【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】平成23年3月3日(2011.3.3)

【公表番号】特表2003-518377(P2003-518377A)
【公表日】平成15年6月10日(2003.6.10)
【出願番号】特願2001-548658(P2001-548658)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　14/725　(2006.01)
Ｃ０７Ｋ　14/74　(2006.01)
Ｃ１２Ｑ　1/02　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　33/53　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　33/566　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　33/58　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　5/10　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/00　ＺＮＡＡ
Ｃ０７Ｋ　14/725
Ｃ０７Ｋ　14/74
Ｃ１２Ｑ　1/02
Ｇ０１Ｎ　33/53　Ｄ
Ｇ０１Ｎ　33/566
Ｇ０１Ｎ　33/58　Ｚ
Ｃ１２Ｎ　5/00　Ｂ

【誤訳訂正書】
【提出日】平成22年12月17日(2010.12.17)
【誤訳訂正１】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】全文
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【書類名】　明細書
【発明の名称】　高親和性ＴＣＲタンパク質および方法
【特許請求の範囲】
【請求項１】　リガンドを検出するために高親和性Ｔ細胞レセプター（ＴＣＲ）を使用する方法であって、該方法が、以下：
高親和性ＴＣＲを標識化する工程；
該標識化高親和性ＴＣＲをリガンドと接触させる工程；
標識の存在を検出し、それによって該標識化高親和性ＴＣＲが結合される該リガンドを検出する工程であって、ここで該高親和性ＴＣＲが該リガンドに対して$10^{7}M^{-1}$より大きい解離定数を示す、工程、
を包含する、方法。
【請求項２】　前記高親和性ＴＣＲが前記リガンドに対して$10^{7}M^{-1}$～$10^{10}M^{-1}$の解離定数を示す、請求項１に記載の方法。
【請求項３】　前記リガンドがペプチド／ＭＨＣリガンドである、請求項１に記載の方法。
【請求項４】　前記ペプチド／ＭＨＣリガンドが細胞の表面上にある、請求項３に記載の方法。

【請求項５】　ペプチドがスーパー抗原である、請求項１に記載の方法。
【請求項６】　前記標識が、蛍光化合物、化学発光化合物、放射性同位元素および発色団からなる群より選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項７】　前記高親和性ＴＣＲがＣＤＲにおいて１つ以上の変異を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項８】　前記１つ以上の変異がＣＤＲ３αまたはＣＤＲ３βにおいて存在する、請求項７に記載の方法。
【請求項９】　リガンドに対して高い親和性を有し、該リガンドに対して$10^{7}M^{-1}$より大きい解離定数を示す、可溶性Ｔ細胞レセプター（ＴＣＲ）であって、ここで、該可溶性ＴＣＲがＣＤＲ中に１つ以上の変異を含む、可溶性ＴＣＲ。
【請求項１０】　前記ＴＣＲが前記リガンドに対して$10^{7}M^{-1}$～$10^{10}M^{-1}$の解離定数を示す、請求項９に記載の可溶性ＴＣＲ。
【請求項１１】　前記リガンドがペプチド／ＭＨＣリガンドである、請求項９に記載の可溶性ＴＣＲ。
【請求項１２】　前記リガンドがスーパー抗原である、請求項９に記載の可溶性ＴＣＲ。
【請求項１３】　前記１つ以上の変異がＣＤＲ３αまたはＣＤＲ３βにおいて存在する、請求項９に記載の可溶性ＴＣＲ。
【請求項１４】　選択されたリガンドに対して$10^{7}M^{-1}$より大きい解離定数を示す高親和性ＴＣＲをＴ細胞表面上で発現する、Ｔ細胞であって、ここで、該高親和性ＴＣＲがＣＤＲ中に１つ以上の変異を含む、Ｔ細胞。
【請求項１５】　前記ＴＣＲが前記リガンドに対して$10^{7}M^{-1}$～$10^{10}M^{-1}$の解離定数を示す、請求項１４に記載のＴ細胞。
【請求項１６】　前記リガンドがペプチド／ＭＨＣリガンドである、請求項１４に記載のＴ細胞。
【請求項１７】　前記リガンドがスーパー抗原である、請求項１４に記載のＴ細胞。
【請求項１８】　前記高親和性ＴＣＲがＣＤＲ３αまたはＣＤＲ３βにおいて１つ以上の変異を有する変異体である、請求項１４に記載のＴ細胞。
【請求項１９】　標的細胞の自己免疫破壊をブロックする方法であって、該方法が、該標的細胞の表面上のＴリンパ球によって認識される部位に対して高い親和性を有する可溶性変異体ＴＣＲと、該標的細胞とを接触させ、それにより該標的細胞の自己免疫破壊がブロックされ、ここで該可溶性、高親和性変異体ＴＣＲが該標的細胞の表面上のＴリンパ球によって認識される部位に対して$10^{7}M^{-1}$より大きい解離定数を示す、工程を包含する、方法。
【請求項２０】　前記高親和性変異体ＴＣＲが前記該標的細胞の表面上のＴリンパ球によって認識される部位に対して$10^{7}M^{-1}$～$10^{10}M^{-1}$の解離定数を示す、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】　前記高親和性ＴＣＲがＣＤＲにおいて１つ以上の変異を有する変異体である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２２】　前記高親和性ＴＣＲがＣＤＲ３αまたはＣＤＲ３βにおいて１つ以上の変異を有する変異体である、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】　所望でない細胞を殺傷するための薬学的組成物であって、該組成物が高親和性ＴＣＲを含み、ここで該ＴＣＲが該細胞の細胞表面マーカーに対して高い親和性を有し、そして治療化合物と結合されて、治療ＴＣＲ誘導体を形成し、ここで該高親和性ＴＣＲが該所望でない細胞の細胞表面マーカーに対して$10^{7}M^{-1}$より大きい解離定数を示し、ここで、該高親和性ＴＣＲがＣＤＲ中に１つ以上の変異を含む、組成物。
【請求項２４】　前記高親和性ＴＣＲが前記所望でない細胞の細胞表面マーカーに対して$10^{7}M^{-1}$～$10^{10}M^{-1}$の解離定数を示す、請求項２３に記載の組成物。
【請求項２５】　前記高親和性ＴＣＲがＣＤＲ３αまたはＣＤＲ３βにおいて１つ以上の変異を有する変異体である、請求項２３に記載の組成物。

【請求項２６】　高親和性ＴＣＲを細胞表面上の選択されたペプチド／ＭＨＣリガンドを有する該細胞に結合する方法であって、該方法が、以下：
該選択されたペプチド／ＭＨＣリガンドに対して$10^{7}M^{-1}$より大きい解離定数を示す変異体ＴＣＲを提供する工程；
該高親和性ＴＣＲを標識化する工程；および、
該標識化高親和性ＴＣＲを細胞表面上に１つ以上のペプチド／ＭＨＣリガンドを有する該細胞を含むサンプルと接触させ、該高親和性ＴＣＲを該サンプル中に存在する選択されたペプチド／ＭＨＣリガンドに結合する工程、
を包含する、方法。
【請求項２７】　前記変異体ＴＣＲが前記選択されたペプチド／ＭＨＣリガンドに対して$10^{7}M^{-1}$～$10^{10}M^{-1}$の解離定数を示す、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】　前記変異体ＴＣＲがＣＤＲにおいて１つ以上の変異を有する、請求項２６に記載の方法。
【請求項２９】　前記変異体ＴＣＲがＣＤＲ３αまたはＣＤＲ３βにおいて１つ以上の変異を有する、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】　Ｔ細胞の表面上に高親和性ＴＣＲ変異体の発現を可能にする系に、該高親和性ＴＣＲ変異体についての遺伝子をクローニングする方法であって、以下：
ＴＣＲを変異させて、ＴＣＲの同族リガンドに対して少なくとも$10^{7}M^{-1}$の解離定数を示す高親和性ＴＣＲ変異体を作製する工程；
該ＴＣＲ変異体をベクターにクローニングする工程；
該ベクターをＴ細胞にトランスフェクトする工程；および
該Ｔ細胞の表面上に該高親和性ＴＣＲ変異体を発現する工程、
を包含する、方法。
【請求項３１】　前記トランスフェクトされたＴ細胞が選択されたペプチド保有ＭＨＣ細胞の認識のために使用される、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】　前記高親和性ＴＣＲ変異体がＣＤＲにおいて１つ以上の変異を有する、請求項３０に記載の方法。
【請求項３３】　前記高親和性ＴＣＲ変異体がＣＤＲ３αまたはＣＤＲ３βにおいて１つ以上の変異を有する、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】　請求項３０の方法によって作製される、Ｔ細胞。
【請求項３５】　変異体高親和性ＴＣＲの同族リガンドに対して$10^{7}M^{-1}$より大きい解離定数を示す該変異体高親和性ＴＣＲをコードする、ＤＮＡ配列であって、ここで、該変異体高親和性ＴＣＲがＣＤＲ中に１つ以上の変異を含む、ＤＮＡ配列。
【請求項３６】　前記ＴＣＲ変異体が該ＴＣＲ変異体同族リガンドに対して$10^{7}M^{-1}$～$10^{10}M^{-1}$の解離定数を示す、請求項３５に記載のＤＮＡ配列。
【請求項３７】　前記ＴＣＲ変異体がＣＤＲ３αまたはＣＤＲ３βにおいて１つ以上の変異を有する、請求項３５に記載のＤＮＡ配列。
【請求項３８】　治療化合物に結合された可溶性の高親和性単鎖ＴＣＲを含む、治療ＴＣＲ誘導体であって、ここで、該可溶性の高親和性単鎖ＴＣＲが、その同族のリガンドに対して$10^{7}M^{-1}$より大きい解離定数を示し、ここで、該可溶性の高親和性ＴＣＲがＣＤＲ中に１つ以上の変異を含む、治療ＴＣＲ誘導体。
【請求項３９】　前記治療化合物が抗癌剤、治療放射性核種または細胞傷害性タンパク質である、請求項３８に記載の治療ＴＣＲ誘導体。
【請求項４０】　前記可溶性の高親和性ＴＣＲが病原体に感染した細胞に特異的に結合する、請求項３８に記載の治療ＴＣＲ誘導体。
【請求項４１】　前記治療化合物が、病原体に対して有毒である分子である、請求項４０に記載の治療ＴＣＲ誘導体。
【請求項４２】　高親和性ＴＣＲ変異体を発現するベクターで形質転換されたＴ細胞であって、ここで該形質転換されたＴ細胞が野生型Ｔ細胞よりもより大きな程度で活性化され得、ここで、該高親和性ＴＣＲ変異体が選択されたリガンドに対して$10^{7}M^{-1}$よ

り大きい解離定数を示し、ここで、該高親和性ＴＣＲ変異体がＣＤＲ中に１つ以上の変異を含む、Ｔ細胞。

【請求項４３】　細胞の表面上の特異的ペプチド／ＭＨＣリガンドを検出する診断プローブであって、該プローブが該特異的ペプチド／ＭＨＣリガンドに結合する検出可能に標識化された高親和性ＴＣＲを含み、ここで、該検出可能に標識化された高親和性ＴＣＲが特異的ペプチド／ＭＨＣリガンドに対して$10^{7}M^{-1}$より大きい解離定数を示し、ここで、該検出可能に標識化された高親和性ＴＣＲがＣＤＲ中に１つ以上の変異を含む、プローブ。

【請求項４４】　病原体を不活化するための高親和性ＴＣＲを含む薬学的組成物であって、該高親和性ＴＣＲが該病原体に対して有毒である分子に結合され、ここで、該高親和性ＴＣＲが該分子に対して$10^{7}M^{-1}$より大きい解離定数を示し、ここで、該高親和性ＴＣＲがＣＤＲ中に１つ以上の変異を含む、薬学的組成物。

【請求項４５】　前記病原体が、以下：
ウイルス、細菌および原生生物
からなる群より選択される、請求項４４に記載の組成物。

【請求項４６】　前記検出工程が、フローサイトメトリーによって実行される、請求項１に記載の方法。

【請求項４７】　薬学的キャリア中に高親和性ＴＣＲを含む、薬学的組成物であって、ここで、該高親和性ＴＣＲがリガンドに対して$10^{7}M^{-1}$より大きい解離定数を示し、ここで、該高親和性ＴＣＲがＣＤＲ中に１つ以上の変異を含む、薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

（関連出願の相互参照）

本願は、米国特許第０９／００９，３８８号（１９９８年１月２０日出願）の一部継続である。本願は、米国予備出願第６０／１６９，１７９号（１９９９年１２月６日出願）の利益を主張する。

【０００２】

（連邦政府の研究支援の承認）

本発明は、少なくとも一部分、国立衛生研究所からの財政的支援でなされた。従って、米国政府は、本発明に特定の権利を有する。

【０００３】

（発明の背景）

本発明の分野は、分子生物学であり、詳細には、組換え宿主細胞の細胞表面上に提示された免疫細胞レセプターのコンビナトリアルライブラリーの場合に関する。より詳細には、本発明は、組換え酵母細胞の表面上に提示された高い親和性のＴ細胞レセプタータンパク質のライブラリー、可溶性の高い親和性のＴＣＲレセプタータンパク質、特定のペプチド／ＭＨＣ対への高い親和性の結合に関して選択された高い親和性のＴＣＲタンパク質、ＭＨＣ決定基の非存在下における特定の抗原への結合に関して選択された高い親和性のＴＣＲタンパク質、ならびに数ある適用の中で診断方法および画像化アッセイにおける選択された高い親和性のＴＣＲ誘導体の使用に関する。

【０００４】

Ｔ細胞レセプター（ＴＣＲ）および抗体は、異なるクラスのリガンドを認識するために開発されている。抗体は、可溶性抗原に結合する膜結合かつ可溶性タンパク質として機能し、一方、天然において、ＴＣＲは、細胞関連ペプチド／ＭＨＣ抗原に結合する膜結合分子としてのみ機能する。抗体：抗原相互作用の全エネルギーは、外来抗原にのみ集中しているが、ＴＣＲ：ペプチド／ＭＨＣ相互作用のエネルギーのうちの実質的な画分は、自己ＭＨＣ分子に指向されるようである［Ｍａｎｎｉｎｇら（１９９８）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　８：４１３：４２５］。さらに、抗体は、体細胞変異および親和性成熟のプロセスに大きく起因して、ＴＣＲのものよりも高い位の大きさであるリガンド－結合親和性を有し得る。その正常な細胞の状況において、ＴＣＲは、体細胞変異を引起さず、そして胸腺選択の

プロセスは、親和性の狭いウィンドウを維持することによって操作されるようである［Ａｌａｍら（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ　３８１：６１６－６２０］。細胞表面におけるＴＣＲのアクセサリー分子ＣＤ４またはＣＤ８との関連はまた、ＴＣＲの機能的な親和性に影響を及ぼし得る［Ｇａｒｃｉａら（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ　３８４：５７７－５８１］。これらの差異にもかかわらず、２つのタンパク質の３次元構造は、顕著に類似し、抗原と接触する分子の単一表面上に超可変領域形成ループを有する。

【０００５】

これらの構造類似性に基づいて、異種発現系においてＴＣＲおよび抗体の細胞外ドメインの、可溶性かつ表面提示形態の産生を成功させることに有意な差異が存在したことは、いくらか驚くべきである。多くの抗体は、現在、インタクトもしくはＦａｂフラグメント形態としてか、または単鎖（ｓｃ）フラグメント－可変（Ｆｖ）タンパク質としてかのいずれかで、高収率かつ可溶性で発現されている。さらに、新規に単離され、そして／またはファージディスプレイ技術（より最近では、酵母－ディスプレイ技術）の使用を介して改善された、多数の抗原結合Ｆｖフラグメントが存在する［ＢｏｄｅｒおよびＷｉｔｔｒｕｐ（１９９７）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１５：５５３－５５７；Ｋｉｅｋｅら（１９９７）Ｐｒｏｔ．Ｅｎｇ．１０：１３０３－１３１０］。抗体フラグメントに関するこれらの発現系は、構造研究ならびに診断抗体および治療抗体の設計に重要である。

【０００６】

対照的に、数個のＴＣＲ分子の３次元構造は、可溶性で相当折り畳まれたＴＣＲの発現に対するかなりの努力のあとにのみ決定された［ＢｅｎｔｌｅｙおよびＭａｒｉｕｚｚａ（１９９６）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４：５６３－５９０］。ＦａｂとＴＣＲとの間の基礎を探求することにおける困難のうちの１つは、抗体における大量の配列多様性であり、そしてＴＣＲ可変（Ｖ）領域は、どの特徴のＶ領域が抗原結合以外の機能（例えば、Ｖ領域の対形成および結合動力学、可溶性、ならびに折り畳み）に重要であるかを識別するための努力を複雑にする。これらの性質に関して、ＴＣＲのＶ領域および抗体を比較する研究は、相対的にほとんどない。

【０００７】

それにもかかわらず、マウスＴ細胞クローン２Ｃ由来のＴＣＲは、現在、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉにおいてｓｃＶ$_{\alpha}$Ｖ$_{\beta}$（ｓｃＴＣＲ）として［Ｓｏｏ　Ｈｏｏら（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９：４７５９－４７６３］、骨髄腫細胞から脂質連結Ｖ$_{\alpha}$Ｃ$_{\alpha}$Ｖ$_{\beta}$Ｃ$_{\beta}$二量体として［ＳｌａｎｅｔｚおよびＢｏｔｈｗｅｌｌ（１９９１）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２１：１７９－１８３］、および昆虫細胞から分泌Ｖ$_{\alpha}$Ｃ$_{\alpha}$Ｖ$_{\beta}$Ｃ$_{\beta}$二量体として［Ｇａｒｃｉａら（１９９６）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７４：２０９－２１９］発現されている。２Ｃ　ｓｃＴＣＲは、ほとんどのｓｃＦｖと比較して、相対的に低い可溶性を有するが、その可溶性は、アミノ末端のチオレドキシンへの融合によって約１０倍増加する［Ｓｃｈｏｄｉｎら（１９９６）Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３３：８１９－８２９］。可溶性で相当折り畳まれたＶ$_{\alpha}$Ｖ$_{\beta}$ドメインを産生することにおける困難は、他のＴＣＲに対して拡大されている［Ｕｄａｋａら（１９９３）前出；Ｓｙｋｕｌｅｖら（１９９４）前出；Ｍａｎｎｉｎｇら（１９９８）前出］。可溶性または表面提示能力のいずれかにおけるＴＣＲとＦｖとの間の明らかな差異に関する分子説明は、適切に探査されていない。２ＣｓｃＴＣＲが、Ｖ$_{\alpha}$／Ｖ$_{\beta}$界面またはＣＤ３$_{\varepsilon}$シグナル伝達サブユニットと相互作用することが疑われるＶ$_{\beta}$フレームワークの領域における特定の単一部位変異の、ランダムなライブラリーからの選択後に、酵母表面ディスプレイシステムで発現され得ることが示された。これらの変異（これらのうちのいくつかは、抗体Ｖ領域に天然に見出される）は、ＴＣＲ中のこれらの位置の重要性を反映し、ＴＣＲ結合特性のさらなる操作に関する基礎を提供する。

【０００８】

（発明の要旨）

本発明は、組換え宿主細胞、例えば、酵母細胞（望ましくはＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）の表面上に提示された免疫Ｔ細胞レセプターポリペプチドの

コンビナトリアルライブラリーを提供する。このようなライブラリーから、高い親和性のＴＣＲポリペプチド（同族のリガンド：主要組織適合遺伝子複合体のタンパク質（ｐＭＨＣ）に結合するペプチドの複合体に関して、野生型よりも高い親和性を示すもの）が単離され得る。望ましくは、ｐＭＨＣに対するＴＣＲペプチドの親和性は、例えば、当該分野で公知の方法によって測定される場合、約10^{7}～約10^{10}の解離定数に反映される。可溶性の高い親和性のＴＣＲをコードする核酸を含むＤＮＡライブラリーが提供され、ここで、このＴＣＲは、変異体ＴＣＲコード配列を作製するためのＴＣＲを変異誘発すること；変異体ＴＣＲの変異体ＴＣＲコード配列を含むＤＮＡを酵母細胞に形質転換すること；この変異体ＴＣＲが酵母細胞の表面上に提示されるようにこの変異体ＴＣＲコード配列の発現を誘導すること；この酵母細胞を、ペプチド／ＭＨＣリガンドを結合する蛍光標識と接触して、選択された酵母細胞を産生すること；および、最も高い蛍光を示す酵母細胞を単離する、方法によって作製される。野生型Ｔ細胞レセプタータンパク質よりもペプチド／ＭＨＣリガンドに対して高い親和性を有する、酵母細胞の表面上に提示されたＴ細胞レセプタータンパク質のライブラリーがまた、提供され、ここで、このライブラリーは、Ｔ細胞レセプタータンパク質コード配列を変異誘発して変化に富むＴ細胞レセプタータンパク質コード配列変異体の集団を作製すること；このＴ細胞レセプター変異体コード配列を、酵母細胞に形質転換すること；酵母細胞の表面上でこのＴ細胞レセプター変異体コード配列の発現を誘導すること；そして、野生型Ｔ細胞レセプタータンパク質よりもペプチド／ＭＨＣリガンドに対して高い親和性を有する、Ｔ細胞レセプター変異体を発現する細胞が選択することによって形成される。

【０００９】

本発明はさらに、同族リガンドに対して高い親和性の結合を示すＴＣＲタンパク質（細胞結合形態でかまたは可溶性形態で）を提供する。本発明において、ＴＣＲタンパク質が結合するリガンドは、ペプチド／ＭＨＣ複合体であるか、または選択プロセス（望ましくは、繰り返された選択プロセス）に起因して、このリガンドは、ＭＨＣ成分（例えば、スーパー抗原）を含まないリガンドであり得る。このリガンドは、とりわけ、ペプチド、タンパク質、炭水化物部分、または脂質部分であり得る。これらの可溶性の高い親和性のＴＣＲは、変異体ＴＣＲコード配列を作製するためにＴＣＲを変異誘発する工程；変異体ＴＣＲのための変異体ＴＣＲコード配列を含むＤＮＡを酵母細胞に形質転換する工程；この変異体ＴＣＲが酵母細胞の表面上に提示されるように、この変異体ＴＣＲコード配列の発現を誘導する工程；この酵母細胞を、ペプチド／ＭＨＣリガンドに結合する蛍光標識と接触して、選択された酵母細胞を生成する工程；および、最も高い蛍光を示す酵母細胞を単離する工程を包含する方法によって作製され得る。この可溶性の高い親和性のＴＣＲは、好ましくは酵母ディスプレイによって単離される。

【００１０】

本発明はさらに、高い親和性のＴＣＲタンパク質の同族リガンドを検出するための方法を提供し、この方法は、高い親和性のＴＣＲタンパク質を同族リガンドと結合させる工程を包含し、ここで、この高い親和性のＴＣＲタンパク質が検出可能に標識化されるか、または添加される二次的な検出可能なタンパク質（例えば、同族リガンドに結合する領域以外の領域においてＴＣＲに特異的な抗体）が存在する。リガンドを同定するために高い親和性のＴＣＲを用いるための好ましい方法は：高い親和性のＴＣＲを検出可能な標識で標識化する工程；この標識化ＴＣＲをリガンドと接触する工程；標識化ＴＣＲが結合するリガンドを同定する工程を包含する。好ましくは、このリガンドは、野生型ＴＣＲよりも高い親和性でＴＣＲに結合するペプチド／ＭＨＣリガンドである。このリガンドを同定する方法は、当業者に公知である。直接または間接的に、ＴＣＲタンパク質の検出を可能にする適切な標識としては、蛍光化合物、化学発光化合物、放射性同位体、発色団などが挙げられるが、これらに限定されない。

【００１１】

高い親和性のＴＣＲタンパク質は、医学、獣医学もしくは植物の診断設定における標的リガンドの定性測定および定量測定のための手段としてか、または組織材料もしくは植物

材料の同定のために、実験室で使用され得る。同様に、本発明の高い親和性のＴＣＲは、標的材料またはリガンドの検出および／または定量のための試薬として使用され得る。選択されたペプチド／ＭＨＣリガンドに結合する高い親和性のＴＣＲを用いる方法がまた、提供され、この方法は、この高い親和性のＴＣＲをこの選択されたペプチド／ＭＨＣリガンドに結合する標識で標識化する工程；この標識化された高い親和性のＴＣＲをＭＨＣ分子を含む細胞と接触させる工程を包含する。本発明の高い親和性のタンパク質（ここで、このタンパク質は、高い親和性および特異性で腫瘍細胞抗原に特異的に結合する）は、特定の癌の型の診断試験に使用され得るか、または生物（好ましくは、哺乳動物、そしてまた好ましくは、ヒト）において、腫瘍の位置を確認するためならびに／または腫瘍のサイズおよび数を概算するための画像化試験の際に生物で使用され得る。診断試験のためにｐＭＨＣに結合する高い親和性のＴＣＲを用いるための方法が提供され、この方法は、高い親和性のＴＣＲを検出可能な標識で標識化する工程；この高い親和性のＴＣＲが高い親和性を有するリガンドを含む細胞と、この高い親和性のＴＣＲを接触させる工程；およびこの標識を検出する工程を包含する。この方法において、標識は、特定のペプチド／ＭＨＣリガンドに結合するために選択され得、これによって、特定のペプチド／ＭＨＣリガンドを発現する細胞が、標的化される。細胞表面上で特定のペプチド／ＭＨＣ分子に対する診断プローブとして高い親和性のＴＣＲを用いるための好ましい方法は：高い親和性のＴＣＲを、特定のペプチド／ＭＨＣリガンドに結合する検出可能な標識で標識化する工程；このＴＣＲを細胞と接触する工程；およびこの標識を検出する工程を包含する。特定の使用に依存した使用のために選択された検出可能な標識、および適切なの選択は、関連分野の当業者の十分に範囲内である。一般的に、目的のリガンドに対する高い親和性結合に関して選択されたＴＣＲタンパク質は、このリガンドに特異的な抗体が使用され得る方法（ＴＣＲ　対　抗体タンパク質に対して手順の改変がなされ、このような改変は、当該分野で公知である）に使用され得る。

【００１２】

高い親和性のＴＣＲ、望ましくは可溶性単鎖（ｓｃ）ＴＣＲは、自己免疫疾患における細胞または組織の自己免疫破壊をブロックするために使用され得、ここで、標的細胞の表面上で細胞傷害性リンパ球によって認識される部位は、高い親和性のＴＣＲによって結合される部位と同じである。細胞の自己免疫破壊をブロックするための好ましい方法は、標的細胞の表面上でＴリンパ球によって認識される部位に高い親和性を有するＴＣＲを、細胞と接触させる工程を包含し、これによって、細胞の自己免疫破壊がブロックされる。

【００１３】

可溶性の、高い親和性のｓｃＴＣＲは、治療化合物（例えば、制癌化合物、治療放射性核種または細胞傷害性タンパク質）に結合され得、ここで、ｓｃＴＣＲの同族のリガンドは、新生物形成細胞表面マーカーである。あるいは、高い親和性の可溶性ｓｃＴＣＲの結合特異性は、病原体感染された標的細胞であり得（例えば、ウイルス、細菌、または原生動物感染された標的細胞）、そして、標的細胞が感染因子のさらなる複製無しに排除され得るように毒性分子が結合され得る。不活性病原体に対して高い親和性のＴＣＲを使用する提供された方法は：この病原体に毒性である分子を、高い親和性のＴＣＲに結合させる工程；およびこの病原体を発現する細胞と、このＴＣＲを接触させる工程を包含する。「毒性」は、病原体が病原体の複製を回避または阻害することを意味する。

【００１４】

疾患を処置するために高い親和性のＴＣＲを使用するための方法がまた提供され、この方法は：新生物形成細胞表面マーカーに対して高い親和性を有するＴＣＲを、治療化合物と結合させる工程：およびこのＴＣＲを細胞と接触させる工程を包含する。ＴＣＲと結合され得る、疾患の進行を遅延する際に有用である任意の治療化合物が、使用され得る。治療化合物をＴＣＲと結合する方法は、当該分野で公知である。

【００１５】

高い親和性のＴＣＲ変異体に対する遺伝子を、Ｔ細胞の表面上で変異体の発現を可能にするシステムにクローニングするための方法がまた、提供され、この方法は：高い親和性

のＴＣＲ変異体を作製するためにＴＣＲを変異させる工程；このＴＣＲ変異体をベクターにクローニングする工程；このベクターをＴ細胞にトランスフェクトする工程；高い親和性のＴＣＲ変異体をＴ細胞の表面上に発現させる工程を包含する。この方法は、さらに：ペプチド／ＭＨＣリガンドによって他のＴ細胞よりも大きな程度に活性化されるＴ細胞を選択する工程を包含する。トランスフェクト／感染されたＴ細胞は、選択されたペプチド保有ＭＨＣ細胞の認識に有用であり得る。これらのトランスフェクト／感染されたＴ細胞は、患者の疾患を処置する際に有用であり、ここで、患者由来のＴ細胞は、取り出され、そして高い親和性のＴＣＲ変異体を発現するベクターで形質転換され、そしてこの患者に戻される（ここで、このＴ細胞は、患者の野生型Ｔ細胞よりも、ペプチド／ＭＨＣリガンドによって大きな程度に活性化される）。

【００１６】

可溶性の高い親和性のＴＣＲ分子は、関連分野の当業者に容易に明らかであるように、ほとんどの適用に対して抗体または単鎖抗体の代わりに使用され得る。

【００１７】

（好ましい実施形態の詳細な説明）

明細書および特許請求の範囲（このような用語に対して与えられる範囲を含む）の明瞭なそして一貫した理解を提供するために、以下の定義が提供される。

【００１８】

コード配列は、タンパク質のアミノ酸配列についてコードするか、またはｔＲＮＡまたはｒＲＮＡのような機能的なＲＮＡについてコードする遺伝子またはｃＤＮＡの一部である。

【００１９】

相補体または相補的な配列は、ワトソン－クリック塩基対形成法則に従う別の配列のヌクレオチドと水素結合した二重鎖を形成するヌクレオチドの配列を意味する。例えば、５’－ＡＡＧＧＣＴ－３’についての相補的な塩基配列は、３’－ＴＴＣＣＧＡ－５’である。

【００２０】

下流は、ＤＮＡまたはＲＮＡにおける任意の部位の３’側を意味する。

【００２１】

発現は、構造的なＲＮＡ（ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ）またはメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）への遺伝子の転写および引き続くｍＲＮＡのタンパク質への翻訳をいう。

【００２２】

具体的に例示されたＴＣＲ配列に機能的に等価であるアミノ酸配列は、単一または複数のアミノ酸置換によって、アミノ酸の付加および／または欠失によって、改変されたアミノ酸配列をいい、ここで、１つ以上のアミノ酸は化学的に改変されているが、それにも関わらず、本発明の細胞結合または可溶性ＴＣＲタンパク質の結合特異性および高い親和性結合活性を保持する。機能的に等価なヌクレオチド配列は、具体的に例示された細胞結合または可溶性ＴＣＲタンパク質と同一の生物学的活性を実質的に有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列である。本発明の状況において、可溶性ＴＣＲタンパク質は、ネイティブな細胞結合ＴＣＲの一部を欠き、そして、溶液中で安定である（すなわち、それは、本明細書中で記載されるように処理される場合、そしてタンパク質溶液についての標準的な条件下で、一般的に溶液中で凝集しない）。

【００２３】

２つの核酸配列は、これらの配列が別々の生物に由来する場合、このような生物が異なった種であろうとなかろうと、これらの配列が、同一の生物において同一の配列中で天然に存在しない限り、お互いに異種である。

【００２４】

相同性は、２つのヌクレオチド間またはアミノ酸配列間の同一性の程度をいう。

【００２５】

単離されたは、天然の状態からヒトの手によって変更されることを意味する。「単離さ

れた」組成物または物質が天然に存在する場合、それは、その本来の環境から変化されるかまたは取り出されるか、あるいはその両方である。例えば、生きている動物に天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されていないが、その用語が本明細書中で使用される場合、天然の状態で共存する物質から分離された同一のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されている。

【００２６】

リンカー領域は、タンパク質の２つの機能的または構造的ドメインを作動可能に連結するアミノ酸配列である。

【００２７】

核酸構築物は、天然に存在する遺伝子から単離されたか、他に天然に存在しない様式で組み合わされそして並列された核酸のセグメントを含むように改変された核酸分子である。

【００２８】

核酸分子は、３’－５’－リン酸ジエステル結合によって結合されたデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのいずれかを含む単一または二重鎖の直鎖状ポリヌクレオチドを意味する。

【００２９】

２つのＤＮＡ配列は、連結の性質が、それらの配列がお互いに対してそれらの正常な機能をもたらす能力を妨げない場合、作動可能に連結されている。例えば、プロモーター領域は、このプロモーターがコード配列の転写をもたらし得る場合、コード配列に作動可能に連結されている。

【００３０】

ポリペプチドは、ペプチド結合によって連結されているアミノ酸の直鎖状ポリマーである。

【００３１】

プロモーターは、シス作用ＤＮＡ配列を意味し、一般的に８０～１２０塩基対長であり、そして遺伝子の開始部位の上流に位置し、これに対してＲＮＡポリメラーゼは、結合し得そして正確な転写を開始する。転写調節の開始／終了調節を提供しそして／または下流のコード配列の発現を増強する（増加する）さらなる転写調節配列に関連し得る。

【００３２】

組換え核酸分子（例えば、組換えＤＮＡ分子）は、２つ以上の非相同性ＤＮＡ分子の連結を介してインビトロで形成された新規の核酸配列である（例えば、少なくとも１つのブローニング部位にクローン化された外来のＤＮＡの１つ以上のインサートを含む組換えプラスミド）。

【００３３】

形質転換は、異なった遺伝子型の別の細胞由来の精製された組換えＤＮＡの外部適用によってゲノムまたは細胞の方向付けられた改変を意味し、被験体細胞のゲノム中へのその取り込みおよび組み込みを生じる。細菌においては、この組換えられたＤＮＡは、代表的には細菌の染色体には組み込まれないが、その代わりに、プラスミドとして自律的に複製する。

【００３４】

上流は、ＤＮＡまたはＲＮＡ中の任意の部位の５’側を意味する。

【００３５】

ベクターは、宿主細胞中で自律的に複製可能でありそして外来ＤＮＡを受け入れ可能である核酸分子である。ベクターは、複製の自分自身の起源、外来ＤＮＡの挿入について使用され得る制限エンドヌクレアーゼについての１つ以上の独特の制限部位、そして通常抗生物質耐性をコードする遺伝子のような選択マーカー、およびしばしば挿入されたＤＮＡの発現のための認識配列（例えば、プロモーター）を保有する。一般的なベクターとしては、プラスミドベクターおよびファージベクターが挙げられる。

【００３６】

高い親和性Ｔ細胞レセプター（ＴＣＲ）は、野生型ＴＣＲよりもより強力に標的リガンドへ結合する操作されたＴＣＲを意味する。

【００３７】

Ｔ細胞は、αβヘテロ二量体Ｔ細胞レセプター（ＴＣＲ）を介したＭＨＣ産物に結合された外来ペプチドを認識する。ＴＣＲレパートリーは、抗体重鎖および軽鎖遺伝子において使用される同一の遺伝子再配列機構によって作製された広範な多様性を有する［Ｔｏｎｅｇａｗａ，Ｓ．（１９８８）Ｂｉｏｓｃｉ．Ｒｅｐ．８：３－２６］。多様性の大部分は、αおよびβ鎖の相補性決定領域３（ＣＤＲ３）をコードする可変（Ｖ）および連結（Ｊ）（または、多様性、Ｄ）領域の接合部において作成される［ＤａｖｉｓおよびＢｊｏｒｋｍａｎ（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ　３３４：３９５－４０２］。しかし、ＴＣＲは、抗体が体細胞点変異を生じるようには、おそらく同時には、体細胞点変異を起さない。ＴＣＲはまた、抗体と同一の程度の親和性変異を起こさない。ＴＣＲは、天然に存在するように、10^5から$10^6 M^{-1}$まで変化する親和性を有するようであり、これに対して、抗体は代表的に、10^5から$10^9 M^{-1}$まで変化する親和性を有する［Ｄａｖｉｓら、（１９９８）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６：５２３－５４４；Ｅｉｓｅｎら、（１９９６）Ａｄｖ．Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃｈｅｍ．４９：１－５６］。ＴＣＲにおける体細胞変異の非存在は、より低い親和性に関連し得るが、ＴＣＲがより高い親和性を有する選択的な利点が存在しないことがまた議論されている。実際、Ｔ細胞活性化の連続的に引き起こす［Ｖａｌｉｔｕｔｔｉら（１９９５）Ｎａｔｕｒｅ　３７５：１４８－１５１］および速度論的校正［Ｒａｂｉｎｏｗｉｔｚら（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．ＵＳＡ　９３：１４０１－１４０５］モデルは共に、より長いオフレート（ｏｆｆ－ｒａｔｅ）（より高い親和性と関連した）はシグナル伝達プロセスに有害であることを示唆する。より高い親和性ＴＣＲは、Ｔ細胞応答について必要なペプチド特異性を維持し得ないこともまたありうる。例えば、ＭＨＣの溝内に結合されたペプチドは、制限されたアクセス可能な表面を示し［Ｂｊｏｒｋｍａｎ，Ｐ．Ｊ．（１９９７）Ｃｅｌｌ　８９：１６７－１７０］、これは、代わりに、相互作用おいて生成され得るエネルギーの量を制限し得る。他方、ＭＨＣへリックスに対してエネルギーを向けることによって、ＴＣＲの親和性を上昇することは、おそらくネガティブな選択の間の胸腺欠失を生じる［Ｂｅｖａｎ，Ｍ．Ｊ．（１９９７）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　７：１７５－１７８］。

【００３８】

我々は、Ｔ細胞レセプタータンパク質のより高い親和性に対する固有な構造特性または遺伝的制限は存在しないことを示す。より高い親和性ＴＣＲ変異体は、酵母ディスプレイコンビナトリアル技術およびＴＣＲ変異体（例えば、ＶαおよびＶβＣＤＲ３変異体）を使用することによって、インビボ選択圧力の非存在下で、生成される。標的リガンドに対する比較的強力な結合について選択された変異体（特定のｐ／ＭＨＣ複合体）は、１００倍以上高い親和性（すなわち、ｐ／ＭＨＣについて約１０ｎＭのK_d）を有し得、そして、これらの変異体は、高度のペプチド特異性を保持した。プロリンまたはグリシンが豊富な保存されたＣＤＲ３モチーフを有するＴＣＲタンパク質についての強力な優先性がまた明らかである。高い親和性ＴＣＲの可溶性単量体形態は、抗原提示細胞上のｐ／ＭＨＣ複合体を直接検出可能であった。これらの発見は、ＴＣＲの親和性成熟が、少なくともインビトロで可能であることを証明する。従って、操作されたＴＣＲタンパク質は、特定のリガンドを標的化するために使用され得、これらとしては、ＭＨＣ成分の非存在下において特定のｐ／ＭＨＣ複合体およびペプチド、タンパク質または他のリガンドが挙げられる。

【００３９】

ペプチド特異性を保持するより高い親和性のＴＣＲを作製することが可能か否かを試験するために、本発明者らは、特徴付けられたＴＣＲを、指向性インビトロ進化のプロセスに供した。ファージディスプレイ技術［Ｃｌａｃｋｓｏｎら（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ　３５２：６２４－６２８］は、抗体とＴＣＲ　Ｖ領域との間の広範囲な構造的類似性にもかかわらず、単鎖ＴＣＲ（ｓｃＴＣＲ、Ｖβ－リンカー－Ｖα）の操作における成功はまだ証明されていない。しかし、本発明者らは、ｓｃＴＣＲが、抗体操作において首尾良い

ことが証明された系［ＢｏｄｅｒおよびＷｉｔｔｒｕｐ（１９９７）（前出）；Ｋｉｅｋｅら（１９９７）前出］において、酵母の表面上に提示され得る［Ｋｉｅｋｅら（１９９９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９６：５６５１－５６５６］ということを近年示した。ＣＴＬクローン２Ｃ由来のｓｃＴＣＲの温度安定化改変体（Ｔ７と呼ばれる）［Ｓｈｕｓｔａら（１９９９）Ｊ． Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９２：９４９－９５６］を、本研究において使用した。ＣＴＬクローン２Ｃは、酵素２－オキソグルタレートデヒドロゲナーゼ由来の［Ｕｄａｋａら（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：１１２７２－１１２７６］、ｐ２Ｃａと呼ばれる結合した八量体ペプチドを有する同種異系抗原Ｌ^{d}を認識する。九量体改変体ＱＬ９はまた、ＣＴＬ ２Ｃにより認識されるが、２Ｃ ＴＣＲによる１０倍高い親和性を有する［Ｓｙｋｕｌｅｖら（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：１１４８７－１１４９１］。構造的研究は、２Ｃ ＴＣＲのＣＤＲ３αがペプチドに近く、そしてｐＭＨＣ複合体に付随するためにコンホメーション変化を受けることが示されたが［Ｇａｒｃｉａ（１９９８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７９： １１６６－１１７２］、アラニンスキャニング変異誘発は、ＣＤＲ３αループが、結合相互作用に対して最少エネルギーの寄与をすることを示す［Ｍａｎｎｉｎｇ（１９９８）前出］。従って、本発明者らは、変異誘発の試みを、ＣＤＲ３αの先端を形成する５つの残基に集中させた。

【００４０】

１０^{5}の独立したＴＣＲ－ＣＤＲ３α酵母変異体のライブラリーを、蛍光で標識化されたＱＬ９／Ｌ^{d}リガンドを用いるフローサイトメトリーによる選択にかけた［Ｄａｌ Ｐｏｒｔｏら（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：６６７１－６６７５］。４回の選別および増殖の後、１５個の異なる酵母コロニーを、リガンドに結合する能力について、ｓｃＴＣＲ改変体Ｔ７（これは、ｗｔ ＣＲＤ３α配列を保有する）に比較して試験した（図１）。抗Ｖβ８．２抗体Ｆ２３．２（これは、タンパク質のＣＤＲ１領域およびＣＤＲ２領域における残基を認識する）を、コントロールとして使用して、ｗｔ ｓｃＴＣＲ－Ｔ７変異体およびｓｃＴＣＲ変異体（図１におけるｑＬ２およびｑＬ７ならびにその他）が、各々ｓｃＴＣＲのほぼ等しい表面レベルを有することが示された（図１）。対照的に、可溶性ＱＬ９／Ｌ^{d}リガンドは、各変異体酵母クローンに非常によく結合するが、ｗｔ ｓｃＴＣＲ－Ｔ７には結合しなかった。ＭＣＭＶ（配列番号１）／Ｌ^{d}複合体（これは、ＣＴＬクローン２Ｃにより認識されない）は、ｓｃＴＣＲ変異体にも、ｗｔ ｓｃＴＣＲ－Ｔ７にも結合せず、このことは、ｓｃＴＣＲ変異体がペプチド特異性を保持していることを示した。変異体ＴＣＲの相対的親和性はまた、一定の濃度でＱＬ９／Ｌ^{d}リガンドで観察されるシグナルにおける差異に基づいて、クローンによって変化するようであった。

【００４１】

１５の変異体のＣＤＲ３α配列は、全て、出発した２Ｃ ＴＣＲ配列（表１）と異なっていた。ＢＬＡＳＴアラインメントアルゴリズムによる比較は、２つのモチーフへと配列を整列させた。あるモチーフは、残基ストレッチの中間にグリシンを含んでいたが、別のモチーフは、３つの直列プロリンを含んでいた。３つのプロリン全てが、最も高い親和性部位を生成させる際に重要であるという証拠が、変異体ｑ３ｒを用いた結果により示唆される。変異体ｑ３ｒは、３つのプロリンのうち２つのみを含んでおり、そして三重プロリン変異体と比較して減少した結合を示した。グリシン含有変異体は、カルボキシ側に対する２つの残基のうち正に荷電した残基を選択し（７／９）、そしてアミノ側に対する２つの残基のうち芳香族のかつ／または正に荷電した残基を選択する（４／９および５／９）ようであった。理論に拘束されることは望まないが、モチーフにおける１０２位のグリシン残基についての選択は、ＣＤＲ３αループが増加した親和性を達成するためにこの残基の周りでのコンホメーションの柔軟性を必要とすることを示していると考えられる。このことは、リガンドが配位したＴＣＲのＣＤＲ３αループとリガンドが配位していないＴＣＲのＣＤＲ３αループとの間で観察された、大きな（６Å）のコンホメーション差異と一致する［Ｇａｒｃｉａら（１９９８）前出］。グリシンが抗体のＶ（Ｄ）Ｊ接合部におけ

る最も一般的な残基であり、そしてグリシンの存在は、近年、（４－ヒドロキシ－３－ニトロフェニル）アセチルハプテンに応じて増加した親和性と関連付けられたことに留意することもまた興味深い［Ｆｕｒｕｋａｗａら（１９９９）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　１１：３２９－３３８］。

【００４２】

グリシンを含有する単離物と対照的に、ＣＤＲ３αループの先端におけるプロリンリッチ配列についての選択は、どんな理論にも束縛されることを望まないが、これらのＴＣＲ分子がより高い親和性を付与するより堅固なコンホメーションを示すということを示すと考えられる。その親和性成熟誘導体に比較して低い親和性の生殖細胞系抗体のＸ線結晶解析構造は、高い親和性の状態が、ハプテンを付随する配置における抗体の安定化に起因し得たことを示した［Ｗｅｄｅｍａｙｅｒら（１９９７）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７６：１６６５－１６６９］。同様に、生殖細胞系抗体に類似し得るｓｃＴＣＲのＮＭＲ溶液構造は、ＣＤＲ３αおよびβループが、両方とも有意な運動性を示したことを示した［Ｈａｒｅら（１９９９）Ｎａｔ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．６：５７４－５８１］。ＴＣＲ：ｐＭＨＣ相互作用の最近の熱力学的研究はまた、結合におけるコンホメーション変化の重要性を示唆した［Ｗｉｌｌｃｏｘら（１９９９）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　１０：３５７－３６５；Ｂｏｎｉｆａｃｅら（１９９９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９６：１１４４６－１１４５１］。本明細書中で考察されるＴＣＲ変異体の構造研究および熱力学的研究により、本発明者らは、２つのＣＤＲ３αモチーフ（Ｇｌｙ対Ｐｒｏリッチ）がより高い親和性を付与する機構において異なるか否かを調べることが可能になった。

【００４３】

ｓｃＴＣＲ変異体は、無効な（ｎｕｌｌ）（無関連な）ペプチド／Ｌ^{d}複合体ＭＣＭＶ（配列番号１）／Ｌ^{d}に結合しなかったが、親和性の増加が、微細な（ｆｉｎｅ）特異性における変化と関連付けられたことは可能なままであった。この問題を調べるために、本発明者らは、以前にそのｗｔ２Ｃ　ＴＣＲについての結合親和性における有意な差異を示すことが支援された、ＱＬ９の５位（Ｐｈｅ）ペプチド改変体を使用した［Ｓｃｈｌｕｅｔｅｒ（１９９６）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５７：４４７８－４４８５］。酵母表面上の種々のＴＣＲ変異体およびクローン２Ｃに対するこれらのｐＭＨＣの結合を、フローサイトメトリーにより測定した。図２に示されるように、２Ｃ上のネイティブＴＣＲは、チロシンまたはヒスチジンのいずれかを５位に含むがグルタミン酸は含まないＱＬ９改変体に結合し得る。より高い親和性のＴＣＲ変異体の各々は、保存的チロシン置換ペプチドを認識する能力を保持し、そしてこれらは、グルタミン酸置換ペプチドを認識できないようであった。しかし、ＴＣＲ変異体のうちのいくつか（ｑＬ２、ｑＬ５、およびｑＬ７）は、ヒスチジン置換ペプチドに（異なる程度であるが）結合したが、その他の変異体（ｑＬ１、ｑＬ３、およびｑＬ８）は、このペプチドに結合しなかった（このアッセイの検出限界内）。従って、ＣＤＲ３αループは、ペプチドの微細な特異性の認識に影響し得るが、ＴＣＲが含まれる唯一の領域ではない。ＣＤＲ３に指向された選択に関する初期の研究［Ｓａｎｔ’Ａｎｇｅｌｏら（１９９６）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　４：３６７－３７６；Ｊｏｒｇｅｎｓｅｎら（１９９２）Ｎａｔｕｒｅ　３５５：２２４－２３０］から示唆されたように、ペプチド特異性に対する効果は、改変体ペプチドとのＣＤＲ３α残基の直接の相互作用に起因し得る。あるいは、結合エネルギーは、Ｌ^{d}分子自体におけるペプチドに誘導される変化に向けられ得る。後者の可能性は、２Ｃ　ＴＣＲ：ＱＬ９／Ｌ^{d}相互作用の場合におけるよりもおそらく起こりやすい。なぜならば、ＱＬ９の５位は、Ｌ^{d}溝に向いていると推測されたからである［Ｓｃｈｌｕｅｔｅｒら（１９９６）前出，Ｓｐｅｉｒら（１９９８）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　８：５５３－５６２］。微細特異性分析はまた、同族のペプチドについて増加したか、または少なくとも変更された特異性を有するＴＣＲを操作することが可能であることを示す。従って、単一のＴＣＲの短い領域（ＣＤＲ３α）のみの指向された進化は、所望のペプチド結合特異性および／または増加した結合親和性を有する多くのＴＣＲ改変体の単離を可能にする。

【００４４】

選択されたＣＤＲ３α変異体に関連する親和性の増加の大きさを決定するために、野生型Ｔ７ｓｃＴＣＲおよびｑＬ２ｓｃＴＣＲは、酵母分泌系において可溶性形態として発現された。精製されたｓｃＴＣＲ調製物を、Ｔ２－Ｌ^{d}細胞の表面上でＬ^{d}上に負荷されたＱＬ９またはＭＣＭＶ（配列番号１）に対する、^{125}Ｉ標識化抗Ｌ^{d}Ｆａｂフラグメントの結合を遮断する能力について比較した［Ｍａｎｎｉｎｇ（１９９８）前出、Ｓｙｋｕｌｅｖら（１９９４）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　１：１５－２２］。予測されたように、Ｔ７もｑＬ２ｓｃＴＣＲも、ＭＣＭＶ（配列番号１）ペプチドでアップレギュレートされたＴ２－Ｌ^{d}細胞に対する^{125}Ｉ－Ｆａｂフラグメントの結合を阻害することができなかった。しかし、Ｔ７およびｑＬ２の両方が、ＱＬ９／Ｌ^{d}に対する抗Ｌ^{d}Ｆａｂフラグメントの結合を阻害し得た（図３）。ｑＬ２ｓｃＴＣＲ改変体は、結合の阻害において標識化されていないＦａｂフラグメントと同程度の効力であったが、Ｔ７ｓｃＴＣＲは、１６０倍も小さい効力（４回の独立した適定の中で、平均して１４０倍の差）であった。ＱＬ９／Ｌ^{d}についてのｓｃＴＣＲのＫ$_{D}$値を、その阻害曲線から、Ｔ７について１．５μＭおよびｑＬ２について９．０ｎＭと算出した。Ｔ７についての値は、２ＣｓｃＴＣＲについて以前に報告された３．２μＭのＫ$_{D}$と密接に一致した［Ｍａｎｎｉｎｇら（１９９９）Ｊ：Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８９：４６１－４７０］。これらの発見は、ＣＤＲ３α指向性変異誘発と組み合わされた酵母系が、特定のｐＭＨＣリガンドについての、少なくとも約１００倍高い固有の結合親和性を有する変異体の選択を可能にするということを示す。

【００４５】

可溶性ｓｃＴＣＲがそのｐＭＨＣリガンドに関して高い親和性を有する場合、抗体のように、細胞表面結合抗原についての特異的プローブとして有用である。このことを確かめるために、この可溶性Ｔ７およびｑＬ２ｓｃＴＣＲを、ビオチン化し、そして標識化されたｓｃＴＣＲ分子を、ＱＬ９、ｐ２Ｃａ、またはＭＣＭＶ（配列番号１）を負荷されたＴ２－Ｌ^{d}細胞とインキュベートした。ｑＬ２ｓｃＴＣＲ（Ｔ７　ｓｃＴＣＲではない）は、ＱＬ９またはｐ２ＣａとインキュベートされたＴ２細胞の容易に検出可能な染色を生じた（図４Ａ～４Ｂ）。ｐ２Ｃａアップレギュレートされた細胞がまた、ｑＬ２ｓｃＴＣＲにより容易に検出されたことは重要である。なぜならば、ｐ２Ｃａは、同種反応性（ａｌｌｏｒｅａｃｔｉｖｅ）クローン２Ｃにより認識されたペプチドの天然で処理された形態であり、そしてこれは、２Ｃ　ＴＣＲについてＱＬ９／Ｌ^{d}複合体よりも低い親和性でさえ有するからである［Ｓｙｋｕｌｅｖら（１９９４）前出］。

【００４６】

本発明者らの研究において記載される高親和性レセプターは、ＶＪ接合部における改変により誘導された（Ｔ細胞における遺伝子再配列によりインビボで非常に有効に作用する同じプロセス）（ＤａｖｉｓおよびＢｊｏｒｋｍａｎ（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ　３３４：３９５－４０２）。本発明者らがインビトロで高親和性ＴＣＲの広範なセットを容易に単離し得たという事実は、高親和性レセプターに対する遺伝的制限も構造的制限も存在しないということを示す。このことは、インビボで見出されるＴＣＲの固有の低い親和性が、より高い親和性についての選択の欠如、およびおそらくより低い親和性の選択に起因するという見解を支持する（Ｓｙｋｕｌｅｖら（１９９５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９２：１１９９０－１１９９２；Ｖａｌｉｔｕｔｔｉら（１９９５）Ｎａｔｕｒｅ　３７５：１４８－１５１；Ｒａｂｉｎｏｗｉｔｚら（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９３：１４０１－１４０５）。この点において、本発明のより高い親和性のＴＣＲはここで、Ｔ細胞応答に対する親和性の効果についての仮定を直接的に試験するための試薬を提供する（（Ｄａｖｉｓら（１９９８）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６：５２３－５４４；Ｓｙｋｕｌｅｖら（１９９５）（前出）；Ｖａｌｉｔｕｔｔｉら（１９９５）（前出）；Ｒａｂｉｎｏｗｉｔｚら１９９６）前出）。

【００４７】

要約すると、本発明者らは、Ｔ細胞レセプター（抗体と同程度広範なタンパク質のクラスを代表する）が、抗体と同様に操作されて、高い親和性の、抗原特異的プローブを与え

得ることを示した。さらに、高親和性レセプターの可溶性変形は、細胞上の特異的ペプチド／ＭＨＣ複合体を直接検出し得る。従って、これらの操作されたタンパク質は、例えば、腫瘍細胞についての診断剤として有用である。高親和性ＴＣＲの可溶性誘導体は、高親和性の抗原特異的プローブとして有用であるか、またはさらに操作され得る。適切に標識化された場合（またはこの可溶性ＴＣＲに検出可能なリガンドにより結合される場合）の可溶性ＴＣＲ誘導体は、細胞（例えば、腫瘍細胞もしくはその他の新形成細胞の誘導された表面、またはウイルス感染細胞もしくはその他の疾患細胞の診断的抗原）上の特異的ペプチド／ＭＣＨＣ複合体についてのプローブとして作用し得る。高親和性ＴＣＲ細胞に結合したタンパク質または可溶性誘導体についての他の適用としては、特定の自己免疫疾患の診断または研究における使用が挙げられる。特徴的なペプチド／ＭＨＣまたはその他のマーカー表面抗原が公知であるかまたは同定され得る場合、高親和性の可溶性ＴＣＲは、その細胞表面部分への特異的結合のために単離され得、そして診断または治療において使用され得る。破壊されることが所望される細胞が、高親和性ＴＣＲ（望ましくは可溶性ＴＣＲタンパク質）により認識される特徴的かつ特異的細胞表面部分を有する場合、高親和性ＴＣＲタンパク質（望ましくは可溶性誘導体）は、癌の処置または他の障害における治療剤として、細胞傷害性因子に結合して使用され得る。同様に、本明細書中に記載される可溶性高親和性ＴＣＲは、画像化剤にカップリングされ得、そして腫瘍細胞が存在する身体内の部位（ここでＴＣＲが、高親和性および特異性を有する腫瘍細胞マーカーに特異的に結合する）を同定するために使用され得る。不適切に自己免疫破壊の標的にされてきた細胞または組織の表面に結合した高親和性ＴＣＲは、標的細胞または組織の細胞表面への結合について細胞傷害性リンパ球と競合することにより、これらの細胞傷害性リンパ球による自己免疫組織破壊を低減させ得る。

【００４８】

これらの結果はまた、Ｔ細胞応答における重要で、基本的な疑問の状況において考慮され得る。Ｔ細胞レセプターについて以前に観察された低い親和性は、体細胞変異の非存在に起因するのか、またはＴ細胞に対して作用するインビボでの選択的圧力に起因するのか？本発明者らの研究において記載される高親和性レセプターは、ＶＪ接合部でのバリエーションに由来した（Ｔ細胞において非常に有効に作用する同じプロセス）［ＤａｖｉｓおよびＢｊｏｒｋｍａｎ（１９８８）前出］。本発明者らが、インビトロで高親和性ＴＣＲの広範なセットを容易に単離し得たという事実は、高親和性レセプターへの構造的制限または遺伝的制限が存在しないことを示す。このことは、インビボで見出される元々低い親和性のＴＣＲが、より高い親和性の選択の欠如およびおそらくより低い親和性の選択の欠如に起因すると言う見解を支持する［Ｓｙｋｕｌｅｖら（１９９５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９２：１１９９０－１１９９２；Ｒａｂｉｎｏｗｉｔｚら（１９９６）前出］。この点において、ここでより高い親和性のＴＣＲは、Ｔ細胞応答に対する親和性の効果についての仮説を直接試験するための試薬を提供する［Ｄａｖｉｓら（１９９８）（前出）；Ｓｙｋｕｌｅｖら（１９９５）（前出）；Ｖａｌｉｔｕｔｔｉら（１９９５）（前出）；Ｒａｂｉｎｏｗｉｔｚら（１９９６）前出］。

【００４９】

遺伝子コードの縮重に起因して、多数の機能的に等価なヌクレオチド配列が、同じアミノ酸配列をコードするということが、当業者に理解される。

【００５０】

さらに、当業者は、標準的な変異誘発技術により、本明細書中に記載される抗原決定活性アッセイを組み合わせて、変更されたＴＣＲ配列を得、そしてそれらを特定の結合活性を有するポリペプチドの発現について試験し得る。当該分野で公知の有用な変異誘発技術としては、限定せずに、オリゴヌクレオチド指向性変異誘発、領域特異的変異誘発、リンカースキャニング変異誘発、およびＰＣＲによる部位指向性変異誘発が挙げられる［例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９）およびＡｕｓｕｂｅｌら（１９９９）を参照のこと］。

【００５１】

改変体ＴＣＲコード配列を得る際に、当業者は、ＴＣＲ由来のタンパク質が、生物学的活性の損失も減少もなしに、特定のアミノ酸置換、付加、欠失および翻訳後修飾により改変され得ることを認識する。特に、保存的アミノ酸置換、すなわち、１つのアミノ酸の、類似のサイズ、電荷、極性およびコンホメーションの別のアミノ酸との置換が、タンパク質の機能を有意に変更しないようであることは周知である。タンパク質を構成する２０種の標準的なアミノ酸は、以下のような保存的アミノ酸の４つのグループに広く分類され得る：非極性（疎水性）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、トリプトファンおよびバリンを含む；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、グリシン、セリン、トレオニンおよびチロシンを含む；正に荷電した（塩基性）グループは、アルギニン、ヒスチジンおよびリシンを含む；そして負に荷電した（酸性）グループは、アスパラギン酸およびグルタミン酸を含む。タンパク質中の１つのアミノ酸を同じグループ内の別のアミノ酸と置換することは、そのタンパク質の生物学的活性に不利な影響を有さないようである。

【００５２】

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決定され得、ここでは、二本鎖ＤＮＡハイブリッドの安定性は、生じる塩基対形成の程度に依存する。高温および／また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少ない相同性を有する配列のアニール化を妨げるために変更させ得る。例えば、約５５％のＧ－Ｃ含量を有する配列に対して、４０～５０℃、６×ＳＳＣ（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム緩衝液）および０．１％　ＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）というハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、約６０～７０％の相同性を示し、５０～６５℃、１×ＳＳＣおよび０．１％　ＳＤＳのハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、約８２～９７％の相同性を示し、そして５２℃、０．１×ＳＳＣおよび０．１％　ＳＤＳのハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、約９９～１００％の相同性を示す。ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を比較するため（そして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はまた、利用可能であり、そして市販されるソフトウエアとフリーソフトウエアの両方の供給源を提供する表は、Ａｕｓｕｂｅｌら（１９９９）において見出される。すぐに利用可能な配列比較および複数の配列整列アルゴリズムは、それぞれ、Ｂａｓｉｃ　Ｌｏｃａｌ　Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ　Ｓｅａｒｃｈ　Ｔｏｏｌ（ＢＬＡＳＴ）（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９７）およびＣｌｕｓｔａｌＷプログラムである。ＢＬＡＳＴは、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖでインターネット上で利用可能であり、そしてＣｌｕｓｔａｌＷのバージョンは、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ２．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋで利用可能である。

【００５３】

微生物の工業的株（例えば、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｆｉｃｕｕｍ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ａｗａｍｏｒｉ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｏｒｙｚａｅ、Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ　ｒｅｅｓｅｉ、Ｍｕｃｏｒ　ｍｉｅｈｅｉ、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ　ｌａｃｔｉｓ、Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓまたはＢａｃｉｌｌｕｓ　ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ）あるいは植物種（例えば、カノーラ、ダイズ、コーン、トマト、オオムギ、ライムギ、コムギ）は、ＴＣＲペプチドの組換え産生のための宿主細胞として使用され得る。高親和性ＴＣＲタンパク質または可溶なタンパク質の異種発現における第１工程として、発現構築物は、ＴＣＲまたは可溶なＴＣＲのコード配列、ならびに制御配列（例えば、プロモーター、エンハンサーおよびターミネーター）を含むように構築される。シグナル配列および選択マーカーのような他の配列はまた、含まれ得る。ｓｃＴＣＲの細胞外発現を達成するために、発現構築物は、分泌性シグナル配列を含み得る。シグナル配列は、細胞質発現が所望される場合、発現構築物上に含まれない。プロモーターおよびシグナル配列は、宿主細胞において機能的であり、そしてＴＣＲまたは可溶なＴＣＲタンパク質の発現および分泌を提供する。転写ターミネーターは、効果的な転写を保証するために含まれる

。発現またはタンパク質精製を増強する補助的配列はまた、発現構築物に含まれ得る。

【００５４】

種々のプロモーター（転写開始調節領域）は、本発明に従って使用され得る。適切なプロモーターの選択は、提案される発現宿主に依存する。異種供給源からのプロモーターは、それらが選択された宿主において機能的である限り、使用され得る。

【００５５】

プロモーター選択はまた、所望の有効性およびペプチドまたはタンパク質の産生のレベルに依存する。誘導プロモーター（例えば、ｔａｃ）は、しばしば、Ｅ．ｃｏｌｉにおけるタンパク質発現のレベルを劇的に増加させるために利用される。タンパク質の過剰発現は、宿主細胞に有害であり得る。その結果、宿主細胞の増殖は制限される。誘導プロモーター系の使用によって、宿主細胞は、遺伝子発現の誘導前に、受容可能な密度まで培養されることが可能となり、それによって、より高い産生物収量を容易にする。

【００５６】

種々のシグナル配列が、本発明に従って使用され得る。ＴＣＲコード配列と同種のシグナル配列が、使用され得る。あるいは、効果的な分泌および発現宿主におけるプロセシングのために選択されるかまたは設計されたシグナル配列はまた、使用され得る。例えば、適切なシグナル配列／宿主細胞の組としては、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓにおける分泌のためのＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ　ｓａｃＢシグナル配列、およびＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ　α接合因子またはＰ．ｐａｓｔｏｒｉｓ分泌のためのＰ．ｐａｓｔｏｒｉｓ酸性ホスファターゼｐｈｏＩシグナル配列が挙げられる。シグナル配列は、タンパク質コード配列に対するシグナルペプチダーゼ切断部位をコードする配列によって、または通常１０より少ないコドンからなる短いヌクレオチドブリッジ（ｂｒｉｄｇｅ）（ここで、このブリッジは、下流のＴＣＲ配列の正しい読み取り枠を保証する）によって、直接連結され得る。

【００５７】

転写および翻訳を増強するためのエレメントは、真核生物のタンパク質発現系について同定されている。例えば、カリフラワーモザイクウイルス（ＣａＭＶ）プロモーター１００ｂｐを異種プロモーターのいずれかの端に配置することは、植物細胞において転写レベルを１０～４００倍増強させ得る。発現構築物はまた、適切な翻訳開始配列を含む。適切な翻訳開始のためのＫｏｚａｋコンセンサス配列を含むための発現構築物の改変は、翻訳のレベルを１０倍増大させ得る。

【００５８】

選択マーカーがしばしば利用され（これは、発現構築物の一部分であっても、または発現構築物と離れて（例えば、発現ベクターによって運ばれる）いてもよい）、その結果、マーカーは、目的の遺伝子と異なる部位で統合され得る。例としては、抗生物質に耐性を与える（例えば、ｂｌａは、Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞に対してアンピシリン耐性を与え、ｎｐｔＩＩは、広範囲の原核生物細胞および真核生物細胞に対してカナマイシン耐性を与える）マーカー、または宿主を最少培地で増殖させるマーカー（例えば、ＨＩＳ４は、Ｐ．ｐａｓｔｏｒｉｓまたはＨｉｓ－Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅがヒスチジンの非存在下で増殖することを可能にする）が挙げられる。選択可能なマーカーは、それ自身の転写および翻訳の開始ならびに停止の調節領域を有し、マーカーの独立した発現を可能にする。抗生物質耐性がマーカーとして利用される場合、選択のための抗生物質濃度は、その抗生物質に依存して変化し、通常、抗生物質１０～６００μｇ／培地１ｍＬの範囲である。

【００５９】

発現構築物は、公知の組換えＤＮＡ技術（Ｓａｍｂｒｏｏｋら、１９８９；Ａｕｓｕｂｅｌら、１９９９）を利用することによって構築される。制限酵素消化および連結は、ＤＮＡの２つのフラグメントを連結させるために利用される基本的工程である。ＤＮＡフラグメントの末端は、連結前に改変を必要とし得、そしてこれは、突出を埋めること、ヌクレアーゼ（例えば、ＥｘｏＩＩＩ）でフラグメント（単数または複数）の末端部分を欠失すること、部位を指向された突然変異誘発によって、またはＰＣＲによって新しい塩基対

を添加することによって達成され得る。ポリリンカーおよびアダプターは、選択されたフラグメントの連結を容易にするために利用され得る。発現構築物は、代表的に、Ｅ．ｃｏｌｉの制限、連結および形質転換の数ラウンド（ｒｏｕｎｄ）を利用する段階で構築される。発現構築のために適切な多くのクローニングベクターは、当該分野において公知である（λＺＡＰおよびｐＢＬＵＥＳＣＲＩＰＴ　ＳＫ－１、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、ＬａＪｏｌｌａ、ＣＡ；ｐＥＴ、Ｎｏｖａｇｅｎ　Ｉｎｃ．Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ－Ａｕｓｕｂｅｌら、１９９９において引用される）、そして特定の選択が、本発明には重要ではない。クローニングベクターの選択は、宿主細胞への発現構築物の導入のために選択される遺伝子転移系によって影響される。各段階の終わりに、得られた構築物は、制限、ＤＮＡ配列、ハイブリダイゼーションおよびＰＣＲ分析によって分析され得る。

【００６０】

発現構築物は、クローニングベクター構築物（線状か環状かのいずれか）として宿主に形質転換され得るか、あるいはクローニングベクターから除去され得、そして送達ベクターとして使用され得るか、または送達ベクター内に導入され得る。送達ベクターは、選択された宿主細胞型において、発現構築物の導入および保持を容易にする。発現構築物は、多くの公知の遺伝子導入系（例えば、天然の能力（ｃｏｍｐｅｔｅｎｃｅ）、化学的に媒介される形質転換、プロトプラスト形質転換、エレクトロポレーション、微粒子銃形質転換、トランスフェクション、または結合）（Ａｕｓｕｂｅｌら、１９９９；Ｓａｍｂｒｏｏｋら、１９８９）のいずれかによって宿主細胞に導入される。選択される遺伝子転移系は、使用される宿主細胞およびベクター系に依存する。

【００６１】

例えば、発現構築物は、プロトプラスト形質転換またはエレクトロポレーションによってＳ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ細胞に導入され得る。Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅのエレクトロポレーションは、容易に達成され、そし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もたらす。

【００６２】

リガンド結合部位以外の部位でＴＣＲタンパク質によって特異的に反応するモノクローナルまたはポリクローナル（好ましくは、モノクローナル）抗体は、当該分野において公知である方法によって作製され得る。例えば、ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ（１９８８）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ；Ｇｏｄｉｎｇ（１９８６）Ｍｏｎｏｃｏｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　第２版、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ；およびＡｕｓｕｂｅｌら（１９９９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ　ＹｏｒｋのＣｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓを参照のこと。

【００６３】

特定のｐＭＨＣに特異的な細胞結合形態または可溶形態の高親和性のＴＣＲタンパク質は、例えば、生物学的サンプル（例えば、細胞、組織サンプル、生検材料、体液など）のスクリーニングのため、または試験サンプルにおける同族ｐＭＨＣの存在を検出するための診断プローブとして有用である。しばしば、高親和性のＴＣＲタンパク質は、検出可能なシグナルを提供する基質を連結させる（共有結合か非共有結合かのいずれか）ことによって標識化される。適切な標識としては、放射性核種、酵素、基質、補助因子、インヒビター、蛍光試薬、化学発光試薬、磁気粒子などが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、ＴＣＲタンパク質は、第２の結合分子に対するリガンドに結合し得：例えば、ＴＣＲタンパク質は、ビオチン標識化され得る。従って、標的細胞または分子に結合したＴＣＲの検出は、検出可能なストレプトアビジン（蛍光分子、放射活性分子、化学発光分子、または他の検出可能な分子が付着されるか、または、発色団基質が利用可能である酵素が付着される、ストレプトアビジン）の結合によって達成され得る。ｓｃＴＣＲタンパク質に共有結合するべきこのような標識物および／または有毒な化合物の使用を記載する米

国特許のとしては、以下の号が挙げられるが、これらに限定されない：

【００６４】

【数１】

3,817,837; 3,850,752; 3,927,193; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; 4,331,647; 4,348,376; 4,361,544; 4,468,457; 4,444,744; 4,640,561; 4,366,241; RE 35,500; 5,299,253; 5,101,827; 5,059,413.

標識化されたＴＣＲタンパク質は、使用される標識に適切なモニタリングデバイスまたは方法を用いて検出され得る。蛍光顕微鏡または蛍光活性化セルソーティングは、標識が蛍光部分である場合に使用され得、そして標識が、放射性核種である場合、γカウンティング、オートラジオグラフィまたは液体シンチレーションカウンティングが、例えば、その方法が分析されているサンプルおよび使用される放射性核種に適切であるという条件で使用され得る。さらに、本明細書中に述べられるＭＨＣ成分の非存在下で同族ｐＨＭＣリガンドまたは他のリガンドに対する結合部位の一部でないＴＣＲタンパク質の部分を認識する検出可能な分子または粒子がある場合、第２の検出分子または粒子が利用され得る。当業者は、インサイチュでの診断画像処理に有用な化合物を知っている；例えば、米国特許第５，１０１，８２７号、同第５，０５９，４１３号を参照のこと。インビボの治療および／または画像処理に有用な放射性核種はとしては、^{111}インジウム、^{97}ルビジウム、^{125}ヨウ素、^{131}ヨウ素、^{123}ヨウ素、^{67}ガリウム、^{99}テクネチウムが挙げられる。毒素としては、一旦、ＴＣＲ－毒素複合体が細胞に結合される場合、毒性部分が内部移行し、その結果、その細胞傷害性効果を及ぼし得るという条件では、とりわけ、ジフテリア毒素、リシンおよびトウゴマ毒素が挙げられる。免疫毒性テクノロジーは、当該分野において周知であり、そして適切な毒性分子としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない；化学療法薬剤（例えば、ビンデシン）、葉酸代謝拮抗財（例えば、メトトレキセート、シスプラチン、マイトマイシン）、アンスロサイクリン（ａｎｔｈｒｏｃｙｃｌｉｎｅｓ）（例えば、ダウノマイシン、ダウノルビシンまたはアドリアマイシン）およびリボソーム不活性化タンパク質のような細胞傷害性タンパク質（例えば、ジフテリア毒素、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、アブリン、リシン、シュードモナス属体外毒素Ａまたはこれらの組換え誘導体）。一般的に、例えば、ＯｌｓｎｅｓおよびＰｉｈｌ（１９８２）Ｐｈａｒｍａｃ．Ｔｈｅｒ．２５：３５５－３８１およびＭｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ、ＢａｌｄｗｉｎおよびＢｙｅｒｓ編、１５９頁－１７９頁、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、１９８５を参照のこと。

【００６５】

特定のｐＭＨＣリガンドに特異的な高親和性ＴＣＲタンパク質は、特定のｐＭＨＣに関連する疾患に罹患すると考えられる動物（ヒトを含む）を診断において有用である。本発明のｓｃＴＣＲ分子は、本質的に、任意の抗原を基本的に検出するのに有用であり、新生物状態、異常なタンパク質、あるいは細菌、真菌、ウイルス、原虫、酵母、線虫または他の寄生生物による感染またはインフェステーションに関連するものが挙げられるが、これらに限定されない。高親和性のｓｃＴＣＲタンパク質はまた、生産された異常なタンパク質が存在する特定の遺伝子疾患の診断の際に使用され得る。これらの高親和性タンパク質の例示的な適用は、自己免疫疾患の処置においてであり、その中には、既知のｐＭＨＣがある。Ｉ型糖尿病は、免疫破壊を誘発する自己抗原に関して比較的よく特徴付けられる。多発性硬化症、セリアック病、炎症性腸疾患、クローン病および慢性関節リウマチは、このような適用に対するさらなる候補疾患である。自己免疫破壊を不適切に標的化する、細胞または組織の表面上のｐ／ＭＨＣ複合体に対する結合特異性を有する高親和性のＴＣＲ（可溶性）タンパク質は、細胞傷害性リンパ球による標的細胞への結合について競合する

ことによって、自己免疫破壊のアンタゴニストとして役立ち得る。対照的に、高親和性ＴＣＲタンパク質（望ましくは、可溶性の一本鎖ＴＣＲタンパク質）（これは、破壊が有益である細胞表面上の抗原またはｐ／ＭＨＣに特異的に結合する）は、有毒な化合物（例えば、毒素または放射性核種）に結合し得、その結果、標的細胞への結合は、細胞傷害性リンパ球による引き続いての結合および破壊を引き起こす。破壊のために標識化された細胞は、新生物細胞（例えば、腫瘍細胞）、ウイルス、細菌、または原虫で感染された細胞、あるいは他の疾患原因因子もしくは寄生生物であり得、すなわち、それは、細菌、酵母、真菌、原虫または所望されない細胞であり得る。このような高親和性のｓｃＴＣＲタンパク質は、本明細書中に記載される方法によって得ることができ、そして続いて、目的の特定のリガンドについてスクリーニングするために使用され得る。

【００６６】

高親和性のＴＣＲ組成物は、当該分野において公知の任意の方法によって処方され得る。これらは、代表的に、特に経静脈投与、経腹膜投与、または滑液投与（特定の疾患によって決定される経路で）のための注射剤として、または、経鼻または経口投与のための処方物（液体溶液か懸濁液かのいずれか）として調製され得る。注射または他の投与前の液体中の、溶液または懸濁液に適切な固体の形態はまた、調製され得る。この調製物はまた、例えば、乳化され得るか、またはリポソーム中にカプセル化されたタンパク質（単数および複数）／ペプチド（単数および複数）であり得る。

【００６７】

活性な成分はしばしば、賦形剤またはキャリアと混合され、これらは、薬学的に受容可能であり、そして活性な成分と共存可能である。適切な賦形剤としては、水、生理的食塩水、ブドウ糖、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。注射可能な、エアロゾルまたは経鼻処方物の形態の高親和性のＴＣＲタンパク質の濃度は、通常、０．０５～５ｍｇ／ｍｌの範囲にある。特定の有効な用量の選択は、公知であり、そして当業者によって過度の実験なしに行われる。同じ用量が、他の粘膜表面に投与され得る。

【００６８】

さらに、所望される場合、ワクチンは、少量の補助的物質（例えば、湿潤剤または乳化剤、ｐＨ緩衝剤、および／またはワクチンの効果を増強するアジュバント）を含み得る。有効であり得るアジュバントの例としては、以下が挙げられるが、これらの限定されない：水酸化アルミニウム；Ｎ－アセチル－ムラミル－Ｌ－スレオニル－Ｄ－イソグルタミン（ｔｈｒ－ＭＤＰ）；Ｎ－アセチル－ｎｏｒ－ムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミン（ＣＧＰ　１１６３７、ｎｏｒ－ＭＤＰと呼ばれる）；Ｎ－アセチルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミニル－Ｌ－アラニン－２－（１’－２’－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３ヒドロキシホスホリル）－エチルアミン（ＣＧＰ　１９８３５Ａ、ＭＴＰ－ＰＥと呼ばれる）およびＲＩＢＩ（これは、細菌から抽出された３つの成分を含む：２％のスクアレン／Ｔｗｅｅｎ　８０乳濁液中のモノホスホリルリピドＡ、トレハロースジマイコレート（ｄｉｍｙｃｏｌａｔｅ）および細胞壁骨格（ＭＰＬ＋ＴＤＭ＋ＣＷＳ）。当該分野において公知であるこのようなさらなる処方物および投与の形態はまた、使用され得る。

【００６９】

本発明の高親和性ＴＣＲタンパク質、および／または高親和性ＴＣＲタンパク質に対して類似（９０％より大きい同一性）の一次構造を有するｐＭＨＣ結合フラグメント（同族のリガンドについて高親和性を維持する）は、中性形態または塩形態としてワクチン中に処方され得る。薬学的に受容可能な塩としては、酸付加塩（ペプチドの遊離アミノ酸基で形成された）が挙げられるがこれらに限定されない。この塩は無機酸（例えば、塩酸またはリン酸）および有機酸（例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、またはマレイン酸）で形成される。遊離のカルボキシル基で形成された塩はまた、無機塩基（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄）、および有機塩基（例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、２－エチルアミノ

－エタノール、ヒスチジン、およびプロカイン）に由来し得る。

【００７０】

治療用途のための高親和性ＴＣＲタンパク質（例えば、細胞毒性化合物に結合体化されたタンパク質）を、当該分野で公知の方法に従って、投与処方物に適切な様式で、そして予防的におよび／または治療的に効果的であるような量および様式で、投与する。投与されるべき量は、一般に１用量あたり約１００～２０，０００μｇタンパク質の範囲、より一般的には、１用量あたり約１０００～１０，０００μｇの範囲である。同様の組成物が、画像化における用途のために標識化した高親和性ＴＣＲタンパク質を用いて類似の様式で投与され、例えば、自己免疫攻撃下でかつ同属のｐＭＨＣを含む組織を検出するか、またはその表面に同属のｐＭＨＣを保有する癌細胞を検出し得る。投与されるのに必要な活性成分の正確な量は、医師または獣医師の判定に依存し得、そして各個体について特有であり得るが、このような決定は、このような医師の当該分野の範囲内である。

【００７１】

ワクチンまたは他の免疫原性組成物は、単回用量；２用量スケジュール（例えば、２～８週間間隔）；または複数用量スケジュールで与えられ得る。複数用量スケジュールは、ワクチン接種の一次コースが１～１０以上の別の用量、続いて、免疫応答を維持するおよび／または強化するために必要な場合、引き続く時間間隔で投与される他の用量（例えば、第二用量は１～４カ月）、そして必要な場合、数ヶ月後に引き続く用量を含み得るスケジュールである。本発明のレトロウイルス様粒子で免疫したヒト（または他の動物）は、同属のレトロウイルスによる感染から防御される。

【００７２】

クローニング、ＤＮＡ単離、増幅および精製のため、ＤＮＡリガーゼ、ＤＮＡポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼなどを含む酵素反応のための標準的技術、ならびに種々の別の技術は、公知の技術であり、そして当業者によって通常使用される。多数の標準的技術が、以下に記載されている：Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：第二版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；Ｍａｎｉａｔｉｓら（１９８２）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；Ｗｕ（編）（１９９３）Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２１８，ＰａｒｔＩ；Ｗｕ（編）（１９７９）Ｍｅｔｈ Ｅｎｚｙｍｏｌ．６８：Ｗｕら（編）（１９８３）Ｍｅｔｈ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１００および１０１；ＧｒｏｓｓｍａｎおよびＭｏｌｄａｖｅ（編）Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．６５；Ｍｉｌｌｅｒ（編）（１９７２）Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；Ｏｌｄ ａｎｄ Ｐｒｉｍｒｏｓｅ（１９８１）Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｇｅｎｅ Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｅｒｋｅｌｅｙ；ＳｃｈｌｅｉｆおよびＷｅｎｓｉｎｋ（１９８２）Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ；Ｇｌｏｖｅｒ（編）（１９８５）ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ第ＩおよびＩＩ号、ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ，ＵＫ；Ｈａｍｅｓ ａｎｄ Ｈｉｇｇｉｎｓ（編）（１９８５）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ，ＵＫ；ならびにＳｅｔｌｏｗおよびＨｏｌｌａｅｎｄｅｒ（１９７９）Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ、１～４号、Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ。ここで使用した略号および命名法は、この分野で標準的とみなされ、そしてここで引用される文献のような専門の文献中に通常用いられている。

【００７３】

本出願に引用される全ての参考文献は、本開示と矛盾しない程度まで、本明細書に提供される開示および実験手順を補充するために、本明細書において参考として援用される。

【００７４】

以下の実施例は、例示的な目的のために提供されるものであり、そして本明細書に記載される本発明の特許請求の範囲を限定する意図ではない。当業者に対して生じる、例示された記事および／または方法における任意のバリエーションは、本発明の範囲内におさまることが意図される。

【００７５】

（実施例）

高い親和性のＴＣＲを作成するための一般的方法は、１９９８年１月２０日出願、米国特許出願番号０９／００９，３８８号、および１９９９年１月２０日出願ＷＯ９９／３６５６９（これらは、本明細書の開示と矛盾しない程度まで、参考として援用される）に与えられる。

【００７６】

（実施例１．ライブラリーの構築）

指向性進化のための足場として用いた２Ｃ　ｓｃＴＣＲ（Ｔ７）は、ＴＣＲの安定性を増大させるがｐＭＨＣ結合を可能にすることが示されている、６つの変異体（βＧ１７Ｅ、βＧ４２Ｅ　βＬ８１Ｓ，αＬ４３Ｐ、αＷ８２Ｒ、およびαＩ１１８Ｎ）を含んだ［例えば、Ｓｈｕｓｔａ，Ｅ．Ｖ．ら（１９９９）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９２，９４９～９５６］。

【００７７】

ＡＧＡ２－特異的上流プライマー（ＧＧＣＡＧＣＣＣＣＡＴＡＡＡＣＡＣＡＣＡＧＴＡＴ（配列番号３））および変性下流プライマーＣＴＴＴＴＧＴＧＣＣＧＧＡＴＣＣＡＡＡＴＧＴＣＡＧ（ＳＮＮ）$_5$ＧＣＴＣＡＣＡＧＣＡＣＡＧＡＡＧＴＡＣＡＣＧＧＣＣＧＡＧＴＣＧＣＴＣ（配列番号４）を用いて、Ｔ７　ｓｃＴＣＲ　ＶαＣＤＲ３の変異性ＰＣＲを、実施した。

下線を付した塩基（配列番号４の最初から１１番目のＧ、終わりから１３番目のＧ）は、特有のＢａｍＨＩおよびＥａｇＩ制限部位を誘導するサイレント変異の位置を示す。精製したＰＣＲ産物を、ＮｄｅＩおよびＢａｍＨＩを用いて消化し、そしてＮｄｅＩ－ＢａｍＨＩで消化したＴ７／ｐＣＴ３０２に連結した［ＢｏｄｅｒおよびＷｉｔｔｒｕｐ（１９９７）前出；Ｋｉｅｋｅら（１９９９）前出；Ｓｈｕｓｔａら（１９９９）前出］。連結混合物をＤＨ１０Ｂエレクトロ－コンピテントなＥ．ｃｏｌｉ（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＩ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）中に形質転換し、そして形質転換体を、アンピシリン１００μｇ／ｍｌ補充した２５０ｍＬのＬＢ中にプールし、そして３７℃で一晩増殖した。プラスミドＤＮＡを、ＧｉｅｔｚおよびＳｃｈｉｅｓｔｌ［Ｇｅｉｔｚら（１９９５）Ｙｅａｓｔ　１１：３５５～３６０］の方法によって、酵母（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株ＥＢＹ１００中に形質転換した。

【００７８】

（実施例２．細胞ソーティング）

酵母ライブラリー［Ｓｈｕｓｔａら（１９９９）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１０：１１７～１２２］を、ＳＤ－ＣＡＡ（２％デキストロース、０．６７％酵母窒素ベース、１％カザミノ酸（Ｄｉｆｃｏ、Ｌｉｖｏｎｉａ，ＭＩ））中で、３０℃で、OD_{600}＝４．０まで増殖した。表面ｓｃＴＣＲ発現を誘導するため、酵母を遠心分離によってペレット化し、ＳＧ－ＣＡＡ（２％ガラクトース、０．６７％酵母窒素ベース、１％カザミノ酸）中で、OD_{600}＝１．０まで再懸濁し、そして２０℃で２４時間インキュベートした。一般に、約10^7細胞／チューブを、５０μｌのＱＬ９／L^d／ＩｇＧダイマー［Ｄａｌ　Ｐｏｒｔｏら（１９９３）前出］（これは０．５ｍｇ／ｍｌＢＳＡ（ＰＢＳ－ＢＳＡ）を補充したリン酸緩衝化生理食塩水（ｐＨ７．４）中で希釈してある）とともに、１時間氷上でインキュベートした。インキュベーション後、細胞を洗浄し、そしてＦＩＴＣ結合体化ヤギ抗マウスＩｇＧ　Ｆ（ab^7）$_2$（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ＆Ｐｅｒｒｙ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）含有ＰＢＳ－ＢＳＡを用いて３０分間標識した。次いで、ソーティングの直前に、ＰＢＳ－ＢＳＡ中で酵母を洗浄し、そして再懸

濁した。コールター７５３ベンチを用いたＦＡＣＳソーティングによって最高の蛍光を示す細胞を、単離した。単離後、ソーティングした細胞をＳＤ－ＣＡＡ中で増殖し、そして以降の回の選択のためにＳＧ－ＣＡＡ中で誘導した。引き続く４回の総ソーティングを実施した。染色に用いたＱＬ９／Ｌ^{d}／ＩｇＧダイマーの濃度は、ソート１～３については５０μｇ／ｍｌであり、そして最終のソートについては０．５μｇ／ｍｌであった。各ソートから単離した総細胞のパーセンテージは、それぞれ５．５５％、２．６８％、２．５６％および０．５８％であった。ソート３および４のアリコートをＳＤ－ＣＡＡ上にプレートし、個々のクローンを単離した。クローンは、コールターＥｐｉｃｓＸＬ装置を用いたフローサイトメトリーにより分析した。

【００７９】

（実施例３．可溶性のｓｃＴＣＲ産生）

Ｔ７およびｑＬ２のオープンリーディングフレームを、ｐＣＴ３０２　ＮｈｅＩ－ＸｈｏＩから切り出し、そしてＮｈｅＩ－ＸｈｏＩで消化したｐＲＳＧＡＬＴ（酵母発現プラスミド）に連結した［Ｓｈｕｓｔａら（１９９９）前出］。ライゲーション（連結）したプラスミドをＤＨ１０Ｂエレクトロ－コンピテントなＥ．ｃｏｌｉ（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ）中に形質転換した。プラスミドＤＮＡを細菌培養物から単離し、そしてＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ　ＢＪ５４６４（α　ｕｒａ３－５２　ｔｒｐ１　ｌｅｕ２　１　ｈｉｓ３　２００　ｐｅｐ４：：ＨＩＳ３　ｐｒｂ１　１．６Ｒ　ｃａｎ１ＧＡＬ）中に形質転換した［Ｓｈｕｓｔａら（１９９９）前出］。酵母クローンを３０℃で４８時間１リットルのＳＤ－ＣＡＡ／Ｔｒｐ（２０ｍｇ／ｍＬ　トリプトファン）中で増殖した。ｓｃＴＣＲ分泌を誘導するため、細胞を４０００×ｇでの遠心分離によってペレット化し、１ｍｇ／ｍｌＢＳＡを補充した１リットルのＳＧ－ＣＡＡ／Ｔｒｐ中に再懸濁し、そして２０℃で７２時間インキュベートした。培養上清を４０００×ｇでの遠心分離によって回収し、約５０ｍｌに濃縮し、そしてＰＢＳ、ｐＨ８．０に対して透析した。６Ｈｉｓ－タグ化ｓｃＴＣＲを、ネイティブなニッケルアフィニティークロマトグラフィー（Ｎｉ－ＮＴＡ　Ｓｕｐｅｒｆｌｏｗ，Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ；５ｍＭおよび２０ｍＭ　イミダゾール、ｐＨ８．０洗浄；２５０ｍＭイミダゾール溶出）によって精製した［Ｓｈｕｓｔａら（１９９９）前出］。

【００８０】

（実施例４．細胞結合アッセイ）

ＱＬ９／Ｌ^{d}に対する可溶性ｓｃＴＣＲの結合を、以前に記載した競合様式でモニターした［Ｍａｎｎｉｎｇら（１９９８）前出；Ｓｙｋｕｌｅｖら（１９９４）前出］。ペプチド－上方制御（アップレギュレート）Ｔ２－Ｌ^{d}細胞（３×１０^{5}／ウェル）を、^{125}Ｉ標識化抗Ｌ^{d}Ｆａｂｓ（３０－５－７）および種々の濃度のｓｃＴＣＲの存在下で、氷上で１時間インキュベートした。結合および未結合の^{125}Ｉ３０－５－７Ｆａｂをオリーブオイル／ジブチルフタラートによる遠心分離によって分離した。阻害曲線を作成し、最大阻害の５０％を生じるインヒビター濃度を決定した。解離定数をＣｈｅｎｇおよびＰｕｒｓｏｆｆの式を用いて算出した［Ｃｈｅｎｇ（１９７３）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍ．２２：３０９９～３１０８］。細胞結合ｐＭＨＣに対するｓｃＴＣＲの直接結合をモニターするため、ペプチド－アップレギュレートＴ２－Ｌ^{d}細胞（５×１０^{5}／チューブ）を、ビオチン化可溶性ｓｃＴＣＲとともに、氷上で４０分間インキュベートし、続いてストレプトアビジン－フィコエリトリン（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を用いて３０分間染色した。フローサイトメトリーによって細胞蛍光を検出した。

【００８１】

（実施例５．異なるペプチドおよび異なるＭＨＣ分子（Ｋ^{b}）について特異的である高親和性ＴＣＲの同定）

ＴＣＲのＣＤＲ３α領域の酵母ディスプレイ変異体の同じライブラリーを用いて、異なるＭＨＣ分子に対して結合した異なるペプチドになお特異的である、より親和性の高いＴＣＲについて選択することが可能であった。この場合、ＳＩＹＲと呼ばれるペプチド（Ｓ

ＩＹＲＹＹＧＬ（配列番号５））を、Ｋ^{b}と呼ばれるＭＨＣ分子に結合し、そしてこのリガンド複合体を、蛍光形態中で用いて、フローサイトメトリーにより選択した。高い親和性のＴＣＲを発現する１６のクローンを、配列決定した。各々のクローンは、ＣＤＲ３α領域において異なる配列を示した（表２）。

【００８２】

これらのＴＣＲの特異性の例として、変異３ＳＱ２を、二次試薬単独（ＳＡ：ＰＥ）、抗－Ｖβ抗体Ｆ２３．２および３つのペプチド／Ｋ^{b}複合体（ＯＶＡ／Ｋ^{b}，ｄＥＶ８／Ｋ^{b}、およびＳＩＹＲ／Ｋ^{b}）を含む、種々の因子で染色した。図５に示すように、元来の選択に用いたｐＭＨＣ（ＳＩＹＲ／Ｋ^{b}）のみが、変異ＴＣＲに対して結合するのに十分な親和性を有した。野生型ＴＣＲは、試験したいずれの濃度でもＳＩＹＲ／Ｋ^{b}リガンドに結合しなかった（データ示さず）。

【００８３】

変異ＴＣＲ３ＳＱ２はまた、酵母分泌系における可溶性タンパク質として発現され、そして、それが腫瘍細胞の表面上のｐＭＨＣに直接結合する能力についてビオチン化後に試験された。図６に示すように、標識化した３ＳＱ２は、適切なペプチドＳＩＹＲのみを発現した腫瘍細胞に非常によく結合した。染色は、ペプチドの存在にかかわらず、任意のＫ^{b}分子に結合する（図６）高親和性抗Ｋ^{b}モノクローナル抗体Ｂ８．２４．３とほぼ同じ強度であった。

【００８４】

（実施例６．同じＭＨＣ分子（Ｋ^{b}）に結合した異なるペプチドについて特異的である高親和性ＴＣＲの同定）

同じＴＣＲ足場が、同じＭＨＣに対して結合した異なるペプチドに対しても、より高い親和性の形態を単離するために用いられ得るか否かを決定するため、本発明者らは、Ｋ^{b}に結合した、ｄＥＶ８（ＥＱＹＫＦＹＳＶ（配列番号６））と呼ばれるペプチドを用いてＴＣＲ　ＣＤＲ３αライブラリーをスクリーニングした。ビオチン化ｄＥＶ８／Ｋ^{b}リガンド（その後、フィコエリトリン－ストレプトビアジン，ＰＥ－ＳＡ）を用いたフローサイトメトリーによるいくつかのソート後、ｄＥＶ８／Ｋ^{b}に結合した酵母細胞の有意な富化が存在した（図７においてＰＥレベルによって示されるように）。

【００８５】

ｄＥＶ８／Ｋ^{b}での選択によって単離されたクローンのうち６つを配列決定したところ、ＣＤＲ３配列は全て異なっていた（表３）。これらの配列は類似であったが、ＳＩＹＲ／Ｋ^{b}を用いた選択によって単離されたクローンの配列とは異なっていた（２つの例である、３ＳＱ２および３ＳＱ５をまた、表３に示す）。同じＴＣＲライブラリーの変異体を用いてさえ、異なる抗原に対して、より高い親和性のＴＣＲを単離することが可能であると結論できる。

【００８６】

単離されたクローンの抗原特異性を証明するため、ｄＥＶ８／Ｋ^{b}選択クローンのうちの１つ（４ｄ１）を、異なる抗体およびリガンドのパネルを用いて試験した（図６）。予期された通り、このＴＣＲは、３つの適切な抗体（抗－Ｖβ８抗体　Ｆ２３．２，抗ＨＡタグ　抗体、および抗Ｈｉｓ　タグ抗体）、およびｄＥＶ８／Ｋ^{b}抗原とは反応するが、他の抗原、ＯＶＡ／Ｋ^{b}とは反応しない。野生型TCRは、ペプチドＫ^{b}複合体のいずれとも結合しない（データ示さず）。このように、高い親和性のＴＣＲは、選択された抗原に特異的であった。

【００８７】

（実施例７．ＴＣＲの異なる領域（β鎖の相補性決定領域３）においてランダムなＴＣＲライブラリーを作成することによる、高親和性ＴＣＲの同定）

上記の本実施例は、ＣＤＲ３と呼ばれるα鎖の領域内で変異したＴＣＲのライブラリーを用いた。ＴＣＲの他の領域がまた、より高い親和性のＴＣＲを生成するように変異され得ることを示すため、β鎖のＣＤＲ３領域の５連続アミノ酸残基内のランダム変異のライブラリーを、出発物質としてｑＬ２　ＴＣＲ変異体を用いて、生成した。次いで、このラ

イブラリーを、ｑＬ２変異体で検出した濃度以下のＱＬ９／Ｌ^{d}リガンドで選択した。５つの酵母クローン（フローサイトメトリーによって選択した）を配列決定したところ、各々は、異なるヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示した（図８）。変異された５つのアミノ酸領域内には配列の顕著な保存が存在しており、このことは、この配列モチーフが高い親和性について最適であったことを示唆していた。本発明者らは、特定のｐＭＨＣに対して、より高い親和性を有する誘導体を生じるためにＴＣＲの異なる領域を変異することが可能であると結論付ける。

【００８８】

上記の詳細な説明は、多くの特殊性を含み、これらは、本発明の範囲を限定するように解釈されるべきではなく、単に、本発明の現在の好適な実施形態のいくつかの例示を提供するだけである。例えば、特別に例示されたリガンド以外のリガンドが用いられてもよい。従って、本発明の範囲は、示された実施例によってではなく、添付の特許請求の範囲およびその法的な等価物によって決定されるべきである。本明細書に引用される全ての参考文献は、本明細書における開示と矛盾しない程度まで援用される。

【００８９】

【表１】

表1. 2C TCR CDR3α の構造および配列

野生型 TCR	VαCDR3
2C	^{93}SGFASAL^{104} (配列番号7)

変異体 TCR	VαCDR3	変異体 TCR	VαCDR3
q2r	SSYGNYL (配列番号8)	q1r	SLPPPLL (配列番号17)
q4r	SRRGHAL (配列番号9)	q3r	SIPTPSL (配列番号18)
q5r	SSRGTAL (配列番号10)	qL6	SNPPPLL (配列番号19)
q6r	SHFGTRL (配列番号11)	qL7	SDPPPLL (配列番号20)
qL1	SMFGTRL (配列番号12)	qL8	SSPPPRL (配列番号21)
qL2	SHQGRYL (配列番号13)	qL10	SAPPPIL (配列番号22)
qL3	SYLGLRL (配列番号14)		
qL4	SKHGIHL (配列番号15)		
qL5	SLTGRYL (配列番号16)		

ＱＬ９／Ｌ^{d}による酵母ディスプレイおよび選択によって単離された変異体ｓｃＴＣＲのアミノ酸配列の整列化。ディスプレイプラスミドは、選択後に酵母クローンから単離され、そしてＣＤＲ３αの配列を決定するために配列決定した。変異体ｍ１、ｍ２、ｍ３、ｍ４、ｍ１０およびｍ１１は、３回目の選別後に単離された。全ての他の変異体は、４回目の選別後に単離された。

【００９０】

【表２】

表2. SIYR/K^{b}結合剤(3SQ2, 3SQ5)：CDR3の配列

•3SQ5	SGTHPFL（配列番号23）
SK7	SGHLPFL（配列番号24）
K5r	SDSKPFL（配列番号25）
K4r	SSDRPYL（配列番号26）
SK8	SLERPYL（配列番号27）
SK2	SREAPYL（配列番号28）
K3r	SLHRPAL*（配列番号29）
3SQ2	SLHRPAL*（配列番号30）
SK10	SSNRPAL（配列番号31）
K1r	STDRPSL（配列番号32）
K2r	SGSRPTL（配列番号33）
•SK3	SLVTPAL（配列番号34）
SK1	SATSPAL（配列番号35）
SK9	SSINPAL（配列番号36）
SK4	SASYPSL（配列番号37）
•3SQ1	SRWTSGL（配列番号38）
•コンセンサス	SGSRPAL（配列番号39）

【００９１】

【表３】

表３　dEV8/K^b(4d1, 4d2, 3Sd3, 3dS6, 3dS2, 3d2)およびSIYR/K^b
に対して高い親和性を有するVαCDR3変異配列の整列化

プローブ	CDR3α
4d1	SLTHHFL（配列番号40）
4d2	SMTHHFL（配列番号41）
3Sd3	SLSRPYL（配列番号42）
3dS6	SLTRPYL（配列番号43）
3dS2	STYRHYL（配列番号44）
3d2	SGLARPL（配列番号45）
3SQ2	SLHRPAL（配列番号46）
3SQ5	SGTHPFL（配列番号47）

【００９２】
【表４】

表４　CDRα3酵母ライブラリー由来のQL9/L^{d} に対する高い親和性について選択された変異体scTCRのVβCDR3配列の整列化

クローン	CDR3β
WT 2C	GGGGTLY（配列番号48）
QB2	GGGGVLY（配列番号49）
QB4	GLGGILY（配列番号50）
QB6/8	GQGGVLY（配列番号51）
QB7	GSGGIIY（配列番号52）
QB9	GGGGILY（配列番号53）

クローン	95	96	97	98	105	106	107
WT 2C	GGT	GGG	GGG	GGC	ACC	TTG	TAC
QB2	GGT	GGG	GGG	GGG	GTG	TTG	TAC
QB4	GGT	TTG	GGG	GGG	ATC	CTC	TAC
QB6/8	GGT	CAG	GGC	GGG	GTG	TTG	TAC
QB7	GGT	TCG	GGG	GGG	ATC	ATC	TAC
QB9	GGT	GGC	GGG	GGG	ATC	TTG	TAC

すべてqL2CDR3αを有する.（SHQGRYL（配列番号13））

QB1/5=wt　　QB3は配列決定されていない.

【図面の簡単な説明】

【図１】

図１は、野生型および変異型２Ｃ　ＴＣＲをそれらの表面に発現する酵母細胞のフローサイトメトリー分析を示す。野生型（Ｔ７）および変異型（ｑＬ２、ｑＬ７）ｓｃＴＣＲを示す酵母細胞は、抗Ｖβ８抗体Ｆ２３．２（１２０ｎＭ）、特異的な同種抗原ペプチドのＭＨＣ、ＱＬ９／Ｌ^{d}／Ｉｇ（４０ｎＭ）、または無ペプチドＭＣＭＶ（配列番号１）／Ｌ^{d}／Ｉｇ（４０ｎＭ）で染色した。結合をＦＩＴＣ結合体化ヤギ抗マウスＩｇＧ　Ｆ（ａｂ’）$_{2}$によって検出し、そして、フローサイトメトリーによって分析した。ネガティブ集団（例えば、Ｆ２３．２染色でみられるような）は、すべての酵母のディスプレイされたタンパク質について観察され、そして、表面融合タンパク質を発現し得ない、増殖または誘導の段階の細胞に起因すると考えられている（Ｋｉｅｋｅら、（１９９９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９６：５６５１－５６５６；Ｂｏｄｅｒお

よびＷｉｔｔｒｕｐ（１９９７）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１５：５５３－５５７；Ｋｉｅｋｅら、（１９９７）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ １０：１３０３－１３１０）。

【図２】

図２は、L^dに結合された異なったＱＬ９改変体ペプチドに対する変異体ｓｃＴＣＲの結合の優れた特異性分析を示す。本来のＴ細胞クローン２Ｃおよび種々の酵母クローンを、野生型ＱＬ９（Ｐ５Ｆ）、ＱＬ９の位置５の改変体（Ｐ５Ｙ、Ｐ５Ｈ、Ｐ５Ｅ）またはＭＣＭＶ（配列番号１）でロードしたL^d／Ｉｇ二量体への結合について、フローサイトメトリーによって分析した。結合をＦＩＴＣ標識化したヤギ抗マウスＩｇＧを用いて検出した。相対的な蛍光を２つの異なったアプローチによって測定した。Ｔ細胞クローン２Ｃについては、種々のペプチド／L^dＩｇ二量体の結合を、ＱＬ９／L^d染色（MFU_{pMHC}／MFU_{QL9-Ld}）に対して調整した。酵母細胞について、各ペプチド／L^d二量体の結合を、抗Ｖβ８抗体Ｆ２３．２（MFU_{pMHC}／$MFU_{F23.2}$）による結合に対して調整した。後者は、異なった変異体が、野生型ＱＬ９／L^dに対する結合についてお互いに比較されるのを可能とした。

【図３】

図３は、可溶性ｓｃＴＣＲによるＱＬ９／L^d結合を示す。ＱＬ９を用いてロードしたＴ２－L^d細胞を^{125}Ｉ標識化した抗L^dＦａｂフラグメントおよび種々の濃度の未標識化のＦａｂ（黒菱形）、ｓｃＴＣＲ－Ｔ７（黒四角）、または変異体ｓｃＴＣＲ－ｑＬ２（黒丸）と共にインキュベートした。結合したおよび未結合の^{125}Ｉ　３０－５－７　Ｆａｂフラグメントを、オリーブ油／ヂブチルフタレートを介して、遠心分離によって分離した。コントロールペプチドＭＣＭＶ（配列番号１）を用いてロードしたＴ２－L^d細胞に対する^{125}Ｉ標識化した抗L^dＦａｂフラグメントのＴ２－L^d細胞に対する結合は、ｓｃＴＣＲの最も高い濃度においてさえ阻害されなかった（データは示されていない）。

【図４Ａ】

図４Ａは、細胞表面ペプチド／ＭＨＣへのｓｃＴＣＲ／ビオチンの結合のフローサイトメトリー分析を示す。ペプチド－ロードしたＴ２－L^d細胞を、ビオチン標識化したｑＬ２ｓｃＴＣＲ（約０．３μＭ）またはＴ７ｓｃＴＣＲ（約１．６μＭ）ｓｃＴＣＲと共にインキュベートし、その後、ストレプトアビジン－ＰＥと共にインキュベートし、フローサイトメトリーによって分析した。図４Ａ：ＱＬ９（影なし）、ｐ２Ｃａ（軽い影付き）、またはＭＣＭＶ（配列番号１）（暗い影付き）を用いてロードし、そしてｑＬ２ｓｃＴＣＲ／ビオチンで染色したＴ２－L^d細胞のフローサイトメトリーヒストグラム。図４Ｂ：ＱＬ９、ｐ２Ｃａ、またはＭＣＭＶ（配列番号１）を用いてロードし、そして第２のＳＡ－ＰＥのみ、Ｔ７ｓｃＴＣＲ／ビオチン＋ＳＡ－ＰＥ、またはｑＬ２ｓｃＴＣＲ／ビオチン＋ＳＡ－ＰＥのいずれかで染色したＴ２－L^d細胞の平均蛍光単位（ＭＦＵ）。図４Ｃ：昆虫細胞から発現された変異体ｑＬ２の可溶性の高い親和性形態は、非常に低い濃度のペプチド－ＭＨＣ複合体を検出し得る。L^d複合体は、３７℃で１．５時間、種々の濃度のＱＬ９ペプチドを用いてインキュベーションによってＴ２－L^d細胞（3×10^6／ｍｌ）の表面上で上方制御された。約2×10^5細胞をトランスフェクトされたＤｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ（昆虫）ＳＣ２細胞由来のＴＣＲを用いて、３０分間氷上で染色した（Ｇａｒｃｉａ，Ｋ．Ｃ．ら、（１９９７）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９４（２５）、１３８３８－１３８４３）。次いで、細胞を洗浄し、そしてストレプトアビジン－ＰＥが後に続く、ビオチン標識化した抗Ｖｂ ＩｇＧ（Ｆ２３．１）で染色し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。

【図４Ｂ】

図４Ｂは、細胞表面ペプチド／ＭＨＣへのｓｃＴＣＲ／ビオチンの結合のフローサイトメトリー分析を示す。ペプチド－ロードしたＴ２－L^d細胞を、ビオチン標識化したｑＬ２ｓｃＴＣＲ（約０．３μＭ）またはＴ７ｓｃＴＣＲ（約１．６μＭ）ｓｃＴＣＲと共にインキュベートし、その後、ストレプトアビジン－ＰＥと共にインキュベートし、フローサイトメトリーによって分析した。図４Ａ：ＱＬ９（影なし）、ｐ２Ｃａ（軽い影付き）

、またはＭＣＭＶ（配列番号１）（暗い影付き）を用いてロードし、そしてｑＬ２ｓｃＴＣＲ／ビオチンで染色したＴ２－Ｌ^{d}細胞のフローサイトメトリーヒストグラム。図４Ｂ：ＱＬ９、ｐ２Ｃａ、またはＭＣＭＶ（配列番号１）を用いてロードし、そして第２のＳＡ－ＰＥのみ、Ｔ７ｓｃＴＣＲ／ビオチン＋ＳＡ－ＰＥ、またはｑＬ２ｓｃＴＣＲ／ビオチン＋ＳＡ－ＰＥのいずれかで染色したＴ２－Ｌ^{d}細胞の平均蛍光単位（ＭＦＵ）。図４Ｃ：昆虫細胞から発現された変異体ｑＬ２の可溶性の高い親和性形態は、非常に低い濃度のペプチド－ＭＨＣ複合体を検出し得る。Ｌ^{d}複合体は、３７℃で１．５時間、種々の濃度のＱＬ９ペプチドを用いてインキュベーションによってＴ２－Ｌ^{d}細胞（３×１０^{6}／ｍｌ）の表面上で上方制御された。約２×１０^{5}細胞をトランスフェクトされたＤｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ（昆虫）ＳＣ２細胞由来のＴＣＲを用いて、３０分間氷上で染色した（Ｇａｒｃｉａ，Ｋ．Ｃ．ら、（１９９７）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　９４（２５）、１３８３８－１３８４３）。次いで、細胞を洗浄し、そしてストレプトアビジン－ＰＥが後に続く、ビオチン標識化した抗Ｖｂ　ＩｇＧ（Ｆ２３．１）で染色し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。

【図４Ｃ】

図４Ｃは、細胞表面ペプチド／ＭＨＣへのｓｃＴＣＲ／ビオチンの結合のフローサイトメトリー分析を示す。ペプチドーロードしたＴ２－Ｌ^{d}細胞を、ビオチン標識化したｑＬ２ｓｃＴＣＲ（約０．３μＭ）またはＴ７ｓｃＴＣＲ（約１．６μＭ）ｓｃＴＣＲと共にインキュベートし、その後、ストレプトアビジン－ＰＥと共にインキュベートし、フローサイトメトリーによって分析した。図４Ａ：ＱＬ９（影なし）、ｐ２Ｃａ（軽い影付き）、またはＭＣＭＶ（配列番号１）（暗い影付き）を用いてロードし、そしてｑＬ２ｓｃＴＣＲ／ビオチンで染色したＴ２－Ｌ^{d}細胞のフローサイトメトリーヒストグラム。図４Ｂ：ＱＬ９、ｐ２Ｃａ、またはＭＣＭＶ（配列番号１）を用いてロードし、そして第２のＳＡ－ＰＥのみ、Ｔ７ｓｃＴＣＲ／ビオチン＋ＳＡ－ＰＥ、またはｑＬ２ｓｃＴＣＲ／ビオチン＋ＳＡ－ＰＥのいずれかで染色したＴ２－Ｌ^{d}細胞の平均蛍光単位（ＭＦＵ）。図４Ｃ：昆虫細胞から発現された変異体ｑＬ２の可溶性の高い親和性形態は、非常に低い濃度のペプチド－ＭＨＣ複合体を検出し得る。Ｌ^{d}複合体は、３７℃で１．５時間、種々の濃度のＱＬ９ペプチドを用いてインキュベーションによってＴ２－Ｌ^{d}細胞（３×１０^{6}／ｍｌ）の表面上で上方制御された。約２×１０^{5}細胞をトランスフェクトされたＤｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ（昆虫）ＳＣ２細胞由来のＴＣＲを用いて、３０分間氷上で染色した（Ｇａｒｃｉａ，Ｋ．Ｃ．ら、（１９９７）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　９４（２５）、１３８３８－１３８４３）。次いで、細胞を洗浄し、そしてストレプトアビジン－ＰＥが後に続く、ビオチン標識化した抗Ｖｂ　ＩｇＧ（Ｆ２３．１）で染色し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。

【図５】

図５は、ストレプトアビジン－ＰＥが続く、ビオチン標識化したペプチド／ＭＨＣ複合体、ＯＶＡ／Ｋ^{b}、ｄＥＶ８／Ｋ^{b}またはＳＩＹＲ（配列番号２）／Ｋ^{b}を用いて染色した変異体ｓｃＴＣＲ（３ＳＱ２と呼ばれる）を示す酵母のフローサイトメトリーヒストグラムを示す。ｓｃＴＣＲの存在についてのポジティブコントロールとして、酵母を、ＦＩＴＣヤギ抗マウスＦ（ａｂ’）$_{2}$が続く、Ｖβ特異的Ｉｇ、Ｆ２３．２で染色した。

【図６】

図６は、Ｔ２－Ｋ^{b}腫瘍細胞を特定のペプチド（ＯＶＡ、ｄＥＶ８またはＳＩＹＲ（配列番号２））と共にインキュベートし、そしてストレプトアビジン－ＰＥが続く、ビオチン標識化した可溶性ｓｃＴＣＲ、３ＳＱ２で染色し、フローサイトメトリーによって分析したことを示す。Ｋ^{b}細胞の存在についてのポジティブコントロールとして、Ｔ２－Ｋ^{b}細胞をビオチン標識化した抗体Ｂ８．２４．３（これは、結合されたペプチドに関わらずＫ^{b}を認識する）を用いて染色した。

【図７】

図７は、ｄＥＶ８／Ｋ^{b}を用いる複数回の仕分け後、酵母ＶαＣＤＲ３ライブラリーを、ストレプトアビジン－ＰＥが続く、ビオチン標識化したｄＥＶ８／Ｋ^{b}で染色し、そし

てフローサイトメトリーによって分析したことを示す。

【図８】

図８は、ビオチン標識化したストレプトアビジン－ＰＥを用いる染色が続く、ビオチン標識化したペプチド／ＭＨＣ複合体、ＯＶＡ／Ｋ^{b}またはｄＥＶ８／Ｋ^{b}で染色した変異体ｓｃＴＣＲ（４ｄ１と呼ばれる）を示す酵母のフローサイトメトリーヒストグラムを示す。ポジティブコントロールとして、酵母を、Ｆ２３，２Ｉｇを用いてｓｃＴＣＲ Ｖβの存在について分析し、そして抗６Ｈｉｓ抗体または抗ＨＡ Ｉｇ、１２ＣＡ５を用いてエピトープタグについて分析した。

【図９】

図９は、変異体Ｔ細胞レセプターｑＬ２を用いてトランスフェクトしたＴ細胞は、低濃度でペプチドＭＨＣを発現する標的細胞を認識し、そしてそれによって刺激され得ることを示す。Ｔ細胞ハイブリドーマ細胞株５８－／－（Ｌｅｔｏｕｒｎｅｕｒ，Ｆ．，およびＢ．Ｍａｌｉｓｓｅｎ．（１９８９）Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １９（１２）、２２６９－７４）を野生型（２Ｃ）または変異型（ｑＬ２）ＴＣＲを用いてトランスフェクトし、そして１ウェルあたり７．５×１０^{4}個のトランスフェクトされた細胞をＱＬ９ペプチドの存在下で、Ｔ２－Ｌ^{d}細胞（７．５×１０^{4}ウェル）と共に３７℃でインキュベートした。約３０時間後、上清を回収し、そして、Ｔ細胞によって放出されたＩＬ－２についてアッセイした：上清をＩＬ－２依存性細胞株、ＨＴ２（５×１０^{3}／ウェル）と共に３７℃で１８時間インキュベートした。ＨＴ２細胞の増殖を３［Ｈ］チミジンの取り込みによって測定した。平均ＣＰＭは、３連ウェルの平均を示す。ＱＬ９ペプチドの非存在下では、ＩＬ－２は全く放出されなかった（データは示されていない）。

【００９３】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS

<120> HIGH AFFINITY TCR PROTEINS AND METHODS

<130> F1-02502D03

<140> JP 2001-548658

<141> 2000-12-06

<150> US 60/169,179

<151> 1999-12-06

<160> 53

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 1

Met Cys Met Val
1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 2

Ser Ile Tyr Arg
1

<210> 3

<211> 24

<212> PRT

<213> ARTIFICAL SEQUENCE

<400> 3

Gly Gly Cys AlaGly Cys Cys Cys Cys Ala Thr Ala Ala Ala Cys Ala
1 5 10 15

Cys Ala Cys AlaGly Thr Ala Thr
20

<210> 4

<211> 74

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 4

Cys Thr Thr ThrThr Gly Thr Gly Cys Cys Gly Gly Ala Thr Cys Cys
1 5 10 15

Ala Ala Ala ThrGly Thr Cys Ala Gly Ser Asn Asn Ser Asn Asn Ser
20 25 30

Asn Asn Ser AsnAsn Ser Asn Asn Gly Cys Thr Cys Ala Cys Ala Gly
35 40 45

Cys Ala Cys AlaGly Ala Ala Gly Thr Ala Cys Ala Cys Gly Gly Cys
50 55 60

Cys Gly Ala GlyThr Cys Gly Cys Thr Cys
65 70

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 5

Ser Ile Tyr ArgTyr Tyr Gly Leu
1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 6

Glu Gln Tyr LysPhe Tyr Ser Val
1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 7

Ser Gly Phe Ala Ser Ala Leu
1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 8

Ser Ser Tyr GlyAsn Tyr Leu
1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICAL SEQUENCE

<400> 9

Ser Arg Arg GlyHis Ala Leu
1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 10

Ser Ser Arg Gly Thr Ala Leu
1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 11

Ser His Phe GlyThr Arg Leu
1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 12

Ser Met Phe GlyThr Arg Leu
1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 13

Ser His Gln GlyArg Tyr Leu
1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 14

Ser Tyr Leu GlyLeu Arg Leu
1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICAL SEQUENCE

<400> 15

Ser Lys His GlyIle His Leu
1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 16

Ser Leu Thr GlyArg Tyr Leu
1 5

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 17

Ser Leu Pro ProPro Leu Leu
1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 18

Ser Ile Pro ThrPro Ser Leu
1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 19

Ser Asn Pro ProPro Leu Leu
1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 20

Ser Asp Pro ProPro Leu Leu
1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 21

Ser Ser Pro ProPro Arg Leu
1 5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 22

Ser Ala Pro ProPro Ile Leu
1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 23

Ser Gly Thr HisPro Phe Leu
1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 24

Ser Gly His LeuPro Phe Leu
1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 25

Ser Asp Ser LysPro Phe Leu
1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 26

Ser Ser Asp Arg Pro Tyr Leu
1 5

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 27

Ser Leu Glu ArgPro Tyr Leu
1 5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 28

Ser Arg Glu AlaPro Tyr Leu
1 5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 29

Ser Leu His ArgPro Ala Leu
1 5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 30

Ser Leu His ArgPro Ala Leu
1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 31

Ser Ser Asn ArgPro Ala Leu
1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 32

Ser Thr Asp ArgPro Ser Leu
1 5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 33

Ser Gly Ser ArgPro Thr Leu
1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 34

Ser Leu Val ThrPro Ala Leu
1 5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 35

Ser Ala Thr SerPro Ala Leu
1 5

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 36

Ser Ser Ile AsnPro Ala Leu
1 5

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 37

Ser Ala Ser TyrPro Ser Leu
1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 38

Ser Arg Trp Thr Ser Gly Leu
1 5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 39

Ser Gly Ser ArgPro Ala Leu
1 5

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 40

Ser Leu Thr HisHis Phe Leu
1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 41

Ser Met Thr HisHis Phe Leu
1 5

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 42

Ser Leu Ser ArgPro Tyr Leu
1 5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 43

Ser Leu Thr Arg Pro Tyr Leu
1 5

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 44

Ser Thr Tyr ArgHis Tyr Leu
1 5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 45

Ser Gly Leu AlaArg Pro Leu
1 5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 46

Ser Leu His ArgPro Ala Leu
1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 47

Ser Gly Thr HisPro Phe Leu
1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 48

Gly Gly Gly GlyThr Leu Tyr
1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 49

Gly Gly Gly GlyVal Leu Tyr
1 5

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 50

Gly Leu Gly GlyIle Leu Tyr
1 5

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 51

Gly Gln Gly GlyVal Leu Tyr
1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 52

Gly Ser Gly GlyIle Ile Tyr
1 5

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<400> 53

Gly Gly Gly GlyIle Leu Tyr
1 5