

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-523437

(P2006-523437A)

(43) 公表日 平成18年10月19日(2006.10.19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 7
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-570696 (P2004-570696)	(71) 出願人	505121578
(86) (22) 出願日	平成15年11月25日 (2003.11.25)		アヴィデックス リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年7月25日 (2005.7.25)		A V I D E X L T D
(86) 国際出願番号	PCT/GB2003/005104		イギリス、オーエックス14 4アールエ
(87) 国際公開番号	W02004/050705		ックス アビンドン、ミルトン パーク
(87) 国際公開日	平成16年6月17日 (2004.6.17)		57シー
(31) 優先権主張番号	0228112.9		57C Milton Park, Abi
(32) 優先日	平成14年12月3日 (2002.12.3)		ngdon OX14 4RX, Unit
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		ed Kingdom
(31) 優先権主張番号	0304090.4	(74) 代理人	100065248
(32) 優先日	平成15年2月22日 (2003.2.22)		弁理士 野河 信太郎
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(72) 発明者	ヤコブセン, ベント, カルステン
(31) 優先権主張番号	0308309.4		イギリス、オーエックス14 4アールエ
(32) 優先日	平成15年4月10日 (2003.4.10)		ックス アビンドン、ミルトン パーク
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		57シー、アヴィデックス リミテッド
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レセプター複合体

(57) 【要約】

非ペプチド性ポリマー鎖によるか又はペプチド性リンカー配列により連結した少なくとも2つのTCRを含む多価T細胞レセプター(TCR)複合体。好ましくは、本TCR複合体は、定常ドメイン残基間の非天然型ジスルフィド結合を有するTCRヘテロ二量体を含み、このTCRは、任意に置換されていてもよいポリアルキレングリコールリンカーを介して連結されている。治療用物質(例えば、細胞傷害性薬物)が、標的付けられた細胞送達のために、そのような複合体に付着され得る。そのようなTCR複合体は、ガン、感染性疾患又は自己免疫疾患の診断又は処置に使用され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非ペプチド性ポリマー鎖又はペプチド性リンカー配列により連結された少なくとも 2 つの TCR を含む多価 T 細胞レセプター (TCR) 複合体。

【請求項 2】

前記 TCR が天然型 TCR の細胞外定常領域配列及び可変領域配列に対応するアミノ酸配列によって構成される請求項 1 に記載の TCR 複合体。

【請求項 3】

前記ポリマー鎖又はペプチド性リンカー配列が、各 TCR のアミノ酸残基であって該 TCR の可変領域配列中に位置しないもの同士の間伸びている請求項 1 又は 2 に記載の TCR 複合体

10

【請求項 4】

前記 TCR が、ポリアルキレングリコール鎖によるか又はヒト多量体化ドメインに由来するペプチド性リンカーにより連結されている請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の TCR 複合体。

【請求項 5】

二価アルキレンスパーサー基が前記ポリアルキレングリコール鎖とその前記複合体の TCR への付着点との間に位置する請求項 4 に記載の TCR 複合体。

【請求項 6】

前記二価アルキレンスパーサーが -CH₂- 又は -CH₂CH₂- である請求項 5 に記載の TCR 複合体。

20

【請求項 7】

前記ポリアルキレングリコール鎖がポリエチレングリコール (PEG) 鎖である請求項 5 又は 6 に記載の TCR 複合体。

【請求項 8】

二価である請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の TCR 複合体。

【請求項 9】

三価である請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の TCR 複合体。

【請求項 10】

四価である請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の TCR 複合体。

30

【請求項 11】

2 つの TCR が直鎖状 PEG 鎖により連結されている請求項 7 に記載の TCR 複合体。

【請求項 12】

2 より多い TCR が分枝した直鎖状 PEG 鎖により連結されている請求項 7 に記載の TCR 複合体。

【請求項 13】

3 又は 4 の TCR が分枝状 PEG 鎖により連結されている請求項 7 に記載の TCR 複合体。

【請求項 14】

少なくとも 1 つの TCR が単鎖 T 細胞レセプター (scTCR) ポリペプチドである請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の TCR 複合体。

40

【請求項 15】

前記 scTCR が天然型 TCR 鎖中に存在する細胞外定常領域配列及び可変領域配列に対応する TCR アミノ酸配列並びにリンカー配列により構成され、

該リンカーが天然型 TCR の 1 つの鎖のそれに対応する可変領域配列を、別の天然型 TCR 鎖の定常領域配列に対応する定常領域配列に連結し、

該 scTCR ポリペプチドの可変領域配列が天然型 TCR 中と実質的に同様に互いに配向し、そして

天然型 T 細胞レセプター中に等価物を有しないジスルフィド結合が該ポリペプチドの残基同士を連結している請求項 14 に記載の TCR 複合体。

【請求項 16】

50

前記 scTCRポリペプチドが、

TCR 鎖定常領域細胞外配列に対応するアミノ酸配列の N 末端に融合した TCR 鎖又は鎖の可変領域配列に対応するアミノ酸配列によって構成される第 1 のセグメント、

TCR 鎖定常領域細胞外配列に対応するアミノ酸配列の N 末端に融合した TCR 鎖又は鎖の可変領域に対応するアミノ酸配列によって構成される第 2 のセグメント、

第 1 のセグメントの C 末端を第 2 のセグメントの N 末端と連結するか、又はその逆に連結するリンカー配列、及び

第 1 の鎖と第 2 の鎖との間の、天然型の 又は の T 細胞レセプター中に等価物を有さないジスルフィド結合を有し、

該リンカー配列の長さ及び該ジスルフィド結合の位置は、第 1 のセグメント及び第 2 のセグメントの可変領域配列が天然型の 又は の T 細胞レセプター中と実質的に同様に互いに配向するような長さ及び位置である請求項 15 に記載の TCR 複合体。 10

【請求項 17】

前記リンカー配列が式 - P - AA - P - (式中、P はプロリンであり、AA はアミノ酸がグリシン及びセリンであるアミノ酸配列を表す)を有する請求項 16 に記載の TCR 複合体。

【請求項 18】

前記リンカー配列が第 1 のセグメントの C 末端を第 2 のセグメントの N 末端に連結する請求項 16 又は 17 に記載の TCR 複合体。

【請求項 19】

前記リンカー配列が 26 ~ 41 アミノ酸からなる請求項 18 に記載の TCR 複合体。 20

【請求項 20】

前記リンカー配列が 29、30、31 又は 32 アミノ酸からなる請求項 18 に記載の TCR 複合体。

【請求項 21】

前記リンカー配列が 33、34、35 又は 36 アミノ酸からなる請求項 18 に記載の TCR 複合体。

【請求項 22】

前記リンカー配列が式 - PGGG - (SGGGG)₅ - P - (式中、P はプロリンであり、G はグリシンであり、S はセリンである)を有する請求項 18 に記載の TCR 複合体。

【請求項 23】

前記リンカー配列が式 - PGGG - (SGGGG)₆ - P - (式中、P はプロリンであり、G はグリシンであり、S はセリンである)を有する請求項 18 に記載の TCR 複合体。 30

【請求項 24】

少なくとも 1 つの TCR が二量体 T 細胞レセプター (dTCR) ポリペプチド対である請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の TCR 複合体。

【請求項 25】

各 TCR が二量体 T 細胞レセプター (dTCR) ポリペプチド対である請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の TCR 複合体。

【請求項 26】

前記 dTCR ポリペプチド対又はその各々が、天然型 TCR 鎖中に存在する細胞外定常領域配列及び可変領域配列に対応する TCR アミノ酸配列によって構成され、該可変領域配列同士が天然型 TCR 中と実質的に同様に互いに配向している請求項 24 又は 25 に記載の TCR 複合体 40

【請求項 27】

前記 dTCR ポリペプチド対又はその各々が

TCR 鎖又は鎖の可変領域配列に対応する配列が TCR 鎖定常領域細胞外配列に対応する配列の N 末端に融合している第 1 のポリペプチド、

TCR 鎖又は鎖の可変領域配列に対応する配列が TCR 鎖定常領域細胞外配列に対応する配列の N 末端に融合している第 2 のポリペプチド

によって構成され、第 1 のポリペプチド及び第 2 のポリペプチドが、天然型の 又は の T 細胞レセプター中に等価物を有しないジスルフィド結合により連結されている請求項 26 に記載の TCR 複合体。

【請求項 28】

前記 scTCRポリペプチド若しくはその各々又は前記 dTCRポリペプチド対若しくはその各々が、 TCRの細胞外定常領域配列及び可変領域配列に対応するアミノ酸配列を有する請求項 13 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の TCR複合体。

【請求項 29】

前記 scTCRポリペプチド若しくはその各々又は前記 dTCRポリペプチド対若しくはその各々が、細胞外 TCR定常領域配列及び TCR可変領域配列に対応するアミノ酸配列を有する請求項 13 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の TCR複合体。

【請求項 30】

前記 scTCRポリペプチド若しくはその各々又は前記 dTCRポリペプチド対若しくはその各々が、非ヒト細胞外 TCR定常領域配列及びヒト TCR可変領域配列に対応するアミノ酸配列を有する請求項 13 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の TCR複合体。 10

【請求項 31】

前記 dTCRポリペプチド対若しくはその各々の 1 つのメンバーのアミノ酸配列又は前記 scTCRポリペプチド若しくはその各々のアミノ酸配列が、天然型 TCR細胞外定常鎖 Igドメイン配列に対応する請求項 13 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の TCR複合体。

【請求項 32】

前記 dTCRポリペプチド対若しくはその各々又は前記 scTCRポリペプチド若しくはその各々が、天然型 TCR細胞外定常鎖 Igドメイン配列に対応する配列を含む請求項 13 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の TCR複合体。 20

【請求項 33】

ジスルフィド結合が前記定常鎖 Igドメイン配列のアミノ酸残基同士を連結し、該ジスルフィド結合が天然型 TCR中に等価物を有しない請求項 32 に記載の TCR複合体。

【請求項 34】

前記ジスルフィド結合が、天然型 TCR中で炭素原子が 0.6nm 未満離れているアミノ酸残基に対応するシステイン残基同士間に存在する請求項 33 に記載の TCR複合体。

【請求項 35】

前記ジスルフィド結合が、TRAC^{*}01 のエキソン 1 の Thr48 及び TRBC1^{*}01 若しくは TRBC2^{*}01 のエキソン 1 の Ser57、又はそれらの非ヒト等価物と置換されたシステイン残基同士間に存在する請求項 34 に記載の TCR複合体。 30

【請求項 36】

前記ジスルフィド結合が、TRAC^{*}01 のエキソン 1 の Thr45 及び TRBC1^{*}01 若しくは TRBC2^{*}01 のエキソン 1 の Ser77、又はそれらの非ヒト等価物と置換されたシステイン残基同士間に存在する請求項 34 に記載の TCR複合体。

【請求項 37】

前記ジスルフィド結合が、TRAC^{*}01 のエキソン 1 の Tyr10 及び TRBC1^{*}01 若しくは TRBC2^{*}01 のエキソン 1 の Ser17、又はそれらの非ヒト等価物と置換されたシステイン残基同士間に存在する請求項 34 に記載の TCR複合体。

【請求項 38】

前記ジスルフィド結合が、TRAC^{*}01 のエキソン 1 の Thr45 及び TRBC1^{*}01 若しくは TRBC2^{*}01 のエキソン 1 の Asp59、又はそれらの非ヒト等価物と置換されたシステイン残基同士間に存在する請求項 34 に記載の TCR複合体。 40

【請求項 39】

前記ジスルフィド結合が、TRAC^{*}01 のエキソン 1 の Ser15 及び TRBC1^{*}01 若しくは TRBC2^{*}01 のエキソン 1 の Glu15、又はそれらの非ヒト等価物と置換されたシステイン残基同士間に存在する請求項 34 に記載の TCR複合体。

【請求項 40】

天然型 TCR細胞外定常鎖 Igドメイン配列に対応する前記配列が、天然型鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基が排除されるように、該天然型配列に対して C 末端で短縮化されている請求項 32 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の TCR複合体。 50

【請求項 4 1】

天然型TCR細胞外定常鎖Igドメイン配列に対応する前記配列において、天然型鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基が非システイン残基によって置換されている請求項 3 2 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載のTCR複合体。

【請求項 4 2】

天然型鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基がセリン又はアラニンに置換されている請求項 4 1 に記載のTCR複合体。

【請求項 4 3】

前記dTCR若しくはその各々又は前記scTCR若しくはその各々において、天然型TCR中に存在する非対合のシステイン残基に対応する非対合のシステイン残基が存在しない請求項 1 3 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載のTCR複合体。 10

【請求項 4 4】

ポリアルキレングリコール鎖により連結される少なくとも 2 つのdTCRポリペプチド対を含み、二価アルキレンスパーサー基が、任意に、該ポリアルキレングリコール鎖とその前記複合体のdTCRへの付着点との間に存在してもよく、該dTCR対の各々が、

TCR 鎖可変ドメイン配列に対応する配列がTCR 鎖定常ドメイン細胞外配列に対応する配列のN末端に融合している第 1 のポリペプチド、及び

TCR 鎖可変ドメイン配列に対応する配列がTCR 鎖定常ドメイン細胞外配列に対応する配列のN末端に融合している第 2 のポリペプチド

によって構成され、 20

第 1 のポリペプチド及び第 2 のポリペプチドが、TRAC¹01のエキソン 1 のThr48及びTRBC¹01若しくはTRBC²01のエキソン 1 のSer57、又はそれらの非ヒト等価物と置換したシステイン残基同士の間でジスルフィド結合により連結され、

該ポリアルキレンリンカーと該複合体の各dTCRとの付着点が該dTCRのC末端のシステイン残基のチオール基を介している請求項 1 に記載のTCR複合体。

【請求項 4 5】

2 つのdTCRがポリエチレングリコール鎖により連結されている請求項 4 4 に記載のTCR複合体。

【請求項 4 6】

ペプチドMHC複合体に結合する請求項 1 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載のTCR複合体。 30

【請求項 4 7】

所定のMHC型に結合する請求項 1 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載のTCR複合体。

【請求項 4 8】

CD1 - 抗原複合体に結合する請求項 1 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載のTCR複合体。

【請求項 4 9】

スーパー抗原又はペプチド - MHC/スーパー抗原複合体と結合する請求項 1 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載のTCR複合体。

【請求項 5 0】

前記TCRが所定のTCRリガンドに特異的であり、(i)可変ドメインにおいて、該TCRリガンドに特異的な天然型TCRに対して変異しており、(ii)該TCRリガンドについて該天然型TCRのものより小さいKdを有する請求項 1 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載のTCR複合体。 40

【請求項 5 1】

前記TCRが所定のTCRリガンドに特異的であり、(i)可変ドメインにおいて、該TCRリガンドに特異的な天然型TCRに対して変異しており、(ii)表面プラズモン共鳴により測定されるような、該TCRリガンドについて該天然型TCRのものより小さいKdを有する請求項 1 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載のTCR複合体。

【請求項 5 2】

前記TCRが所定のTCRリガンドに特異的であり、(i)可変ドメインにおいて、該TCRリガンドに特異的な天然型TCRに対して変異しており、(ii)該TCRリガンドについて該天然型TCRのものより小さいオフレート(k_{off})を有する請求項 1 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載のTCR 50

複合体。

【請求項 5 3】

前記TCRが所定のTCRリガンドに特異的であり、(i)可変ドメインにおいて、該TCRリガンドに特異的な天然型TCRに対して変異しており、(ii)表面プラズモン共鳴により測定されるような、該TCRリガンドについて該天然型TCRのものより小さいオフレート(k_{off})を有する請求項 1 ~ 5 2 のいずれか 1 項に記載のTCR複合体。

【請求項 5 4】

細胞傷害性部分、検出可能若しくは画像化可能な部分又は免疫刺激性ペプチド若しくはポリペプチドと結合した請求項 1 ~ 4 6 又は 4 8 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のTCR複合体。

10

【請求項 5 5】

請求項 1 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載のTCR複合体を薬学的に受容可能なキャリアと共に含む組成物。

【請求項 5 6】

自己免疫疾患の処置のための医薬の製造における請求項 1 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の多価TCR複合体の使用。

【請求項 5 7】

i) ガンの処置

ii) ウイルス性又は細菌性感染の処置

のための医薬の製造における請求項 1 ~ 4 6 又は 4 8 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の多価TCR複合体の使用。

20

【請求項 5 8】

標的細胞集団においてアポトーシスを誘導するための医薬の製造における請求項 1 ~ 4 6 又は 4 8 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の多価TCR複合体の使用。

【請求項 5 9】

標的細胞集団に免疫応答を誘導するための医薬の製造における、免疫刺激性ペプチド又はポリペプチドと結合した請求項 5 4 に記載の多価TCR複合体の使用。

【請求項 6 0】

患者に、アポトーシスを誘導するに有効な量の請求項 1 ~ 4 4 又は 4 6 ~ 5 2 のいずれか 1 項に記載のTCR複合体を投与することを含み、その必要がある患者の標的細胞集団においてアポトーシスを誘導する方法。

30

【請求項 6 1】

患者に、アポトーシスを誘導するに有効な量の、免疫刺激性ペプチド又はポリペプチドと結合した請求項 5 4 に記載のTCR複合体を投与することを含み、その必要がある患者の標的細胞集団に免疫応答を誘導する方法。

【請求項 6 2】

患者への有効量の請求項 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のTCR複合体の投与を含む自己免疫疾患の処置方法。

【請求項 6 3】

患者への有効量の請求項 1 ~ 4 6 又は 4 8 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載のTCR複合体の投与を含むガンの処置方法。

40

【請求項 6 4】

細胞を、請求項 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のTCR複合体と接触させることを含み、該複合体中に存在するTCRが所定のTCRリガンドと結合し、該複合体がそれと結合した検出可能又は画像化可能な部分を有する、所定のTCRリガンドをディスプレイする細胞を検出又は画像化する方法。

【請求項 6 5】

前記細胞が、腫瘍塊を形成するガン性細胞を含むガン性細胞である請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

50

感染細胞により特徴付けられる疾患又はガンの診断又はモニターのための請求項64に記載の方法。

【請求項67】

インビボで実施される請求項64～66のいずれか1項に記載の方法。

【請求項68】

エキソビボで実施される請求項64～66のいずれか1項に記載の方法。

【請求項69】

ガン性細胞又は感染細胞のための診断用又は画像化用組成物の製造における、結合した検出可能又は画像化可能な部分を有する請求項1～46又は48～54のいずれか1項に記載の多価TCR複合体の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、非ペプチド性ポリマー鎖によるか又はペプチド性リンカー配列によって連結された少なくとも2つのT細胞レセプターを含む多価T細胞レセプター複合体、並びに医学、特に自己免疫疾患及びガンの診断及び処置におけるこの複合体の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

天然型TCR

20

例えばW099/60120に記載のように、TCRは、T細胞による特異的主要組織適合性複合体(MHC)-ペプチド複合体の認識を媒介し、それ自体が免疫系の細胞兵器の機能化に必須である。

【0003】

抗体及びTCRは、特異的な様式で抗原を認識する唯2つの分子型であり、したがってTCRは、MHCにおいて提示される特定ペプチド抗原(この外来ペプチドは、細胞内の異常の唯一の徴候であることが多い)の唯一のレセプターである。T細胞認識は、T細胞と抗原提示細胞(APC)とが直接の物理的接触状態にあるときに起こり、抗原特異的TCRとペプチド-MHC(pMHC)複合体との結びつきにより開始される。

【0004】

30

天然型(native)TCRは、シグナル伝達の媒介に関与するCD3複合体の非変形体タンパク質と結合する、免疫グロブリンスーパーファミリーのヘテロ二量体細胞表面タンパク質である。TCRは 形態及び 形態で存在し、これらの形態は構造的に類似するが、全く異なる解剖学的所在及びおそらくは機能を有する。MHCクラスI及びクラスIIリガンドもまた、免疫グロブリンスーパーファミリータンパク質であるが、APC細胞表面で多様な数々の短いペプチドフラグメントを提示することを可能にする高度に多形性のペプチド結合部位を有して抗原提示に特化している。

【0005】

2つのさらなるクラスのタンパク質が、TCRリガンドとして機能し得ることが知られている。(1)CD1抗原は、その遺伝子が古典的MHCクラスI及びクラスII抗原とは異なる染色体に位置するMHCクラスI関連分子である。CD1分子は、従来のクラスI及びクラスII-MHC-pep複合体と類似の様式で、ペプチド部分及び非ペプチド(例えば、脂質、糖脂質)部分をT細胞に提示することができる(例えば、Barclayら(1997) The Leucocyte Antigen Factsbook 第2版, Academic Press、及びBauer(1997) Eur J Immunol 27(6) 1366-1373を参照)。(2)細菌性スーパー抗原は、クラスII MHC分子とTCRのサブセットとの両方に結合できる可溶性毒素である(Fraser(1989) Nature 339 221-223)。多くのスーパー抗原が1又は2のVセグメントに対して特異性を示す一方、その他のものはより無差別な結合を示す。ともかく、スーパー抗原は、多クローン性様式でT細胞のサブセットを刺激する能力により、亢進した免疫応答を誘発することができる。

40

【0006】

50

天然型ヘテロ二量体及びTCRの細胞外部分は2つのポリペプチドからなり、その各々が、膜近位定常ドメイン及び膜遠位可変ドメインを有する。定常ドメイン及び可変ドメインの各々が鎖内ジスルフィド結合を含む。可変ドメインは、抗体の相補性決定領域(CDR)に類似する高度多形性ループを含む。TCRのCDR3は、MHCにより提示されたペプチドと相互作用し、TCRのCDR1及びCDR2は、そのペプチド及びMHCと相互作用する。TCR配列の多様性は、連結している可変(V)、多様性(D)、連結(J)及び定常(C)遺伝子の体細胞再編成(somatic rearrangement)を介して生じる。

【0007】

機能的な鎖ポリペプチド及び鎖ポリペプチドは、再編成V-J-C領域により形成される一方、鎖及び鎖はV-D-J-C領域からなる。細胞外定常ドメインは、膜近位領域及び免疫グロブリン領域を有する。それぞれTRAC及びTRDCとして知られる、単一の鎖及び鎖の定常ドメインが存在する。鎖定常ドメインは、TRBC1及びTRBC2(IMG T命名法)として知られる2つの異なる定常ドメインの1つから構成される。これらの定常ドメイン間には4つのアミノ酸変化が存在し、そのうちの3つは、本発明のファージ粒子上にディスプレイされる単鎖TCRを作成するために使用するドメイン内にある。これらの変化は全て、TRBC1及びTRBC2のエキソン1内にあり(N₄K₅ K₄N₅及びF₃₇ Y (IMG T番号付け、差異TRBC1 TRBC2))、2つのTCR鎖定常領域間の最後のアミノ酸変化は、TRBC1及びTRBC2のエキソン3にある(V₁ E)。定常ドメインは、TRGC1、TRGC2(2x)又はTRGC2(3x)のいずれか1つから構成される。2つのTRGC2定常ドメインは、この遺伝子のエキソン2によりコードされるアミノ酸の、存在するコピー数のみが異なる。

10

20

【0008】

TCR細胞外ドメインの各々の範囲はいくらか変化し得る。しかし、当業者は、The T Cell Receptor Facts Book, Lefranc & Lefranc, Academic Press発行, 2001のような参考文献を使用して、ドメイン境界の位置を容易に決定できる。

【0009】

(組換えTCR)

組換えTCRの作成は、それらが以下の目的に適切な可溶性TCRアナログを提供するので有益である：

- ・ TCR/リガンド相互作用(例えば TCRに関するpMHC)の研究
- ・ TCRが関連する相互作用の阻害剤についてのスクリーニング
- ・ 治療剤候補の基礎の提供

30

【0010】

今日までに、組換えTCRの作成のために多くの構築物が考案されてきた。これらの構築物は、2つの広義のクラス、単鎖TCR及び二量体TCRに分けられる。これらの構築物に関する文献を下記に概説する。

【0011】

(単鎖TCR)

単鎖TCR(scTCR)は、一本のアミノ酸鎖からなる人工の構築物であり、これは天然型ヘテロ二量体TCRと同様にMHC-ペプチド複合体に結合する。不運にも、鎖及び鎖をその両方が1つのオープンリーディングフレームで発現するように単に連結することによって機能的な / アナログscTCRを作成する試みは、成功しなかった。これは、可溶ドメイン対合の本来的な不安定性のためである。

40

【0012】

したがって、鎖及び鎖のいずれか又は両方の種々の短縮体を使用する特別な技法が、scTCRの作成に必要とされてきた。これらの方式は、非常に限られた範囲のscTCR配列に対してのみ適用可能であるようである。Hooら(1992) PNAS. 89(10): 4759-63は、25アミノ酸リンカーに連結した短縮型の鎖及び鎖と細菌細胞周辺質発現(bacterial periplasmic expression)とを使用する2C T細胞クローンからの単鎖形式でのマウスTCRの発現を報告する(Schodinら(1996) Mol. Immunol. 33(9): 819-29もまた参照)。この設計はまた、Hollerら(2000) PNAS. 97(10): 5387-92により報告された、2C scTCRから誘導され同じH2

50

-Ld制限アロエピトープ(alloepitope)に結合するm6単鎖TCRの基礎をなす。Shustara(2000) Nature Biotechnology 18:754-759は、酵母ディスプレイ実験において単鎖2C TCR構築物を使用することを報告し、これは亢進した熱安定性及び溶解性を有する変異TCRを産生した。この報告はまた、これらディスプレイされた2C TCRがそのコグネイトpMHCを発現する細胞に選択的に結合することができることを証明した。Khandekarら(1997) J.Biol.Chem. 272(51):32190-7は、マウスD10 TCRについて、このscTCRをMBPに融合して細菌細胞質で発現させたが、同様な設計を報告している(Hareら(1999) Nat.Struct.Biol. 6(6):574-81もまた参照)。Hilyardら(1994) PNAS. 91(19):9057-61は、V_H-リンカー-V_H設計を使用し細菌細胞周辺質で発現させた、インフルエンザマトリクスタンパク質-HLA-A2に特異的なヒトscTCRを報告している。

10

【0013】

Chungら(1994) PNAS. 91(26)12654-8は、V_H-リンカー-V_H-C設計及び哺乳動物細胞株の表面での発現を使用するヒトscTCRの作成を報告している。この報告は、scTCRのペプチド-HLA特異的結合に対しては何らの言及も含んでいない。Plaksinら(1997) J.Immunol. 158(5):2218-27は、HIV gp120-H-2D^dエピトープに特異的なマウスscTCRを作成するための同様なV_H-リンカー-V_H-C設計を報告している。このscTCRは、細菌封入体として発現させ、インビトロでリフォールディングさせる。

【0014】

(二量体TCR)

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

20

【0015】

W099/60120には、天然型リガンドを認識し得るように正しくフォールディングし、経時的に安定であり、合理的な量で作成することが可能な可溶性TCRが記載されている。このTCRは、一对のC末端二量体化ペプチド(例えばロイシンジッパー)により、それぞれTCR鎖又は鎖の細胞外ドメインと二量体化したTCR鎖又は鎖の細胞外ドメインを含む。TCRを作成するためのこの戦略は、一般に、全てのTCRに適用可能である。

30

【0016】

Guillaumeら, Nature Immunology, 2003 (advance on-line publication)は、その構築物のC末端に付着させたアミノ酸間に導入ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性JM22 TCRの構築を詳述する。この特別な構築物は、N末端~天然型ジスルフィド鎖間結合の位置の単一アミノ酸を短縮化したJM22 TCRの細胞外部分から誘導された。C末端定常ドメイン伸長部(extension)がこのTCRの鎖及び鎖の両方に付加された。これら伸長部は、天然型の位置に対して、鎖中で3アミノ酸、鎖中で6アミノ酸ほど下流への鎖間形成性システイン残基位置の移動を引き起こした。この一般的設計の可溶性TCR(すなわち、ジスルフィド鎖間ジスルフィド結合を含む導入C末端定常ドメイン伸長部を含む可溶性TCR)もまた、本発明の多価TCR複合体において使用され得る。

40

【0017】

Reiterら(Immunity, 1995, 2:281-287)は、一方がPseudomonasエクソトキシン(PE38)の短縮型形態に連結している、ジスルフィド安定化されたTCR鎖及び鎖の可変ドメインを含む可溶性分子の構築を詳述している。述べられているこの分子を作成するための理由の1つは、単鎖TCRの本来的不安定性を克服することであった。TCR可変ドメイン中の新規ジスルフィド結合の位置は、これらが予め導入されている抗体の可変ドメインとの相同性により同定された(例えば、Brinkmannら(1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:7538-7542及びReiterら(1994) Biochemistry 33:5451-5459を参照)。しかし、抗体とTCRの定常ドメイン

50

間にそのような相同性はないので、この技法は、TCR定常ドメイン間の新たな鎖間ジスルフィド結合の適切な部位を同定するために用いることができなかつた。

【0018】

(治療及び診断用途)

TCRには、疾患プロセスによって影響される細胞に局在させ得る標的する部分(targeting moiety)としての必要性が存在する。このような標的する部分は、自己免疫疾患の原因である免疫系の「誤って指向された」作用を直接遮断するためか又はガン性細胞に細胞毒性薬剤を送達する手段としてのいずれかに利用され得る。このような分子は、標的リガンドに対する良好な親和性及び妥当な血漿安定性を有するべきである。

【発明の開示】

10

【課題を解決するための手段】

【0019】

(発明の簡単な説明)

本発明は、対応する一価TCR分子と比較して、上昇した血漿半減期、及びそのコグネイトリガンドに対する改善した親和性を有する新規な多価TCR複合体を利用可能にする。本発明の複合体において、TCRは非ペプチド性ポリマー鎖によるか又はペプチド性リンカーにより連結されている。本複合体中のTCRは、scTCRであってもよいしdTCRであってもよい。

【0020】

(発明の詳細な説明)

20

本発明は、非ペプチド性ポリマー鎖によるか又はペプチド性リンカー配列によって連結された少なくとも2つのTCRを含む多価T細胞レセプター(TCR)複合体を提供する。

好ましくは、本複合体中のTCRは、天然型TCRの細胞外定常領域配列及び可変領域配列に対応するアミノ酸配列によって構成される。

【0021】

好ましくは、ポリマー鎖又はペプチド性リンカー配列は、各TCRのアミノ酸残基であって当該TCRの可変領域配列に位置しないもの同士の間伸びる。

本複合体中のTCRは、例えば、ポリアルキレングリコール鎖(例えば、ポリエチレングリコール鎖)によるか又はヒト多量体化ドメインから誘導されるペプチド性リンカーにより連結されてもよい。

30

本発明の1つの実施形態において、二価アルキレンスパーサー基、例えば -CH₂- 又は -CH₂CH₂- 基が、ポリアルキレングリコール鎖とその本複合体のTCRへの付着点との間に位置する。

【0022】

本発明の多価TCR複合体は、例えば二価、三価又は四価であり得るが、二価複合体(すなわち僅か2つのTCRを含むもの)が本発明において好ましい。

【0023】

(本発明の複合体中に存在する好ましいTCR)

本発明の複合体において、TCR分子は、単鎖T細胞レセプター(scTCR)ポリペプチドであってもよいし、(好ましくは)二量体TCR(dTCR)ポリペプチド対であってもよい。scTCRポリペプチド又はdTCRポリペプチド対は、TCRの細胞外定常領域配列及び可変領域配列に対応するTCRアミノ酸配列によって構成され得、あるTCR鎖の可変領域配列に対応するscTCRの可変領域配列が、別のTCR鎖の定常領域配列に対応する定常領域配列に、リンカー配列により連結され；dTCRポリペプチド対又はscTCRポリペプチドの可変領域配列同士が、天然型TCR中と実質的に同様に互いに配向し；そしてscTCRポリペプチドの場合は、天然型T細胞レセプター中に等価物を有しないジスルフィド結合がそのポリペプチドの残基同士を連結する。

40

【0024】

本発明の複合体中に存在する アナログのscTCR又はdTCRに関して、 セグメント及び セグメントの可変領域配列が、天然型 T細胞レセプター中と実質的に同様に互い

50

に配向しているという要件は、その分子が該当するTCRリガンド(pMHC複合体、CD1 - 抗原複合体、スーパー抗原又はスーパー抗原/pMHC複合体)に結合することの確認によって検定することができ、結合すればこの要件を充足する。pMHC複合体との相互作用は、BIAcore 3000(商標)装置又はBIAcore 2000(商標)装置を使用して測定することができる。W099/6120は、MHC - ペプチド複合体へのTCR結合を分析するために必要な方法の詳細な説明を提供する。これらの方法は、TCR/CD1及びTCR/スーパー抗原相互作用の研究に等しく適用可能である。これらの方法をTCR/CD1相互作用の研究に適用するために、可溶形態のCD1が必要であり、その作成は、Bauer(1997) Eur J Immunol 27(6) 1366-1373に記載されている。本発明の複合体中に存在するアナログのTCRの場合、これらの分子のコグネイトリガンドは未知であり、したがってこれら分子のコンホメーションを検証する二次的手段(例えば抗体による認識)を用いることができる。鎖可変領域に特異的なモノクローナル抗体MCA991T(Serotecから入手可能)は、この課題に適切な抗体の例である。

10

【0025】

好ましくは、本発明の複合体中に存在するscTCRポリペプチドは、例えば、TCR鎖定常領域細胞外配列に対応するアミノ酸配列のN末端に融合した、TCR鎖又は鎖の可変領域配列に対応するアミノ酸配列により構成される第1のセグメント、TCR鎖定常領域細胞外配列に対応するアミノ酸配列のN末端に融合した、TCR鎖又は鎖の可変領域に対応するアミノ酸配列により構成される第2のセグメント、第1のセグメントのC末端を第2のセグメントのN末端に連結するか又はその逆に連結するリンカー配列、並びに、第1の鎖と第2の鎖との間のジスルフィド結合を有するものであり、ここで、ジスルフィド結合は、天然型の又はのT細胞レセプター中に等価物を有さないものであり、リンカー配列の長さ及びジスルフィド結合の位置は、第1のセグメント及び第2のセグメントの可変領域配列が天然型の又はのT細胞レセプター中と実質的に同様に互いに配向しているような長さ及び位置である。

20

【0026】

好ましくは、本発明の複合体中に存在するdTCRは、TCR鎖又は鎖の可変領域配列に対応する配列がTCR鎖定常領域細胞外配列に対応する配列のN末端に融合している第1のポリペプチド、及びTCR鎖又は鎖の可変領域配列に対応する配列がTCR鎖定常領域細胞外配列に対応する配列のN末端に融合している第2のポリペプチドより構成されるものであり、ここで第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドは、天然型の又はのT細胞レセプター中に等価物を有さないジスルフィド結合により連結されている。

30

【0027】

上記好ましいscTCR又はdTCRに存在する定常領域細胞外配列は、好ましくは、ヒトTCRのそれらに対応し、可変領域配列も同様である。しかし、この配列間の対応性は、アミノ酸レベルで1:1である必要はない。対応するヒトTCR配列に対するN末端若しくはC末端の短縮並びに/又はアミノ酸の欠失及び/若しくは置換は、全体として結果的に、と可変領域配列又はと可変領域配列の互いの配向がそれぞれ天然型の又はのT細胞レセプター中と同様であれば許容される。特に、第1のセグメント及び第2のセグメントに存在する定常領域細胞外配列は、scTCR又はdTCRが結合するリガンドとの接触に直接関与しないので、天然型TCRの細胞外定常ドメイン配列より短くてもよいし、又はこの細胞外定常ドメイン配列に対する置換若しくは欠失を含んでもよい。

40

【0028】

dTCRポリペプチド対の一方若しくはscTCRポリペプチドの第1のセグメントに存在する定常領域細胞外配列が、天然型TCR鎖の細胞外定常Igドメインに対応する配列を含み、且つ/又はその対の他方のメンバー若しくは第2のセグメントに存在する定常領域細胞外配列が、天然型TCR鎖の細胞外定常Igドメインに対応する配列を含んでもよい。

【0029】

ポリペプチド対の一方のメンバー若しくはscTCRポリペプチドの第1のセグメントが、TCR鎖の定常領域の実質的に全ての細胞外ドメインのN末端に融合したTCR鎖の実質的に全ての可変領域に対応し、且つ/又はその対の他方のメンバー若しくは第2のセグメン

50

トが、TCR 鎖の定常ドメインの実質的に全ての細胞外領域のN末端に融合したTCR 鎖の実質的に全ての可変領域に対応してもよい。

【0030】

dTCRポリペプチド対に存在するか又はscTCRポリペプチドの第1のセグメント及び第2のセグメントに存在する定常領域細胞外配列は、当該TCRの天然型鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基が排除されるように、そのC末端で短縮化した天然型TCRの鎖及び鎖の定常領域に対応してもよい。或いは、これらシステイン残基は、天然型ジスルフィド結合が欠失するように、別のアミノ酸残基(例えばセリン又はアラニン)で置換されてもよい。加えて、天然型TCR 鎖は対合していないシステイン残基を含むが、その残基は、本発明のscTCRの配列から欠失されていてもよいし、その配列において非ステ

10

【0031】

dTCRポリペプチド対に存在するか又はscTCRポリペプチドの第1のセグメント及び第2のセグメントに存在するTCR 鎖及び鎖の可変領域配列は、共に、第1のTCRの機能的な可変ドメインに対応し、dTCRポリペプチド対に存在するか又はscTCRポリペプチドの第1のセグメント及び第2のセグメントに存在するTCR 鎖及び鎖の定常領域細胞外配列は、第2のTCRのものに対応してもよいが、第1のTCRと第2のTCRとは同じ種に由来する。したがって、dTCRポリペプチド対に存在するか又はscTCRポリペプチドの第1のセグメント及び第2のセグメントに存在する鎖及び鎖の可変領域配列は、第1のヒトTCRのそれらに対応し、鎖及び鎖の定常領域細胞外配列は、第2のヒトTCRのそれらに対応し

20

【0032】

dTCRポリペプチド対に存在するか又はscTCRポリペプチドの第1のセグメント及び第2のセグメントにそれぞれ存在するTCR 鎖及び鎖の可変領域配列は、共に、第1のTCRの機能的な可変ドメインに対応し、dTCRポリペプチド対に存在するか又はscTCRポリペプチドの第1のセグメント及び第2のセグメントにそれぞれ存在するTCR 鎖及び鎖の定常領域細胞外配列は、第2のTCRのそれらに対応していてもよいが、第1のTCRと第2のTCRとは同じ種に由来する。したがって、dTCRポリペプチド対に存在するか又はscTCRポリペ

30

【0033】

dTCRポリペプチド対に存在するか又はscTCRポリペプチドの第1のセグメント及び第2のセグメントに存在するTCR 鎖及び鎖の又は鎖及び鎖の可変領域配列は、共に、第1のヒトTCRの機能的可変ドメインに対応し、dTCRポリペプチド対に存在するか又はscTCRポリペプチドの第1のセグメント及び第2のセグメントに存在するTCR 鎖及び鎖の定常領域細胞外配列は、第2の非ヒトTCRのそれらに対応してもよい。したがって、dTCRポリペプチド対に存在するか又はscTCRポリペプチドの第1のセグメント及び第2のセグメントに存在する鎖及び鎖の又は鎖及び鎖の可変領域配列は、第1のヒトTCRのそれらに対応し、鎖及び鎖の定常領域細胞外配列は、第2の非ヒトTCRのそれらに対応していてもよい。例えば、マウスTCR定常領域細胞外配列は、非相同のヒトのTCR可変ドメイン及びTCR可変ドメインが融合できるフレームワークとして使用することが可能である。

40

【0034】

scTCRにおいて、リンカー配列は、単一のポリペプチド鎖を形成するために、第1のTCRセグメントと第2のTCRセグメントとを連結し得る。リンカー配列は、例えば、式 - P - A

50

A - P - (式中、Pはプロリンであり、AAはアミノ酸がグリシン及びセリンであるアミノ酸配列を表す)を有してもよい。

【0035】

scTCRがコグネイトリガンド(例えば、TCRの場合にはMHC - ペプチド複合体又はCD1 - 抗原複合体)に結合するために、第1のセグメントと第2のセグメントとは、これらの可変領域配列がそのような結合に関して配向しているように、対合していなければならない。したがって、リンカーは、第1のセグメントのC末端と第2のセグメントのN末端との間又はその逆の間の距離を橋渡しするに十分な長さを有するべきである。他方で、リンカーの端部が、N末端可変領域配列で、scTCRと標的リガンドとの結合を遮断し又は減少させないように、好ましくは、過度なリンカー長は回避すべきである。

10

【0036】

例えば、第1のセグメント及び第2のセグメントに存在する定常領域細胞外配列が、C末端で短縮化されその結果当該TCRの天然型鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基が排除された天然型TCRの鎖及び鎖の定常領域に対応し、リンカー配列が第1のセグメントのC末端と第2のセグメントのN末端を連結する場合、リンカーは、26~41アミノ酸、例えば29、30、31若しくは32アミノ酸又は33、34、35若しくは36アミノ酸からなってもよく、特定のリンカーは、式 - PGGG - (SGGGG)₅ - P - 又は - PGGG - (SGGGG)₆ - P - (式中、Pはプロリンであり、Gはグリシンであり、Sはセリンである)を有する。

【0037】

本発明の複合体のscTCRの主要な特徴的特性(feature)及び(好ましくは)dTCRの特性は、dTCRポリペプチド対の定常領域細胞外配列間又はscTCRポリペプチドの第1のセグメントの定常領域細胞外配列と第2のセグメントの定常領域細胞外配列との間のジスルフィド結合である。この結合は、天然型二量体TCRに存在する天然型鎖間ジスルフィド結合に対応してもよいし、或いは天然型TCR中に対応物(counterpart)を有さず、dTCRポリペプチド対の定常領域細胞外配列中又はscTCRポリペプチドの第1のセグメント及び第2のセグメントの定常領域細胞外配列中に特異的に組み込まれたシステイン間に存在してもよい。いくつかの場合には、天然型及び非天然型の両方のジスルフィド結合が、望ましくあり得る。

20

【0038】

ジスルフィド結合の位置は、dTCRポリペプチド対の可変領域配列同士又はscTCRポリペプチドの第1のセグメントの可変領域配列と第2のセグメントの可変領域配列とが、天然型の又はのT細胞レセプター中と実質的に同様に互いに配向しているという要件に従属する。

30

【0039】

ジスルフィド結合は、第1セグメント及び第2のセグメント上の非システイン残基をシステインに変異させ、その変異した残基間にジスルフィド結合の形成を引き起こすことにより形成してもよい。天然型残基の代わりに導入したシステイン残基間にジスルフィド結合を形成することができるように、天然型TCR中でそれぞれの炭素が約6(0.6nm)又はそれ以下、好ましくは3.5(0.35nm)~5.9(0.59nm)の範囲で離れている残基が好ましい。ジスルフィド結合は膜近位領域の残基間に存在し得るが、その結合が定常免疫グロブリン領域中の残基間に存在すれば好ましい。システインを導入してジスルフィド結合を形成することができる好ましい部位は、TCR鎖についてはTRAC¹01の、TCR鎖についてはTRBC¹01又はTRBC²01のエキソン1中の以下の残基である：

40

【表 1】

TCR α 鎖	TCR β 鎖	天然型 β 炭素の隔離距離(nm)
Thr 48	Ser 57	0.473
Thr 45	Ser 77	0.533
Tyr 10	Ser 17	0.359
Thr 45	Asp 59	0.560
Ser 15	Glu 15	0.59

10

【0040】

今や、システイン残基に変異させて本発明に従ってディスプレイされるdTCR又はscTCR中に新たな鎖間ジスルフィド結合を形成させることができるヒトTCR中の残基が同定されたので、当業者は、他の種のTCRを同じ方法で変異させて、ファージディスプレイ用のその種のdTCR又はscTCRを作成することができる。ヒトにおいては、当業者は、単に、それぞれのTCR鎖中の以下のモチーフを探索して変異させるべき残基(下線を付した残基がシステインへの変異のための残基である)を同定することのみが必要である。

鎖Thr48: D S D V Y I T D K I V L D M R S M D F K (TRAC^{*}01遺伝子のエキソン1のアミノ酸39~58)

鎖Thr45: Q S K D S D V Y I T D K T V L D M R S M (TRAC^{*}01遺伝子のエキソン1のアミノ酸36~55) 20

鎖Tyr10: D I Q N P D P A V Y Q L R D S K S S D K (TRAC^{*}01遺伝子のエキソン1のアミノ酸1~20)

鎖Ser15: D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F (TRAC^{*}01遺伝子のエキソン1のアミノ酸6~25)

鎖Ser57: N G K E V H S G V S T D P Q P L K E Q P (TRBC1^{*}01遺伝子及びTRBC2^{*}01遺伝子のエキソン1のアミノ酸48~67)

鎖Ser77: A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W (TRBC1^{*}01遺伝子及びTRBC2^{*}01遺伝子のエキソン1のアミノ酸68~87)

鎖Ser17: P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A (TRBC1^{*}01遺伝子及びTRBC2^{*}01遺伝子のエキソン1のアミノ酸8~27) 30

鎖Asp59: K E V H S G V S T D P Q P L K E Q P A L (TRBC1^{*}01遺伝子及びTRBC2^{*}01遺伝子のエキソン1のアミノ酸50~69)

鎖Glu15: V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q (TRBC1^{*}01遺伝子及びTRBC2^{*}01遺伝子のエキソン1のアミノ酸6~25)

【0041】

他の種においては、TCR鎖は、上記モチーフに対して100%同一性を有する領域を有さなくてもよい。しかし、当業者は、上記モチーフを使用してTCR鎖又は鎖の等価部分を、したがってシステインに変異させるべき残基を同定することができる。整列技法(alignment technique)をこの点に関して使用してもよい。例えば、変異のためのTCR配列の該当部分を位置決めするために、European Bioinformatics Instituteのウェブサイト(<http://www.ebi.ac.uk/index.html>)で入手可能であるClustalWを使用して上記モチーフと特定のTCR鎖配列を比較することができる。

40

【0042】

本発明は、その範囲に、及びアナログのscTCRの複合体並びに他の哺乳動物(マウス、ラット、ブタ、ヤギ及びヒツジを含むがこれらに限定されない)のそれらを含む。上記のように、当業者は、システイン残基を導入して鎖間ジスルフィド結合を形成させることが可能である上記のヒト部位と等価な部位を決定することができる。例えば、以下は、マウスC₁及びC₂可溶性ドメインのアミノ酸配列を、システインに変異させてTCR鎖間ジスルフィド結合を形成させることができる上記のヒト残基に等価なマウス残基を示すモ

50

チーフと共に示す（ここで、該当の残基には下線が付されている）。

マウスC 可溶性ドメイン：

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

マウスC 可溶性ドメイン：

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

ヒト 鎖Thr48のマウス等価物： E S G T F I T D K T V L D M K A M D S K

ヒト 鎖Thr45のマウス等価物： K T M E S G T F I T D K T V L D M K A M

ヒト 鎖Tyr10のマウス等価物： Y I Q N P E P A V Y Q L K D P R S Q D S

ヒト 鎖Ser15のマウス等価物： A V Y Q L K D P R S Q D S T L C L F T D

ヒト 鎖Ser57のマウス等価物： N G R E V H S G V S T D P Q A Y K E S N

ヒト 鎖Ser77のマウス等価物： K E S N Y S Y C L S S R L R V S A T F W

ヒト 鎖Ser17のマウス等価物： P P K V S L F E P S K A E I A N K Q K A

ヒト 鎖Asp59のマウス等価物： R E V H S G V S T D P Q A Y K E S N Y S

ヒト 鎖Glu15のマウス等価物： V T P P K V S L F E P S K A E I A N K Q

【0043】

上記のように、A6 Tax sTCR細胞外定常領域は、それに非相同可変ドメインを融合させることが可能であるフレームワークとして使用することができる。非相同可変領域配列は、ジスルフィド結合と定常領域配列のN末端との間の任意の点で定常領域配列に連結することが好ましい。A6 Tax TCRの定常領域配列及び定常領域配列の場合、ジスルフィド結合は、アミノ酸残基158及び172でそれぞれ導入されたシステイン残基同士間で形成され得る。したがって、非相同鎖及び鎖可変領域配列付着点が、それぞれ残基159又は173と定常領域配列又は定常領域配列のN末端との間であれば好ましい。

【0044】

標識又は別の部分（例えば毒性部分又は治療的部分）が本発明の多価TCR複合体に含まれてもよい。例えば、標識又は他の部分は、混合された分子多量体に含まれてもよい。このような多量体分子の例は、3つのTCR分子と1つのペルオキシダーゼ分子とを含む四量体である。これは、TCRと当該酵素を3：1のモル比で混合して四量体複合体を生成し、正しい比の分子を含有しない複合体から、所望の複合体を単離することによって達成し得る。これら混合された分子は、立体障害がその分子の所望の機能を損なわないか又は有意に損なわないという条件で、任意の組合せの分子を含有し得る。ストレプトアビジン分子上の結合部位の位置は、立体障害が生じる可能性がないので、混合した四量体に適切である。

【0045】

本発明のTCR複合体は、ペプチドMHC複合体又は所定のMHC型又はスーパー抗原又はペプチド-MHC/スーパー抗原複合体又はCD1-抗原複合体と結合してもよい。

【0046】

本発明の1つの実施形態は、高親和性TCRを含むTCR複合体を利用可能にする。

【0047】

本明細書で使用する場合、用語「高親和性TCR」とは、特異的TCRリガンドと相互作用し、かつ、表面プラズモン共鳴により測定されるような対応する天然型TCRのものより小さい当該TCRリガンドに関するKdを有するか又は表面プラズモン共鳴により測定されるような対応する天然型TCRのものより小さい当該TCRリガンドに関するオフ-レート(off-rate) (k_{off})を有するかのいずれかである、変異したscTCR又はdTCRをいう。

【0048】

本発明の複合体中に存在する高親和性のscTCR又はdTCRは、好ましくは、少なくとも1

10

20

30

40

50

つの相補性決定領域及び/又はフレームワーク領域で、天然型TCRに対して変異している。

【0049】

本発明の好ましい実施形態において、TCR複合体は、ポリアルキレングリコール鎖によって連結された少なくとも2つのdTCRポリペプチド対を含む。ここで、任意に、二価アルキレンスパーサー基が、ポリアルキレングリコール鎖と本複合体のdTCRへの付着点との間に位置してもよく、各dTCR対は、

TCR鎖可変ドメイン配列に対応する配列がTCR鎖定常ドメイン細胞外配列に対応する配列のN末端に融合している第1のポリペプチド、及び

TCR鎖可変ドメイン配列に対応する配列がTCR鎖定常ドメイン細胞外配列に対応する配列のN末端に融合している第2のポリペプチド

によって構成され、

第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとは、TRAC¹01のエキソン1のThr48及びTRBC¹01若しくはTRBC²01のエキソン1のSer57と置換されたか又はそれらの非ヒト等価物と置換されたシステイン残基間のジスルフィド結合により連結され、

本複合体の各dTCRへのポリアルキレンリンカーの付着点は、dTCRのC末端でシステイン残基のチオール基を介している。

【0050】

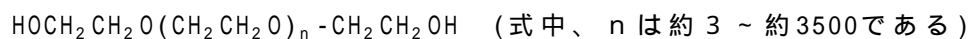
(TCRリンカー)

本発明の複合体において、少なくとも2つのTCR分子がリンカー部分を介して連結して多価複合体を形成している。TCRは非ペプチド性ポリマー鎖によるか又はペプチド性リンカー配列により連結される。好ましくは、本複合体は水溶性であり、したがってリンカー部分は相応に選択すべきである。さらに、好ましくは、リンカー部分はTCR分子上の規定位置に付着させることが可能であり、その結果、形成される本複合体の構造的多様性は最小にされるべきである。本発明の複合体は医療に使用され得るので、リンカー部分は、薬学的適合性(例えば免疫原性)に当然払うべき注意を払って選択すべきである。

上記の所望され得る基準を充足するリンカー部分の例は、当該分野、例えば抗体フラグメントの連結の分野において公知である。

【0051】

本発明の多価TCR分子の作成における使用に好ましい2つのクラスのリンカーが存在する。第1は、親水性ポリマー、例えばポリアルキレングリコールである。最も通常に使用されるこのクラスのものは、ポリエチレングリコール又はPEGをベースにし、その構造は以下に示される。



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

【0052】

このようなポリマーを使用して治療用物質(therapeutic agent)(特に、ポリペプチド又はタンパク質治療薬)を処理又はコンジュゲートし、その治療薬のPKプロフィールに対する有益な変化、例えば、腎クリアランスの低下、血漿半減期の改善、免疫原性の低減及び溶解性の改善を達成してもよい。PEG-治療薬コンジュゲートのPKプロフィールのこのような改善は、PEG分子がその治療薬の周囲に、免疫系との反応を立体的に障害しタンパク質性分解を減少させる「殻」を形成することに起因すると考えられる(Caseyら、(2000) Tumor Targetting 4 235-244)。使用される親水性ポリマーのサイズは、具体的には、本TCR複合体の意図する治療的用途に基づいて選択され得る。したがって、例えば、製品が、例えば腫瘍の治療における使用のために、循環を出て組織に侵入するように意図される場合、5 KDaのオーダーの低分子量ポリマーを使用することが有利であり得る。薬学的製剤におけるPEG及び同様な分子の使用を詳説する多くの総説論文及び書籍が存在する(例えば、Harris(1992) Polyethylene Glycol Chemistry - Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum, New York, NY.又はHarris及びZalipsky(1997) Chemistry and Biologi

10

20

30

40

50

cal Applications of Polyethylene Glycol ACS Books, Washington, D.C.を参照)。

【0053】

使用されるポリマーは、直鎖状又は分枝状のコンホメーションを有することができる。分枝状PEG分子又はその誘導体は、分枝部分(グリセロール及びグリセロールオリゴマー、ペンタエリスリトール、ソルビトール及びリジンを含む)の付加により誘導することができる。

通常、ポリマーは、当該ポリマーがTCR中の標的部位に連結することが可能であるために、その構造中に、例えば一方又は両方の末端に及び/又は骨格からの分枝上に化学反応基を有する。この化学反応基は、親水性ポリマーに直接付着されてもよいし、下記に示されるように親水性ポリマーと反応性化学成分(reactive chemistry)との間にスペーサー基/部分が存在してもよい。

10

反応性化学成分 - 親水性ポリマー - 反応性化学成分

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

【0054】

上記で概説した型の構築物の生成に使用されるスペーサーは、非反応性の化学的に安定な鎖である任意の有機部分であり得る。このようなスペーサーには以下のものが含まれるがそれらに限定されない：

$-(CH_2)_n-$ (式中、 $n = 2 \sim 5$)

$-(CH_2)_3NHCO(CH_2)_2$

【0055】

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

20

【0056】

本発明に有用であり得る反応性化学成分に直接か又はスペーサーを介して連結する市販の親水性ポリマーには、以下のものが含まれるがそれらに限定されない。

【表 2】

PEGリンカーの説明	PEGの供給元	カタログ番号
TCR 単量体付着		
5K 直鎖状 (マレイミド)	Nektar	2D2MOHO1
20K 直鎖状 (マレイミド)	Nektar	2D2MOPO1
20K 直鎖状 (マレイミド)	NOF Corporation	SUNBRIGHT ME-200MA
20K 分枝状 (マレイミド)	NOF Corporation	SUNBRIGHT GL2-200MA
30K 直鎖状 (マレイミド)	NOF Corporation	SUNBRIGHT ME-300MA
40K 分枝状PEG (マレイミド)	Nektar	2D3XOTO1
5K-NP 直鎖状 (Lys付着用)	NOF Corporation	SUNBRIGHT MENP-50H
10K-NP 直鎖状 (Lys付着用)	NOF Corporation	SUNBRIGHT MENP-10T
20K-NP 直鎖状 (Lys付着用)	NOF Corporation	SUNBRIGHT MENP-20T
TCR 二量体リンカー		
3.4K 直鎖状 (マレイミド)	Nektar	2D2DOFO2
5K フォーク状 (マレイミド)	Nektar	2D2DOHOF
10K 直鎖状 (マレイミドの代わりにオルトピリジル _{ds} リンカーを有する)	Sunbio	
20K フォーク状 (マレイミド)	Nektar	2D2DOPOF
20K 直鎖状 (マレイミド)	NOF Corporation	
40K フォーク状 (マレイミド)	Nektar	2D3XOTOOF
高次TCR多量体		
15K, 3アーム, Mal ₃ (三量体用)	Nektar	OJ00NO3
20K, 3アーム, Mal ₄ (四量体用)	Nektar	OJ00PO4
40 K, 8アーム, Mal ₈ (八量体用)	Nektar	OJ00TO8

10

20

【0057】

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

30

N - マレイミド
 ビニルスルホン
 炭酸ベンゾトリアゾール
 スクシンイミジルプロピオネート
 スクシンイミジルブタノエート (succinimidyl butanoate)
 チオエステル
 アセトアルデヒド
 アクリラート
 ビオチン
 一級アミン

40

【0058】

上記のように、非PEGベースのポリマーもまた、本発明のTCRを多量体化するに適切なリンカーを提供する。例えば、脂肪性鎖により連結されたマレイミド末端を含む部分を使用できる(例えばBMH及びBMOE(Pierce, 製品番号22330及び22323))。

【0059】

ペプチド性リンカーは、他のクラスのTCRリンカーである。これらのリンカーは、アミ

50

ノ酸の鎖から構成され、TCR分子が付着できる単純なリンカー又は多量体化ドメインを作成するために機能する。ビオチン/ストレプトアビジン系は、インビトロ結合研究用にTCR四量体を作成するために従来から使用されてきた(WO/99/60119を参照)。しかし、ストレプトアビジンは細菌由来のポリペプチドであり、そうであるので、治療薬における使用に理想的に適してはいない。

【0060】

多価TCR複合体の作成に使用し得る多量体化ドメインを含む多くのヒトタンパク質が存在する。例えば、p53の四量体化ドメインは、scFv抗体フラグメントの四量体を作成するために使用されており、この四量体は、単量体scFvフラグメントと比較して、増大した血清残留性及び有意に減少したオフレートを示した(Willudaら(2001) J. Biol. Chem. 276 (17) 14385-14392)。ヘモグロビンもまた、この種の応用に使用され得る可能性がある四量体化ドメインを有する。

10

【0061】

(多価TCR複合体での細胞標的化)

本発明の多価TCR複合体、特にTCR二量体は、これらに組み込まれるTCRのコグネイトTCRリガンドを発現する標的細胞との優先的な結合を示すという利点を有する。これら複合体はまた、最も高い可能性として腫瘍への血液供給を介して、腫瘍塊に侵入し得る。本明細書中の実施例10は、NY-ESO TCR二量体の腫瘍侵入特性および局在特性の実験的例証を提供する。これら特性により、本発明の多価TCR複合体は、所定のTCRリガンドを発現する細胞への治療用及び/又は画像化用の薬剤の送達に適切な部分となる。

20

【0062】

(治療用途)

本発明のTCR複合体は、例えば細胞殺傷に使用するための毒性部分又は免疫刺激物質(immunostimulating agent)(例えばインターロイキン、サイトカイン又は免疫刺激性ペプチド若しくはポリペプチド)であり得る治療用物質と結合(例えば、共有結合又は他の連結)をしていてもよい。免疫刺激性ポリペプチドの例には、NY-ESOポリペプチド及びNY-ESOポリペプチドを含むガン性細胞上でHLA-A2分子により搭載される(loaded)SLLMWITQCペプチド又はインフルエンザに感染した細胞によりHLA-A2により搭載されるGILGFVFTLペプチドが含まれる。この免疫刺激性ポリペプチドは、好ましくは、HLA分子によりプロセシングされて提示され得る形態で1又はそれ以上のペプチドエピトープを含む。あるいは、免疫刺激性ペプチドは、HLAポリペプチドにより搭載され得る合成の天然に存在しないペプチドを含み得る。次いで、本発明の多価TCR複合体における使用のために、HLA-合成ペプチド複合体を認識する組換えTCRが作成され得る。複数の治療用物質を本発明の多価TCR複合体と結合させることもまた企図する。

30

【0063】

本発明の多価TCR複合体は、非多量体のT細胞レセプターヘテロ二量体と比べて、コグネイトリガンドに関して増強した結合能力を有し得る。したがって、本発明に従う多価TCR複合体は、特定の抗原を提示する細胞をインビトロ又はインビボで追跡又は標的するために特に有用であり、またそのような用途を有するさらに多価のTCR複合体の製造のための中間体としても有用である。したがって、TCR又は多価TCR複合体は、インビボでの使用のために薬学的に受容可能な製剤で提供され得る。

40

【0064】

本発明はまた、標的細胞に治療用物質を送達する方法を提供し、この方法は、潜在的な標的細胞を本発明に従う多価TCR複合体と、標的細胞への多価TCR複合体の付着を可能にする条件下で接触させることを含み、当該多価TCR複合体は、コグネイトリガンド(例えば、MHC-ペプチド複合体、CD1-抗原複合体、スーパー抗原又はMHC-ペプチド/スーパー抗原複合体)に特異的であり、治療用物質を結合される。

【0065】

現在、本発明のTCR複合体(例えばTCR-PEG二量体又は治療用物質に連結されたその二量体)の治療的使用は更なる予測されない有益性を提供すると考えられている。例えば、こ

50

のような複合体の分布は、多くの場合、大部分が、腫瘍の生存可能な領域(viable area)に局限される。これは、本発明の多量体TCR複合体がこの腫瘍領域に選択的に標的付け得ることを示す。このことは重要であり、予測されなかった有益性である。なぜなら、奏功する治療剤が標的すべきはこれら生存可能な領域であり、死亡腫瘍細胞を標的することに消耗されなければ、所期の効果に必要とされるのは僅かな複合体であり得るからである。更に、現在、このような複合体は迅速な腫瘍侵入が可能であると考えられている。迅速な内在化は能動的な進入機構を示す。理論に縛られることは望まないが、この能動的機構は、TCR複合体(例えば二量体)との相互作用への応答における腫瘍細胞上のpMHCの内在化を含み得ると仮定される。この内在化は、pMHCと結合した複合体が腫瘍細胞中に「入る」ことを導き得る。更に、以前から、pMHCの内在化はアポトーシスを導き、このような多価TCR複合体治療薬の更なる予測されなかった作用態様を提供し得ることが示唆されてきた。この主張は、抗原提示細胞が抗HLA抗原の結合に応答してアポトーシスを起こすことを証明する多くの研究により支持される(例えば、Wallen-Ohmanら(1997) J. Immunology 9 (4) 599-606及びDanielら(2003) Transplantation 75 (8) 1380-6を参照)。この観察により、おそらくは追加の細胞傷害性薬剤を連結する必要なく、効果的な抗ガン剤としてのそれらの使用のための更なる基礎が提供される。

【0066】

しかし、本発明の特定の実施形態では、多価TCR複合体は、特定の抗原を提示する細胞の場所に治療用物質を送達するために使用することができる。このことは、多くの状況で、特に腫瘍に対して有用である。治療用物質は、その効果を局所的にはあるが、その治療用物質が結合する細胞上のみに限らずに発揮するように送達され得る。したがって、1つの特別な戦略では、腫瘍抗原に特異的な本発明の多価TCR複合体に連結した抗腫瘍分子が使用される。

【0067】

多くの治療用物質、例えば放射活性化合物、酵素(例えばパーフォリン)又は化学療法剤(例えばシスプラチン)がこの用途に用いられ得る。確実に所望の位置で毒性効果が発揮されるために、毒素は、それが緩徐に放出されるように、ストレプトアビジンに連結したりポソーム内にあり得る。このことが、体内での輸送の間の損傷効果を防止し、該当する抗原提示細胞との多価TCR複合体の結合後に毒素が最大効果を有することを確実にする。

【0068】

他の適切な治療用物質には、

- ・小分子細胞毒性物質、すなわち、哺乳動物細胞を殺傷する能力を有する、分子量700ダルトン未満の化合物。このような化合物はまた、細胞毒性効果を有することができる毒性金属を含み得る。更に、これら小分子細胞毒性物質はまた、プロドラッグ、すなわち、生理学的条件下で崩壊又は変換して細胞毒性物質を放出する化合物を含む。このような物質の例には、シスプラチン、メイタンシン(maytansine)誘導体、ラケルマイシン(rachelmycin)、カリケアマイシン(calicheamicin)、ドセタキセル、エトポシド、ゲムシタピン、イホスファミド、イリノテカン、メルファラン、ミトキサントロン、ソルフィマーソディウムホトフィリンII(sorfiner sodiumphotofrin II)、テモゾロマイド(temozolamide)、トポテカン、トリメトレキサート(trimetrexate)、グルクロナート、オーリスタチンE(auristatin E)、ピンクリスチン及びドキシソルピシンが含まれる；

- ・ペプチド細胞毒素、すなわち、哺乳動物細胞を殺傷する能力を有するタンパク質又はそのフラグメント。例には、リシン、ジフテリア毒素、シュードモナス細菌外毒素A、DNAアーゼ及びRNAアーゼが含まれる；

- ・放射性核種、すなわち、1以上の若しくは粒子又は線の同時放射を伴って崩壊する元素の不安定同位体。例には、ヨウ素131、レニウム186、インジウム111、イットリウム90及び⁹⁰Ytを組み込まれた複合体(例えば⁹⁰Yt - DOTA - ピオチン)、ピスマス210及び213、アクチニウム225並びにアスタチン213が含まれる；

- ・プロドラッグ、例えば抗体により指向させた酵素プロドラッグ；

- ・免疫増強剤(immuno-stimulant)、すなわち、免疫応答を刺激する部分。例には、サイ

トカイン(例えばIL-2)、ケモカイン(例えばIL-8)、血小板第4因子、メラノーマ増殖刺激タンパク質など、抗体又はそのフラグメント、補体活性化剤、異種タンパク質ドメイン、同種タンパク質ドメイン、ウイルス性/細菌性タンパク質ドメイン及びウイルス性/細菌性ペプチドが含まれる。

【0069】

本発明の可溶性多価TCR複合体は、プロドラッグを薬物に変換し得る酵素に連結されてもよい。これは、プロドラッグが薬物を必要とする(すなわち、sTCRにより標的される)部位でのみ薬物に変換することを可能にする。

【0070】

本発明に従うTCRに適切なMHC-ペプチド標的の例には、ウイルス性エピトープ、例えば、HTLV-1エピトープ(例えばHLA-A2により制限されたTaxペプチド; HTLV-1は白血病に関連する)、HIVエピトープ、EBVエピトープ、CMVエピトープ;メラノーマエピトープ(例えばMAGE-1 HLA-A1制限エピトープ)及び他のガン特異的エピトープ(例えばHLA-A2により制限された腎臓細胞ガン腫関連抗原G250);並びに自己免疫疾患(例えば慢性関節リウマチ)に関連するエピトープが含まれるが、これらの限定されない。さらに、本発明での使用に適切な疾患関連pMHC標的は、HLA Factbook(Barclay編, Academic Press)に掲載されており、他にも多くのものが同定されている。

【0071】

多くの疾患処置は、可溶性TCRの特異性を通じて薬物を局在化することによって亢進させることができる可能性がある。

【0072】

そのための薬物が存在するウイルス性疾患、例えばHIV、SIV、EBV、CMVは、その薬物が感染細胞の近位で放出又は活性化されることの恩恵を受ける。ガンについては、腫瘍又は転移の近位に限局することにより、毒素又は免疫増強剤の効果が亢進する。自己免疫疾患では、より長い期間にわたってより局所的な効果を有する一方で、被験者の免疫能力全体には最小限にしか影響しない免疫抑制薬物が緩徐に放出され得る。移植拒絶の予防では、免疫抑制薬物の効果は、同じ方法で最適化され得る。ワクチン送達のためには、ワクチン抗原は抗原提示細胞の近くに限局され、したがって抗原の効力を亢進され得る。この方法はまた、画像化目的にも適用することができる。

【0073】

本発明の可溶性多価TCR複合体は、特異的コグネイトリガンドへ結合しそれによりT細胞活性化を阻害することによって、T細胞活性化を調整するために使用し得る。T細胞媒介性炎症及び/又は組織損傷を含む自己免疫疾患(例えばI型糖尿病)は、このアプローチに適する。該当するpMHCにより提示される特異的ペプチドエピトープの知識が、この用途に必要である。自己免疫疾患を処置する別の手段は、広範囲の又は任意の適切なペプチドを搭載する(loaded)所定の型のHLA分子と結合し得るTCRを含む本発明の多価TCR複合体を使用することである。このような多価TCR複合体の使用は、当該HLA分子を含む複合体との相互作用により媒介されるT細胞応答の抑制を導くと予測される。多くの自己免疫疾患が特定のHLA型に関連しており、この関連性を使用して、本発明の多量体TCR複合体が認識すべき適切なHLAを選択できることは周知である。例えば、慢性関節リウマチはHLA-DR4に関連し、強直性脊椎炎はHLA-B27に関連する。HLA型と多くの疾患との間の関連性の議論は、Lechler(2000) HLA in Health and Disease, 第2版, Academic Pressに見出すことができる。

【0074】

本発明のTCR複合体は、特異的TCRリガンドへの結合及びそのことによるT細胞活性化の阻害によってT細胞活性化を調整するために使用され得る。T細胞媒介性炎症及び/又は組織損傷を含む自己免疫疾患(例えば、I型糖尿病)は、このアプローチに影響を受け易い。該当するpMHCにより提示される特異的ペプチドエピトープの知識がこの使用に必要である。

【0075】

10

20

30

40

50

本発明に従う治療用又は画像化用TCR複合体は、通常、一般には薬学的に受容可能なキャリアを含む、滅菌の薬学組成物の部分として供給される。この薬学組成物は、(これを患者に投与する望ましい方法に依存して)任意の適切な形態であり得る。これは、単位投薬剤形で提供されてもよく、一般には密封容器で提供され、キットの部分として提供されてもよい。このようなキットは、(必ずしもではないが)通常、使用のための指示書を含む。キットは、複数の単位投薬剤形を含んでもよい。

【0076】

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

【0077】

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

【0078】

遺伝子クローニング技法は、本発明の複合体としてのコンジュゲーション用のTCRを提供するために使用され得る。これらの技法は、例えば、J. Sambrookら、Molecular Cloning, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に開示されている。

【0079】

(診断用途)

上記のように、本発明の多価TCR複合体は、細胞及び細胞塊の画像化、追跡及び標的化に関する適用を有する。これらの細胞の画像化を容易にする部分をこれらの複合体と結合させることができる。このような標識した多価TCR複合体は、所定の多価TCR複体内に組み込まれたTCRについてのコグネイトTCRリガンドを発現する細胞の分布を分析するために使用することができる。この画像化は、インビボ又はエキソビボのいずれかで実施することができる。当業者に公知の、本発明の多価TCR複合体と結合され得る広範囲の画像化剤が存在する。これら画像化剤には、以下のものが含まれるがこれらに限定されない：

放射性核種(例えば、 ^{125}I 、 ^{201}Tl 、 ^{67}Ga 、 ^{17}F 、 ^{131}I 及び $^{99\text{m}}\text{Tc}$)

電子高密度粒子(例えば、金)

蛍光標識(例えば、FITC、PE、CY-3及びCY-5)

【0080】

そのような標識部分と結合した多価TCR複合体は、ガン及び感染性疾患の診断のため並びにその疾患又はガンの進行をモニターするための方法において有用である。

【0081】

(更なる観点)

本発明の複合体に存在する可溶性多価TCRは、封入体としての細菌(例えばE.coli)中での発現及びその後のインビトロでのリフォールディングにより得られ得る。

【0082】

TCR鎖のリフォールディングは、適切なリフォールディング条件下でインビトロで起こり得る。特定の実施形態では、正確なコンホメーションを有するTCRは、可溶化剤(例えば尿素)を含むリフォールディング緩衝液中で、可溶化したTCR鎖をリフォールディングすることによって達成される。有利には、尿素は、少なくとも0.1M又は少なくとも1M又は少なくとも2.5M又は約5Mの濃度で存在し得る。使用し得る代替りの可溶化剤は、0.1M~8M、好ましくは少なくとも1M又は少なくとも2.5Mの濃度のグアニジンである。リフォールディングの前に、還元剤を用いて、確実にシステイン残基の還元を完了するのが好ましい。必要であれば、更なる変性化剤(例えばDTT及びグアニジン)を使用してもよい。リフォールディング工程の前に異なる変性剤及び還元剤(例えば尿素、 β -メルカプトエタノール)を使用してもよい。リフォールディングの間に、代替りのレドックス対(シス

10

20

30

40

50

タミン/システアミンレドックス対、DTT又は -メルカプトエタノール/大気中の酸素、並びに還元形態及び酸化形態のシステイン)を使用してもよい。

【0083】

フォールディングの効率はまた、リフォールディング混合物に、ある他のタンパク質成分(例えば、シャペロンタンパク質)を添加することにより増大させ得る。改善されたリフォールディングは、ミニ-シャペロンが固定されたカラムにタンパク質を通過させることによって達成されている(Altamiranoら(1999) Nature Biotechnology 17:187-191; Altamiranoら(1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(8):3576-8)。

【0084】

或いは、本発明の多価TCR複合体は、真核細胞系(例えば昆虫細胞)中での発現により取得し得る。

【0085】

多価TCR複合体の精製は、多くの異なる手段により達成され得る。代替形態のイオン交換を使用してもよいし、他の形態のタンパク質精製(例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー又はアフィニティークロマトグラフィー)を使用してもよい。

【0086】

本発明の各観点の好ましい特性は、その他の観点の各々についての特性と同様である(ただし必要な変更は加える)。本明細書中で言及した先行技術文献は、法が許す最大範囲で本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0087】

本発明は以下の実施例においてさらに記述するが、実施例は、いかなる意味においても、本発明の範囲を限定するものではない。

以下に添付図面について言及する。

【0088】

図1a及び1bは、それぞれ、システインコドンを導入するように変異された可溶性A6 TCRの鎖及び鎖の核酸配列を示す。影は導入したシステインコドンを示す。

図2aは、新規なジスルフィド鎖間結合を形成するために使用したT₄₈ C変異(下線)を含むA6 TCR鎖細胞外アミノ酸配列を示す。図2bは、新規なジスルフィド鎖間結合を形成するために使用したS₅₇ C変異(下線)を含むA6 TCR鎖細胞外アミノ酸配列を示す。

図3a及び3bは、それぞれ、システインコドンを導入するように変異した可溶性NY-ESO TCRの鎖及び鎖の核酸配列を示す。

【0089】

図4aは、新規なジスルフィド鎖間結合を形成するために使用したT₄₈ C変異を含むNY-ESO TCR鎖細胞外アミノ酸配列を示す。図4bは、新規なジスルフィド鎖間結合を形成するために使用したS₅₇ C変異を含むA6 TCR鎖細胞外アミノ酸配列を示す。

図5は、コードするポリペプチドのC末端にシステイン残基の付加を引き起こすコドンを導入するように更に変異させた可溶性NY-ESO TCRの鎖の核酸配列を示す。

図6は、ポリペプチドのC末端にシステイン残基を導入するように更に変異させた可溶性NY-ESO TCRの鎖のアミノ酸配列を示す。

図7a及び7bは、それぞれ、コードするポリペプチドのC末端にシステイン残基の付加を引き起こすコドンを導入するように更に変異させた可溶性A6 TCRの鎖及び鎖の核酸配列を示す。

図8a及び8bは、それぞれ、ポリペプチドのC末端にシステイン残基を導入するように更に変異させた可溶性A6 TCRの鎖及び鎖のアミノ酸配列を示す。

【0090】

図9は、PBS中で予め平衡化したSuperdex 75 HR10/30ゲル濾過カラムで泳動させた二量体NY-ESO TCR 3.4kd Mal-PEG-Mal複合体のクロマトグラムである。

図10は、還元条件及び非還元条件下で泳動させた図9に示したゲル濾過ゲルから集めた画分のSDS PAGEゲルである。

10

20

30

40

50

図11aは、単量体NY-ESO TCRと固定化HLA-A2-NY-ESOとの間の相互作用を示すBIAcoreトレースである。図11bは、二量体NY-ESO TCR 3.4kd Mal-PEG-Mal複合体と固定化HLA-A2-NY-ESOとの間の相互作用を示すBIAcoreトレースである。

図12aは、単量体A6 TCRと固定化HLA-A2-Taxとの間の相互作用を示すBIAcoreトレースである。図12bは、二量体A6 TCR 3.4kd Mal-PEG-Mal複合体と固定化HLA-A2-Taxとの間の相互作用を示すBIAcoreトレースである。図12cは、固定化HLA-A2-Tax上に流した二量体A6 TCR 3.4kd Mal-PEG-Mal複合体の単回注入を示すBIAcoreトレースである。

【0091】

図13は、A6 scTCRの構築に使用したリンカーのDNA配列及びアミノ酸配列を示す。

図14は、ファージミドベクター中へのTCR 鎖及び 鎖のクローニングを概説する。この図は、ファージディスプレイベクターを記述する。RSBはリボソーム結合部位である。S1又はS2は、E.coliの細胞周辺質にタンパク質を分泌するためのシグナルペプチドである。「*」は翻訳停止コドンを示す。TCR 鎖又は 鎖のいずれもがファージコートタンパク質と融合され得るが、この図では、TCR 鎖のみがファージコートタンパク質と融合している。

図15a及び15bは、それぞれ、ファージミドpEX746:A6のDNA配列及びアミノ酸配列を詳説する。

【0092】

図16は、腫瘍を有する雌性ヌードラットに二量体-[¹²⁵I]-mTCR(PEG化)の単回の静脈内投与をした20分後の組織内の放射活性の分布を示す。

図17は、腫瘍を有する雌性ヌードラットに二量体-[¹²⁵I]-mTCR(PEG化)の単回の静脈内投与をした48時間後の組織内の放射活性の分布を示す。

図18は、PEG連結A6 TCR四量体と固定化HLA-A2-Taxとの間の相互作用を示すBIAcoreトレースである。

【0093】

図19aはH&E染色したクリオスタット腫瘍切片を示す。図19bは抗HLA-A2染色したクリオスタット腫瘍切片を示す。図19cは対照IgG染色したクリオスタット腫瘍切片を示す。

図20aは、H&E染色及び抗TCR 鎖抗体染色したホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍切片を示す。図20bは、H&E染色及び抗NY-ESO TCR抗体染色したホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍切片を示す。図20cは、H&E染色及び抗NY-ESO抗体/NY-ESO TCR対照染色したホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍切片を示す。図20dは、H&E染色及び省略(omission)対照染色したホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍切片を示す。

図21は、H&E染色及び抗NY-ESO TCR抗体染色したホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍切片を示す。

【0094】

図22aは、3'末端に導入システインコドンを含む高親和性A6 TCR 鎖のDNA配列を詳述する。図22bは、3'末端に導入システインコドンを含むA6 TCR 鎖のアミノ酸配列を詳述する。

図23aは高親和性A6 TCR 鎖のDNA配列を詳述する。変異した核酸を太字で示す。図23bはA6 TCR 鎖のアミノ酸配列を詳述する。変異したアミノ酸を太字で示す。

【0095】

図24は、高親和性A6 TCRと固定化HLA-A2-Taxとの間の相互作用を示すBIAcoreトレースである。

図25は、二価高親和性A6 TCR 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体と固定化HLA-A2-Taxとの間の相互作用を示すBIAcoreトレースである。

図26は、A6 TCR PEG複合体と固定化HLA-A2-Taxとの間の相互作用を示すBIAcoreトレースである：

ピーク1 - 単量体3.4KD A6 TCR PEG複合体

ピーク2 - 二量体3.4KD A6 TCR直鎖状Mal-PEG-Mal複合体

ピーク3 - 二量体5KD A6 TCRフォーク状Mal-PEG-Mal複合体。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 6 】

図27aは、高親和性クローン134 A6 TCR 20KD PEG二量体による、 10^{-4} MのTaxペプチドでパルスしたPP細胞の特異的染色を示す。図27bは、高親和性クローン134 A6 TCR 20KD PEG二量体による、 10^{-5} MのTaxペプチドでパルスしたPP細胞の特異的染色を示す。

【 0 0 9 7 】

実施例 1 - A6 Tax TCR 鎖及び 鎖のプライマーの設計及び変異誘発

TRAC⁺01中のエキソン1のA6 Taxスレオニン48をシステインに変異させるために、以下のプライマーを設計した(変異を小文字で示す)：

5'-C ACA GAC AAA tgT GTG CTA GAC AT

5'-AT GTC TAG CAC Aca TTT GTC TGT G

TRBC1⁺01及びTRBC2⁺01の両方でエキソン1のA6 Taxセリン57をシステインに変異させるために、以下のプライマーを設計した(変異を小文字で示す)：

5'-C AGT GGG GTC tGC ACA GAC CC

5'-GG GTC TGT GCa GAC CCC ACT G

【 0 0 9 8 】

PCR変異誘発：

A6 Tax TCR 鎖又は 鎖の遺伝子を含む発現プラスミドを、それぞれ 鎖プライマー又は 鎖プライマーを使用して、以下のように変異させた。100ngのプラスミドを5 μ lの10 mM dNTP、25 μ lの10 \times Pfu緩衝液(Stratagene)、10単位のPfuポリメラーゼ(Stratagene)と混合し、最終容量をH₂Oで240 μ lに調整した。48 μ lのこの混合物に、50 μ lの最終反応容量中で0.2 μ Mの最終濃度が得られるように希釈したプライマーを補充した。95 $^{\circ}$ Cにて30秒間の最初の変性工程の後、反応混合物を、Hybaid PCR express PCR装置において、15回の変性(95 $^{\circ}$ C、30秒)、アニーリング(55 $^{\circ}$ C、60秒)及び伸長(73 $^{\circ}$ C、8分)に付した。次いで、産物を10単位のDpnI制限酵素(New England Biolabs)で37 $^{\circ}$ Cにて5時間消化した。10 μ lの消化反応物を、コンピテントXL1-Blue細菌に形質転換し、37 $^{\circ}$ Cにて18時間増殖させた。一つのコロニーを採取し、5 mlのTYP+アンピシリン(16g/l細菌トリプトン、16g/l酵母抽出物、5 g/l NaCl、2.5g/l K₂HP0₄、100mg/lアンピシリン)中で一晩増殖させた。プラスミドDNAを、製造業者の指示に従ってQiagenミニプレップカラムで精製し、配列を、オックスフォード大学生化学部の配列決定設備で自動配列決定により検証した。それぞれの変異した核酸配列及びアミノ酸配列を、 鎖については図1a及び図2aに、 鎖については図1b及び図2bに示す。

【 0 0 9 9 】

実施例 2 - 新規ジスルフィド結合を含む可溶性NY-ESO TCRの作成

NY-ESO TCRをコードするcDNAを、Enzo Cerundolo(Institute of Molecular Medicine, University of Oxford)より供給されたT細胞から公知の技法に従って単離した。NY-ESO TCRをコードするcDNAは、逆転写酵素でのmRNAの処理により作成した。

実施例 1で調製した可溶性A6 TCRの 鎖は、天然型配列中に、連結部位としての使用に適切なBglIII制限部位(AAGCTT)を含む。

【 0 1 0 0 】

PCR変異誘発を下記に詳述するように行い、新規なシステインコドンの5'側で可溶性A6 TCRの 鎖中にBamHI制限部位(GGATCC)を導入した。図1aに記載する配列をこの変異誘発のためのテンプレートとして使用した。以下のプライマーを使用した：

【 化 1 】

| BamHI |

5'-ATATCCAGAACCCgGAtCCTGCCGTGTA-3'

5'-TACACGGCAGGAaTcGGGTTCTGGATAT-3'

【 0 1 0 1 】

新規なジスルフィド結合が組み込まれている可溶性NY-ESO TCRを作成するため、 鎖Ba

10

20

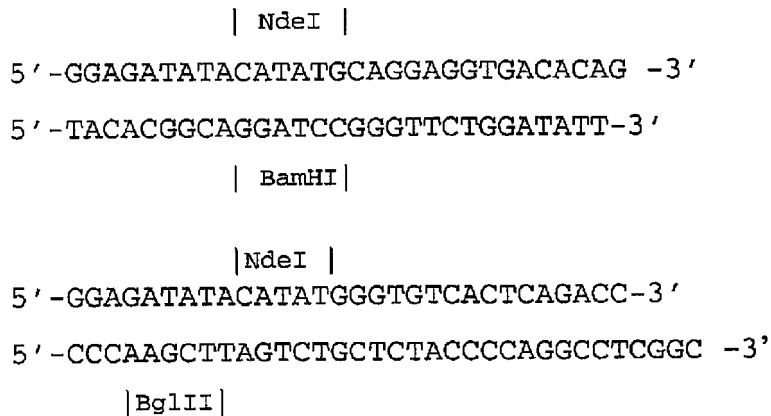
30

40

50

mHI制限部位及び 鎖BglIII制限部位を含むA6 TCRプラスミドをテンプレートとして使用した。以下のプライマーを使用した：

【化2】



10

【0102】

NY-ESO TCR 鎖構築物及び 鎖構築物を、以下のとおりのPCRクローニングにより取得した。PCR反応を上記のようなプライマー及びNY-ESO TCR鎖を含むテンプレートを使用して行った。PCR産物を該当する制限酵素で制限消化し、pGMT7中にクローニングして発現プラスミドを取得した。このプラスミド挿入物の配列を自動化DNA配列決定により確認した。図3a及び図3bは、NY-ESO TCRの変異した 鎖及び 鎖のDNA配列をそれぞれ示し、図4a及び図4bは得られるアミノ酸配列を示す。

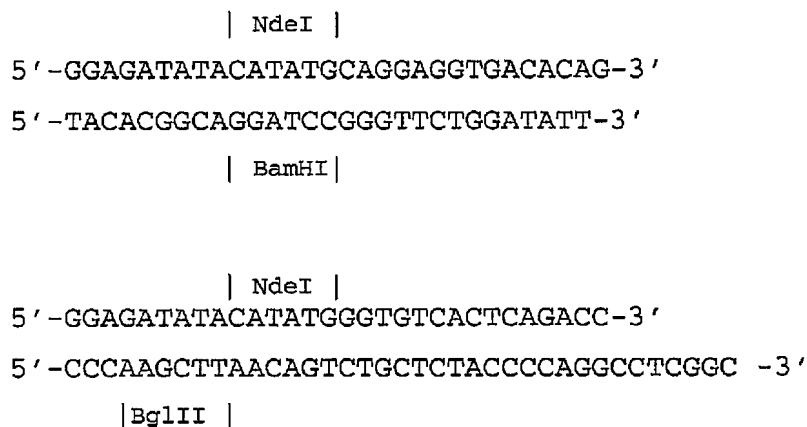
20

【0103】

実施例3 - 新規ジスルフィド鎖間結合と 鎖C末端の追加のシステイン残基とを含む可溶性NY-ESO TCRの作成

新規なジスルフィド結合と 鎖C末端のシステイン残基とが組み込まれている可溶性NY-ESO TCRを作成するため、 鎖BamHI制限部位及び 鎖BglIII制限部位を含むプラスミドを、実施例2に記載のようなフレームワークとして使用した。以下のプライマーを使用した：

【化3】



30

40

【0104】

NY-ESO TCR 鎖構築物及び 鎖構築物を、以下のとおりのPCRクローニングにより取得した。PCR反応を上記のようなプライマー及びNY-ESO TCR鎖を含むテンプレートを使用して行った。PCR産物を該当する制限酵素で制限消化し、pGMT7中にクローニングして発現プラスミドを取得した。このプラスミド挿入物の配列を自動化DNA配列決定により確認した。図5は、NY-ESO TCRの変異した 鎖のDNA配列を示し、図6は得られるアミノ酸配列を示す。

【0105】

50

実施例 4 - 新規ジスルフィド鎖間結合と 鎖 C 末端の追加のシステイン残基とを含む可溶性 A6 TCR の作成

実施例 2 に記載したように調製した 鎖 BamHI 制限部位及び 鎖 BglIII 制限部位を含む A6 TCR をコードするプラスミドを開始点として使用した。以下のプライマーを使用して、実施例 3 に記載のように新規ジスルフィド結合及び 鎖 C 末端上のシステイン残基を組み込まれた可溶性 A6 TCR を作成した：

5' - GGAGATATACATATGAACGCTGGTGTCACT - 3'

5' - CCCAAGCTTAACAGTCTGCTCTACCCCAGGCCTCGGC - 3'

【 0 1 0 6 】

このプラスミド挿入物の配列を自動化 DNA 配列決定により確認した。図 7a 及び図 8a は、変異 A6 TCR の 鎖の DNA 配列及びアミノ酸配列を示す。図 7b 及び図 8b は、変異 A6 TCR の 鎖の DNA 配列及びアミノ酸配列を示す。

10

【 0 1 0 7 】

実施例 5 新規ジスルフィド鎖間結合及び 鎖 C 末端上の追加のシステイン残基を含む可溶性の A6 TCR 及び NY-ESO TCR の発現及びリフォールディング

新規ジスルフィド鎖間結合及び 鎖 C 末端上の追加のシステイン残基を含む変異した NY-ESO TCR 及び A6 TCR をコードする実施例 3 及び 4 に詳述した発現プラスミドを、別々に、E. coli 株 BL21pLysS 中に形質転換し、単一のアンピシリン耐性コロニーを 37 °C にて TYP (アンピシリン 100 µg/ml) 培地中で OD₆₀₀ が 0.4 になるまで増殖させ、その後 0.5mM IPTG でタンパク質発現を誘導した。誘導の 3 時間後に、Beckman J-6B での 30 分間 4000rpm にての遠心分離により細胞を集めた。50mM Tris-HCl、25% (w/v) スクロース、1 mM NaEDTA、0.1% (w/v) アジ化 Na、10mM DTT を含む緩衝液 (pH 8.0) 中に細胞ペレットを再懸濁した。一晩の凍結解凍工程の後、標準 12mm 直径プローブを使用して Milsonix XL2020 超音波装置において 1 分間のバーストで合計約 10 分間、再懸濁細胞を超音波処理した。Beckman J2-21 遠心分離機における 13000rpm にて 30 分間の遠心分離により封入体ペレットを回収した。次いで、3 回の界面活性剤洗浄を実施して、細胞残渣及び膜成分を除去した。各回、Triton 緩衝液 (50mM Tris-HCl、0.5% Triton-X100、200mM NaCl、10mM NaEDTA、0.1% (w/v) アジ化 Na、2 mM DTT、pH 8.0) 中で封入体ペレットをホモジナイズした後、Beckman J2-21 における 13000rpm にて 15 分間の遠心分離によりペレット化した。次いで、以下の緩衝液中での同様な洗浄により界面活性剤及び塩を除去した：50mM Tris-HCl、1 mM NaEDTA、0.1% (w/v) アジ化 Na、2 mM DTT、pH 8.0。最後に、封入体を 30mg のアリコートに分割し、-70 °C に凍結した。6 M グアニジン - HCl での可溶化及び Bradford 色素結合アッセイ (PerBio) での測定により、封入体タンパク質の収率を定量した。

20

30

【 0 1 0 8 】

発現した TCR 鎖をリフォールディングするため、30mg の可溶化 TCR 鎖封入体及び 60mg の対応する可溶化 TCR 鎖封入体を、凍結ストックから解凍した。封入体を、6 M グアニジン溶液中 5 mg/ml の最終濃度まで希釈し、DTT (2 M ストック) を 10mM の最終濃度まで添加した。この混合物を 37 °C にて 30 分間インキュベートした。

【 0 1 0 9 】

可溶性 TCR のリフォールディング：

40

1 L のリフォールディング緩衝液を 5 ± 3 °C にて激しく攪拌した。レドックス対 (2 -メルカプトエチルアミン及びシスタミン、それぞれ最終濃度 6.6mM 及び 3.7mM まで) を添加して約 5 分後に、変性 TCR 鎖を添加した。次いで、5 ± 3 °C にて攪拌しながら、約 5 時間 ± 15 分間、タンパク質をリフォールディングさせた。

【 0 1 1 0 】

リフォールディングした可溶性 TCR の透析：

Spectrapor 1 メンブレン (Spectrum；製品番号 132670) において、10 L の 10mM Tris (pH 8.1) に対して、5 ± 3 °C にて 18 ~ 20 時間、リフォールディングした TCR を透析した。この後、透析緩衝液を、新鮮な 10mM Tris (pH 8.1) (10 L) に交換し、透析を 5 ± 3 °C にて更に 20 ~ 22 時間継続した。

50

【0111】

透析したリフォールディング体をPOROS 50HQアニオン交換カラムに充填し、Akta精製装置(Pharmacia)を使用して50カラム容量を超える0~500mM NaClの勾配で結合タンパク質を溶出させることにより、分解産物及び不純物からsTCRを分離した。ピーク画分を4にて保存し、クーマシー染色SDS-PAGEにより分析した後、プールして濃縮した。最後に、HB S-EP緩衝液(10mM HEPES pH 7.4、150mM NaCl、3.5mM EDTA、0.05% nonidet p40)中で予め平衡化したSuperdex 200HRゲル濾過カラムを用いて、sTCRを精製し、特徴付けを行なった。次いで、約50kDaの相対分子量で溶出するピークをプールして濃縮した。

【0112】

実施例6 - 3.4kd Mal-PEG-Malリンカーを使用するTCRの二量体化

10

新規ジスルフィド鎖間結合及び鎖C末端の追加のシステイン残基を含むNY-ESO TCR(上記のように調製)を、非分枝状二官能性マレイミド-PEG(MAL-PEG-MAL、MW 3.4KD、Shearwater corp.)を用いて架橋した。このリンカーの末端上のマレイミド基は、リンカーに、自由チオール結合特異性を付与する。ジスルフィドTCR鎖間結合を還元することなく可溶性TCR鎖の自由システインを還元するために、架橋前にTCRを還元剤0.2mM DTTで前処理した(室温、一晩)。次いで、10mM EDTAを含むPBS緩衝液中でのゲル濾過クロマトグラフィー(Superdex 75)により可溶性TCRを再精製した。約2:1(タンパク質対架橋剤)のモル比にてMAL-PEG-MAL(DMF中10mM)を添加し、続いて室温で一晩インキュベートすることにより架橋を達成した。次いで、PBS中で予め平衡化したSuperdex 75 HR10/30ゲル濾過カラムを使用して生成物を精製した(図9)。架橋後に3つの異なるピークが観察された。このうち1つはインタクトな「単量体」TCRの位置に相当し、その他の2つは、より高分子量の種に相当した。ピーク中の物質をSDS-PAGEにより更に分析した。

20

【0113】

図9に示した3つのピークからのサンプルを、DTTを含まないか(非還元用)又は15mM DTTを含む(還元用)標準的なSDSサンプル緩衝液(BioRad)で前処理し、勾配4~20% PAGE上で泳動させ、クーマシーブルー染色で染色した。非還元条件下で、3つのピーク中の物質(左右)は、それぞれ、架橋した(TCR-PEG-TCR)種(ピーク1に対応する画分4及び5)、中間種(TCR-PEG)(画分6/ピーク2)及び非改変TCR(画分7/ピーク3)として現れた。還元条件(これは、鎖間ジスルフィド結合の破壊を引き起こし、したがってSDS-PAGEでのポリペプチド鎖及びポリペプチド鎖の分離を引き起こす)下で、同じサンプルは、それぞれ、架橋鎖二量体(-PEG-)、中間体(PEG-)及び非改変鎖を示した一方で、遊離鎖は、全ての画分に(充填したタンパク質に比例して)分布している(図10)。

30

【0114】

上記方法はまた、非分枝状二官能性マレイミド-PEG(MAL-PEG-MAL、MW 3.4KD、Shearwater corp.)を用いて架橋した、新規ジスルフィド鎖間結合及び鎖のC末端上の追加のシステイン残基を含むA6 TCRを作成するためにも使用した(データは示さず)。

【0115】

実施例7 - 特異的pMHCへの二価A6 TCR及びNY-ESO TCR 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体の結合のBIAcore表面プラズモン共鳴特徴付け

表面プラズモン共鳴バイオセンサ(BIAcore 3000(商標))を使用して、二価のA6 TCR PEG複合体及びNY-ESO TCR PEG複合体とそれらのコグネイトペプチド-MHCリガンドとの結合を分析した。これは、半配向様式でストレプトアビジン被覆結合表面に固定した単一pMHC複合体(下記に説明)を作成することによって促進させた。pMHC複合体の手動での注入により、固定したクラスI分子を正確なレベルで容易に操作することが可能になる。

40

このような固定化pMHC複合体は、T細胞レセプター及びコレセプター(coreceptor)CD8の両方に結合し得る。これらは共に可溶相で注入され得る

【0116】

構成成分のサブユニットタンパク質及び合成ペプチドを含む細菌発現封入体から、インビトロで、ビオチン化クラスI HLA-A2-ペプチド複合体をリフォールディングさせ、続いて精製し、インビトロで酵素的にビオチン化した(O'Callaghanら(1999) Anal. Biochem

50

. 266 : 9-15)。適切な構築物中でHLA重鎖の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインに置換するC末端ビオチン化タグを有するHLA重鎖を発現させた。~75mg/リットル細菌培養物の封入体発現レベルが得られた。HLA軽鎖又は 2-ミクログロブリンもまた、~500mg/リットル細菌培養物のレベルで、適切な構築物からE.coli中で封入体として発現させた。

【0117】

E.coli細胞を溶解し、封入体を約80%の純度まで精製する。封入体からのタンパク質を6Mグアニジン-HCl、50mM Tris(pH8.1)、100mM NaCl、10mM DTT、10mM EDTA中で変性させ、5より低いリフォールド緩衝液中に変性タンパク質の単一パルス(single pulse of denatured protein)を添加することにより、30mg/リットルの重鎖、30mg/リットルの 2mの濃度で、0.4M L-アルギニン-HCl、100mM Tris(pH8.1)、3.7mMシスタミン、mMシステアミン、4mg/mlペプチド(例えばtax 11-19)中にリフォールディングさせた。リフォールディングは少なくとも1時間4で完了に到達させた。

10

【0118】

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

【0119】

ビオチン化タグを付したpMHC複合体を、10mM Tris(pH8.1)、5mM NaClに、同じ緩衝液中で平衡化したPharmacia迅速脱塩カラムを使用して緩衝液交換をした。溶出の際、即座に、タンパク質含有画分を氷上で冷却し、プロテアーゼインヒビターカクテル(Calbiochem)を加えた。次いで、ビオチン化試薬を加えた：1mMビオチン、5mM ATP(pH8に緩衝化)、7.5mM MgCl₂及び5µg/ml BirA酵素(0' Callaghanら(1999) Anal. Biochem. 266 : 9-15に従って精製)。次いで、混合物を室温にて一晩インキュベートした。

20

【0120】

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

30

【0121】

二価A6 TCR 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体及びNY-ES0 TCR 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体又はそれぞれの単量体可溶性TCRと、それらのコグネイトpMHC複合体との間の相互作用を、Biacore 3000(商標)表面プラズモン共鳴(SPR)バイオセンサで分析した。SPRは、レセプターリガンド相互作用を検出しその親和性及び動力学的パラメータを分析するために使用することができる原理である、小さなフローセル内のセンサ表面近くでの応答単位(RU)で表される屈折率の変化を測定する。2mに架橋したビオチンとフローセルの活性化表面に化学的に架橋されたストレプトアビジンとの間の結合を介して、HLA-A2ペプチド複合体(1000応答単位)を別々のフローセルに固定化することにより、プローブフローセルを準備した。次いで、異なるフローセルの表面上にsTCR又は二価A6 PEG複合体を一定流速で通過させ、そうしている間のSPR応答を測定することにより、アッセイを実施した。ペプチド-MHC複合体上に一定流速で異なる濃度で可溶性sTCRを注入してバックグラウンドの共鳴を規定した。

40

【0122】

ストレプトアビジン被覆Biacoreチップに、NY-ES0ペプチド(1000応答単位)の存在下、リフォールディングしたビオチン化HLA A2を載せた。次いで、NY-ES0 TCRの系列希釈物を

50

注入し、応答を測定した(図11a)。TCR-PEG-TCR二量体の希釈物を、より長い解離期を許容したことを除いて同じ方法で注入した(図11b)。親和性についての値(Kd)及び解離半減期についての値を、独自のソフトウェアを使用して算出した。二量体は、劇的なアビディティ効果を示し、遊離NY-ESO TCRと比較して、解離半減期が20倍の増大を生じた。

【0123】

本来のA6 TCR/HLA結合親和性は、比較的高い(Kd~ 1 μM)。次いで、A6 TCRの系列希釈物を注入して応答を測定した(図12a)。二価A6 TCR 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体の希釈物を、より長い解離期を許容したことを除いて同じ方法で注入した(図12b)。二価A6 TCR 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体は、アビディティ効果に起因してその複合体の安定性の劇的な増大を示した(10分間の解離後に50%以上の物質が結合したままであった)。単回注入に続いて延長した解離期を使用して、解離半減期を測定した(図12c)。

10

【0124】

二価A6 TCR 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体及びNY-ESO TCR 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体は、それぞれ、35~79分及び81~90秒の解離半減期を有していた。これらを、単量体可溶性A6 TCR及びNY-ESO TCRについてのそれぞれ10.4秒及び4.1秒の解離半減期と比較する。

【0125】

実施例8 - 新規ジスルフィド鎖間結合が組み込まれた単鎖A6 TCRの設計、発現及び試験

本実施例は、新規ジスルフィド鎖間結合が組み込まれた単鎖A6 TCRの作成に使用する方法を詳述する。この設計の単鎖構築物はまた、実施例6に記載した方法を使用して二価TCR-PEG複合体を作成するためのTCR単量体としても使用し得る。

20

【0126】

鎖配列の末端部から停止コドン(TAA)を除去した以外は、実施例1で調製し、図1a及び図1bに示したような新規ジスルフィドの形成に必要な追加のシステイン残基を組み込んだ変異A6 TCR 鎖及び鎖のDNA配列を含む発現ベクターを、以下のように、単鎖A6 TCRの作成の基礎として使用した。

【0127】

scDis A6 TCRは、TCR 鎖のC末端と鎖のN末端との間に、30アミノ酸リンカー配列を含む。図13は、このリンカーのDNA配列及びアミノ酸配列を示す。scDis A6 TCRを作成するために用いたクローニング戦略を図14にまとめる。

【0128】

簡潔には、A6 dsTCRの鎖及び鎖を、図14に示すような制限部位を含むプライマー、すなわち：

30

5'プライマー：ccaaggccatgatgcagaaggaagtggagcagaactct

3'プライマー：ttgggcccgcgggatccgccccgggggaactttctgggctgggg

5'プライマー：tccccggggcggatccggcgggccaacgctggtgtcactcag

3'プライマー：gggaagcttagtctgctctaccccaggcctcg

を使用するPCRにより増幅させた。

【0129】

このように作成した2つのフラグメントを、5'プライマー及び3'プライマーを使用してPCRにより縫い合わせて(PCR stitched)、部位XmaI - BamHI - ApaIを含む短いリンカーを有する単鎖TCRを得た。このフラグメントをpGMT7中にクローニングした。次いで、完全長リンカーを二段階で挿入した。最初に、42bpフラグメントを、XmaI部位及びBamHI部位を使用して挿入した：

40

5'-CC GGG GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGT TCA GGC GGT GGC G -3'

3'-C CCA CCG AGA CCG CCA CCG CCA AGT CCG CCA CCG CCT AG-5'。

【0130】

第2に、48bpフラグメントを、BamHI部位及びApaI部位を使用して挿入して、鎖の3'末端と鎖の5'末端との間に90bpリンカーを作成した。48bpフラグメントは、以下のオリゴの混合物のPCR伸長により作成した：

5'- GC GGA TCC GGC GGT GGC GGT TCG GGT GGC GGT GGC TC-3'

50

3'-CCA AGC CCA CCG CCA CCG AGT CCG CCA CCG CCC GGG TG -5'.

【0131】

この伸長の産物を、BamHI及びApaIで消化し、42bpリンカーフラグメントを含む消化プラスミド中に連結した。

scDis A6 TCRの完全なDNA配列及びアミノ酸配列を、それぞれ、図15a及び図15bに示す。

【0132】

追加のシステインコドンは、実施例6に記載のような二量体作成に適切な分子を作成するために、上記A6 scTCRをコードするDNAの3'末端の「停止」コドンの直前に付加することができる。

【0133】

単鎖ジスルフィド連結A6 TCRの発現及び精製：

単鎖ジスルフィド連結A6 TCRを含む発現プラスミドを、E.coliのBL21pLysS株に形質転換し、1つのアンピシリン耐性コロニーを37℃にてTYP(アンピシリン100µg/ml)培地中でOD₆₀₀が0.4になるまで増殖させた後、0.5mM IPTGでタンパク質発現を誘導した。誘導の3時間後に、Beckman J-6B中での4000rpmにて30分間の遠心分離によって細胞を採集した。細胞ペレットを、50mM Tris-HCl、25% (w/v)スクロース、1 mM NaEDTA、0.1% (w/v)アジ化Na、10mM DTTを含む緩衝液(pH8.0)に再懸濁した。一晩の凍結-解凍工程の後、再懸濁した細胞を、Milsonix XL2020超音波処理器中で標準の12mm径プローブを使用して1分間のバーストで合計約10分間超音波処理した。封入体ペレットを、Beckman J2-21遠心分離器で13000rpmにて30分間の遠心分離により回収した。次いで、3回の界面活性剤洗浄を行なって細胞残渣及び膜成分を除去した。各回で、封入体ペレットをTriton緩衝液(50mM Tris-HCl、0.5% Triton-X100、200mM NaCl、10mM NaEDTA、0.1% (w/v)アジ化Na、2 mM DTT、pH8.0)中でホモジナイズした後、Beckman J2-21中で13000rpmにて15分間の遠心分離によりペレット化した。次いで、界面活性剤及び塩を、以下の緩衝液中での同様な洗浄により除去した：50mM Tris-HCl、1 mM NaEDTA、0.1% (w/v)アジ化Na、2 mM DTT、pH8.0。最後に、封入体を30mgのアリコートに分け、-70℃で凍結させた。封入体タンパク質の収率を、6 M グアニジン - HClでの可溶化及びBradford顔料結合アッセイ(PerBio)での測定により定量化した。

【0134】

約15mgの可溶化封入体鎖を凍結ストックから解凍した。封入体を、6 M グアニジン溶液中5 mg/mlの最終濃度まで希釈し、DTT(2 Mストック)を10mMの最終濃度まで加えた。混合物を37℃にて30分間インキュベートした。1リットルのリフォールディング緩衝液(100mM Tris(pH8.5)、400mM L-アルギニン、2 mM EDTA、5 mM還元グルタチオン、0.5mM酸化グルタチオン、5 M尿素、0.2mM PMSF)を調製し、5 ± 3℃にて激しく攪拌した。レドックス対(redox couple)(2-メルカプトエチルアミン及びシスタミン(それぞれ6.6mM及び3.7mMの最終濃度まで)を添加して約5分後に、変性TCR鎖を添加した。次いで、タンパク質を、5 ± 3℃にて攪拌しながら、約5時間 ± 15分間リフォールディングさせた。次いで、リフォールディング体(refold)を、2回、最初は10リットルの100mM尿素に対して、第2回目は10リットルの100mM尿素、10mM Tris(pH8.0)に対して透析した。リフォールディング工程及び透析工程は共に6 ~ 8℃で行なった。

【0135】

Akta精製装置(Pharmacia)を使用して、透析したリフォールディング体をPOROS 50HQアニオン交換カラムに充填し、50カラム容量にわたる0 ~ 500mM NaClの勾配で結合タンパク質を溶出させることにより、scTCRを分解産物及び不純物から分離した。ピーク画分を4で保存し、クーマシー染色SDS-PAGEにより分析した後、プールして濃縮した。次いで、sTCRを精製し、HBS-EP緩衝液(10mM HEPES(pH7.4)、150mM NaCl、3.5mM EDTA、0.05% nonidet p40)中で予め平衡化したSuperdex 200HRゲル濾過カラムを使用して特徴付けた(図8)。ピーク画分を4で保存し、クーマシー染色SDS-PAGEにより分析した後、プールして濃縮した。

10

20

30

40

50

【0136】

実施例9 NY-ESO TCR二量体のヨウ素放射標識

実施例6に記載のように調製したPEG化二価NY-ESO TCR 3.4kd Mal-PEG-Mal複合体を、以下のとおり、 ^{125}I で標識した。

50 μl の1.0Mリン酸緩衝液を、100 μl のPBS中1 mg/mlの二価NY-ESO TCR 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体に添加した。次いで、15 μl (1500 μCi)の ^{125}I ヨウ素溶液(Amersham Bioscience, UK)をこのタンパク質溶液に添加し、続いて50 μl の2 mg/mlクロラミン-T(Sigma)を添加した。次いで、溶液を混合し、室温にて1分間放置した。次いで、50 μl の1 mg/ml L-チロシン溶液を添加し、次いで溶液を十分に混合した。次いで、2.3mlの0.05Mリン酸緩衝液を添加し、次いでこの溶液をP10カラム(Sigma)に加えた。次いで、このカラムの空隙容量を集めた。0.05Mリン酸緩衝液の12の0.5mlアリコートのカラムに加え、溶出した画分を集めて番号を付した。次いで、更に5 mlの0.05Mリン酸緩衝液をカラムに加えて、得られた溶出画分を集めた。

【0137】

次いで、集めた画分中の活性をシンチレーション計数により評価した。次いで、存在するタンパク質/ヨウ素含量の定量を可能にするために、TLCを各画分からのサンプルについて行った。

P10カラム画分1~6を合わせて、約3.5mlの容量を得た。次いで、1.84mlのPBS中54 μg /mlの二価NY-ESO TCR 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体を添加して10mgの総タンパク質を得た。更に4.7mlのPBSを溶液に添加した。次いで、これをシンチレーションカウンターで計数した。次いで、この溶液をPBSで10mlに希釈した。

画像化目的で本実施例においてTCRを標識するために使用した ^{125}I は、治療用物質を作成するために、 ^{131}I と置換し得る。

【0138】

実施例10 - 二価NY-ESO TCR 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体を使用して標的したインビボ腫瘍

実施例9に記載したように調製した ^{125}I 標識PEG化二価NY-ESO TCR 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体のHLA-A2 NY-ESOを発現する腫瘍に局在する能力を以下のとおりに調べた：

12匹の雌性ヌードラット(HARLAN, France)をこの試験に使用した。

6匹のラットに、メラノーマ腫瘍形成細胞株(A375-SM)をs.c.注射し、15~20日間放置して皮下腫瘍を発症させた(試験群)。残りのラットには、腫瘍形成細胞株を注射しなかった(対照群)。

次いで、ラットに以下の二価NY-ESO TCR 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体のi.v.ボラス投薬量を与えた：

PBS中の二価NY-ESO TCR 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体 2 mg/kg(~25 μCi /ラット)

【0139】

次いで、1匹の試験群ラット及び1匹の対照群ラットを、二価NY-ESO TCR 3.4kd Mal-PEG-Mal複合体投与後の以下の時点で屠殺した。

20分

1時間

3時間

6時間

24時間

48時間

次いで、これらのラットを、標準手順を用いる定量的全身オートラジオグラフィ(Quantitative Whole Body Autoradiography)(QWBA)に供した。可能な限り多くの組織が含まれるように、ラット身体の5つのレベルで断面を示した。次いで、Fuji BAS 1500バイオイメージアナライザー並びに付属のTina及びSeeScanソフトウェアを用いて、放射活性の定量的分布を行った。

【0140】

(結果)

10

20

30

40

50

各時点での放射標識した二価NY-ESO TCR 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体の分布を、オートラジオグラフィにより可視化した。放射標識した二量体は、最初、ラット全身に迅速に広がった。このことは、二量体投与の20分後に屠殺したラットのオートラジオグラフである図16から理解できる。二量体がより長期にわたって腫瘍への局在又は腫瘍内での局在を引き起こす能力は、二量体投与の48時間後に屠殺したラットのオートラジオグラフである図17から明確に理解できる。

【0141】

(結論)

二価NY-ESO TCR 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体投与の48時間後の放射活性の分布は、放射標識した二量体が腫瘍に局在し、腫瘍に侵入したことを示す。

10

【0142】

実施例11 - TCRの四量体化

四量体マレイミド - PEG(4 アームMAL-PEG, MW 20KD, Shearwater Corporation)を使用して、新規ジスルフィド鎖間結合及び鎖C末端上の追加のシステイン残基を含むA6 TCR(上記のように調製)を四量体化した。このリンカーの末端上のマレイミド基は、リンカーに、自由チオールの結合特異性を付与する。ジスルフィドTCR鎖間結合を還元することなく可溶性TCR鎖の自由システインを還元するために、四量体化前にTCRを還元剤0.5mM DTTで前処理した(37℃、1時間)。次いで、10mM EDTAを含むPBS緩衝液中でのゲル濾過クロマトグラフィ(Superdex 75)により可溶性TCRを再精製した。約4:1(タンパク質対架橋剤)のモル比にて4アームMAL-PEG(DMF中10mM)を添加し、続いて室温で一晩インキュベートすることにより四量体化を達成した。次いで、PBS中で予め平衡化したSuperdex 75 HR10/30ゲル濾過カラムを使用して、生成物を精製した。溶出画分をSDS-PAGEにより更に分析した。

20

【0143】

この画分からのサンプルを、DTTを含まないか(非還元用)又は15mM DTTを含む(還元用)標準的なSDSサンプル緩衝液(BioRad)で前処理し、勾配4~20% PAGE上で泳動させ、クーマシーブルー染色で染色した。

【0144】

実施例12 - 特異的pMHCへの四価A6 TCR PEG複合体の結合のBIAcore表面プラズモン共鳴特徴付け

30

実施例11に記載したように調製した四価A6 TCR PEG複合体とそのコグネイトpMHC複合体との相互作用を、実施例7に記載した方法を用いてBIAcore 3000(商標)表面プラズモン共鳴(SPR)バイオセンサで分析した。

簡潔には、ストレプトアビジン被覆BIAcoreチップに、Taxペプチド(1000応答単位)の存在下でリフォールディングしたピオチン化HLA A2を載せた。四量体は、解離半減期の計算が問題あると判明する程度に、劇的なアビディティ効果を示した。図12c及び図18の比較により、これらA6 TCR四量体は、増大したアビディティを有し、したがって対応するA6 TCR二量体より長い解離半減期を有することが示される。

【0145】

実施例13 - 腫瘍切片のクリオスタット及びパラフィン調製

40

免疫組織化学(IHC)研究及び免疫蛍光(IF)研究を実施するため、実施例10で使用した3匹のラットから腫瘍を取り出した。腫瘍を半分に切断し、次いで一方をホルマリン固定パラフィン包埋により調製し、残る半分を以下の方法を用いてクリオスタット調製により調製した:

(クリオスタット調製)

腫瘍サンプルを液体窒素中で素早く凍結させ、次いでクリオスタットを使用して6µm切片にスライスした。これら切片をIF研究に使用した。

(ホルマリン固定パラフィン包埋組織調製)

残る腫瘍サンプルを10%中性ホルマリン中で固定し、パラフィンワックスに包埋した。次いで、マイクロトームを使用して包埋腫瘍切片から3µm切片をスライスした。これら切

50

片をIHC研究に使用した。

【0146】

実施例14 - IHC染色及びIF染色並びに可視化

(TCR 鎖及びNY-ESO TCR特異的染色)

全てのTCR 鎖及びNY-ESO TCRの両方の分布を、ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織サンプルにおいて可視化した。これらは、西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素マーカを用いる間接IHC法を使用して以下のとおり実施した：

【0147】

プロトコル

1. 切片を40℃で10分間暖めた。
2. 切片をHistoClear中で10分間脱パラフィン化し、100% Industrial Methylated Spirit (IMS)中、70% IMS/H₂O中、H₂O中に各5分間浸すことにより再水和化した。
3. 切片をPBS中で5分間洗浄した。
4. 0.3% H₂O₂中に室温にて30分間浸すことにより切片から内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。
5. 切片をPBS中で3回、各回5分間洗浄した。
6. 100µlのブロッキング血清を各切片に加え、30分間放置した。ブロッキング血清は、二次抗体を惹起させた種から調製する。この工程は、二次Abが適用されたときにそれが一次抗体にのみ結合するように、切片へのマウスIgGの非特異的結合を阻止するために行う。
7. 100µlの一次Ab(ウサギポリクローナル抗TCR抗体)を各切片に加え、カバーグラスで覆った。工程6で使用したブロッキング血清中1:50の希釈物を作成し、これを室温にて40~50分間放置した。
8. 切片をPBS中で2回、各回5分間洗浄した。
9. 100µlのビオチン化二次Ab(抗ウサギ抗体)を各切片に加え、次いで切片をカバーグラスで覆い、30分間放置した。
10. 切片をPBS中で2回、各回5分間洗浄した。
11. 100µlのアビジン/ビオチン複合体(Vectastain kit)(使用の30分前に製造業者の指示に従って作成)を各切片に室温にて30分間加えた。
12. 切片をPBS中で2回、各回5分間洗浄した。
13. 100µlの酵素基質、ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド(DAB)を各切片に加えて5分間放置した。
14. 次いで切片を水道水で濯いだ。
15. 切片をヘマトキシリンで15秒間対比染色した。
16. 切片を70% IMS/dH₂O中、100% IMS中に5分間、次いでHistoClear中に5~10分間浸すことにより脱水化した。
17. DPXを用いて標本を作成した。

10

20

30

【0148】

2つの異なる対照をこれらTCR染色研究に含めた。第1は、一次抗体を省略した「省略対照」である。第2の対照では、可溶性NY-ESO TCRに予め吸着させた抗NY-ESO TCR抗体もまた使用した。

40

【0149】

(HLA-A2染色)

クリオスタットで調製した腫瘍切片内でのHLA-A2の分布を、標準的な免疫蛍光技法により評価した。簡潔には、画像化すべきクリオスタット調製切片を、FITC蛍光マーカで標識した飽和濃度の抗HLA-A2抗体中に水浴させた。次いで、過剰の未結合抗体を洗い流し、次いでサンプルを画像化用に調製した。この方法はまた、対照としてFITC標識非特異的IgGを用いても繰り返した。

【0150】

(ヘマトキシリン及びエオシン(H&E)染色)

50

以下の方法を使用して、ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍切片でH&E染色を行った：

- 1．切片をHistoclear中で10分間脱パラフィン化し、100% (IMS)中、70% IMS/H₂O中、H₂O中に各5分間浸すことにより再水和化した。
- 2．切片をヘマトキシリンに10～15分間浸した。
- 3．切片を水道水で、次いで蒸留H₂Oで十分に洗浄した。
- 4．スライドを、酸/アルコール(1% HCl/70% IMS)中で数秒間浸漬することにより脱染した。
- 5．スライドを70% IMS/H₂O及び100% IMSの各々に2分間浸漬することにより脱水化した。
- 6．スライドをエオシン中に15～30秒間浸漬した。
- 7．スライドを100% IMS中に2分間浸した。
- 8．スライドを100% IMS中に5分間浸した。
- 9．スライドをHistoclear中に～10分間浸した。
- 10．最後に、スライドをDPXを用いて標本にした。

10

【0151】

次いで、染色した腫瘍切片を、光学顕微鏡(H&E染色)又は蛍光顕微鏡(TCR/HLA染色)を用いて画像化した。

【0152】

(結果)

NY-ESO PEG二量体の注射20分後に屠殺したラットから調製した腫瘍切片で実施したNY-ESO TCR染色の結果は、TCR二量体が腫瘍塊に迅速に侵入したことを証明する(図20a～図20d)。

20

NY-ESO TCR分布を、腫瘍内の生存組織及び壊死組織(H&E染色により決定)中で直接比較した。この比較により、NY-ESO TCRが腫瘍の生存領域内で優勢に見出されることが明らかとなった(図21を参照)。

HLA-A2分布を、腫瘍内の生存組織及び壊死組織(H&E染色により決定)中で直接比較した。この比較により、HLA-A2が腫瘍の生存領域内で優勢に見出されることが明らかとなった(図19a～図19cを参照)。

【0153】

(結論)

上記実験は、TCR PEG二量体が注射後20分以内に腫瘍中に侵入したことを示す。図20a～図20dは、TCR PEG二量体が腫瘍細胞中に内在化された可能性を示す。その間にこれが生じたようにみえる非常に短い時間スケールは、能動的な進入機構を示唆する。更に、注射したNY-ESO TCR PEGは、腫瘍の生存領域で優勢に見出された。HLA-A2分布は大部分が腫瘍の生存領域に局限されているので、腫瘍のこの領域は、選択的に標的されると予測される。

30

【0154】

実施例15 - 定常領域間に非天然型ジスルフィド結合を有しCDR3変異を含む高親和性可溶性ヘテロ二量体A6 TCRの作成

高親和性可溶性ヘテロ二量体A6 TCRを、実施例5に記載の方法を用いて発現及びリフォールディングさせた。この可溶性A6 TCRは、二量体化を促進するために鎖のC末端にシステイン残基が付加されていることを除いて、前述したTCR鎖を含む(DNA配列及びアミノ酸配列についてはそれぞれ図22a及び図22bを参照)。このTCRの鎖は、相補性決定領域3(CDR3)中に、そのコグネイトHLA-A2-Taxリガンドに関する増大した親和性を付与する変異を含む(DNA配列及びアミノ酸配列についてはそれぞれ図23a及び図23bを参照)。

40

【0155】

実施例16 二価高親和性A6 TCR PEG複合体の作成及びBIAcore試験

実施例15に記載したように作成した高親和性可溶性ヘテロ二量体A6 TCRのPEG二量体を、実施例6に記載したような方法を用いて調製した。

次いで、BIAcore 3000(商標)を用いて、コグネイトリガンドに対する高親和性A6 TCR及び高親和性A6 TCR PEG二量体の結合を評価した。使用した方法は、この変異体A6 TCRの高

50

親和性が単回注入を用いて結合研究を行うことを必要としたことを除いて、実施例7で使用した方法と同様であった。使用した条件(動力学的研究に最適化)を下記に要約する：

BIAcore条件

緩衝液：PBS；流速：50ml/分

リガンド(HLA-A2 Tax)固定化レベル：500RU

注入(Kinject)：250ml結合/2400ml解離

タンパク質サンプル

高親和性(HA) A6 TCR；PBS中4.4 A280/ml (15.05.03NL)；実用希釈率(working dilution)：最終的に400ml中4ml

高親和性A6 TCR二量体(TCR-PEG-TCR；3,400K直鎖状PEG)；PBS中1.0 A280/ml；実用希釈率：最終的に400ml中17.6ml

【0156】

(結果)

高親和性A6 TCRとHLA-A2 Taxとの間の相互作用についての $T_{1/2}$ を41分と算出した(図24を参照)。高親和性A6 TCR 3.4KD PEG二量体とHLA-A2 Taxとの間の相互作用についての $T_{1/2}$ を22~78時間のオーダーであると算出した(図25を参照)。

【0157】

(結論)

上記のように、高親和性A6 TCRの二量体化は、相互作用 $T_{1/2}$ を41分から22~78時間の間にまで増大させた。PEG二量体における高親和性変異体A6 TCRの使用は、相互作用 $T_{1/2}$ を35~79分(天然型A6 TCR PEG二量体)から22~78時間まで増大させた。

【0158】

実施例17 - 20KD Mal-PEG-Malリンカーを用いる高親和性A6 TCRの二量体化

実施例6に記載の作成方法を使用して、非分枝状二官能性マレイミド-PEG (MAL-PEG-MAL, MW 20KD, NOF Corp.)を用いて、新規ジスルフィド鎖間結合及び鎖C末端上の追加のシステイン残基を含む高親和性A6 TCR(上記のように作成)を架橋した。

次いで、作成した二量体高親和性A6 TCR 20KD Mal-PEG-Mal複合体を、変法を用いて以下のとおり再精製した：

アニオン交換クロマトグラフィーを使用して、高親和性A6 TCR 20KD Mal-PEG-Mal複合体のための最初の再精製工程を行った：

カラム：MonoQ HR5/5高分解能カラム(Pharmacia)

緩衝液：25mM Tris-HCL、pH8、0.5mM EDTA

溶出勾配：0~0.5M NaCl(上記緩衝液中)

【0159】

二量体は、勾配の中間(約0.25M NaCl)で単一ピークとして溶出した。

次いで、生成物を、PBS中で予め平衡化したSuperdex 200 HR10/30ゲル濾過カラムを用いて最終的な精製に付した。

【0160】

実施例18 - HLA-A2 Taxへの高親和性A6 TCR 20KD Mal-PEG-Mal複合体の結合のBIAcore表面プラズモン共鳴特徴付け

実施例17に記載したように作成した高親和性A6 TCR 20KD Mal-PEG-Mal複合体とそのコグネイトpMHC複合体(HLA-A2 Tax)との間の相互作用を、実施例16に記載のようにBIAcore 3000(商標)表面プラズモン共鳴(SPR)バイオセンサで分析した。

二価高親和性A6 TCR 20KD PEG複合体は、HLA-A2-Taxに関して、9.5日の解離半減期を有していた。これを、同じ相互作用についての高親和性二価A6 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体の解離半減期22~78時間と比較する。

理論に拘束されることを望まないが、高親和性A6 TCR 20KD PEG複合体について証明された、高親和性A6 TCR 3.4KD PEG複合体のそれと比較して増大した解離半減期は、標的細胞の表面上のHLA複合体への二価性付着を機会より多く提供するより長いリンカーに起因すると考えられる。

10

20

30

40

50

【0161】

実施例19 - 5KDフォーク状Mal-PEG-Malリンカーを用いるA6 TCRの二量体化

実施例6に記載の作成方法及び再精製方法を使用して、5KDフォーク状二官能性マレイミド-PEG (MAL-PEG-MAL, MW 5KD, Shearwater Corporation)を用いて、新規ジスルフィド鎖間結合及び鎖C末端上の追加のシステイン残基を含むA6 TCR(実施例5に記載のように作成)を架橋した。

【0162】

実施例20 - HLA-A2 Taxへの二量体A6 TCR 5KDフォーク状Mal-PEG-Mal複合体、二量体A6 TCR 3.4KD直鎖状Mal-PEG-Mal複合体及び単量体3.4KD直鎖状A6 TCR複合体の結合のBIAcore表面プラズモン共鳴の比較

実施例19に記載したように作成した二量体A6 TCR 5KDフォーク状Mal-PEG-Mal複合体とそのコグネイトpMHC複合体(HLA-A2 Tax)との間の相互作用を、実施例16に記載のようにBIAcore 3000(商標)表面プラズモン共鳴(SPR)バイオセンサで分析した。

実施例5に記載のように作成した二量体A6 TCR 3.4KD直鎖状Mal-PEG-Mal複合体と単量体A6 TCR 3.4KD直鎖状PEG複合体との間の相互作用もまた、比較のために同じBIAcoreチップ上で分析した。

二価A6 TCR 5KDフォーク状PEG複合体及び二価A6 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体は、HLA-A2-Taxに関して同様な結合特性を有していた(図26を参照)。

【0163】

実施例20 - 高親和性クローン134 A6 TCR 20KD PEG二量体を使用する細胞染色

PP抗原提示細胞をある濃度(10^{-5} ~ 10^{-9} M)のTaxペプチドで37 °Cにて90分間パルスした。対照は、T2細胞を使用して、 10^{-5} Mインフルエンザ(Flu)ペプチドでパルスするか、又はペプチドなしでインキュベートした(パルスなし)。パルスの後、細胞を無血清RPMIで洗浄し、 1×10^5 細胞を、Alexa 488 (Molecular probes, The Netherlands)で標識した高親和性クローン134 A6 TCR 20KD PEG二量体と共に室温にて10分間インキュベートした。細胞を洗浄後、標識したTCR二量体の結合を、FACSVantage SE (Becton Dickinson)を使用するフローサイトメトリにより調べた。

(結果)

図27a及び図27bに示されるように、高親和性クローン134 A6 TCR 20KD PEG二量体によるPP細胞の特異的染色が、 10^{-5} Mを下限とするTaxペプチド濃度で観察することができた。

【図面の簡単な説明】

【0164】

【図1】システインコドンを導入するように変異された可溶性A6 TCRの鎖(a)及び鎖(b)の核酸配列を示す。影は導入したシステインコドンを示す。

【図2】aは、新規なジスルフィド鎖間結合を形成するために使用したT₄₈ C変異(下線)を含むA6 TCR 鎖細胞外アミノ酸配列を示す。bは、新規なジスルフィド鎖間結合を形成するために使用したS₅₇ C変異(下線)を含むA6 TCR 鎖細胞外アミノ酸配列を示す。

【図3】システインコドンを導入するように変異した可溶性NY-ES0 TCRの鎖(a)及び鎖(b)の核酸配列を示す。

【図4】aは、新規なジスルフィド鎖間結合を形成するために使用したT₄₈ C変異を含むNY-ES0 TCR 鎖細胞外アミノ酸配列を示す。bは、新規なジスルフィド鎖間結合を形成するために使用したS₅₇ C変異を含むA6 TCR 鎖細胞外アミノ酸配列を示す。

【図5】コードするポリペプチドのC末端にシステイン残基の付加を引き起こすコドンを導入するように更に変異させた可溶性NY-ES0 TCRの鎖の核酸配列を示す。

【図6】ポリペプチドのC末端にシステイン残基を導入するように更に変異させた可溶性NY-ES0 TCRの鎖のアミノ酸配列を示す。

【図7】コードするポリペプチドのC末端にシステイン残基の付加を引き起こすコドンを導入するように更に変異させた可溶性A6 TCRの鎖(a)及び鎖(b)の核酸配列を示す。

【図8】ポリペプチドのC末端にシステイン残基を導入するように更に変異させた可溶性

10

20

30

40

50

A6 TCRの鎖(a)及び鎖(b)のアミノ酸配列を示す。

【図9】PBS中で予め平衡化したSuperdex 75 HR10/30ゲル濾過カラムで泳動させた二量体NY-ESO TCR 3.4kd Mal-PEG-Mal複合体のクロマトグラムである。

【図10】還元条件及び非還元条件下で泳動させた図9に示したゲル濾過ゲルから集めた画分のSDS PAGEゲルである。

【図11a】単量体NY-ESO TCRと固定化HLA-A2-NY-ESOとの間の相互作用を示すBIAcoreトレースである。

【図11b】二量体NY-ESO TCR 3.4kd Mal-PEG-Mal複合体と固定化HLA-A2-NY-ESOとの間の相互作用を示すBIAcoreトレースである。

【図12a】単量体A6 TCRと固定化HLA-A2-Taxとの間の相互作用を示すBIAcoreトレースである。 10

【図12b】二量体A6 TCR 3.4kd Mal-PEG-Mal複合体と固定化HLA-A2-Taxとの間の相互作用を示すBIAcoreトレースである。

【図12c】固定化HLA-A2-Tax上に流した二量体A6 TCR 3.4kd Mal-PEG-Mal複合体の単回注入を示すBIAcoreトレースである。

【図13】A6 scTCRの構築に使用したリンカーのDNA配列及びアミノ酸配列を示す。

【図14】ファージミドベクター中へのTCR鎖及び鎖のクローニングを概説する。この図は、ファージディスプレイベクターを記述する。RSBはリボソーム結合部位である。S1又はS2は、E. coliの細胞周辺質にタンパク質を分泌するためのシグナルペプチドである。「*」は翻訳停止コドンを示す。TCR鎖又は鎖のいずれもがファージコートタンパク質と融合され得るが、この図では、TCR鎖のみがファージコートタンパク質と融合している。 20

【図15】ファージミドpEX746:A6のDNA配列(a)及びアミノ酸配列(b)を詳説する。

【図16】腫瘍を有する雌性ヌードラットに二量体-[¹²⁵I]-mTCR(PEG化)の単回の静脈内投与をした20分後の組織内の放射活性の分布を示す。

【図17】腫瘍を有する雌性ヌードラットに二量体-[¹²⁵I]-mTCR(PEG化)の単回の静脈内投与をした48時間後の組織内の放射活性の分布を示す。

【図18】PEG連結A6 TCR四量体と固定化HLA-A2-Taxとの間の相互作用を示すBIAcoreトレースである。

【図19】aはH&E染色したクリオスタット腫瘍切片を示す。bは抗HLA-A2染色したクリオスタット腫瘍切片を示す。cは対照IgG染色したクリオスタット腫瘍切片を示す。 30

【図20】aは、H&E染色及び抗TCR鎖抗体染色したホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍切片を示す。bは、H&E染色及び抗NY-ESO TCR抗体染色したホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍切片を示す。cは、H&E染色及び抗NY-ESO抗体/NY-ESO TCR対照染色したホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍切片を示す。dは、H&E染色及び省略(omission)対照染色したホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍切片を示す。

【図21】H&E染色及び抗NY-ESO TCR抗体染色したホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍切片を示す。

【図22】aは、3'末端に導入システインコドンを含む高親和性A6 TCR鎖のDNA配列を詳述する。bは、3'末端に導入システインコドンを含むA6 TCR鎖のアミノ酸配列を詳述する。 40

【図23】aは高親和性A6 TCR鎖のDNA配列を詳述する。変異した核酸を太字で示す。bはA6 TCR鎖のアミノ酸配列を詳述する。変異したアミノ酸を太字で示す。

【図24】高親和性A6 TCRと固定化HLA-A2-Taxとの間の相互作用を示すBIAcoreトレースである。

【図25】二価高親和性A6 TCR 3.4KD Mal-PEG-Mal複合体と固定化HLA-A2-Taxとの間の相互作用を示すBIAcoreトレースである。

【図26】A6 TCR PEG複合体と固定化HLA-A2-Taxとの間の相互作用を示すBIAcoreトレースである： ピーク1 - 単量体3.4KD A6 TCR PEG複合体 ピーク2 - 二量体3.4KD A6 TCR直鎖状Mal-PEG-Mal複合体 ピーク3 - 二量体5 KD A6 TCRフォーク状Mal-PEG-Mal複合体 50

。

【図27】 aは、高親和性クローン134 A6 TCR 20KD PEG二量体による 10^{-4} MのTaxペプチドでパルスしたPP細胞の特異的染色を示す。bは、高親和性クローン134 A6 TCR 20KD PEG二量体による 10^{-5} MのTaxペプチドでパルスしたPP細胞の特異的染色を示す。

【図2】

(a)
 MQKEVQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFVYRQYSQ
 KSPFLIMSIYNSGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDS
 ATYLCAVTTDSWGKLFQFAGTVVVPDIQNPDAVYQLRD
 SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVYSQKPSDVIITDKCVLDMRSMDF
 FKSNSAVAVSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSS停止

(b)
 MNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDP
 GMeGLRLLIHYSVVGAGITDQGEVFNPNVSRSTEDFPRLRLS
 AAPSQTSVYFCASRPGLAGGRPEYFPGTRTLVTEDLKNVF
 PPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNG
 KEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSRLRVSATFWQDPR
 NHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVVTQIVSABAWGRAD停止

Figure 3a

atgcaggaggtgacacagattcctgcagctctgagtgctcccaagaaggagaaaacttg
 gtctcaactgcagttcactgatagcgtatctcaaacctccagtggttaggcag
 gacctgggaaaggctcactatctctgtgttatctcagtcagtcagagagagca
 acaagtggaagacttaatgcctcctgctgataaatcatcaggacgtactcttatac
 atgcagctctcagcctggtgactcagccactcactctgtctgtaggcccaca
 tcaggaggaagctacatacctcaatttgaagaggaacagccttatgttcatcgc
 tatacagacaacctgacctgctgctcagctgagagactctaaatccagtgac
 aagtctgtctcctattcaaccgattttgattctcaacaatgtgtcacaagttag
 gattctgatgtgtatatacagacaaaatgtgtctagacatgaggtctatggactc
 aagagcaacagctctgtgacctggagcaacaaatctgactttgcatgtcaaacgcc
 ttcaacaacagcatattccagaagacacctctctccaccagccagaagtctctaa

Figure 3b

atgggtgtcactcagaccocaaaatccaggtcctgaagacaggacagagcatgaca
 ctgcagtggtgccagagatgaaacatgaaatcctgctcctggtatcgacaagacca
 ggctggggctgaggtgatcacttactcagttgggtgctggtatcactgaccaagga
 gaagctcccactggtTacaatgtctccagatcaaccacagagagattccocgtcagg
 ctgctgtcgggtgctccctccagacactctgtgtactctgtgcccagcttacgtc
 gggaaacccggggagctgtttttggagaaggctctaggctgacctactggaggac
 ctgaaaaacgtgttcccaccgaggtctgctgtgtttgagccatcagaagcagagatc
 tcccacacccaaaaggcccaactggtgtgctggtccacaggtctctaccgccaccac
 gtggagctgagctggtgggtgaaatgggaagaggtgcaacagtggggtctgcacagac
 ccgagccccctcaaggagcagccccctcaatgactccagatcagctctgagcagc
 cgctgaggggtctcggccacctctggaagagccccgcaaccactccogctgcaa
 gtccagttctcagggctctcgggaatgacaggtggaccaggtatgggccaaccc
 gctaccacagatcgtcagcggcaggtcctgggttagagcagactaa

【図4】

(a)
 MQEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQ
 DPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLNASLDKSSGRSTLYI
 AASQPGDSATYLCAVRPTSGGSYIPTFGRGTSLLIVHPYI
 QNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVYSQKSDS
 DVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAVSNKSDFACANAF
 NNSIIPEDTFFPSPSS停止

(b)
 MGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQ
 DPGMeGLRLLIHYSVVGAGITDQGEVFNPNVSRSTEDF
 PLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVNGTGELFFGEGSRLTVL
 EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPD
 HVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALS
 SRLRVSATFWQDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDR
 AKPVTQIVSABAWGRAD停止

【図6】

MGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQ
 DPGMeGLRLLIHYSVVGAGITDQGEVFNPNVSRSTEDFP
 LRLLSAAPSQTSVYFCASSYVNGTGELFFGEGSRLTVL
 DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPD
 HVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALS
 SRLRVSATFWQDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDR
 AKPVTQIVSABAWGRAD停止

```

atgcagaagg aagtggagca gaactctgga cccctcagtg tccagaggg
agccattgcc tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct
tcttctggta cagacaatat tctgggaaaa gccttgagtt gataatgtcc
atatactcca atggtgacaa agaagatgga aggtttacag cacagctcaa
taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc cagcccagtg
atcagccac ctacctctgt gccgttacaa ctgacagctg ggggaaattg
cagtttggag cagggaccca gttgtgctc accccagata tccagaaccc
ggatcctgcc gtgtaccgac tgaagagctc taaatccoat gacaagtctg
tctgctatt cccgatttt gatctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag
gattctgatg tgtatatcac agacaaatgt gtgctagaca tgaggcttat
ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa tctgactttg
cagttgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc
cccagccag aaagttccta a

```

Figure 7a

```

atgaacgctg gtgtcactca gaccccaaaa ttccaggtcc tgaagacag
acagagcagc acactgcagt gtycccaaga tatgaacct gaatacatgt
cctgglatcg acaagaccca gycatggggc tgaggctgat toattactca
gttggctgctg gtatcactga ccaggagaa gtcccacatg gctacaatgt
ctccagatca accacagagg atttccocet cagctgctg tggctgtctc
cctccacagc atctgtgtac ttctgtgcca gcagcccgag actagccgga
ggcgaccagc agcagctact cgggcccggc accagctcca cgttcacaga
ggacctgaaa aacgtgttcc caccagaggt cgtgtgttt gagccatcag
aagcagagat ctcccacacc caaaaggcca cactgtgtgt cctggccaca
ggcttctacc ccgaccacgt ggaactgagc ttgtgggtga atgggaagga
ggtgcacagt ggggtctgca cagaccocga gccctcaag gagcagccgc
ccctcaatga ctccagatca gctctgagca gccccctgag ggtctcgcc
accttctggc aggaccoccc caaccacttc cgtgtcaag tccagttcta
cgggctctcg gagaatgagc agtggaccca ggatagggcc aaaccogtca
cccagatcgt cagcgccag gctctgggta gagcagactg ttaa

```

Figure 7b

【 図 8 】

(a)

```

MQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYR
QYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLI
RDSQPSDSATYLCAVTTDSWGKLFAGTQVVVTPDIQ
NPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDS
VYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFAANAFN
NSIIPEDTFFPSPSS 停止

```

(b)

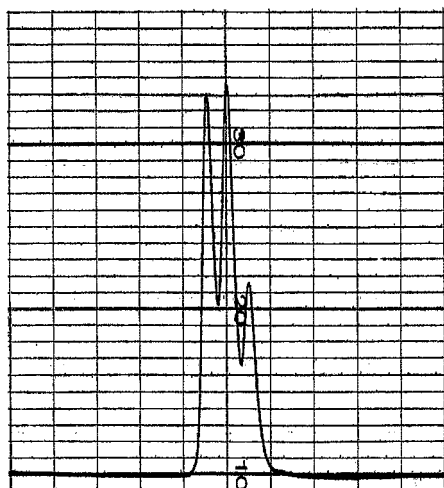
```

MNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWY
RQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTED
FPLRLLSAAPSQTSVYFCASRPGLAGGRPEQYFPGTRL
VTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF
YPDHVELS WVVNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALNDSR
YALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCCQVFYGLSENDEWT
QDRAKPVTVIVSAEAWGRADC 停止

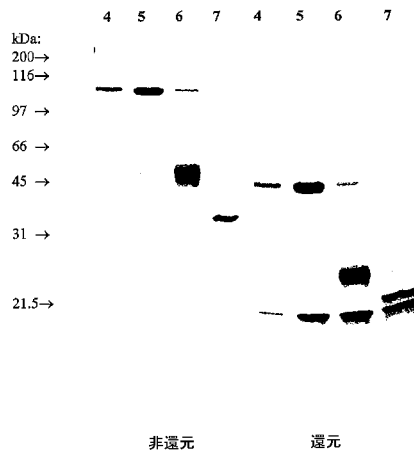
```

【 図 9 】

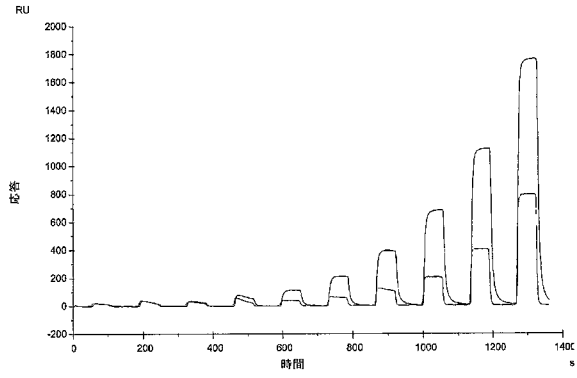
画分: 4 5 6 7



【 図 10 】

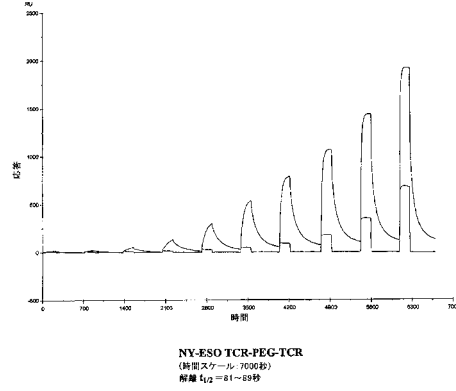


【 図 1 1 a 】



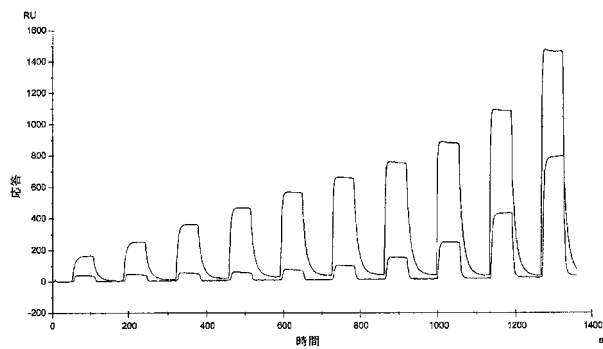
NY-ESO TCR
 (時間スケール: 1400秒)
 解離 $t_{1/2}$ = 4.1秒

【 図 1 1 b 】



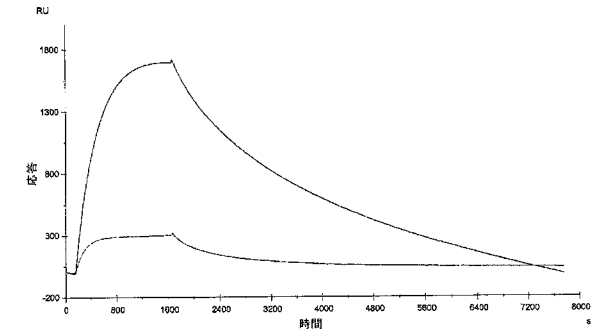
NY-ESO TCR-PEG-TCR
 (時間スケール: 7000秒)
 解離 $t_{1/2}$ = 81~89秒

【 図 1 2 a 】



A6 TCR
 (時間スケール: 1400秒)
 解離 $t_{1/2}$ = 10.4秒

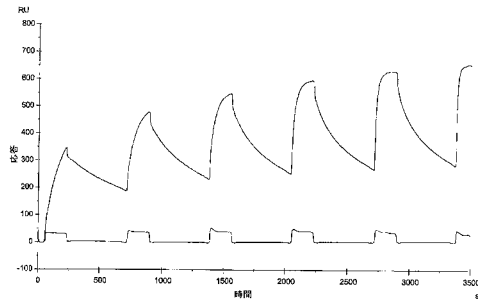
【 図 1 2 c 】



解離 $t_{1/2} \geq 8$ 分(500秒)
 二成分モデルに最適に適合
 第1成分(優勢): 7.7~8.3分
 第2成分: 35~79分

A6 TCR-PEG-TCR (単回注入)
 (リガンド密度: 1000RU, 5500RU; 時間スケール: 8000秒)

【 図 1 2 b 】



A6 TCR-PEG-TCR
 (注: 時間スケール: 7000秒)
 解離 $t_{1/2} \geq 500$ 秒

【 図 1 3 】

```

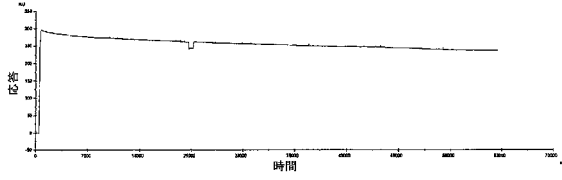
P G G G S G G G S G G G G
CCC GGG GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGT TCA GGC GGT GGC GGA
GGG CCC CCA CCG AGA CCG CCA CCG CCA AGT CCG CCA CCG CCT

S G G G G G S G G G G S G G G
TCC GGC GGT GGC GGT TCG GGT GGC GGT GGC TCA GGC GGT GGC
AGG CCG CCA CCG CCA AGC CCA CCG CCA CCG AGT CCG CCA CCG

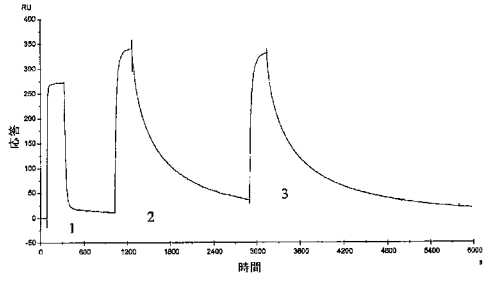
G P
GGG CCC
CCC GGG
  
```

Figure 13

【 2 5】



【 2 6】



【 図 1 】

(a)

atgcagaaggaagtggagcagaactctggacccctcagtggtccagagggagccatt
 ccctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttctctggtacaga
 caatatctctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatgggtgacaaa
 gaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgtttctctgctc
 atcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgcccgttacaactgac
 agctgggggaaattgcagtttggagcagggaccaggttgtgggtcaccagatatac
 cagaacctgaccctgcccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtct
 gtctgcctattcaccgattttgattctcaaacaaatgtgtcacaagtaaggattct
 gatgtgtatatcagacacaaaatctgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagc
 aacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaac
 aacagcattattccagaagacaccttcttccccagcccagaaagtctcctaa

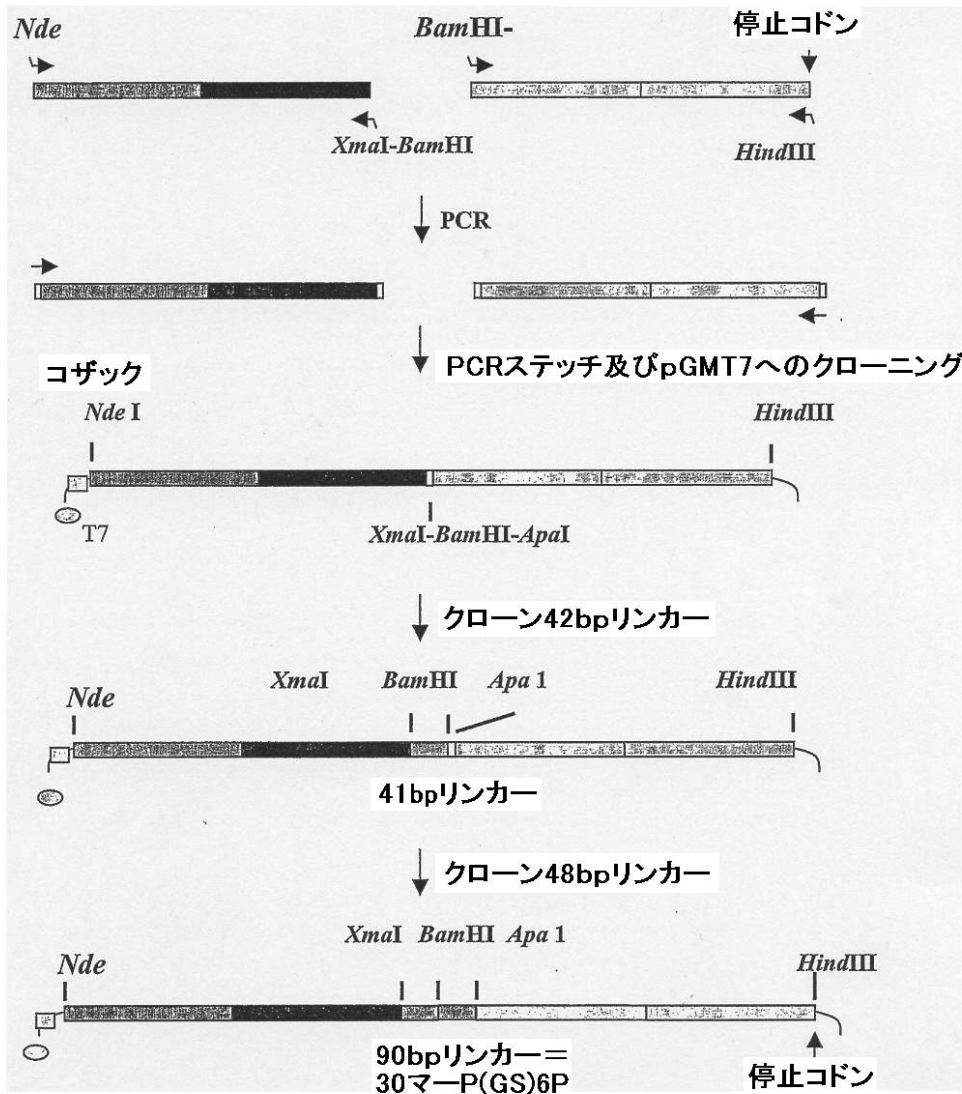
(b)

atgaacgctgggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagc
 atgacactgcagtggtgcccaggatataaacatgaatacatgtcctgggtatcgacaa
 gaccagggcatggggctgaggtgattcattactcagttgggtgctgggtatcactgac
 caaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccg
 ctcaggtgctgtgctggctgctccctcccagacatctgtgtacttctgtgcccagcagg
 ccgggactagcgggagggcgaccagagcagtaacttcgggcccgggaccaggtctcacg
 gtacagaggacctgaaaaacgtgttcccacccaggtcgctgtgtttgagccatca
 gaagcagagatctcccacccccaaaaggccacactgggtgtgcctggccacaggcttc
 taccgacaccgctggagctgagctgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggg
 gtctggacagaccgagccctcaaggagcagccgcctcaatgactccagatac
 gctctgagcagccgctgagggctctcgccaccttctggcaggacccccgcaaccac
 ttccgctgtcaagtcagttctacgggctctcggagaatgacgagtggaaccaggat
 agggccaaaccgctcaccagatcgtcagcgcgaggcctggggtagagcagactaa

【 図 5 】

atgggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagcatgaca
 ctgcagtggtgcccaggatataaacatgaatacatgtcctgggtatcgacaagacca
 ggcatggggctgaggtgattcattactcagttgggtgctgggtatcactgaccaagga
 gaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccgctcagg
 ctgctgtcggctgctccctcccagacatctgtgtacttctgtgcccagcagttacgtc
 gggaacaccggggagctgttttttggagaaggctctaggctgaccgtaactggaggac
 ctgaaaaacgtgttcccacccaggtcgctgtgtttgagccatcagaagcagagatc
 tcccacccccaaaaggccacactgggtgtgcctggccacaggcttctaccgaccac
 gtggagctgagctgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtctggacagac
 ccgagccccctcaaggagcagccgcctcaatgactccagatacgtctgtgagcagc
 cgctgagggctctcgccaccttctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaa
 gtccagttctacgggctctcggagaatgacgagtggaaccaggatagggccaaacc
 gtcaccagatcgtcagcgcgaggcctggggtagagcagactgttaa

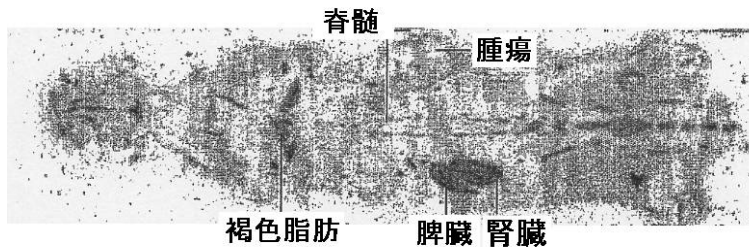
【 図 1 4 】



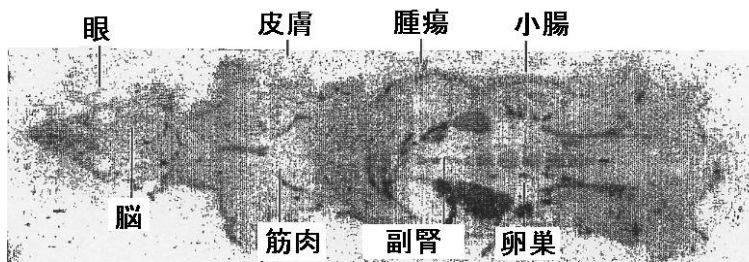
【 図 1 6 】

腫瘍を有する雌性ヌードラットへの二量体-[¹²⁵I]-mTCR(PEG化)の単回静脈内投与後20分における組織内放射活性の分布

レベル1



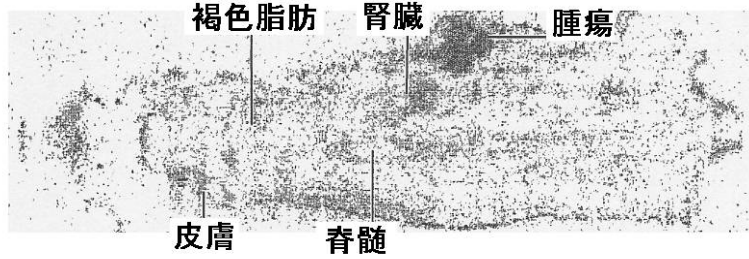
レベル2



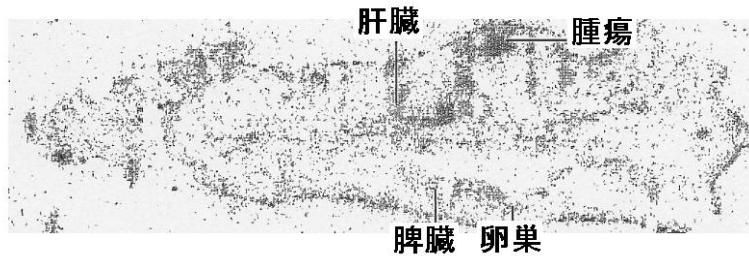
【 図 1 7 】

腫瘍を有する雌性ヌードラットへの二量体-[¹²⁵I]-mTCR(PEG化)の単回静脈内投与後48時間における組織内放射活性の分布

レベル1



レベル2



【 図 2 2 】

(a)

```

atgcagaagg aagtggagca gaactctgga cccctcagtg ttccagaggg
agccattgcc tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct
tcttctggta cagacaatat tctgggaaaa gccttgagtt gataatgtcc
atatactcca atgggtgacaa agaagatgga aggtttacag cacagctcaa
taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc cagcccagtg
attcagccac ctacctctgt gccgttacia ctgacagctg ggggaaatg
cagtttggag cagggaccca ggttgtggtc accccagata tccagaacc
ggatcctgcc gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg
tctgcctatt caccgatttt gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag
gattctgatg tgtatatcac agacaaatgt gtgctagaca tgaggcttat
ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa tctgactttg
catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc
cccagcccag aaagttccttta a

```

(b)

```

MQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYR
QYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLI
RDSQPSDSATYLCVTTDSWGKLQFGAGTQVVVTPDIQ
NPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSD
VYITDKCVLDMRSMDFKNSNSAVAWSNKSDFACANAFN
NSIIPEDTFFPSPSSC 停止

```

【 図 2 3 】

(a) 変異A6 TCRβ鎖DNA配列

```

gctgggtcactcagacccccaaattccaggctcgaagacaggacagagcatgacactgcagtggtcccaggatatgaacctg
aatacatgtcctggatcgaagacccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttggctggtatcactgaccaaggag
aagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggattcccgtcaggtgctgctggctgctccctccagacatctgt
gtactctgtgctcagggccggggctgatgagtcggaaccagagcagctactcgggcccgggcaccaggctcaccggtcacag
aggacctgaaaaacgtgtccaccgggctggtgagcctcagaagcagagatctccacacccaaaaggccacac
tgggtgctggccaccggtttctacccgaccacgtggagctgagctgggtggatgggaaggagggtgcacagtgggtctgc
acagaccgcagcccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatacgtctgagcagccgctgaggggtctcgccac
ctctggcaggacccccgaaccactccgctgcaagtcagttctacgggctctcgggagaatgacgagtgaccaggatagg
gccaaaccgctaccagatcgtcagcggcgggctgggtgagcagactaagcttgaattc

```

(b) 変異A6 TCRβ鎖アミノ酸配列

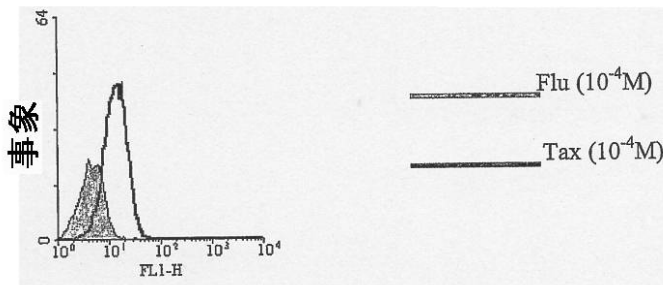
```

mnagvtqtpkfqvltgqsmllqcaqdmnheymswyrqdpqmgllrlhysvgaitdqgevpngynvrsttedfplrlsaaps
qtsvyfcasrpglmsaepeqyfgpgtrltvtedlknvfppevavfepseaeishtqkatlvclatgfyphvelswwvngkevhsqv
ctdpqplkeqpalndsryalssrlrvsatfwqdpnrhfrqcqvfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgrad*

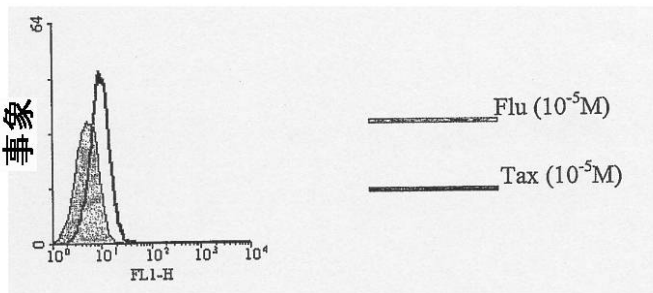
```

【 図 2 7 】

(a)



(b)



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT 03/05104
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/00 C07K14/705		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99/60119 A (JAKOBSEN BENT KARSTEN ; AVIDEX LTD (GB); BOULTER JONATHAN MICHAEL (GB)) 25 November 1999 (1999-11-25) cited in the application abstract page 8, lines 1-25 page 9, lines 4-12 page 12, line 21 - page 15, line 21 page 16, lines 17-29 page 21, lines 5-21 page 22, line 26 - page 24, line 19 page 25, line 18 - page 27, line 11 page 31, line 25 - page 32, line 7 examples claims ----- -/--	1-5, 7-16, 24-69
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 21 July 2004		Date of mailing of the international search report 11 10 2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT 03/05104

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98/39482 A (SUNOL MOLECULAR CORP) 11 September 1998 (1998-09-11) examples abstract	1-5, 7-16, 24-69
A	WO 97/35991 A (HERRIN SEAN D ; SCHNECK JONATHAN P (US); UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 2 October 1997 (1997-10-02) abstract examples claims	
A	WO 02/089837 A (BONA CONSTANTIN A ; BRUMEANU TEODOR D (US); SINAI SCHOOL MEDICINE (US)) 14 November 2002 (2002-11-14) abstract example 5.3 claims	1-5,7-14
A	WO 01/93913 A (SUNOL MOLECULAR CORP) 13 December 2001 (2001-12-13) abstract	1-5, 7-14, 24-69
A	WO 01/62908 A (NISSIM AHUVA) 30 August 2001 (2001-08-30) abstract	1-5, 7-16, 24-69
A	WO 00/23087 A (SUNOL MOLECULAR CORP) 27 April 2000 (2000-04-27) abstract	1-5, 7-16, 24-69
A	WO 98/03552 A (CHILDRENS HOSP MEDICAL CENTER) 29 January 1998 (1998-01-29) abstract examples	1-5, 7-16, 24-69
A	LING LING CHEN ET AL: "PRODUCTION OF MULTIMERIC FORMS OF CD4 THROUGH A SUGAR-BASED CROSS-LINKING STRATEGY" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 266, no. 27, 25 September 1991 (1991-09-25), pages 18237-18243, XP000471616 ISSN: 0021-9258 abstract column 3, line 1 figure 7	1-5,7-14

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT 03/05104

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No:
A	CASARES SOFIA ET AL: "Enzymatically mediated engineering of multivalent MHC class II-peptide chimeras" PROTEIN ENGINEERING, vol. 14, no. 3, March 2001 (2001-03), pages 195-200, XP002288730 ISSN: 0269-2139 abstract column 2	1-5,7-14
A	----- TODOROVSKA ANETA ET AL: "Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 248, no. 1-2, 1 February 2001 (2001-02-01), pages 47-66, XP002288731 ISSN: 0022-1759 abstract paragraphs [0002], [0003] -----	1-5,7-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 CT/GB 03/05104
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

see additional sheet

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

see annex

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/ GB 03/ 05104

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 60-63 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.

Although claims 64-68 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/ GB 03/ 05104

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-5 partially, 7, 8-10 partially, 11-13, 14-16 partially, 24-44 partially, 45, 46-69 partially)

Multivalent T Cell Receptor (TCR) complex comprising at least two TCRs, linked by a non peptidic polymer chain.

2. claims: 1-5 partially, 6, 8-10 partially, 14-16 partially, 17-23, 24-44 partially, 46-69 partially.

Multivalent T Cell Receptor (TCR) complex comprising at least two TCRs, linked by a peptidic linker sequence.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

Information on patent family members

PCT/ 03/05104

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
WO 9960119	A	25-11-1999	AT 208819 T 15-11-2001			
			AU 758949 B2 03-04-2003			
			AU 3945699 A 06-12-1999			
			AU 746164 B2 18-04-2002			
			AU 3945999 A 06-12-1999			
			BG 105053 A 28-09-2001			
			BR 9910253 A 17-09-2002			
			CA 2327314 A1 25-11-1999			
			CA 2328144 A1 25-11-1999			
			CN 1306572 T 01-08-2001			
			CN 1308674 T 15-08-2001			
			DE 69900468 D1 20-12-2001			
			DE 69900468 T2 18-07-2002			
			DK 1066380 T3 28-01-2002			
			EE 200000697 A 17-06-2002			
			EP 1080193 A2 07-03-2001			
			EP 1066380 A2 10-01-2001			
			ES 2168866 T3 16-06-2002			
			WO 9960119 A2 25-11-1999			
			WO 9960120 A2 25-11-1999			
			HK 1035739 A1 26-07-2002			
			HR 20000790 A1 30-06-2001			
			HU 0103614 A2 28-01-2002			
			ID 28040 A 03-05-2001			
			JP 2002515243 T 28-05-2002			
			JP 2002515244 T 28-05-2002			
			NO 20005811 A 19-01-2001			
			NO 20005812 A 19-01-2001			
			NZ 507886 A 30-05-2003			
			NZ 507887 A 20-12-2002			
			PT 1066380 T 31-05-2002			
			SI 1066380 T1 30-04-2002			
			SK 17332000 A3 11-06-2001			
			TR 200003391 T2 21-02-2001			
			US 2002142389 A1 03-10-2002			
			US 2002119149 A1 29-08-2002			
			ZA 200006181 A 31-01-2002			

			WO 9839482	A	11-09-1998	AU 6685698 A 22-09-1998
						EP 0977886 A1 09-02-2000
						WO 9839482 A1 11-09-1998

			WO 9735991	A	02-10-1997	AU 729406 B2 01-02-2001
						AU 2422497 A 17-10-1997
						CA 2250166 A1 02-10-1997
						EP 0889964 A1 13-01-1999
						JP 11507843 T 13-07-1999
						KR 2000005060 A 25-01-2000
						NZ 331688 A 28-02-2000
						US 6140113 A 31-10-2000
						WO 9735991 A1 02-10-1997
						US 6448071 B1 10-09-2002
						US 6458354 B1 01-10-2002
						US 6015884 A 18-01-2000
						US 2002127231 A1 12-09-2002

WO 02089837	A	14-11-2002	US 2002164340 A1 07-11-2002			
			EP 1392356 A1 03-03-2004			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/ 03/05104

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02089837	A	WO 02089837 A1	14-11-2002
WO 0193913	A	13-12-2001	
		AU 7524601 A	17-12-2001
		CA 2411470 A1	13-12-2001
		CN 1464790 T	31-12-2003
		EP 1289564 A2	12-03-2003
		JP 2003534821 T	25-11-2003
		WO 0193913 A2	13-12-2001
		US 2003144474 A1	31-07-2003
WO 0162908	A	30-08-2001	
		AU 3220401 A	03-09-2001
		EP 1259601 A2	27-11-2002
		WO 0162908 A2	30-08-2001
WO 0023087	A	27-04-2000	
		AU 1218000 A	08-05-2000
		EP 1124568 A1	22-08-2001
		WO 0023087 A1	27-04-2000
		US 2003171552 A1	11-09-2003
		US 6534633 B1	18-03-2003
WO 9803552	A	29-01-1998	
		US 6211342 B1	03-04-2001
		AU 3664597 A	10-02-1998
		EP 0914347 A2	12-05-1999
		WO 9803552 A2	29-01-1998
		US 6197302 B1	06-03-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 35/12 (2006.01)		A 6 1 K 35/12	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)		A 6 1 P 37/02	
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	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 31/18 (2006.01)		A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)		A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)		A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 19/02 (2006.01)		A 6 1 P 19/02	
C 1 2 R 1/225 (2006.01)		C 1 2 N 1/21	
C 1 2 R 1/23 (2006.01)		C 1 2 R 1:225	
		C 1 2 N 1/21	
		C 1 2 R 1:23	

- (31)優先権主張番号 60/475,906
(32)優先日 平成15年6月5日(2003.6.5)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 0314113.2
(32)優先日 平成15年6月18日(2003.6.18)
(33)優先権主張国 英国(GB)
(31)優先権主張番号 0316354.0
(32)優先日 平成15年7月11日(2003.7.11)
(33)優先権主張国 英国(GB)

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

(72)発明者 グリック, マイアー

アメリカ合衆国、マサチューセッツ 0 2 0 7 2、スタウトン、ゴールデン ロード 6 3

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA04 CA11 HA08 HA11 HA19
4B065 AA01X AA30X AA30Y AA57X AA87X AB01 AC20 BA02 CA44
4C087 AA01 AA03 BB63 CA04 NA14 ZA96 ZB07 ZB15 ZB21 ZB26
ZB33 ZC35 ZC55