

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6251570号

(P6251570)

(45) 発行日 平成29年12月20日(2017.12.20)

(24) 登録日 平成29年12月1日(2017.12.1)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00 Z N A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 16 (全 107 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-529432 (P2013-529432)	(73) 特許権者	504090190
(86) (22) 出願日	平成23年9月21日(2011.9.21)		アルター・バイオサイエンス・コーポレー ション
(65) 公表番号	特表2013-541335 (P2013-541335A)		アメリカ合衆国 フロリダ州 33025 ミラマー ノース・コマー・パークウ エイ 2810号
(43) 公表日	平成25年11月14日(2013.11.14)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/052545	(74) 代理人	100189131
(87) 国際公開番号	W02012/040323		弁理士 佐伯 拓郎
(87) 国際公開日	平成24年3月29日(2012.3.29)	(74) 代理人	100182486
審査請求日	平成26年9月18日(2014.9.18)		弁理士 中村 正展
(31) 優先権主張番号	61/384,817	(74) 代理人	100158872
(32) 優先日	平成22年9月21日(2010.9.21)		弁理士 牛山 直子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100147289
(31) 優先権主張番号	61/527,911		弁理士 佐伯 裕子
(32) 優先日	平成23年8月26日(2011.8.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

前置審査

最終頁に続く

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

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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

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

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

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

第1融合タンパク質のIL-15ドメインが、第2融合タンパク質の可溶性IL-15Rドメインと結合して可溶性融合タンパク質複合体を形成し、該IL-15ポリペプチドは成熟IL-15配列の72位でNからDへの置換を有するIL-15変異体(IL-15N72D)であり、該IL-15RポリペプチドはIL-15R_{sushi}結合ドメインを含んでいる、

可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 2】

第1及び第2生物活性ポリペプチドの一方が第1可溶性T細胞受容体(TCR)若しく

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

【請求項3】

Fcドメインに融合したIL-15R sushi結合ドメイン(IL-15R Su/Fc)及びN72D突然変異を含むIL-15変異体ポリペプチド(IL-15N72D)を含んでなる(IL-15N72D:IL-15R Su/Fc複合体)、請求項1に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項4】

請求項1～3の何れか一項に記載の第1融合タンパク質をコードする配列を有する、核酸。

10

【請求項5】

請求項1～3の何れか一項に記載の第2融合タンパク質をコードする配列を有する、核酸。

【請求項6】

請求項4に記載の核酸を含んでなる、DNAベクター。

【請求項7】

請求項5に記載の核酸を含んでなる、DNAベクター。

【請求項8】

請求項4及び5に記載の核酸を含んでなる、DNAベクター。

20

【請求項9】

請求項4に記載の核酸、請求項5に記載の核酸、及び、請求項4及び5に記載の核酸の群から選ばれる核酸を含んでなる、細胞。

【請求項10】

方法が、

a) 第1融合タンパク質をコードする請求項6に記載のDNAベクターを第1宿主細胞内に導入すること、

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

c) 宿主細胞又は培地から第1融合タンパク質を精製すること、

30

d) 第2融合タンパク質をコードする請求項7に記載のDNAベクターを第2宿主細胞内に導入すること、

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

f) 宿主細胞又は培地から第2融合タンパク質を精製すること、及び

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

を含んでなる、請求項1～3の何れか一項に記載の可溶性融合タンパク質複合体を製造する方法。

40

【請求項11】

方法が、

a) 第1融合タンパク質をコードする請求項6に記載のDNAベクター及び第2融合タンパク質をコードする請求項7に記載のDNAベクターを宿主細胞に導入すること、

b) 細胞又は培地中に融合タンパク質を発現させ、第1融合タンパク質のIL-15ドメインと第2融合タンパク質の可溶性IL-15Rドメインの間を会合させて可溶性融合タンパク質複合体の形成を可能にするのに十分な条件下で、宿主細胞を培地中で培養すること、及び

c) 宿主細胞又は培地から可溶性融合タンパク質複合体を精製すること、
を含んでなる、請求項1～3の何れか一項に記載の可溶性融合タンパク質複合体を製造

50

る方法。

【請求項 1 2】

方法が、

a) 複数の細胞を請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の可溶性融合タンパク質複合体と接触させること、該複数の細胞は更に、請求項 1 に記載の I L - 1 5 ドメインによって認識される I L - 1 5 R 鎖を担持している免疫細胞又は請求項 1 に記載の F c ドメインによって認識される F c 受容体鎖を担持している免疫細胞、及び請求項 1 に記載の生物活性ポリペプチドの少なくとも 1 つによって認識される抗原を担持している標的細胞を含んでいる、

b) 標的細胞上の抗原と、免疫細胞上の I L - 1 5 R 又は F c 受容体鎖の間に、免疫細胞を結合及び活性化するのに十分に、特異的結合複合体（架橋）を形成すること、及び

c) 結合した活性化免疫細胞によって標的細胞を殺傷すること、
を含んでなる、インビトロで標的細胞を殺傷する方法。

【請求項 1 3】

疾患関連抗原を認識する生物活性ポリペプチドを含んでいる請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の可溶性融合タンパク質複合体を含んでなる、疾患細胞が疾患関連抗原を発現している、患者の疾患を予防又は治療するための医薬組成物。

【請求項 1 4】

I L - 1 5 R 鎖又は F c 受容体鎖を担持している免疫細胞を、疾患関連抗原を認識する生物活性ポリペプチドを含んでいる請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の可溶性融合タンパク質複合体と混合することによって得られる免疫細胞 - 融合タンパク質複合体混合物を含んでなる、疾患細胞が疾患関連抗原を発現している、患者の疾患を予防又は治療するための医薬組成物。

【請求項 1 5】

疾患が癌又はウィルス感染症である、請求項 1 3 又は 1 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の可溶性融合タンパク質複合体を含んでなる、哺乳動物における免疫応答を刺激又は抑制するための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

（関連出願）

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

【0 0 0 2】

（政府の支援）

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

【背景技術】

【0 0 0 3】

多価分子の形成を介して有効親和性を増大すること、或いは複数の特定分子の形成を介して認識の範囲を広げることの何れかを目的とする多量体標的タンパク質を作ることの有用性を過去の研究が明らかにしている。多種のタンパク質相互作用ドメインが2価及び多価結合部位を有する組み換えタンパク質を作るために用いられてきた。初めに、ロイシンのジッパードメインに対する標的ドメインの融合が一般に二量化に用いられた。この手法では、ロイシンジッパードメインの疎水性相互作用が並行螺旋中の規則的間隔のロイシンによって介在され、それと同時に二量化の相手が、主に荷電される残基である、疎水性コアのすぐ手前にある別のアミノ酸によって認識され、塩橋を形成する（1 ~ 3）。この相互作用はタンパク質の F o s と J u n ファミリーによって例示され、これは標的ドメ

10

20

30

40

50

ン特異性の有意な障害なしで優先的にヘテロ二量体を形成する。この手法は多量体を作るための多目的な骨格を提供する（４、５）。しかしながら、治療用タンパク質の開発に対するこの手法の実用性に著しく影響を与える制限がある。最も顕著には、F o sとJ u nは殆ど例外なく核内に蓄積される細胞内タンパク質である。従って、可溶性で分泌型のF o sとJ u nの融合は通常、バキュロウィルス感染又は安定に形質転換された昆虫細胞系を用いて、比較的低い収量で容易には拡張できない製造工程で作られる（６、７）。二重特異性分子を作るために、F o s - J u nに結合している抗体ドメインを細菌細胞又は哺乳動物細胞内に産生したが、主な制限は、精製工程を複雑にしそして全収量を低下する（８、９）サブユニットのホモ二量化であった（８、９）。更に、昆虫又は細菌細胞によって産生されるタンパク質のグリコシル化のパターンの相違が、治療適用で用いられるときに産生物の潜在的な免疫原性についての懸念を引き起こしている。

10

【０００４】

ロイシンジッパーモチーフに加えて、免疫グロブリン（I g G）定常ドメイン、ヘリックス・ターン・ヘリックス自己二量化ペプチド、コラーゲンの三量又は四量サブドメイン及びp 5 3が、それによって多価分子を作る骨格として用いられている（８、１０～１３）。I g G断片を除いて、これらの相互作用ドメインは主として分子骨格として働いて、自らはその他の機能活性を欠いている。更に、これらのドメインを含んでいる融合タンパク質は大抵、安定な多量体形成を促進するための最適化及び特殊化した産生細胞株、そして面倒な又は治療法の開発に関する規制ハードルを負わせる精製方法を必要としている（１０、１２）。これらの骨格の多くは、乏しい薬物動態特性を示しそしてその治療可能性を制限する免疫原性応答のリスクをもたらす非ヒトタンパク質ドメイン又は血漿の非天然成分の何れかの誘導体である。

20

【発明の概要】

【０００５】

本発明は少なくとも２つの可溶性融合タンパク質を有している可溶性融合タンパク質複合体を提供する。ある特定の実施態様では、第１融合タンパク質は、インターロイキン - 1 5（I L - 1 5）ポリペプチド又はその機能的断片に共有結合している第１生物活性ポリペプチドを包含している。第２融合タンパク質は、可溶性インターロイキン 1 5受容体アルファ（I L - 1 5 R ）ポリペプチド又はその機能的断片に共有結合している第２生物活性ポリペプチドを包含している。複合体中で、第１及び第２融合タンパク質の一方又は両方が更に免疫グロブリンF cドメイン又はその機能断片を包含している。複合体中で、第１融合タンパク質のI L - 1 5ドメインは第２融合タンパク質の可溶性I L - 1 5 R と結合して可溶性融合タンパク質複合体を形成する。

30

【０００６】

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

40

【０００７】

ある特定の実施態様では、本発明の可溶性融合複合体中で、T C Rは独立して、及び鎖T C R並びに単鎖T C Rポリペプチドを含んでいるヘテロ二量体から選ばれる。ある特定の実施態様では、単鎖T C Rはペプチドリンカー配列によってT C R V - 鎖と共有結合しているT C R V - 鎖を包含している。ある特定の実施態様では、単鎖T C Rは更に、T C R V - 鎖と共有結合している可溶性T C R C 鎖断片包含している。あ

50

る特定の実施態様では、単鎖 T C R は更に、T C R V - 鎖と共有結合している可溶性 T C R C 鎖断片を包含している。可溶性融合タンパク質複合体のある特定の実施態様では、第 1 生物活性ポリペプチドは T C R ポリペプチド又はその機能的断片を包含し、そして第 2 生物活性ポリペプチドは T C R ポリペプチド又はその機能的断片を包含する。

【 0 0 0 8 】

ある特定の実施態様では、可溶性融合タンパク質複合体中で、第 1 及び第 2 生物活性ポリペプチドの一方又は両方は抗体又はその機能的断片を包含する。ある特定の実施態様では、複合体中の抗体は少なくとも 2 つの異なった抗体を包含する。ある特定の実施態様では、全ての抗体が同じである。少なくとも 2 つの異なった抗体が存在するある特定の実施態様では、抗体は異なった標的分子に結合する。少なくとも 2 つの異なった抗体が存在するある特定の実施態様では、抗体は同じ標的分子上の異なったエピトープに結合する。ある特定の実施態様では、抗体は特定抗原の認識に対して特異的である。

【 0 0 0 9 】

可溶性融合タンパク質複合体のある特定の実施態様では、抗体は単鎖抗体又は単鎖 F v である。ある特定の実施態様では、単鎖抗体は、ポリペプチドリンカー配列によって免疫グロブリン重鎖可変ドメインに共有結合している免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含んでいる。ある特定の実施態様では、第 1 生物活性ポリペプチドは抗体重鎖ポリペプチド又はその機能的断片を含んでおり、そして第 2 生物活性ポリペプチドは抗体軽鎖ポリペプチド又はその機能的断片を含んでいる。

【 0 0 1 0 】

本発明の可溶性融合タンパク質複合体のある特定の実施態様では、I L - 1 5 ポリペプチドは天然型 I L - 1 5 ポリペプチドと異なったアミノ酸配列を有している I L - 1 5 変異体である。ヒト I L - 1 5 ポリペプチドを本明細書では h u I L - 1 5、h I L - 1 5、h u I L 1 5、h I L 1 5、I L - 1 5 野生型 (w t) 等で示し、そしてこの変異体を天然アミノ酸、天然配列中のその位置及び変異アミノ酸を用いて示す。例えば、h u I L 1 5 N 7 2 D は、7 2 位の N の D への置換を含むヒト I L - 1 5 を示す。ある特定の実施態様では、I L - 1 5 変異体は、例えば、天然型 I L - 1 5 ポリペプチドと比べて I L - 1 5 R C 受容体に対する増大した結合活性によって実証されているように、I L - 1 5 アゴニストとして機能する。ある特定の実施態様では、I L - 1 5 変異体は、例えば、天然型 I L - 1 5 ポリペプチドと比べて I L - 1 5 R C 受容体に対する減少した結合活性によって実証されているように、I L - 1 5 アンタゴニストとして機能する。ある特定の実施態様では、I L - 1 5 変異体は天然型 I L - 1 5 ポリペプチドと比べ I L - 1 5 R C 受容体に対して増大した結合親和性又は減少した結合活性を有している。ある特定の実施態様では、I L - 1 5 変異体の配列は天然型 I L - 1 5 の配列と比べて、少なくとも 1 つの (すなわち、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれ以上の) アミノ酸変化を有している。アミノ酸変化は、I L - 1 5 R 及び / 又は I L - 1 5 R C と相互作用する I L - 1 5 のドメインにおける 1 つ又はそれ以上のアミノ酸の置換又は欠失を包含できる。ある特定の実施態様では、アミノ酸変化は成熟ヒト I L - 1 5 配列 (配列番号 5 1) の 8、6 1、6 5、7 2、9 2、1 0 1、1 0 8、又は 1 1 1 位における 1 つ又はそれ以上のアミノ酸置換又は欠失である。例えば、アミノ酸変化は、成熟ヒト I L - 1 5 配列の 8 位の D を N 又は A へ、6 1 位の D を A へ、6 5 位の N を A へ、7 2 位の N を R へ又は 1 0 8 位の Q を A への置換又はこれらの置換の組合わせである。ある特定の実施態様では、アミノ酸変化は、成熟ヒト I L - 1 5 配列の 7 2 位の N を D への置換である。

【 0 0 1 1 】

本発明のある特定の実施態様では、可溶性融合タンパク質複合体中で、F c ドメイン又はその機能的断片は、I g G F c ドメイン、ヒト I g G 1 F c ドメイン、ヒト I g G 2 F c ドメイン、ヒト I g G 3 F c ドメイン、ヒト I g G 4 F c ドメイン、I g A F c ドメイン、I g D F c ドメイン、I g E F c ドメイン、及び I g M F c ドメイン：又

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

10

【0012】

可溶性融合タンパク質複合体のある特定の実施態様では、第1生物活性ポリペプチドはポリペプチドリンカー配列によってIL-15ポリペプチド（又はその機能的断片）と共有結合している。可溶性融合タンパク質複合体のある特定の実施態様では、第2生物活性ポリペプチドはポリペプチドリンカー配列によってIL-15Rポリペプチド（又はその機能的断片）と共有結合している。可溶性融合タンパク質複合体のある特定の実施態様では、IL-15Rポリペプチド（又はその機能的断片）はポリペプチドリンカー配列によってFcドメイン（又はその機能的断片）と共有結合している。それぞれのポリペプチドリンカー配列は独立して選択できる。ある特定の実施態様では、ポリペプチドリンカー配列は同一である。ある特定の実施態様では、これは異なっている。

20

【0013】

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

【0014】

ある特定の実施態様では、抗体ドメインに対する抗原はCD抗原、サイトカイン又はケモカインの受容体或いはリガンド、生育因子の受容体又はリガンド、細胞接着分子、MHC/MHC様分子、Fc受容体、Toll様受容体、NK受容体、TCR、BCR、陽性/陰性同時刺激受容体又はリガンド、死受容体又はリガンド、腫瘍関連抗原、或いはウィルスがコードする抗原の1つ又はそれ以上である。

30

【0015】

可溶性融合タンパク質複合体のある特定の実施態様では、IL-15Rポリペプチドは、IL-15ポリペプチドと結合できるIL-15受容体アルファの細胞外ドメインを包含する。可溶性ヒトIL-15Rポリペプチドを本明細書では、hIL-15R、huIL-15R、hIL-15R、huIL-15Rなどと呼ぶ。ある特定の実施態様では、IL-15RポリペプチドはIL-15R sushi (Su)ドメイン又はIL-15R E3ドメインの何れかを包含する。

40

【0016】

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

50

【 0 0 1 7 】

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

【 0 0 1 8 】

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

10

【 0 0 1 9 】

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

【 0 0 2 0 】

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

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

20

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

c) 宿主細胞又は培地から第1融合タンパク質を精製すること、

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

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

f) 宿主細胞又は培地から第2融合タンパク質を精製すること、及び

g) 第1融合タンパク質の1 L - 1 5 ドメインと第2融合タンパク質の可溶性1 L - 1 5 R の間を結合させるのに十分な条件下で第1及び第2融合タンパク質を混合して可溶性融合タンパク質複合体を形成すること；

30

の工程を包含する。

【 0 0 2 1 】

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

【 0 0 2 2 】

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

40

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

b) 細胞中又は培地中に融合タンパク質を発現して第1融合タンパク質の1 L - 1 5 ドメインと第2融合タンパク質の可溶性1 L - 1 5 R ドメインの間を結合させるのに十分な条件下で宿主細胞を培地中で培養して可溶性融合タンパク質複合体を形成すること、

c) 宿主細胞又は培地から可溶性融合タンパク質複合体を精製すること；
の工程を包含する。

【 0 0 2 3 】

ある特定の実施態様では、方法は更に、発現ベクターから発現されたポリペプチドの間

50

にジスルフィド結合を形成するのに十分な条件下で第1及び第2融合タンパク質を混合することを包含する。

【0024】

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

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

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

c) 宿主細胞又は培地から可溶性融合タンパク質複合体を精製すること；
の工程を包含している。

【0025】

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

【0026】

本発明は標的細胞を死滅させる方法を提供し、方法は：

a) 複数の細胞を本発明の可溶性融合タンパク質複合体と接触させること（ここで複数の細胞は、IL-15ドメインによって認識されるIL-15R鎖を有する免疫細胞、又はFcドメインによって認識されるFc受容体鎖を有している免疫細胞、及び少なくとも1つの生物活性ポリペプチドによって認識される抗原を有している標的細胞を更に包含する）、

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

c) 結合して活性化した免疫細胞によって標的細胞を死滅させること；
の工程を包含している。

【0027】

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

【0028】

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

【0029】

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

【0030】

本発明は、病的細胞が疾患関連抗原を発現している、患者における疾患を予防又は治療する方法を提供し、方法は、

a) 疾患関連抗原を認識する生物活性ポリペプチドを有している本発明の可溶性融合タンパク質複合体を患者に投与すること；

b) 抗原発現病的細胞と免疫細胞を発現しているIL-15R又はFc受容体との間で、免疫細胞を局在化するのに十分な、特定結合複合体（架橋）を形成すること；及び

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

【0031】

本発明は、病的細胞が疾患関連抗原を発現している、患者における疾患を予防又は治療する方法を提供し、方法は、

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

b) 免疫細胞と融合タンパク質複合体との混合物を患者にとうよすること；

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

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

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

【0032】

病的細胞が疾患関連抗原を発現している、患者における疾患を予防又は治療する方法のある特定の実施態様では、疾患は癌又はウィルス感染症である。ある特定の実施態様では、疾患関連抗原はペプチド/MHC複合体である。

【0033】

本発明は、本発明の可溶性融合タンパク質複合体の有効量を哺乳動物に投与することによって哺乳動物における免疫応答を刺激する方法を提供する。

【0034】

本発明は、本発明の何れか1つの可溶性融合タンパク質複合体の有効量を哺乳動物に投与することによって哺乳動物における免疫応答を抑制する方法を提供する。

【0035】

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

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

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

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

【0036】

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

【0037】

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

【0038】

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

10

20

30

40

50

【 0 0 3 9 】

一態様では、本発明は、インターロイキン - 15 (I L - 15) : インターロイキン - 15 受容体アルファ (I L - 15 R) 融合タンパク質複合体を製造する方法を提供し、方法は、I L - 15 (又はI L - 15 変異体) をコードする第1 DNA ベクター及びI L - 15 R 融合タンパク質をコードする第2 DNA ベクターを宿主細胞 (例えば哺乳動物の細胞) 内へ導入すること; I L - 15 (又はI L - 15 変異体) 及びI L - 15 R 融合タンパク質を発現するのに十分な条件下で宿主細胞を培地内で培養すること; 及びI L - 15 : I L - 15 融合タンパク質複合体を宿主細胞又は培地から精製すること: を含んでいる。

【 0 0 4 0 】

別の態様では、本発明は、I L - 15 R / F c 融合タンパク質を含んでいるI L - 15 : I L - 15 R 複合体を製造する方法を提供し、方法は、I L - 15 (又はI L - 15 変異体) をコードする第1 DNA ベクター及びI L - 15 R / F c 融合タンパク質をコードする第2 DNA ベクターを宿主細胞内へ導入すること; I L - 15 (又はI L - 15 変異体) 及びI L - 15 R / F c 融合タンパク質を発現するのに十分な条件下で宿主細胞を培地内で培養すること; 及びI L - 15 : I L - 15 R 複合体を宿主細胞又は培地から精製すること: を含んでいる。

【 0 0 4 1 】

別の態様では、本発明は、I L - 15 R / F c 融合タンパク質を含んでいるI L - 15 : I L - 15 R 融合タンパク質複合体を製造する方法を提供し、方法は、宿主細胞中でI L - 15 (又はI L - 15 変異体) 及びI L - 15 R / F c 融合タンパク質を同時発現すること; I L - 15 (又はI L - 15 変異体) 及びI L - 15 R / F c 融合タンパク質を発現するのに十分な条件下で宿主細胞を培地中で培養すること; 及びI L - 15 : I L - 15 R / F c 融合タンパク質複合体を宿主細胞又は培地から精製すること: を含んでいる。

【 0 0 4 2 】

別の態様では、本発明は、宿主細胞中でI L - 15 N 7 2 D 及びI L - 15 R S u / F c 融合タンパク質を同時発現すること; I L - 15 N 7 2 D 及びI L - 15 R S u / F c 融合タンパク質を発現するのに十分な条件下で宿主細胞を培地中で培養すること; 及びI L - 15 N 7 2 D : I L - 15 R S u / F c 融合タンパク質複合体を宿主細胞又は培地から精製することを含んでいる、I L - 15 N 7 2 D : I L - 15 R S u / F c 融合タンパク質複合体を製造する方法を提供する。ここでI L - 15 N 7 2 D : I L - 15 R S u / F c 複合体のI L - 15 結合部位は両方とも完全に塞がっている。

【 0 0 4 3 】

別の態様では、本発明は、I L - 15 又はI L - 15 変異体をコードする第1 ポリヌクレオチド及びI L - 15 受容体融合タンパク質をコードする第2 ポリヌクレオチドを含有している細胞を提供する。一実施態様では、細胞はI L - 15 N 7 2 D をコードする第1 発現ベクター及びI L - 15 R S u / F c 融合タンパク質をコードする第2 発現ベクターを含んでいる。

【 0 0 4 4 】

別の態様では、本発明は、二量体I L - 15 R S u / F c 及び2つのI L - 15 N 7 2 D 分子を含有している単離された完全に塞がっているI L - 15 N 7 2 D : I L - 15 R S u / F c 複合体を提供する。一実施態様では、複合体は90 ~ 95 % 又はそれ以上精製されて完全に塞がれていて; 5 . 6 ~ 6 . 5 の等電点を有し; 約114 k D a の分子量を有し; そして/ 或いはI L - 15 N 7 2 D 及びI L - 15 R S u / F c ポリペプチドの何れか又は両方上でグリコシル化される。

【 0 0 4 5 】

別の態様では、本発明は、本明細書中で詳しく説明されている発現及び精製方法の何れかによって産生される、単離されて完全に塞がっているI L - 15 N 7 2 D : I L - 15 R S u / F c 複合体を提供する。

【 0 0 4 6 】

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

【 0 0 4 7 】

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

【 0 0 4 8 】

上記態様又は本明細書で詳細に説明されている本発明の他の態様の多様な実施態様では、I L - 1 5 R 融合タンパク質は、生物活性ポリペプチド（例えば、I g G の重鎖定常ドメイン、I g G の重鎖定常ドメインの F c ドメイン）と共有結合している可溶性 I L - 1 5 R を含んでいる。上記態様の本発明の別の実施態様では、I L - 1 5 は、第 2 生物活性ポリペプチドと共有結合している I L - 1 5 を含んでいる。別の実施態様では、細胞又は培地から I L - 1 5 : I L - 1 5 R 複合体を精製することは、I L - 1 5 : I L - 1 5 R 融合タンパク質複合体と特異的に結合する親和性試薬上に I L - 1 5 : I L - 1 5 R 複合体を捕獲することを含んでいる。別の実施態様では、I L - 1 5 R 融合タンパク質は、I L - 1 5 R / F c 融合タンパク質を含んでいて、親和性試薬は F c ドメインと特異的に結合する。別の実施態様では、親和性試薬はプロテイン A 又はプロテイン G である。別の実施態様では、親和性試薬は抗体である。別の実施態様では、宿主細胞又は培地から I L - 1 5 : I L - 1 5 R 複合体を精製することはイオン交換クロマトグラフィーを含んでいる。別の実施態様では、宿主細胞又は培地から I L - 1 5 : I L - 1 5 R 複合体を精製することはサイズ排除クロマトグラフィーを含んでいる。別の実施態様では、I L - 1 5 R は I L - 1 5 R S u s h i (I L - 1 5 R S u) を含んでいる。別の実施態様では、I L - 1 5 は、突然変異 I L - 1 5 （例えば、I L - 1 5 N 7 2 D ）である。別の実施態様では、I L - 1 5 : I L - 1 5 R 複合体の I L - 1 5 結合部位は完全に塞がっている。別の実施態様では、I L - 1 5 : I L - 1 5 R S u / F c 複合体の両方の I L - 1 5 結合部位は完全に塞がっている。別の実施態様では、I L - 1 5 : I L - 1 5 R 複合体は複合体電荷又はサイズ特性に基づいて精製される。別の実施態様では、完全に塞がっている I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R S u / F c 融合タンパク質複合体は複合体電荷特性に基づいて陰イオン交換クロマトグラフィーで精製される。別の実施態様では、完全に塞がっている I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R S u / F c 融合タンパク質複合体は、低いイオン強度の中性 p H 緩衝剤を用いる結合条件及びイオン強度を増大させる緩衝剤を用いる溶出条件と共に 4 級アミンベースの樹脂を用いて精製される。

【 0 0 4 9 】

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

すなわち、本発明は、以下の（ 1 ）から（ 1 0 8 ）に関する。

（ 1 ）少なくとも 2 つの可溶性融合タンパク質を含んでなる、可溶性融合タンパク質複合体であって、第 1 の融合タンパク質が、インターロイキン - 1 5 (I L - 1 5) ポリペプチド（ b ）又はその機能的断片と共有結合している第 1 生物活性ポリペプチド（ a ）を含み、そして、第 2 の融合タンパク質が、可溶性インターロイキン - 1 5 受容体アルファ（ I L - 1 5 R ）ポリペプチド（ d ）又はその機能的断片と共有結合している第 2 生物活性ポリペプチド（ c ）を含み、第 1 及び第 2 融合タンパク質の一方又は両方が更に免疫グロブリン F c ドメイン又はその機能的断片を含み、第 1 融合タンパク質の I L - 1 5 ドメ

10

20

30

40

50

インが第2融合タンパク質の可溶性IL-15R ドメインと結合して可溶性融合タンパク質複合体を形成している、可溶性融合タンパク質複合体。

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

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

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

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

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

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

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

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

(10) 1本鎖TCRが、TCR V-鎖と共有結合している可溶性TCR C鎖断片を更に含んでいる、前記(8)又は(9)に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(11) 第1生物活性ポリペプチドが、TCRポリペプチド又はその機能的断片を含み、そして第2生物活性ポリペプチドが、TCRポリペプチド又はその機能的断片を含んでいる、前記(1)に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

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

(13) 抗体が、特定抗原の認識に特異的である、前記(12)に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(14) 抗体が、1本鎖抗体又は1本鎖Fvである、前記(12)又は(13)に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(15) 1本鎖抗体が、ポリペプチドリinker配列によって免疫グロブリン重鎖可変領域と共有結合している免疫グロブリン軽鎖可変領域を含んでいる、前記(14)に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(16) 第1生物活性ポリペプチドが抗体重鎖ポリペプチド又はその機能的断片を含み、そして第2生物活性ポリペプチドが抗体軽鎖ポリペプチド又はその機能的断片を含んでいる、前記(1)に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(17) IL-15ポリペプチドが、天然のIL-15ポリペプチドとは異なるアミノ酸配列を含んでいるIL-15変異体である、前記(1)に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(18) IL-15変異体が、IL-15アゴニスト又はアンタゴニストとして機能する、前記(17)に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(19) IL-15変異体が、天然のIL-15ポリペプチドと比較して、IL-15R C受容体に対する増大した又は減少した結合活性を有している、前記(17)に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(20) IL-15変異体の配列が、天然のIL-15配列と比較して少なくとも1つのアミノ酸変化を有している、前記(17)~(19)の何れかに記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(21) アミノ酸変化が、IL-15R及び/又はIL-15R Cと相互作用するIL-15のドメイン中のアミノ酸置換又は欠失である、前記(20)に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

10

20

30

40

50

(22) アミノ酸変化が、成熟ヒト IL-15 配列 (配列番号 51) の 6、8、10、61、65、72、92、101、104、105、108、109、111、又は 112 位における 1 つ又はそれ以上のアミノ酸置換又は欠失である、前記 (20) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(23) アミノ酸変化が、成熟ヒト IL-15 配列の 6 位の I を S に、8 位の D を N 若しくは A に、61 位の D を A に、65 位の N を A に、72 位の N を R に、104 位の V を P に、又は 108 位の Q を A に置換すること、又はこれらの置換の何れかの組み合わせである、前記 (22) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(24) アミノ酸変化が、IL-15 アンタゴニスト活性又は天然の IL-15 ポリペプチドと比較して IL-15 R_C 受容体に対する減少した結合活性を有する IL-15 変異体をもたらす、前記 (23) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(25) アミノ酸変化が、成熟ヒト IL-15 配列の 72 位で N を D に置換することである、前記 (20) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(26) アミノ酸変化が、IL-15 アゴニスト活性又は天然の IL-15 ポリペプチドと比較して IL-15 R_C 受容体に対する増大した結合活性を有する IL-15 変異体をもたらす、前記 (25) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(27) Fc ドメイン又はその機能的断片が、IgG Fc ドメイン、ヒト IgG1 Fc ドメイン、ヒト IgG2 Fc ドメイン、ヒト IgG3 Fc ドメイン、ヒト IgG4 Fc ドメイン、IgA Fc ドメイン、IgD Fc ドメイン、IgE Fc ドメイン、及び IgM Fc ドメインからなる群より選ばれる Fc ドメインを含んでいる、前記 (1) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(28) Fc ドメインが、変化した相補体又は Fc 受容体結合特性を有する Fc ドメインをもたらすアミノ酸変化を含んでいる、前記 (27) に記載の可溶性融合タンパク質。

(29) アミノ酸変化が、IgG1 C_H2 の 234 及び 235 位のロイシン残基の (抗体コンセンサス配列に基づいてナンバリング) (すなわち、...PELLGG...) アラニン残基による置換 (すなわち、...PEAAGG...)、IgG1 C_H2 の 332 位のリジン残基の (抗体コンセンサス配列に基づいてナンバリング) (すなわち、...KCKSL...) アラニン残基による置換 (すなわち、...KCA SL...)、又はこれらの何れかの組み合わせからなる群より選ばれる、前記 (28) に記載の可溶性融合タンパク質。

(30) 第 1 生物活性ポリペプチドが、ポリペプチドリinker 配列によって IL-15 ポリペプチド (又はその機能的断片) と共有結合している、前記 (1) ~ (29) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(31) 第 2 生物活性ポリペプチドが、ポリペプチドリinker 配列によって IL-15 R_C ポリペプチド (又はその機能的断片) と共有結合している、前記 (1) ~ (30) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(32) IL-15 R_C ポリペプチド (又はその機能的断片) が、ポリペプチドリinker 配列によって Fc ドメイン (又はその機能的断片) と共有結合している、前記 (1) ~ (31) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

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

(34) ペプチド抗原が、腫瘍関連ポリペプチド又はウィルスがコードするポリペプチドに由来している、前記 (33) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(35) 抗体ドメインに対する抗原が、細胞表面受容体又はリガンドを含んでいる、前記 (13) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(34) 抗体ドメインに対する抗原が、CD 抗原、サイトカイン又はケモカインの受容体又はリガンド、成長因子受容体又はリガンド、細胞接着分子、MHC / MHC 様分子、Fc 受容体、Toll 様受容体、NK 受容体、TCR、BCR、陽性 / 陰性同時刺激受容体又はリガンド、死受容体又はリガンド、腫瘍関連抗原、或いはウィルスがコードする抗原を含んでいる、前記 (13) 又は (35) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

10

20

30

40

50

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(5 1) 方法が、a) 第 1 融合タンパク質をコードする前記 (4 5) に記載の DNA ベクター及び第 2 融合タンパク質をコードする前記 (4 6) に記載の DNA ベクターを宿主細胞に導入すること、b) 細胞又は培地中に融合タンパク質を発現して、第 1 融合タンパク質の I L - 1 5 ドメインと第 2 融合タンパク質の可溶性 I L - 1 5 R ドメインの間を会合させて可溶性融合タンパク質複合体の形成を可能にするのに十分な条件下で宿主細胞を

10

20

30

40

50

培地中で培養すること、c) 宿主細胞又は培地から可溶性融合タンパク質複合体を精製すること、を含んでなる、前記(1)に記載の可溶性融合タンパク質複合体を製造する方法。

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

(53) 方法が、a) 第1及び第2融合タンパク質をコードする前記(47)に記載のDNAベクターを宿主細胞内に導入すること、b) 細胞又は培地中に融合タンパク質を発現して、第1融合タンパク質のIL-15ドメインと第2融合タンパク質の可溶性IL-15Rドメインの間を会合させて可溶性融合タンパク質複合体の形成を可能にする、及び前記(46)に記載の核酸によってコードされるポリペプチドの間にジスルフィド結合を形成させるのに十分な条件下で宿主細胞を培地中で培養すること、c) 宿主細胞又は培地から可溶性融合タンパク質複合体を精製することを含んでなる、前記(1)に記載の可溶性融合タンパク質複合体を製造する方法。

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

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

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

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

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

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

(60) 疾患細胞が疾患関連抗原を発現している、患者の疾患を予防又は治療する方法であって、方法が、a) 疾患関連抗原を認識する生物活性ポリペプチドを含んでいる前記(1)~(41)の何れかに記載の可溶性融合タンパク質複合体を患者に投与すること、b) 抗原発現疾患細胞と免疫細胞を発現しているIL-15R又はFc受容体の間に免疫細胞を局在化するのに十分に特異的結合複合体(架橋)を形成すること、及びc) 患者の疾患を予防又は治療するのに十分に疾患細胞を損傷又は殺傷すること、を含んでなる、方法。

(61) 疾患細胞が疾患関連抗原を発現している、患者の疾患を予防又は治療する方法であって、方法が、a) IL-15R鎖又はFc受容体鎖を担持している免疫細胞を疾患関連抗原を認識する生物活性ポリペプチドを含んでいる前記(1)~(41)の何れかに記載の可溶性融合タンパク質複合体と混合すること、b) 免疫細胞-融合タンパク質複合体混合物を患者に投与すること、c) 抗原発現疾患細胞と免疫細胞を発現しているIL-15R又はFc受容体の間に免疫細胞を局在化するのに十分に特異的結合複合体(架橋)を

10

20

30

40

50

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

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

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

(64) 前記(1)～(41)の何れかに記載の可溶性融合タンパク質複合体の有効量を哺乳動物に投与することを含んでなる、哺乳動物における免疫応答を刺激する方法。

(65) 前記(1)～(41)の何れかに記載の可溶性融合タンパク質複合体の有効量を哺乳動物に投与することを含んでなる、哺乳動物における免疫応答を抑制する方法。

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

(67) 検出可能な標識が、ビオチン、ストレプトタビジン、酵素又はその触媒活性断片、放射性核種、ナノ粒子、常磁性金属イオン、又は蛍光性、リン光性若しくはケミルミネセント分子である、前記(66)に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(68) 方法が、a)抗原と可溶性融合タンパク質複合体の生物活性ポリペプチドの間に特異的結合複合体を形成する条件下で、細胞又は組織を前記(66)に記載の少なくとも1つの可溶性融合タンパク質複合体と接触させること、b)抗原に結合しなかった何れの可溶性融合タンパク質複合体も除去するのに適している条件下で細胞又は組織を洗浄すること、及びc)抗原を含有している細胞又は組織の指標であるとして、特異的結合複合体を検出することを含んでなる、細胞又は組織上に提示される抗原を含有している細胞又は組織を検出する方法。

(69) 生物活性ポリペプチドがTCRを含み、そして抗原がTCRによって認識されるMHC又はHLA分子内に提示されるペプチド抗原を含んでいる、前記(68)に記載の方法。

(70) 抗原提示のコピー数が細胞当たり多くて1000コピーである、前記(68)又は(69)に記載の方法。

(71) 方法がインビボ、インビトロ、又はエクスピボで行われる、前記(68)～(70)の何れかに記載の方法。

(72) 第1可溶性融合タンパク質複合体と第2可溶性融合タンパク質複合体の二量体を形成すること(ここで、それぞれの融合タンパク質複合体の第1生物活性ポリペプチドと第2生物活性ペプチドの結合部位は同一又は異なっている)を含んでなる、前記(2)又は(12)に記載の可溶性融合タンパク質複合体の分子当りの結合活性を増大する方法。

(73) 分子当りの結合活性が、10%又はそれ以上、20%又はそれ以上、30%又はそれ以上、40%又はそれ以上、50%又はそれ以上、60%又はそれ以上、或いは70%又はそれ以上増大する、前記(72)に記載の方法。

(74) 第1可溶性融合タンパク質複合体と第2可溶性融合タンパク質複合体の二量体を形成することを含んでなる、前記(2)又は(12)に記載の可溶性融合タンパク質複合体の分子当りのIL-15活性を増大する方法。

(75) 方法が、a)IL-15をコードする第1DNAベクター及びIL-15R融合タンパク質をコードする第2DNAベクターを宿主細胞内に導入すること、b)IL-15とIL-15R融合タンパク質を発現するのに十分な条件下で宿主細胞を培地中で培養すること、及びc)IL-15:IL-15R融合タンパク質複合体を宿主細胞又は培地から精製することを含んでなる、インターロイキン-15(IL-15):インターロイキン-15受容体アルファ(IL-15R)融合タンパク質複合体を製造する方法。

(76) IL-15R融合タンパク質複合体が、生物活性ポリペプチドと共有結合している可溶性IL-15Rを含んでいる、前記(75)に記載の方法。

(77) 生物活性ポリペプチドが、IgGの重鎖定常ドメインである、前記(76)に記載の方法。

(78) 生物活性ポリペプチドが、IgGの重鎖定常ドメインのFcドメインである、前

10

20

30

40

50

記(76)に記載の方法。

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

(80) 方法が、a) IL-15 をコードする第1 DNA 及び IL-15 R / Fc 融合タンパク質をコードする第2 DNA を宿主細胞内に導入すること、b) IL-15 と IL-15 R / Fc 融合タンパク質を発現するのに十分な条件下で宿主細胞を培地中で培養すること、及び c) IL-15 : IL-15 R / Fc 複合体を宿主細胞又は培地から精製することを含んでなる、IL-15 R / Fc 融合タンパク質を含んでいる IL-15 : IL-15 R 複合体を製造する方法。

(81) 方法が、a) IL-15 と IL-15 R / Fc 融合タンパク質を宿主細胞内で同時発現すること、b) IL-15 と IL-15 R / Fc 融合タンパク質を発現するのに十分な条件下で、宿主細胞を培地中で培養すること、及び c) IL-15 : IL-15 R / Fc 融合タンパク質複合体を宿主細胞又は培地から精製することを含んでなる、IL-15 R / Fc 融合タンパク質を含んでいる IL-15 : IL-15 R 融合タンパク質複合体を製造する方法。

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

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

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

(85) 親和性試薬が抗体である、前記(82)又は(83)に記載の方法。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(95) a) 宿主細胞内で IL-15 N72D と IL-15 R Su / Fc 融合タンパク質を同時発現すること、b) IL-15 N72D と IL-15 R Su / Fc 融合タンパク質を発現するのに十分な条件下で宿主細胞を培地中で培養すること、及び c) IL-15 N72D : IL-15 R Su / Fc 融合タンパク質複合体を宿主細胞又は培地から精製すること(ここで、IL-15 N72D : IL-15 R Su / Fc 複合体の両方の IL-15 結合部位は完全に占有されている)を含んでなる、IL-15 N72D : IL-

10

20

30

40

50

15R Su/Fc 融合タンパク質複合体を製造する方法。

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

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

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

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

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

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

(102) 複合体が、5.6~6.5の間の等電点を有している、前記(100)に記載の複合体。

(103) 約114kDaの分子量を有している、前記(100)に記載の複合体。

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

(105) 前記(75)~(97)の何れかに記載の方法に従って産生された、単離された完全に占有されている IL-15N72D: IL-15R Su/Fc 複合体。

(106) 方法が、前記(100)~(105)の何れかに記載の完全に占有されている IL-15N72D: IL-15R Su/Fc 複合体を対象に投与することを含んでなる、対象における免疫応答を調節する方法。

(107) 免疫応答を増大又は減少する、前記(106)に記載の方法。

(108) 方法が、前記(100)~(105)の何れかに記載の完全に占有されている IL-15N72D: IL-15R Su/Fc 複合体を対象に投与することを含んでなる、腫瘍を有している対象における免疫応答を増強する方法。

その他の実施態様は以下の開示から明確になるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】図1は、多重鎖ポリペプチドからなるT2分子(T2M)として示される融合タンパク質を示す。

【図2】図2は、正確なヒトIL15R Sushi 遺伝子挿入を含有しているベクター(pMC.c264scTCR-Su/IgG1.PUR)を示す。

【図3】図3は、c264scTCR/huIL15R Sushi/huIgG1 核酸配列の配列(配列番号34)を示す。

【図4】図4は、c264scTCR/huIL15R Sushi/huIgG1 ペプチドのタンパク質配列(配列番号35)を示す。

【図5】図5は、c264scTCR/Sushi/huIgG1-pMSGVc 又は pMSGVc264SuIg と表わされるベクターを示す。

【図6】図6は、c264scTCR/huIL15R Sushi/huIgG1 核酸配列の配列(配列番号36)を示す。

【図7】図7は、c264scTCR/huIL15R Sushi/huIgG1 ペプチドのタンパク質配列(配列番号37)を示す。

【図8】図8は、c149scTCR/IL15N72D-pMSGVn 又は pMSGV

10

20

30

40

50

- c 1 4 9 I L 1 5 N 7 2 D と表わされるベクターを示す。

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

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

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

10

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

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

20

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

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

30

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

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

40

【図 1 8】図 1 8 A ~ B は、I L - 1 5 応答免疫細胞の増殖を促進する T 2 タンパク質の能力を確認するインビボ霊長類モデル実験の結果を示す。T 2 タンパク質を注射した後 5

50

日目に血液を採取してCD8メモリーT細胞マーカー（CD8及びCD95）（A）及びNK細胞マーカー（CD56及びCD16）（B）について染色を行い、そして処置前に採取した血液と比較した。

【図19】図19A～Bは、T2分子のIgG1Fcドメインの結合活性を特徴付ける細胞結合アッセイを示す。A. U937細胞を有しているFcガンマ受容体を33nMのT2タンパク質（c264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1鎖からなる）、c264scTCR/huIgG1又はA2AL9scTCR/IgG1（陰性コントロール）と20分間培養したアッセイの結果を示しているフローサイトメトリー分析である。細胞を1回洗浄して、PEと共役したp53（aa264～272）ペプチド/HLA-A2四量体と20分培養した。U937細胞表面上でのFcガンマ受容体との結合をフローサイトメトリーで分析した。B. 示されているタンパク質の一連の濃度を用いる同様のU937結合試験を実施して染色細胞に対する平均蛍光強度をプロットした結果を示すフローサイトメトリー分析。

10

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

20

【図21】図21A及びBは、HLA-A2陽性T2細胞を各種濃度のp53aa264～272ペプチドでパルスして、T2タンパク質の細胞表面のペプチド/MHC標的との結合活性を評価するアッセイの結果を示す。ペプチド負荷細胞をそれぞれ83mMのT2タンパク質（c264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1鎖からなる）、c264scTCR/huIgG1又はA2AL9scTCR/IgG1（陰性コントロール）と培養した。細胞をビオチニル化した抗TCR Ab（BF1）及びストレプトタビジン-PEと培養した。次いで、細胞をフローサイトメトリーで抗体染色について分析して（A）、異なった濃度のペプチドを負荷した細胞の平均蛍光染色強度をプロットした（B）。

30

【図22】図22は、c149scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1又はc264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1のT2分子（細胞培養上澄液中）を、抗ヒトTCR抗体BF1でコーティングしたマイクロタイタープレート上に捕獲して、結合したT2分子を抗ヒトTCR抗体W4F-BNを用いて検出したELISAの結果を示す。

【図23】図23は、c149scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1又はc264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1のT2分子（細胞培養上澄液中）を、ヤギ抗ヒトIgG抗体でコーティングしたマイクロタイタープレート上に捕獲して、結合したT2分子を抗ヒトIL-15抗体を用いて検出したELISAの結果を示す。

40

【図24】図24は、c149scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1のT2分子（細胞培養上澄液中）をヤギ抗ヒトIgG抗体又は抗ヒトTCR抗体BF1の何れかでコーティングしたマイクロタイタープレート上に捕獲したELISAの結果を示す。BF1が捕獲したT2分子を抗ヒトTCR抗体W4F-BN又は抗ヒトIL-15抗体の何れかで検出した。ヤギ抗ヒトIgG Abが捕獲したT2分子をp53（aa149～157）ペプチド/HLA-A2ス

50

トレプタビジン - HRP 四量体又は p 5 3 (a a 2 6 4 ~ 2 7 2) ペプチド / H L A - A 2 ストレプタビジン - HRP 四量体の何れかで検出した。

【図 2 5】図 2 5 は、2 つの異なったドメイン、すなわち、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 1 4 9 s c T C R / h u I L 1 5 R S u s h i / h u I g G 1 鎖を含む T 2 分子を特徴付けたフローサイトメトリーアッセイの結果を示す。これらの分子の F c 及び T C R 活性を U 9 3 7 細胞を有している F c - ガンマ受容体との結合及び p 5 3 (a a 2 6 4 ~ 2 7 2) ペプチド / H L A - A 2 四量体による検出に続くフローサイトメトリーによって評価した。

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

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

【図 2 8】図 2 8 は、I L - 1 5 ドメインに各種の点突然変異を有する T 2 分子の I L - 1 5 活性アッセイの結果を、3 2 D 細胞の増殖により測定して示す。

【図 2 9】図 2 9 は、I L - 1 5 及び I g G F c ドメインに各種の点突然変異を有する T 2 分子を用いる抗体依存性細胞傷害活性アッセイの結果を、ペプチド負荷 T 2 標的細胞の P B M C 依存性溶解により測定して示す。

【図 3 0】図 3 0 は、ヒト N K 及び T 細胞応答を刺激する T 2 分子の能力に対する I L - 1 5 及び F c 突然変異の効果を検出するアッセイの結果を示す。1 . 8 ~ 5 $\times 10^5$ 細胞 / m l のヒト P B M C を、表示される突然変異を含む 1 n M の T 2 分子を含有しているか、又はコントロールとして 1 0 n g / m l の組み替えヒト I L - 2 又は I L - 1 5 を有する培地中で 4 日間 3 7 ° で培養した。次いで、5 0 μ g / m l のカルセイン - A M で標識化した後、N K 感受性 K - 5 6 2 細胞を標的細胞として用いて、N K 細胞細胞傷害性を評価した。

【図 3 1】図 3 1 は、N K 細胞増殖アッセイの結果を示し、ここでは P B M C を、I L - 1 5 及び I g G F c ドメインに各種の点突然変異を含有する T 2 分子と、又はコントロールとして組み替えヒト I L - 2 又は I L - 1 5 と培養した。c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R S u s h i / h u I g G 1 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 鎖を含む T 2 分子又は F c ドメイン L A L A 及び K A 突然変異体を有するものが C D 5 6 + N K 細胞の増殖において増大をもたらしたのに対して、I L - 1 5 N 6 5 D 又は D 8 N 置換を含有する T 2 分子はそれほど多くの N K 細胞増殖活性をもたらさなかった。

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

10

20

30

40

50

対ノイズ比を示す。

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

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

【図35】図35A及びBは、1)オボアルブミンのアミノ酸257～264由来のペプチドに特異的なscTCRと融合しているhuIL15N72ドメイン、及び2)huIL15R Sushii/huIgG1融合体と結合している一本鎖CD8 / ドメイン 10
含有している多重特異的T2分子を用いるELISAの結果を示す。OT1-CD8-T2Mの結合活性をOT1scTCR/huIL15N72D融合体のそれとELISAによって比較した。各タンパク質の等モル量を抗TCR C mAb(H57)でコーティングしたウェル上に捕獲して、OVA aa257-264/H-2Kb四量体又はIL15、CD8、CD8若しくはTCRV2に対するmAbでプローブした。抗ヒトIgでコーティングしたウェルを用いて抗TCRV2でプローブするアッセイも実施した。

【図36】図36Aは、c264scTCR/hIL-15:c264scTCR/hIL-15R Su/birA複合体(c264scTCR二量体)の概略図を示す。二量体 20
hIL-15:hIL-15R Sudメインのモデルは、ヒトIL-15:IL-15R Su複合体の公表されている結晶構造に基づいている(33)(PDB 2Z3Q)。Bは、c264scTCR融合タンパク質のSEC分析を示す。図は、c264scTCR/hIL-15(上)、c246scTCR/hIL-5R Su/birA(中)及びc264scTCR/hIL-15:c246scTCR/hIL-15R Su/birA複合体(c264scTCR二量体)(下)のサイズ分析を示し、点線は比タンパク質ピークを示している。

【図37】図37は、c264scTCR/hIL-15:c246scTCR/hIL-15R Su/birA複合体を含むc264scTCR二量体、及びc149scTCR/hIL-15:c264scTCR/hIL-15R Su/birA複合体を含むc264scTCR/c149scTCRヘテロ二量体の結合活性の特性を示す。 30
A．T2細胞を0～62.5nMのp53(aa264-272)ペプチドでパルスした。細胞を等量(80nM)のc264scTCR二量体又はc264scTCR/birAのPE共役多量体で染色した。B．c264scTCR二量体をc264scTCR/birA試薬と比べた細胞染色の相対的増大を異なったペプチド濃度で確認した。増大(倍)=(c264scTCR二量体で染色されたT2細胞の幾何学的平均)/(c264scTCR/birAで染色されたT2細胞の幾何学的平均)。C．c264scTCR/c149scTCRヘテロ二量体のp53ペプチド/HLA-A*0201結合活性をELISAで確認した。抗hIL-15モノクローナル抗体(R&D System)を捕獲抗体として用いた。A2/p53.264-272.HRP又はA2/53.149-157.HRP四量体をプローブとして用いた。データは3回繰返し測定の平均±SDを表わす。 40

【図38】図38は、OT1scTCR/hIL-15:OT1scTCR/hIL-15R Su/birA複合体からなるOT1scTCR二量体の結合活性の特性を示す。EL4細胞にOVA(aa257-264)ペプチドを負荷して、200nMのOT1sc/birA-SA-PE(上)及びOT1scTCR二量体-SA-PE(下)で染色した。

【図39】図39は、OT1scTCR/hIL-15:scCD8/hIL-15R Su/birA複合体を含むOT1scTCR/scCD8ヘテロ二量体が増強したpMHCI結合活性を示すことを表わす。A．OT1scTCR/scCD8ヘテロ二量体のネズミCD8発現をELISAで確認した。抗mTCRH57-597mAbを捕獲 50

抗体として用いた。ビオチニル化抗ネズミCD8 又はCD8 mAbをプローブとして用いた後、SA-HRPを行った。データは3回繰返し測定の前平均±SDを表わす。B・EL4細胞に表示される濃度のOVA(aa257-264)ペプチドを負荷して、200nMのOT1scTCR二量体-SA-PE(上)及びOT1scTCR/scCD8ヘテロ二量体-SA-PE(下)で染色した。

【図40】図40は、TCR/hIL-15:TCR/hIL-15R Su/birA複合体を含むTCR/ヘテロ二量体を包含する融合タンパク質はpMHC I結合活性を保持することを示す。A・OT1scTCR/birAとOT1TCR/ヘテロ二量体のOVA(aa257-264)/H-2Kb複合体への結合活性をELISAで確認した。抗mTCR H57-59mAbを捕獲抗体として用いた。Kb/OVA.257-264四量体をプローブとして用いた。B・264scTCR/birA及び264TCR/ヘテロ二量体のp53(aa26-272)/HLA-A*201複合体への結合活性をELISAによって確認した。抗TCR mAbを捕獲抗体として用いた。A2/p53.264-272.HRP四量体をプローブとして用いた。データは3回繰返し測定の前平均±SDを表わす。

10

【図41】図41は、融合タンパク質のIL-15結合及び機能活性を示す。A・32D細胞をIL-15野生型又はIL-15N72D若しくはIL-15D8N突然変異タンパク質ドメインを含む320nMのc264scTCR二量体と培養した。融合タンパク質の結合を順に抗ヒトTCR CAbで検出した。B・IL-15の野生型又は突然変異タンパク質ドメインを含むc264scTCR二量体の32D細胞の増殖をサポートする能力を実施例に記載されるように確認した。データは2回繰返し測定の前平均±SDを表わす。

20

【図42】図42は、OT1scTCR/hIL-15D8N、OT1scTCR/hTL-15R Su/birA及びOT1scTCR二量体のOVA(aa257-264)/H-2K^b結合活性をELISAで確認したことを示す。抗m-TCR H57-597mAbを捕獲抗体として用いた。Kb/OVA.257-264.HRP四量体をプローブとして用いた。データは3回繰返し測定の前平均±SDを表わす。

【図43】図43は、SPRで確認したOVA(aa257-264)/H-2K^b及びコントロールであるVSV/H-2K^b複合体に対するOT1scTCR融合タンパク質の結合曲線を示す。

30

【図44】図44A及びBは、免疫正常マウスにおけるネズミB16腫瘍細胞株を用いる原発腫瘍生育モデルの結果を示す。腫瘍担持マウスにrhIL-15、T2M、T2MCH1及びT2MTCRCH1タンパク質、又はPBS(コントロール)を静脈内注射した。腫瘍の生育を測定してデータをA示す。動物における体重の処置後変化をBに示す。

【図45】図45A及びBは、免疫正常マウスにおけるネズミEG7腫瘍細胞株を用いる原発腫瘍生育モデルの結果を示す。腫瘍担持マウスにrhIL-15、T2M、及びT2MTCRCH1タンパク質、又はPBS(コントロール)を静脈内注射した。腫瘍の生育を測定してデータをA示す。動物における体重の処置後変化をBに示す。

【図46】図46は、共有結合で及び/又は遺伝子的に他のタンパク質ドメインと融合して融合タンパク質複合体を生成したヒトIgG1CH2-CH3ドメイン又はFcドメインのタンパク質配列(配列番号40)を示す。

40

【図47】図47は、細胞発現ペプチドMHC標的に対する、T2M及びscTCR-huIgG1タンパク質が介在する抗体依存性細胞傷害活性を確認するアッセイの結果を示す。各種の量の融合タンパク質(T2M、T2M2又はc264scTCR-Ig)を新鮮なヒトPBMC及びp53ペプチドでパルスしたHLA-A2陽性T2細胞(カルセイン標識化)(E:T比、40:1)と混合した。2時間培養した後、培養培地を採取して溶解細胞からのカルセイン放出を定量的に分析した。

【図48】図48は、マウスにおける各種T2分子の免疫刺激活性を確認するインビボアッセイの結果を示す。C57BL/6マウスをhIL-15(1mg/kg)、IL15

50

N72D:IL15R -Fc (3.6 mg/kg)、T2M (11 mg/kg)、T2M2 (10 mg/kg) の等モルIL 15用量、又は等容量のPBSで試験第1日目にi.v.処置した。試験4日目にマウスを屠殺して血液のWBC数及び脾臓重量を図Aに示すように確認した。末梢血単核細胞(PBMC)CD8⁺及びNKp46⁺細胞のパーセント変化を図Bに示すようにフローサイトメトリーで評価した。PBMCも図Cに示すように、カルセイン放出アッセイにおけるNK感受性Yac-1標的細胞の溶解に基づくNK細胞活性を評価するために用いた。

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

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

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

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

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

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

【図55】図55は、抗CD20scAb/huIL-15R Su/huIgG1 Fc構築物の核酸配列(配列番号45)を示す。

【図56】図56は、成熟抗CD20scAb/huIL-15R Su/huIgG1 Fc融合タンパク質のタンパク質配列(配列番号46)を示す。

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

【図58】図58は、CD20⁺ヒト腫瘍細胞に対する抗CD20scAb T2Mが介在する抗体依存性細胞傷害活性を確認するアッセイの結果を示す。各種濃度の融合タンパク質(抗CD20scAb T2M、c264sc T2M(陰性コントロール))又はキメラ抗CD20mAAb(陽性コントロール)を新鮮なヒトPBMC(異なる2人のドナー由来)及びダウディ細胞(カルセイン標識化)(E:T比、100:1)と混合した。培養期間後に、培養培地を採取して溶解細胞から放出したカルセインを定量的に分析した。

【図59】図59は、CD20⁺ヒト腫瘍細胞に対する抗CD20scAb T2Mが介

10

20

30

40

50

在する抗体依存性細胞傷害活性を確認するアッセイの結果を示す。融合タンパク質（抗CD20s cAb T2M、c264 s c TCR T2M（陰性コントロール）又はキメラ抗CD20mAb（陽性コントロール）を各種の比率の新鮮なヒトPBMC（異なる2人のドナー由来及びダンディ細胞（カルセイン標識化）と混合した。培養期間後に、培養培地を採取して溶解細胞から放出したカルセインを定量的に分析した。

【図60】図60は、抗CD20軽鎖Vドメイン/ヒトカッパ定常ドメイン/hIL-15N72D構築物の核酸配列（配列番号47）を示す。

【図61】図61は、成熟抗CD20軽鎖Vドメイン/ヒトカッパ定常ドメイン/hIL-15N72D融合タンパク質のタンパク質配列（配列番号48）を示す。

【図62】図62は、抗CD20重鎖Vドメイン/ヒトIgG1 CH1ドメイン/huIL-15R Su/huIgG1 Fc構築物の核酸配列（配列番号49）を示す。

【図63】図63は、成熟抗CD20重鎖Vドメイン/ヒトIgG1 CH1ドメイン/huIL-15R Su/huIgG1 Fc融合タンパク質のタンパク質配列（配列番号50）を示す。

【図64】図64は、二量体IL-15R Su/Fc融合タンパク質と非共有結合する（して）IL-15N72Dを基礎とするIL-15N72D:IL-15R Su/Fc複合体の概略図である。

【図65】図65（A～D）は、IL-15N72D:IL-15R Su/Fc調製物のゲル電気泳動分析プロファイルの写真である。（A）IEF pH3～10ゲル分析。レーン1、IEFマーカー。レーン2、rプロテインAカラムで精製したIL-15N72D:IL-15R Su/Fc複合体。レーン3、IL-15R Su/Fc。レーン4、IL-15wt。（B）IEF pH3～10ゲル分析。レーン1、IEFマーカー。レーン2、Q工程1溶出で精製したIL-15N72D:IL-15R Su/Fc複合体。レーン3、Q工程2溶出によるQ1c。レーン4、Q工程2溶出によるQ2c。（C）SDS-PAGE（還元）分析。レーン1、MWマーカー。レーン2、rプロテインAカラムで精製したIL-15N72D:IL-15R Su/Fc複合体。レーン3、Q工程2溶出によるIL-15N72D:IL-15R Su/Fc（Q2c）。レーン4、IL-15R Su/Fc（Q流出から）。（D）タンパク質の脱グリコシル化を示すSDS-PAGE（還元）分析。レーン1、MWマーカー。レーン2及び3はそれぞれN-グリコシダーゼFで消化した及び消化していないIL-15N72D:IL-15R Su/Fcタンパク質を示す。レーン4、IL-15wt。

【図66】図66は、スーパーデックス200HR10/30ゲルろ過カラムを用いるSECクロマトグラムのグラフである。精製されたIL-15N72D:IL-15R Su/Fc複合体が単一ピークとして溶出された。

【図67】図67は、CD-1マウスへ静脈内注射した後のIL-15wt及びIL-15N72D:IL-15R Su/Fc複合体の薬物動態プロファイルの比較を示すグラフである。抗IL-15 Ab ELISAはIL-15wtの濃度を測定する（）。抗IL-15 Ab ELISAは無傷IL-15N72D:IL-15R Su/Fc分子の濃度を測定する（）のに対して、抗ヒトIgG Fc Ab ELISAはIL-15R Su/Fc融合タンパク質の血清濃度を測定する（）。観察された濃度をシンボルで表わし、モデル近似曲線をラインで表わしている。

【図68】図68は、インビトロで構築したIL-15N72D:IL-15R Su/Fc（IL-15N72D:IL-15R Su/Fc IVA）の生物活性のIL-15N72D:IL-15R Su/Fcとの比較を示しているグラフである。32D細胞をインビトロで構築したIL-15N72D:IL-15R Su/Fc（）又はIL-15N72D:IL-15R Su/Fc（）と72時間培養した後、WST-1を4時間添加した。440nmで読み取った吸光度によって細胞増殖を定量してホルマゾンレベルを評価した。示されているデータ点は3回繰返しサンプルの平均（±標準偏差）であり、線はEC₅₀を決定するのに適しているS字型用量応答曲線を表わしている。結果は少なくとも3回の実験を代表している。

10

20

30

40

50

【図69】図69は、IL-15wtとIL-15N72D:IL-15R Su/Fc複合体の脾臓重量及び白血球レベルに対する効果を示す一組のグラフである。C57BL/6マウス(1群当り5匹マウス)に1mg/kgのIL-15N72D:IL-15R Su/Fc融合複合体、0.28mg/kg(等モル用量)のIL-15wt、又は陰性コントロールとしてPBSの単回用量を静脈内に注射した。脾臓重量(左図)及び血中の白血球数(右図)を注射後4日目に確認した。バーは平均値±標準誤差(n=5)を表わす。*PBS及びIL-15wtと比較して $p > 0.05$ 。結果は少なくとも2回の実験を代表している。

【図70】図70は、マウスリンパ球に対するIL-15wt及びIL-15N72D:IL-15R Su/Fc複合体の効果を示す一組のグラフである。C57BL/6マウス(1群当り5匹マウス)に1mg/kgのIL-15N72D:IL-15R Su/Fc融合複合体、0.28mg/kg(等モル用量)のIL-15wt、又は陰性コントロールとしてPBSの単回用量を静脈内に注射した。注射後4日目に、B細胞(CD19)、CD4 T細胞(CD4)、NK細胞(NKp46)及びCD8 T細胞(CD8)のパーセントを脾臓細胞中で確認し(左図:平均値±標準誤差(n=5))、そしてPBM C(右欄:プール血液中の濃度(n=5))で確認した。*PBSと比較して $p > 0.05$ 。*IL-15wtと比較して $p > 0.05$ 。結果は少なくとも2回の実験を代表している。

【発明を実施するための形態】

【0051】

(定義)

以下の定義は以下の明細書で用いられている特定の用語に対して提供されている。

【0052】

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

【0053】

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

【0054】

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

【0055】

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

【0056】

「抗体」は、特異的エピトープを結合する抗体及びその断片を包含する、免疫グロブリン

10

20

30

40

50

ンの何れかである。この用語はポリクローナル、モノクローナル、キメラ、F a b s、F v s、一本鎖抗体、及び一重又は多重免疫グロブリン変異鎖を、或いはC D Rドメイン構造を、更に二重特異及び多重特異抗体も包含する。

【0057】

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

【0058】

本明細書で用いられる用語「生物活性ポリペプチド」は、抗原結合活性を有するT C R若しくは抗体、C D 8を包含するC D分子、又はF cドメインを包含する抗体ドメインを包含する、本明細書で検討しているような望ましい効果を生ずることができるタンパク質、ポリペプチド又はペプチドのようなアミノ酸配列；糖若しくは多糖；脂質若しくは糖脂質；糖タンパク質；又はリポタンパク質への言及を意味している。

【0059】

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

【0060】

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

【0061】

本明細書で用いられる用語「エフェクター分子」は、I L - 1 5 Rアルファ、I L - 1 5 R S u、I L - 1 5 R エクソン3欠失、I L - 2 Rベータ又はガンマ - C、又はこれらの機能的断片のようなI L - 1 5ドメイン、I L - 1 5変異体又はI L - 1 5受容体、及び更に免疫グロブリンF cドメイン又はその機能的断片を含んでいるポリペプチドのようなものを包含する、本明細書で検討しているような所望の効果を生ずることができるタンパク質、ポリペプチド又はペプチドのようなアミノ酸配列；糖又は多糖；脂質又は糖脂質；糖タンパク質；リポタンパク質；又は化学試薬を示している。

【0062】

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

【0063】

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

【0064】

10

20

30

40

50

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

【 0 0 6 5 】

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

【 0 0 6 6 】

用語「ポリペプチド」は、好ましくはその大きさに関わらず本質的に20種の天然アミノ酸の何れかからなる、何れかのポリマーへの言及を意味している。用語「タンパク質」が比較的大きいタンパク質を参照するために用いられ、そして多くの場合「ペプチド」が小さいポリペプチドを参照するために用いられているが、この分野におけるこれらの用語の使用はオーバーラップしていることが多い。用語「ポリペプチド」は特段の断りがない限り、一般にタンパク質、ポリペプチド、及びペプチドを示す。一般に本発明に関して有用なペプチドは通常、遠心分離又はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような標準的分子サイズ測定技術で評価して、約0.1~100KD又は最高約1000KDの大きさ、好ましくは約0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、30及び50KDの間である。

【 0 0 6 7 】

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

【 0 0 6 8 】

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

【 0 0 6 9 】

本明細書で用いられる用語「可溶性」は、水性緩衝液、例えば、細胞培地から低いG力遠心分離下（例えば、通常の遠心機で約30,000回転/分以下）で容易に沈殿しない

10

20

30

40

50

融合分子、特に融合タンパク質を意味する。更に、融合分子は、低濃度の陰イオン又は非イオン洗浄剤の存在下又は非存在下において中性pH又はその付近で約5～37より高い温度で水溶液に維持されるならば可溶性である。これらの条件下で、可溶性タンパク質は低い沈降価、例えば約10～50のスベドベルグ単位を有している。

【0070】

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

10

【0071】

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

【0072】

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

20

【0073】

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

30

40

50

米国特許公開第US 20030144474号の、標題「T CELL RECEPTOR FUSIONS AND CONJUGATES AND METHODS OF USE THEREOF」の米国仮特許出願に開示されているT細胞受容体も包含する。

【0074】

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

10

【0075】

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

【0076】

20

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

30

【0077】

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

40

【0078】

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

【0079】

具体的に述べられているか又は文脈から明らかである場合を除いて、本明細書で用いら

50

れている用語「又は」は包括的であると理解される。

【0080】

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

【0081】

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

10

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

【0082】

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

【0083】

(Fcドメイン)

20

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

30

【0084】

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

40

【0085】

50

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

【0086】

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

【0087】

(T細胞受容体(TCR))

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

【0088】

TCR複合体は少なくとも7つの膜貫通タンパク質から成っている。ジスルフィド結合した(又は)ヘテロ二量体は単一型抗原認識ユニットを形成するが、
、及び鎖から成る、CD3の不変鎖は、T細胞活性化及び細胞免疫応答の同化をもたらすシグナル伝達経路へのリガンド結合のカップリングに関与する。TCR鎖の遺伝子多様性に関わらず、2つの構造特性が全ての公知サブユニットに共通している。第1に、これらは恐らく螺旋である、一本鎖膜貫通ドメインを有する膜貫通タンパク質である。第2に、全てのTCR鎖は予測される膜貫通ドメイン内に荷電アミノ酸を保有しているという独特な特性を有している。不変鎖はマウスとヒトの間に保存されている、単一の負の電荷を有し、そして可変鎖は1つの(TCR-)又は2つの(TCR-)正電荷を保有している。TCRの膜貫通配列は多数の種で高度に保存されているので、系統発生的に重要な役割を果たしているのだろう。親水性アミノ酸、アルギニン及びリジンを含んでいるオクタペプチド配列が種の間で一致している。

【0089】

T細胞の応答はTCRに結合している抗原によって調節される。TCRの1つの型は、免疫グロブリン可変(V)及び定常(C)領域に類似している及び鎖からなる膜結合ヘテロ二量体である。TCRの鎖が共有結合したV-とC-鎖を包含しているのに対して、鎖はC-鎖と共有結合しているV-鎖を包含している。V-及びV-鎖は、主要な組織的適合性複合体(MHC)(ヒトではHLA複合体として知られている)との関連でスーパー抗原又は抗原を結合できるポケット又は裂け目を形成する。概して、Davis Ann. Rev. of Immunology 3: 537 (1985); Fundamental Immunology 3rd Ed., W. Paul Ed. Rsen Press LTD. New York (1993)を参照されたい。

【0090】

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

【 0 0 9 1 】

(融合タンパク質複合体)

本発明の可溶性融合タンパク質及び共役分子複合体は少なくとも 2 つの可溶性融合タンパク質を含んでいる。ある特定の実施態様では、第 1 融合タンパク質は、インターロイキン - 1 5 (I L - 1 5) 又はその機能的断片と共有結合している第 1 生物活性ポリペプチドを含み ; 第 2 融合タンパク質は可溶性インターロイキン - 1 5 受容体 (I L - 1 5 R) ポリペプチド又はその機能的断片と共有結合している第 2 生物活性ポリペプチドを含み、そしてここで第 1 融合タンパク質の I L - 1 5 ドメインは第 2 融合タンパク質の可溶性 I L - 1 5 R ドメインと結合して可溶性融合タンパク質複合体を形成する。本発明の融合タンパク質複合体は第 1 及び第 2 融合タンパク質の一方又は両方と結合している免疫グロブリン F c ドメイン又はその機能的断片も含んでいる。F c ドメインが第 1 及び第 2 融合タンパク質と結合する F c ドメインが相互作用して融合タンパク質複合体を形成することが好ましい。このような複合体は免疫グロブリン F c ドメイン間にジスルフィド結合を形成することにより安定化させることができる。ある特定の実施態様では、本発明の可溶性融合タンパク質複合体は、I L - 1 5 ポリペプチド、I L - 1 5 変異体又はその機能的断片及び可溶性 I L - 1 5 R ポリペプチド又はその機能的断片を包含し、そこでは I L - 1 5 及び I L - 1 5 R ポリペプチドの一方又は両方が免疫グロブリン F c ドメイン又はその機能的断片を更に包含している。

【 0 0 9 2 】

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

【 0 0 9 3 】

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

【 0 0 9 4 】

更なる実施態様では、第 1 及び第 2 生物活性ポリペプチドの一方又は両方が抗体又はその機能的断片を含んでいる。

【 0 0 9 5 】

別の実施態様では、T C R ドメインに対する抗原は M H C 又は H L A 分子中に存在するペプチド抗原を含んでいる。更なる実施態様では、ペプチド抗原は腫瘍関連ポリペプチド

10

20

30

40

50

又はウィルスがコードするポリペプチドに由来している。

【0096】

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

【0097】

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

【0098】

本明細書で用いられる用語「生物活性ポリペプチド」又は「エフェクター分子」は、本明細書で検討するような所望の効果を生み出すことのできる、タンパク質、ポリペプチド又はペプチド；糖又は多糖；脂質又は糖脂質、糖タンパク質、又はリポタンパク質のようなアミノ酸配列を意味する。エフェクター分子は化学物質も包含する。生物活性又はエフェクタータンパク質、ポリペプチド、又はペプチドをコードするエフェクター分子核酸も意図されている。従って、適切な分子は調節因子、酵素、抗体又は薬剤、更にはDNA、RNA、及びオリゴヌクレオチドを包含する。生物活性ポリペプチド又はエフェクター分子は天然由来であってもよく或いは公知成分から、例えば、遺伝子組み換え又は化学合成、によって合成でき、そして異種成分を包含できる。生物活性ポリペプチド又はエフェクター分子は通常、遠心分離又はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような標準的分子サイズ測定技術で評価して、約0.1~100KD又は最大で約1000KDの大きさ、好ましくは約0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、30及び50KDの間である。本発明の望ましい効果は、これに限定されないが、例えば、増大した結合活性を有する本発明の融合タンパク質複合体を形成すること、標的細胞を殺傷して、例えば、疾患の予防又は治療において、細胞増殖又は細胞死を誘発して、免疫応答を開始すること、又は診断目的で検出分子として作用することを包含する。このような検出のために、アッセイを用いることができ、例えば、それを増殖するために細胞を培養すること、及び細胞を本発明のTCR融合複合体と接触させること、次いでTCR融合複合体が細胞の更なる発生を阻害するか否かを評価することを含んでいるアッセイを用いることができる。

【0099】

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

【0100】

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

【 0 1 0 1 】

(リンカー)

本発明の融合複合体は、I L - 1 5 又は I L - 1 5 R ドメインと生物活性ポリペプチドの間に挿入されたフレキシブルなリンカー配列も包含していることが好ましい。リンカー配列は、I L - 1 5 又は I L - 1 5 R ドメインに対する生物活性ポリペプチドの効果的な位置決めが両方のドメインに機能活性を持たせるようにしなければならない。生物活性ポリペプチドが T C R である場合の実施態様では、リンカー配列は、T 細胞受容体が提示 M H C ペプチド複合体を認識できるように、そしてエフェクター分子を望ましい位置へ送達できるように、T C R 分子結合溝を位置付ける。エフェクター分子の良好な提示は、T 細胞を培養してこれを増殖すること、T 細胞を本発明の T C R 融合複合体と接触させること、そして T C R 融合複合体が細胞の更なる発生を阻害するか否かを評価することの連続工程を含んでいるインビトロアッセイを包含している、以下に開示されているアッセイによって確認されるように、細胞が T 細胞増殖を誘発又は阻害するか、或いは特定部位に対する免疫応答を開始するか阻害するかの何れかの細胞の活性を調節することができる。

10

【 0 1 0 2 】

ある特定の実施態様では、可溶性融合タンパク質複合体は、第 1 生物活性ポリペプチドがポリペプチドリリンカー配列によって I L - 1 5 (又はその機能的断片) に共有結合しているリンカーを有している。

【 0 1 0 3 】

別の特定の実施態様では、本明細書に記載されているような可溶性融合タンパク質複合体は、第 2 生物活性ポリペプチドがポリペプチドリリンカー配列によって I L - 1 5 R ポリペプチド (又はその機能的断片) に共有結合しているリンカーを有している。

20

【 0 1 0 4 】

提示抗原を認識するために T C R 分子の結合溝を、或いは抗原を認識するために抗体分子の結合ドメインを効果的に位置づけることができるペプチドをもたらすヌクレオチド配列によって、リンカー配列がコードされることが好ましい。本明細書で用いられる語句「I L - 1 5 又は I L - 1 5 R ドメインに対する生物活性ポリペプチドの効果的な位置決め」、又は同様の語句は、I L - 1 5 又は I L - 1 5 R ドメインに結合している生物活性ポリペプチドが、I L - 1 5 又は I L - 1 5 R ドメインが互いに相互作用してタンパク質複合体を形成できるように位置していることを意味するように意図されている。ある特定の実施態様では、I L - 1 5 又は I L - 1 5 R ドメインが免疫細胞と相互作用して免疫反応を開始又は阻害するか、或いは細胞の成長を阻害又は刺激することを許容するように効果的に位置している。

30

【 0 1 0 5 】

本発明の融合複合体は、I L - 1 5 又は I L - 1 5 R ドメインと免疫グロブリン F c ドメインの間に挿入されたフレキシブルなリンカー配列も包含していることが好ましい。リンカー配列は、F c ドメイン、生物活性ポリペプチド及び I L - 1 5 又は I L - 1 5 R ドメインを、それぞれのドメインが機能活性を持つように、効果的に位置つけるようにしなければならない。ある特定の実施態様では、F c ドメインは、適切な融合タンパク質複合体形成及び / 又は免疫細胞又は相補体系のタンパク質上の F c 受容体との相互作用を許容して、オプソニン化、細胞溶解、マスト細胞、好塩基球及び好酸球の脱顆粒、並びにその他の F c 受容体依存性の過程 ; を包含する F c が介在する効果を刺激し ; 相補経路を活性化し ; そして融合タンパク質複合体のインビボ半減期の増大することを可能にするように効果的に位置決めされている。

40

【 0 1 0 6 】

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

【 0 1 0 7 】

リンカー配列は好ましくは約 7 ~ 2 0 個のアミノ酸を、より好ましくは約 8 ~ 1 6 個のアミノ酸を含んでいる。リンカー配列は、望ましくない単一構造中に生物活性ポリペプチ

50

ド又はエフェクター分子を保持しないようにフレキシブルであることが好ましい。リンカー配列は、例えば、認識部位を融合分子から距離をあけて置くために用いることができる。具体的には、ペプチドリンカー配列を、例えば、これを化学的に架橋して分子柔軟性をもたらすために、生物活性ポリペプチドとエフェクター分子の間に位置付けることができる。リンカーは主にグリシン、アラニン及びセリンのような小さい側鎖を有するアミの酸を含んでいて柔軟性をもたらすことが好ましい。好ましくは、リンカー配列の約80又は90%又はそれ以上がグリシン、アラニン、又はセリン残基を、特にグリシンとセリン残基を含有している。ヘテロ二量体TCRを含んでいる融合タンパク質複合体に関しては、リンカー配列はTCR分子のa鎖にも結合できるが、リンカー配列はTCR分子の鎖に適切に結合する。あるいは、リンカー配列はTCR分子の鎖及び鎖の両方に結合できる。このようにペプチド鎖が鎖と共に発現された場合は、結合したTCRポリペプチドは、図1に大まかに描かれているように畳み込まれて機能的なTCR分子をもたらす。1つの適切なリンカー配列は、ASGGGGSGGG(すなわちAla Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly)(配列番号5)であり、TCRのドメインの第1アミノ酸と結合していることが好ましい。抗体可変領域を共に結合するために良好に用いられている多くのフレキシブルリンカーデザインの中から何れかを包含する異なったリンカー配列を用いることができる。Whitlow, M. et al., (1991) Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97-105を参照されたい。ある実施例では、エフェクター分子をTCR鎖分子と共有結合するために、リンカーのアミノ配列は、TCR鎖のC末端残基からエフェクター分子のN末端残基までの適切な距離を橋渡しすることができる。適切なリンカー配列を実験的に容易に確認することができる。また、リンカー配列の適切な大きさ及び配列もTCR分子の予測サイズ及び形状に基づいて従来のコンピュータモデリング技術によって確認できる。

【0108】

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

【0109】

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

【0110】

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

【0111】

本発明の一態様では、第1融合タンパク質はインターロイキン-15(IL-15)ドメイン又はその機能的断片と共有結合している第1生物活性ポリペプチドを含んでいる。

IL - 15 は T 細胞の活性化及び増殖に影響を及ぼすサイトカインである。免疫細胞の活性化及び増殖に作用する IL - 15 活性は、ある意味では IL - 2 と類似しているが、根本的な違いはよく特徴付けられている (Waldmann, T A, 2006, Nature Rev. Immunol. 6: 595-601)。

【 0 1 1 2 】

本発明の別の態様では、第 1 融合タンパク質は IL - 15 変異体 (本明細書では IL - 15 突然変異体ともよぶ) であるインターロイキン - 15 (IL - 15) ドメインを含んでいる。IL - 15 変異体は、天然型 (又は野生型) IL - 15 タンパク質とは異なったアミノ酸配列を含んでいることが好ましい。IL - 15 変異体は IL - 15 R ポリペプチドと結合して IL - 15 アゴニスト又はアンタゴニストとして機能することが好ましい。アゴニスト活性を伴う IL - 15 変異体はスーパーアゴニスト活性を有していることが好ましい。ある実施態様では、IL - 15 変異体はその IL - 15 R との関連とは独立して IL - 15 アゴニスト又はアンタゴニストとして作用する。IL - 15 アゴニストは野生型 IL - 15 と比較して相当の又は増加した生物活性によって例示される。IL - 15 アンタゴニストは野生型と比較して減少した生物活性で、又は IL - 15 が介在する応答を阻害する能力によって例示される。ある例では、IL - 15 変異体は増大した又は減少した活性で IL - 15 R C 受容体と結合する。ある実施態様では、IL - 15 変異体の配列は、天然型 IL - 2 配列と比べて、少なくとも 1 つのアミノ酸変化、例えば、置換又は欠失を有していて、このような変化は IL - 15 アゴニスト又はアンタゴニスト活性をもたらす。アミノ酸置換 / 欠失が IL - 15 R 及び / 又は C と相互作用する IL - 15 のドメイン内にあることが好ましい。アミノ酸置換 / 欠失が IL - 15 R との結合或いは IL - 15 変異体を産生する能力に影響を及ぼさないことがより好ましい。IL - 15 変異体を生成する適切なアミノ酸置換 / 欠失は、想定される又は公知の IL - 15 構造、公知構造を有する IL - 2 のような同族分子と IL - 15 との比較に基づいて、本明細書で提供されているように、又はその他の実験方法で、合理的な或いは無作為的な突然変異生成及び機能アッセイによって確認できる。更なる適切なアミノ酸置換は同類又は非同類変化及び追加のアミノ酸の挿入である。本発明の IL - 15 変異体が、天然の成熟型ヒト IL - 15 配列の 6、8、10、61、65、72、92、101、104、105、108、109、111、又は 112 位に 1 つ又はそれ以上の 1 つのアミノ酸置換 / 欠失を含んでいることが好ましく ; 特に D8N (「D8 は天然型成熟ヒト IL - 15 配列のアミノ酸及び残基位置を示し、そして「N」は IL - 15 変異体のその位置で置換されたアミノ酸残基を示す)、I6S、D8A、D61A、N65A、N72R、V104P 又は Q108A 置換はアンタゴニスト活性を有する IL - 15 変異体もたらして、N72D 置換はアゴニスト活性を有する IL - 15 変異体をもたらす。

【 0 1 1 3 】

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

【 0 1 1 4 】

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

【 0 1 1 5 】

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

10

20

30

40

50

て周知であって、例えば、D T A 鎖及びリシン A 鎖を包含する。更に、毒素は、例えば、ホスホリパーゼ酵素（例えば、ホスホリパーゼ C）のような細胞表面で活性な薬剤であってよい。

【0116】

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

【0117】

更に、エフェクター分子は診断又は画像検討に適している検出可能な標識化分子であってよい。このような標識はビオチン、又はストレプトタビジン／アビジン、検出可能なナノ粒子又は結晶、酵素又はその触媒活性断片；緑色蛍光タンパク質、F I T C、フィコエリトリン、チクローム、テキサスレッド又は量子ドットのような蛍光標識；放射性核種、例えば、ヨウ素 - 131、イットリウム - 90、レニウム - 188、又はビスマス - 212；リン発光或いはケミルミネセント分子、又は G d³⁺ 又は常時性金属イオンをベースにした造影剤のような、P E T、超音波又は M R I によって検出可能な標識を包含する。エフェクター又はタグを含んでいるタンパク質の製造及び使用に関連する開示について、例えば、Moskaug, et al. J. Biol. Chem. 264, 15709 (1989); Pastan, I. et al. Cell 47, 641, 1986; Pastan et al., Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents, Ann. Rev. Biochem. 61, 331, (1992); "Chimeric Toxins" Olsnes and Phil, Pharmac. Ther., 25, 355 (1982); P C T 出願公開第 W O 9 4 / 2 9 3 5 0 号；P C T 出願公開第 W O 9 4 / 0 4 6 8 9 号；P C T 出願公開第 W O 2 0 0 5 0 4 6 4 4 9 号及び米国特許第 5, 6 2 0, 9 3 9 号を参照されたい。

【0118】

共役結合した I L - 1 5 及び I L - 1 5 R ドメインを包含しているタンパク質融合又は共役複合体はいくつかの重要な用途を有している。例えば、T C R を含んでいるタンパク質融合又は共役複合体は、I L - 1 5 : I L - 1 5 R 複合体を特異的に T C R を結合できるある特定の細胞へ送達するために用いることができる。従って、タンパク質融合又は共役複合体は、リガンドを含有している細胞を選択的に損傷又は殺傷する手段を提供する。T C R を含有しているタンパク質融合又は共役複合体のよって損傷又は殺傷可能な細胞又は組織の例は、T C R によって特異的に結合できる 1 つ又はそれ以上のリガンドを発現している腫瘍及びウイルス又は細菌に感染した細胞を包含する。損傷又は殺傷を受けやすい細胞又は組織は本明細書に開示されている方法で容易にアッセイできる。

【0119】

本発明の I L - 1 5 及び I L - 1 5 R ポリペプチドは、天然由来の I L - 1 5 及び I L - 1 5 R 分子、例えば、ヒト、マウス或いはその他の齧歯動物、又はその他の哺乳動物の I L - 1 5 及び I L - 1 5 R 分子とアミノ酸配列において適切に対応する。これらのポリペプチド及びコードする核酸の配列は文献中で公知であって、ヒトインターロイキン 1 5 (I L 1 5) m R N A - G e n B a n k : U 1 4 4 0 7 . 1、ハツカネズミ筋肉インターロイキン 1 5 (I L 1 5) m R N A - G e n B a n k : U 1 4 3 3 2 . 1、ヒトインターロイキン - 1 5 受容体 鎖前駆体 (I L - 1 5 R A) m R N A - G e n B a n k : U 3 1 6 2 8 . 1、ツカネズミ筋肉インターロイキン 1 5 受容体、 鎖 - G e n B a n k : B C 0 9 5 9 8 2 . 1 を包含する。

【0120】

ある設定では、本発明の多価体のタンパク質融合又は共役複合体を、例えば、s c - T C R 又は s c - 抗体の結合価を増やすために作成することは有用である。特に、融合タンパク質複合体の I L - 1 5 と I L - 1 5 R ドメインの間の相互作用は多価複合体を作成する手段を提供する。また、多価融合タンパク質は、例えば、標準的なビオチン - ストレプトタビジン標識化技術を用いて 1 ~ 4 つの間のタンパク質（同一又は異なっている）と共に共有結合又は非共有結合で結合するか、又はラテックスビーズのような適切な固体支持体へ接合して作成できる。化学的に架橋したタンパク質（例えば、デンドリマーへ架橋）

も適切な多価の種である。例えば、タンパク質を、ビオチニル化 B i r A タグ或いは C y s 又は H i s のように化学反応性側鎖を有するアミノ酸残基のように改変できるタグ配列をコードする配列を包含させることにより、改変できる。このようなアミノ酸タグ又は化学反応性アミノ酸を融合タンパク質内の様々な位置に、好ましくは生物活性ポリペプチド又はエフェクター分子の活性部位から離して、位置付けることができる。例えば、可溶性融合タンパク質の C - 末端をタグ又はそのような反応性アミノ酸（複数を含む）を含有している別の融合タンパク質と共有結合させることができる。2つ又はそれ以上の融合タンパク質を適切なデンドリマー - 又はその他のナノ粒子と化学的に結合して多価の分子を得るために適切な側鎖を包含させることができる。デンドリマーは、その表面の多数の異なった官能基のうちの何れか1つを有することができる合成化学ポリマーである（D. Tomalia, Aldrichimica Acta, 26:91:101 (1993)）。本発明に従って用いるための例示的なデンドリマーは、例えば、システイン残基を結合できる、E 9 星形ポリアミンデンドリマー及び E 9 可燃性ポリアミンデンドリマーを包含する。例示的なナノ粒子はリポソーム、コアシェル粒子又は P L G A をベースとする粒子を包含する。

【 0 1 2 1 】

本発明の別の実施態様では、融合タンパク質複合体の一方又は両方のポリペプチドは免疫グロブリンドメインを含んでいる。あるいは、タンパク質結合ドメイン - I L - 1 5 融合タンパク質は免疫グロブリンドメインと更に結合できる。好ましい免疫グロブリンドメインは、別の免疫グロブリンドメインと相互作用して上で提供されるような多重鎖タンパク質を形成できる領域を含んでいる。例えば、I g G 1 C_H2 - C_H3 のような、免疫グロブリン重鎖領域は安定に相互作用して F c 領域を作り出す。F c ドメインを包含している好ましい免疫グロブリンドメインは、F c 受容体又は相補タンパク質結合活性を包含しているエフェクター機能を有する、及び/又はグリコシル化部位を有する領域も含有している。ある実施態様では、融合タンパク質複合体の免疫グロブリンドメインは、F c 受容体又は相補体の結合活性又はグリコシル化を減少又は増大して、それにより得られたタンパク質の生物活性に影響を及ぼす突然変異を含んでいる。例えば、F c 受容体への結合を減少させる突然変異を含有している免疫グロブリンドメインを、F c 受容体担持細胞への低結合活性を有する本発明の融合タンパク質複合体を生成するために用いることができ、これは特異抗原を認識又は検出するように設計された試薬にとって有利である。

【 0 1 2 2 】

（核酸及びベクター）

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

【 0 1 2 3 】

可溶性融合タンパク質複合体を作成する方法が本発明に含まれていて、方法は本明細書に記載されているように第1及び第2融合タンパク質をコードする D N A ベクターを宿主細胞に導入すること、細胞又は培地中に融合タンパク質を発現して、第1融合タンパク質の I L - 1 5 ドメインと第2融合タンパク質の可溶性 I L - 1 5 R ドメインの間を会合

させて可溶性融合タンパク質複合体を形成させるのに十分な条件下で宿主細胞を培養すること、可溶性融合タンパク質複合体を宿主細胞又は培地から精製することを含んでいる。

【0124】

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

【0125】

DNAベクターでコードされる融合タンパク質成分はカセット形式で提供されてもよい。用語「カセット」とは、標準的な組み換え方法で各成分を別の成分に容易に置き換えることができることを意味する。特に、カセット形式に構成されたDNAベクターは、コードされた融合複合体を、血清型を有しているか又は発生させる能力を有している病原菌に対して用いられる場合に特に望ましい。

【0126】

融合タンパク質複合体をコードするベクターを作成するために、生物活性ポリペプチドをコードする配列を、適切なリガーゼを用いてエフェクターペプチドをコードする配列に結合する。提示されるペプチドをコードするDNAは適切な細胞株からのように天然の供給源からDNAを単離して、又は公知の合成方法、例えば、リン酸トリエステル方法によって得ることができる。例えば、Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (M. J. Gait, ed., 1984)を参照されたい。合成オリゴヌクレオチドも市販の自動オリゴヌクレオチド合成器を用いて製造することができる。単離されたら、生物活性ペプチドをコードする遺伝子をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)又は当該技術分野で公知のその他の手段で増幅できる。生物活性ポリペプチド遺伝子を増幅するのに適切なPCRプライマーはPCR産物へ制限酵素認識部位を添加できる。PCR産物は好ましくはエフェクターペプチド用のスプライス部位及び生物活性ポリペプチド-エフェクター融合複合体の適切な発現及び分泌に必要なリーダー配列を含んでいる。PCR産物がリンカー配列をコードする配列、或いはこのような配列のライゲーションのための制限酵素部位を包含していることも好ましい。

【0127】

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

【0128】

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

【0129】

変異生物活性ポリペプチド、IL-15、IL-15R又はFcドメインをコードする配列を得るときに、当業者は生物活性の損失又は減少なしで、ある特定のアミノ酸置換、付加、欠失及び翻訳後改変によってポリペプチドを改変できることを認識するだろう。

特に、同類アミノ酸置換は周知である。すなわち、1つのアミノ酸を類似した大きさ、荷電、極性及び構造のアミノ酸による置換はタンパク質機能を有意に変化させる可能性は少ない。タンパク質の構成要素である20の標準アミノ酸は以下のように同類アミノ酸の4群に大まかに分類できる：非極性（親水性）グループはアラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン及びバリンを包含する；極性（非荷電、中性）グループはアスパラギン、システイン、グルタミン、セリン、スレオニン及びチロシンを包含する；正の荷電をもつ（塩基性）グループはアルギニン、ヒスチジン及びリジンを含む；及び負の荷電をもつ（酸性）グループはアスパラギン酸及びグルタミン酸を含む。タンパク質において1つのアミノ酸の同じグループ内の別のアミノ酸による置換は、タンパク質の生物活性に対して不都合な影響を殆ど有さない。別の例では、アミノ酸位置の改変がタンパク質の生物活性を減少又は増強させることができる。このような変化は、不規則に、或いは標的残基の公知又は予測される構造、及び機能の特性に基づく部位特異的突然変異を介して導入できる。変異タンパク質の発現に続いて、改変に起因する生物活性の変化を結合又は機能アッセイを用いて容易に評価できる。

10

【0130】

ヌクレオチド配列間の相同性は、DNAハイブリダイゼーション分析によって確認でき、ここで2重鎖DNAハイブリッドの安定性は生じる塩基対の程度に依存している。高温及び/又は低塩含量の条件はハイブリッドの安定性を減少させ、そして選択された程度より低い相同性を有する配列のアニールを阻害するように変化させることができる。例えば、約55%のG-C含量を有する配列については、40~50°C、6×SSC（塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム緩衝液）及び0.1%SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）のハイブリッド及び洗浄条件が約60~70%の相同性を示し、50~65°C、1×SSC及び0.1%SDSのハイブリッド及び洗浄条件が約82~97%の相同性を示し、そして52°C、0.1×SSC及び0.1%SDSのハイブリッド及び洗浄条件は約99~100%の相同性を示す。ヌクレオチド及びアミノ酸配列を比較する（及び相同性の程度を測定する）ための広範囲のコンピュータプログラムも利用可能で、市販及び無料ソフトウェアの両方の供給源を提供するリストは Ausbel et al. (1999) に見出せる。容易に入手できる配列比較及び複数配列アラインメントアルゴリズムは、それぞれ、the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1997) 及び ClustalW programs である。BLASTは世界的なウェブ、ncbi.nlm.nih.gov で入手可能であって、ClustalWのバージョンは2.ebi.ac.uk で入手可能である。

20

30

【0131】

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

【0132】

本発明の好ましいエフェクター分子は、これらのドメインが意図している機能をもたらすサイズを有するだろう。本発明のエフェクター分子は、周知の化学架橋方法を含む多種の方法によって作成されて生物活性ポリペプチドと融合させることができる。例えば、Means, G. E. and Feeney, R. E. (1974) in Chemical Modification of Proteins, Holden-Day. を参照されたい。S. S. Wong (1991) in Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Pressも参照されたい。しかしながら、インフレーム融合タンパク質を作成する組み換え操作を用いることが一般に好ましい。

40

【0133】

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

【0134】

その代わりに、或いは更に、必要に応じて、1つ又はそれ以上の追加エフェクター分子

50

を生物活性ポリペプチド又は共役複合体内へ挿入することができる。

【0135】

(ベクター及び発現)

本発明のタンパク質融合複合体を発現するために多数の戦略を用いることができる。例えば、上記の融合タンパク質構築物を、構築物を挿入し次いでライゲーションするために、ベクターに切れ目を入れる制限酵素を用いるような公知の方法によって適切なベクターに組み込むことができる。次いで融合タンパク質の発現のために、遺伝子構築物を含有しているベクターを適切な宿主に導入する。概要は、前記の Sambrook et al. を参照されたい。適切なベクターの選択は、クローニングプロトコルに関する因子に基づいて経験的に行うことができる。例えば、ベクターは用いられている宿主に適合し、そしてこれに対して適切なレプリコンを有していなければならない。更に、ベクターは、発現されるべき融合タンパク質複合体をコードするDNA配列を収容できなければならない。適切な宿主細胞は真核及び原核細胞を包含し、容易に形質転換できて培養培地中で迅速な成長を示すものが好ましい。特に好ましい宿主細胞は、*E. coli*、*Bacillus subtilis* 等のような原核細胞、及び動物細胞及び酵母株、例えば、*S. cerevisiae* のような真核細胞を包含する。哺乳動物の細胞、特にJ588、NSO、SP2-O又はCHOが一般に好ましい。その他の適切な宿主は、例えば、Sf9のような昆虫細胞を包含する。従来の培養条件が用いられる。前記の Sambrook を参照されたい。次いで、安定に形質転換された又はトランスフェクトされた細胞株を選択できる。本発明の融合タンパク質複合体を発現する細胞を公知の手順によって確認できる。例えば、免疫グロブリンと結合している融合タンパク質複合体の発現は、結合した免疫グロブリンに特異的なELISA及び/又はイムノブロットングによって確認できる。IL-15又はIL-15R ドメインに結合している生物活性ポリペプチドを含有している融合タンパク質の発現を検出するためのその他の方法は実施例に開示されている。

【0136】

上で大まかに述べたように、宿主細胞は、所望の融合タンパク質をコードする核酸を繁殖させるための予備的目的で用いることができる。従って、宿主細胞は融合タンパク質の産生を特異的に意図している原核又は真核細胞を包含できる。従って、宿主細胞は具体的に、酵母、ハエ、蠕虫、植物、カエル、哺乳動物細胞、及び融合体をコードする核酸を伝播できる器官を包含する。使用可能な哺乳動物細胞の限定しない例は、CHO dhfr 細胞 (Urlaub and Chasm, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980))、293細胞 (Graham et al., J Gen. Virol., 36:59 (1977)) 又はSP2又はNSOのような骨髓腫細胞 (Galfre and Milstein, Meth. Enzymol., 73(B):3 (1981)) を包含できる。

【0137】

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

【0138】

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

【0139】

各種のプロモーター(転写開始調節領域)を本発明に従って用いることができる。適切

10

20

30

40

50

なプロモーターの選択は提案された発現宿主に依存している。それらが選択された宿主内で機能する限り、異種起源由来のプロモーターを用いることができる。

【0140】

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

【0141】

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

【0142】

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

【0143】

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

【0144】

発現構築物は公知の組み換えDNA技術を用いて構成される(Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1999)。制限酵素消化及びライゲーションはDNAの2つの断片を結合するために用いる基本的な工程である。DNA断片の末端はライゲーションの前に改変を必要とすることがあり、これは突出部に埋めること、ヌクレアーゼ(例えば、ExoIII)で断片の末端部分を欠失すること、部位特異的突然変異、又はPCRで新規な塩基対を加えることによって達成できる。選択された断片の結合を促進するためにポリリンカー及びアダプターを用いることができる。発現構築物は、E. coliの一連の制限、ライゲーション、及び形質転換を用いて段階的に構成化される。発現構築物の構築のために適している多数のクローニングベクターは当該技術分野において公知であって(ZAP及びpBLUESCRIPT SK-1、Stratagene, La Jolla, CA, pET, Novagen Inc.

10

20

30

40

50

、Madison, WI、Ausubel et al., 1999 で引用されている）、特定の選択は本発明に重要ではない。クローニングベクターの選択は、発現構築物の宿主細胞内への導入のために選択された遺伝子導入系に影響を受けるだろう。各段階の終わりに、得られた構築物を、制限、DNA配列、ハイブリダイゼーション及びPCR分析で分析できる。

【0145】

発現構築物を宿主内で線状又は環状の何れかのクローニングベクターとして形質転換するか、又はクローニングベクターから除去してそのまま用いるか、若しくは送達ベクター上に導入することができる。送達ベクターは選択された宿主細胞型中への発現構築物の導入及び保持を促進する。発現構築物は多数の公知遺伝子導入システム（例えば、自然の形質転換受容性、化学的媒介形質転換、プロトプラスト形質転換、エレクトロポレーション、遺伝子銃形質転換、トランスフェクション、又は接合）（Ausubel et al., 1999; Sambrook et al., 1989）の何れかによって宿主細胞内へ導入される。遺伝子導入システムは用いられた宿主細胞及びベクターシステムに応じて選択される。

10

【0146】

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

【0147】

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

20

【0148】

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

30

40

【0149】

本発明の融合タンパク質が実質的に純粋であることが好ましい。すなわち、融合タンパク質が少なくとも80%、又は90%～95%の均質性（w/w）であるように、融合タンパク質が細胞に自然に付随している細胞置換分から単離されていることが好ましい。少なくとも98%～99%の均質性を有している融合タンパク質は、多くの医薬、臨床及び研究適用に対して最も好ましい。実質的に精製されると融合タンパク質は治療適用のために、夾雑物を実質的に含まないはずである。部分的に又は実質的に純粋にまで精製されると

50

、可溶性融合タンパク質を治療的に、又は本明細書に記載されているようなインビトロ又はインビボでのアッセイの実施に用いることができる。実質的な純度はクロマトグラフィー及びゲル電気泳動のような各種標準技術によって確認できる。

【0150】

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

10

【0151】

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

【詳細な説明】

【0152】

ヒトのインターロイキン-15(hIL-15)は抗原提示細胞上に発現されたヒトIL-15受容体鎖(hIL-15R)によって免疫エフェクター細胞にトランス提示されている。IL-15Rは、主に細胞外sushiドメイン(hIL-15R Su)を介して、高い親和性(38 pM)でIL-15に結合する。hIL-15及びhIL-15R Suドメインを複数ドメイン融合複合体を構築するための骨格(スカフォールド)として用いることができることをここで明らかにする。2価及び二重特異性T細胞受容体(TCR)融合複合体の両方をこのスカフォールドを用いてhIL-15及びhIL-15R Su鎖のN末端と融合している各種一本鎖(sc)TCRドメインの組み合わせを介して形成した。これらの融合体において、scTCRドメインは抗原結合活性を保持してhIL-15ドメインは受容体結合及び生物活性を示す。2価scTCR融合体は増大した分子結合力に起因する改善された抗原結合能力を示す一方、2つの異なったscTCRドメインを含有している融合体は2つの同種ペプチド/MHC複合体と結合する能力があった。scTCR及びscCD8ドメインを含有している二重特異性ドメインも2価或いは1価のscTCR分子よりも同族ペプチド/MHC複合体との有意に優れている結合を示して、IL-15:IL-15Rスカフォールドが複数ドメインの所定の標的との相互作用をサポートするのに必要な柔軟性を示すことを明らかにした。驚くべきことに、機能性TCRは、hIL-15及びhIL-15R Suドメインとの融合体として別々にTCR及び鎖を同時発現させることによって形成できた。最後に、融合したhIL-15ドメインを部位特異的突然変異によって操作してスーパーアゴニスト又はアンタゴニストサイトカイン活性をもたらすことができた。同時に、これらの特性は、hIL-15及びhIL-15Rドメインを新規な標的免疫分子を作成するための多用途で機能的なスカフォールドとして用いることができることを示している。

20

30

【0153】

IgGドメイン、特にFc断片は、承認された生物製剤を含む多数の治療用分子のための二量体のスカフォールドとして成功裏に用いられている。例えば、エタネルセプトはヒトIgG1のFcドメインに結合している可溶性ヒトp75腫瘍壊死因子-(TNF-)受容体(sTNFR)の二量体である。この二量体化は、エタネルセプトがTNF活性の阻害を一量体のsTNFRより1,000倍まで強力にすることを可能にして、そして一量体形態より5倍長い血清半減期を有する融合体を提供する。結果的にエタネルセプトはインビボにおけるTNFの炎症誘発活性を中和して多数の異なった自己免疫適応症について患者の予後を改善するのに効果的である。

40

【0154】

その二量体化活性に加えて、Fc断片は、天然のキラー細胞(NK)、好中球、食細胞及び樹状細胞上に提示されるFc受容体との相補活性及び相互作用を介して細胞毒性工

50

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

10

【0155】

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

20

30

【0156】

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

40

50

【 0 1 5 7 】

h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R S uをベースとするスカフォールドは、C D 8 / 及びT C Rドメインが同じp M H C I複合体と結合可能であるが空間的に異なった位置にある、O T 1 s c T C R / s c C D 8ヘテロ二量体を作成するために用いることもできる。可溶性p M H C I試薬を用いる先の検討は、C D 8がオフ速度及びオン速度の両方への影響を介して細胞表面でのT C R : p M H C I相互作用を安定化して増大することを確認している。p M H C I特異的T細胞の活性化に対するC D 8の要件がT C R : p M H C I親和性と逆相関するように、T細胞のC D 8コレセプター活性への依存性を確認する際にこの効果は重要である。しかしながら、可溶性の精製したC D 8 / 、T C R及びp M H C Iタンパク質を用いる幾つかの結合研究は、T C R : p M H C I相互作用がC D 8の存在又は非存在による影響を受けないことを示して、共同結合効果を示唆しなかった。

10

【 0 1 5 8 】

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

20

【 0 1 5 9 】

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

30

40

【 0 1 6 0 】

h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R S uをベースとするスカフォールドは、I g GスカフォールドのF cドメインとほぼ同様に多価又は多重特異的の標的治療薬を作成するために利用できる。エフェクターN K及びC D 8⁺記憶T細胞の増殖及び活性化を刺激するその強力な活性を用いて、h I L - 1 5ドメインは抗体依存性の細胞傷害性及びI g Gに基づく手法に関連する相補体活性化を越えて、潜在的な免疫治療メカニズムの範囲を拡大する。I g G分子のF cドメインの活性を操作するために用いられているものと同様の手法を用いて、I L - 1 5ドメインが、その機能的活性を増大又は減少するように突然変異できることを明らかにする。I L - 1 5ドメインにN 7 2 D突然変異を含んでいるh I L - 1

50

5 : h I L - 1 5 R S u 融合分子が生物活性の 3 ~ 4 倍の増加を示す一方で、I L - 1 5 D 8 N 突然変異は殆ど又は全く活性を表わさないことが示される。I L - 1 5 スーパーアゴニストに基づく融合タンパク質は癌又は感染性疾患のための標的免疫治療薬として役立つ一方、疾患部位で I L - 1 5 応答細胞を阻害できる I L - 1 5 アンタゴニストは、同種移植拒絶反応及び炎症性自己免疫疾患、特に記憶 C D 8 T 細胞が疾患病状の一因となっている場合の治療における治療可能性を有している。非標的 I L - 1 5 突然変異 / F c 2 a アンタゴニストタンパク質は、実験動物モデルにおける膵島及び心臓同種移植の拒絶反応の抑制及び関節炎の発症及び進行を予防するのに有効であることが既に示されている。h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R S u 融合タンパク質に関連している I L - 1 5 アンタゴニストドメインを用いる同様のアプローチが可能である。さらに、ある特定の状況下では、多量体分子を作成するために機能的に不活性なスカフォールドを有することが望ましい。例えば、I L - 1 5 R との相互作用を除去する I L - 1 5 D 8 N 突然変異を含んでいる s c T C R / h I L - 1 5 : s c T C R / h I L - 1 5 R S u 融合体が I L - 1 5 受容体複合体を提示する細胞の優れた T C R 抗原特異的染色をもたらすことを見出した。

10

【 0 1 6 1 】

本明細書における説明の目的のために標的ドメインとして T C R 及び C D 8 分子に焦点を合わせているが、h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R S u スカフォールドを、抗体、接着分子、又はその他の受容体に由来するタンパク質ドメインを用いてその他の新規な分子を構築するために使用できることを理解されたい。結晶構造に基づいて改変に利用可能な h I L - 1 5 及び h I L - 1 5 R S u の C 末端とのタンパク質ドメイン融合体を創出することも可能である。得られる分子は 4 つまでの異なった標的認識性能を有することができる。適切な融合パートナーを用いて、これらのタイプの分子は免疫エフェクター細胞と標的細胞の接合を促進して標的細胞の効果的な殺傷を達成できる。また、エフェクター細胞増殖及び細胞毒性をサポートする免疫刺激活性を提供することによって、複合体の I L - 1 5 ドメインはこれらの過程を更に補強できる。各種の多機能分子は、抗癌及び抗ウィルス免疫治療剤として用いるためにこの概念に基づいた。

20

【 0 1 6 2 】

これまでは、標準的な哺乳類細胞における弱い発現レベルが治療薬としての組み換え h I L - 1 5 の開発を制限していた。本明細書で明らかにしたように、臨床開発及び潜在的に商品化をサポートできるレベルでの s c T C R / h I L - 1 5 : s c T C R / h I L - 1 5 R S u 複合体の発現を達成することができる。また、I L - 1 5 R 鎖が、メカニズムに縛られることなく、恐らくサイトカインの薬物動態を改善することによって、h I L - 1 5 のインビボ活性を増強することが示されている。h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R S u 複合体のこれら 2 つの特性は、その多価特質及び / 又は多重特異性標的設計と合わせて、癌及びウィルス感染症に対する免疫治療薬剤として h I L - 1 5 の最大の能力を得る機会をもたらしている。

30

【 0 1 6 3 】

実施例に提供されているように、免疫グロブリン F c ドメインを含有している h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R S u 融合タンパク質複合体は更なる利点を有することが見出された。F c ドメインの結合が多価及び多重特異性相互作用が可能な多鎖分子の作成を許容する。実際に、同じ s c T C R の複数ドメインを含んでいる本発明の融合タンパク質複合体は二量体 s c T C R 融合体の活性に基づいて予測されたものより増大した抗原結合活性を示した。ある場合では、本発明の融合複合体は、I L - 1 5 R C 担持免疫細胞と F c 受容体担持免疫細胞の両方を結合して活性化でき、強力な免疫刺激活性を許容する。2 つの I L - 1 5 ドメインを含んでいる本発明のタンパク質融合複合体は、他の I L - 1 5 融合タンパク質と比較したときに想定されるよりも優れた I L - 1 5 活性を示すことが分かった。更に、本発明のタンパク質融合複合体は、ペプチド / M H C 提示標的細胞に対する抗体 F c 依存性細胞傷害性を介在することにおいて T C R - I g G 1 融合タンパク質よりもより有効であった。改善された活性は、タンパク質融合複合体のペプチド / M H C 複合

40

50

体との増強された結合及び／又はFc受容体又はIL-15受容体を提示するエフェクター細胞との増大した反応性の結果であるかもしれない。更に、突然変異生成分析によって、融合タンパク質複合体のTCR、IL-15及びIgG Fcドメインのそれぞれがその結合及び機能活性を変化させるように容易に且つ独立して操作されて望ましい生物学的効果を有する多重特異的複合体をもたらすことが分かった。

【0164】

本発明の融合タンパク質複合体は、遊離のIL-15より有意に優れた薬物動態プロファイルを有していることが明らかにされた。また、異なった分析方法で観察された類似したPKプロファイルに基づく、融合タンパク質複合体はポリペプチド鎖解離又は切断の証拠を有していない多鎖分子としてインビボで無傷のままである。更に、本発明の融合タンパク質複合体は動物において標的担持及び非標的担持腫瘍の両方に対する抗腫瘍活性を介在できることが示され、そして等モル用量を投与したrhIL-15よりもより強力な抗腫瘍効果を示した。また、融合タンパク質の有効用量による治療はこれらの動物モデルで良好な耐性を示した。

【実施例】

【0165】

実施例1 - c264scTCR/huIL15R Sushi-huIgG1及びc149scTCR/huIL15N72D遺伝子融合体を含有している発現ベクターの構築。

T2分子(T2M)と呼ばれる融合タンパク質は多鎖ポリペプチドから成っている(図1)。本発明の一実施態様では、これらのポリペプチドの1つは、国際特許公開第WO2008143794号公報(参照により本明細書に取り込まれている)に開示されているようにタンパク質結合ドメインとIL-15(又IL-15変異体)の間の融合を含んでいる。T2の第2ポリペプチドはタンパク質結合ドメイン、IL-15Rドメイン及び免疫グロブリンドメインの間の融合を含んでいる。或いは、タンパク質結合ドメイン-IL-15融合タンパク質は、更に免疫グロブリンドメインと結合してもよい。好ましい免疫グロブリンドメインは他の免疫グロブリンドメインと相互作用して多鎖タンパク質を形成できるようにする領域を含んでいる。例えば、IgG1、CH2-CH3のような、免疫グロブリンの重鎖領域は相互作用してFc領域を作成できる。好ましい免疫グロブリンドメインはFc受容体又は相補体タンパク質結合活性を包含する、エフェクター機能を有し、そして又はグリコキシル化部位を有する領域も含んでいる。ある実施態様では、T2分子の免疫グロブリンドメインは、Fc受容体又は相補体の結合活性若しくはグリコキシル化を減少又は補強して、それにより得られるタンパク質の生物活性に影響を及ぼす突然変異を含んでいる。例えば、Fc受容体との結合を減少する突然変異を含んでいる免疫グロブリンドメインはFc受容体担持細胞に対する低い結合活性を有するT2分子を作成するために用いることができ、これはTCR-特異抗原を認識又は検出するように設計された試薬に対して有利であろう。

【0166】

ヒトIL-15R sushiドメイン(huIL-15R Sushi)及びヒトIgG1定常領域(huIgG1CH1-CH2-CH3)と融合しているp53(aa264-272)1本鎖TCR(c264scTCRと呼ぶ)を含有している発現ベクターの構築を以下のように実施した。c264scTCR/huIgG1遺伝子断片を先に構築したpNEF38-c264scTCR/huIgG1ベクターからPacI及びM1uIで制限消化して除去した。遺伝子断片をゲルで精製し、同じ制限酵素で消化したpMSGVベクターにライゲートして、pMSGV-c264scTCR/huIgG1と呼ぶ構築物をもたらした。CMVプロモーターを含有しているDNA断片をpcDNA3.1から精製し、続いてNruI及びHindIIIで消化した。この断片を、PacIで消化してあるpMSGV-c264scTCR/huIgG1内にライゲートして、DNAポリメラーゼで充填して平滑末端を作成した後HindIIIで消化した。得られた構築物をpMC-c264scTCR/huIgG1と称した。先に構築された、pNEF

38 - c264scTCR/huIL15R Sushi (国際公開第WO2008143794号公報を参照されたい)由来のhuIL15R Sushi遺伝子断片をフロントプライマー:

5' - TGT TGGGAATTCATCACGTGCCCTC - 3' (配列番号6)
及びバックプライマー:

5' - TGGTGTGAATTCCTCTAATGCATTTGAGACTGG - 3' (配列番号7)

を用いて、次のPCR条件下でKOD HOT Start DNAポリメラーゼ(EMD)によって増幅した: 95°C、2分、1サイクル; 95°C、20秒、65°C、20秒; 70°C、20秒、35サイクル; 72°C、10分、1サイクル。ヒトIL-15R Sushi遺伝子のPCR産物をゲルで精製してEcoRIで消化した。この遺伝子をEcoRIで消化してあるpMC-c264scTCR/huIgG1内にライゲートした。ヒトIL-15R SushiドメインをコードするDNA断片のpMC-c264scTCR/huIgG1内へのクローニングは以下の配列を含んでいるc264scTCR/huIL15R Sushi-huIgG1融合遺伝子をもたらした: 3' - 免疫グロブリン重鎖リーダー-264TCR V- - ペプチドリンカー-264TCR V- - ヒトTCR C- - ヒトIL-15R Sushi-ヒトIgG1重鎖。図2に示されている、正確なヒトIL15R Sushi遺伝子挿入を含有している得られたベクター(pMC-c264scTCR-Su/IgG1.PUR)を診断PCRに基づいて同定し、そしてDNAシーケンシングで再確認した。c264scTCR/huIL-15R Sushi/huIgG1遺伝子及びタンパク質はそれぞれ図3及び図4に示される。

【0167】

c264scTCR/huIL-15R Sushi-huIgG1遺伝子融合を含有している異なった発現ベクター(内在EcoRI部位(及び対応するコード配列)を欠失している)を構築した。このベクターのために、c264scTCR遺伝子断片の部分をc264scTCR/huIgG1ベクターから、フロントプライマー:

5' GTACGACTTAATTAACCTCGAGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGG3' (配列番号8)

及びバックプライマー:

5' CTTCCCGTTAAACCCACCAGCTCAGCTCCACGTG3' (配列番号9)

を用いて増幅した。

【0168】

c264scTCR遺伝子断片のTCR 定常領域の残りの部分をc264scTCR/huIgG1ベクターから、フロントプライマー:

5' CTGGTGGGTTAACGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCT3' (配列番号10)

及びバックプライマー:

5' GAGGGGCACGTGATGTCTGCTCTACCCCAAGGCCTCT3' (配列番号11)

を用いて増幅した。

【0169】

huIL15R Sushi遺伝子断片をc264scTCR/huIL15R Sushiベクターから、フロントプライマー:

5' GTAGAGCAGACATCACGTGCCCTCCCCCATG3' (配列番号12)

及びバックプライマー:

5' CCTTGGTGCTAGCTCTAATACATTTGAGACTGGGGGTGTGTCCT3' (配列番号13)

を用いて増幅した。

10

20

30

40

50

【0170】

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

5' C C A G T C T C A A A T G T A T T A G A G C T A G C A C C A A G G G C C C A T C G G T C 3' (配列番号14)

及びバックプライマー：

5' G T A A T A T T C T A G A C G C G T T C A T T A T T T A C C A G G A G A C A G G G A G A G G C T C T T C 3' (配列番号15)

を用いて増幅した。

【0171】

10

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

5' C T G G T G G G T T A A C G G G A A G G A G G T G C A C A G T G G G G T C 3' (配列番号10)

及びバックプライマー：

5' C C T T G G T G C T A G C T C T A A T A C A T T T G A G A C T G G G G G T T G T C C 3' (配列番号13)

を用いる P C R によって遺伝子断片を作成した。

【0172】

得られた P C R 産物及び h u I g G 1 遺伝子断片は、フロントプライマー：

20

5' C T G G T G G G T T A A C G G G A A G G A G G T G C A C A G T G G G G T C 3' (配列番号10)

及びバックプライマー：

5' G T A A T A T T C T A G A C G C G T T C A T T A T T T A C C A G G A G A C A G G G A G A G G C T C T T C 3' (配列番号15)

を用いる P C R によって T C R c / h u I L 1 5 R S u s h i / h u I g G 1 融合遺伝子を作成するための鋳型の役割を果たした。

【0173】

c 2 6 4 s c T C R P C R 産物を P a c I 及び H p a I で消化して、T C R c / h u I L 1 5 R S u s h i / h u I g G 1 融合遺伝子を H p a I 及び N s i I で消化した。消化した遺伝子断片を C M V プロモーターを含む p M S G V レトロウイルスベクター内にライゲートした。得られたベクターを c 2 6 4 s c T C R / S u s h i / h u I g G 1 - p M S G V 又は p M S G V c 2 6 4 S u I g と表した(図5)。c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R S u s h i / h u I g G 1 遺伝子及びタンパク質の配列は、それぞれ図6及び図7に示される。

30

【0174】

1 本鎖 T C R 結合ドメイン(すなわち、c 2 6 4 s c T C R)と I L - 1 5 (又は I L - 1 5 変異体)の融合を産生する発現ベクターの作成は国際公開第 W O 2 0 0 8 1 4 3 7 9 4 号公報に開示されている。特に有用な I L - 1 5 変異体は I L - 1 5 の生物活性を減少若しくは消去するもの又は I L - 1 5 の生物活性を増大するものである。例えば、7 2 位を置換した(すなわち、N 7 2 D 置換)ヒト I L - 1 5 変異体は I L - 1 5 の生物活性を 5 ~ 1 0 倍増大できる。I L - 1 5 変異体は以下の表に提供される。

40

【0175】

【表 1】

突然変異体	位置	8	61	65	72	108	IL15R β γ c 受容体結合	IL15R α 結合	増殖活性
	WT aa	D	D	N	N	Q	+	+	+
1	8	N					-	+	-
2	8	A					-	+	-
3	61		A				-	+	-
4	65			D			-	+	-
5	65			A			-	+	-
6	72				D		3+	+	3+
8	72				R		-	+	-
9	108					A	-	+	-
10	8+65	N		A			-	+	-
11	8+108	A				A	-	+	-
12	8+65	S		R			-	+	-

【0176】

すぐ上の図に記載されている IL - 15 変異体を含有している融合タンパク質複合体を、TCR 特異的抗原である、p53 (aa264-272) / HLA - A2.1 と結合するそれらの能力について特徴付けた。p53 (aa264-272) / HLA - A2.1 を提示する細胞を生成するために、HLA - A2.1 陽性 T2 細胞 (2×10^6 / mL) に 20 μ M の p53 (aa264-272) ペプチドを、1 \times PLE (Altor Bioscience) の存在下 37 で 2 ~ 3 時間負荷した。ペプチドで培養されなかった T2 細胞及び IL - 2 / 15 R c を発現する 32D 細胞をコントロールに供した。次いで、p53 ペプチド負荷 T2 細胞、コントロール T2 細胞、又は 32D 細胞 (2×10^5 / 100 μ L) を次の二量体融合タンパク質複合体 320 nM と 4 で 30 分間培養した：

- 1) c264scTCR / huIL15 + c264scTCR / huIL15R Sushi、
- 2) c264scTCR / huIL15D8A + c264scTCR / huIL15R Sushi、及び
- 3) c264scTCR / huIL15D8N + c264scTCR / huIL15R Sushi。

160 nM の精製した c264scTCRhuIL15 融合タンパク質及び 160 nM の精製した c264scTCRhuIL15R Sushi 融合タンパク質を 4 で 3 時間培養して、これらの複合体を生成した。次いで染色する、細胞を洗浄緩衝液 (0.5% の BSA と 0.05% のアジ化ナトリウムを含有している PBS) で 1 度洗浄して、0.5 μ g のビオチニル化マウスモノクローナル抗ヒト TCR C 抗体 (BF1) で 100 μ L の洗浄緩衝液中、4 で 30 分間染色した。細胞を 1 度洗浄して、0.5 μ g の R - フィコエリトリン共役ストレプトアビジンで 100 μ L の洗浄緩衝液中、4 で 30 分間染色した。細胞を洗浄してフローサイトメトリーで分析するために再懸濁した、

【0177】

c264scTCR / huIL15D8A + c264scTCR / huIL15R Sushi 複合体及び c264scTCR / huIL15D8N + c264scTCR / huIL15R Sushi 複合体は、p53 ペプチド負荷 T2 細胞を特異的に染色することに関して、c264scTCR / huIL15D8N + c264scTCR / huIL

15R Sushiと同等の活性を示した。これらの結果は、これらの融合複合体のそれぞれにおいて多価s c T C Rドメインが十分に機能的であることを示している。IL - 15変異体(D8A及びD8N)を含有している融合タンパク質複合体は32D細胞上に存在しているIL - 15R_α受容体との結合活性を示さない。IL - 15R_α受容体結合の同様な検討をIL - 15変異体を含有しているその他の融合タンパク質を用いて実施して表1に要約した。結果は、IL - 15変異体を含有している本発明の融合タンパク質及び融合タンパク質複合体がペプチド/MHC複合体を認識する活性を保持して、IL - 15R_α受容体との結合活性の減少又は増大を示すことを示唆している。

【0178】

ある特定のT2分子に関しては、IL - 15及びIL - 15R成分と融合した複数の異なった結合ドメインを有することが有用である。このような分子の活性を説明する一例では、HLA - A2と関連して提示されるp53(aa149 - 157)ペプチドに特異的な、1本鎖TCRドメイン(c149 s c T C Rと呼ばれる)をIL - 15N72Dドメインと結合して、得られた融合タンパク質を、c264 s c T C R / h u I L 15 R Sushi / h u I g G 1融合タンパク質と同時に発現させて、c264 s c T C R及びc149 s c T C R結合ドメインを有する多鎖T2タンパク質を産生した。

【0179】

c149 s c T C R / I L 15 N 7 2 D遺伝子融合を生成するために、c149 s c T C R遺伝子断片(T C R - 、リンカー、T C R - 及びT C R - 定常断片)をc149 s c T C R / h u I g G 1発現ベクターからフロントプライマー：

5' G A C T T C A A G C T T A A T T A A G C C A C C A T G G A C A G A C T T A C T T C T T C 3' (配列番号16)

及びバックプライマー：

5' - C T T C C C G T T A A C C C A C C A G C T C A G C T C C A C G T G - 3' (配列番号9)

を用いて増幅した。

【0180】

c149 s c T C R / h u I g G 1ベクターのT C R 定常領域の残分をフロントプライマー：

5' C T G G T G G G T T A A C G G G A A G G A G G T G C A C A G T G G G G T C 3' (配列番号10)

及びバックプライマー：

5' C A C C C A G T T G T C T G C T C T A C C C C A G G C C T C 3' (配列番号17)

を用いて増幅した。

【0181】

h u I L 15 N 7 2 D遺伝子をc264 s c T C R / h u I L 15 N 7 2 D発現ベクターからフロントプライマー：

5' C T G G G G T A G A G C A G A C A A C T G G G T G A A T G T A A T A A G T G A T T T G 3' (配列番号18)

及びバックプライマー：

5' C C T C A T G C A T T C G A A T C C G G A T C A T T A A G A A G T G T T G A T G A A C A T T T G G 3' (配列番号19)

を用いて増幅した。

【0182】

T C R 定常領域配列及びh u I L 15 N 7 2 D遺伝子を含有している得られた産物を鋳型として用い、フロントプライマー：

5' C T G G T G G G T T A A C G G G A A G G A G G T G C A C A G T G G G G T C 3' (配列番号10)

及びバックプライマー：

5' CCTCATGCATTCGAATCCGGATCATTTAAGAAGTGTTG
ATGAACATTTGG3' (配列番号19)

を用いるPCRによって遺伝子断片を生成した。

【0183】

c149scTCR PCR産物をPacI及びHpaIで消化して、TCR c/huIL15N72D PCR産物をHpaI及びBstBIで消化した。消化した遺伝子断片をCMVプロモーター含有pMSGVレトロウィルスベクター内にライゲートした。得られたベクターをc149scTCR/IL15N72D-pMSGVn又はpMSGV-c149IL15N72Dと称した(図8)。c149scTCR/huIL15N72D遺伝子及びタンパク質の配列をそれぞれ、図9及び図10に示す。

10

【0184】

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

発現ベクターを、いくつかの異なる形質転換、トランスフェクション又は形質導入方法によって多様な宿主細胞株内に導入することができる。このような一方法では、CHO-K1細胞(5×10^5)を6ウェルのプレートに播種してCO₂インキュベータ中で1晩培養した。細胞を、c264scTCR/huIL15N72D融合遺伝子を含む発現ベクター5 μ gで、10 μ LのMirus TransIT-LT1試薬(Mirus)を用いて製造会社のプロトコールに従ってトランスフェクトした。トランスフェクション後1日目に細胞を4mg/mLのG418(Invitrogen)を用いて選択した。G418耐性細胞を増殖し、TCR/IL15融合タンパク質発現細胞を限界希釈法で3回サブクローニングして産生細胞株を、捕獲抗体、抗ヒトTCR C抗体(BFI)及び検出抗体であって既に記載されている(出願公開第WO2008143794号公報を参照されたい)ビオチニル化抗ヒトIL-15抗体(BAM247、R&D Systems)を用いるTCR及びhuIL15特異的ELISAによって、培養培地中に分泌される可溶性融合タンパク質のレベルに基づいてスクリーニングした。次いで、c264scTCR/IL15N72D産生細胞株を、c264scTCR/huIL15R Sushi-huIgG1融合遺伝子を含む偽型レトロウィルスベクターで以下のようにして形質導入した。

20

【0185】

偽型レトロウィルスベクターを産生するために、ポリリジンコーティングした10cmのディッシュ(BD Bioscience)内で 2×10^6 個の293GPパッケージング細胞をCO₂インキュベータ内で2日間37℃で培養した。次いで、細胞に、リポフェクタミン2000(Invitrogen)を用いて、9 μ gのプラスミドpMC-c264scTCR/huIL15R Sushi/huIgG1及び4 μ gのVSV-Gエンベロープタンパク質をコードするプラスミドpMD-Gを同時導入した。トランスフェクション後48時間目に、ウィルスを含む上澄液を採取して、0.45 μ Mのフッ化ポリビニリデンフィルターを通過させて細胞残屑を除去した。10 μ g/mLのポリブレン(Sigma-Aldrich)の存在下でウィルスをc264scTCR/IL15N72D産生細胞(6ウェルプレート中、 1×10^5 細胞/ウェル)に適用した。形質導入後2日目に、細胞を10 μ g/mLのピューロマイシン及び2mg/mLのG418を用いて選択した。ピューロマイシン及びG418耐性細胞を増殖し、T2融合タンパク質複合体発現細胞を限界希釈法で3回サブクローニングして、産生細胞株を、捕獲抗体、抗ヒトIgG抗体(Jackson ImmunoResearch)、及び検出抗体であるビオチニル化抗ヒトIL-15抗体(BAM247、R&D Systems)でhuIgG1/huIL15特異的ELISAを用いて、培養培地中に分泌される可溶性融合タンパク質のレベルに基づいてスクリーニングした。

30

40

【0186】

実施例3 - T2融合タンパク質の生成及び精製。

c264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R Sushi/huIgG1を発現する細胞株を生育条件(すなわち、小規模培養フラスコ、スピナー、若しくは攪拌フラスコ、又は大規模の中空繊維、ウェーブバッグ若しくは攪拌タンク生物反応器、又は同等の培養容器及び反応器中で、25~37℃で5~28日

50

間)下で培養して、培養培地中に可溶性タンパク質としてT2分子を産生した。T2分子を精製するために、培養培地をpH調節してセファロースに共有結合させた抗TCR抗体(BF1)を含有している免疫親和性カラムに付した。カラムを洗浄して、T2分子を0.5Mのクエン酸ナトリウム、pH4.0で溶出した。溶出したタンパク質を濃縮して緩衝液をリン酸緩衝食塩液(PBS)に交換し、次いでrプロテインA-セファロースカラムに付した。洗浄工程に続いて、タンパク質を0.5Mのクエン酸ナトリウム、pH4.0で溶出し、次いでPBSに緩衝液を交換した。得られたタンパク質をクーマシー-染色SDS-PAGE及びサイズ排除クロマトグラフィーで特性化した。

【0187】

還元SDS-PAGE条件下で、精製したT2タンパク質は、ホモ二量体分子に予想される単一バンドに移動する精製したc264scTCR/huIgG1及びc264scTCR/huIgG1-CH1融合タンパク質と比較して、c264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R-Sushi/huIgG1成分に予想される分子量に対応する2つのポリペプチドバンドに移動した(図11)。非還元変性条件下では、c264scTCR/huIL15R-Sushi/huIgG1バンドは二量体ポリペプチドと一致する分子量に移動するのに対して、c264scTCR/huIL15N72Dバンドはその単量体形態と一致していた。サイズ排除ゲルろ過クロマトグラフィーにより、天然のT2タンパク質は4本鎖(2×c264scTCR/IL15N72D、2×c264scTCR/huIL15R-Sushi/huIgG1)分子の予想される分子量で溶出された(図12)。これらの結果は、図1に示すように、T2分子がhuIL15N72D及びhuIL15R-Sushiドメインの間の相互作用並びにhuIgG1間の共有結合相互作用に一致している多鎖構造を示すことを確認している。

【0188】

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

【0189】

実施例4 - T2分子の結合活性のインビトロでの特性化

T2分子のドメインの結合活性を特性化してこれらの活性をその他の融合タンパク質のそれと比較するためにインビトロアッセイを実施した。IgG1ドメインを特性化するために、マイクロタイターウェルを抗ヒトIgG1抗体でコーティングして、c264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R-Sushi/huIgG1鎖から成る、等モル量の精製したT2タンパク質、又は精製したc264scTCR/huIgG1融合タンパク質をウェルに適用した。結合及び洗浄工程に続いて、結合したタンパク質を標準的なELISA条件下で抗ヒトIgG1抗体を用いて検出した。

【0190】

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

【0191】

図14に示されているように、T2タンパク質は抗TCR抗体に対して、c264scTCR/huIgG1タンパク質より2倍高い反応性を示した。T2分子の4本鎖TCR融合タンパク質組成物をc264scTCR/huIgG1融合体のホモ二量体組成物と比較すると、このことは予想される。T2分子のTCRドメインのペプチド/MHC結合活性を評価した。等モル量のT2(c264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R-Sushi/huIgG1鎖から成る)又はc264

s c T C R / h u I g G 1 タンパク質を抗ヒト I g G 1 a b でコーティングしたウェルに捕獲して p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) ペプチド / H L A - A 2 ストレプタビジン - H R P 四量体で検出した。図 1 5 に示すように、T 2 タンパク質は、ペプチド / M H C 試薬に対して、c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 タンパク質より 3 倍高い結合活性を示した。その構造及び抗 T C R A b 反応性 (図 1 4 を参照されたい) に基づくと T 2 タンパク質は c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 よりわずかに 2 倍高い結合活性を示すことが予測されるので、このことは予想外であった。従って、T 2 分子構造は、個々の成分に基づいて予測されるものよりもより優れた抗原特異的結合活性をもたらす。この増強した結合活性は、より小さい立体障害、優れた親和性効果、協調相互作用及び / 又は T C R ドメインとペプチド / M H C 抗原の間の優れた構造適合の結果であろう。

10

【 0 1 9 2 】

実施例 5 - T 2 I L - 1 5 ドメインの生物活性の特性化

T 2 分子の I L - 1 5 ドメインの活性も評価した。マイクロタイターウェルを抗ヒト I L - 1 5 抗体でコーティングして、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R S u s h i / h u I g G 1 鎖から成る、精製した T 2 タンパク質、又は精製した c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質の等モル量をウェルに適用した。結合及び洗浄工程に続いて、結合したタンパク質を標準的な E L I S A 条件下で抗ヒト I L - 1 5 抗体で検出した。

【 0 1 9 3 】

図 1 6 に示したように、T 2 タンパク質は、それぞれの T 2 分子が 2 つの I L - 1 5 ドメインを含有しているという仮説に基づいて予測したように、抗 I L - 1 5 A b に対して c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 融合体と比較して増大した反応性 (1 . 6 倍高い) を示した。T 2 分子の I L - 1 5 ドメインの生物活性を、サイトカイン依存性 3 2 D 細胞株を用いる増殖アッセイで更に特性化した。細胞増殖を測定するために、3 2 D 細胞 (2×10^4 細胞 / ウェル) を濃度を上昇させた T 2 タンパク質 (c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R S u s h i / h u I g G 1 鎖から成る) 又は c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質と 3 7 で 4 8 時間培養した。細胞増殖試薬 W S T - 1 (Roche Applied Science) を製造会社の手順に従って、細胞生育の終わりの 4 時間の間に添加した。代謝的に活性な細胞による W S T - 1 の染色されたフォルマザン染料への変換を 4 4 0 n m の吸収測定で確認した。

20

30

【 0 1 9 4 】

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

【 0 1 9 5 】

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

40

【 0 1 9 6 】

50

実施例 6 - T2 Fcドメインの結合及び生物活性の特性化

T2分子のIgG1 Fcドメインの結合活性を細胞結合アッセイで特性化した。Fcガンマ受容体担持U937細胞を33 nMのT2タンパク質(c264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1鎖から成る)、c264scTCR/huIgG1又はA2AL9scTCR/IgG1(陰性コントロール)と20分間培養した。細胞を1度洗浄して、PE-共役p53(aa264-272)ペプチド/HLA-A2四量体と培養した。U937細胞表面上のFcガンマ受容体への結合を、図19Aに示すように、フローサイトメトリーで分析した。タンパク質の濃度範囲を用いる同様なU937結合試験も実施して、染色細胞に対する平均蛍光強度を図19Bにプロットした。

10

【0197】

これらの検討の結果は、U937細胞が、対応するc264scTCR/huIgG1融合タンパク質よりT2分子によってより効果的に染色されることを示していて、T2分子のFc受容体結合活性を検証した。Fcドメインの生物活性を評価するために、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)活性を介在するT2分子の能力を評価した。この検討では、0.137~100 nMのT2タンパク質、c264scTCR/huIgG1又はA2AL9scTCR/IgG1(陰性コントロール)を96ウェルプレートに添加した。HLA-A2陽性T2標的細胞を10 µMのp53aa264-272ペプチドでパルスして50 µg/mlのカルセイン-AMで標識化した。融合タンパク質をウェル当り 1×10^4 標的細胞と混合して、 1×10^6 /ウェルの新鮮なヒトPBMCを添加した。プレートをCO₂インキュベーター中、37℃で2時間培養し、100 µlの条件培地を採取して、溶解細胞からのカルセイン放出を分析した。カルセインをEx-485 nm、Em-538 nm、及びカットオフ-530 nmで蛍光リーダーを用いて定量した。特異的な細胞溶解を次の式で算出した：特異的溶解=[exp-(バックグラウンド-自動放出)]/[完全放出-(バックグラウンド-自動放出)]×100%。Exp=融合タンパク質+T2細胞+PBMC；バックグラウンド=培地のみ；自動放出=T2細胞のみ；完全放出=T2細胞+0.5%トリトンX-100。

20

【0198】

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

30

【0199】

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

T2タンパク質の細胞上のペプチド/MHC標的との結合活性を評価するために、HLA-A2陽性T2細胞を各種の量のp53aa264-272ペプチドでパルスした。次いで、細胞をそれぞれ83 nMのT2タンパク質(c264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1鎖から成る)、c264scTCR/huIgG1又はA2AL9scTCR/IgG1(陰性コントロール)と培養した。細胞をビオチニル化抗TCR Ab(BF1)及びストレプトアビジン-PEと培養した。次いで、細胞を、図21Aに示すようにフローサイトメトリーで分析した。染色細胞に対する平均蛍光強度を図21Bにプロットした。

40

【0200】

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

【0201】

50

別のペプチド/MHC標的に特異的なTCRドメインを含有しているT2分子を用いて同様な結果が期待される。例えば、ヒト腫瘍関連タンパク質；p53、gp100、MART1、MAGE-A3、PSMA、PSA、Her2/neu、hTERT、チロシナーゼ、スルビピン、WT1、PR1、NY-ESO1、EGFR、BRAF及びその他に由来する様々なペプチドがHLA分子に結合すること及びTCR相互作用を介するヒトT細胞応答に対する標的であることが知られている。更に、HIV、HCV、HBC、CMV、HTLV、HPV、EBV及びその他に由来するウィルスペプチド抗原を提示するHLA複合体に特異的なTCRが同定されている。これらのTCRは、IL-15又はhuIL15R Sushitankinと融合でき、そして上記のような適切なペプチド負荷抗原提示細胞上でペプチド/MHC反応性について特性化できる。

10

【0202】

実施例8 - 2つの異なったTCRドメインを担持しているT2分子の特性化

上で示したように、T2分子のIL-15、IL-15R及びIgG成分と融合した複数の異なったTCRドメインを有することは有用である。これは、1つ以上の抗原標的活性を単一の多鎖タンパク質内に存在させることができる。この手法の実行可能性を明らかにするために、c264scTCR-Sushitankin-hIgG1-pMSGVc及びc149scTCR-hIL15N72D-pMSGVn発現ベクターをIMDM-10培地で培養したCHO細胞内に同時トランスフェクトした。室温で6日間トランスフェクト体を培養した後、培養上澄液を採取した。c149scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R Sushitankin/huIgG1のT2分子をELISAで特性化した。c264scTCR/huIL15R Sushitankin/huIgG1及びc264scTCR/huIL15N72Dの精製したT2分子をコントロールとして用いた。TCRドメインを評価する1つのアッセイでは、ウェルを抗ヒトTCR Ab (BF1)でコーティングし、融合タンパク質を添加して、結合したタンパク質をビオチニル化抗ヒトTCR Ab (W4F-BN)で検出した。

20

【0203】

図22に示した結果は、c149scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R Sushitankin/huIgG1から成るT2分子のTCRドメインが抗TCR抗体で検出可能であったことを示している。T2タンパク質のIgG1及びIL-15ドメインを評価するために、上記のようなヤギ抗ヒトIgG Ab捕獲及び抗ヒトIL-15 Ab検出から成るELISAを用いた。

30

【0204】

図23に示したように、c149scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R Sushitankin/huIgG1から成るT2分子はこの形態で検出可能であり、IgG1及びIL-15N72Dを含有しているタンパク質鎖の間の相互作用を示した。c149scTCRドメインの活性も、抗ヒトIgG Ab捕獲及びp53 (aa149-157)ペプチド/HLA-A2ストレプトタビジン-HRP四量体による検出を用いるELISAで試験した。

【0205】

図24に示したように、c149scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R Sushitankin/huIgG1から成るT2分子はこの形態で検出可能であり、IgG1ドメインを有する分子もc149scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R Sushitankin/huIgG1鎖の間の相互作用を介するp53 (aa149-157)ペプチド/HLA-A2複合体との結合活性も有していることを示した。抗ヒトIgG Ab捕獲及びp53 (aa149-157)ペプチド/HLA-A2或いはp53 (aa264-272)ペプチド/HLA-A2四量体による検出、又は抗TCR Ab (BF1)捕獲及び抗TCR Ab若しくは抗IL-15 Ab検出から成る更なるアッセイは、それぞれのドメインがc264scTCR/huIL15R Sushitankin/huIgG1及びc149scTCR/huIL15N72D鎖から成るT2タンパク質において機能的に結合されたことを立証した(図24)

40

50

。

【0206】

別のタンパク質鎖、すなわち、c264scTCR/huIL15N72D及びc149scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1鎖上でこれら2つのTCRドメインが発現されるT2分子も作成した。これらの分子のFc及びTCR活性を、続いてU937細胞と結合して、そしてp53(aa264-272)ペプチド/HLA-A2四量体による検出、次いでフローサイトメトリーによって評価した。

【0207】

図25に示したように、c264scTCR/huIL15N72D及びc149scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1鎖から成るT2分子は、Fcドメインを介するU937細胞上のFcガンマ受容体を結合すること及びc264scTCRドメインを介してp53(aa264-272)ペプチド/HLA-A2複合体を認識することが可能であった。これらの検討は複数の機能的TCRドメイン並びにIL-15、IL-15R及びIgG1ドメインを有するT2分子が図1に示す構造を形成できることを立証している。

10

【0208】

実施例9 - マウス及びカニクイザルにおけるT2タンパク質薬物動態の特性化

IL-15による治療可能性の主な制約はインビボにおけるサイトカインの非常に短い生物学的半減期である。動物モデルにおけるT2分子の生物学的薬物動態特性を評価するために、HLA-A2/Kbトランスジェニックマウス(5匹マウス/時点)に精製したT2タンパク質(c264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1鎖から成る)135µg/マウスを静脈内注射した。このc264scTCRが制限されている、HLA-A2.1の存在がタンパク質の薬物動態に影響を与え、そして他の非ヒトモデルより薬物動態より関連性のある「ヒト化」観点をもたらすはずであるので、HLA-A2/Kbトランスジェニックマウスモデルを選択した。この試験で、注射後0、1、4、8、24、48、72、及び96時間点で血液を採取して血清中のT2タンパク質の濃度をELISAで測定した。2つの異なったELISA形態を用いた：1)ヤギ抗ヒトIgGAb捕獲及び抗ヒトTCRAb(W4F-BN)検出、又は2)ヤギ抗ヒトIgGAb捕獲及び抗ヒトIL-15Ab検出。これらのアッセイは無傷タンパク質及び多鎖タンパク質複合体の安定性の評価を可能にする。

20

30

【0209】

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

40

【0210】

霊長動物モデルにおけるT2分子の生物学的薬物動態特性を評価するために、カニクイザル(2頭、雄1頭、雌2頭)に精製したT2タンパク質(c264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1鎖から成る)0.5mg/kgを静脈内注射した。この試験で、注射後0、1、4、8、24、48、72、96及び120時間点で血液を採取して血清中のT2タンパク質の濃度をELISAで測定した。3つの異なったELISA形態を用いた：1)抗ヒトTCRAb(F-1)捕獲及びHRP共役ヤギ抗ヒトIgGAb検出、又は2)抗ヒトIL-15Ab捕獲及びHRP共役ヤギ抗ヒトIgGAb検出、又は3)抗ヒトIL-15

50

A b 捕獲及び抗ヒト T C R A b (W 4 F - B N) 検出。これらのアッセイは無傷タンパク質及び多鎖タンパク質複合体の安定性の評価を可能にする。

【 0 2 1 1 】

図 2 6 B に示したように、T 2 分子は静脈内注射に続いて約 4 ~ 6 時間の生物学的半減期を有していた。これは報告されている皮下注射後のサルで観察された ~ 1 時間の I L - 1 5 の半減期 (Villinger, F. et al. 2004. Vaccine 22: 3510) よりかなり長い。従って、T 2 分子は遊離の I L - 1 5 より有意に優れた薬物動態プロファイルを有しているように思われる。更に、3 つの E L I S A で観察された同様の P K プロファイルに基づくところ、これらのデータは T 2 タンパク質が開裂の証拠の無い、多鎖分子として無傷のままであることを示唆しているネズミの P K データをサポートしている。

10

【 0 2 1 2 】

実施例 1 0 - 異種移植腫瘍マウスモデルにおける固形ヒト腫瘍に対する T 2 分子の抗腫瘍活性

T 2 分子の治療効果を確認するために、ヌードマウスにおいて p 5 3 + H L A - A 2 + A 3 7 5 メラノーマ細胞株を有する原発腫瘍増殖モデルにおける抗腫瘍活性を試験した。腫瘍細胞をヌードマウスに皮下注射して、腫瘍を治療開始前に 1 0 0 m m ³ まで生育させた。腫瘍担持マウスに、3 2 μ g / 用量 (1 . 6 m g / k g) の c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R S u s h i / h u I g G 1 鎖から成る T 2 タンパク質、3 2 μ g / 用量 (1 . 6 m g / k g) の c 2 6 4 s c T C R / h u I L 2、又は 6 0 μ g / 用量 (3 m g / k g) の 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 を静脈内注射した。マウスを 1 日おきに 1 週間処置し (3 回注射)、9 日の休息期間に続いてその後 1 日おきに更に 1 週間処置した (3 回注射)。試験中に、腫瘍の生育を測定して腫瘍容量をプロットした (図 2 7)。結果を P B S のみで処置したマウスにおける A 3 7 5 腫瘍の生育と比較した。

20

【 0 2 1 3 】

図 2 7 に示したように、A 3 7 5 腫瘍の生育は T 2 分子又は T C R I L 2 若しくは T C R I g G 融合タンパク質の何れかで処置したヌードマスにおいて阻害された。以前の研究では、このモデルにおける p 5 3 特異的 T C R - I L 2 又は T C R - I g G 融合タンパク質の抗腫瘍効果は、エフェクタードメイン活性を、T C R ドメインを介して腫瘍部位を標的化した結果であったことが示された (Belmont et al. 2006 Clin. Immunol. 121:29,、Mosquera et al. 2005 J. Immunol. 174:4781)。この可能性を評価するために、非標的化 T C R ドメインを有するタンパク質が A 3 7 5 腫瘍異種移植マウスモデルで試験されるだろう。p 5 3 に特異的な T 2 タンパク質と比較した非標的化 T 2 分子の A 3 7 5 腫瘍に対する減少した有効性は、腫瘍抗原標的化が T 2 分子の抗腫瘍活性で役割を果たしている証拠を提供するだろう。

30

【 0 2 1 4 】

実施例 1 1 - I L - 1 5 及び F c ドメインに突然変異を有する T 2 分子の特性化

国際出願公開第 W O 2 0 0 8 1 4 3 7 9 4 号公報に開示されているように、I L - 1 5 R 鎖と相互作用するその能力を増大又は減少してその生物活性に影響を及ぼす突然変異を I L - 1 5 ドメインに導入することができる。例えば、上で示したように、N 7 2 D 置換は I L - 1 5 の生物活性を 5 ~ 1 0 倍増大することができる。別の例では、アンタゴニスト機能をもたらす I L - 1 5 の活性を減少することが有用である。T 2 分子形態に関連するこのような突然変異の効果を試験するために、I L - 1 5 ドメインの 8 位 (すなわち、D 8 N) 及び 6 5 位 (すなわち、N 6 5 D) の置換を含んでいる c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 構築物を作成して c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R S u s h i / h u I g G 1 タンパク質と同時発現した。c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 変異体及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R S u s h i / h u I g G 1 鎖の得られた複合体を、実施例 5 に記載されているように 3 2 D 細胞を用いる I L - 1 5 生物活性について試験した。図 2 8 に示したように、I L - 1 5 D 8 N 及び N 6 5 D 変異を含んでいる T 2 分子は、I L - 1 5 N 7 2 D ドメイン又は c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 融合を含んでい

40

50

る T2 分子と比較して 32D 細胞増殖をサポートするそれらの能力の有意な減少を示した。実施例 5 の結果と一致して、IL-15N72D ドメインを含んでいる T2 分子は c264scTCR/huIL15N72D 又は c264scTCR/huIL15 融合体の何れかよりもより高い IL-15 活性を示した。

【0215】

Fc ガンマ受容体又は相補体と相互作用するその能力を減少することが先に示された IgG1 Fc ドメイン (Hessell, A. J., et al. 2007. Nature 449: 101-1040、参照により本明細書に取り込まれている) 内にも突然変異を導入した。例えば、IgG1 C_H2 の 234 位及び 235 位のロイシン残基 (抗体コンセンサス配列に基づく番号付け) (すなわち、...PELLLG... (配列番号 1)) のアラニン残基による置換 (すなわち、...PEAAG... (配列番号 2)) は、Fc ガンマ受容体結合の損失をもたらすのに対して、IgG1 C_H2 の 322 位のリジン残基 (抗体コンセンサス配列に基づく番号付け) (すなわち、...KCKSL... (配列番号 3)) のアラニン残基による置換 (すなわち、...KCA... (配列番号 4)) は相補体活性化の損失をもたらす (Hessell, A. J., et al. 2007. Nature 449: 101-1040、参照により本明細書に取り込まれている)。これらの置換を c264scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1 構築物内に導入して、得られたタンパク質を c264scTCR/huIL15N72D 又は上記の別の TCR-IL15 変異体と同時発現した。これらの複合体が p53aa264-272 ペプチド-負荷 HLA-A2 陽性 T2 標的細胞に対するヒト PBMC の ADCC 活性を介在する能力を実施例 6 に記載されているようにして評価した。Fc 機能を変化させることが知られているその他の突然変異は、例えば、Lazar et al., PNAS, 103:4005-4010, 2006 (参照により本明細書に取り込まれている) に提供されている。

【0216】

図 29 に示したように、c264scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1-LALA 及び c264scTCR/huIL15N72D 鎖を含んでいる T2 複合体は Fc-LALA 変異体によって示された Fc ガンマ受容体結合の損失と一致して高レベルの ADCC 活性を介在することができなかった。これと対照的に、c264scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1-KA 及び c264scTCR/huIL15N72D 鎖又は上記の IL-15 変異体 (N65D 又は D8N) を含んでいる複合体は c264scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1-c264scTCR/huIL15N72D 複合体と同レベルの ADCC 活性を示した。メカニズムに捕らわれずに、これらのデータも、IL-15 ドメイン及び Fc 相補体結合ドメインが ADCC 活性を介在することとは関連していないという可能性に基づいて予測される。

【0217】

IL-15 及び Fc 突然変異の、ヒト NK 及び T 細胞応答を刺激する T2 分子の能力への影響も試験した。1.8 ~ 5 × 10⁵ 細胞/mL のヒト PBMC を、上記の突然変異を含んでいる 1 nM の T2 分子、又はコントロールとして 10 ng/mL の組み換えヒト IL-2 又は IL-15 を含んでいる培地中、37 °C で 4 日間培養した。

【0218】

次いで、NK 細胞傷害性を、NK 感受性 K-562 細胞を標的細胞として用いて評価した後、50 µg/mL のカルセイン-A-M で標識化した。各種比の PBMC 及び K-562 細胞を混合して CO₂ インキュベーター内、37 °C で 2 時間培養し、100 µl の条件培地を採取して、溶解した細胞から放出されたカルセインについて分析した。カルセインを Ex-485 nm、Em-538 nm、及びカットオフ-530 nm で蛍光リダーを用いて定量した。特異的細胞溶解を次の式を用いて計算した：特異的溶解 = [exp - (バックグラウンド - 自動放出)] / [完全放出 - (バックグラウンド - 自動放出)] × 100 %、Exp = K-562 細胞 + PBMC；バックグラウンド = 培地のみ；自動放出 = K-562 細胞のみ；完全放出 = K-562 細胞 + 0.5 % トリトン X-100。

【0219】

図30に示したように、c264scTCR/huIL15R Sushi/huIgG1及びc264scTCR/huIL15N72D鎖を含んでいるT2分子との培養は、培地だけで培養した後に観察されたものと比較してヒトPBMCのNK細胞溶解活性を刺激することができた。更に、FcドメインLALA及びKA変異体を含んでいるT2分子もNK細胞を刺激できたのに対して、IL-15ドメインにN65D又はD8N置換を含有しているものはNK細胞傷害性を殆ど又は全く刺激しないはずだ。これらの結果と一致して、ヒトPBMCの、c264scTCR/huIL15R Sushi/huIgG1及びc264scTCR/huIL15N72D鎖を含んでいるT2分子、又はFcドメインLALA及びKA変異体を有するものとの培養はCD56+ NK細胞の増殖の増大をもたらしたのに対して、IL-15N65D又はD8N置換を含んでいるT2分子はそれほどのNK細胞増殖活性をもたらさなかった(図31)。それぞれのIL-15の機能性に基づいてこのような結果が期待される。

10

【0220】

ある適用に対しては、T2分子とIL-15又はFc受容体との間の減少した相互作用は、これらの受容体を担持している細胞との非特異的結合を減少するために望ましいだろう。これを評価するために、IL-15及びFc突然変異を含有しているT2分子をペプチドを負荷させたT2細胞を用いてTCR特異的標的細胞認識について評価した。T2分子又はc264scTCR-ストレプタビジン四量体陽性コントロールによる細胞染色を、実施例7に記載された方法を用いてp53ペプチドを負荷させたT2細胞(T2.265)及び負荷させていないT2細胞(T2)上で実施した(図32A)。非負荷細胞の染色に基づく、c264scTCR/huIL15R Sushi/huIgG1及びc264scTCR/huIL15N72D鎖を含むT2分子は、c264scTCR-ストレプタビジン四量体又はBF1抗体コントロールと比較して、有意な細胞結合を示すことが明確である。FcLALA又はIL-15N65D若しくはD8N突然変異の導入はこの細胞結合を減少して、Fc及びIL-15受容体の両方との相互作用がT2複合体結合に役割を果していることを示唆している。FcLALAとIL-15N65D又はD8N突然変異との組み合わせは、c264scTCR/huIL15R Sushi/huIgG1-LALA及びc264scTCR/huIL15D8Nを含む分子が上記BF1抗体陰性コントロールを負荷していないT2細胞との結合を示さないように、T2複合体結合を更に減少する。p53ペプチド負荷細胞の染色もFc又はIL-15突然変異の導入によって達成される。しかしながら、ペプチド負荷対非負荷細胞のT2分子染色の平均蛍光強度を比較したとき(特異的対非特異的の比)、c264scTCR/huIL15R Sushi/huIgG1-LALA及びc264scTCR/huIL15D8N鎖を含むT2分子がp53ペプチド抗原に対して最も高い染色特異性をもたらすことが明確である(図32B)。これらの結果は、T2分子のTCR、IL-15及びIgGFcドメインのそれぞれの結合活性が容易に独立して操作されて望ましい生物活性を有する多重特異的複合体をもたらすことを示している。

20

30

【0221】

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

40

【0222】

実施例12 - 非標的化T2分子の特性化

いくつかの適用では、T2複合体を用いて特異抗原を標的化する必要はない。このよう

50

な分子では、T C R 結合ドメインのような抗原特異的ドメインは突然変異によって又は完全に欠失させることによって不活性化できる。本明細書に記載されている方法を用いて、T 2 M T C R と称する h u I L 1 5 R S u s h i / h u I g G 1 及び h u I L 1 5 D 8 N 鎖を含むような分子の活性を、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R S u s h i / h u I g G 1 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 鎖を含む T 2 分子 (T 2 M と称する) 及び h u I g G 1 鎖を欠失している T 2 分子 (c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R S u s h i 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 、 T 2 M I g 又は c 2 6 4 s c T C R 二量体と称する) と比較した。実施例 5 に記載されているように 3 2 D 細胞生育をサポートする能力を試験したときに、T 2 M T C R は組み換えヒト I L - 1 5 を用いて観察されたものの > 2 4 倍である非常に強い I L - 1 5 活性を示した (図 3 3 A) 。

10

【 0 2 2 3 】

ヒト免疫細胞生育をサポートする T 2 M T C R の能力も評価した。 1×10^6 細胞 / m l のヒト P B M C を T 2 M (0 . 5 n M) 、 T 2 M T C R (0 . 5 n M) 、 又は T 2 M I g (1 n M) の存在下又は非存在下で培地と 7 日間培養した。細胞を抗 C D 4 5 R O 及び抗 C D 8 、 又は抗 C D 8 、 抗 C D 9 5 、 及び抗 C C R 7 、 又は抗 C D 5 6 及び抗 C D 1 6 で染色して、F A C S c a n で分析した。図 3 3 B に示される 8 つの異なったドナーから得た平均した結果は、T 2 M T C R 及びその他の T 2 分子が、エフェクター記憶 T 細胞を包含する、各種 C D 8 + 記憶 T 細胞及び N K 細胞サブセットの増殖を効果的に刺激できたことを示唆している。これらの細胞の N K 細胞活性を実施例 1 1 に記載されている方法を用いて試験した。図 3 3 C に示される 2 つのドナー P B M C 調製物からの代表的な結果は、T 2 M T C R 及びその他の T 2 分子が N K 細胞溶解活性を効果的に刺激できたことを示唆している。これらの結果の全てが、T 2 M T C R タンパク質は強力な免疫刺激性分子であることを示唆している。

20

【 0 2 2 4 】

実施例 1 3 - T 2 分子のインビボ活性

T 2 分子の免疫刺激活性を更に特性化するために、T 2 M 、 T 2 M T C R 、 I g G 1 C H 1 ドメインを欠失している T 2 M T C R (T 2 M T C R C H 1) 、 F c - L A L A 突然変異を有する T 2 M (T 2 M L A L A) 及び I L - 1 5 D 8 N 突然変異を有する T 2 (T 2 M D 8 N) を C 5 7 B L / 6 マウスにおいて N K 及び C D 8 T 細胞の増殖を誘発するそれらの能力について試験した。更に、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 、 c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R S u s h i 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D + c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R S u s h i 複合体を評価した。

30

【 0 2 2 5 】

マウスに I L - 1 5 の 2 . 5 μ g 用量に相当する量の融合タンパク質を 1 日目と 4 日目に静脈内に注射した。8 日目に、血液細胞と脾臓細胞を採取し、C D 8 T 細胞及び N K 細胞について染色して、フローサイトメトリーで分析した。図 3 4 に示した結果は T 2 分子が血液及び脾臓の N K 細胞及び C D 8 T 細胞の両方をインビボで増殖させるのに効果的であることを示唆している。T 2 M L A L A は T 2 M と同様の活性を示して、F c R 結合及びシグナル伝達は N K 及び C D 8 T 細胞の増殖に有意な役割を果さないであろうことを示唆した。T 2 M D 8 N 処置は T 2 M と比較すると減少した活性をもたらし、ヒト P B M C を用いるインビトロにおける分子の免疫刺激活性を D 8 N 突然変異が消失するという知見を確認した。T C R の欠失 (T 2 M T C R 及び T C R) と C H 1 の欠失 (T 2 M T C R C H 1) は減少した活性を示した。これらの結果はこれらのより小さい分子のより短い半減期に起因しているかもしれない。c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 、 c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R S u s h i 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D + c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R S u s h i 複合体も T 2 M と比較して減少したインビボ活性を示して、T 2 分子がより強力な免疫刺激性化合物であることを示唆しているインビトロ結果を立証した。

40

50

【 0 2 2 6 】

実施例 1 4 - 多重特異的 T 2 分子

多重結合ドメインのスcaffoldとして作用する I L - 1 5 と I L - 1 5 R / I g G F c の融合ドメインの能力を更に特性化するために、h u I L 1 5 N 7 2 D と結合した H - 2 K ^b - 制限 O V A a a 2 5 7 - 2 6 4 ペプチド (S I I N F E K L (配列番号 2 0)) に特異的な 1 本鎖 T C R ドメイン (O T 1 s c T C R) と h u I L 1 5 R S u s h i / h u I g G 1 融合と結合した 1 本鎖 C D 8 / ドメインを含む、融合タンパク質複合体 (O T 1 - C D 8 - T 2 M) を作成した。1 本鎖 C D 8 / ドメインは、(G ₄ S) ₄ ペプチドリンカー (配列番号 2 1) を介してネズミ C D 8 の細胞外ドメインと結合しているネズミ C D 8 の細胞外ドメインを含んでいる。C D 8 が、T C R 特異的ペプチド / M H C 接合部と遠位の M H C 分子内の部位と結合することが十分に特性化される。従って、O T 1 - C D 8 - T 2 M 複合体の O T s c T C R と s c C D 8 / ドメインの両方が O V A a a 2 5 7 - 2 6 4 / H - 2 K ^b - 分子上の異なった部位で相互作用すると期待される。

10

【 0 2 2 7 】

これを試験するために、O T 1 - C D 8 - T 2 M の結合活性を O T 1 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 融合体のそれと E L I S A で比較した。それぞれのタンパク質の等モル量を抗 T C R C m A b (H 5 7) でコーティングしたウェル上に捕獲して、O V A a a 2 5 7 - 2 6 4 / H - 2 K ^b 四量体又は I L 1 5 、C D 8 、C D 或いは T C R V 2 に対する m A b でプローブした。アッセイを抗ヒト I g でコーティングしたウェルで実施して、抗 T C R V 2 でプローブした。

20

【 0 2 2 8 】

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

30

【 0 2 2 9 】

実施例 1 5 - 機能的 scaffold としての I L 1 5 : I L - 1 5 R ドメイン (ペプチド / M H C クラス I (p M H C I) 四量体の製造) -

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

40

【 0 2 3 0 】

(E L I S A) -

免役プレート (Maxisorb, Nunc, Rochester, NY) を、c 2 6 4 s c T C R 融合タンパク質を捕獲するための (B F 1) 8 A 3 . 3 1 m A b で、或いは O T 1 s c T C R 融合タンパク質を捕獲するための H 5 7 - 5 9 7 m A b でコーティングした。洗浄した後、結果

50

の部に詳述したような各種プローブを用いてタンパク質を検出した。次いで、A B T S (2 , 2 ' - アジノピス[3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸] - ジアンモニウム塩) 基質を加えて、9 6 ウェルプレートリーダー (Versamax, Sunnyvale, CA) を用いて 4 0 5 n m における吸光度を測定した。

【 0 2 3 1 】

(フローサイトメトリー) -

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

【 0 2 3 2 】

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

【 0 2 3 3 】

(細胞増殖アッセイ) -

先に記載されている (2 5) ようにして細胞増殖を測定した。すなわち、3 2 D 細胞 (1 × 1 0 ⁵ 細胞 / ウェル) を、等モル濃度の T C R / h I L - 1 5 R S u の存在下又は非存在下で、濃度を増大させた s c T C R / h I L - 1 5 又は s c T C R - h I L 1 5 突然変異タンパク質と 3 7 で 4 8 時間培養した。細胞増殖試薬 W S T - 1 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) を製造会社の手順に従って細胞増殖の最後の 4 時間の間に添加した。代謝的に活性な細胞による W S T - 1 の着色フォルマザン色素への変換を 4 4 0 n m における吸光度測定によって確認した。P r i z m 4 ソフトウェア (GraphPad Software, La Jolla, CA) で適合させる非線形回帰可変傾斜曲線によって実験データから作成した用量依存曲線で E C ₅₀ を確認した。

【 0 2 3 4 】

(表面プラズモン共鳴) -

O t 1 s c T C R 融合タンパク質のそれらの同種 p M H C I との親和定数を、B I A c o r e 2 0 0 0 計器 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) で表面プラズモン共鳴 (S P R) 手法を用いて確定した。ビオチニル化 p M H C I 複合体を、H B S 緩衝液 (1 0 m M の H E P E S、1 5 0 m M の N a C L、3 . 4 m M の E D T A、0 . 0 0 5 % の p 2 0 界面活性剤、p H 7 . 4) 中 2 μ g / m l のタンパク質を流速 1 0 μ l / 分で注入して、S A 5 センサーチップ (GE Healthcare, Piscataway, NJ) のストレプトタビジンでコーティングした表面上に固定化した。これは固定化した p M H C I 複合体の 1 0 0 0 ~ 1 2 0 0 R U をもたらした。

【 0 2 3 5 】

精製した O T 1 s c T C R 融合タンパク質を H B S 中で 1 μ M、0 . 5 μ M 及び 0 . 2 5 μ M に希釈する。それぞれの濃度を流速 1 0 μ l / 分で新たに固定化した p M H C I 表面上、並びにビオチンでブロックしたコントロールのストレプトタビジン表面 (ベースライン) 上に 1 度注入し (5 0 μ l) て、結合曲線を記録した。解離定数 (K _D) 及び結合 (k _{on}) と解離 (k _{off}) の比を、B I A 評価 4 . 1 . 1 ソフトウェア (GE Healthcare Sciences, Piscataway, NJ) を用いて、修正した結合曲線 (ベースラインを差し引いた) から計算した。

【 0 2 3 6 】

10

20

30

40

50

(h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R スカフォールドを用いる s c T C R 二量体の作成) - c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 と称する生物活性な、二元機能を有する融合タンパク質は、h I L - 1 5 の N 末端を 3 つのドメイン、p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 5 7) ペプチド抗原 (c 2 6 4 s c T C R) に特異的な H L A - A * 0 2 0 1 - 制限キメラ T C R と融合することによって生成できることを先に示した (2 5) (図 3 6 A)。c 2 6 4 s c T C R 及びヒト I L - 1 5 R の s u s h i 結合ドメイン (a a 1 - 6 6) (h I L - 1 5 R S u) を用いて同様な融合タンパク質を構築し、これは h I L - 1 5 結合に応答可能な構造要素を含有することが示されている。この融合タンパク質は遺伝子学的に b i r A ペプチドタグと結合してストレプトタビジンの存在下でピオチニル化及びそれに続く多量体化を可能にする (3 2)。この融合タンパク質を c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 R S u / b i r A と称し、その C H O 細胞からの発現及び精製は c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 のそれと同様であった (2 5)。これらの融合タンパク質は細胞培養上澄液のリットル当りミリグラムのレベルで容易に産生できる (データは示されていない)。

10

【 0 2 3 7 】

h I L - 1 5 と h I L - 1 5 R S u ドメインの間の高い特異的結合活性に基づいて、この融合タンパク質はヘテロ二量体複合体を形成できると推測した。更に、ヒト I L - 1 5 : I L 1 5 R 複合体の結晶構造の実験は、2 つのタンパク質の N - 末端がほぼ 5 0 離れて複合体の反対端にあることを示唆した (3 3)。従って、s c T C R ドメインのこれらの領域との融合は複合体形成を阻害しないことが期待される。

20

【 0 2 3 8 】

c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 と c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 R S u / b i r A 融合タンパク質の間の結合の最初の証拠が、h I L - 1 5 及び c 2 4 6 s c T C R / h I L - 1 5 タンパク質を捕獲するためのプレートに結合した c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 R S u / b i r A を用いる E L I S A で観察された (2 5)。二量体 c 2 6 4 s c T C R 融合タンパク質複合体 (c 2 6 4 s c T C R 二量体と称する) を更に特性化するために、等モル量の精製 c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 と c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 R S u / B i r A 融合タンパク質を混合して 1 0 分以上室温で結合させた。複合体及び個々のタンパク質融合体をサイズ排除クロマトグラフィーで評価した。

【 0 2 3 9 】

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

30

【 0 2 4 0 】

c 2 6 4 s c T C R 二量体を単量体 c 2 6 4 s c T C R / B i r A タンパク質と、T C R 特異抗原、p 5 3 (a a 2 4 6 ~ 2 7 2) / H L A - A * 0 2 0 1 を結合するそれらの能力について比較した。それぞれの場合に、タンパク質をピオチニリガーゼでピオチニル化した後、S A - P E と複合体化して (3 2) 先に記載されるように (3 2) 多量体フローサイトメトリー染色試薬を作成した。様々な濃度の p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) ペプチドでパルスされた H L A - A * 0 2 0 1 - 陽性 T 細胞を染色するために用いる場合、両方の試薬は、ペプチドの濃度依存的に増大する抗原特異的結合を示した (図 3 7 A)。しかしながら、c 2 6 4 s c T C R 二量体を含む染色試薬は単量体由来 c 2 6 4 s c T C R / b i r A 対応物より最大 3 倍より良く染色した (図 3 7 B)。メカニズムに囚われることなく、これらのデータは I L - 1 5 : I L - 1 5 R 相互作用による二量体化が s c T C R の機能活性を保存して、増大した親和性を通してその同種 H L A / ペプチドとの s c T C R 複合体の効果的な親和性を増大することを示唆している。b i r A タグによるピオチニル化を複合体の s c T C R / h I L - 1 5 の C - 末端を対象としたときに同様な結果

40

50

が観察された（データは示していない）。このことは複合体のC末端が、二量体化又は融合タンパク質複合体の抗原結合ドメインの何れにも影響を与えずに、有意な大きさの分子のプロープ（ストレプタビジンのMWはほぼ60kDaである）と、共役するために利用しやすいことを明らかにしている。

【0241】

これらの検討を、二重特異的分子を生成する可能性を試験するために拡張した。149～157のアミノ酸残基に広がるヒトp53タンパク質のHLA-A*0201制限エピートープを認識する第2s c T C R (c 1 4 9 s c T C R) を作成した(24)。このs c T C Rをh I L - 1 5と融合して、c 1 4 9 s c T C R / h I L - 1 5と称する、得られたタンパク質をCHO細胞内でc 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 S u / b i r A融合体と同時発現した。組み換えCHO細胞培養液の上澄液中で観察されたこの融合複合体を抗I L - 1 5抗体を用いて固定化してH R P - 標識化p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) 又はp 5 3 (a a 1 4 9 - 1 5 7) ペプチド/HLA-A*0201四量体の何れかでプローブした。図37Cに示すように、抗I L - 1 5抗体が捕獲した融合タンパク質複合体は両方のペプチド負荷HLA四量体と結合できた。この結果は、h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R S uスカフォールドと融合したときに、個々のs c T C R分子が機能活性を保持して、h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R S u複合体の空間配置が個々におよそ40kDaの分子量を有しているs c T C Rドメインの充填に有意には影響を及ぼさないことを明らかにしている。

【0242】

h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R S uスカフォールドのタンパク質二量体化に対する汎用性を明らかにするために、一方がh I L - 1 5のN-末端に融合していて他方がh I L - 1 5 R S u / b i r Aタンパク質のN-末端に融合している2つの1本鎖O T 1 T C Rを対合して第2二量体s c T C R融合複合体を作成した。O T 1は、ネズミH - 2 K bとの関連で、アミノ酸残基257 - 264に広がるO V Aタンパク質のエピートープを認識するとよく特徴付けられたT C Rである(34)。組み換えCHO細胞発現のために、O T 1 1本鎖T C R (O T 1 s c T C R) 遺伝子を作成して、h I L - 1 5とO T 1 s c T C R / h I L - 1 5 R S u / b i r A構築物と融合した。親和性精製したO T 1 s c T C R融合タンパク質は捕獲試薬として抗マウスT C R C H 5 7抗体、及びH R P標識化、O V A (a a 2 5 7 - 2 6 4) ペプチド負荷H - 2 K b四量体を用いるE L I S Aでp M H C I結合活性を有することが見出された(図42)。O T 1 s c T C R二量体とO T 1 s c T C R / b i r A単量体の間の結合活性の相違を区別するために、c 2 6 4 s c T C R二量体についての上記方法と同様だが、O V A (a a 2 5 7 - 2 6 4) ペプチドを負荷したH - 2 K b陽性E L 4細胞を用いてフローサイトメトリー分析を行った。

【0243】

図38に示すように、O T 1 s c T C R二量体を含むS A - P E四量体は実際に、単量体O T 1 s c T C R / b i r A融合体を含むものより有意によく染色した。ストレプタビジンセンサーチップ上に固定化されたビオチニル化O V A (a a 2 5 7 - 2 6 4) ペプチド負荷H 2 - K b / b i r A複合体に対するO T 1 s c T C R単量体及び二量体の結合親和性を評価するために表面プラズモン共鳴アッセイも実施した。O V Aペプチド/H - 2 K b複合体に対するO T 1 s c T C R二量体の見掛け上の結合親和性(KD)は約30μMであると推定されたのに対して、単量体O T 1 s c T C R / b i r A融合タンパク質については結合が観察されなかった(表1)。これらのデータは、h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R 相互作用による二量体化がs c T C Rの生物活性を保存して、増大した親和性によってs c T C R分子のその同種p M H C I複合体との効果的な親和性を増大することを裏付けている。

【0244】

(O t 1 s c T C R / s c C D 8ヘテロ二量体の作成) -

C D 8分子がO T 1 T C Rとその同種O V Aペプチド/H 2 - K b複合体の間の相互作用に極めて重要な役割を果たしていることが先に明らかにされているので(35～37)

、h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R S uスカフォールドは、細胞表面で発現されるO V Aペプチド / H - 2 K b に対するO T 1 T C R 結合親和性を、そして細胞及び接着分子非存在条件下でC D 8 分子が増大するか否かを評価する機会をもたらす。これを実施するために、最初に、フレキシブルなリンカーを用いてネズミC D 8 の 及び 鎖の細胞外ドメインを融合して1本鎖形態のネズミC D 8 分子 (s c C D 8) を作成した。この融合遺伝子をレトロウイルス発現ベクター中でh I L - 1 5 R S u / b i r A と融合した。次いで、組み換えレトロウイルスをO T 1 s c T C R / h I L - 1 5 融合タンパク質を発現しているC H O 細胞株を感染するために用いた。ヘテロ二量体融合タンパク質複合体を培養した組み替えC H O 細胞の上澄液から抗T C R 抗体ベースのアフィニティークロマトグラフィーを上記のように用いて精製した。この精製したタンパク質を捕獲試薬として抗T C R 抗体及びプローブとしてビオチニル化抗m C D 8 又は抗m C D 8 m A b の何れかを用いるE L I S A に付した。

10

【 0 2 4 5 】

図39Aに示すように、抗T C R A b 固定化融合複合体はC D 8 及びC D 8 の両方を含んでいるので、O T 1 s c T C R / s c C D 8 ヘテロ二量体の形成を示唆している。フローサイトメトリー分析を用いて、細胞表面上に提示される様々な量のO V A ペプチド / H - 2 K b 複合体に対するO T 1 s c T C R / s c C D 8 ヘテロ二量体の結合活性をO T 1 s c T C R 二量体と比較した。図39Bに示すように、O T 1 s c T C R / s c C D 8 ヘテロ二量体を含む染色試薬は、わずか10 ng / ml のO V A ペプチドを負荷したE L 4 細胞上で、O V A ペプチド / H - 2 K b 複合体を容易に検出できたのに対して、O T 1 s c T C R 二量体を含む相当する試薬を用いたときはこのペプチド濃度で殆ど或いは全く染色が観察されなかった。ペプチドでパルスされていないE L 4 細胞上で、O T 1 s c T C R / s c C D 8 ヘテロ二量体のより高いバックグラウンド染色が観察されて、細胞表面上でC D 8 ドメインとM H C 分子の間でペプチド非依存的な相互作用が生じたことを示唆している。T細胞上で発現されたC D 8 分子と結合するp M H C I 四量体について同様な効果が報告されている(38)。

20

【 0 2 4 6 】

O T 1 s c T C R / s c C D 8 ヘテロ二量体のペプチド特異的相互作用の結果を表面プラズモン共鳴分析で更に確認した。O T 1 s c T C R / s c C D 8 ヘテロ二量体のO V A ペプチド / H - 2 K b 複合体に対する結合親和性 (K D) を、O T 1 s c T C R 二量体について観察された ~ 30 μ M より有意に高い、2 . 6 μ M であると推定した(表1、図43)。どの融合タンパク質もコントロールV S V ペプチド / H - 2 K b 複合体との結合を示さなかった。

30

【 0 2 4 7 】

O T 1 s c T C R 二量体の2価特性がこのアッセイ形式で増大した機能的親和性をもたらすと期待されることを考えると、特異的p M H C I 結合活性の相違は驚くべきことである。更に、可溶性T C R、C D 8 / 及びp M H C I タンパク質を独立した成分として用いて行った同様なS P R 結合研究はC D 8 タンパク質とペプチド / H - 2 K b 複体の間に単に弱い相互作用 (K D 30 ~ 100 μ M) のみを示し、T C R : ペプチド / H - 2 K b 相互作用に対するC D 8 の協調的効果を示さなかった(39 ~ 41)。まとめると、これらのデータは、O T 1 s c T C R 融合体へのC D 8 / ドメインの付加は、2価O T 1 s c T C R 分子の作成よりもp M H C I 結合により大きい影響を及ぼすことを示している。本発明者らの結果は更に、h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R S uスカフォールドは、複雑なタンパク質 - タンパク質相互作用に適合する柔軟性を有する機能的な二重特異性分子を作成するために用いることができることを明らかにしている。また、本発明らは機能的なC D 8 分子を可溶性1本鎖分子として構築できることを初めて示して、s c C D 8 ドメインがヘテロ二量体分子内でO T 1 s c T C R と複合体を形成すると、その他の接着分子が存在していない無細胞条件下で、T C R : p M H C I 相互作用を増強することを明らかにした。

40

【 0 2 4 8 】

50

(機能的 T C R / ヘテロ二量体の作成) -

上で示したように、h I L - 1 5 及び h I L - 1 5 R ドメインの N - 末端は複合体の遠位末端にあり、このスカフォールドが多鎖タンパク質のポリペプチドと融合するために適しているか否かという問題を提起している。h I L - 1 5 及び h I L - 1 5 R S u スカフォールドを用いて可溶性で、生物活性なヘテロ二量体 T C R / を構築できるか否かを確認するために、細胞外 O T 1 T C R V - C 及び V - C ドメインの C - 末端をそれぞれ、h I L - 1 5 及び h I L - 1 5 R S u / b i r A の N - 末端に結合した。公表されている / T C R の結晶構造に基づく、適切に折り畳まれた O T 1 T C R / 分子の T C R C 及び C - C - 末端アミノ酸は ~ 1 8 離れていると推測される (4 2)。O T 1 T C R / h I L - 1 5 及び O T 1 T C R / h I L - 1 5 S u / b i r A 融合遺伝子を 2 つの別々の発現ベクター内にクローンして C H O 細胞内に同時にトランスフェクトした。分泌された融合タンパク質複合体を上記のように抗 T C R C m A b アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。還元条件下のクーマシー染色 S D S - P A G E で分析すると、精製されたタンパク質のバンドが、2 つの融合分子それぞれの計算された単量体 M W (4 0 k D a) と一致して、5 0 k D a に移動した (データは示されていない)。

【 0 2 4 9 】

精製したタンパク質を更に機能的 E L I S A (抗 T C R C m A b で捕獲 : O V A ペプチド / H 2 - K b 四量体でプローブ) で特性化した。図 4 0 A に示すように、精製したタンパク質は 1 本鎖形態にある O T 1 T C R と同等の p M H C I 結合活性を有していることが分かった。同様な結果が、p 5 3 特異的 2 6 4 T C R の V - C 及び V - C 鎖との h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R S u / b i r A 融合体で観察された (図 4 0 B)。哺乳動物細胞内で可溶性 / T C R ヘテロ二量体を産生する以前の試みは殆どうまくいかなかった (4 3、4 4)。従って、本発明者らの結果は、トランスフェクト細胞内で h I L - 1 5 及び h I L - 1 5 R S u / b i r A ドメインの結合によって T C R 及び鎖が適切に折り畳まれていたことを示唆している。興味深いことに、h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R S u スカフォールドの N - 末端との融合は、c 2 6 4 s c T C R / c 1 4 9 s c T C R ヘテロ二量体複合体を用いて観察されたように機能的に独立した結合ドメインにとって十分な空間配置を提供できる一方、O T 1 T C R 及び 2 6 4 T C R の 及び鎖のような近接して対合している鎖の折り畳みを可能にする柔軟性を保持している。

【 0 2 5 0 】

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

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

【 0 2 5 1 】

融合タンパク質二量体の h I L - 1 5 生物活性も 3 2 D 細胞を用いる細胞増殖アッセイで試験した。図 4 2 B に示すように、単量体 (s c T C R / h I L - 1 5 融合体) 又は

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

【 0 2 5 2 】

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

T 2 分子、I g G 1 C H 1 ドメインを欠失している T 2 M (T 2 M C H 1) 及び非標的化 T 2 M T C R C H 1 タンパク質複合体の更なるインビボ効果を確認するために、腫瘍担持免疫正常 C 5 7 B L マウスにおいて毒性及び抗腫瘍活性を試験した。B 1 6 (5 × 1 0 ⁵ / マウス) 又は E G 7 (1 × 1 0 ⁶ / マウス) ネズミ腫瘍細胞を C 5 7 B L / 6 N H s d マウスに試験 0 日目に皮下に注射した。試験 1、4、8 及び 1 1 日目に腫瘍担持マウスに、5 1 又は 2 5 . 5 μ g / 用量の T 2 タンパク質 (c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R S u s h i / h u I g G 1 鎖から成る) 、4 7 . 7 μ g / 用量の T 2 M C H 1 (c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R S u s h i / h u I g G 1 C H 2 - C H 3 鎖から成る) (T 2 タンパク質の 5 1 μ g / 用量と等モル) 、1 6 . 6 又は 8 . 3 μ g / 用量の T 2 M T C R C H 1 (h u I L 1 5 N 7 2 D 及び h u I L 1 5 R S u s h i / h u I g G 1 C H 2 - C H 3 鎖から成る) (それぞれ T 2 タンパク質の 5 1 及び 2 5 . 5 μ g / 用量と等モル) 、又は 1 . 2 μ g / 用量の r h I L - 1 5 (T 2 タンパク質の 2 5 . 5 μ g / 用量と等モル) を静脈内に注射した。試験期間中、動物の体重及び腫瘍の容量を測定して結果をプロットした (図 4 4 A - B 及び 4 5 A - B) 。

【 0 2 5 3 】

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

【 0 2 5 4 】

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

同様な標的化 I L - 1 5 : I L - 1 5 R - F c 複合体を更に特性化するために、c 2 6 4 s c T C R / h u I L - 1 5 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L - 1 5 R / I g G 1 F c 融合タンパク質を同時発現する組み換え C H O 細胞株を作成した。ある場合は、ヒト I g G 1 ドメインは全重鎖定常 (C H 1 - C H 2 - C H 3) を包含し、第 2 の場合は、C H 2 - C H 3 ドメイン (すなわち、C H 1) 又は F C ドメインを上記のようにして用いた。ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 ドメイン又は F c ドメインのタンパク質配列を図 4 6 に示す。簡単にするために、この実施例では、得られた c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D スーパーアゴニスト : c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R / I g G 1

10

20

30

40

50

CH1 - CH2 - CH3 複合体をT2分子(T2M)と、そしてc264scTCR / huIL15N72Dスーパーアゴニスト：c264scTCR / huIL15R / IgG1 CH2 - CH3 複合体をT2M2(上記のようにT2M CH1とも)と称する。これらの複合体の利点はFcドメインを介する二量体化及びIL-15とIL-15Rドメインの間の相互作用が、IL-15R 陽性細胞及びFc受容体(FcR)陽性細胞と結合可能な四量体標的化分子を生ずることである。また、これらのドメインそれぞれの活性を同種受容体との相互作用を減少する突然変異体によって分析できる。組み替えCHO細胞による可溶性発現の後、これらの複合体を抗TCR C mAb - セファローズ及びプロテインAセファローズを用いるアフィニティークロマトグラフィーで精製して均質にした。サイズ排除クロマトグラフィーが、無傷の複合体について期待されているサイズに分子が移動したことを示した。

10

【0255】

上記分析と同様に、ELISAに基づく方法が、T2M及びT2M2のscTCR及びIL-15ドメインがそれぞれそれぞれの結合活性を保持することを確認している。更に、T2M及びT2M2のIgG1ドメインは、scTCR - IgG1融合体のそれに匹敵する活性を有するペプチド/HLA四量体での特異的検出を可能にするFc受容体(FcR)担持細胞を結合する能力を保持している。T2M及びT2M2はp53(aa264-272)/HLA-A2複合体を提示している標的細胞に対するヒトリンパ球のADCC活性を介在することができた(図47)。これらの結果は、T2M及びT2M2がscTCR - IgG融合体について先に記載される抗体様エフェクター機能を保持していることを立証する。FcR結合活性を減少するFc突然変異(LALA)を含有している複合体を用いる検討は機能的FcドメインがADCC活性に必要なことを明らかにした。T2M及びT2M2はIL-15依存性32D細胞株の生育もサポートしたが、T2M2はT2Mより約~3倍低いインビトロIL-15活性を示した。マウスにおける免疫応答を刺激するこれらの分子の能力も評価した。IL-15(1mg/kg)によるC57BL/6マウスの処置は、白血球(WBC)数、脾臓重量又は血中のNK及びCD8+T細胞集団に殆ど或いは全く影響を与えなかったのに対して、IL-15N72D：IL-15R - IgG CH2 - CH3複合体(IL-15の用量と等モルで)による処置は、同様なIL-15：IL-15R - Fc複合体で先に観察された結果と一致して、脾臓及び上昇した血液CD8+T細胞レベルをもたらした(図48A及びB)。T2M2複合体は等モル用量でより強力な免疫刺激効果を示して(32D細胞に対してより低いIL-15活性を示したにもかかわらず)、T2M及びT2M2複合体の両方はWBCレベル、脾臓重量及び血液NK及びCD8+T細胞集団の増加を刺激した。同様な処置によるNK及びCD8+T細胞数に対する効果が脾臓において観察された。T2M2及びIL-15N72D/IgG複合体で処置したマウスから単離した脾細胞が、NK感受性YAC細胞に対して細胞溶解活性を示した(図48C)。用量応答検討は、0.4mg/kgという低い単回用量レベルでもこれらの効果が観察されることを示している(図49A)。T2M2及びIL-15N72D/IgGによるヌードマウスの処置は、血液及び脾臓中のNK細胞のパーセントが処置後4日目に増加して、これが処置後7日目にベースライン値付近まで減少したことを示した(図49B)。まとめると、これらの結果は、T2M2複合体がマウスにおけるCD8+T細胞及びNK細胞応答を、IL-15のそれよりそしてNK細胞についてはIL-15N72D/IgG複合体のそれより有意に高い活性で刺激可能であったことを示している。

20

30

40

【0256】

これらの複合体の抗腫瘍活性をヌードマウスにおける皮下A375異種移植モデルで更に試験した。初期の研究では、組み換えヒトIL-15、c264scTCR - IL15及びc264scTCR - IL15N72D融合タンパク質又はc264scTCR - IL15N72D/c264scTCR - IL15R 複合体は、s.c.A375腫瘍異種移植に対してPBS又はc264scTCR - IL15R 融合タンパク質処置と比較

50

して効果を示さなかった（図50A）。このモデルにおけるTCR-IL15融合の効果の欠如は、c264scTCR-IL2融合体を用いて報告されている結果と対照的に、これらのタンパク質がNK細胞応答を刺激できないことに起因していると思われる。上で示したように、T2M複合体をこのモデルで試験すると、NK細胞増殖を刺激するこれらの能力と一致して、これらは中等度だが統計的に有意な抗腫瘍活性を示した（図50B）。しかし、c264scTCR-IL15融合の等モル量による処置とは対照的に、T2Mの用量スケジュール（3週間1日おきに4mg/kg）は有意な体重減少及び最終投与後6匹マウスのうち2匹の死亡をもたらした。臨床所見はマウスの不活発化、猫背姿勢、及び赤みかかった肌を含んでいた。別のモデルにおけるIL-15タンパク質複合体の同時研究は、繰返し1日おき投与は良好な耐容性がないこと及び週に1回の投与が過剰な毒性なしで免疫刺激をもたらすことを立証した。1日おきから週に1回への用量計画の変更によって、NK細胞増殖の誘発に有効であることを示した用量レベルで、T2M2複合体がIL-15又はPBS処置と比較して有意により強い抗腫瘍活性を示した（図50C）。更に重要なことは、この週に1回の投与計画が腫瘍担持ヌードマウス及び免疫正常マウスにも良好な耐容性をもたらした。

【0257】

s c T C R - I L 1 5 融合体及びT2M複合体の毒性プロファイルを上記のインビボ活性試験と同時に評価した。上に示したように、s c T C R - I L 1 5 融合体による3週間の1日おき処置は腫瘍担持ヌードマウスに良好な耐容性をもたらしたが、T2M（4mg/kg）処置は動物の>30%死亡率をもたらした。これを更に、1週間1日おきに9、18、又は36mg/kgのT2M又は等モル量のT2M2複合体を投与したHLA-A*0201/Kb-トランスジェニックマウスで評価した。処置の開始1週間後に、体重及び臨床所見において用量及び時間に依存する効果が見られた。36mg/kgのT2Mを投与されたマウスは当量のT2M2で処置されたマウスで観察された12%減少と比較して体重の20%損失を示した。~9mg/kgのT2M又はT2M2で処置されたマウスは1週間の期間を越えても体重の変化が観察されなかった。興味深いことに、T2Mで観察されたより高い毒性は、T2M2で処置したマウスがT2Mで処置されたマウスより高いレベルのWBC数及びNK細胞レベルを示したように、増大した免疫細胞の活性化と相関しなかった。マウスの体重、脾臓重量及び免疫細胞に対する最小効果を0.4mg/kgのT2M2の単回用量i.v.投与後に観察した。更に、カニクイザルでの予備検討がT2Mの0.5mg/kg単回i.v.用量が観察された毒性効果を何も引き起こさず、しかしCD8+記憶T細胞及びエフェクターNK細胞増殖を誘発できたことを示した。これらの検討の結果は、強力な免疫刺激及び抗腫瘍活性並びに好ましい毒性及び薬物動態プロファイルを有する標的化IL-15融合複合体を作成できることを示している。これらの検討を介して、最適化されたTCR-標的化T2M2（c264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1CH2-CH3鎖から成るT2M CH1とも称する）を定義して特性化した。c264scTCR/huIL15R Sushii/huIgG1CH2-CH3構築物の核酸及びタンパク質配列をそれぞれ、図51及び52に示す。

【0258】

実施例18 - 抗体標的ドメイン含んでいるT2分子の特性化

更なる疾患標的分子を作成するためのhuIL-15:huIL-15R SUsカフォールドの有用性を明らかにするために、抗ヒトCD20単鎖抗体のC-末端をhuIL-15N72D及びhuIL-15R Su/huIgG1CH2-CH3（Fc）鎖のN末端と結合して構築物を作成した。抗ヒトCD20単鎖抗体（抗CD20scAb）配列は柔軟なリンカー配列を介して結合しているリツキシマブ抗体の重鎖及び軽鎖Vドメインのコード領域を包含している。抗CD20scAb/huIL-15N72D構築物の核酸及びタンパク質配列をそれぞれ、図53及び54に示す。抗CD20scAb/huIL-15R Su/huIgG1Fc構築物の核酸及びタンパク質配列をそれぞれ、図55及び56に示す。これらの配列を上記のような発現ベクター内にクローンして発現

ベクターをCHO細胞内にトランスフェクトした。2つの構築物の同時発現が、可溶性抗CD20 s c A b / h u I L - 1 5 N 7 2 D : 抗CD20 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 複合体 (抗CD20 s c A b T 2 M と称する) の形成及び分泌を可能にして、これをプロテインAアフィニティークロマトグラフィーを用いてCHO細胞培養上澄液から精製した。

【0259】

上記の分析と同様に、ELISAに基づく方法は、抗CD20 s c A b / h u I L - 1 5 N 7 2 D : 抗CD20 s c A b / h u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 F c 複合体の形成を立証した。更に、上記のような32D細胞を用いる1L-15受容体結合及び細胞増殖アッセイは、この複合体がIL-15結合及び生物活性を示すことを示唆した。次いで、抗CD20 s c A b T 2 M 複合体をヒトCD20⁺パーキットリンパ腫ダウディ細胞株に対する抗原特異的結合活性について試験した。ダウディ細胞を抗CD20 s c A b T 2 M、c264 s c T C R T 2 M 又はP B S と培養した。洗浄工程に続いて、細胞に結合した融合タンパク質複合体を、P E と共役しているヤギ抗ヒトI g 抗体 (G A H - I g - P E) を用いてフローサイトメトリーで検出した (図57)。抗CD20 s c A b T 2 M 複合体は、c264 s c T C R T 2 M 又はG A H - I g - P E では観察されなかったダウディ細胞との有意な結合を示し、これらの細胞との特異的な反応性を示唆した。

【0260】

抗CD20 s c A b T 2 M 複合体がADCCに基づくメカニズムを介してCD20⁺腫瘍細胞を殺傷できたか否かを確認する試験も実施した。カルセイン-A M で標識したダウディ標的細胞をヒトP M B C (E : T 100 : 1) 及び各種濃度の抗CD20 s c T 2 M、c264 s c T C R T 2 M (陰性コントロール) 又はキメラ抗CD20 m A b (陽性コントロール) と混合した。培養期間後に、標的細胞溶解を上記のように評価した。図58に示すように、抗CD20 s c A b T 2 M 複合体はCD20⁺ヒトリンパ腫細胞に対するADCC活性を介在することにおいて非常に効果的であった。異なったエフェクターと標的細胞の比を試験する同様な検討でこのことが立証されて、ここで抗CD20 s c A b T 2 M 複合体 (2 n M で) はキメラ抗CD20 m A B に匹敵する活性を示した (図59)。

【0261】

これらの結果に基づくと、抗CD20 s c A b T 2 M 分子は標準的な異種移植腫瘍モデル (例えば、Rossi et al. Blood 2009;114:3864; Gillis et al. Blood. 2005;105:3972; 及び Xuan et al. Blood 2010;115:2864-2871 を参照されたい) においてヒトリンパ腫細胞に対して抗腫瘍活性を示すことが期待される。

【0262】

更に、それぞれが個々にh u I L - 1 5 N 7 2 D 及びh u I L - 1 5 R S u / h u I g G 1 C h 2 - C H 3 (F c) 鎖と融合している (又はその逆) 抗CD20 軽鎖及び重鎖ドメインを含むT 2 M 構築物を本明細書に記載のように作成して発現できる。2つのこのような融合構築物の核酸及びタンパク質配列を図60 ~ 63 に示す。これらの融合タンパク質を含む精製した複合体は、上記のように、F c ドメイン及びIL-15生物活性、並びにCD20に特異的な結合活性を示すことが期待される。これらの複合体はCD20⁺腫瘍細胞に対するADCC活性を介在すること及びインピボでCD20⁺腫瘍細胞に対する抗腫瘍活性が期待される。

【0263】

その他のCD抗原、サイトカイン又はケモカインの受容体又はリガンド、成長因子の受容体又はリガンド、細胞接着分子、M H C / M H C 様分子、F c 受容体、T o l l 様受容体、N K 受容体、T C R、B C R、陽性 / 陰性同時刺激受容体又はリガンド、死受容体又はリガンド、腫瘍関連抗原、ウィルスコード及び細菌コード抗原、並びに細菌特異的抗原に特異的な抗体配列を用いてs c A b 又は抗体認識ドメインを含む同様なT 2 M 構築物を容易に作成できる。特に興味深いのは、CD3、CD4、CD19、CD21、CD22

10

20

30

40

50

、CD23、CD25、CD30、CD33、CD38、CD40、CD44、CD51、CD52、CD70、CD74、CD80、CD152、CD147、CD221、EGFR、HER-2/neu、HER-1、HER-3、HER-4、CEA、OX40リガンド、cMet、組織因子、ネクチン-4、PSA、PSMA、EGFL7、FGFR、IL-6受容体、IGF-1受容体、GD2、CA-125、EpCam、細胞死受容体5、MUC1、VEGFR1、VEGFR2、PDGFR、Trail R2、葉酸受容体、アンジオポエチン-2、 α インテグリン受容体及びHLA-DR抗原のエピトープに特異的な抗体ドメインを有するT2Mである。HIV、HCV、HBC、CMV、HTLV、HPV、EBV、RSV及びその他のウィルスに由来するウィルス抗原に対する抗体ドメインも興味深く、特にHIVエンベロープスパイク並びにノ又はgp120及びgp41エピトープを認識するものが興味深い。このような抗体ドメインは当該技術分野で公知の配列から作成できるか或いは当該技術分野で公知の各種供給源（すなわち、脊椎動物宿主又は細胞、コンビナトリアルライブラリー、ランダム合成ライブラリー、コンピュータモデリング等）から新たに単離できる。

【0264】

更に、前述の通り、IL-15ドメイン及びIgGFcドメインの活性を増大又は減少して、抗体標的T2複合体の治療インデックスを最適化しそして毒性を最小化することは有益である。Fcドメインの活性を改変する方法は上に記載されていて当該技術分野で十分に特性化されている。このような場合、その活性を減少する突然変異をIL-15ドメインに含んでいる複合体はよりすぐれた治療活性及びより低い毒性をもたらすことが期待される。IL-15ドメインに上記のN65D又はD8N置換、又はIL-15活性を減少することが知られている、I6S、D8A、D61A、N65A、N72R、V104P又はQ108Aを包含するその他の置換を含んでいる抗体標的T2分子が特に興味深い。

【0265】

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

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

を約 100 mg / L 産生できるクローンを同定した。この結果は、IL - 15 が哺乳動物細胞中で IL - 15 R Su ドメインと同時に発現されると高レベルで発現され得るということを示した。

【0266】

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

【0267】

次いで、IL - 15 R Su / Fc 複合体の多種の形態を分離するためにイオン交換クロマトグラフィーを展開した。IL - 15 R Su / Fc 二量体分子の計算した等電点 (pI) は 8.5 である。予測通りに、20 mM Tris - HCl、pH 8.0 溶液中のこのタンパク質はその後 Q S F F 樹脂に結合しないことが分かった。また、計算した IL - 15 N72D の pI は 4.5 である。従って、部分的に占有されている IL - 15 N72D : IL - 15 R Su / Fc (すなわち、二量体 IL - 15 R Su / Fc + 1 つの IL - 15 N72D 分子) と完全に占有されている IL - 15 N72D : IL - 15 R Su / Fc (すなわち、二量体 IL - 15 R Su / Fc + 2 つの IL - 15 N72D 分子) の全体の電荷は異なることが予測された。このことは、プロテイン A の精製した調製物の I E F ゲル分析と一致していて、これは 5.6 ~ 6.5 と 6.8 ~ 7.5 の pI を有する 2 つの主要な複合体のグループが完全に占有されている複合体と部分的に占有されている複合体の予測される pI とそれぞれに一致することを明らかにした (図 65 A)。各タンパク質群の pI バンド間の不均質性は恐らく Ig G 鎖におけるグリコシル化及び C - 末端リジン変異体の程度に起因している。従って、異なるイオン強度を有する緩衝液を Q S F F から完全に占有されている複合体と部分的に占有されている複合体を別々に溶出するために用いた。130 mM の NaCl、20 mM の Tris - HCl、pH 8.0 を用いて単一タンパク質画分 (Q 工程 1) を Q S S F から溶出して、IL - 15 R Su / Fc 分子の部分占有を確認する E L I S A に基づいて、主に部分的に占有されている複合体を含有していることが分かった。300 mM の NaCl、20 mM の Tris - HCl、pH 8.0 を用いる次の工程で、Q 1 c 及び Q 2 c と称する 2 つのタンパク質画分が Q S F F から溶出された。これらの調製物に行った E L I S A 分析が、Q 1 c 画分が部分的に占有されている複合体 (全体の 10%) と完全に占有されている複合体 (90%) の混合物を含んでいたのに対して Q 2 c 画分が完全に占有されている複合体のみを含んでいたことを示した (データは示していない)。これらの知見は精製したタンパク質製剤の I E F ゲル分析と一致している (図 65 B)。Q 工程 1 から溶出したタンパク質は 5.6 ~ 7.5 の範囲の広い pI を有している：pI が 6.8 ~ 7.5 のタンパク質は部分的に占有されている複合体を示している。Q 工程 2 溶出の画分 Q 1 c は 5.6 ~ 6.5 の範囲の pI を有するタンパク質 (すなわち、完全に占有されている複合体) を主に含んでいたが、5.6 ~ 7.5 の pI を有する少量の夾雑タンパク質を含んでいた。Q 2 c 画分は 5.6 ~ 7.5 の範囲の pI を有するタンパク質のみを含んでいた。

【0268】

S E C 分析で、精製した IL - 15 N72D : IL - 15 R Su / Fc の Q 2 c 調製物が高純度で単一分子として溶出することが分かった (図 66)。ホモ二量体の推定分子量は約 114 kDa であり、これは IL - 15 N72D と IL - 15 R Su / Fc の融合タンパク質の推定アミノ酸配列に基づいて算出した分子量 92 kDa より大きかった。

これは哺乳動物細胞で生産したタンパク質のグリコシル化に起因していると思われる。

【0269】

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

10

【0270】

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

20

【0271】

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

IL-15及びインビトロで構築されたIL15:IL-15R /Fc複合体は、マウスにこれらのタンパク質を腹腔内注射したときに、それぞれ1時間及び20時間の血清半減期を有していたことが先に報告されている(T.A. Stoklasek et al., J Immunol 177 (2006) 6072-6080)。IL-15及び同時に発現させた、精製したIL-15:IL-15 Su/Fc複合体を静脈内に投与したときに同様に挙動するか否かを評価するために、それらの薬物動態パラメータをCD-1マウスで確認した。静脈内投与は、ヒトにおいてIL-15:IL-15 Su-Fc複合体に関して用いられる薬剤送達のルートであると思われるので静脈内投与を選択した。雌のマウスに1.0mg/kgのIL-15:IL-15 Su/Fc又は0.28mg/kgのIL-15(等モル用量)を静脈内に注射して、IL-15については注射後15分から8時間、そしてIL-15N72D:IL-15 Su/Fcについては30分から72時間の様々な時点に血液を採取した。IL-15N72D:IL-15 Su/Fcの血清濃度を2つのELISA形態、無傷の複合体を検出する第1法(抗IL-15Ab検出)及びIL-15 Su/Fc融合タンパク質のみを検出する別法(抗ヒトIgG FcAb検出)を用いて評価した。IL-15の濃度は標準的なIL-15特異的ELISAで評価した。

30

【0272】

単回静脈内急速注射後のIL-15:IL-15 Su/Fc及びIL-15についての予測フィット及び実際のデータを図67に示す。抗IL-15Abに基づく、又は抗ヒトIgG Fc Abに基づくELISAを用いるIL-15:IL-15 Su/Fcの推定半減期はそれぞれ、約25時間又は18時間であった。これらの結果は、インビボでこの融合タンパク質は開裂せず、そしてIL-15はIL-15R Su/Fc分子から有意には解離しなかったことを示している。IL-15:IL-15 Su/Fcのクリアランス(Cl)は0.059~0.051mL/時間に及んで、定常状態における分布の容積(Vss)はアッセイの形式に依存して2.1~1.3mLに及んだ。これと比べると、IL-15は0.24時間の吸収半減期及び0.64時間の消失半減期を有していた。IL-15のClは49mL/時間であり、そしてVssは18.4mLであった。これらの結果は、IL-15:IL-15 Su/Fcが、IL-15より>24倍長い

40

50

消失半減期を示し、そして>800倍遅く排泄されることを示している。

【0273】

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

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

【0274】

IL-15N72D:IL-15R Su/Fc複合体とIL-15wtも、C57BL/6マウスにおいてNK細胞及びCD8⁺T細胞の増殖を誘発するそれらの能力について比較した。図69に示すように、IL-15wtは0.28mg/kgの単回静脈内投与後4日目にNK及びCD8⁺細胞の増殖に対して有意な効果を有していない。これに対して、IL-15N72D:IL-15R Su/Fc複合体は血中及び脾臓内のNK及びCD8⁺細胞の増殖を有意に促進し、これは血中のリンパ球増加症及び脾腫を導いた(図69及び70)。これらの知見はIL-15:IL-15R複合体がインビボでIL-15の生物活性を有意に増大したという先の報告と一致している(M.P. Rubinstein et al., Proc Natl Acad Sci U S A 103 (2006) 9166-9171; T.A. Stoklasek et al., J Immunol 177 (2006) 6072-6080; S. Dubois et al., J Immunol 180 (2008) 2099-2106; M. Epardaud et al., Cancer Res 68 (2008) 2972-2983; A. Bessard et al., Mol Cancer Ther 8 (2009) 2736-2745)。IL-15N72D:IL-15R Su/Fc複合体のこの増大した活性は、N72D突然変異タンパク質のIL-15R_c複合体との増大した結合活性(X. Zhu et al., J Immunol 183 (2009) 3598-3607)、インビボにおけるIL-15R鎖による最適化されたサイトカインのトランス提示(樹状細胞及びマクロファージ上のFcR受容体を介して)、サイトカインドメインの二量体特性(IL-15R_cとの結合について増大した親和性)及びIL-15と比較して増大したインビボ半減期(25時間対<40分)との組み合わせの結果と思われる。

【0275】

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

【0276】

上記実施例は以下の材料及び方法を用いて実施した。

【0277】

(タンパク質複合体発現のためのベクターの構築)

IL-15R Su/Fc融合遺伝子をヒトIL-15R (ヒトIL-15Rのa1-66)のsushidメイン及びヒトIgG1Fc断片をコードするDNA鋳型のオーバーラップPCR増幅によって構築した。シグナルペプチド-IL-15R Suコ

10

20

30

40

50

ード領域 (R.L. Wong et al., Protein Eng Des Sel 24 (2011) 373-383) 及びヒト I g G 1 - F c 遺伝子断片 (L.A. Mosquera et al., J Immunol 174 (2005) 4381-4388) をプライマー対:

BA494: 5' - G A C T T C A A G C T T A A T T A A G C C A C C A T G G A C A G A C T T A C T T C T T C - 3' (配列番号 16);

BA550R: 5' - G T G A G T T T T G T C A C A A G A T T T C G G C T C T C T A A T G C A T T T G A G A C T G G G G T T G - 3' (配列番号 22); 及び

BA550F: 5' G A G C C G A A A T C T T G T G A C A A A A C T C A C - 3' (配列番号 23);

BA393R: 5' - G T A A T A T T C T A G A C G C G T T C A T T A T T T A C C A G G A G A C A G G G A G A G G C T C T T C - 3' (配列番号 15)

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

【0278】

I L - 15 N 7 2 D のコード配列 (X. Zhu et al., J Immunol 183 (2009) 3598-3607) を、I R E S 領域の後にネオマイシン耐性遺伝子を搭載している改変レトロウイルス発現ベクター p M S G V - 1 (M.S. Hughes et al., Hum Gene Ther 16 (2005) 457-472) 内にクローンして発現ベクター p M S G V - I L - 15 N 7 2 D を構築した。

【0279】

(C H O 細胞における I L - 15 N 7 2 D : I L - 15 R S u / F c 融合複合体の同時発現)

I L - 15 N 7 2 D と I L - 15 R S u / F c の融合タンパク質 (図 64 を参照されたい) を同時発現するために、p M S G V - I L - 15 R S u / F c と p M S G V - I L - 15 N 7 2 D を C H O 細胞内に同時にトランスフェクトした後、2 m g / m L の G 4 1 8 (Hyclone, Logan, UT) と 10 μ g / m L のピューロマイシン (Hyclone, Logan, UT) を含有している培地中で選択した。I L - 15 R S u / F c 融合タンパク質も、コントロールとして組み換えヒト野生型 I L - 15 (I L - 15 w t) を負荷するのに用いるために、別に C H O 細胞で発現させた。融合タンパク質の産生のために、組み替え C H O 細胞を無血清規定培地 (S F M 4 C H O、Hyclone, Logan, UT) 中で 37 °C で生育した。培養物の生育細胞密度が最大に達したとき、可溶性複合体を蓄積するために培養温度を 30 °C に下げた。次いで、培養物の生育細胞密度が約 10 % 生育細胞に達したときに培養上澄液を採取した。

【0280】

(精製手順)

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

【0281】

I L - 15 N 7 2 D : I L - 15 R S u / F c 複合体は I g G 1 - F c ドメインを含んでいるので、r P r o t e i n A S e p h a r o s e F a s t F l o w (GE Healthcare) カラムを精製処理の第 1 工程として用いた。サンプルを負荷する前に、カラムを 5 カラム容量 (C V) の 20 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0) で洗浄し、5 C V の 0 . 1 N N a O H で 1 時間消毒し、次いで 7 C V の 20 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0) で平衡化した。上澄液を 11 m L のカラム上に 2 m L / 分で負荷させて、次いでカラムを 8 C V の 20 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0) で洗浄した後、7 C V の洗浄緩衝液 (0 . 1 M N a - クエン酸、p H 5 . 0) で洗浄して非特異的結合タンパク質を除去した。次いで、タンパク質を 0 . 2 M N a - クエン酸 (p H 4 . 0) で溶出して、

採取したピーク画分のpHを0.2Mのクエン酸を用いて直ちにpH3.5に調整した：標準ウイルス排除工程として、溶出したタンパク質を30分間この低pHで維持した。低pH維持工程の後に、溶出した調製物のpHを2M Tris-HCl (pH8.0)を用いてpH7.7に調整した。調製物をAmicon Ultra-15遠心濃縮器(30kDaカットオフ、Millipore, Billerica, MA)を用いて濃縮して緩衝液を20mM Tris-HCl (pH8.0)に変えた後、0.22µmフィルター(Corning Life Sciences, Lowell, MA)を用いて滅菌濾過した。

【0282】

次いで、タンパク質調製物をQ Sepharose Fast Flow (Q S F F ; GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ) イオン交換カラムに付した。5mLのカラムを緩衝液A (20mM Tris-HCl、pH8.0)で洗浄し、5CVの0.1N NaOHで1時間消毒し、次いで緩衝液Aで平衡化した。調製物中のタンパク質濃度を最初に20mM Tris-HCl (pH8.0)で<1mg/mLに調整した後、1mL/分の速度でQ S F Fカラム上で負荷させた。次いで、以下の3工程勾配プロセスを用いてタンパク質をカラムから溶出した：第1工程として、4CVに対して、20mM Tris-HCl (pH8.0)、130mM NaCl、第2工程として、4CVに対して、20mM Tris-HCl (pH8.0)、300mM NaCl、そして最終工程として、2CVに対して、20mM Tris-HCl (pH8.0)、1M NaCl。タンパク質ピーク画分を採取し、緩衝液をPBS (Hyclone, Logan, UT)に交換して、0.22µmフィルターを用いて濾過した。タンパク質濃度を、 $A_{280nm} = 0.79$ mg/mLの吸光係数を用いるUV分光光度計によって280nmで確認した。この吸光係数はIL-15N72D : IL-15R Su/Fc複合体の推定アミノ酸配列に基づいて計算した。

【0283】

E.coli中で産生してリフォールディングしたIL-15N72D又はIL-15wt (Zhu、1009#3315)で溶液中に複合体を構築するために、別に発現したIL-15R Su/Fcを上記のようにrプロテインAアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。これらのインビトロで構築した複合体を生物活性の評価、及び同時発現複合体におけるIL-15結合部位の占有程度の推定のための標準として用いた。

【0284】

(ゲル電気泳動及びサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析)

精製したタンパク質を異なったタイプのゲル電気泳動方法で分析した。これはNuPAGE 12%Bis-Trisゲル(還元及び非還元条件下)、4~20%Tris-グリシンゲル(自然条件)、及びIEF pH3~10ゲル(pI確認用)を包含する。これら全てはInvitrogen (Carlsbad, CA)から供給された。実験方法は製造会社の記載のように実施した。泳動用緩衝液としてPBS (Hyclone, Logan, UT)を用いるSuperdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare Bio-Sciences)クロマトグラフィーを純度を試験するため及びタンパク質の分子量を推定するために用いた。

【0285】

(N-末端アミノ酸配列及びグリコシル化の分析)

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

【0286】

融合複合体がグリコシル化されているか否かを試験するために、イオン交換クロマトグラフィー後の高度に精製されたタンパク質50µgを、2µLのN-グリコシダーゼ(Calbiochem, La Jolla, CA)で、総容量50µLのPBS中、室温で48時間消化した後、還元条件下でNuPAGE 12%Bis-Trisゲル中電気泳動に付した。

【0287】

(IL-15N72D : IL-15R Su/Fc複合体のIL-15N72D占有の確

10

20

30

40

50

認)

精製した IL - 15 R S u / F c に IL - 15 w t (E . c o l i 中で産生してリフォールディングした、J. Yovandich, NCI, Fredrick, MD より提供された) を様々な比で 15 時間 4 で負荷した。培養後、 IL - 15 w t : IL - 15 R S u / F c 複合体を上記のように r プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。精製した複合体を、2つの ELISA 形態、無傷の複合体を検出する 1つの方法 (抗ヒト Ig G F c で捕獲して抗 IL - 15 で検出する) 及び IL - 15 S u / F c 融合タンパク質のみを検出するもう 1つの方法 (抗ヒト Ig G F c で捕獲して抗ヒト Ig G F c で検出する) を用いて評価した。無傷 IL - 15 w t : IL - 15 S u / F c 複合体と IL - 15 R S u / F c タンパク質濃度の間の比は、複合体の IL - 15 結合部位の占有率を反映している。[占有率 (%) = 無傷複合体 (ng / mL) / IL - 15 R S u / F c (ng / mL I) × 100 %]。次いで、完全に占有されている複合体 (IL - 15 R S u / F c と IL - 15 w t を 1 : 3 の比で前もって結合した) を精製後に精製した IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R S u / F c 融合タンパク質複合体の占有率を定量化するための標準として用いた。

10

【0288】

(IL - 15 生物活性の確認)

先に記載されている (X. Zhu et al., J Immunol 183 (2009) 3598-3607) ように、 IL - 15 依存性 3 2 D 細胞株を用いるインビトロ細胞増殖アッセイを、精製した複合体と IL - 15 w t タンパク質の IL - 15 生物活性を評価するために用いた。

20

【0289】

(薬物動態の評価)

IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R S u / F c 複合体及び IL - 15 w t の薬物動態プロファイルを雌の CD - 1 マウス (1 時点当りマウス 4 匹、Harlan, Indianapolis, IN) において、 IL - 2 について先に記載されている (H. J. Belmont et al., Clin Immunol 121 (2006) 29-39) ようにして評価した。 IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R S u / F c 複合体の血清濃度を上記のような 2つの ELISA 形態で評価した。 IL - 15 w t 濃度を抗 IL - 15 捕獲剤 (M A B 6 4 7 ; R&D Systems, Minneapolis, MN) 及び抗 IL - 15 検出剤 (B A M 2 4 7 ; R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いる ELISA で評価した。それぞれの ELISA 形態からの IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R S u / F c 濃度は P K S o l u t i o n 2 . 0 (Summit Research Services, Montrose, CO) を用いる 1 分画モデルと一致した。 IL - 15 w t で処置したマウスから得られたデータは 2 分画モデルとして最もよくモデル化された。

30

【0290】

(リンパ球刺激)

C 5 7 B L / 6 マウス (雄、6 週齢、Harlan, Indianapolis, IN) に IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R S u / F c 融合複合体 1 mg / kg 又はヒト IL - 15 w t 0 . 2 8 mg / kg (等モル用量) それぞれの、或いは陰性コントロールとして P B S の単回用量を静脈内に注射した。処置後 4 日目に、プール血液 (1 群当り 5 匹のマウス) 及び脾細胞を採取した。ヒストパック (Sigma, St. Louis, MO) を用いて血液から P B M C を単離した。次いで、P B M C 及び脾細胞を P E で標識した抗 CD 1 9、P E で標識した抗 CD 3 3 5 (NK p 4 6)、F I T C で標識した抗 CD 4 及び F I T C で標識した抗 CD 8 抗体 (BioLegend, San Diego, CA) で染色した。染色した細胞を F A C S c a n フローサイトメトリー (BD Bioscience, San Jose, CA) で分析した。全ての動物実験は A l t o r ' s I A C U C 承認プロトコールに従って実施された。

40

【0291】

以下のペプチドを前期実施例に示される検討で用いた。

【0292】

【表 2】

タンパク質	アミノ酸	配列 (配列番号)
p53	149-157	STPPPGTRV (配列番号 24)
p53	264-272	LLGRNSFEV (配列番号 25)
OVA	257-264	SIINFEKL (配列番号 20)
VSV	52-59	RGYVYQGL (配列番号 26)

10

【0293】

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

【0294】

【表 3】

リンカー	リンカー配列	融合タンパク質	
一本鎖 TCR リンカー	TCR V α - DTSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSS - TCR V β (配列番号 27 として開示される リンカー配列)	c264scTCR/hIL-15, c264scTCR/hIL- 15R α Su/birA	10
	TCR V α - TSGGGGSGGGGSPGGGGSGGGGSSS - TCR V β (配列番号 28 として開示される リンカー配列)	c149scTCR/hIL15N72D	
	TCR V α - DTSGGGGSGGGASGGGGSGGGGSSS - TCR V β (配列番号 29 として開示される リンカー配列)	OT1scTCR/birA	20
	TCR V α - SGGGGSGGGASGGGGSGGGGS - TCR V β (配列番号 30 として開示される リンカー配列)	OT1scTCR/hIL-15D8N, OT1scTCR/hIL- 15R α Su/birA	
突然変異 ヒト IgG1 ヒンジ	TCR ドメイン - VNEPKSSDKTHTSPSPTR - hIL-15R α Su (配列番号 31 として開示される リンカー配列)	c264scTCR/hIL-15R α Su/birA, OT1scTCR/hIL-15R α Su/birA, OT1TCR β /hIL-15R α Su/birA, 264TCR β /hIL-15R α Su/birA	30
	TCR ドメイン - VNEPKSSDKTHTSPSPTR - hIL-15 (配列番号 31 として開示される リンカー配列)	264TCR α /hIL-15D8N, OT1TCR α /hIL-15, OT1scTCR/hIL-15D8N	
BirA リンカー	hIL-15R α Su - SGGGGSGGGGSID - birA タグ (配列番号 32 として開示されるリンカー 配列)	c264scTCR/hIL-15R α Su/birA, OT1TCR β /hIL-15R α Su/birA	40
一本鎖 CD8 リンカー	CD8 α - SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS - CD8 β (配列番号 33 として開示される リンカー配列)	scCD8 $\alpha\beta$ /hIL-15R α Su/birA	

【 0 2 9 5 】

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

【 0 2 9 6 】

1. Kouzarides, T., and Ziff, E. (1988) *Nature* 336, 646-651
2. Kouzarides, T., and Ziff, E. (1989) *Nature* 340, 568-571
3. Kouzarides, T., and Ziff, E. (1989) *Cancer Cells* 1, 71-76
4. Rieker, J. D., and Hu, J. C. (2000) *Methods Enzymol* 328, 282-296
5. Busch, R., Pashine, A., Garcia, K. C., and Mellins, E. D. (2002) *J Immunol Methods* 263, 111-121
6. Stern, L. J., and Wiley, D. C. (1992) *Cell* 68, 465-477
7. Sloan, V. S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., and Zaller, D. M. (1995) *Nature* 375, 802-806 10
8. de Kruif, J., and Logtenberg, T. (1996) *Journal of Biological Chemistry* 271, 7630-7634
9. Kostelny, S., Cole, M., and Tso, J. (1992) *J Immunol* 148, 1547-1553
10. Holliger, P., and Hudson, P. J. (2005) *Nat Biotechnol* 23, 1126-1136
11. Hayden-Ledbetter, M. S., Cervený, C. G., Espling, E., Brady, W. A., Grosmaire, L. S., Tan, P., Bader, R., Slater, S., Nilsson, C. A., Barone, D. S., Simon, A., Bradley, C., Thompson, P. A., Wahl, A. F., and Ledbetter, J. A. (2009) *Clinical Cancer Research* 15, 2739-2746
12. Kubetzko, S., Balic, E., Waibel, R., Zangemeister-Wittke, U., and Pluckthun, A. (2006) *J Biol Chem* 281, 35186-35201 20
13. Cuesta, A. M., Sanchez-Martin, D., Sanz, L., Bonet, J., Compte, M., Kremer, L., Blanco, F. J., Oliva, B., and Alvarez-Vallina, L. (2009) *PLoS One* 4, e5381
14. Mohler, K., Torrance, D., Smith, C., Goodwin, R., Stremler, K., Fung, V., Madani, H., and Widmer, M. (1993) *J Immunol* 151, 1548-1561
15. Feldmann, M. (2002) *Nat Rev Immunol* 2, 364-371
16. Weiner, L. M. (2007) *Nat Rev Cancer* 7, 701-706
17. Baeuerle, P. A., Kufer, P., and Bargou, R. (2009) *Curr Opin Mol Ther* 11, 22-30
18. Shen, J., Vil, M. D., Jimenez, X., Iacolina, M., Zhang, H., and Zhu, Z. (2006) *J Biol Chem* 281, 10706-10714 30
19. Lu, D., and Zhu, Z. (2009) *Methods Mol Biol* 525, 377-404, xiv
20. Jackman, J., Chen, Y., Huang, A., Moffat, B., Scheer, J. M., Leong, S. R., Lee, W. P., Zhang, J., Sharma, N., Lu, Y., Iyer, S., Shields, R. L., Chiang, N., Bauer, M. C., Wadley, D., Roose-Girma, M., Vandlen, R., Yansura, D. G., Wu, Y., and Wu, L. C. (2010) *J Biol Chem* (In Press)
21. Mortier, E., Quemener, A., Vusio, P., Lorenzen, I., Boublik, Y., Grotzinger, J., Plet, A., and Jacques, Y. (2006) *J Biol Chem* 281, 1612-1619
22. Waldmann, T. A. (2006) *Nat Rev Immunol* 6, 595-601
23. Bergamaschi, C., Rosati, M., Jalah, R., Valentin, A., Kulkarni, V., Alicea, C., Zhang, G. M., Patel, V., Felber, B. K., and Pavlakis, G. N. (2008) *J Biol Chem* 283, 4189-4199 40
24. Theobald, M., Biggs, J., Dittmer, D., Levine, A. J., and Sherman, L. A. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11993-11997.
25. Zhu, X., Marcus, W. D., Xu, W., Lee, H. I., Han, K., Egan, J. O., Yovandich, J. L., Rhode, P. R., and Wong, H. C. (2009) *J Immunol* 183, 3598-3607
26. Deer, J. R., and Allison, D. S. (2004) *Biotechnol Prog* 20, 880-889
27. Zhao, Y., Bennett, A. D., Zheng, Z., Wang, Q. J., Robbins, P. F., Yu, L. Y., Li, Y., Molloy, P. E., Dunn, S. M., Jakobsen, B. K., Rosenberg, S. A., and Morgan, R. A. (2007) *J Immunol* 179, 5845-5854
28. Belmont, H. J., Price-Schiavi, S., Liu, B., Card, K. F., Lee, H. I., Han, K. 50

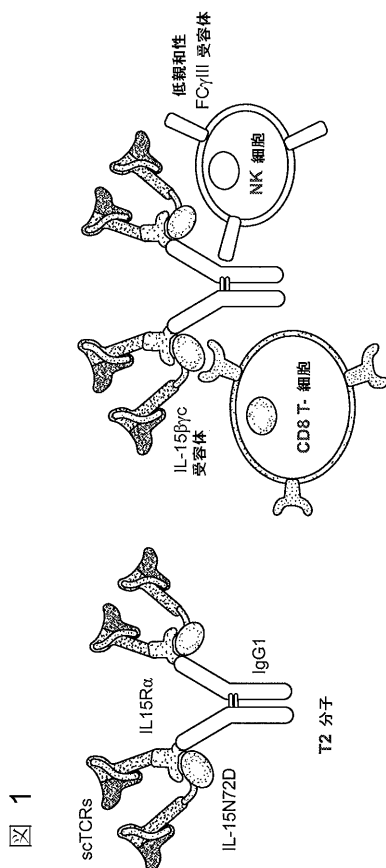
- P., Wen, J., Tang, S., Zhu, X., Merrill, J., Chavillaz, P. A., Wong, J. L., Rhode, P. R., and Wong, H. C. (2006) *Clin Immunol* 121, 29-39
29. Yang, S., Rosenberg, S. A., and Morgan, R. A. (2008) *J Immunother* 31, 830-839
30. Card, K. F., Price-Schiavi, S. A., Liu, B., Thomson, E., Nieves, E., Belmont, H., Builes, J., Jiao, J. A., Hernandez, J., Weidanz, J., Sherman, L., Francis, J. L., Amirkhosravi, A., and Wong, H. C. (2004) *Cancer Immunol Immunother* 53, 345-357
31. Garboczi, D. N., Hung, D. T., and Wiley, D. C. (1992) *PNAS* 89, 3429-3433
32. Zhu, X., Belmont, H. J., Price-Schiavi, S., Liu, B., Lee, H. I., Fernandez, M., Wong, R. L., Builes, J., Rhode, P. R., and Wong, H. C. (2006) *J Immunol* 176, 3223-3232
33. Chirifu, M., Hayashi, C., Nakamura, T., Toma, S., Shuto, T., Kai, H., Yamagata, Y., Davis, S. J., and Ikemizu, S. (2007) *Nat Immunol* 8, 1001-1007
34. Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., and Carbone, F. R. (1994) *Cell* 76, 17-27
35. Daniels, M. A., and Jameson, S. C. (2000) *J Exp Med* 191, 335-346.
36. Nugent, C. T., Renteria, R. O., Kuus-Reichel, K., and Kumar, A. (2005) *Immunol Lett* 98, 208-215
37. Schott, E., and Ploegh, H. L. (2002) *Eur J Immunol* 32, 3425-3434
38. Neveu, B., Echasserieau, K., Hill, T., Kuus-Reichel, K., Houssaint, E., Bonnevillie, M., and Saulquin, X. (2006) *Int. Immunol.* 18, 1139-1145
39. Kern, P., Hussey, R. E., Spoerl, R., Reinherz, E. L., and Chang, H.-C. (1999) *Journal of Biological Chemistry* 274, 27237-27243
40. Arcaro, A., Gregoire, C., Bakker, T. R., Baldi, L., Jordan, M., Goffin, L., Boucheron, N., Wurm, F., van der Merwe, P. A., Malissen, B., and Luescher, I. F. (2001) *J Exp Med* 194, 1485-1495
41. Wang, R., Natarajan, K., and Margulies, D. H. (2009) *J Immunol* 183, 2554-2564
42. Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E., and Wiley, D. C. (1996) *Nature* 384, 134-141
43. Lin, A., Devaux, B., Green, A., Sagerstrom, C., Elliott, J., and Davis, M. (1990) *Science* 249, 677-679
44. Traunecker, A., Dolder, B., Oliveri, F., and Karjalainen, K. (1989) *Immunol Today* 10, 29-32
45. Laugel, B., van den Berg, H. A., Gostick, E., Cole, D. K., Wooldridge, L., Boulter, J., Milicic, A., Price, D. A., and Sewell, A. K. (2007) *J Biol Chem* 282, 23799-23810
46. Wooldridge, L., van den Berg, H. A., Glick, M., Gostick, E., Laugel, B., Hutchinson, S. L., Milicic, A., Brenchley, J. M., Douek, D. C., Price, D. A., and Sewell, A. K. (2005) *J Biol Chem* 280, 27491-27501
47. Gakamsky, D. M., Luescher, I. F., Pramanik, A., Kopito, R. B., Lemonnier, F., Vogel, H., Rigler, R., and Pecht, I. (2005) *Biophys J* 89, 2121-2133
48. Cole, D. K., Dunn, S. M., Sami, M., Boulter, J. M., Jakobsen, B. K., and Sewell, A. K. (2008) *Mol Immunol* 45, 2700-2709
49. Alam, S. M., Davies, G. M., Lin, C. M., Zal, T., Nasholds, W., Jameson, S. C., Hogquist, K. A., Gascoigne, N. R., and Travers, P. J. (1999) *Immunity* 10, 227-237
50. Cheever, M. A. (2008) *Immunol Rev* 222, 357-368
51. Ferrari-Lacraz, S., Zanelli, E., Neuberg, M., Donskoy, E., Kim, Y. S., Zheng

, X. X., Hancock, W. W., Maslinski, W., Li, X. C., Strom, T. B., and Moll, T. (2004) J Immunol 173, 5818-5826

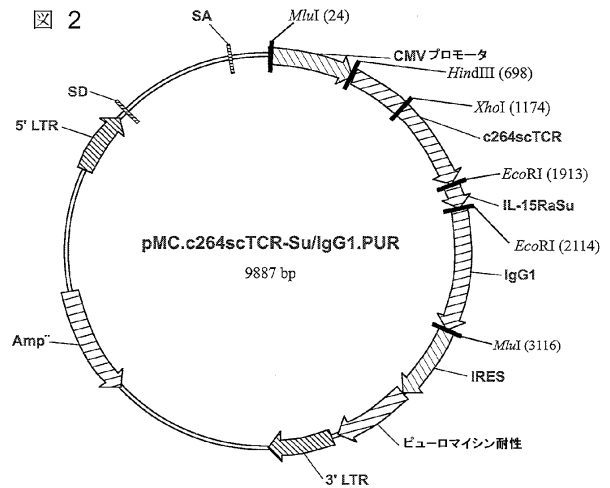
52. Zheng, X. X., Gao, W., Donskoy, E., Neuberger, M., Ruediger, M., Strom, T. B., and Moll, T. (2006) in Transplantation Vol. 81, pp. 109-116

53. Ferrari-Lacraz, S., Zheng, X. X., Fueyo, A. S., Maslinski, W., Moll, T., and Strom, T. B. (2006) Transplantation 82, 1510-1517

【図 1】



【図 2】



【図 6】

図 6

ATGGAGACAGACACACTCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCACAGGTTCACCGGTCA
 GTCTAGTGACGACGCGCGATGCTCGCGTCTACTGTCTGAAGGACGCTCTCTGCAGCTGAGAT
 GCAAGTATTCCTACTCTGGGACACCTTATCTGTTCTGGTATGTCAGTACCGCGCGGAGGG
 CTGCAGTCTCTCAAGTACTATTCAGGAGACCCAGTGGTTCAGGAGTGAATGGCTTCGA
 GGCTGAGTTCAGCAAGAGTAAGTCTCTCTCCACCTCGCGAAAGCCCTCTGTGACTGGAGCG
 ACTCTGCTGTACTCTCTGTTTTCAGGAGGATAGCAACTATCAGTTGATCTGGGCTCT
 GGGACCAAGCTAATTATAAAGCCAGACACTAGTGGTGGCGGTGGCAGCGCGGTGGTGGTTC
 CGGTGGCGCGGTCTGCGGTGGCGGTCTCTCGAGCAATCAAAAGTCATTAGACTCCAA
 GATATCTGGTGAAGGGCAAGGACAAAAGCAAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAAGGACAT
 CCAGTTGATTTCTGGTATCAACAAAATAAGAACAAATGAGTTTAAATTTTGTATTAACTTTCA
 GAATCAAGAAGTTCTTCAGCAAATAGACATGACTGAAAACGATTCTCTGCTGAGTGTCTT
 CAAACTCACCTTGACGCTAGAAATTCAGTCTCTGAGGAGGAGACTCAGCACTGTACCTC
 TGTGCCAGAGTCTGTGAGGGGCGGCACAGAGTTTCTTTGGTAAAGGAACAGGCTCAC
 AGTTGTAGAGGACCTGAACAAGGTGTTCACCCGAGGTGCTGTGTTTGAAGCATCAGAAG
 CAGAGATCTCCACACACCAAAAGGCCACACTGGTGTGCTTGCCACAGGCTTCTTCCCTGAC
 CACGTGAGCTGAGCTGGTGGGTAAACGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGTTCAGCACGGACCC
 GCAGCCCTCAAGGAGCAGCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCCTGA
 GGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGCAACCACTTCGCTGTCAAGTCCAGTTCTCA
 GGGCTCTCGGAGAATGACAGGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAG
 CCGCAGGGCTGGGTGAGAGAGACATCAGTGCCTTCCCGCATGTCCGTGAACACGACGAG
 ACATCTGGTCAAGAGCTACAGTTGTACTCCAGGAGCGGTACATTTGTAACCTGTGTTTCA
 AAGCGTAAAGCCGCGACGTCCAGCCTGACGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGC
 CCACTGGACAACCCCACTCTCAAATGATTAGAGCTAGCACCAAGGCCCATCGTCTTCC
 CCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
 GACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACACGCGGCTGCA
 CACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC
 CCTCCAGAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAAGGCCAGCAACAC
 AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCCCCTGCCCC
 AGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCACTCTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCC
 TCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGAACAGCCCT
 GAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGCGGTGGAGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCG
 GGAGGAGCAGTACACAGCAGCTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCAGCGTGTGACAGGACT
 GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAG
 AAAACCATCTCCAAGCCAAAGGCGAGCCCGAGAACCAAGGTGTACACCTGCCCCCATC
 CCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
 GCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGAGAACAACTACAAGACCAGCCCT
 CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAG
 GTGGCAGCAGGGGAAGCTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACA
 CGCAGAAGAGCCTCTCCTGTCTCCGGTAAATAA

【図 7 - 2】

図 7-2

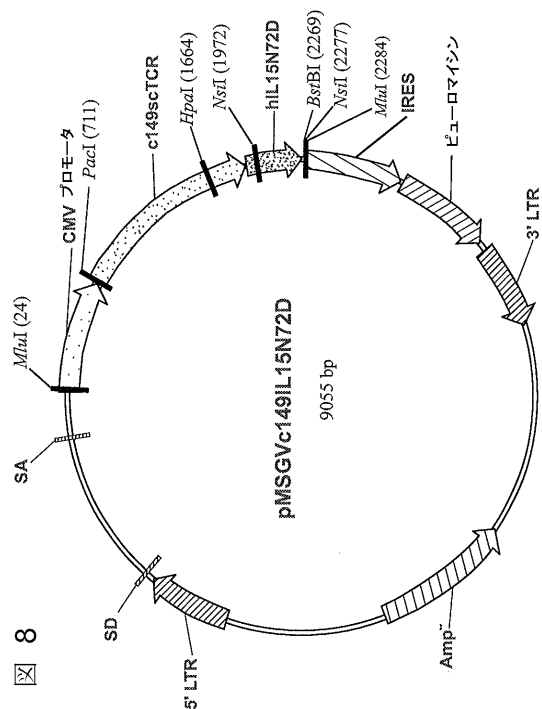
diwvksyslysreriyensqfkrkagtssltcevlakatnvahwttslkcirastkqp
 <<
 huIL-15RαSu huIgG1
 svfplapsskstsggtaalgclvdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssglysl
 huIgG1 定常領域
 ssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapellgqpsvf
 huIgG1 定常領域
 lfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynsty
 huIgG1 定常領域
 rrvsvltvlhqdwlngkeyckvsnkalpapietiskakggprepgvytlppsrldelt
 huIgG1 定常領域
 knqvsltclvkgyfypsdiawesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdksrwg
 huIgG1 定常領域
 ggnvfscsvmhlehnhytgkslslspgk
 >
 huIgG1 定常領域

【図 7 - 1】

図 7-1

metdtilllwlllwpggstgsvtqpdarvtvsegaslgirckysysgtpylfwvyvyp
 < >>
 Ig リーダー TCR-Vα
 rgglqlllkyysgdppvvqgvngfeafesksnssfhrlkasvhwdsavycvlsedsny
 TCR-Vα
 gliwgsqtkliikpdtsgggsgggsgggsgggsgggsssnsvkiqtprylvkqggqkak
 >> >>
 TCR-Vα リンカー TCR-Vβ
 mrcipekghpvvfwyqgnknnefklflinfnqnevlqgidatekrfsaaccpsnspcslei
 TCR-Vβ
 gsseagdsalylcasslsgggtvffgkgtrltvvedlnkvfppevavfepseaeisht
 >>
 TCR-Vβ TCR-Cβ
 gkatlvcilatgffpdhvelswwnqkevhsqsvtdpqpkeqpalndsrlyclsrirvs
 TCR-Cβ
 atfwgnprnhfrcqvgyfyslendewtqdrakpvtqivsaawgraditcoppmsveha
 >>
 TCR-Cβ huIL-15RαSu

【図 8】

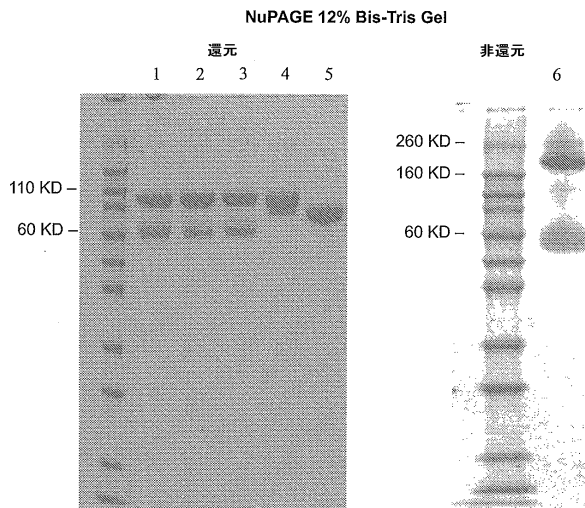


【図 9】

図 9

ATGGACAGACTTACTTCTTCATTCCTGCTCCTGATTGTCCTGCGTACGCTTTGGCCAGAA
 GGTAAACAGACTCAGACTTCAATTTCTGTGATGGAGAAGACAACGGTGACAATGGACTGTG
 TGTATGAAACCCGGGACAGTTCTTACTTCTTATCTTGGTACAAGCAACAGCAAGTGGGGAA
 ATAGTTTCTTATTCGTGAGGACTCTTACAAAAAGGAAATGCAACAGAAAGTCATTATTC
 TCTGAACTTTCAGAGCCAAAAGTTCCATCGGACTCATCATCTGCCACACAGATTGAGG
 ACTCAGCAGTATATTTCTGTGCTATGAGAGACACAAATGCTTACAAAGTCATCTTTGAAAA
 GGGACACATCTTCATGTTCTGCCTACTAGTGGTGGCGGTGGCAGCGCGGTGGTGGTCCCC
 TGGTGGCGGCGGTCTGGCGGTGGCGGTTCCTCGAGCGAGGCTGCAGTCACCAAGTCCAA
 GAAGCAAGGTGGCAGTAACAGAGGAAAGGTGACATTGAGCTGTCAACAGACTAATAACCAT
 GACTATATGTACTGGTATCGGCAGGACACGGGCATGGGCTGAGGCTGATCCATTACTCATA
 TGTGCTGACAGCAGCGAGAAAGGAGATATCCCTGATGGGTACAAGGCCTCCAGACCAAGCC
 AAGAGAATTTCTCTCATTCCTGAGTTGGCTTCCCTTTCTCAGACAGCTGTATATTTCTGT
 GCCAGCAGCCCCACTCCTATGAACAGTACTTCGGTCCCGCACCAGGCTCAGGTTTTAGA
 GGACCTGAACAAGGTGTTCCCAACCGAGGTCGCTGTGTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCT
 CCCACACCAAAAGGCCACACTGGTGTGCTGGCCACAGGCTTCTCCCTGACCACGTGGAG
 CTGAGCTGGTGGTTAACGGGAAGGAGTGCACAGTGGGTCAGCAGGACCCGACGCCCT
 CAAGGACAGCCCCGCTCAATGACTCCAGATAGCTTGGTGGCAGCGCTGAGGGTCTCGG
 CCACCTTCTGGCAGAACCCCGCAACCACTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCG
 GAGAATGACAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCTGTCAACAGATCGTCAGCGCCGAGGC
 CTGGGGTAGAGCAGACAACCTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTA
 TTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAGTGATGTTCAACCCAGTTGCAAA
 GTAACAGCAATGAAGTCTTTCTCTGGAGTTACAAGTTATTCACCTGAGTCCGGAGATGC
 AAGTATTCATGATACAGTAGAAAAATCTGATCATCTAGCAAAACGACAGTTTGTCTCTAATG
 GGAATGTAACAGAAATCTGGATGCAAGAATGTGAGGAACCTGGAGAAAAAATATTAAAGAA
 TTTTTCAGAGTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCAACACTTCTTAA

【図 11】



- 還元
 1. T2 BF1 カラム pH4
 2. T2 BF1 カラム pH3
 3. T2 BF1 + R-プロテインA
 4. c264scTCR/IgG1 BF1 + R-プロテインA
 5. c264scTCR/IgG1A₁ BF1 + R-プロテインA
- 非還元
 6. T2 BF1 + R-プロテインA

図 11

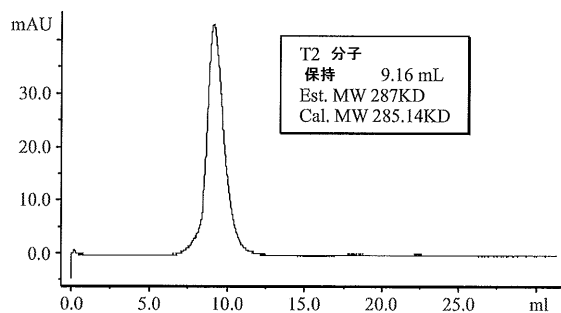
【図 10】

図 10

mdrltssflillivpayvlagkvtgtqtsisvmekttvtmdcvyetrdsyflfwyqta
 < >>
 Ig リンカー TCR-Vα
 sgeivflirqdsykenateghyslnfqkpkssiqliitatqiedsavfycamrdtnay
 TCR-Vα
 kvifgkqthlhvlpstsgggsgggsgpgggsgggssseavtgsprskvavtgkvt
 >> >>
 TCR-Vα リンカー TCR-Vβ
 lschqtnnhdymwyvrgdtghglrlhysyvadtstekdipdgykasrpsqenfsile
 TCR-Vβ
 laslsqtavfycassphsyeyqfpgtrltvledlnkvfppevavfepseaeishtqka
 >>
 TCR-Vβ TCR-Cβ
 tlvlcatgffpdhvelswwngkevhsgvstdpgplkegpalndsrlyclssrlrvsatf
 TCR-Cβ
 wgnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradnwnvnvisdlkkiedl
 >>
 TCR-Cβ huIL-15N72D
 iqmhidatlytesdvhpckvtamkcflllelqvieslesgdasihdtvenliilandsl
 huIL-15N72D
 ssngnvtesgckeceeleeknikelfqsfvhiqvmfints
 huIL-15N72D >

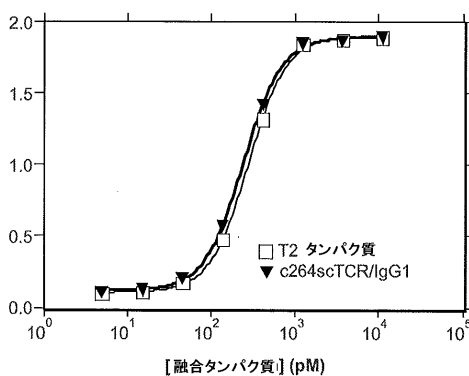
【図 12】

図 12



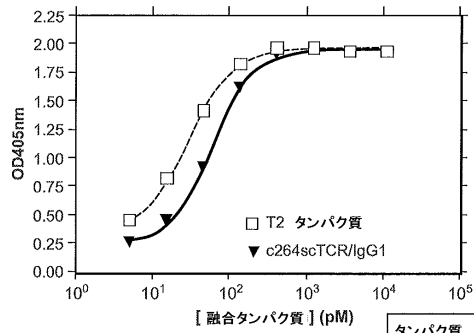
【図 13】

図 13



【図 14】

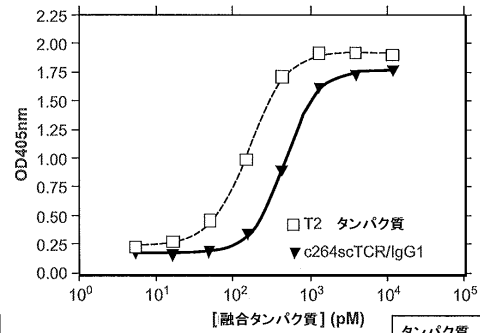
図 14



タンパク質	比活性(%)
264TCR-IgG1	100
T2M	209

【図 15】

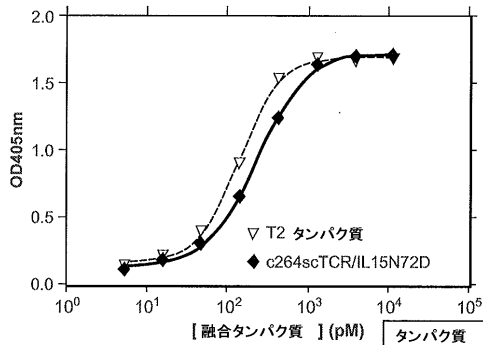
図 15



タンパク質	比活性(%)
264TCR-IgG1	100
T2M	299

【図 16】

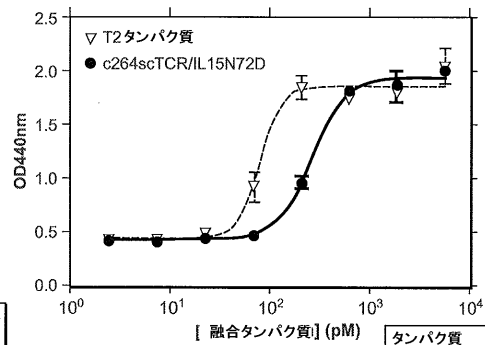
図 16



タンパク質	比活性(%)
264TCR-IL15N72D	100
T2M	161

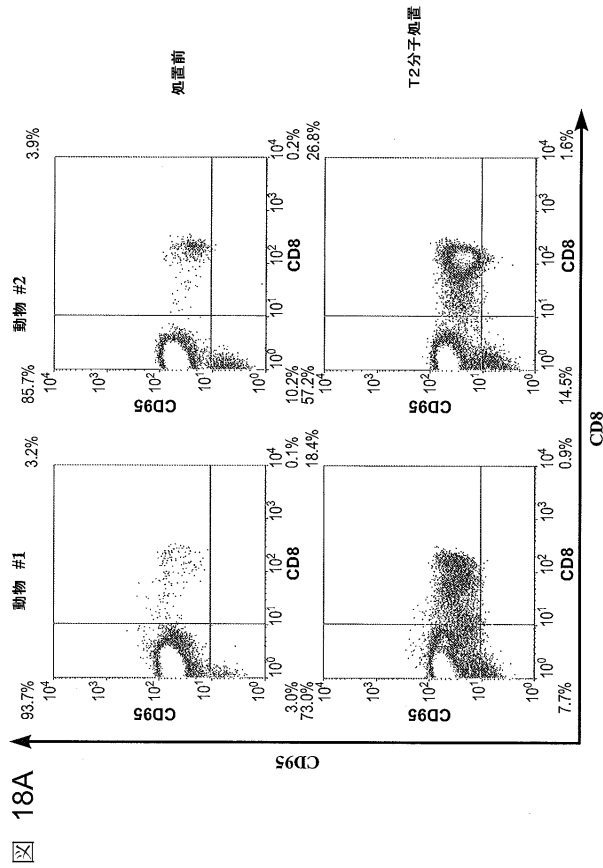
【図 17】

図 17

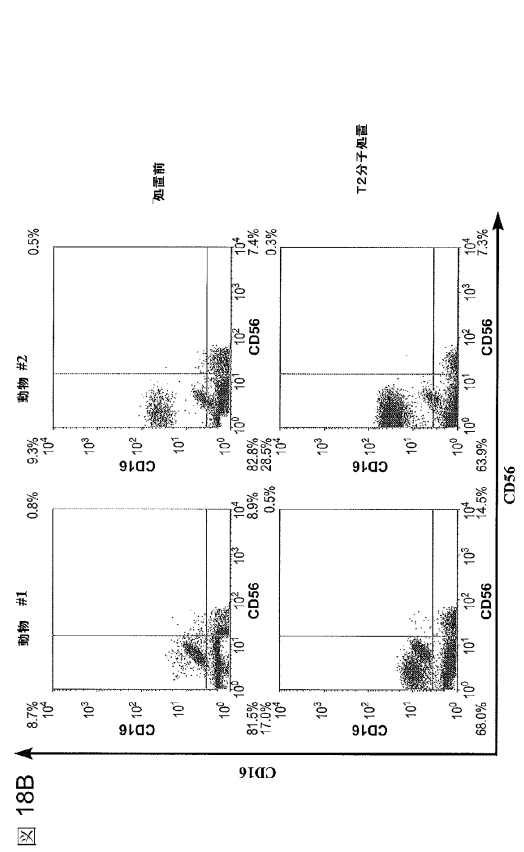


タンパク質	比活性(%)
264TCR-IL15N72D	100
T2M	322

【図 18 A】



【図 18 B】



【図 19】

図 19A

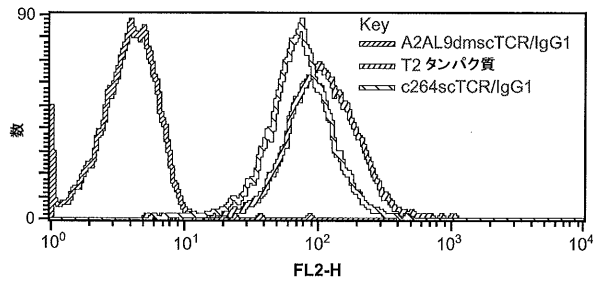
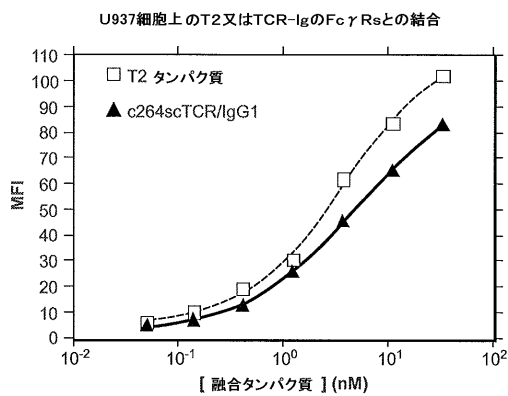
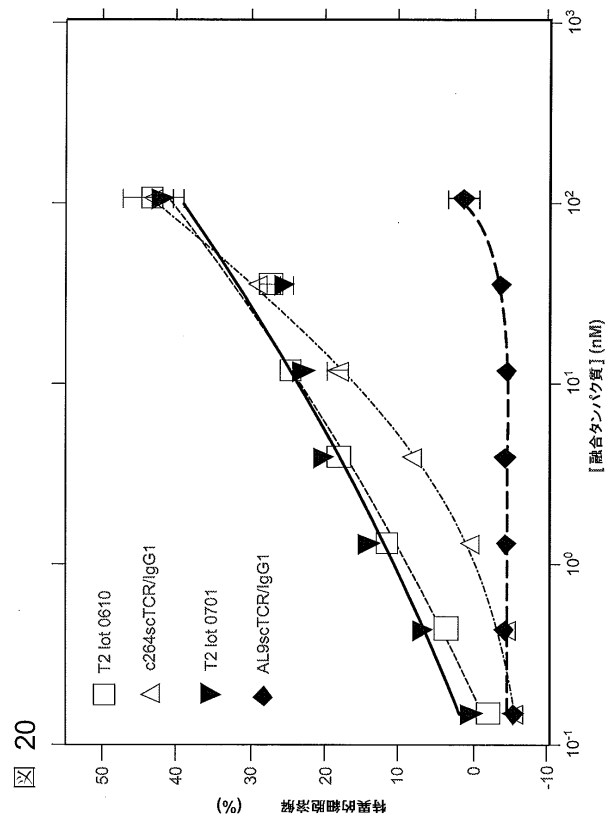


図 19B

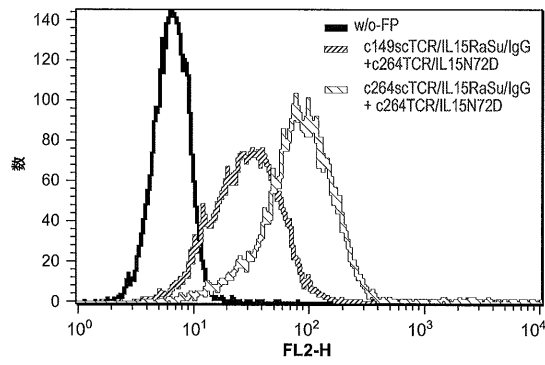


【図 20】



【図 25】

図 25



【図 26】

図 26A

マウス検討

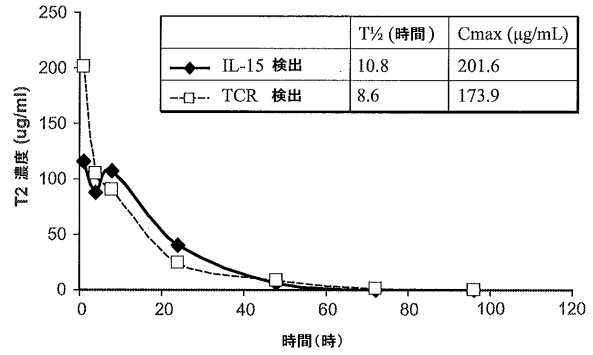
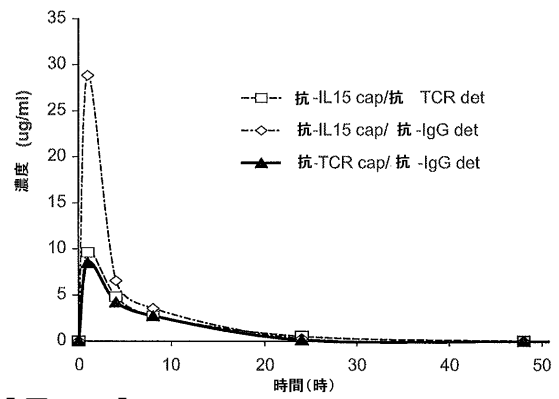
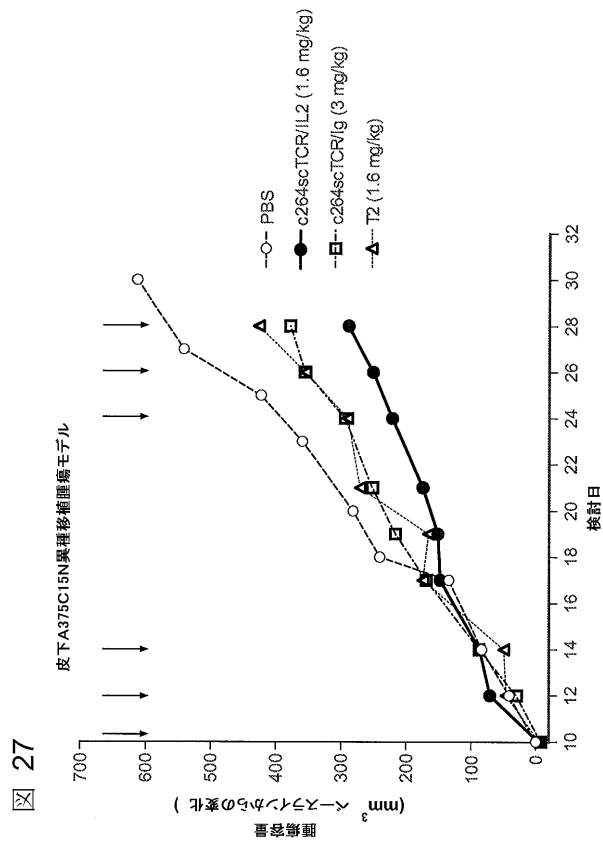


図 26B

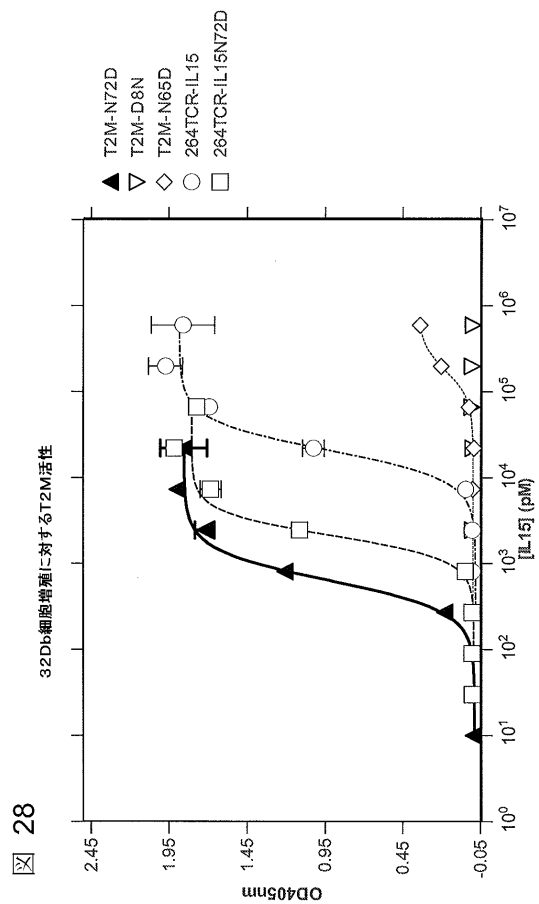
サル検討



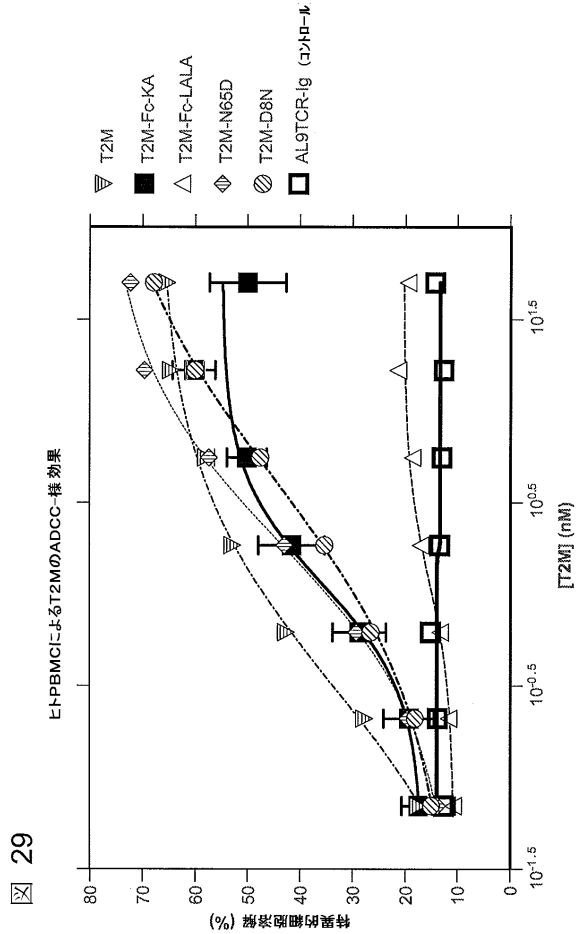
【図 27】



【図 28】



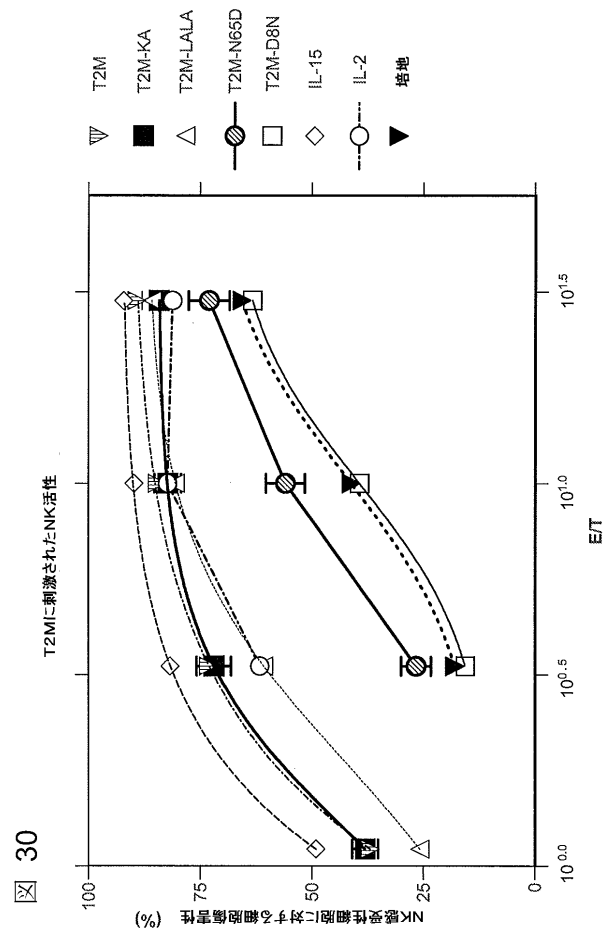
【図 29】



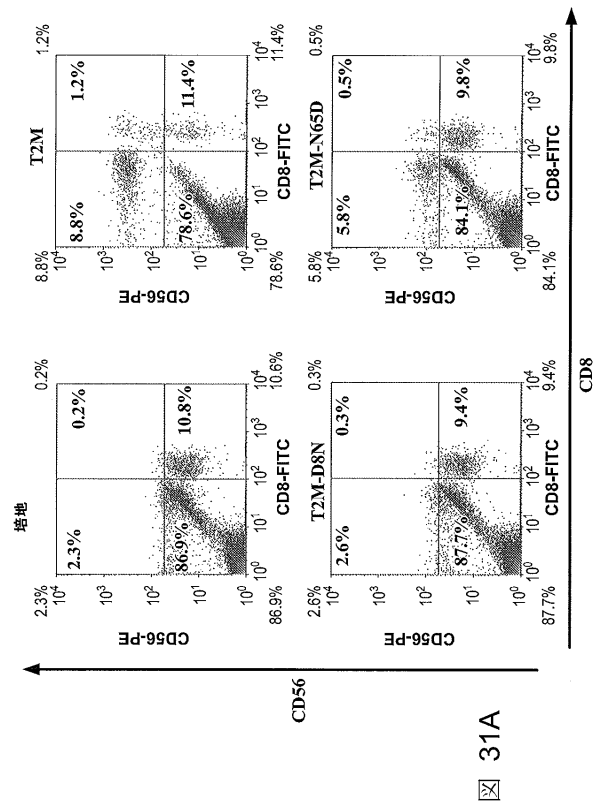
【図 31】

FIG. 31A
FIG. 31B
FIG. 31

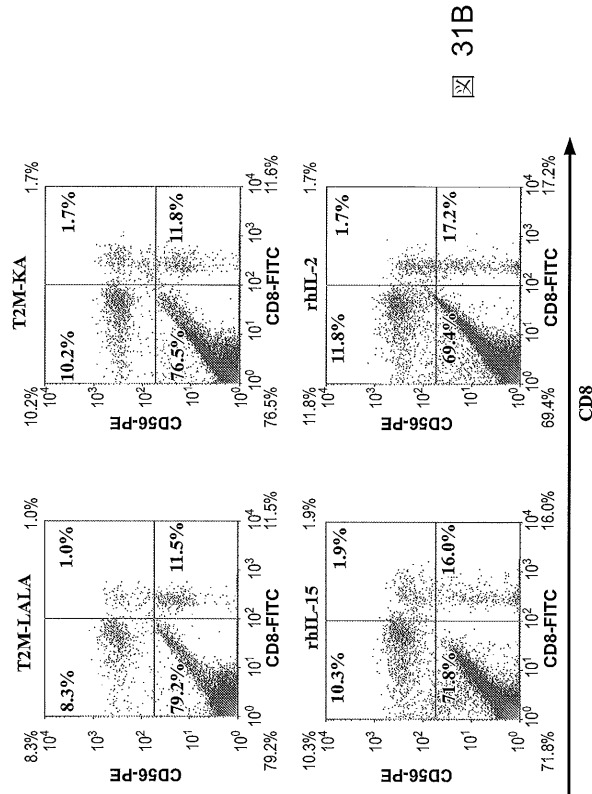
【図 30】



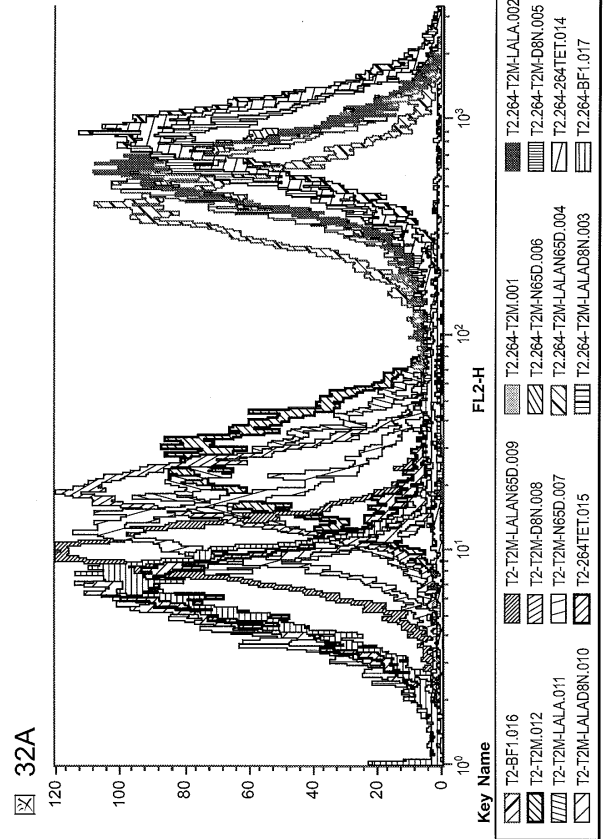
【図 31 A】



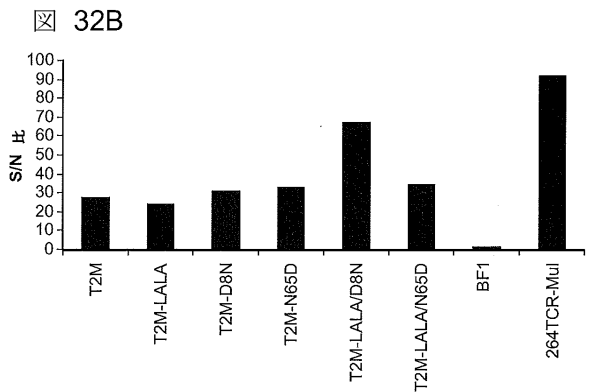
【図 3 1 B】



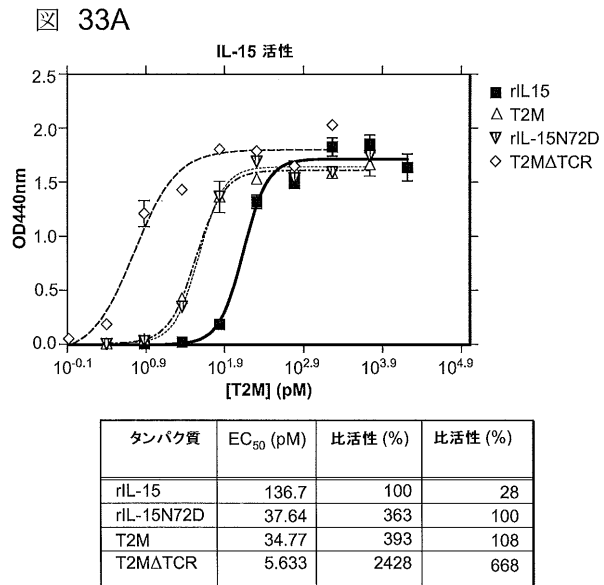
【図 3 2 A】



【図 3 2 B】

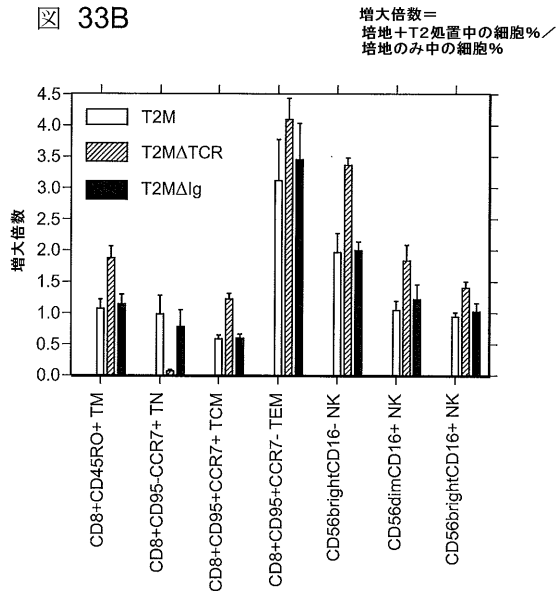


【図 3 3 A】



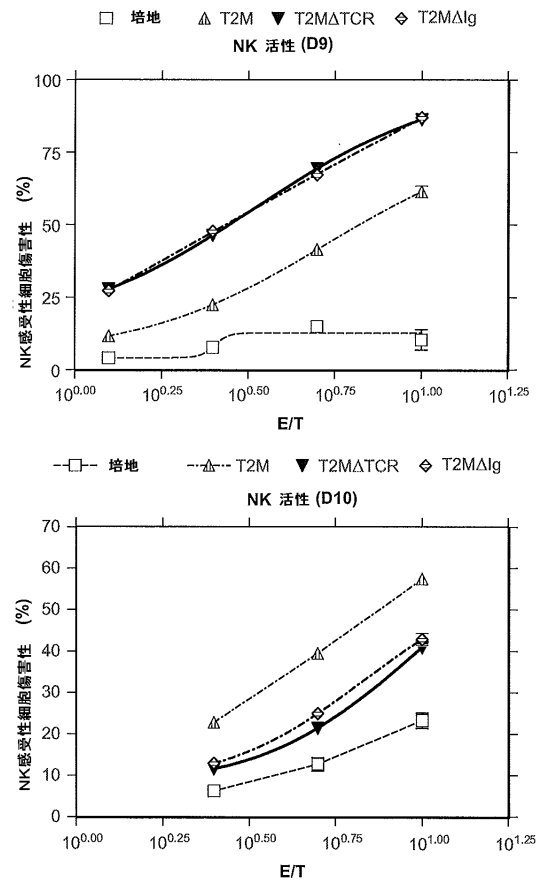
【図 3 3 B】

33B

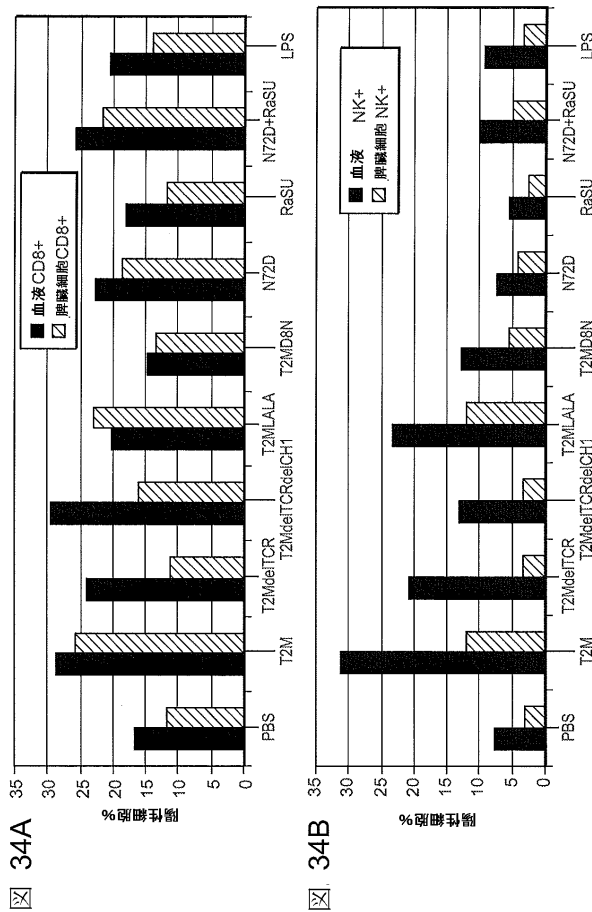


【図 3 3 C】

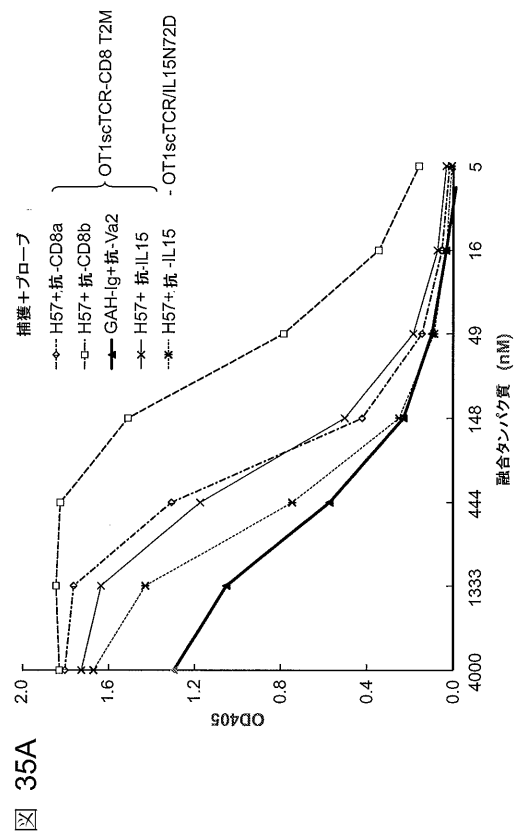
33C



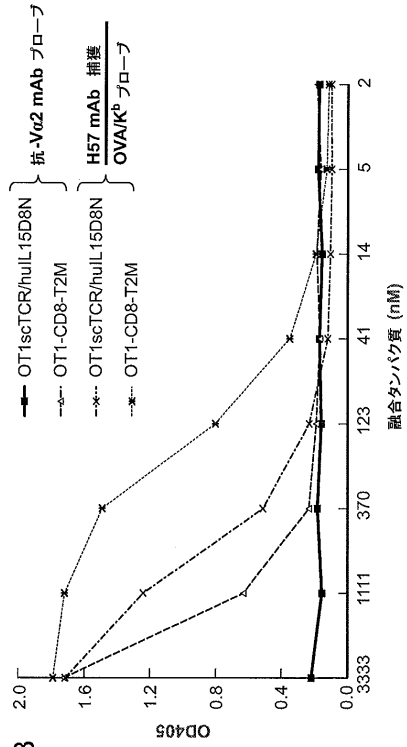
【図 3 4】



【図 3 5 A】



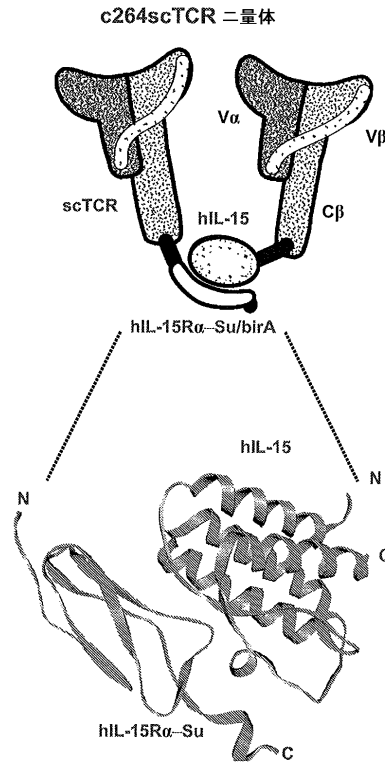
【図 35 B】



35B

図

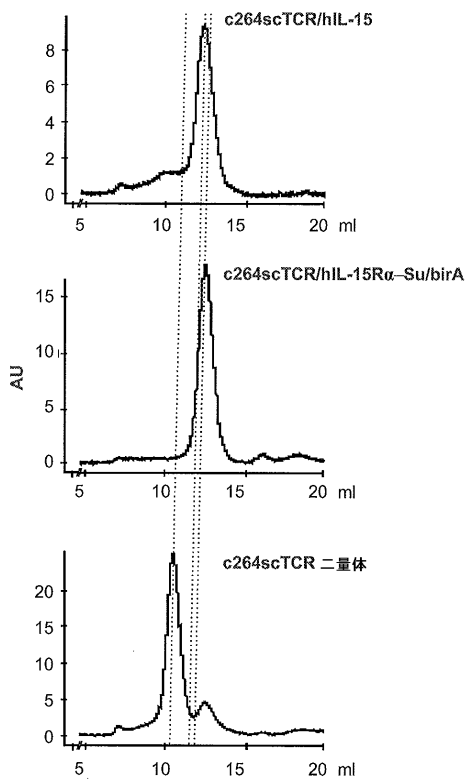
【図 36 A】



36A

図

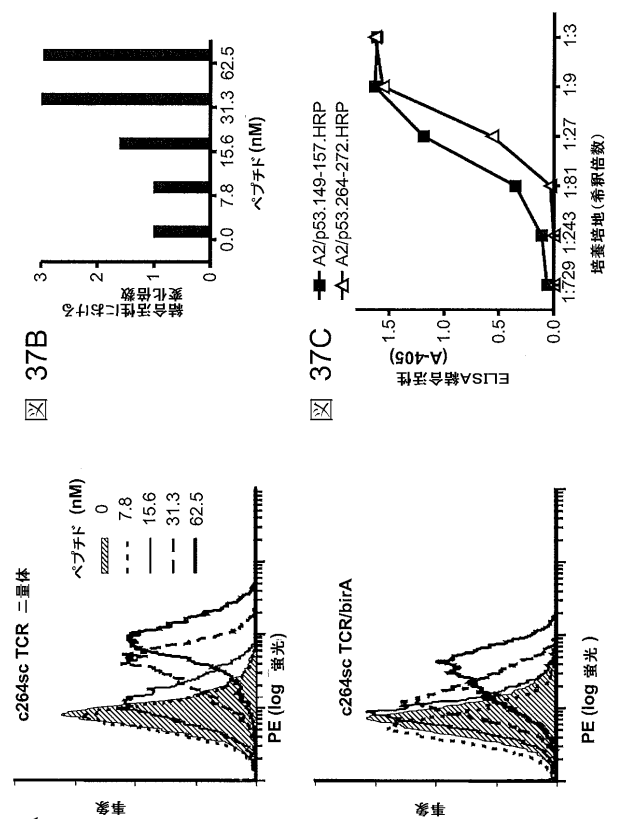
【図 36 B】



36B

図

【図 37】



37A

図

37C

図

【図 38】

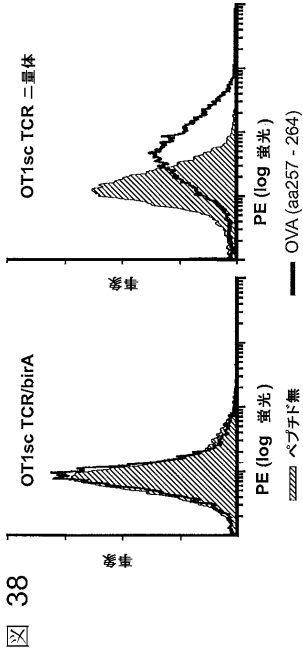


図 38

【図 40】

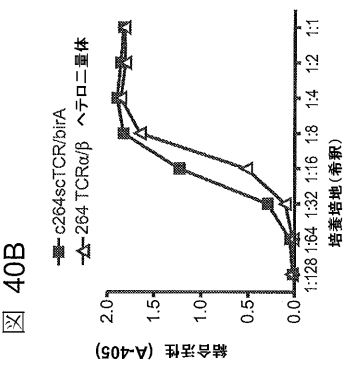
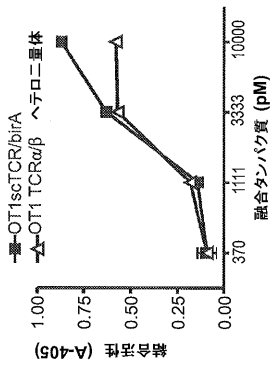


図 40B

図 40A



【図 39】

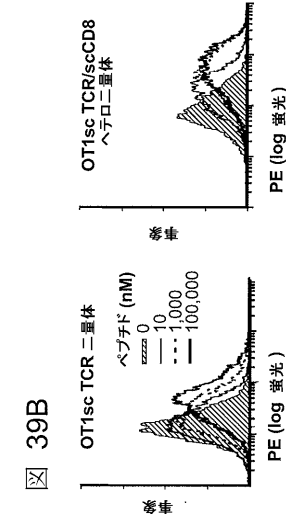


図 39B

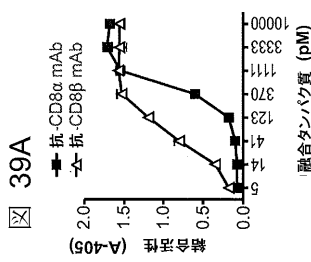


図 39A

【図 41】

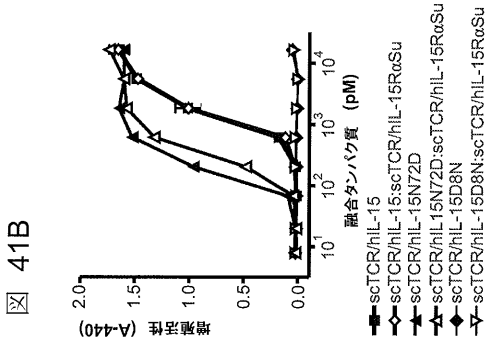
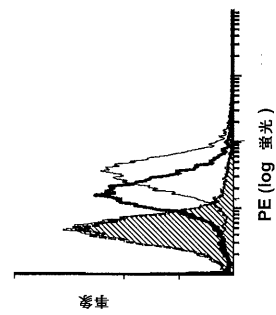


図 41B

図 41A



2° Ab のみ
scTCR/hIL-15-scTCR/hIL-15RαSu
scTCR/hIL-15N72D-scTCR/hIL-15RαSu
scTCR/hIL-15D8N-scTCR/hIL-15RαSu

【図 4 2】

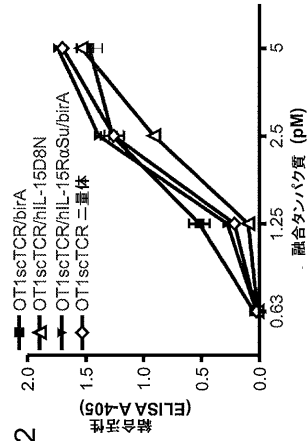


図 42

【図 4 3】

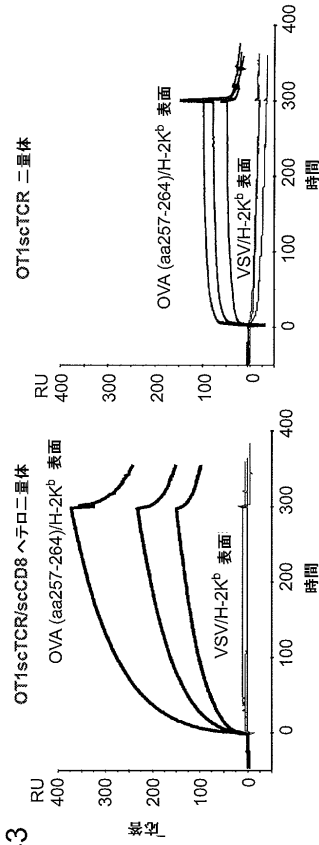


図 43

【図 4 4 A】

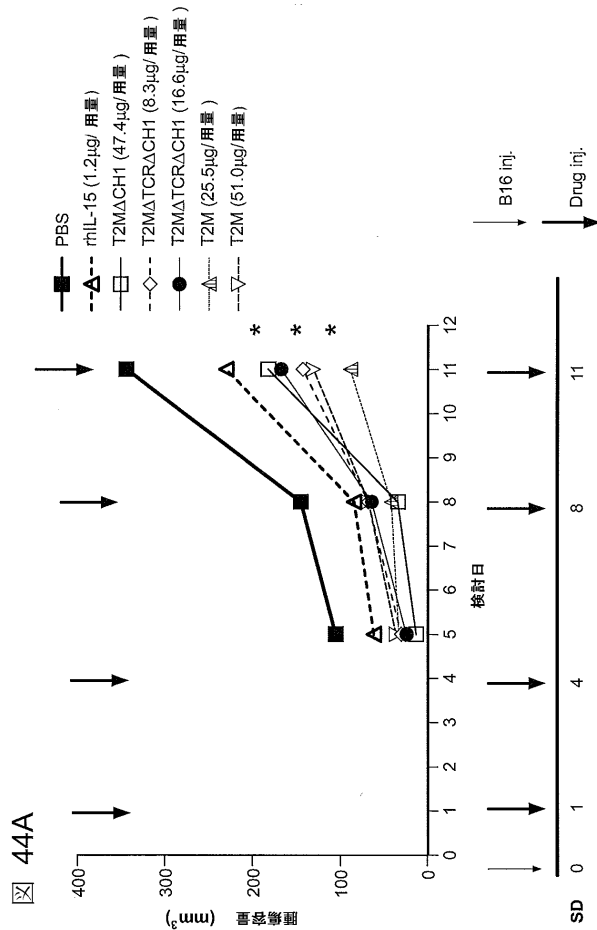


図 44A

【図 4 4 B】

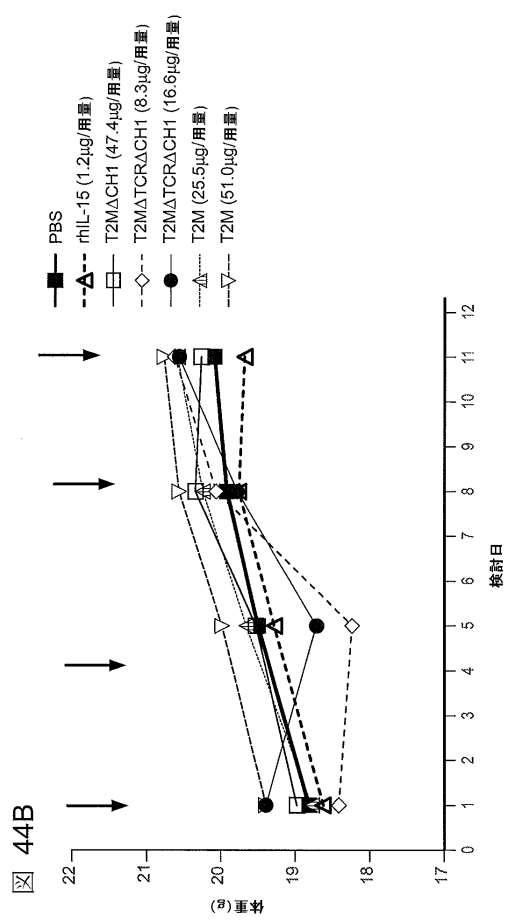


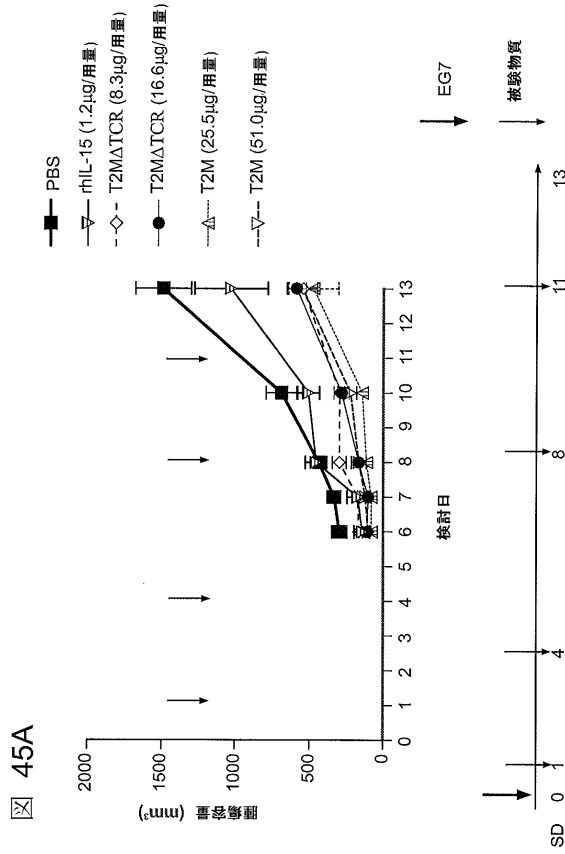
図 44B

【 図 4 6 】

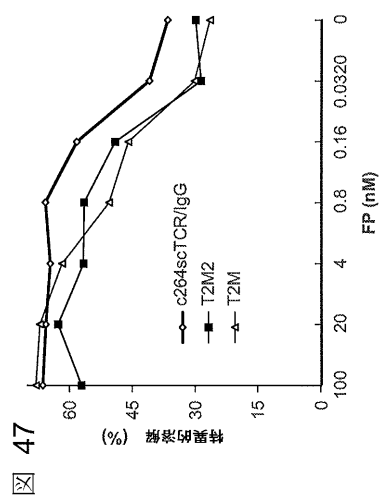
epksdktthtcppcpape1lgppsvflfppkpkdtlmi srtpevtcvrvdvshedpevkfnw
yvdgvevhnaaktpreeqynstyrvsvitvlhgdlngkeykckvsnkalpaplektiska
kgqprepqvtytlpbrdelitknqysltclvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsd
gsfflysklitvdksrwqggnvfscsvmhealhnhytqkslspsgk

46

【 図 4 5 A 】

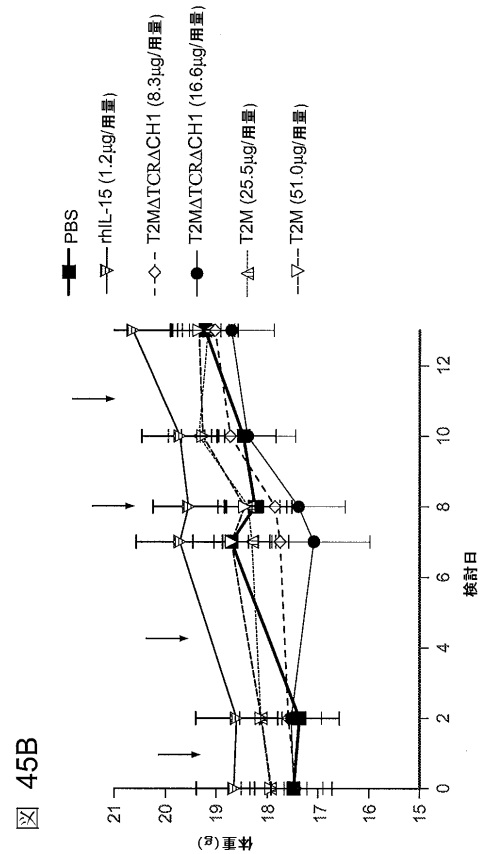


【 図 4 7 】



47

【 図 4 5 B 】



【図 48 A B】

図 48A

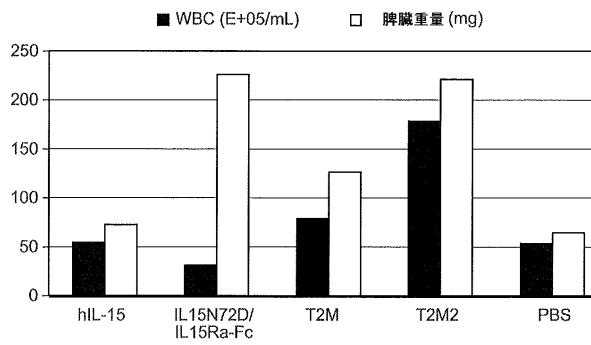
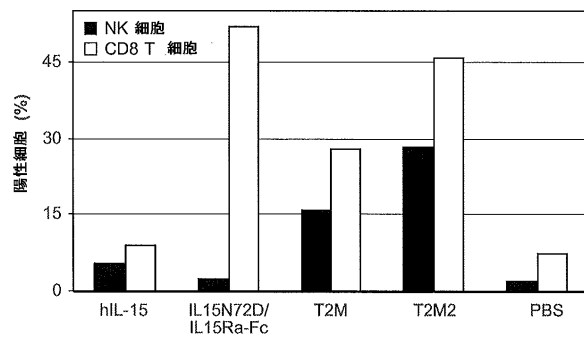


図 48B



【図 49】

図 49A

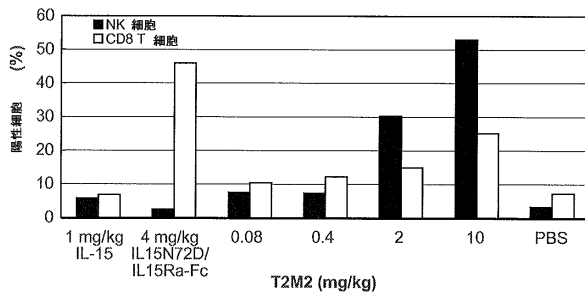
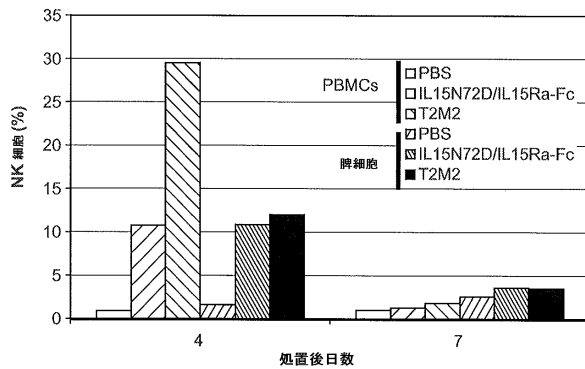


図 49B



【図 48 C】

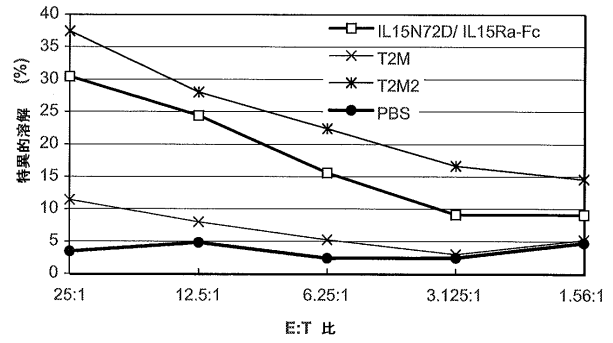


図 48C

【図 50 A B】

図 50A

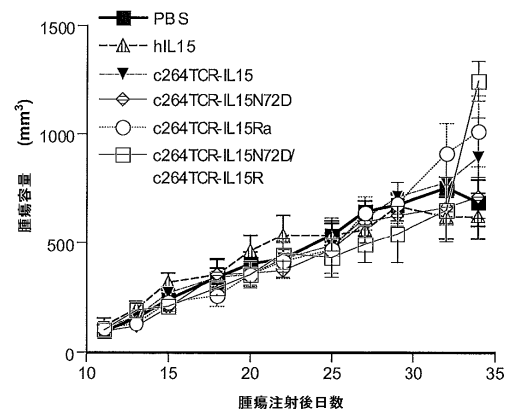
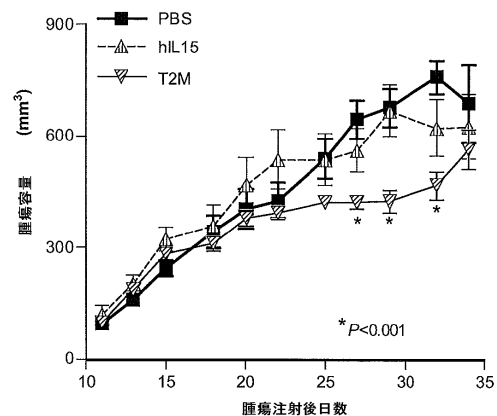


図 50B



【図 50C】

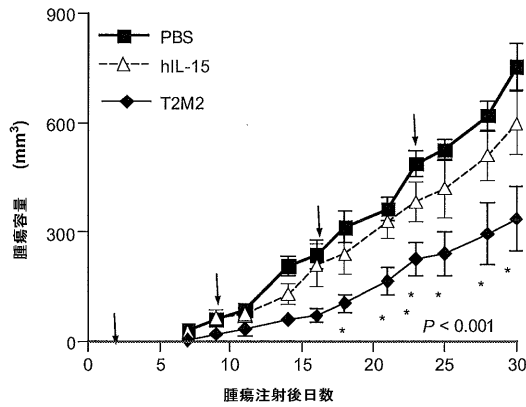


図 50C

【図 51 - 1】

図 51-1

```

ATGGAGACAGACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGG
< リーダー seq
TTCCACCGGTCTAGTCAGTCAGCGAGCCCGATGCTCGCGTCACTGTCTCTG
>< c264scTCR
AAGGAGCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGTATTCTACTCTGGGACACCT
TATCTGTTCTGGTATGTCCAGTACCCGCGGCAGGGGCTGCAGCTGCTCCT
CAAGTACTATTTCAGGAGACCCAGTGGTTCAGGAGTGAATGGCTTCGAG
CTGAGTTTCAGCAAGAGTAACTCTCCTCCACCTGCGGAAAGCCTCTGTG
CACTGGAGCGACTCTGCTGTGTACTTCTGTGTTTTCAGCGAGGATAGCAA
CTATCAGTTGATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTAATTATAAGCCAGACA
CTAGTGGTGGCGGTGGCAGCGCGGTGGTGGTCCGGTGGCGGCGGTCTCT
GGCGGTGGCGGTTCCTCGAGCAATTCAAAAGTCATTTCAGACTCCAAGATA
TCTGGTGAAGGGCAAGGCAAAAAGCAAAGATGAGGTGTATCCCTGAAA
AGGGACATCCAGTTGTATTCTGGTATCAACAAAATAAGAACAATGAGTTT
AAATTTTGTATTAACCTTTCAGAATCAAGAAGTTCTTCAGCAAAATAGACAT
GACTGAAAACGATTCTCTGCTGAGTGTCTTCAAACTCACCTTCAGGCC
TAGAAATTCAGTCCCTCTGAGGCGAGGACTCAGCACTGTACCTCTGTGCC
AGCAGTCTGTGAGGGGCGGCACAGAAGTCTTCTTTGGTAAAGGAACAG
GCTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACAAGGTGTTCCACCCGAGGTGCGTG
TGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAGGCCACACTG
GTGTGCTTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTG
GGTTAACGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACGACCCGACGCCCC
TCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGC
CTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGCAACCCTTCCGCTG
TCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGATGACGAGTGGACCCAGGATA
GGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCTGGGGTAGAGCA
GACATCAGTGCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGACAGACATCTGGGT
>< ヒト IL-15R α sushi ドメイン
CAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGAGCGGTACATTGTAACTCTGGTT

```

【図 51 - 2】

図 51-2

```

TCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGGTGTGAACAAG
GCCACGAATGTCGCCCAGTGGACAACCCCAAGTCTCAAATGCATTAGAGA
><
GCCGAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTG
ヒト IgG1 CH2-CH3 (Fc) ドメイン
AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGAC
ACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGT
GAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAAAGCAGC
TACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCG
AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC
ACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCTGAC
CTGCTGTGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCAGCCCTCCCGTGTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGCAG
GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC
ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA
>

```

【図 52】

図 52

```

qsvtqpdarvtvsegaslrlckysysgtpylfwyvqyprqglqlllkyysgdprvvgvn
< c264scTCR
gfeaeafsksnssfhrlkasvhwdsavfyfcvlsedsnyqliwsgtklikpdtsggggs
ggggsgggsgggssnskvitprylvkqggkakmrcipekghpvvfwyqqnknef
kflinfqnqevlqqidmtekrfsaecspspcslsleiqseagdsalylcasslsgggtv
ffkgktrltvvedlnkvfppevavfepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswwng
kevhsgvstdpqplkeqpalndsryclsrslrvsatfwqnrnhfrqcqvfyglsendew
tqdrakpvtqivsaeeawgraditcoppmsvehadiwvksyslsreryicnsgfkrkagt
>< ヒト IL-15R α sushi ドメイン
ssltecvlnkatnvahwttslkcirepksodkthtccppcapellggpsvflfppkpkd
>< ヒト IgG1 CH2-CH3 (Fc) ドメイン
tlmsirtpvctvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrsvsvltvl
hqdwlngkeykckvsnkalpapietiskakggprepqvytlppsrdeltnkqvsltcclv
kgfypsdiawewesngqpennykttpvldsdgsfflyskltvdkrsrwqgnvfscsvmh
ealhnhytqkslsispgk
>

```

【図 5 3】

図 53

ATGGATTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCTGCTAATCAGTGCTTCAGT
< リーダー seq
CATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGT
><
CTGCATCTCCAGGGGAGAGGTCACAATGACTTGCAAGGCCAGCTCAAGT
抗-CD20 軽鎖VDメイン
GTAAGTTACATCCACTGGTTCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACC
CTGGATTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCA
GTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAG
GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACC
CACGTTTCGAGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAGTGGAGGTGGCGGAT
>< リンカー
CAGGAGCGGAGGTTCTGGCGGAGGTGGGAGTCAGGTACAACCTGCAGCAG
><
CCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCTTGCAG
抗-CD20 重鎖VDメイン
GGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAAACAGA
CACCTGGTCGGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGT
GATACTTCCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGA
CAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGG
ACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGACTGG
TACTTCAATGTCTGGGGCGCAGGGACACGGTCACCGTCTCTGCAAACTG
><
GGTGAATGTAATAAGTGATTGAAAAAAATGAAGATCTTATTCAATCTA
ヒト IL-15N72D
TGCATATTGATGCTACTTTATATACGAAAGTGATGTTACCCAGTTGC
AAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACT
TGAGTCCGGAGATGCAAGTATTTCATGATACAGTAGAAAAATCTGATCATCC
TAGCAAACGACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGC
AAAGAATGTGAGGAAGTGGAGGAAAAAATATTAAAGAATTTTTCAGAG
TTTTGTACATATTGTCAAATGTTTCATCAACACTTCTTAA
>

【図 5 5 - 1】

図 55-1

ATGGATTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCTGCTAATCAGTGCTTCAGT
< リーダー seq
CATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGT
><
CTGCATCTCCAGGGGAGAGGTCACAATGACTTGCAAGGCCAGCTCAAGT
抗-CD20 軽鎖VDメイン
GTAAGTTACATCCACTGGTTCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACC
CTGGATTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCA
GTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAG
GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACC
CACGTTTCGAGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAGTGGAGGTGGCGGAT
>< リンカー
CCGGAGGTGGAGGTCTCTGGTGGAGGTGGGAGTCAGGTACAACCTGCAGCAG
><
CCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCTTGCAG
抗-CD20 重鎖VDメイン
GGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAAACAGA
CACCTGGTCGGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGT
GATACTTCCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGA
CAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGG
ACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGACTGG
TACTTCTATGTCTGGGGCGCAGGGACACGGTCACMGTTCTCTGCAATCAC
><
GTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCT
ヒト IL-15R α sushi ドメイン
ACAGCTTGTAATCCAGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGT
AAAGCCGGCACGTCACGCTGACGGAGTGGCTGTTGAACAAGGCCACGAA
TGTCGCCCACTGGACAACCCCACTCTCAAATGCATTAGAGAGCCGAAAT
><

【図 5 4】

図 54

qivlsqspailsaspgekvtmtcrasssvsyihwfqqkpgsspkpiyatsnlasgvpvr
< 抗-CD20 軽鎖VDメイン
fsgsgsgtsysltisrveaadaatyycqqtwnpntfpgggtkleiksgggsgggsggg
>< リンカー
gsqvlqppgaelvkgasvkmcsckasytftsnyhmhwkqtpgrglewigaiypngndt
>< 抗-CD20 重鎖VDメイン
synqkfkqkatltadkssstaymqllsstsedsavyyarstyyggdwyfdvwgagttvt
vsanwnvisdlkkiedligsmhidatlytesdvhpckvtamkcfllelqvvislesgda
>< ヒト IL-15N72D
sihdtvenliilandslssngnvtesgckeceeleekneflqsfvhivqmfmints
>

【図 5 5 - 2】

図 55-2

CTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCCTGCCAGCAGCCTGAACTCCTG
ヒト IgG1 CH2-CH3 (Fc) ドメイン
GGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCAT
GATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
AAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCTACCGTGT
GGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAAACC
ATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACACCCCTGCC
CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTGACCTGACCTGCCTGG
TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGAGTCCGACGG
CTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
AGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTTGTTAAATAA
>

【図 5 6】

図 56

qivlsqspailsaspgekvtmtcrasssvsyihwfqqkpgsspkpiyatsnlasgvpvr
< 抗-CD20 軽鎖VDメイン
fsgsgsgtsysltisrveaadaatyycqqtwnpntfpgggtkleiksgggsqgsggg
>< リンカー
gsqvlqppgaelvkgasvkmcsckasytftsnyhmhwkqtpgrglewigaiypngndt
>< 抗-CD20 重鎖VDメイン
synqkfkqkatltadkssstaymqllsstsedsavyyarstyyggdwyfnvwgagttvt
vsaitcoppmvsvehadiwvksylsryeryicnsqfkrkaqtssltecvlnkatnvahwt
>< ヒト IL-15R α sushi ドメイン
tpslkcirepkscdkthtccppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpetvcvvdvs
>< ヒト IgG1 CH2-CH3 (Fc) ドメイン
hedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnka
lpapiektiskakgpprepqvytlppsrdeitknqsvltclvkgyfypsdiawewesngqp
ennyktpvpvldsdgsfflyskltvdksrwqgnvfscsvmhhealnhhytqkslsislpqk
>

【図 57】

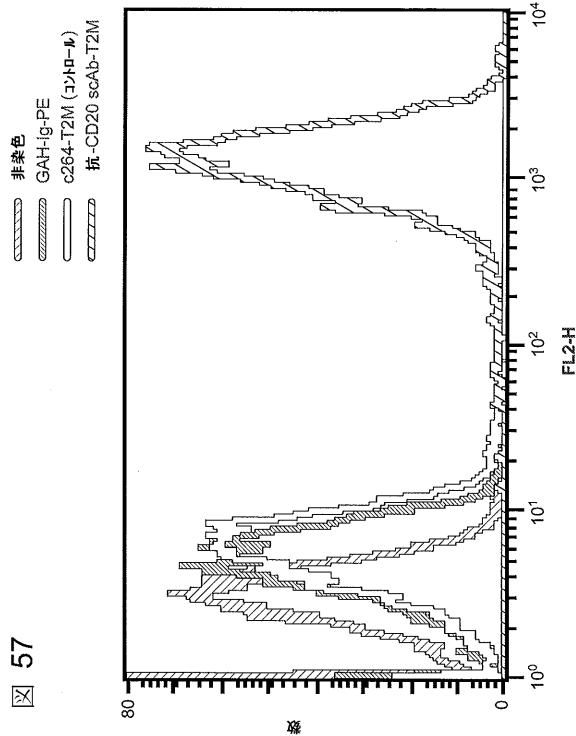
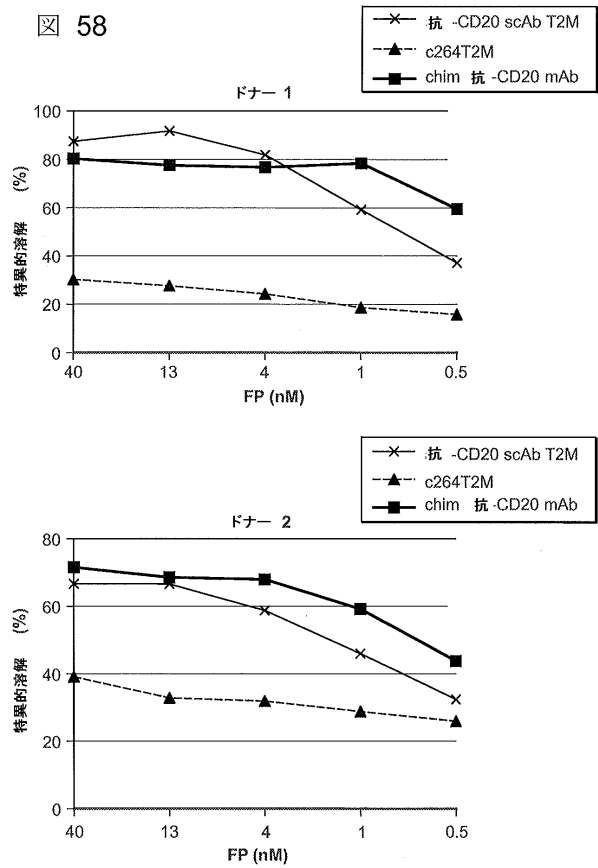
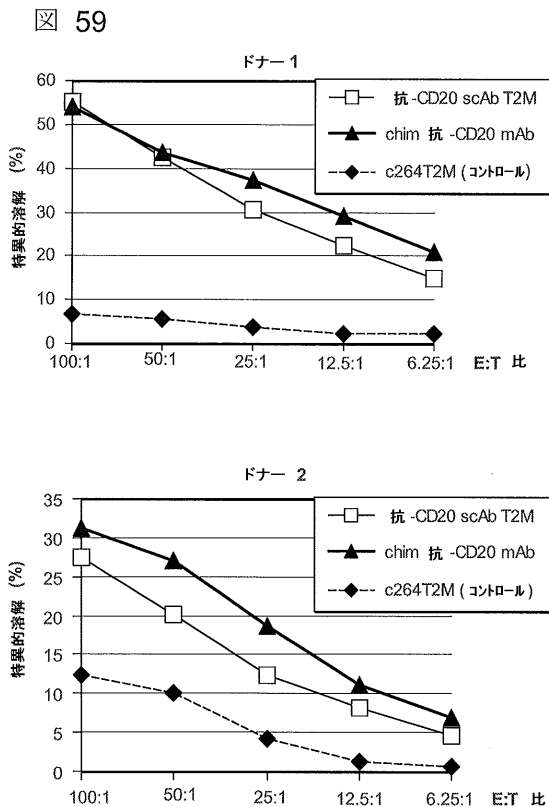


図 57

【図 58】



【図 59】



【図 60】

図 60

ATGGATTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCTCTGCTAATCAGTGCTTCAGT
 < リーダー 配列
 CATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGT
 >>
 CTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGT
 抗-CD20軽鎖V / ヒト カッパ C ドメイン
 GTAAGTTACATCCACTGGTTCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACC
 CTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGTTCA
 GTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAG
 GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACC
 CACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAACGTACGGTGTGTCAC
 CATCTGTCTTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC
 GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT
 ACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTG
 TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
 ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCCAAGT
 CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCTCACAAGAGCTTCAACAGGGGAG
 AGTGTAAGTGGGTGAATGTAATAAGTGATTGAAAAAATTGAAGATCTT
 >>
 ヒト IL-15N7D
 ATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAGTGATGTTCA
 CCCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAG
 TTATTTTCACTTGAGTCCGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAAT
 CTGATCATCTTAGCAAACGACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGA
 ATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAAGTGGAGGAAAAAATATTAAGAAT
 TTTGCAGAGTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTAA
 >

【図 6 1】

図 61

qivlsqspailsaspgekvmtcrasssvsyihwfqqkpgsspkpiyatsnlasgvpvr
 < 抗-CD20軽鎖Vドメイン
 fsgsgsgtsysltisrveadaatyycqqwtsnpptfgggtkleikrtvaapsvfifpps
 ><
 deqlksgtasvvcilnnfypreakvqkwkdnalqsgnsqesvteqdskdstyslstltl
 ヒト カッパ C ドメイン
 skadyekhkvacevthqglsspvtksfnrgecnwvnnvisdlkkiedliqsmhidatlyt
 >< ヒト IL-15N72D
 esdvhpsckvtamkcflllelqvislesgdasihdtvenliilandslssngnvtsgcke
 ceeleeknikeflqsfvhivqmfints
 >

【図 6 2 - 1】

図 62-1

ATGGGTTGGAGTCTCATCTTGCTCTTCCTTGCTGCTGTTGCTACACGTGT
 < リーダー 配列
 CCTGTCCCAGGTACAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTG
 ><
 GGGCCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGT
 抗-CD20重鎖V / ヒト HC CH1 ドメイン
 TACAATATGCACTGGGTAAAACAGACACCTGGTCGGGGCCTGGAATGGAT
 TGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATACTTCTTACAATCAGAAGTTCA
 AAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCTCCAGCACAGCCTACATG
 CAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAG
 ATCGACTTACTACGGCGGTGACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGA
 CCACGGTCACCGTCTCTGCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC
 CTGGCACCCCTCTCCAAGAGCAGCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
 CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAG
 GCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCTCA
 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG
 CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
 TGGACAAGAAAGTTATCAGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCA
 >< ヒト IL-15R α sushi ドメイン
 GACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTG
 TAACTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCAGTCCAGCCTGACGGAGTGCG
 TGTGAAACAAGGCCACGAATGTGCGCCACTGGACAACCCCACTCTCAAA

【図 6 2 - 2】

図 62-2

TGCATTAGAGAGCCCAAACTCTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTG
 >< ヒト IgG1 CH2-CH3 (Fc) ドメイン
 CCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGACCGTCACTCTTCTCTTCCCCCAA
 AACCCAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG
 GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT
 GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
 ACAACAGCAGCTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACACAGGAC
 TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC
 AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
 CACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAG
 GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT
 GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTC
 CCGTGTGGACTCCGACGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTG
 GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA
 TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCTG
 GTAAATAA
 >

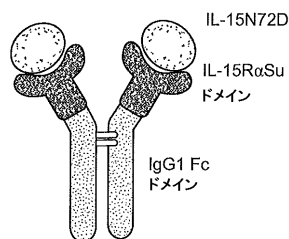
【図 6 3】

図 63

qvqlqppgaelvkgasvkmcsckasgytftsnnmhvkwktpgrglewigaiypngdtsy
 < 抗-CD20重鎖Vドメイン
 nqkfkqkatltadkssstaymqlssltssedsavyyrcarstyyggdwfydwgagttvtvs
 aastkqpsvflpaspsskstsggtaalgclvkdypfpvptvswngaltsgvhtfpavlqs
 >< ヒト IgG1 HC CH1 ドメイン
 sglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnkpsntkvdkkvitcpgppmsvehadiwvksysl
 ><
 ysrreryicnsgfkragtssltecvlnkatnvahwttslkcirepkscdkthtccppcpa
 ヒト IL-15R α sushi ドメイン
 pellggpsvflfppkpkdtlmsrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkp
 ヒト IgG1 CH2-CH3 (Fc) ドメイン
 reeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgpprepqvytl
 ppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflysklt
 vdksrwqggnvfscsvmhcalhnhytqkslspsgk
 >

【図 6 4】

図 64



【図 6 5】

図 65A

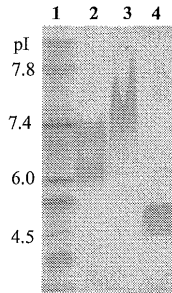


図 65B

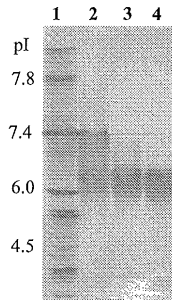


図 65C

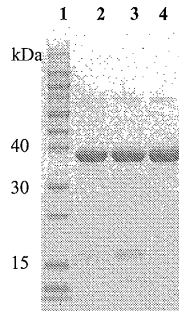
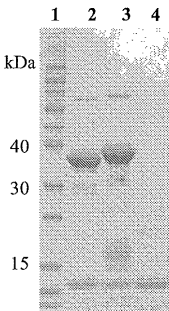
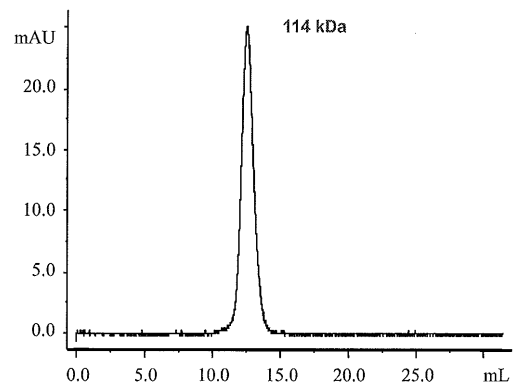


図 65D



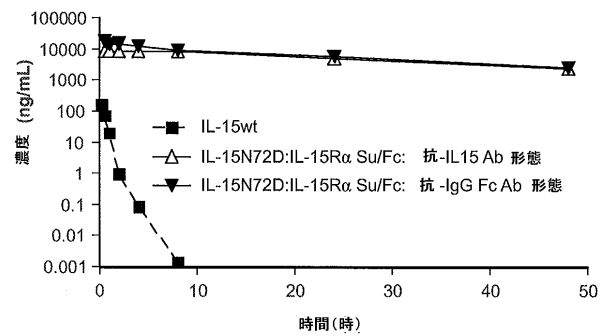
【図 6 6】

図 66



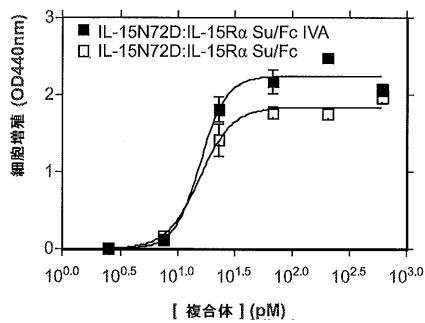
【図 6 7】

図 67



【図 6 8】

図 68



【図 6 9】

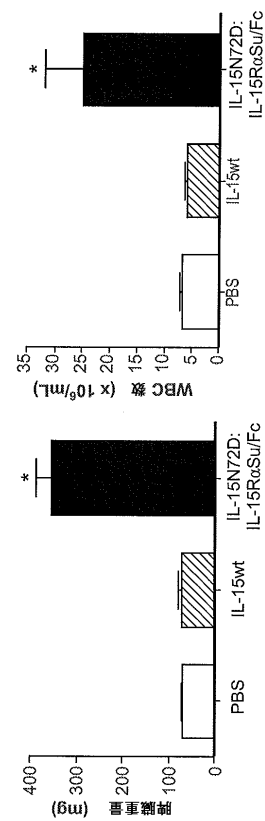
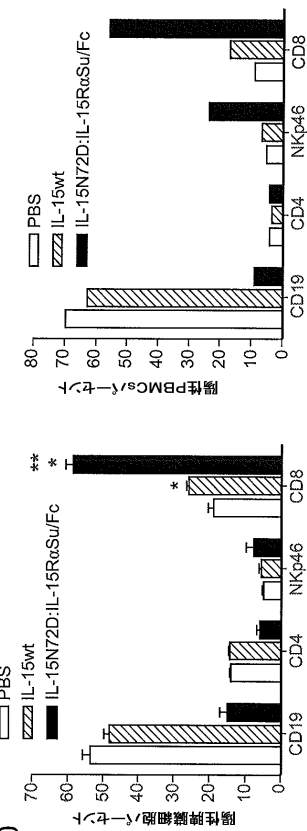


図 69

【図 70】



70

【配列表】

0006251570000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 38/00
A 6 1 K	38/17	(2006.01)	A 6 1 K 38/17
A 6 1 K	38/20	(2006.01)	A 6 1 K 38/20
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12

- (72)発明者 ウォン, ヒン シー .
アメリカ合衆国 フロリダ州 3 3 3 3 2 ウェストン ウェントワース 2 9 6 6
- (72)発明者 ロード, ピーター
アメリカ合衆国 フロリダ州 3 3 1 8 5 マイアミ サウスウェスト・4 2 ンド・レーン 1 4
8 5 7
- (72)発明者 リウ, バイ
アメリカ合衆国 フロリダ州 クーパー・シティ ノースウェスト・3 9 ス・ストリート 9 6 3
1
- (72)発明者 チュー, シャオユン
アメリカ合衆国 フロリダ州 3 3 1 7 6 マイアミ サウスウェスト・1 1 8 ス・ストリート
1 0 3 0 0
- (72)発明者 ハン, カイピン
アメリカ合衆国 フロリダ州 3 3 0 2 5 ミラマー サウスウェスト・2 4 ス・ストリート 1
0 2 3 2

審査官 小林 薫

- (56)参考文献 特表2010-527919(JP, A)
国際公開第2007/001677(WO, A2)
J. Immunol., 2008, Vol.180, No.4, p.2099-2106

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 1 2 N 1 / 0 0 - 5 / 1 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
D W P I (D e r w e n t I n n o v a t i o n)