

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6246711号  
(P6246711)

(45) 発行日 平成29年12月13日(2017.12.13)

(24) 登録日 平成29年11月24日(2017.11.24)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 P 21/02	(2006.01) C 12 P 21/02 Z N A C
C 12 P 21/08	(2006.01) C 12 P 21/08
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 A
C 07 K 19/00	(2006.01) C 07 K 19/00
C 07 K 16/00	(2006.01) C 07 K 16/00

請求項の数 9 (全 76 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-516311 (P2014-516311)
(86) (22) 出願日	平成24年6月19日 (2012.6.19)
(65) 公表番号	特表2014-519830 (P2014-519830A)
(43) 公表日	平成26年8月21日 (2014.8.21)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2012/061734
(87) 國際公開番号	W02012/175508
(87) 國際公開日	平成24年12月27日 (2012.12.27)
審査請求日	平成27年6月11日 (2015.6.11)
(31) 優先権主張番号	11171027.3
(32) 優先日	平成23年6月22日 (2011.6.22)
(33) 優先権主張国	歐州特許庁 (EP)

前置審査

(73) 特許権者	306021192 エフ・ホフマンーラ・ロシュ・アクチエン ゲゼルシャフト スイス、ツェハーネ 4070 バーゼル、グ レンツアッハーシュトラーセ 124 番
(74) 代理人	110002077 園田・小林特許業務法人
(72) 発明者	クネットゲン、ヘンドリック ドイツ国 ベンツベルク 82377, アガテ フライスナー ヴェーク 16

審査官 藤井 美穂

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】複合体を含むMHCクラスIを用いてウイルス特異的細胞傷害性T細胞を循環させることによる標的細胞の除去

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

i ) N末端からC末端の方向に、T細胞応答誘発性ペプチド、2-ミクログロブリン、並びにクラスI MHC分子の細胞外ドメインの1、2、及び3を含む融合ポリペプチド、

i i ) 1対のジスルフィド結合ポリペプチド鎖であって、

第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖はNからC末端方向に、免疫グロブリン重鎖可変(VH)ドメイン、免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン(CH1)、抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、免疫グロブリン重鎖第二定常(CH2)及び第三定常(CH3)ドメインを含み、

第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖はNからC末端方向に、抗体の重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、免疫グロブリン重鎖第二定常(CH2)及び第三定常(CH3)ドメインを含み、

第一と第二のジスルフィド結合ポリペプチド鎖が一以上のジスルフィド結合によって連結された、1対のジスルフィド結合ポリペプチド鎖、及び

i i i ) 抗体軽鎖

を含む複合体の真核細胞における組換え生産の方法であって、

- 複合体をコードする一以上の核酸を同一真核細胞内に含む真核細胞を培養する工程、及び

- 細胞又は培養培地から複合体を回収する工程

10

20

を含み、

複合体が T 細胞応答誘発性ペプチド、 2 - ミクログロブリン、並びにクラス I MHC 分子の細胞外ドメイン 1、 2、 及び 3 の厳密に一の融合ポリペプチドを含む、方法。

【請求項 2】

複合体が培養培地で 1 mg / ml 以上の濃度で得られることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

真核細胞が哺乳動物細胞であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

哺乳動物細胞が、ヒト胚性腎細胞、又はチャイニーズハムスター卵巣細胞、又はベビーハムスター腎臓細胞、又はマウスの骨髄腫細胞であることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

融合ポリペプチドが、 i ) 第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の N 末端に共有結合するか、又は ii ) 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の N 末端に共有結合するか、又は iii ) 抗体軽鎖の N 末端に共有結合することを特徴とする、請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6】

T 細胞応答誘発性ペプチドがウイルス由来ペプチドであることを特徴とする、請求項 1 から 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7】

融合ポリペプチドが N から C 末端方向に、

( i ) 配列番号 01 ~ 配列番号 09 から選択されるアミノ酸配列を有するウイルス由来ペプチド、

( ii ) 配列番号 16、 17、 18、 21、 22、 及び 23 から選択されるアミノ酸配列を有する第一リンカーペプチド、

( iii ) 配列番号 10 のアミノ酸配列を有する 2 - ミクログロブリン、

( iv ) 配列番号 16、 17、 18、 21、 22、 及び 23 から選択されるアミノ酸配列を有する第二リンカーペプチド、

( v ) 配列番号 11 のアミノ酸配列を有するクラス I MHC 分子の細胞外ドメインの 1、 2、 及び 3、 及び

( vi ) 配列番号 12、 16、 17、 18、 21、 22、 及び 23 から選択されるアミノ酸配列を有する第三リンカーペプチド

を含むことを特徴とする、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 8】

第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖及び第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖は、 i ) 配列番号 31、 32、 及び 33 から選択されるアミノ酸配列を含むヒト IgG1 の CH2 ドメイン、及び配列番号 34、 35、 及び 36 から選択されるアミノ酸配列を含むヒト IgG1 の CH3 ドメインを含むことを特徴とする、請求項 1 から 7 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 9】

複合体が、 i ) 配列番号 21 のアミノ酸配列を有する第一リンカーペプチド、及び / 又は ii ) 配列番号 22 のアミノ酸配列を有する第二リンカーペプチド、及び / 又は iii ) 配列番号 12 のアミノ酸配列を有する第三リンカーペプチド、及び / 又は iv ) 配列番号 32 又は 33 のアミノ酸配列を有するヒト IgG1 の CH2 ドメイン、及び / 又は v ) 第一ジスルフィド結合ポリペプチドにおいて、配列番号 35 のアミノ酸配列を有するヒト IgG1 の CH3 ドメイン及び第二ジスルフィド結合ポリペプチドにおいて、配列番号 36 のアミノ酸配列を有するヒト IgG1 の CH3 ドメインを含むことを特徴とする、請求項 7 又は 8 の何れか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【発明の詳細な説明】****【発明の開示】****【0001】**

本明細書において、抗体及びMHCクラスI成分を含む融合ポリペプチド及びウイルス特異的細胞傷害性T細胞を循環させることの標的引による腫瘍細胞の除去におけるその使用が報告される。

**【発明の背景】****【0002】**

MHCクラスIタンパク質は、鎖（-1から3及び膜貫通ドメイン）及び2-マイクログロブリンからなる。それは多遺伝子性（一倍体ゲノムにおけるMHCクラスIタンパク質で3遺伝子座）で、6つの異なるMHCクラスIタンパク質の鎖を生じる（ヒトでは2つのHLA-A、2つのHLA-B、2つのHLA-C）。MHCはさらに多形性である。ヒトHLA-対立遺伝子A\*0201は、コーカサス人口の約30%から50%で優勢である（Player, et al., J Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19 (1996) 357-363）。

**【0003】**

ヒトサイトメガロウイルスのCMV（=ヒトヘルペスウイルス5、HHV-5）は、最大のヒトウイルスの一つである。そのゲノムは約230000bpの線形二重鎖DNAを含み、160タンパク質以上をコードする（Davison, A.J., et al., J. Gen. Virol. 84 (2003) 17-28）。

**【0004】**

CMVはヒトゲノムの崇高な寄生生物になるために進化しており、それは強力な免疫原であり、そして免疫系の全てのアームから強い免疫応答を引き起こす。このウイルスは、ヒト免疫系に知られている最も免疫優性な抗原の一つのように見え、前例のない大きさのCD8<sup>+</sup>-T細胞応答を刺激する。

**【0005】**

CMV「潜伏期」は、ウイルス転写パターンの変化よりもCMVウイルスの慢性的な免疫抑制に依存する（Moss & Khan, Human Immunology 65 (2004) 456-464）。

**【0006】**

CD8<sup>+</sup>-T細胞免疫応答は、全てのCMVタンパク質に対して均等に指向していないが、集束される。CMVタンパク質のpp65及びIE-1が優勢な標的である（McLaughlin-Taylor, E., et al., J. Med. Virol. 43 (1994) 103-110; Moss & Khan, Human Immunology 65 (2004) 456-464）。

**【0007】**

CMV特異的T細胞の真の頻度は、全CD8<sup>+</sup>-T細胞レパートリーのうち最大1%から2%の程度で個々のペプチドの頻度と共に非常に高い（Moss & Khan, Human Immunology supra; Wills, M.R., et al., J. Virol. 70 (1996) 7569-7579）。

**【0008】**

CMV特異的CD8<sup>+</sup>-T細胞応答は年齢とともに著しく増加し、個々のHLA-ペプチド四量体は全CD8<sup>+</sup>-T細胞プールの10%を超えて高い頻度で染色する（Khan, N., et al., J. Immunol. 169 (2002) 1984-1992）。

**【0009】**

健康な高齢ドナーにおける全CD8<sup>+</sup>-T細胞応答は、CD8<sup>+</sup>-T細胞レパートリーの約50%を占めることができる。

**【0010】**

膨大なCD8<sup>+</sup>-T細胞の増殖は、しばしばクローン的に非常に限定され、CMVは、加齢に伴って末梢血において見られるクローン性CD8<sup>+</sup>-T細胞の増殖の少なくとも30%の原因であると推定されている。全CD8<sup>+</sup>-T細胞数は、CMV血清陰性コホートと比較して、60歳以上のCMV血清反応陽性ドナーにおいて2倍である（Looney, R.J., et al., Clin. Immunol. 90 (1999) 213-219）。

10

20

30

40

50

## 【0011】

可溶性 H L A と - 2 - ミクログロブリンの融合は、Mottez et al. (Eur. J. Immunol. 21 (1991) 467-471); Godeau et al. (J. Biol. Chem. 267 (1992) 24223-24229) 及び Mage et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 89 (1992) 10658-10662) によって報告されている。可溶性 H L A 及び - 2 - ミクログロブリンとのウイルス由来ペプチドの融合は、Mottez et al. (J. Exp. Med. 181 (1995) 493-502) によって報告されている。免疫グロブリン重鎖の可溶性 H L A 及び共発現された - 2 - ミクログロブリンとの融合は、Dal Porto et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6671-6675) によって報告されている。F a b に化学的結合したストレプトアビシンとのビオチン化ペプチド可溶性 H L A 及び - 2 - ミクログロブリンの四量体複合体は Robert et al. (Eur. J. Immun. 30 (2000) 3165-3170) によって記述されている。可溶性 H L A 及び - 2 - ミクログロブリンとのウイルス由来ペプチドの融合と化学的に結合した F a b は、Robert et al. (Cancer Immunology 1 (2001) 2) によって報告されている。可溶性 H L A 及び - 2 - ミクログロブリンとのウイルス由来ペプチドのマウスモノクローナル抗体の重鎖への融合は、Greten et al. (J. Immunol. Methods 271 (2002) 125-135) によって報告されている。ペプチド、インビトロでのリフォールディング及びペプチドローディングを伴わない s c F v 融合体の大腸菌発現は、Lev et al. (J. Immunol. 169 (2002) 2988-2996), Lev et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 101 (2004) 9051-9056)、及び Novak et al. (Int. J. Cancer 120 (2006) 329-336) により報告されている。ペプチドを負荷され、ストレプトアビシン融合 F a b 又は s c F v 抗体に結合したビオチン化可溶性 M H C の使用は、Mous et al. (Leukemia 20 (2006) 1096-1102) により報告される。

## 【0012】

国際公開第 2005 / 099361 号において、M H C クラス I - ペプチド抗体は修飾された - 2 - ミクログロブリンにコンジュゲートすると報告されている。国際公開第 2005 / 099361 号に報告される典型的なコンジュゲートは、M H C - 複合体のアルファ鎖 (H L A) のインビトロのコンジュゲーションによるか又は同じ細胞において別々の遺伝子からの共発現により得られる。

## 【0013】

米国特許出願公開第 2004 / 0091488 号において、特定のキャリア分子を有する主要組織適合性複合体クラス I 抗原の抗原性コンストラクトが報告されている。本明細書において融合ポリペプチドはヒンジ領域を欠いて報告されている。

## 【発明の概要】

## 【0014】

本明細書は、第一部分として標的抗原に特異的に結合する抗体由来部分、及び第二部分として M H C クラス I タンパク質複合体に共有結合したウイルス由来ペプチドを含む複合体を組換え的に生成する方法、並びに複合体そのものを報告する。

## 【0015】

本明細書に報告される複合体とともに、個体の既存のウイルス特異的循環性細胞障害性 T 細胞 (T メモリー細胞及び / 又は T エフェクター細胞) は、M H C クラス I タンパク質複合体に結合したウイルス由来ペプチドにより急性ウイルス感染を模倣する M H C クラス I 複合体と、これらの細胞をドレッシングすることにより、複合体の抗体由来部分が特異的に結合する標的抗原を発現する細胞に指向することができる。

## 【0016】

本明細書に報告される一態様は、真核細胞において i ) 複合体をコードする一以上の核酸を含む真核細胞を培養し、及び i i ) 細胞又は培養培地から複合体を回収する工程を含む、 i ) - 2 - ミクログロブリンとクラス I の M H C 分子の細胞外ドメイン 1、 2、 及び 3 の融合ポリペプチド、 i i ) 抗体のヒンジ領域を各々含むジスルフィド結合ポリペプチドの対、及び i i i ) 抗体軽鎖可変ドメイン及び抗体重鎖可変ドメインの少なくとも一対を含んでなる複合体の組換え生産の方法であり、該複合体は、 - 2 - ミクログロブリン及びクラス I の M H C 分子の細胞外ドメインの 1、 2、 及び 3 の厳密に一の

10

20

30

40

50

融合ポリペプチドを含むことを特徴とする。

【0017】

一実施態様において、複合体は厳密に一のMHC由来ポリペプチド又はMHC由来分子を含む厳密に一の融合ポリペプチドを含んでなる。

【0018】

一実施態様において、複合体は培養培地中で1mg/ml以上の濃度で得られる。一実施態様において、複合体は培養培地中で4mg/ml以上の濃度で得られる。

【0019】

一実施態様において、真核細胞は哺乳動物細胞である。一実施態様において、哺乳動物細胞は、ヒト胚性腎細胞、又はチャイニーズハムスター卵巣細胞、又はベビーハムスター腎臓細胞、又はマウスの骨髄腫細胞である。

10

【0020】

一実施態様において、融合ポリペプチドは、N末端からC末端の方向で、2-ミクログロブリン、及び1%未満の出現の相対頻度を有するクラスIのMHC分子の細胞外ドメインの1、2及び3を含む。

【0021】

一実施態様において、融合ポリペプチドは、T細胞応答誘発性ペプチド、2-ミクログロブリン、及び出現の相対頻度が1%以上を有するクラスIのMHC分子の細胞外ドメインの1、2及び3を含む。

【0022】

20

一実施態様において、抗体のヒンジ領域由来のジスルフィド結合ポリペプチド鎖の対のポリペプチドは、i)一以上のジスルフィド結合によって連結され、ii)第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖はNからC末端方向に、免疫グロブリン軽又は重鎖可変ドメイン、免疫グロブリン軽鎖又は重鎖定常ドメイン、及び抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチドを含み、第二のジスルフィド結合ポリペプチド鎖は、抗体の重鎖ヒンジ領域ポリペプチドを含む。

【0023】

一実施態様において、融合ポリペプチドは、i)ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の一方のC末端又はN末端の何れかに共有結合し、又はii)第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な同族重鎖又は軽鎖の可変ドメインである抗体可変ドメインのN末端に共有結合し、又はiii)第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重鎖又は軽鎖の定常ドメインである抗体定常ドメインのC末端に共有結合する。

30

【0024】

一実施態様において、T細胞応答誘発性ペプチドは、ウイルス由来のペプチドである。

【0025】

一実施態様において、融合ポリペプチドは、NからC末端方向に、(i)配列番号01～配列番号09から選択されるアミノ酸配列を有するウイルス由来ペプチド、

(ii)配列番号16、17、18、21、22、及び23から選択されるアミノ酸配列を有する第一リンカーペプチド、

(iii)配列番号10のアミノ酸配列を有する2-ミクログロブリン、

(iv)配列番号16、17、18、21、22、及び23から選択されるアミノ酸配列を有する第二リンカーペプチド、

(v)配列番号11のアミノ酸配列を有するクラスIのMHC分子の細胞外ドメインの1、2、及び3、及び

(vi)配列番号12、16、17、18、21、22、及び23から選択されるアミノ酸配列を有する第三リンカーペプチドを含む。

40

【0026】

一実施態様において、第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖及び第二ジスルフィド結合

50

ポリペプチド鎖は、i)配列番号31、32、及び33から選択されるアミノ酸配列を含むヒトIgG1のCH2ドメイン、及び配列番号34、35、及び36から選択されるアミノ酸配列を含むヒトIgG1のCH3ドメインを含む。

【0027】

一実施態様において、複合体は、i)配列番号21のアミノ酸配列を有する第一リンカーペプチド、及び/又はii)配列番号22のアミノ酸配列を有する第二リンカーペプチド、及び/又はiii)配列番号12のアミノ酸配列を有する第三リンカーペプチド、及び/又はiv)配列番号32又は33のアミノ酸配列を有するヒトIgG1のCH2ドメイン、及び/又はv)第一ジスルフィド結合ポリペプチドにおいて、配列番号35のアミノ酸配列を有するヒトIgG1のCH3ドメイン及び第二ジスルフィド結合ポリペプチドにおいて、配列番号36のアミノ酸配列を有するヒトIgG1のCH3ドメインを含む。 10

【0028】

本明細書に報告される一態様は複合体であって、

- NからC末端方向に、  
(i) 2-ミクログロブリン、及び  
(ii) 1%未満の相対頻度を有するクラスIのMHC分子の細胞外ドメインの  
1、2、及び3、

又は

- (i) T細胞応答誘発性ペプチド、  
(ii) 2-ミクログロブリン、及び  
(iii) 1%以上の相対頻度を有するクラスIのMHC分子の細胞外ドメインの  
1、2、及び3、

の何れかを含む一の融合ポリペプチド、

及び

- 一以上のジスルフィド結合により連結される2つのポリペプチド鎖であって、  
第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖はNからC末端方向に、  
(i) 免疫グロブリン軽又は重鎖可変ドメイン、  
(ii) 免疫グロブリン軽又は重鎖定常ドメイン、及び  
(iii) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド

を含み、

及び、第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖が抗体の重鎖ヒンジ領域ポリペプチドを含む2つのポリペプチド鎖

を含み、

ここで融合ポリペプチドは、

- ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の一方のC末端又はN末端の何れかに対して共有結合し、又は
  - 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖可変ドメインである抗体の可変ドメインのN末端に共有結合し、又は
  - 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖定常ドメインである抗体の定常ドメインのC末端に共有結合する

ことを特徴とする。 40

【0029】

全ての態様のうちの一実施態様において、複合体は、抗原結合複合体である。

【0030】

全ての態様のうちの一実施態様において、複合体は、共有結合複合体である。

【0031】

全ての態様のうちの一実施態様において、1%以上の相対頻度を有するクラスIのMHC分子は、10%以上の相対頻度を有する。一実施態様において、10%以上の相対頻度を有するクラスIのMHC分子は、HLA-A\*0201、又はHLA-A\*1101、又はHLA-A\*2402、又はHLA-A\*340101、又はHLA-C\*0304 50

、又はHLA-C\*0401、又はHLA-C\*0702である。

【0032】

全ての態様のうちの一実施態様において、10%以上の相対頻度を有するクラスIのMHC分子が、複合体が以下のように投与されるべき個体の領域に依存して選択される：

ヨーロッパ起源の個体において、クラスIのMHC分子は、HLA-A\*0101、HLA-A\*0201、HLA-A\*0301、HLA-B\*0702、HLA-B\*0801、HLA-B\*4402、HLA-C\*0401、HLA-C\*0501、HLA-C\*0701、及びHLA-C\*0702を含む群から選択され、

オーストラリア起源の個体において、クラスIのMHC分子は、HLA-A\*0201、HLA-A\*1101、HLA-A\*2402、HLA-A\*340101、HLA-B\*1301、HLA-B\*1521、HLA-B\*5601、HLA-B\*5602、HLA-C\*0102、HLA-C\*0401、HLA-C\*0403、及びHLA-C\*1502を含む群から選択され、

北アメリカ起源の個体において、クラスIのMHC分子は、HLA-A\*0201、HLA-A\*2402、HLA-C\*0202、HLA-C\*0304、HLA-C\*0401、及びHLA-C\*0702を含む群から選択され、及び

東南アジア起源の個体において、クラスIのMHC分子は、HLA-A\*1101、HLA-A\*2402、HLA-B\*1504、HLA-C\*0102、HLA-C\*0304、HLA-C\*0702、及びHLA-C\*0801を含む群から選択される。

【0033】

全ての態様のうちの一実施態様において、10%以上の相対頻度を有するクラスIのMHC分子が、複合体が以下のように投与されるべき個体の領域に依存して選択される：

ヨーロッパ起源の個体において、クラスIのMHC分子はHLA-A\*0201であり、

オーストラリア起源の個体において、クラスIのMHC分子は、HLA-A\*2402、HLA-B\*1301、HLA-C\*0102、及びHLA-C\*0401を含む群から選択され、

北アメリカ起源の個体において、クラスIのMHC分子は、HLA-A\*2402、及びHLA-C\*0304を含む群から選択され、そして

東南アジア起源の個体において、クラスIのMHC分子はHLA-A\*2402である。

【0034】

全ての態様のうちの一実施態様において、NからC末端方向に、2-ミクログロブリン及び1%未満の相対頻度を有するクラスIのMHC分子の細胞外ドメインの1、2及び3を含む融合ポリペプチドは、そのN末端に、MHCペプチド結合の溝に結合するペプチドを更に含む。

【0035】

全ての態様のうちの一実施態様において、T細胞応答誘発性ペプチドはCD8<sup>+</sup>-T細胞応答誘発性ペプチドである。一実施態様において、T細胞応答誘発性ペプチドは、ウイルス由来のペプチドである。

【0036】

全ての態様のうちの一実施態様において、1%未満の相対頻度を有するクラスIのMHC分子は、HLA-B\*4201、HLA-B\*5901、HLA-B\*6701、及びHLA-B\*7802を含む群から選択される。

【0037】

全ての態様のうちの一実施態様において、融合ポリペプチドは、

(i)ウイルス由来ペプチド、

(ii)2-ミクログロブリン、及び

(iii)可溶性HLA-A対立遺伝子A\*0201

を含む。

10

20

30

40

50

## 【0038】

全ての態様のうちの一実施態様において、ウイルスは、アデノウイルス、ヒトヘルペスウイルス1、ヒトヘルペスウイルス2、ヒトヘルペスウイルス4（エプスタイン・バーウイルス）、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ヒトパピローマウイルス16型、ヒトパピローマウイルス18型、ヒトパピローマウイルス31型、ヒトパピローマウイルス33型、ヒトパピローマウイルス35型、ヒトパピローマウイルス39型、ヒトパピローマウイルス45型、ヒトパピローマウイルス51型、ヒトパピローマウイルス52型、ヒトパピローマウイルス56型、ヒトパピローマウイルス58型、ヒトパピローマウイルス59型、ヒトパピローマウイルス68型、ヒトパピローマウイルス73型、ヒトパピローマウイルス82型、ヒトT細胞白血病ウイルスI型、ヒトインフルエンザA型ウイルス、ヒトインフルエンザB型ウイルス、ワクシニアウイルス、デングウイルスから選択される。

10

## 【0039】

全ての態様のうちの一実施態様において、ウイルス由来ペプチドは、N L V P M V A T V（配列番号01）、S L Y N T V A T L（配列番号02）、G L C T L V A M L（配列番号03）、G I L G F V F T L（配列番号04）、S T N R Q S G R Q（配列番号05）、L L F G Y P V Y V（配列番号06）、F A E G F V R A L（配列番号07）、L I V I G I L I L（配列番号08），又はI L H T P G C V（配列番号09）、W Y A Q I Q P H W（配列番号52）、A F S G V S W T M（配列番号53）、I L I G V V I T W（配列番号54）、M M I P T V V A F（配列番号55）、P F P Q S N A P I（配列番号56）、L L L T L L A T V（配列番号57）、I V L E H G S C V（配列番号58）、L L F K T E N G V（配列番号59）、P L N E A I M A V（配列番号60）、N L V R L Q S G V（配列番号61）、L V I S G L F P V（配列番号62）、L L L V A H Y A I（配列番号63）、L A L L A A F K V（配列番号64）、V I L A G P M P V（配列番号65）、H V L G R L I T V（配列番号66）、V T E H D T L L Y（配列番号67）、N T D F R V L E L（配列番号68）、C V E T M C N E Y（配列番号69）、V L E E T S V M L（配列番号70）、N L V P M V A T V（配列番号71）、R I F A E L E G V（配列番号72）、I I Y T R N H E V（配列番号73）、V L A E L V K Q I（配列番号74）、A V G G A V A S V（配列番号75）、T V R S H C V S K（配列番号76）、I M R E F N S Y K（配列番号77）、G P I S H G H V L K（配列番号78）、A T V Q G Q N L K（配列番号79）、V Y A L P L K M L（配列番号80）、A Y A Q K I F K I L（配列番号81）、Q Y D P V A A L F（配列番号82）、Y V K V Y L E S F（配列番号83）、D I Y R I F A E L（配列番号84）、V F E T S G G L V V（配列番号85）、K A R D H L A A V L（配列番号86）、Q A R L T V S G L（配列番号87）、K A R A K K D E L（配列番号88）、Q I K V R V D M V（配列番号89）、R R R H R Q D A L（配列番号90）、A R V Y E I K C R（配列番号91）、K M Q V I G D Q Y（配列番号92）、N V R R S W E E L（配列番号93）、C P S Q E P M S I Y V Y（配列番号94）、K P G K I S H I M L D V A（配列番号95）、E L R R K M M Y M（配列番号96）、I P S I N V H H Y（配列番号97）、F E Q P T E T P P（配列番号98）、Y A Y I Y T T Y L（配列番号99）、Q E F F W D A N D I Y（配列番号100）、Y E Q H K I T S Y（配列番号101）、Q E P M S I Y V Y（配列番号102）、S E H P T F T S Q Y（配列番号103）、Q A I R E T V E L（配列番号104）、T R A T K M Q V I（配列番号105）、D A L P G P C I（配列番号106）、C E D V P S G K L（配列番号107）、H E R N G F T V L（配列番号108）、P T F T S Q Y R I Q G K L（配列番号109）、Q M W Q A R L T V（配列番号110）、H E L L V L V K K A Q L（配列番号111），又はD D Y S N T H S T R Y V（配列番号112）、又は1から3アミノ酸の交換、付加、及び/又は欠損を含む。これらの変異体から選択される。

20

30

40

## 【0040】

全ての態様のうちの一実施態様において、2-ミクログロブリンはヒト 2-ミクロ

50

グロブリンである。一実施態様において、2-ミクログロブリンは野生型ヒト2-ミクログロブリンである。一実施態様において、2-ミクログロブリンは配列番号10のアミノ酸配列からなるか又は1から10のアミノ酸の交換、付加、及び/又は欠損を含むその変異体である。

【0041】

全ての態様のうちの一実施態様において、2-ミクログロブリンはヒト2-ミクログロブリンであり、10%以上の相対頻度を有するクラスIのMHC分子はヒトHLA-A\*0201である。一実施態様において、クラスIのMHC分子の細胞外ドメインの1、2、及び3は、配列番号11のアミノ酸配列からなるか又は1から10のアミノ酸の交換、付加、及び/又は欠損を含むその変異体である。

10

【0042】

全ての態様のうちの一実施態様において、ウイルス由来ペプチドは第一リンカーペプチドを介して2-ミクログロブリンへ融合される。一実施態様において、ウイルス由来ペプチドは2-ミクログロブリンのN末端へ融合される。

【0043】

全ての態様のうちの一実施態様において、2-ミクログロブリンは第二リンカーペプチドを介してクラスIのMHC分子の細胞外ドメインの1へ融合される。

【0044】

全ての態様のうちの一実施態様において、クラスIのMHC分子の細胞外ドメインの3は第三のリンカーペプチドを介してジスルフィド結合ポリペプチドの一へ融合される。

20

【0045】

全ての態様のうちの一実施態様において、第一、第二、及び第三のリンカーペプチドは同一であるか又は異なる。

【0046】

全ての態様のうちの一実施態様において、第一リンカーペプチド、第二リンカーペプチド、及び第三リンカーペプチドはアミノ酸配列GS(配列番号12)、GGS(配列番号13)、GGGS(配列番号14)、GGGS(GGGS(配列番号15)、GGGS(GGGS(配列番号16)、GGGS(GGGS(GGGS(配列番号17)、GGGS(GGGS(GGGS(GGGS(配列番号18)、GGGS(配列番号19)、GGGS(GGGS(GGGS(配列番号20)、GGGS(GGGS(GGGS(GGGS(配列番号21)、GGGS(GGGS(GGGS(GGGS(配列番号22)、及びGGGS(GGGS(GGGS(GGGS(配列番号23)からお互いに独立して選択される。

30

【0047】

全ての態様のうちの一実施態様において、第一リンカーペプチドは配列番号21のアミノ酸配列を含む。

【0048】

全ての態様のうちの一実施態様において、第二リンカーペプチドは配列番号22のアミノ酸配列を含む。

【0049】

全ての態様のうちの一実施態様において、第三リンカーペプチドは配列番号12のアミノ酸配列を含む。

40

【0050】

全ての態様のうちの一実施態様において、抗体の重鎖ヒンジ領域のポリペプチドは、クラスIgG又はクラスIgEのヒト抗体の抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチドから選択される。

【0051】

全ての態様のうちの一実施態様において、抗体の重鎖ヒンジ領域のポリペプチドは、サブクラスIgG1、又はIgG2、又はIgG3、又はIgG4のヒト抗体の抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチドから選択される。

50

## 【0052】

全ての態様のうちの一実施態様において、抗体の重鎖ヒンジ領域のポリペプチドは、E P K S C D K T H T C P P C P (配列番号24)、E P K S A D K T H T C P P C P (配列番号25)、E R K C C V E C P P C P (配列番号26)、E R K C A V E C P P C P (配列番号27)、E R K A C V E C P P C P (配列番号28)、E L K T P L G D T T H T C P R C P (E P K S C D T P P P C P R C P)<sub>3</sub> (配列番号29)、E S K Y G P P C P S C P (配列番号30)、D K T H T C P P C P (配列番号47)、V E C P P C P (配列番号48)、A V E C P P C P (配列番号49)、D T T H T C P R C P (配列番号50)、又はP P C P S C P (配列番号51)のアミノ酸配列を含む又はからなる。

## 【0053】

全ての態様のうちの一実施態様において、第一ジスルフィド結合ポリペプチド及び/又は第二ジスルフィド結合ポリペプチドは、ヒト起源のC H 2 ドメイン及び/又はC H 3 ドメインを含む。一実施態様において、ヒト起源のC H 2 ドメイン及びC H 3 ドメインはクラスI g G 又はI g E のヒト抗体のものである。一実施態様において、C H 2 ドメイン及びC H 3 ドメインは、サブクラスI g G 1、又はI g G 2、又はI g G 3、又はI g G 4 のヒト抗体のものである。一実施態様において、C H 3 ドメインは配列番号31のアミノ酸配列を含む。一実施態様において、C H 2 ドメインは、サブクラスI g G 1 又はI g G 2 のヒト抗体のものであり、そしてE 2 3 3、L 2 3 4、L 2 3 5、G 2 3 6、D 2 6 5、D 2 7 0、N 2 9 7、E 3 1 8、K 3 2 0、K 3 2 2、A 3 2 7、P 3 2 9、A 3 3 0、及び/又はP 3 3 1において少なくとも一の変異を含む (K a b a t のE U インデックスに従った番号付け)。一実施態様において、C H 2 ドメインは、変異L 2 3 4 A 及びL 2 3 5 A、及び/又は変異D 2 6 5 A 及びN 2 9 7 A を有するヒトサブクラスI g G 2 又はサブクラスI g G 1 のヒト抗体のものであり、及び/又はP V A 2 3 6 変異を含み、及び/又は変異P 3 2 9 G を含む。一実施態様において、C H 2 ドメインは変異L 2 3 4 A 及びL 2 3 5 A 及び/又はP 3 2 9 G を有するサブクラスI g G 1 のヒト抗体のものである。一実施態様において、C H 2 ドメインはS 2 2 8 P 及び/又はL 2 3 5 E を有するサブクラスI g G 4 のヒト抗体のものである。一実施態様において、C H 2 ドメインは配列番号32又は配列番号33のアミノ酸配列を含む。一実施態様において、C H 3 ドメインは配列番号34のアミノ酸配列を含む。

## 【0054】

全ての態様のうちの一実施態様において、第一ジスルフィド結合ポリペプチドは配列番号35のアミノ酸配列を含み、第二ジスルフィド結合ポリペプチドは配列番号36のアミノ酸配列を含む。

## 【0055】

全ての態様のうちの一実施態様において、第一及び第二ジスルフィド結合ポリペプチドは配列番号37又は配列番号38のアミノ酸配列を含む。

## 【0056】

全ての態様のうちの一実施態様において、第一ジスルフィド結合ポリペプチド又は第二ジスルフィド結合ポリペプチドは配列番号37又は配列番号38のアミノ酸配列からなる。

## 【0057】

全ての態様のうちの一実施態様において、第一ジスルフィド結合ポリペプチドは配列番号39のアミノ酸配列を含み、第二ジスルフィド結合ポリペプチドは、配列番号40のアミノ酸配列を含む。

## 【0058】

全ての態様のうちの一実施態様において、一以上のジスルフィド結合により連結されるポリペプチド鎖は、2つ又は3つ又は4つのジスルフィド結合により連結される。

## 【0059】

全ての態様のうちの一実施態様において、複合体は、融合ポリペプチドがNからC末端の方向に、

10

20

30

40

50

(i) 配列番号 01 から配列番号 09 を含む群から選択されるアミノ酸配列を有するウイルス由来ペプチド、

(ii) 配列番号 16、17、18、21、22、及び 23 を含む群から選択されるアミノ酸配列を有する第一リンカーペプチド、

(iii) 配列番号 10 のアミノ酸配列を有する又は 1 から 10 のアミノ酸の交換、付加、及び / 又は欠損を含むその変異体である 2-ミクログロブリン、

(iv) 配列番号 16、17、18、21、22、及び 23 を含む群から選択されるアミノ酸配列を有する第二リンカーペプチド、

(v) 配列番号 11 のアミノ酸配列を有する又は 1 から 10 のアミノ酸の交換、付加、及び / 又は欠損を含むその変異体であるクラス I の MHC 分子の細胞外ドメインの 1、2、及び 3、及び

(vi) 配列番号 12、16、17、18、21、22、及び 23 を含む群から選択されるアミノ酸配列を有する第三リンカーペプチド、  
を含むことを特徴とする。

#### 【0060】

全ての態様のうちの一実施態様において、第一ジスルフィド結合ポリペプチド及び第二ジスルフィド結合ポリペプチドは、

- 配列番号 31、32、及び 33 から選択されるアミノ酸配列を含むヒト IgG1 の CH2 ドメイン、及び

- 配列番号 34、35、及び 36 から選択されるアミノ酸配列を含むヒト IgG1 の CH3 ドメイン  
を更に含む。

#### 【0061】

全ての態様のうちの一実施態様において、複合体は、

- N から C 末端方向に、

(i) 配列番号 01 ~ 配列番号 09 から選択されるアミノ酸配列を有するウイルス由来ペプチド、

(ii) 配列番号 16、17、18、21、22、及び 23 から選択されるアミノ酸配列を有する第一リンカーペプチド、

(iii) 配列番号 10 のアミノ酸配列を有する又は 1 から 10 のアミノ酸の交換、付加、及び / 又は欠損を含むその変異体である 2-ミクログロブリン、

(iv) 配列番号 16、17、18、21、22、及び 23 から選択されるアミノ酸配列を有する第二リンカーペプチド、

(v) 配列番号 11 のアミノ酸配列を有する又は 1 から 10 のアミノ酸の交換、付加、及び / 又は欠損を含むその変異体であるクラス I の MHC 分子の細胞外ドメインの 1、2、及び 3、及び

(vi) 配列番号 12、16、17、18、21、22、及び 23 から選択されるアミノ酸配列を有する第三リンカーペプチド

を含む一の融合ポリペプチド

及び

- 一以上のジスルフィド結合により連結される 2 つのポリペプチド鎖であって、

第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖は N から C 末端方向に、

(i) 免疫グロブリン軽又は重鎖可変ドメイン、

(ii) 免疫グロブリン軽又は重鎖定常ドメイン、

(iii) 配列番号 24 から配列番号 30 及び配列番号 47 - 51 から選択されるアミノ酸配列を含む抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、

(iv) 配列番号 31、32、及び 33 から選択されるアミノ酸配列を含むヒト IgG1 の CH2 ドメイン、及び

(v) 配列番号 34、35、及び 36 から選択されるアミノ酸配列を含むヒト IgG1 の CH3 ドメイン

10

20

30

40

50

を含み

及び、第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖はNからC末端方向に、

(i) 配列番号24から配列番号30及び配列番号47-51から選択されるアミノ酸配列を含む抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、

(ii) 配列番号31、32、及び33から選択されるアミノ酸配列を含むヒトIgG1のCH2ドメイン、及び

(iii) 配列番号34、35、及び36から選択されるアミノ酸配列を含むヒトIgG1のCH3ドメイン

を含む2つのポリペプチド鎖

を含み、

10

ここで融合ポリペプチドは、

- 第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖のC末端又はN末端の何れかに対して共有結合されることを特徴とする。

#### 【0062】

全ての態様のうちの一実施態様において、第一及び第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖は同一抗体の重鎖ヒンジ領域ポリペプチドを含む。

#### 【0063】

全ての態様のうちの一実施態様において、ウイルス由来ペプチドは配列番号01のアミノ酸配列を含み、第一リンカーペプチドは配列番号21のアミノ酸配列を含み、第二リンカーペプチドは配列番号22のアミノ酸配列を含み、第三リンカーペプチドは配列番号12のアミノ酸配列を含み、ヒトIgG1のCH2ドメインは配列番号32又は33のアミノ酸配列を含み、及び一のジスルフィド結合ポリペプチドのヒトIgG1のCH3ドメインは配列番号35のアミノ酸配列を含み、そして他のジスルフィド結合ポリペプチドのヒトIgG1のCH3ドメインは配列番号36のアミノ酸配列を含む。

20

#### 【0064】

全ての態様のうちの一実施態様において、複合体は、

- NからC末端方向に、

(i) 配列番号01～配列番号09から選択されるアミノ酸配列を有するウイルス由来ペプチド、

30

(ii) 配列番号16、17、18、21、22、及び23から選択されるアミノ酸配列を有する第一リンカーペプチド、

(iii) 配列番号10のアミノ酸配列を有する又は1から10のアミノ酸の交換、付加、及び/又は欠損を含むその変異体である2-ミクログロブリン、

(iv) 配列番号16、17、18、21、22、及び23から選択されるアミノ酸配列を有する第二リンカーペプチド、

(v) 配列番号11のアミノ酸配列を有する又は1から10のアミノ酸の交換、付加、及び/又は欠損を含むその変異体であるクラスIのMHC分子の細胞外ドメインの1、2、及び3、及び

(vi) 配列番号12、16、17、18、21、22、及び23から選択されるアミノ酸配列を有する第三リンカーペプチド

40

を含む一の融合ポリペプチド、

及び

- 一以上のジスルフィド結合により連結される2つのポリペプチド鎖であって、ここで第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖はNからC末端方向に、

(i) 免疫グロブリン軽又は重鎖可変ドメイン、

(ii) 免疫グロブリン軽又は重鎖定常ドメイン、

(iii) 配列番号24から配列番号30及び配列番号47-51から選択されるアミノ酸配列を含む抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、

(iv) 配列番号31、32、及び33から選択されるアミノ酸配列を含むヒトI

50

g G 1 の C H 2 ドメイン、及び

( v ) 配列番号 3 4 、 3 5 、及び 3 6 から選択されるアミノ酸配列を含むヒト I g G 1 の C H 3 ドメイン

を含み

及び第二ジスルフィド結合ポリペプチドは、配列番号 2 4 から配列番号 3 0 及び配列番号 4 7 - 5 1 から選択されるアミノ酸配列を含む抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチドを含む 2 つのポリペプチド鎖

を含み、

ここで融合ポリペプチドは、

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の C 末端又は N 末端の何れかに対して共有結合し、又は 10

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖可変ドメインである抗体の可変ドメインの N 末端に共有結合し、又は、

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖定常ドメインである抗体の定常ドメインの C 末端に共有結合することを特徴とする。

#### 【 0 0 6 5 】

全ての態様のうちの一実施態様において、ウイルス由来ペプチドは配列番号 0 1 のアミノ酸配列を含み、第一リンカーペプチドは配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含み、第二リンカーペプチドは配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含み、第三リンカーペプチドは配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含み、ヒト I g G 1 の C H 2 ドメインは配列番号 3 2 又は 3 3 のアミノ酸配列を含み、及び一のジスルフィド結合ポリペプチドのヒト I g G 1 の C H 3 ドメインは配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含み、そして他のジスルフィド結合ポリペプチドのヒト I g G 1 の C H 3 ドメインは配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む。 20

#### 【 0 0 6 6 】

全ての態様のうちの一実施態様において、複合体は、

- N から C 末端方向に、

( i ) 配列番号 0 1 ~ 配列番号 0 9 から選択されるアミノ酸配列を有するウイルス由来ペプチド、

( i i ) 配列番号 1 6 、 1 7 、 1 8 、 2 1 、 2 2 、及び 2 3 から選択されるアミノ酸配列を有する第一リンカーペプチド、 30

( i i i ) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する又は 1 から 1 0 のアミノ酸の交換、付加、及び / 又は欠損を含むその変異体である 2 - ミクログロブリン、

( i v ) 配列番号 1 6 、 1 7 、 1 8 、 2 1 、 2 2 、及び 2 3 から選択されるアミノ酸配列を有する第二リンカーペプチド、

( v ) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有する又は 1 から 1 0 のアミノ酸の交換、付加、及び / 又は欠損を含むその変異体であるクラス I の M H C 分子の細胞外ドメインの 1 、 2 、及び 3 、及び

( v i ) 配列番号 1 2 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 2 1 、 2 2 、及び 2 3 から選択されるアミノ酸配列を有する第三リンカーペプチド 40

を含む一の融合ポリペプチド、

及び

- 一以上のジスルフィド結合により連結される 2 つのポリペプチド鎖であって、ここで、第一及び第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の各々は N から C 末端方向に、

( i ) 免疫グロブリン軽又は重鎖可変ドメイン、

( i i ) 免疫グロブリン軽又は重鎖定常ドメイン、

( i i i ) 配列番号 2 4 から配列番号 3 0 及び配列番号 4 7 - 5 1 から選択されるアミノ酸配列を含む抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、

( i v ) 配列番号 3 1 、 3 2 、及び 3 3 から選択されるアミノ酸配列を含むヒト I 50

g G 1 の C H 2 ドメイン、及び

(v) 配列番号 34、35、及び 36 から選択されるアミノ酸配列を含むヒト Ig G 1 の C H 3 ドメインを含む 2 つのポリペプチド鎖を含み、

ここで融合ポリペプチドは、

- 第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の C 末端又は N 末端の何れかに対して共有結合し、又は

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖可変ドメインである抗体の可変ドメインの N 末端に共有結合し、又は、

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖定常ドメインである抗体の定常ドメインの C 末端に共有結合することを特徴とする。

#### 【0067】

全ての態様のうちの一実施態様において、ウイルス由来ペプチドは配列番号 01 のアミノ酸配列を含み、第一リンカーペプチドは配列番号 21 のアミノ酸配列を含み、第二リンカーペプチドは配列番号 22 のアミノ酸配列を含み、第三リンカーペプチドは配列番号 12 のアミノ酸配列を含み、ヒト Ig G 1 の C H 2 ドメインは配列番号 32 又は 33 のアミノ酸配列を含み、及び一のジスルフィド結合ポリペプチドのヒト Ig G 1 の C H 3 ドメインは配列番号 35 のアミノ酸配列を含み、そして他のジスルフィド結合ポリペプチドのヒト Ig G 1 の C H 3 ドメインは配列番号 36 のアミノ酸配列を含む。

#### 【0068】

全ての態様のうちの一実施態様において、

- 第一リンカーペプチドは配列番号 21 のアミノ酸配列を含み、及び / 又は

- 第二リンカーペプチドは配列番号 22 のアミノ酸配列を含み、及び / 又は

- 第三リンカーペプチドは配列番号 12 のアミノ酸配列を含み、及び / 又は

ヒト Ig G 1 の C H 3 ドメインは配列番号 32 又は 33 のアミノ酸配列を含み、及び / 又は

- 一のジスルフィド結合ポリペプチドのヒト Ig G 1 の C H 3 ドメインは配列番号 35 のアミノ酸配列を含み、他のジスルフィド結合ポリペプチドのヒト Ig G 1 の C H 3 ドメインは配列番号 36 のアミノ酸配列を含む。

#### 【0069】

全ての態様のうちの一実施態様において、ウイルス由来ペプチドは、配列番号 01 から配列番号 09、配列番号 52 から配列番号 112 を含む群から選択され又は 1 から 3 のアミノ酸の交換、付加、及び / 又は欠損を含むそれらの変異体である。

#### 【0070】

本明細書に報告される一態様は、本明細書に報告される複合体をコードする核酸である。

一実施態様において、核酸は、異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする構造遺伝子を含む二から四の発現カセットを含む。

#### 【0071】

本明細書に報告される一態様は、本明細書に報告される核酸を含む宿主細胞である。

本明細書に報告される一態様は、複合体が生成されるように本明細書に報告される宿主細胞を培養することを含む、本明細書に報告される複合体を生成する方法である。

#### 【0072】

一実施態様において、複合体は細胞又は培養培地から回収され、それにより複合体が生成される。

#### 【0073】

本明細書に報告される一態様は、本明細書に報告される複合体を含むイムノコンジュゲート及び細胞障害剤である。

#### 【0074】

10

20

30

40

50

本明細書に報告される一態様は、本明細書に報告される複合体、及び任意で薬学的に許容される担体を含む薬学的製剤である。

【0075】

一実施態様において、薬学的製剤は追加の治療薬を更に含む。

【0076】

本明細書に報告される一態様は、医薬として使用のための本明細書に報告される複合体である。

【0077】

本明細書に報告される一態様は、癌又は慢性ウイルス感染の治療に使用するための本明細書に報告される複合体である。

10

【0078】

本明細書に報告される一態様は、標的に対して個体のウイルス特異的細胞傷害性T細胞を誘引することに使用するための本明細書に報告される複合体である。

【0079】

本明細書に報告される一態様は、癌細胞又はウイルス感染細胞の除去に使用するための本明細書に報告される複合体である。

【0080】

本明細書に報告される一態様は、医薬の製造における本明細書に報告される複合体の使用である。

【0081】

20

一実施態様において、医薬は癌又は慢性ウイルス感染の治療のためである。

【0082】

一実施態様において、医薬は標的に対する個体のウイルス特異的細胞傷害性T細胞の誘引のためである。

【0083】

一実施態様において、医薬は癌細胞又はウイルス感染細胞の除去のためである。

【0084】

本明細書に報告される一態様は、本明細書に報告される複合体の有効量を個体に投与することを含む、癌又は慢性ウイルス感染を有する個体を治療する方法である。

【0085】

30

一実施態様において、本方法は個体に追加の治療薬を投与することを更に含む。

【0086】

本明細書に報告される一態様は、標的に対して個体のウイルス特異的細胞傷害性T細胞を誘引するために、本明細書に報告される複合体の有効量を個体に投与することを含む、個体における標的に対して個体のウイルス特異的細胞障害性T細胞を誘引する方法である。

【0087】

本明細書に報告される一態様は、癌細胞又はウイルス感染細胞を除去／分解するために、本明細書に報告されるように複合体の有効量を個体に投与することを含む、個体において癌細胞又はウイルス感染細胞を除去する方法である。

40

【0088】

発明の詳細な説明

【図面の簡単な説明】

【0089】

【図1】本明細書に報告される複合体の注釈付きの図解

【図2】本明細書に報告される複合体に含まれる典型的なポリペプチド：融合ポリペプチドは、ポリペプチドを含む抗体軽鎖又は抗体重鎖のヒンジ領域の何れかに対してN末端が融合していた。

【図3】対応する発現プラスミドでトランスフェクトしたHEK293細胞の細胞培養上清のSDSポリアクリラミドゲルのウエスタンプロット。染色は、ペルオキシダーゼ結

50

合ポリクローナルウサギ抗ヒト 軽鎖抗体及び西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートしたポリクローナルウサギ抗ヒト Ig G 抗体を用いて実施した。レーン：1：二腕のペプチド - 2 - ミクログロブリン - HLA - A 0 2 0 1 - Ig G - Fc ; 2 : 一腕のペプチド - 2 - ミクログロブリン - HLA - A 0 2 0 1 - Ig G - Fc + Ig G - Fc ; 3 : 一腕のペプチド - 2 - ミクログロブリン - HLA - A 0 2 0 1 - Ig G - 重鎖 + Ig G - 軽鎖 + Ig G - Fc ; 4 : 一腕のペプチド - 2 - ミクログロブリン - HLA - A 0 2 0 1 - Ig G - 重鎖 + Ig G - 軽鎖 ; 5 : 二腕の 2 - ミクログロブリン - HLA - A 0 2 0 1 - Ig G - 軽鎖 + Ig G - 重鎖 ; 6 : 二腕のペプチド - 2 - ミクログロブリン - HLA - A 0 2 0 1 - Ig G - 軽鎖 + Ig G - 重鎖 ; 7 : 二腕のペプチド - 2 - ミクログロブリン - HLA - A 0 2 0 1 - Ig G - 重鎖 + Ig G - 軽鎖 ; 8 : 二腕のペプチド - 2 - ミクログロブリン - HLA - A 0 2 0 1 - Ig G - Fc - sC Fv ; 9 : 一腕のペプチド - 2 - ミクログロブリン - HLA - A 0 2 0 1 - Ig G - Fc + 一腕の Ig G (重及び軽鎖) ; 10 : 分子量マーカー ; 11 : 参照の標準 Ig G 1 抗体。

【図4】特異的ペプチドを用いたインビトロの刺激の前後で異なるドナー由来のCMV特異的細胞溶解性T細胞の数を決定するためのフローサイトメトリー分析：4人のヒトドナー由来末梢血リンパ球（PBL）の分析；Pro5ペンタマーAPC（ProImmune, カタログ番号F008-4A-E）と組み合わされたFITC標識染色にコンジュゲートした抗CD8抗体（BD, カタログ番号345772）は、CMV由来ペプチド（NLVPMVATV, か配列番号01）を負荷された、TCRを認識するMHCクラスI（HLA-A\*0201）を染色した；丸：CMV - 特異的CD8<sup>+</sup> - T細胞。

【図5】CMVペプチドを負荷されたMN60腫瘍細胞の溶解を介する刺激されたCTLの細胞溶解能力を分析するためのフローサイトメトリー分析。

【図6】CMVパルス化T細胞のT細胞特異的除去。エフェクター対標的細胞の比率に依存する、CMVペプチドを負荷されたMN60腫瘍細胞の溶解を介する刺激されたCTLの細胞溶解能力を分析するためのフローサイトメトリー分析；黒：CMV - ペプチドを負荷されたMN60細胞、白：CMV - ペプチドを負荷されていないMN60細胞。

【図7】A : クーマシー染色によるSDS-PAGEゲル：レーン1：分子量の標準、レーン2：非還元条件 - HLA - A 0 2 0 1 - Ig G - Fc + 一腕のIg G複合体（重及び軽鎖），非還元条件；レーン3：非還元条件 - HLA - A 0 2 0 1 - Ig G - Fc + 一腕のIg G複合体（重及び軽鎖），還元条件。B : サイズ排除クロマトグラフィーのクロマトグラム；1：高分子量型（0.7面積%）、2：単量体複合体（99.3面積%）。

【図8】A : マーシー染色によるSDS-PAGEゲル：レーン1：分子量の標準、レーン2：一腕のペプチド - 2 - ミクログロブリン - HLA - A 0 2 0 1 - Ig G - 重鎖 + Ig G - 軽鎖 + Ig G - Fc複合体、非還元条件；レーン3：一腕のペプチド - 2 - ミクログロブリン - HLA - A 0 2 0 1 - Ig G - 重鎖 + Ig G - 軽鎖 + Ig G - Fc複合体、還元条件。B : サイズ排除クロマトグラフィーのクロマトグラム；1：高分子量型（1.8面積%）、2：単量体複合体（98.2面積%）。

【図9】FACSを用いたヒトIGF-1R陽性細胞株に対する本明細書に報告される複合体の結合の分析；1：一腕のペプチド - 2 - ミクログロブリン - HLA - A 0 2 0 1 - Ig G - 重鎖 + Ig G - 軽鎖 + Ig G - Fc複合体、染色されず；2：一腕のペプチド - 2 - ミクログロブリン - HLA - A 0 2 0 1 - Ig G - 重鎖 + Ig G - 軽鎖 + Ig G - Fc複合体により4でインキュベートされたH460M2細胞、蛍光標識された抗<ヒトIgG>抗体により染色；3：一腕のペプチド - 2 - ミクログロブリン - HLA - A 0 2 0 1 - Ig G - 重鎖 + Ig G - 軽鎖 + Ig G - Fc複合体により37でインキュベートされたH460M2細胞、蛍光標識された抗<ヒトIgG>抗体により染色；4：一腕のペプチド - 2 - ミクログロブリン - HLA - A 0 2 0 1 - Ig G - 重鎖 + Ig G - 軽鎖 + Ig G - Fc複合体によりインキュベートされたH460M2細胞、蛍光標識された対照抗体（抗DIG抗体）により染色；5：蛍光標識された抗ヒトIgG抗体により染色されたH460M2細胞；6：蛍光標識された抗ヒトIGF-1R抗体により染色

された H 4 6 0 M 2 細胞。

【図 10】ヒト I G F - 1 R を発現する I 2 4 3 T 3 細胞（大きく粘着性に増殖している細胞、白い矢印）の溶解を媒介する、本明細書に報告される抗原結合複合体の顕微鏡像。溶解は、ヒト M V 特異的 T 細胞によって媒介される（各円形の小細胞、白矢印、又はアメーバ状に移行する細胞、黒い矢印）。

【図 11】ヒト C M V 特異的 T 細胞（各円形の小細胞、白矢印、又はアメーバ状に移行する細胞、黒い矢印）とともにインキュベートされた I 2 4 3 T 3 細胞（大きく粘着性に増殖している細胞、白い矢印）の顕微鏡像。

【図 12】細胞毒性アッセイ：本明細書で報告されるように、抗原結合複合体は、ヒト C M V 特異的 T 細胞を通じて H 4 6 0 M 2 腫瘍細胞の溶解を動作させる。a) (6 時間) 標的細胞：C M V - 特異的エフェクター T 細胞 1 : 1 . 5 ; b) (6 時間) 標的細胞：C M V - 特異的エフェクター T 細胞 1 : 0 . 7 5 ; c) (6 時間) 標的細胞：C M V - 特異的エフェクター T 細胞 1 : 0 . 5 ; 左の棒：本明細書で報告される複合体；右の棒 M A B I G F - 1 R - アフコシル化型。 10

【図 13】細胞毒性アッセイ：本明細書で報告されるように、抗原結合複合体は、ヒト C M V 特異的 T 細胞を通じて I 2 4 3 T 3 腫瘍細胞の溶解を動作させる。a) (9 時間) 標的細胞：C M V - 特異的エフェクター T 細胞 1 : 1 . 5 ; b) (9 時間) 標的細胞：C M V - 特異的エフェクター T 細胞 1 : 0 . 7 5 ; c) (9 時間) 標的細胞：C M V - 特異的エフェクター T 細胞 1 : 0 . 5 ; 左の棒：本明細書で報告される複合体；中央の棒：M A B I G F - 1 R - a f u ; 右の棒：M A B e d ; 右の棒：抗ジゴキシゲニン抗体。 20

【図 14】抗 I G F - 1 R 抗体及び本明細書に報告される複合体の肺腺癌細胞株 H 4 6 0 M 2 に対する結合の F A C S 分析；a) 二次抗体のみ（ヤギ抗ヒト I g G (H + L) (Jackson Laboratories, カタログ # 109 - 116 - 088)）；b) 融合ポリペプチドが、可変ドメインのただ一つの対を含む抗 I G F - 1 R 抗体の重鎖の N 末端に融合されている本明細書に報告される複合体；c) 抗 I G F - 1 R 抗体。

【図 15】本明細書に報告される異なる複合体のインビトロ有効性及び特異性（細胞毒性試験）；a) 一価抗 I G F 1 R 抗体および C M V 由来ペプチドを含む複合体；b) 一価の抗 I G F 1 R 抗体及び E B V 由来ペプチド（対照）を含む複合体；c) 二価の抗 I G F 1 R 抗体及び C M V 由来ペプチドを含む複合体；d) 抗 I G F - 1 R 抗体（対照）；e) 抗ジゴキシゲニン抗体（対照）。 30

【図 16】融合ポリペプチドは、標的 (T) 対エフェクター (E) 細胞の異なる比率で特定された完全な抗 I G F - 1 R 抗体の重鎖の N 末端に融合されていることを特徴とする、本明細書に報告されるような複合体のインビトロ有効性及び特異性 (E C 5 0 の値)。

【図 17】a) 一価の抗 I G F 1 R 抗体と C M V 由来ペプチドを含む融合ポリペプチドを含む複合体及び b) 抗 I G F - 1 R 抗体とともに、標的対エフェクター細胞の比率を 1 : 1 . 5 で、6 時間インキュベートした後の標的細胞の溶解。

#### 【0090】

##### 配列の簡単な説明

配列番号 0 1 ヒトヒトサイトメガロウイルス由来ペプチド。

配列番号 0 2 ヒト免疫不全ウイルス由来ペプチド。

配列番号 0 3 ヒトヘルペスウイルス 4 由来ペプチド。

配列番号 0 4 インフルエンザ A 型ウイルス由来ペプチド。

配列番号 0 5 B 型肝炎ウイルス由来ペプチド。

配列番号 0 6 ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型由来ペプチド。

配列番号 0 7 V - j u n 肉腫ウイルス 1 7 癌遺伝子ホモログ (J U N) 由来ペプチド。

。

配列番号 0 8 ヒトアデノウイルス 3 型由来ペプチド。

配列番号 0 9 C 型肝炎ウイルス由来ペプチド。

配列番号 1 0 ヒト 2 - ミクログロブリンアミノ酸配列。

配列番号 1 1 ヒト H L A - A \* 0 2 0 1 1 - 3 鎖のアミノ酸配列。 50

- 配列番号 12 - 23 リンカーペプチドのアミノ酸配列。
- 配列番号 24 ヒト Ig G 1 重鎖ヒンジポリペプチドのアミノ酸配列。
- 配列番号 25 ヒト Ig G 1 重鎖ヒンジ変異体ポリペプチドのアミノ酸配列。
- 配列番号 26 ヒト Ig G 2 重鎖ヒンジポリペプチドのアミノ酸配列。
- 配列番号 27 ヒト Ig G 2 重鎖ヒンジ変異体ポリペプチドのアミノ酸配列。
- 配列番号 28 ヒト Ig G 2 重鎖ヒンジ変異体ポリペプチドのアミノ酸配列。
- 配列番号 29 ヒト Ig G 3 重鎖ヒンジポリペプチドのアミノ酸配列。
- 配列番号 30 ヒト Ig G 4 重鎖ヒンジポリペプチドのアミノ酸配列。
- 配列番号 31 ヒト Ig G 1 の CH2 ドメインのアミノ酸配列。
- 配列番号 32 ヒト Ig G 1 の CH2 ドメインの L 234A、L 235A 変異体のアミノ酸配列。 10
- 配列番号 33 ヒト Ig G 1 の CH2 ドメインの L 234A、L 235A、P 329G のアミノ酸配列。
- 配列番号 34 ヒト Ig G 1 の CH3 ドメインのアミノ酸配列。
- 配列番号 35 ヒト Ig G 1 の CH3 ドメインのノブ変異体のアミノ酸配列。
- 配列番号 36 ヒト Ig G 1 の CH3 ドメインのホール変異体のアミノ酸配列。
- 配列番号 37 ヒト Ig G 1 の Fc 領域のアミノ酸配列。
- 配列番号 38 ヒト Ig G 1 の Fc 領域の L 234A、L 235A 変異体のアミノ酸配列。 20
- 配列番号 39 ヒト Ig G 1 の Fc 領域の L 234A、L 235A 変異体及びホール変異体のアミノ酸配列。
- 配列番号 40 ヒト Ig G 1 の Fc 領域の L 234A、L 235A 変異体及びノブ変異体のアミノ酸配列。
- 配列番号 41 ヒト化抗 IgF - 1R モノクローナル軽鎖抗体のアミノ酸配列 (カッパ)。
- 配列番号 42 ヒト化抗 IgF - 1R モノクローナル重鎖抗体のアミノ酸配列 (Ig G 1 の L 234A、L 235A 変異体)。
- 配列番号 43 ヒト化抗 IgF - 1R モノクローナル重鎖抗体のアミノ酸配列 (Ig G 1 の L 234A、L 235A 変異体及びノブ変異体)。
- 配列番号 44 ヒト化抗 IgF - 1R モノクローナル重鎖抗体のアミノ酸配列 (Ig G 1 の L 234A、L 235A 変異体及びホール変異体)。 30
- 配列番号 45 ヒト Ig G 1 の Fc 領域変異体ヒンジ領域及び L 234A、L 235A 変異体及びノブ変異体。
- 配列番号 46 ヒト化抗 IgF - 1R モノクローナル抗体のジスルフィド安定化一本鎖 Fv。
- 配列番号 47 - 51 短縮されたヒト抗体の重鎖ヒンジポリペプチドのアミノ酸配列。
- 配列番号 52 - 66 デングウイルス由来ペプチド。
- 配列番号 67 - 112 ヒトヒトサイトメガロウイルス由来ペプチド。

## 【0091】

I . 定義 40

「親和性」とは、分子(例えば、抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば、抗原)との間の非共有結合相互作用の総和の強度を指す。本明細書で使用する場合、特に断らない限り、「結合親和性」は、結合対(例えば、抗体と抗原)のメンバー間の1:1の相互作用を反映している本質的な結合親和性を指す。そのパートナーYに対する分子Xの親和性は、一般的に解離定数( $K_d$ )で表すことができる。親和性は、本明細書に記載したものを含む、当技術分野で知られている一般的な方法によって測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な例示であって典型的な実施態様は、以下で説明される。

## 【0092】

この出願で用いられる用語「アミノ酸」は、カルボキシ - アミノ酸の基を表し、それ 50

は直接的に又は前駆体の形態で、核酸によってコードされ得る。個々のアミノ酸は、コドン又は塩基トリプレットと呼ばれる3つのスクレオチドからなる核酸によってコードされる。各アミノ酸は、少なくとも一つのコドンによってコードされる。これは、「遺伝コードの縮重」として知られている。用語「アミノ酸」は、本出願で使用される場合、アラニン(3文字コード: a l a、1文字コード: A)、アルギニン( a r g、R)、アスパラギン( a s n、N)、アスパラギン酸( a s p、D)、システイン( c y s、C)、グルタミン( g l n、Q)、グルタミン酸( g l u、E)、グリシン( g l y、G)、ヒスチジン( h i s、H)、イソロイシン( i l e、I)、ロイシン( l e u、L)、リジン( l y s、K)、メチオニン( m e t、M)、フェニルアラニン( p h e、F)、プロリン( p r o、P)、セリン( s e r、S)、スレオニン( t h r、T)、トリプトファン( t r p、W)、チロシン( t y r、Y)、及びバリン( v a l、V)を含む天然に生じるカルボキシ-アミノ酸の群を示す。

#### 【0093】

用語「抗標的抗体」及び「標的に結合する抗体」は、抗体が、標的を標的とすることにおいて、診断薬剤及び/又は治療的薬剤として有用であるように、十分な親和性で標的に結合することができる抗体を指す。所定の実施態様において、標的へ結合する抗体は、解離定数( $K_d$ )が、 $10 \text{ nM}$ 、 $1 \text{ nM}$ 、 $0.1 \text{ nM}$ 、 $0.01 \text{ nM}$ 、又は $0.001 \text{ nM}$ (例えば、 $10^{-8} \text{ M}$ 未満、例えば、 $10^{-8} \text{ M}$ から $10^{-13} \text{ M}$ 、例えば、 $10^{-9} \text{ M}$ から $10^{-13} \text{ M}$ )。

#### 【0094】

用語「抗体」は最も広い意味で用いられ、様々な抗体構造を包含し、限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体(例えば二重特異性抗体)、及び、所望の抗原結合活性を示す限り、抗体断片を含む。

#### 【0095】

「抗体断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原を結合するインタクトな抗体の一部を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、限定されないが、 $F_v$ 、 $Fab$ 、 $Fab'$ 、 $Fab' - SH$ は、 $F(ab')_2$ 、ダイアボディ、直鎖状抗体、単鎖抗体分子(例えば $scF_v$ )、單一ドメイン抗体、及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

#### 【0096】

抗体の「クラス」は、その重鎖が保有する定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。抗体の5つの主要なクラスがあり： $IgA$ 、 $IgD$ 、 $IgE$ 、 $IgG$ 及び $IgM$ 、及びこれらの幾つかは、例えば、 $IgG1$ で、 $IgG2$ 、 $IgG3$ 、 $IgG4$ 、 $IgA1$ 、及び $IgA2$ などのサブクラス(アイソタイプ)に更に分割されてもよい。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、及び $\mu$ と呼ばれる。

#### 【0097】

用語「～の相対頻度を有するクラスIのMHC分子」とは、個別のクラスIのMHC分子が、ヒトの特定の集団において又は所与の相対頻度を持つ全てのヒトのなかで出現の頻度を有することを意味する。これが特定の集団、例えばヨーロッパ起源の全ヒトの27.2%の全てのヒトのうち10%以上に見いだすことができる10%以上の相対頻度を有するクラスIのMHC分子である。

#### 【0098】

複合体のそのコンジュゲーションパートナーへの「コンジュゲーション」は、異なる方法により、例えば化学結合、又は特定の結合対を介した結合により形成することができる。用語「コンジュゲーションパートナー」は、例えば、ポリペプチド、検出可能な標識、特異的結合対のメンバーを意味する。一実施態様において、コンジュゲーションパートナーへの複合体のコンジュゲーションは、N末端基、及び/又はアミノ基(リジン)、別のリジンのアミノ基、複合体の一部分のアミノ酸配列のカルボキシ-、スルフヒドリル-、ヒドロキシル-、及び/又はフェノール官能基、及び/又は複合体の糖鎖構造の糖ア

10

20

30

40

50

ルコール基を介する化学結合により行われる。一実施態様において、複合体は特定の結合対を介してそのコンジュゲーションパートナーへコンジュゲートする。

#### 【0099】

本明細書で用いられる「細胞傷害性薬物」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び／又は細胞死又は破壊を生ずる物質を指す。細胞傷害性薬物は、限定されないが、放射性同位体（例えば、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 及び $^{173}\text{Lu}$ の放射性同位体）：化学療法剤又は薬物（例えば、メトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンプラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシリ、ダウノルビシン又は他の挿入剤）；成長阻害剤、酵素及びその断片、例えば核酸分解酵素など；抗生物質；小分子毒素などの毒素、又は細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素（それらの断片及び／又はその変異体を含む）；及び様々な抗腫瘍剤又は抗癌剤を包含する。

#### 【0100】

色原体（蛍光性又は発光性の基及び色素）、酵素、NMR活性基又は金属粒子、ハプテン、例えばジゴキシゲニンは、「検出可能な標識」の例である。検出可能な標識は、光活性化可能な架橋基、例えばアジド又はアジリン基などであってもよい。電気化学発光により検出できる金属キレートはまた、適切なシグナル放出基であり、ルテニウムキレート、例えばルテニウム（ビスピリジル） $^{2+}$ キレートに対して特に興味がある。適切なルテニウム標識基は、例えば、欧州特許第0580979号、国際公開第90/05301号、国際公開第90/11511号、及び国際公開第92/14138号に記述されている。直接検出のため、標識基は、任意の公知の検出可能なマーカー基、例えば染料、例えばアクリジニウムエステル又はジオキセタンなど化学発光基などの発光標識基、又は蛍光染料、例えばフルオレセイン、クマリン、ローダミン、オキサジン、レゾルフィン、シアニンお及びその誘導体から選択することができる。標識基の他の例は、例えば、ルテニウム錯体又はユーロピウム錯体などの発光金属錯体、例えばELISA用又はCEDIA用(Cloned Enzyme Donor Immunoassay、例えば、EP-A-0061888)に使用される酵素、及び放射性同位元素である。

#### 【0101】

「エフェクター機能」とは、抗体のアイソタイプにより変わる、抗体のFc領域に起因する生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合及び補体依存性細胞傷害(CDC)、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)、貪食、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）のダウンリギュレーション、及びB細胞の活性化を含む。

#### 【0102】

薬剤、例えば、薬学的製剤の「有効量」とは、所望の治療的又予防的結果を達成するために必要な用量及び期間での、有効な量を指す。

#### 【0103】

用語「発現」は、本明細書で使用される場合、細胞内で生じる転写及び／又は翻訳及び分泌のプロセスを指す。細胞中の目的の核酸配列の転写レベルは、細胞内に存在する対応するmRNAの量に基づいて決定することができる。例えば、目的の配列から転写されるmRNAは、RT-PCRによって、又はノーザンハイブリダイゼーションによって定量することができる(Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)を参照)。核酸によってコードされるポリペプチドは、例えばELISAなど種々の方法によって、ポリペプチドの生物学的活性についてアッセイすることによって、又は、ポリペプチドを認識し結合する免疫グロブリンを使用するウェスタンプロッティング又はラジオイムノアッセイなど、そのような活性とは無関係であるアッセイを用いることにより定量することができる(Sambrook, et al., (1989)、前記を参照)。

#### 【0104】

10

20

30

40

50

「発現カセット」は、細胞中に少なくとも含有される核酸の発現のために、プロモーターやポリアデニル化部位など必要な調節エレメントが含まれるコンストラクトを意味する。

【0105】

用語「発現機構」は、核酸又は遺伝子の転写工程（すなわち、「遺伝子発現機構」ともいう）から始まり、核酸によってコードされるポリペプチドの翻訳後修飾までの工程に関与している細胞の酵素、補因子などの総和を意味する。発現機構は、例えば、DNAのプレmRNAへの転写の工程、成熟mRNAへのプレmRNAスプライシングの工程、mRNAのポリペプチドへの翻訳工程、及びポリペプチドの翻訳後修飾工程を含む。

【0106】

「発現プラスミド」は、宿主細胞中で構成される構造遺伝子の発現のための全ての必要な要素を提供する核酸である。典型的には、発現プラスミドは、例えば大腸菌用に、目的の構造遺伝子の発現のための、複製起点、及び選択可能なマーカー、真核生物の選択マーカー、及び、各々がプロモーター、構造遺伝子、及びポリアデニル化シグナルを含む転写ターミネーターを含む一又は複数の発現カセットを含む原核生物プラスミド増殖ユニットを含む。遺伝子発現は通常、プロモーターの制御下に置かれ、そのような構造遺伝子はプロモーターに「作動可能に連結された」と言われる。同様に、調節エレメントがコアプロモーターの活性を調節する場合、調節エレメント及びコアプロモーターは作動可能に連結されている。

【0107】

本明細書において用語「Fc領域」は、定常領域の少なくとも一部を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。本用語は、天然配列のFc領域及び変異体Fc-領域を含む。一実施態様において、ヒトIgG重鎖Fc領域はCys226又はPro230から重鎖のカルボキシル末端まで伸長する。しかし、Fc領域のC末端リジン(Lys447)は存在しているか、又は存在していない場合がある。本明細書に明記されていない限り、Fc領域又は定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242に記載されるように、EUインデックスとも呼ばれるEU番号付けシステムに従う。

【0108】

「Fc領域」はよく知られた用語であり、抗体の重鎖のパパイン切断に基づいて定義される。本明細書に報告される複合体は、一実施態様にて、抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチドとして、ヒトFc領域又はヒト起源由来のFc領域を含み得る。

【0109】

更なる実施態様において、Fc領域は、サブクラスIgG4のヒト抗体のFc領域又はサブクラスIgG1、IgG2、又はIgG3のヒト抗体のFc領域のいずれかであって、Fc受容体（例えばFcRIIIa）結合及び/又はC1q結合を全く検出することができないように改変されている。一実施態様において、Fc領域は、ヒトFc領域であり、特にヒトIgG4サブクラス由来又はヒトIgG1サブクラス由来の変異型Fc領域の何れかである。一実施態様において、Fc領域はL234A及びL235Aの変異を有するヒトIgG1サブクラスからのものである。IgG4はFc受容体（FcRIIIa）結合の減少を示すが、別のIgGサブクラスの抗体は強い結合を示す。しかしながら、Pro238、Asp265、Asp270、Asn297（Fc糖鎖の喪失）、Pro329、Leu234、Leu235、Gly236、Gly237、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434、又は/及びHis435は、変更される場合には、Fc受容体結合の減少も与える残基である(Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; EP 0307434)。一実施態様において、本明細書に報告される複合体は、L234、L235、

10

20

30

40

50

及び／又はD 2 6 5に変異を伴う、I g G 4サブクラス又はI g G 1又はI g G 2サブクラスのFのF c受容体結合に関し、及び／又はP V A 2 3 6変異を含む。一実施態様において、変異はS 2 2 8 P、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、L 2 3 5 E、及び／又はP V A 2 3 6である（P V A 2 3 6とは、I g G 1のアミノ酸位置の2 3 3から2 3 6由来のアミノ酸配列E L L G（一文字アミノ酸コードで与えられる）又はI g G 4のE F L GがP V Aで置換されることを意味する）。一実施態様において、変異はI g G 4のS 2 2 8 P、及びI g G 1のL 2 3 4 A及びL 2 3 5 Aである。抗体のF c領域は、A D C C（抗体依存性細胞媒介性細胞傷害）及びC D C（補体依存性細胞傷害）に直接関与している。F c受容体及び／又は補体因子C 1 qに結合しない複合体は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（A D C C）及び／又は補体依存性細胞傷害（C D C）を誘発しない。

10

#### 【0 1 1 0】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養」は互換的に使用され、外因性の核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫を含める。宿主細胞は、「形質転換体」及び「形質転換された細胞」を含み、継代の数に関係なく、それに由来する一次形質転換細胞及び子孫が含まれる。子孫は親細胞と核酸含量が完全に同一ではないかもしれないが、突然変異が含まれる場合がある。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能又は生物活性を有する変異型子孫が本明細書において含まれる。

#### 【0 1 1 1】

用語「細胞」は、プラスミドの増殖のために使用される原核細胞及び核酸の発現のために使用される真核細胞の両方を含む。一実施態様において、真核細胞は哺乳動物細胞である。一実施態様において、哺乳動物細胞は、C H O 細胞（例えばC H O K 1、C H O D G 4 4）、B H K 細胞、N S 0 細胞、S p 2 / 0 細胞、H E K 2 9 3 細胞、H E K 2 9 3 E B N A 細胞、P E R . C 6（登録商標）細胞、及びC O S 細胞を含む哺乳動物細胞の群から選択される。

20

#### 【0 1 1 2】

「ヒト抗体」は、ヒト又はヒト細胞により産生されるか、又はヒト抗体のレパートリー又は他のヒト抗体をコードする配列を利用した非ヒト起源に由来する抗体のそれに対応するアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に除外する。

30

#### 【0 1 1 3】

「イムノコンジュゲート」は、1つ以上の異種分子にコンジュゲートした本明細書に報告される複合体を意味し、限定されないが、細胞傷害性薬物を含む。

#### 【0 1 1 4】

「個体」又は「被検体」は、哺乳動物である。哺乳動物は、限定されないが、家畜動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマ）、靈長類（例えば、ヒト、サルなどの非ヒト靈長類）、ウサギ、げっ歯類（例えば、マウス及びラット）を含む。所定の実施態様において、個体又は被検体はヒトである。

#### 【0 1 1 5】

「単離された」複合体は、その自然環境の成分から分離されたものである。幾つかの実施態様において、複合体は、例えば、電気泳動（例えば、S D S - P A G E、等電点電気泳動（I E F）、キャピラリー電気泳動）又はクロマトグラフィー（例えば、イオン交換又は逆相H P L C）により決定されるように、9 5 %以上または9 9 %の純度に精製される。

40

「単離された」核酸は、その自然環境の成分から分離された核酸分子を指す。単離された核酸は、核酸分子を通常含む細胞に含まれる核酸分子を含むが、しかし、その核酸分子は、染色体外又はその自然の染色体上の位置とは異なる染色体位置に存在している。

#### 【0 1 1 6】

用語「一の融合ポリペプチド」は、定義される厳密に一の融合ポリペプチドを意味し、定義される更なる融合ポリペプチドの存在を排除する。用語「一」は「厳密に一」又は「

50

単一」を意味する。

【0117】

「作動可能に連結される」とは、2つ以上の構成要素の並置を意味し、そのように説明される構成要素は、それらの意図された様式で機能することを可能にする関係にある。例えば、プロモーター及び／又はエンハンサーは、連結された配列の転写を制御又は調節するためにそれがシスに作用した場合、コード配列に作動可能に連結される。一般に、必ずしもそうではないが、「作動可能に連結」されているDNA配列は連続しており、ここで、分泌リーダー及びポリペプチドなどの2つのタンパク質コード領域を連結するために必要である場合、連続しており（読み取り）フレーム内にある。しかし、作動可能に連結されたプロモーターは一般にコード配列の上流に位置しているものの、それは必ずしもそれと連続していない。エンハンサーは連続している必要はない。エンハンサーがコード配列の転写を増加させる場合、エンハンサーは、コード配列に作動可能に連結されている。作動可能に連結されたエンハンサーは、コード配列の上流、内部又は下流に、プロモーターからかなりの距離に位置することができる。ポリアデニル化部位は、それがコード配列の下流端に位置する場合、コード配列に作動可能に連結され、転写がコード配列を通じてポリアデニル化配列へと進行する。翻訳終止コドンは、それがコード配列の下流端（3'末端）に位置する場合、エキソンの核酸配列へ作動可能に連結され、コード配列を介して翻訳が終止コドンまで進みそこで終了する。連結は、当技術分野で公知の組換え方法によって、例えば、PCR方法論を使用して及び／又は都合のよい制限部位でのライゲーションにより達成される。都合のよい制限部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカー従来の慣例に従って使用される。

【0118】

用語「パッケージ挿入物」は、効能、用法、用量、投与、併用療法、禁忌についての情報、及び／又はそのような治療用製品の使用に関する警告を含む、治療用製品の商用パッケージに慣習的に含まれている説明書を指すために使用される。

【0119】

用語「ペプチドリンカー」は、天然及び／又は合成起源のアミノ酸配列を示す。それらは20の天然アミノ酸は単量体構成要素であることを特徴とする直鎖アミノ酸鎖から構成される。ペプチドリンカーは、1から50個のアミノ酸の長さを有し、一実施態様では1から28個のアミノ酸、更なる実施態様では2から25個のアミノ酸を有する。ペプチドリンカーは、反復アミノ酸配列又は天然に存在するポリペプチドの配列を含み得る。リンカーは、お互いにコンジュゲートしたポリペプチドが、該ポリペプチドが正しくフォールディングし適切に提示されることによりその生物学的活性を発揮することができることを確実にする機能を有する。一実施態様において、ペプチドリンカーは、グリシン、グルタミン、及び／又はセリン残基に富んでいる。これらの残基は、例えば最大5つのアミノ酸の小さな反復単位で、例えばGS（配列番号12）、GGS（配列番号13）、GGGS（配列番号14）、及びGGGS（配列番号19）で配列されている。この小さな反復単位は、1から5回反復することができる。多量体単位のアミノ末端及び／又はカルボキシ末端で、最大6つの付加的な任意の天然に存在するアミノ酸を加えることができる。他の合成ペプチドリンカーは、10から20回の間で反復される単一のアミノ酸で構成され、アミノ末端及び／又はカルボキシ末端に、最大6つの付加的な任意の天然に存在するアミノ酸を含み得る。全てのペプチドリンカーは、核酸分子によってコードされることができ、よって組換えにより発現させることができる。リンカーは、ペプチド自体であるので、リンカーによって連結されたポリペプチドは、二つのアミノ酸の間に形成されるペプチド結合を介してリンカーに連結されている。

【0120】

用語「薬学的製剤」は、その中に有効で含有される活性成分の生物学的活性を許容するような形態であって、製剤を投与する被検体にとって許容できない毒性である他の成分を含まない調製物を指す。

【0121】

10

20

30

40

50

「薬学的に許容される担体」は、被検体に非毒性であり、有効成分以外の製剤処方中の成分を指す。薬学的に許容される担体は、限定されないが、緩衝剤、賦形剤、安定剤、又は保存剤を含む。

【0122】

「ポリペプチド」は、天然又は合成で生成されるかによらず、ペプチド結合によって結合されるアミノ酸からなるポリマーである。約25アミノ酸残基未満のポリペプチドは「ペプチド」と呼ばれても良く、一方二以上のポリペプチドからなる、又は100アミノ酸残基を超える一のポリペプチドを含む分子は「タンパク質」と呼ぶことができる。ポリペプチドはまた、炭水化物基、金属イオン、又はカルボン酸エステルなどの非アミノ酸成分を含むことができる。非アミノ酸成分は、ポリペプチドが発現される細胞によって添加してもよく、細胞の種類によって異なり得る。ポリペプチドは、それらのアミノ酸骨格構造又はそれをコードする核酸の観点から本明細書において定義される。炭水化物基などの付加は、一般に特定されないが、それにもかかわらず存在することができる。

10

【0123】

「構造遺伝子」は、シグナル配列、即ちコード領域を含まない遺伝子の領域を示す。用語「T細胞応答誘発性ペプチド」は、クラスIのMHC複合体のペプチド結合溝に提示されるペプチドを意味し、メモリー又はエフェクターT細胞を循環させることによって認識される。ペプチドの認識によりこのようなペプチド-MHCクラスI複合体を提示する細胞の除去をもたらす免疫応答を生じる。

【0124】

20

本明細書で用いられるように、「治療」(及び「治療する(treat)」または「治療している(treating)」など文法上の変形)は、治療されている個体の自然経過を変えようと試みる臨床的介入を指し、予防のために、または臨床病理の過程においてのいずれかで実行できる。治療の望ましい効果は、限定されないが、疾患の発症又は再発を予防すること、症状の緩和、疾患の直接的または間接的な病理学的帰結の縮小、転移を予防すること、疾患の進行の速度を遅らせること、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善を含む。幾つかの実施態様において、本発明の抗体は、疾患の発症を遅延させるか又は疾患の進行を遅くするために使用される。

【0125】

30

用語「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗体の抗原への結合に関与する抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然型抗体の可変重鎖ドメイン及び軽鎖(それぞれVHおよびVL)は、4つの保存されたフレームワーク領域(FR)と3つの超可変領域(HVR)を含む各ドメインを持ち、一般的に似たような構造を有する。(例えば、Kindt, T.J., et al., Kuby Immunology、第6版、W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), 91頁)を参照)。単一のVH又はVLドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。更に、特定の抗原に結合する抗体は、相補的なVL又はVHドメインのそれぞれのライブラリーをスクリーニングするために、抗原に特異的に結合する抗体由来のVH又はVLドメインを用いて単離することができる。例えば、Portolano, S., et al., J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T., et al., Nature 352 (1991) 624-628)を参照。

【0126】

40

本明細書で使用される用語「ベクター」は、それがリンクされている別の核酸を伝播することができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、並びにそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。ある種のベクターは、それらが動作可能なようにリンクされている核酸の発現を指示することができる。このようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と言う。

【0127】

I I . 組成物及び方法

A . 典型的な複合体

本明細書は、第一部分として標的抗原に特異的に結合する抗体由来部分、及び第二部分としてMHCクラスIタンパク質複合体に結合したウイルス由来ペプチドを含む抗原結合

50

複合体を組換え的に生成する方法を報告する。

【0128】

本明細書に報告される複合体とともに、個体の既存のウイルス特異的循環性細胞障害性T細胞（Tメモリー細胞及び/又はTエフェクター細胞）は、急性ウイルス感染を模倣するMHCクラスI複合体と、これらの細胞をドレッシングすることにより、複合体の抗体由来部分が特異的に結合する標的抗原を発現する細胞に指向することができる。

【0129】

一態様において、本発明は、第一部分としてMHCクラスIタンパク質に結合したウイルス由来ペプチド及び第二部分として抗体に由来したジスルフィド結合分子を含んでなる本明細書において報告されている複合体は、個体の既存のウイルス特異的細胞傷害性T細胞を急性ウイルス感染を模倣する標的抗原を発現する細胞へと指向するために使用することができ、それにより標的抗原を発現する細胞の除去を開始することができるとする発見に一部基づいている。

【0130】

ある実施態様において、(i)ウイルス由来ペプチド、(ii)可溶性HLA-対立遺伝子A\*0201、及び(iii)-2-ミクログロブリンを含んでなる融合ポリペプチドを含む複合体が与えられる。

【0131】

本発明の抗体は、例えば、癌又はウイルス感染など様々な疾患の診断又は治療のために有用である。

【0132】

一態様において、本発明は(i)細胞表面抗原及び(ii)細胞傷害性T細胞に結合する融合ポリペプチドを提供する。ある実施態様において、融合ポリペプチドは、10nMの親和性で細胞表面抗原に特異的に結合する。

【0133】

本明細書に報告される複合体は、標的細胞、例えば腫瘍細胞又はウイルス感染細胞を除去/分解するために、天然に存在する、非常に効果的な抗ウイルス免疫応答を利用する。細胞の除去は、活性化のために任意の共刺激を必要としない個体自身の非常に強力な循環性T細胞を使用することにより達成される。更に、少数の治療用分子が作用機序のために細胞表面上に必要とされる(Mottez et al., 1995)。

【0134】

治療の間、融合ポリペプチドは、免疫感作と同様に個体の抗ウイルス免疫応答を引き起こすことができ、それにより、複数の治療/適用によりその有効性を向上させることができる。

【0135】

限定された患者集団のみが特定のアロタイプであり(HLA-アロタイプ:対立遺伝子A\*0201を有する集団の30%から50%)、特定のウイルス感染症の有病率も限定されているが(CMV感染の60%から90%は主に年齢に依存する)、前治療としての免疫感作は有効性を高めるために使用することができる。

【0136】

あるいは、集団におけるその頻度が非常に低く、一実施態様においては1%以下であるアロタイプを使用することができる。このようなアロタイプの使用は、アロタイプは異物として個体の免疫系によって認識され、免疫応答が開始されるであろうため、免疫感作の工程の用途を陳腐化し得る。

【0137】

標的とする抗体は、毒性及び副作用を制限するために高度に細胞又は抗原特異的である必要がある。

【0138】

このように、本明細書に報告される複合体を用いることにより、(i)非常に特異的なT細胞集団のみが活性化され(単一のMHC-ペプチド複合体に

10

20

30

40

50

特異的な C D 8 陽性エフェクター / メモリー細胞 ) 、他の全ての C D 3 + 細胞は影響されない ( C D 4 + - T 細胞 : T H 1 、 T H 2 、 T H 1 7 、調節 T 細胞 ) ;

( i i ) 個体の免疫系の自然な応答が模倣され ( ウィルス感染細胞の正常な除去 ) ; 及び

( i i i ) 適応に対する応答は最初は低いであろうが治療期間中に追加免疫することができ ( 特異的 T 細胞が活性化され数が増える ) 、それとともに初期注入反応と初期のサイトカイン放出を減らすことができる。

#### 【 0 1 3 9 】

一実施態様において、本方法は、選択されたウィルス由来ペプチド、例えばヒトサイトメガロウィルス ( H C M V ) 由来ペプチドを適用することにより、 C D 8 陽性細胞傷害性 T 細胞を刺激する工程を含む。 10

#### 【 0 1 4 0 】

活性化された C M V - ペプチド特異的 T 細胞は、インビトロで効果的な腫瘍細胞 ( インビトロで C M V 由来ペプチドを負荷された腫瘍細胞 ) の除去を媒介することができることが示されている。

#### 【 0 1 4 1 】

ウイルス感染細胞はそれらの細胞表面上に M H C クラス I タンパク質とともにウイルス由来ペプチドを提示する。これらは、提示細胞を枯渇 / 除去する特異的 C D 8 + - T 細胞によって認識される。細胞溶解性 ( 細胞傷害性 ) C D 8 + - T 細胞 ( C T L ) は、その特異的な T 細胞受容体により、 M H C クラス I タンパク質内のペプチドを認識する。 C T L 20 は、共刺激シグナルを必要とせずにウイルス感染細胞の除去を誘発する。

#### 【 0 1 4 2 】

エフェクター細胞、例えば本明細書において報告されているように、融合ポリペプチドに含まれる C M V 由来ペプチドで予め刺激することができる末梢血単核細胞 ( P B M C ) 又は F A C S 選別 C D 8 + - T 細胞を使用することができる。

#### 【 0 1 4 3 】

治療されるべき個体の H L A - アロタイプが認識されなければならない。 N C B I によると、 10 % 以上の頻度を有する H L A - アロタイプは次の表に示されるように分布している。

表

HLA-アロタイプ HLA-	オーストラリアの 頻度 [%]	ヨーロッパの頻度 [%]	北アメリカの頻度 [%]	東南アジアの頻度 [%]
A*01:01		16.4		
A*02:01	12.7	27.2	19.7	
A*02:04				
A*03:01		14.1		
A*11:01	13.5			20.4
A*24:02	25.9		37.7	29.9
A*31:01:02				
A*34:01:01	40.1			
B*07:02		13.9		
B*08:01		11.8		
B*13:01	23.8			
B*15:04				11.7
B*15:21	10.6			
B*44:02		10.6		
B*56:01	16.1			
B*56:02	10.3			
C*01:02	24.6			13.3
C*02:02			12.7	
C*03:03				
C*03:04			20.4	17.3
C*04:01	26.0	10.1	15.0	
C*04:03	13.9			
C*05:01		10.6		
C*06:02				
C*07:01		17.0		
C*07:02		15.9	10.2	18.9
C*08:01				12.8
C*15:02	16.5			

## 【0144】

それゆえ、本明細書に報告される一態様は抗原結合複合体であり、

- NからC末端方向に、

(i) 2-ミクログロブリン、及び

(ii) 10%未満の相対頻度を有するクラスIのMHC分子の細胞外ドメインの

1、2、及び3、

又は

10

20

30

40

50

(i) T細胞応答誘発性ペプチド、  
 (ii) 2-ミクログロブリン、及び  
 (iii) 10%以上の相対頻度を有するクラスIのMHC分子の細胞外ドメインの1、2、及び3、  
 の何れかを含む单一の融合ポリペプチド

及び

- 一以上のジスルフィド結合により連結される2つのポリペプチド鎖であって、  
 ここで、第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖はNからC末端方向に  
 (i) 免疫グロブリン軽又は重鎖可変ドメイン、  
 (ii) 免疫グロブリン軽又は重鎖定常ドメイン、及び  
 (iii) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド

を含み

ここで軽又は重鎖可変ドメインは、単独又はそれとの相補的な重又は軽鎖可変ドメインと組み合わせのどちらかで抗原に特異的に結合し、

及び、第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖が抗体の重鎖ヒンジ領域ポリペプチドを含む2つのポリペプチド鎖

を含み、

ここで融合ポリペプチドは、

- ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の一方のC末端又はN末端の何れかに対して共有結合し、又は

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖可変ドメインである抗体の可変ドメインのN末端に共有結合し、又は、

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖定常ドメインである抗体の定常ドメインのC末端に共有結合することを特徴とする。

#### 【0145】

一実施態様において、NからC末端方向に、2-ミクログロブリン及び1%未満の相対頻度を有するクラスIのMHC分子の細胞外ドメインの1、2及び3を含む融合ポリペプチドは、そのN末端に、MHCペプチド結合の溝に結合するペプチドを更に含む。一実施態様において、ペプチドは、T細胞応答を誘発するペプチドである。

#### 【0146】

一実施態様において、複合体は、

- NからC末端方向に、  
 (i) 2-ミクログロブリン、及び  
 (ii) 10%未満の相対頻度を有するクラスIのMHC分子の細胞外ドメインの1、2、及び3、

又は

(i) T細胞応答誘発性ペプチド、  
 (ii) 2-ミクログロブリン、及び  
 (iii) 10%以上の相対頻度を有するクラスIのMHC分子の細胞外ドメインの1、2、及び3、  
 の何れかを含む一の融合ポリペプチド

及び

- 一以上のジスルフィド結合により連結される2つのポリペプチド鎖であって、  
 ここで、第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖はNからC末端方向に  
 (i) 免疫グロブリン軽又は重鎖可変ドメイン、  
 (ii) 免疫グロブリン軽又は重鎖定常ドメイン、及び  
 (iii) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド

を含み

ここで軽又は重鎖可変ドメインは、単独又はそれとの相補的な重又は軽鎖可変ドメ

10

20

30

40

50

インと組み合わせのどちらかで抗原に特異的に結合し、

及び、第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖が抗体の重鎖ヒンジ領域ポリペプチドを含む2つのポリペプチド鎖

を含み、

ここで融合ポリペプチドは、

- ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の一方のC末端又はN末端の何れかに対して共有結合し、又は

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖可変ドメインである抗体の可変ドメインのN末端に共有結合し、又は、

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖定常ドメインである抗体の定常ドメインのC末端に共有結合する

ことを特徴とする。

#### 【0147】

一実施態様において、複合体は、

- NからC末端方向に、

(i) T細胞応答誘発性ペプチド、

(ii) 2-ミクログロブリン、及び

(iii) 10%以上の相対頻度を有するクラスIのMHC分子の細胞外ドメインの1、2、及び3、

を含む一の融合ポリペプチド、

及び

- 一以上のジスルフィド結合により連結される2つのポリペプチド鎖であって、

ここで、第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖はNからC末端方向に、

(i) 免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン(VL)、及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン(CL)及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン(CH1)から選択される定常ドメイン、又は

免疫グロブリン重鎖可変ドメイン(VH)、及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン(CH1)及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン(CL)から選択される定常ドメイン、及び

(ii) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド

を含み、

ここで軽又は重鎖可変ドメインは、単独又はそれとの相補的な重又は軽鎖可変ドメインと組み合わせのどちらかで抗原に特異的に結合し、

及び、第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖が抗体の重鎖ヒンジ領域ポリペプチドを含む2つのポリペプチド鎖

を含み、

ここで融合ポリペプチドは、

- ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の一方のC末端又はN末端の何れかに対して共有結合し、又は

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖可変ドメインである抗体の可変ドメインのN末端に共有結合し、又は

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖定常ドメインである抗体の定常ドメインのC末端に共有結合する

ことを特徴とする。

#### 【0148】

一実施態様において、複合体は、

- NからC末端方向に、

(i) T細胞応答誘発性ペプチド、

(ii) 2-ミクログロブリン、及び

(iii) 10%以上の相対頻度を有するクラスIのMHC分子の細胞外ドメイン

10

20

30

40

50

の 1、 2、 及び 3、  
を含むーの融合ポリペプチド、  
及び

- 一以上のジスルフィド結合により連結される 2 つのポリペプチド鎖であって、  
ここで、第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖は N から C 末端方向に、  
( i ) 免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン ( V L ) 、及び免疫グロブリン軽鎖定常ド  
メイン ( C L ) 及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン ( C H 1 ) から選択される定常  
ドメイン、又は

免疫グロブリン重鎖可変ドメイン ( V H ) 、及び免疫グロブリン重鎖第一定  
常ドメイン ( C H 1 ) 及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン ( C L ) から選択される定常  
ドメイン、及び

( i i ) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、及び  
( i i i ) 免疫グロブリン重鎖の第二 ( C H ) 及び第三 ( C H 3 ) 定常ドメイン  
を含み、

ここで軽又は重鎖可変ドメインは、単独又はそれとの相補的な重又は軽鎖可変ド  
メインと組み合わせのどちらかで抗原に特異的に結合し、

及び、第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖が抗体の重鎖ヒンジ領域ポリペプチドを  
含む 2 つのポリペプチド鎖

を含み、

ここで融合ポリペプチドは、

- ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の一方の C 末端又は N 末端の何れかに対して共有  
結合し、又は

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖  
可変ドメインである抗体の可変ドメインの N 末端に共有結合し、又は

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖  
定常ドメインである抗体の定常ドメインの C 末端に共有結合する  
ことを特徴とする。

#### 【 0 1 4 9 】

一実施態様において、複合体は、

- N から C 末端方向に  
( i ) T 細胞応答誘発性ペプチド、  
( i i ) 2 - ミクログロブリン、及び  
( i i i ) 10 % 以上の相対頻度を有するクラス I の M H C 分子の細胞外ドメイン  
の 1、 2、 及び 3、  
を含むーの融合ポリペプチド

及び

- 一以上のジスルフィド結合により連結される 2 つのポリペプチド鎖であって、  
ここで、第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖は N から C 末端方向に、  
( i ) 免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン ( V L ) 、及び免疫グロブリン軽鎖定常ド  
メイン ( C L ) 及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン ( C H 1 ) から選択される定常  
ドメイン、又は

免疫グロブリン重鎖可変ドメイン ( V H ) 、及び免疫グロブリン重鎖第一定  
常ドメイン ( C H 1 ) 及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン ( C L ) から選択される定常  
ドメイン、及び

( i i ) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、及び  
( i i i ) 免疫グロブリン重鎖の第二 ( C H ) 及び第三 ( C H 3 ) 定常ドメイン、  
を含み、

ここで軽又は重鎖可変ドメインは、単独又はそれとの相補的な重又は軽鎖可変ド  
メインと組み合わせのどちらかで抗原に特異的に結合し、

及び第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖は N から C 末端方向に抗体重鎖ヒンジ領域

10

20

30

40

50

ポリペプチド、免疫グロブリン重鎖の第二定常領域（C H 2）、及び免疫グロブリン重鎖の第三定常領域（C H 3）を含む2つのポリペプチド鎖を含み、

ここで融合ポリペプチドは、

- ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の一方のC末端又はN末端の何れかに対して共有結合し、又は

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖可変ドメインである抗体の可変ドメインのN末端に共有結合し、又は、

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖定常ドメインである抗体の定常ドメインのC末端に共有結合する

10

ことを特徴とする。

### 【0150】

一実施態様において、複合体は、

- NからC末端方向に

(i) T細胞応答誘発性ペプチド、

(ii) 2-ミクログロブリン、及び

(iii) 10%以上の相対頻度を有するクラスIのMHC分子の細胞外ドメインの1、2、及び3、

を含む一の融合ポリペプチド

及び

- 一以上のジスルフィド結合により連結される2つのポリペプチド鎖であって、

ここで、第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖はNからC末端方向に、

(i) 免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（VL）、及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン（CL）及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン（CH1）から選択される定常ドメイン、又は

免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（VH）、及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン（CH1）及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン（CL）から選択される定常ドメイン、及び

(ii) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、及び

(iii) 免疫グロブリン重鎖の第二（CH）及び第三（CH3）定常ドメイン

を含み、

ここで軽又は重鎖可変ドメインは、単独又はそれとの相補的な重又は軽鎖可変ドメインと組み合わせのどちらかで抗原に特異的に結合し、

及び、第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖はNからC末端方向に

(i) 免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（VL）、及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン（CL）及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン（CH1）から選択される定常ドメイン、又は

免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（VH）、及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン（CH1）及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン（CL）から選択される定常ドメイン、及び

(ii) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、及び

(iii) 免疫グロブリン重鎖の第二定常領域（CH2）、及び免疫グロブリン重鎖の第三定常領域（CH3）

を含む2つのポリペプチド鎖

を含み、

ここで融合ポリペプチドは、

- ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の一方のC末端又はN末端の何れかに対して共有結合し、又は

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖可変ドメインである抗体の可変ドメインのN末端に共有結合し、又は、

50

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖定常ドメインである抗体の定常ドメインのC末端に共有結合することを特徴とする。

【0151】

一実施態様において、複合体は、

- NからC末端方向に、
  - (i) T細胞応答誘発性ペプチド、
  - (ii) 2-ミクログロブリン、及び
  - (iii) 10%以上の相対頻度を有するクラスIのMHC分子の細胞外ドメインの1、2、及び3、  
を含む一の融合ポリペプチド

及び

- 一以上のジスルフィド結合により連結される2つのポリペプチド鎖であって、  
ここで、第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖はNからC末端方向に、  
(i) 免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン(VL)、及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン(CL)及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン(CH1)から選択される定常ドメイン、又は

免疫グロブリン重鎖可変ドメイン(VH)、及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン(CH1)及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン(CL)から選択される定常ドメイン、及び

- (ii) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、及び
- (iii) 免疫グロブリン重鎖の第二(CH)及び第三(CH3)定常ドメイン、  
を含み、

ここで軽又は重鎖可変ドメインは、単独又はそれそれの相補的な重又は軽鎖可変ドメインと組み合わせのどちらかで抗原に特異的に結合し、

及び、第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖はNからC末端方向に、

- (i) 免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン(VL)、及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン(CL)及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン(CH1)から選択される定常ドメイン、又は

免疫グロブリン重鎖可変ドメイン(VH)、及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン(CH1)及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン(CL)から選択される定常ドメイン、及び

- (ii) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、及び
- (iii) 免疫グロブリン重鎖の第二定常領域(CH2)、及び免疫グロブリン重鎖の第三定常領域(CH3)、  
を含む2つのポリペプチド鎖、

- NからC末端方向に、第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の可変ドメインに相補的である免疫グロブリン可変ドメイン、及び第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の可変ドメインに続く定常ドメインに相補的な定常ドメインを含む一つのポリペプチド鎖

を含み、

ここで融合ポリペプチドは、

- ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の一方のC末端又はN末端の何れかに対して共有結合し、又は

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖可変ドメインである抗体の可変ドメインのN末端に共有結合し、又は

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖定常ドメインである抗体の定常ドメインのC末端に共有結合することを特徴とする。

【0152】

一実施態様において、複合体は、

10

20

30

40

50

- N から C 末端方向に
  - ( i ) T 細胞応答誘発性ペプチド、
  - ( i i ) 2 - ミクログロブリン、
  - ( i i i ) 10 % 以上の相対頻度を有するクラス I の MHC 分子の細胞外ドメインの 1、2、及び 3、
  - ( i v ) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、
  - ( v ) 免疫グロブリン重鎖の第二 (CH) 及び第三 (CH3) 定常ドメイン、を含む一の融合ポリペプチド

及び

- N から C 末端方向に、
  - ( i ) 免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン (VL)、及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン (CL) 及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン (CH1) から選択される定常ドメイン、又は

免疫グロブリン重鎖可変ドメイン (VH)、及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン (CH1) 及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン (CL) から選択される定常ドメイン、及び

- ( i i ) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、及び
- ( i i i ) 免疫グロブリン重鎖の第二 (CH) 及び第三 (CH3) 定常ドメイン、を含む一の第一ポリペプチド

及び

- N から C 末端方向に、第一ポリペプチド鎖の可変ドメインに相補的な免疫グロブリン可変ドメイン、及び第一ポリペプチド鎖の定常ドメインに相補的な定常ドメインを含む一の第二ポリペプチド鎖

を含み、

ここで軽又は重鎖可変ドメインは、単独又はそれとの相補的な重又は軽鎖可変ドメインと組み合わせのどちらかで抗原に特異的に結合し、及び

ここで、融合ポリペプチドと第一ポリペプチド鎖はジスルフィド結合されていることを特徴とする。

### 【0153】

- 一 実施態様において、複合体は、
  - N から C 末端方向に、
    - ( i ) T 細胞応答誘発性ペプチド、
    - ( i i ) 2 - ミクログロブリン、
    - ( i i i ) 10 % 以上の相対頻度を有するクラス I の MHC 分子の細胞外ドメインの 1、2、及び 3、
    - ( i v ) 免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン (VL)、及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン (CL) 及び免疫グロブリン重鎖の第二定常ドメイン (CH1) から選択される定常ドメイン、又は

免疫グロブリン重鎖可変ドメイン (VH)、及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン (CH1) 及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン (CL) から選択される定常ドメイン、

( v ) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、

- ( v i ) 免疫グロブリン重鎖の第二 (CH) 及び第三 (CH3) 定常ドメイン、を含む一の融合ポリペプチド

及び

- N から C 末端方向に、
  - ( i ) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、及び
  - ( i i ) 免疫グロブリン重鎖の第二 (CH) 及び第三 (CH3) 定常ドメイン、を含む一の第一ポリペプチド鎖

及び

10

20

30

40

50

- N から C 末端方向に、第一ポリペプチド鎖の可変ドメインに相補的な免疫グロブリン可変ドメイン、及び第一ポリペプチド鎖の定常ドメインに相補的な定常ドメインを含む一の第二ポリペプチド鎖  
を含み

ここで軽又は重鎖可変ドメインは、単独又はそれその相補的な重又は軽鎖可変ドメインと組み合わせのどちらかで抗原に特異的に結合し、及び

ここで、融合ポリペプチドと第一ポリペプチド鎖はジスルフィド結合されていることを特徴とする。

【 0 1 5 4 】

一実施態様において、複合体は、

- N から C 末端方向に、  
 ( i ) T 細胞応答誘発性ペプチド、  
 ( i i ) 2 - ミクログロブリン、  
 ( i i i ) 10 % 以上の相対頻度を有するクラス I の MHC 分子の細胞外ドメインの 1、2、及び 3、  
 ( i v ) 免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン ( VL ) 、及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン ( CL ) 及び免疫グロブリン重鎖の第一定常ドメイン ( CH1 ) から選択される定常ドメイン、又は

免疫グロブリン重鎖可変ドメイン ( VH ) 、及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン ( CH1 ) 及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン ( CL ) から選択される定常ドメイン、

を含む一の融合ポリペプチド

及び

- N から C 末端方向に、  
 ( i ) 融合ポリペプチドの可変ドメインに相補的な免疫グロブリン可変ドメイン、及び融合ポリペプチドの定常ドメインに相補的な定常ドメイン、  
 ( i i ) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、及び  
 ( i i i ) 免疫グロブリン重鎖の第二 ( CH ) 及び第三 ( CH3 ) 定常ドメイン、  
 を含む一の第一ポリペプチド鎖  
を含み、

ここで軽又は重鎖可変ドメインは、単独又はそれその相補的な重又は軽鎖可変ドメインと組み合わせのどちらかで抗原に特異的に結合し、及び

ここで融合ポリペプチドと第一ポリペプチド鎖はジスルフィド結合されていることを特徴とする。

【 0 1 5 5 】

一実施態様において、複合体は、

- N から C 末端方向に、  
 ( i ) T 細胞応答誘発性ペプチド、  
 ( i i ) 2 - ミクログロブリン、  
 ( i i i ) 10 % 以上の相対頻度を有するクラス I の MHC 分子の細胞外ドメインの 1、2、及び 3、  
 ( i v ) 免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン ( VL ) 、及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン ( CL ) 及び免疫グロブリン重鎖の第一定常ドメイン ( CH1 ) から選択される定常ドメイン、又は

免疫グロブリン重鎖可変ドメイン ( VH ) 、及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン ( CH1 ) 及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン ( CL ) から選択される定常ドメイン、

( v ) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、

( vi ) 免疫グロブリン重鎖の第二 ( CH ) 及び第三 ( CH3 ) 定常ドメイン、  
 を含む一の融合ポリペプチド

10

20

30

40

50

及び

- N から C 末端方向に、  
( i ) 免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン ( V L ) 、及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン ( C L ) 及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン ( C H 1 ) から選択される定常ドメイン、又は

免疫グロブリン重鎖可変ドメイン ( V H ) 、及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン ( C H 1 ) 及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン ( C L ) から選択される定常ドメイン、

( i i ) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、及び

- ( i i i ) 免疫グロブリン重鎖の第二 ( C H ) 及び第三 ( C H 3 ) 定常ドメインを含む一の第一ポリペプチド、

10

及び

- N から C 末端方向に、融合ポリペプチド鎖の可変ドメインに相補的な免疫グロブリン可変ドメイン、及び融合ポリペプチド鎖の定常ドメインに相補的な定常ドメインを含む一の第二ポリペプチド鎖、

及び

- N から C 末端方向に、第一ポリペプチド鎖の可変ドメインに相補的な免疫グロブリン可変ドメイン、及び第一ポリペプチド鎖の定常ドメインに相補的な定常ドメインを含む一の第三ポリペプチド鎖

20

を含み、

ここで融合ポリペプチド及び / 又は第一ポリペプチド鎖の軽又は重鎖可変ドメインは、単独又はそれそれ相補的な重又は軽鎖可変ドメインと組み合わせのどちらかで抗原に特異的に結合し、及び

ここで融合ポリペプチドと第一ポリペプチド鎖はジスルフィド結合されていることを特徴とする。

#### 【 0 1 5 6 】

一 実施態様において、複合体は、

- N から C 末端方向に  
( i ) T 細胞応答誘発性ペプチド、  
( i i ) 2 - ミクログロブリン、  
( i i i ) 10 % 以上の相対頻度を有するクラス I の M H C 分子の細胞外ドメインの 1 、 2 、及び 3 、  
( i v ) 免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン ( V L ) 、及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン ( C L ) 及び免疫グロブリン重鎖の第二定常ドメイン ( C H 1 ) から選択される定常ドメイン、又は

30

免疫グロブリン重鎖可変ドメイン ( V H ) 、及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン ( C H 1 ) 及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン ( C L ) から選択される定常ドメイン、

を含む一の融合ポリペプチド

及び

- N から C 末端方向に、  
( i ) 融合ポリペプチドの可変ドメインに相補的な免疫グロブリン可変ドメイン、及び融合ポリペプチドの定常ドメインに相補的な定常ドメイン、  
( i i ) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、及び  
( i i i ) 免疫グロブリン重鎖の第二 ( C H ) 及び第三 ( C H 3 ) 定常ドメイン、  
を含む一の第一ポリペプチド

40

及び

- N から C 末端方向に  
( i ) 免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン ( V L ) 、及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン ( C L ) 及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン ( C H 1 ) から選択される定常

50

ドメイン、又は

免疫グロブリン重鎖可変ドメイン (VH)、及び免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン (CH1) 及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン (CL) から選択される定常ドメイン、

(i i) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、及び

(i i i) 免疫グロブリン重鎖の第二 (CH) 及び第三 (CH3) 定常ドメインを含む一の第二ポリペプチド鎖

及び

- N から C 末端方向に、第二ポリペプチド鎖の可変ドメインに相補的な免疫グロブリン可変ドメイン、及び第二ポリペプチド鎖の定常ドメインに相補的な定常ドメインを含む一の第三ポリペプチド鎖、

を含み、

ここで融合ポリペプチド及び / 又は第二ポリペプチド鎖の軽又は重鎖可変ドメインは、単独又はそれそれの相補的な重又は軽鎖可変ドメインと組み合わせのどちらかで抗原に特異的に結合し、及び

ここで第一ポリペプチドと第二ポリペプチド鎖はジスルフィド結合されていることを特徴とする。

#### 【0157】

一実施態様において、T 細胞応答誘発性ペプチドは、ウイルス由来のペプチドである。  
一実施態様において、ウイルスは、アデノウイルス、ヒトヘルペスウイルス 1、ヒトヘルペスウイルス 2、ヒトヘルペスウイルス 4 (エプスタイン・バーウイルス)、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ヒトパピローマウイルス 16 型、ヒトパピローマウイルス 18 型、ヒトパピローマウイルス 31 型、ヒトパピローマウイルス 33 型、ヒトパピローマウイルス 35 型、ヒトパピローマウイルス 39 型、ヒトパピローマウイルス 45 型、ヒトパピローマウイルス 51 型、ヒトパピローマウイルス 52 型、ヒトパピローマウイルス 56 型、ヒトパピローマウイルス 58 型、ヒトパピローマウイルス 59 型、ヒトパピローマウイルス 68 型、ヒトパピローマウイルス 73 型、ヒトパピローマウイルス 82 型、ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型、ヒトイソフルエンザ A 型ウイルス、ヒトイソフルエンザ B 型ウイルス、ワクシニアウイルスから選択される。

#### 【0158】

一実施態様において、ウイルス由来ペプチドは、N L V P M V A T V (配列番号 01)、S L Y N T V A T L (配列番号 02)、G L C T L V A M L (配列番号 03)、G I L G F V F T L (配列番号 04)、S T N R Q S G R Q (配列番号 05)、L L F G Y P V Y V (配列番号 06)、F A E G F V R A L (配列番号 07)、L I V I G I L I L (配列番号 08)、又は h I L H T P G C V (配列番号 09) から選択される。

#### 【0159】

一実施態様において、2 - ミクログロブリンはヒト 2 - ミクログロブリンである。  
一実施態様において、2 - ミクログロブリンは、配列番号 10 のアミノ酸配列からなる。

#### 【0160】

一実施態様において、10 % 以上の相対頻度を有するクラス I の MHC 分子はヒト H L A - A \* 0201 である。一実施態様において、クラス I の MHC 分子の細胞外ドメインの 1、2、及び 3 は配列番号 11 のアミノ酸配列からなる。

#### 【0161】

一実施態様において、ウイルス由来ペプチドは第一リンカーペプチドを介して 2 - ミクログロブリンへ融合される。

#### 【0162】

一実施態様において、2 - ミクログロブリンは第二リンカーペプチドを介してクラス I の MHC 分子の細胞外ドメインの 1 へ融合される。

10

20

30

40

50

## 【0163】

一実施態様において、クラスIのMHC分子の細胞外ドメインの3は第三のリンカーペプチドを介して(ジスルフィド結合し又はジスルフィド結合していない何れかの)ポリペプチドへ融合される。

## 【0164】

一実施態様において、第一、第二、及び第三のリンカーペプチドは同一であるか又は異なる。

## 【0165】

一実施態様において、第一リンカーペプチド、第二リンカーペプチド、及び第三リンカーペプチドはアミノ酸配列GS(配列番号12)、GGS(配列番号13)、GGGS(配列番号14)、GGGSGGGS(配列番号15)、GGGSGGGSGGGS(配列番号16)、GGGSGGGSGGGGSGGGS(配列番号17)、GGGSGGGSGGGSGGGS(配列番号18)、GGGGS(配列番号19)、GGGGSGGGGS(配列番号20)、GGGGSGGGGS(配列番号21)、GGGGSGGGGS(配列番号22)、及びGGGGSGGGGS(配列番号23)からお互いに独立して選択される。

10

## 【0166】

一実施態様において、第一リンカーペプチドは配列番号21のアミノ酸配列を含む。

## 【0167】

一実施態様において、第二リンカーペプチドは配列番号22のアミノ酸配列を含む。

20

## 【0168】

一実施態様において、第三リンカーペプチドは配列番号12のアミノ酸配列を含む。

## 【0169】

一実施態様において、抗体の重鎖ヒンジ領域のポリペプチドは、クラスIgG又はクラスIgEのヒト抗体の抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチドから選択される。

## 【0170】

一実施態様において、抗体の重鎖ヒンジ領域のポリペプチドは、サブクラスIgG1、又はIgG2、又はIgG3、又はIgG4のヒト抗体の抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチドから選択される。

## 【0171】

一実施態様において、抗体の重鎖ヒンジ領域のポリペプチドは、EPKSCDKTHTCPPCP(配列番号24)、EPKSADKTHTCPPCP(配列番号25)、ERKCCVECPPCP(配列番号26)、ERKCAVECPPCP(配列番号27)、ERKACVECPPCP(配列番号28)、ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP<sub>3</sub>(配列番号29)、又はESKYGPPCPSCP(配列番号30)のアミノ酸配列を含む又はからなる。

30

## 【0172】

一実施態様において、第一ジスルフィド結合ポリペプチド及び/又は第二ジスルフィド結合ポリペプチドは、ヒト起源のCH2ドメイン及び/又はCH3ドメインを含む。一実施態様において、ヒト起源のCH2ドメイン及びCH3ドメインはクラスIgG又はIgEのヒト抗体のものである。一実施態様において、CH2ドメイン及びCH3ドメインは、サブクラスIgG1、又はIgG2、又はIgG3、又はIgG4のヒト抗体のものである。一実施態様において、CH2ドメインは配列番号31のアミノ酸配列を含む。一実施態様において、CH2ドメインは、サブクラスIgG1又はIgG2のヒト抗体のものであり、そしてE233、L234、L235、G236、D265、D270、N297、E318、K320、K322、A327、A330、P331及び/又はP329の少なくとも一の変異を含む(KabatのEUインデックスに従った番号付け)。一実施態様において、CH2ドメインは、変異L234A及びL235A、及び/又は変異D265A及びN297Aを有するヒトサブクラスIgG2又はサブクラスIgG1のヒト抗体のものであり、及び/又はPVA236変異を含み、及び/又は変異P329Gを含

40

50

む。一実施態様において、C H 2 ドメインは変異 L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A 及び / 又は P 3 2 9 G を有するサブクラス I g G 1 のヒト抗体のものである。一実施態様において、C H 2 ドメインは S 2 2 8 P 及び / 又は L 2 3 5 E を有するサブクラス I g G 4 のヒト抗体のものである。一実施態様において、C H 2 ドメインは配列番号 3 3 又は配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む。一実施態様において、C H 3 ドメインは配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む。

## 【 0 1 7 3 】

一実施態様において、第一ジスルフィド結合ポリペプチドは配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含み、第二ジスルフィド結合ポリペプチドは配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む。

## 【 0 1 7 4 】

一実施態様において、第一及び第二ジスルフィド結合ポリペプチドは配列番号 3 7 又は配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む。

## 【 0 1 7 5 】

一実施態様において、第一ジスルフィド結合ポリペプチド又は第二ジスルフィド結合ポリペプチドは配列番号 3 7 又は配列番号 3 8 のアミノ酸配列からなる。

## 【 0 1 7 6 】

一実施態様において、第一ジスルフィド結合ポリペプチドは配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含み、第二ジスルフィド結合ポリペプチドは配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む。

## 【 0 1 7 7 】

一実施態様において、一以上のジスルフィド結合により連結されるポリペプチド鎖は、2 つ又は 3 つ又は 4 つのジスルフィド結合により連結される。

## 【 0 1 7 8 】

一実施態様において、複合体は、

- N から C 末端方向に

- ( i ) 配列番号 0 1 のアミノ酸配列を有するウイルス由来ペプチド、
- ( i i ) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を有する第一リンカーペプチド、
- ( i i i ) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する 2 - ミクログロブリン、
- ( i v ) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する第二リンカーペプチド、
- ( v ) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有するクラス I の M H C 分子の細胞外ドメインの 1 、 2 、 及び 3 、 及び
- ( v i ) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する第三リンカーペプチド

を含む一の融合ポリペプチド

及び

- 一以上のジスルフィド結合により連結される 2 つのポリペプチド鎖であって、ここで、第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖は N から C 末端方向に、
  - ( i ) 免疫グロブリン軽又は重鎖可変ドメイン、
  - ( i i ) 免疫グロブリン軽又は重鎖定常ドメイン、
  - ( i i i ) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、
  - ( i v ) 配列番号 3 2 及び 3 3 から選択されるアミノ酸配列を含むヒト I g G 1 の C H 2 ドメイン、 及び
  - ( v ) 配列番号 3 5 又は 3 6 のアミノ酸配列を含むヒト I g G 1 の C H 3 ドメイン

を含み、

及び、第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖は N から C 末端方向に

- ( i ) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、
- ( i i ) 配列番号 3 2 及び 3 3 から選択されるアミノ酸配列を含むヒト I g G 1 の C H 2 ドメイン、 及び
- ( i i i ) 配列番号 3 5 又は 3 6 のアミノ酸配列を含むヒト I g G 1 の C H 3 ドメイン

を含み、

10

20

30

40

50

ここで融合ポリペプチドは、

- 第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の C 末端又は N 末端の何れかに対して共有結合されることを特徴とする。

【 0 1 7 9 】

一実施態様において、複合体は、

- N から C 末端方向に、
  - ( i ) 配列番号 0 1 のアミノ酸配列を有するウイルス由来ペプチド、
  - ( i i ) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を有する第一リンカーペプチド、
  - ( i i i ) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する 2 - ミクログロブリン、
  - ( i v ) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する第二リンカーペプチド、
  - ( v ) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有するクラス I の MHC 分子の細胞外ドメインの 1、2、及び 3、及び
  - ( v i ) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する第三リンカーペプチドを含む一の融合ポリペプチド

及び

- 一以上のジスルフィド結合により連結される 2 つのポリペプチド鎖であって、ここで、第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖は N から C 末端方向に、
  - ( i ) 免疫グロブリン軽又は重鎖可変ドメイン、
  - ( i i ) 免疫グロブリン軽又は重鎖定常ドメイン、
  - ( i i i ) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、
  - ( i v ) 配列番号 3 2 及び 3 3 から選択されるアミノ酸配列を含むヒト IgG1 の CH2 ドメイン、及び
  - ( v ) 配列番号 3 5 又は 3 6 から選択されるアミノ酸配列を含むヒト IgG1 の CH3 ドメイン

を含み、

及び、第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖が抗体の重鎖ヒンジ領域ポリペプチドを含み、

ここで融合ポリペプチドは、

- 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の C 末端又は N 末端の何れかに対して共有結合し、又は
  - 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖可変ドメインである抗体の可変ドメインの N 末端に共有結合し、又は、
  - 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖定常ドメインである抗体の定常ドメインの C 末端に共有結合することを特徴とする。

【 0 1 8 0 】

一実施態様において、複合体は、

- N から C 末端方向に、
  - ( i ) 配列番号 0 1 のアミノ酸配列を有するウイルス由来ペプチド、
  - ( i i ) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を有する第一リンカーペプチド、
  - ( i i i ) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する 2 - ミクログロブリン、
  - ( i v ) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する第二リンカーペプチド、
  - ( v ) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有するクラス I の MHC 分子の細胞外ドメインの 1、2、及び 3、及び
  - ( v i ) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する第三リンカーペプチドを含む一の融合ポリペプチド

及び

- 一以上のジスルフィド結合により連結される 2 つのポリペプチド鎖であって、ここで、第一及び第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の各々は N から C 末端方向

10

20

30

40

50

に、

( i ) 免疫グロブリン軽又は重鎖可変ドメイン、  
 ( i i ) 免疫グロブリン軽又は重鎖定常ドメイン、  
 ( i i i ) 抗体重鎖ヒンジ領域ポリペプチド、  
 ( i v ) 配列番号 3 2 及び 3 3 から選択されるアミノ酸配列を含むヒト Ig G 1 の  
 CH2 ドメイン、及び  
 ( v ) 配列番号 3 5 又は 3 6 から選択されるアミノ酸配列を含むヒト Ig G 1 の  
 CH3 ドメイン  
 を含み、

ここで融合ポリペプチドは、

- 第二ジスルフィド結合ポリペプチド鎖の C 末端又は N 末端の何れかに対して共有結合し、又は  
 - 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖可変ドメインである抗体の可変ドメインの N 末端に共有結合し、又は、  
 - 第一ジスルフィド結合ポリペプチド鎖に含まれるものに対して相補的な重又は軽鎖定常ドメインである抗体の定常ドメインの C 末端に共有結合することを特徴とする。

#### 【 0 1 8 1 】

図 1 4 から、本明細書で報告されるような複合体は、それが融合される抗体の結合特性を維持することが分かる（図 1 4 b 及び c ）。

#### 【 0 1 8 2 】

図 1 5 と 1 7 において、本明細書で報告されるような複合体のインピトロでの有効性と特異性が示される。

#### 【 0 1 8 3 】

細胞毒性試験は CMV 特異的 CD8<sup>+</sup> - T 細胞の存在下で行った。CMV 由来ウイルスペプチドを含む複合体は、一価抗体について（図 1 5 a を参照）、二価抗体について（図 1 5 b ）標的細胞の溶解 / 除去 / 分解を誘発することが分かる。標的細胞の溶解は、EBV 由来ウイルスペプチド（図 1 5 b ）と対照抗体（図 1 5 d ）及び e ）を含んでなる複合体とのインキュベーションは広範な細胞溶解を生じないため（自然溶解は約 3 . 5 % である）非常に特異的であることが更に分かる。

#### 【 0 1 8 4 】

図 1 7 に、 IgF - 1 R 陽性肺腺癌細胞株 H 4 6 0 M 2 の溶解が示されている。

#### 【 0 1 8 5 】

CMV 由来ペプチド及び二価抗体を含む複合体の EC<sub>50</sub> 値は約 5 0 pM に対応する約 1 0 n g / m l である。決定された EC<sub>50</sub> の値は標的細胞対エフェクター細胞の比率とは無関係である（図 1 6 を参照；標的細胞対エフェクター細胞の比率が 1 : 3 から 1 : 1 は 1 : 0 . 4 4 から 1 : 0 . 1 4 の実効比に対応する（エフェクター細胞の 7 6 % が CD8 陽性であり、 1 9 % が CMV 特異的である））。

#### 【 0 1 8 6 】

従って、一実施態様では、本明細書において報告される複合体は約 5 0 pM の EC<sub>50</sub> 値を有する。

#### 【 0 1 8 7 】

##### 1. 親和性

ある実施態様において、本明細書で提供される複合体は抗体可変ドメインの抗原結合対を含む。所定の実施態様において、可変ドメインは、その抗原に対して解離定数（ Kd ）が、 1 0 n M 、 1 n M 、 0 . 1 n M 、 0 . 0 1 n M 、又は 0 . 0 0 1 n M ( 例えば、 1 0<sup>-8</sup> M 未満、例えば、 1 0<sup>-8</sup> M から 1 0<sup>-1 3</sup> M 、例えば、 1 0<sup>-9</sup> M から 1 0<sup>-1 3</sup> M ) を有する。

#### 【 0 1 8 8 】

一実施態様において、 Kd は表面プラズモン共鳴アッセイを用いて測定される。

10

20

30

40

50

## 【0189】

例えば、これはBIACORE (登録商標) - 2000又はBIACORE (登録商標) - 3000機器(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を用いて固定化抗原CM5チップにより~10応答単位(RU)で25で行うことができる。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5, BIAcore Inc.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)及びN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)で活性化した。抗原を10mM酢酸ナトリウム、pH4.8で5μg/ml(~0.2μM)に希釈し、結合したタンパク質の応答単位(RU)がおよそ10になるように5μl/分の流速で注入する。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために1Mのエタノールアミンを注入する。動力学的な測定のために、Fabの2倍の段階希釈(0.78nMから500nM)を、25で、およそ25μl/分の流速で0.05%ポリソルベート20(TWEEN-20<sup>TM</sup>)界面活性剤(PBS)を含むPBSに注入する。会合センサーグラム及び解離センサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model)(BIACORE (登録商標) Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度(kon)と解離速度(koff)を算出する。平衡解離定数(Kd)をkoff/kon比として算出する。例えば、Chen, Y., et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881を参照。

## 【0190】

## 2. 発現

10

20

本明細書で報告されるように、HEK293及びCHOにおいて複合体の特定の形態(異なるリンカー、HLAと2-ミクログロブリンの異なる組み合わせ)の発現は、仮にも検出可能な場合、小胞体内に複合体の蓄積をもたらし、言い換えれば複合体の単離と分泌が強く損なわれた。

## 【0191】

複合体が以下の表に概説されるようなポリペプチドの一を含むことを意図したときには、培養培地への複合体の分泌は検出できなかった。

■

シグナルペプチド	CMV- 由来ペプチド	$G_4S(G_3S)_2$ - リンカー	$\beta 2$ - ミクログロブリン	$(G_4S)_3$ -リンカー	$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - 鎖	$(G_4S)_2$ -リンカー	抗体軽鎖
シグナルペプチド	$\beta 2$ - ミクログロブリン	$(G_4S)_3$ -リンカー	$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - 鎖	$(G_4S)_2$ -リンカー	抗体軽鎖		
シグナルペプチド	CMV- 由来ペプチド	$(G_3S)_2$ GG- リンカー	$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - 鎖	$(G_4S)_3$ -リンカー	$\beta 2$ - ミクログロブリン	$(G_4S)_2$ -リンカー	抗体軽鎖
シグナルペプチド	CMV- 由来ペプチド	GGPGGGSG GG-リンカー	$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - 鎖	$(G_4S)_3$ -リンカー	$\beta 2$ - ミクログロブリン	$(G_4S)_2$ -リンカー	抗体軽鎖
シグナルペプチド	$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - 鎖	$(G_4S)_3$ -リンカー	$\beta 2$ - ミクログロブリン	$(G_4S)_2$ -リンカー	抗体軽鎖		
シグナルペプチド	CMV- 由来ペプチド	$(G_3S)_2$ GG- リンカー	$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - 鎖	$(G_4S)_3$ -リンカー	抗体軽鎖		
シグナルペプチド	CMV- 由来ペプチド	GGPGGGSG GG-リンカー	$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - 鎖	$(G_4S)_3$ -リンカー	抗体軽鎖		
シグナルペプチド	CMV- 由来ペプチド	$(G_3S)_2$ GG- リンカー	$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - 鎖	$(G_4S)_3$ -リンカー	$\beta 2$ - ミクログロブリン	$(G_4S)_2$ -リンカー	抗体重鎖

表

シグナルペプチド	CMV-由来ペプチド	$\beta 2$ -ミクログロブリン	$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ -鎖	IgG-Fc-領域	scFv
シグナルペプチド	CMV-由来ペプチド	$\beta 2$ -ミクログロブリン	$\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ -鎖	抗体重鎖	

## 【0192】

MHCクラスIタンパク質複合体に結合したウイルス由来ペプチドの2つの部分、及び抗体の少なくとも一の可変ドメイン及び一の定常ドメインを含む複合体の発現、及び特に分泌は真核細胞では不可能であることが分かっている。 10

## 【0193】

更に、MHCクラスIタンパク質複合体に結合したウイルス由来ペプチド、及び少なくとも一の可変ドメイン及びヒンジ領域に由来したジスルフィド結合ポリペプチドの一対を含む2つの融合ポリペプチドを含む複合体の発現、及び特に分泌は真核細胞では不可能であることが分かっている。

## 【0194】

従って、本明細書において報告される複合体において、真核細胞を用いた複合体の產生及び分泌を可能にするために、MHCクラスIタンパク質に結合したウイルス由来のペプチドを含む融合ポリペプチドは複数回存在することはできず、少なくとも一の抗体可変ドメイン及び一の抗体定常ドメインが存在しなければならない。 20

## 【0195】

従って、MHCクラスIタンパク質に結合したウイルス由来ペプチド、抗体重鎖ヒンジ領域、及び少なくとも一の抗体可変ドメイン及び一の抗体定常ドメインを含む厳密に一の融合ポリペプチドを含む複合体は、真核細胞中で組換え產生され分泌させることができる。一実施態様において、少なくとも一の定常ドメインは抗体重鎖定常ドメイン1(CH1)又は抗体軽鎖定常ドメイン(CL)の何れかである。

## 【0196】

従って、抗体重鎖ヒンジ領域、抗体可変ドメインの少なくとも一対、任意で抗体定常ドメイン、及びMHCクラスIタンパク質に結合したウイルス由来ペプチドの厳密に一の融合ポリペプチドを含む複合体は、真核細胞で組換え的に產生され分泌させることができる。一実施態様において、少なくとも一の定常ドメインは抗体重鎖定常ドメイン1(CH1)又は抗体軽鎖定常ドメイン(CL)の何れかである。 30

## 【0197】

異なるポリペプチドの種々の組み合わせを試験した。分泌された発現は、例えば、ウイルス由来ペプチドがクラスIのMHC分子にN-末端で融合されている複合体における免疫グロブリン由来のシグナルペプチドのN末端融合により達成することができる。クラスIのMHC分子の重鎖(膜貫通及び細胞質ドメインを欠いている1-2-3)及び軽鎖(2ミクログロブリン)を順番に変えることができる。異なる融合ポリペプチドをN末端で抗体軽鎖又はポリペプチドを含む抗体の重鎖のヒンジ領域のいずれかに融合させた。典型的な組み合わせを図2に示す。 40

## 【0198】

以下の表から分かるように、融合ポリペプチドを含む複合体は、単一のウイルス由来のペプチド-ミクログロブリン-HLA-融合ポリペプチドが存在する場合、可変抗体ドメイン及び抗体重鎖ヒンジ領域由来のポリペプチドと共に発現させることができる。

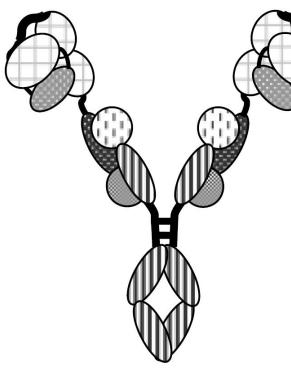
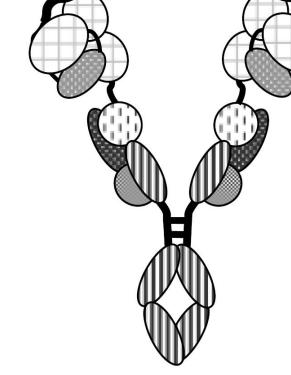
表

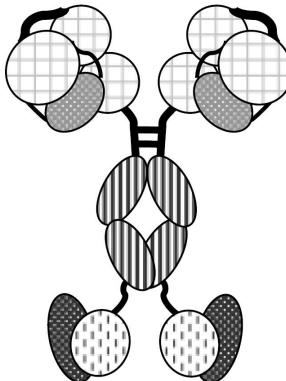
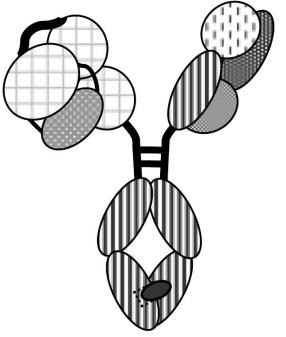
	ウイルス由来ペプチド -クラスI MHC融合ペプチド	2	可変ドメインの数 0	CH1ドメインの数 0	抗体重鎖ヒンジ領域を含む ペプチドを含有する はい	発現レベル 高い	図3のレーン 1

10

20

10	20	30	40	ウイルス由来ペプチド -クラスマHC融合ポリペプチド	可変メインの数	CH1ドメインの数	抗体重鎖ヒンジ領域を含む ポリペプチドを含有する	発現レベル	図3のレーン
				1	0	0	はい	高い	2
				1	1	1	はい	高い	3
				1	2	2	はい	高い	4

図3のレーン						
	ウイルス由来ペプチド -クラスIMHC融合ポリペプチド	可変ドメインの数	CH1ドメインの数	抗体重鎖にンジ領域を含む ポリペプチドを含有する	発現レベル	
	2	2	2	はい	発現なし	5
	2	2	2	はい	発現なし	6
	2	2	2	はい	非常に低い	7

	ウイルス由来ペプチド -クラスIMHC融合ポリペプチド	可変ドメインの数	CH1ドメインの数	抗体重鎖ヒンジ領域を含む ポリペプチドを含有する	発現レベル	図3のレーン	
10		2	2	0	はい	発現なし	8
20		1	1	1	はい	高い	9
30							

## 【0199】

一実施態様において、本明細書に報告される複合体はポリペプチドの異なる対合を含む。ポリペプチドの適切な対合を可能にするために、ノブ・イントゥ・ホール (knobs-into-holes) 技術又はクロス m A b の技術を正しく会合していない複合体の量を低減するために使用することができる。

## 【0200】

ノブ修飾は抗体のCH3ドメインの変異T366Wを意味する (KabatのEUインデックスに従って番号付けられる)。

## 【0201】

ホール修飾は抗体のCH3ドメインの変異T366S、L368A及びY407Vを意味する (KabatのEUインデックスに従って番号付けられる)。

## 【0202】

ノブ及びホール修飾に加えて、一方のCH3ドメインの変異S354C及び他方のCH3ドメインの変異Y349Cが存在し得る。

## 【0203】

40

20

30

40

50

クロスmAb技術は、例えば国際公開第2009/080251号、国際公開第2009/080252号、国際公開第2009/080254号、国際公開第2009/080253号、国際公開第2010/112193号、国際公開第2010/115589号、国際公開第2010/136172号、国際公開第2010/145792号及び国際公開第2010/145793号に報告されている。

#### 【0204】

##### 3. 変異体

ある実施態様において、本明細書で提供される複合体のアミノ酸配列変異体が企図される。例えば、複合体の結合親和性及び/又は他の生物学的特性を改善することが望まれ得る。複合体のアミノ酸配列変異体は、複合体のポリペプチド鎖をコードするスクレオチド配列に適切な改変を導入することにより、またはペプチド合成によって調製することができる。このような改変は、例えば、複合体のポリペプチドのアミノ酸配列内における残基の欠失、及び/又は挿入及び/又は置換を含む。最終コンストラクトが所望の特性、例えば、抗原結合を有していることを条件として、欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせが、最終コンストラクトに到達させるために作成され得る。

#### 【0205】

##### a) 置換、挿入、および欠失変異体

ある実施態様において、ポリペプチド鎖に一つ以上のアミノ酸置換を有する複合体変異体が提供される。保存的置換は以下の表の「好ましい置換」の見出しの下に示されている。より実質的な変更が、以下の表の「典型的な置換」の見出しの下に与えられ、アミノ酸側鎖のクラスを参照して以下に更に説明される。アミノ酸置換は、目的の複合体に導入することができ、その産物は、所望の活性、例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の減少、又はADC又はCDCの改善についてスクリーニングされる。

10

20

## 表

元の 残基	典型的な置換	望ましい 置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

10

20

30

## 【0206】

アミノ酸は、共通の側鎖特性に応じて分類される：

- (1) 疎水性：Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg；
- (5) 鎌の配向に影響する残基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

40

## 【0207】

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。

## 【0208】

アミノ酸配列挿入は、一残基から百以上の残基を含有するポリペプチド長にわたるアミノ及び/又はカルボキシル末端融合、並びに单一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例としては、N末端メチオニン残基を有するポリペプチドを含む複合体が含まれる。他の挿入変異体は、酵素に対する複合体のポリペプチド鎖のN-又はC-

50

末端への融合物を含む。

【0209】

b) グリコシル化変異体

所定の実施態様において、本明細書で提供される複合体のポリペプチドは、ポリペプチドがグリコシル化される程度を増加又は減少するよう改変される。ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加又は欠失は、一以上のグリコシル化部位が作成又は削除されるようアミノ酸配列を変えることによって簡便に達成することができる。

【0210】

複合体が抗体のFc領域を含む場合には、それに付着する糖を変えることができる。哺乳動物細胞によって產生された天然型Fc領域は、典型的には、Fc領域のCH2ドメインのAsn297にN-結合により一般的に付着した分岐鎖、二分岐オリゴ糖を含んでいる。例えば、Wright, A. and Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32を参照。オリゴ糖は、様々な炭水化物、例えば、二分岐オリゴ糖構造の「幹」のGalNAcに結合した、マンノース、N-アセチルグルコサミン(GalNAc)、ガラクトース、シアル酸、並びにフコースを含み得る。幾つかの実施態様において、本発明の抗体におけるオリゴ糖の改変は、一定の改善された特性を有する抗体変異体を作成するために行われ得る。

一実施態様において、ポリペプチド変異体を含む複合体は、Fc領域に(直接または間接的に)付着されたフコースを欠いた糖鎖構造を有して提供される。例えば、このようなFc領域のフコース量は、1%から80%、1%から65%、5%から65%、または20%から40%であり得る。フコースの量は、例えば、国際公開第2008/077546号に記載されているように、MALDI-TOF質量分析法によって測定されるAsn297に付着しているすべての糖構造の合計(例えば、コンプレックス、ハイブリッド及び高マンノース構造)に対して、Asn297の糖鎖中のフコースの平均量を計算することによって決定される。Asn297は、Fc領域(Fc領域残基のEU番号付け)でおよそ297の位置に位置するアスパラギン残基を指し、しかし、Asn297もまた位置297の上流または下流のおよそ±3アミノ酸に、すなわち抗体の軽微な配列変異に起因して、位置294と300の間に配置され得る。このようなフコシル化変異体はADC機能を改善させた可能性がある。例えば米国特許出願公開第2003/0157108号;米国特許出願公開第2004/0093621号を参照。「非フコシル化」又は「フコース欠損」抗体変異体に関連する出版物の例としては、米国特許出願公開第2001/29246号;国際公開第2003/0115614号;国際公開第2002/0164328号;米国特許出願公開第2004/0093621号;米国特許出願公開第2004/0132140号;米国特許出願公開第2004/0110704号;米国特許出願公開第2004/0110282号;米国特許出願公開第2004/0109865号;米国特許出願公開第2003/085119号;米国特許出願公開第2003/084570号;国際公開第2005/035586号;国際公開第2005/035778号;国際公開第2005/053742号;国際公開第2002/031140号;国際公開第2005/053742号;国際公開第2002/031140号;Okazaki, A., et al., J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N., et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622が含まれる。非フコシル化抗体を產生する能力を有する細胞株の例としては、タンパク質フコシル化を欠損しているLec13 CHO細胞(Ripka, J., et al., Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545;米国特許出願公開第2003/0157108号;及び国際公開第2004/056312号、特に実施例11)、及びノックアウト細胞株、アルファ-1、6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞(例えば、Yamane-Ohnuki, N., et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622; Kanda, Y., et al., Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688;及び国際公開第2003/085107号を参照)を含む。

【0211】

Fc領域変異体を含む複合体は、例えば、Fc領域に結合した二分岐オリゴ糖がGalNAcによって二分されている二分オリゴ糖を更に備えている。このような変異体はフコ

10

20

30

40

50

シル化を減少させ、及び／又はADC C機能を改善している可能性がある。このような抗体変異体の例は、例えば国際公開第2003/011878号；米国特許第6,602,684号；及び米国特許出願公開第2005/0123546号に記述される。Fc領域に結合したオリゴ糖内に少なくとも1つのガラクトース残基を持つFc領域変異体も提供される。このようなFc領域変異体はCDC機能を改善させた可能性がある。対応する抗体変異体は、例えば国際公開第97/30087号；国際公開第98/58964号；及び国際公開第99/22764号に記述される。

#### 【0212】

##### c) Fc領域変異体

所定の実施態様において、1つまたは複数のアミノ酸改変が、本明細書で提供される複合体に含まれるポリペプチドのFc領域に導入することができ、それによってFc領域変異体を生成する。Fc領域の変異体は、1つまたは複数のアミノ酸位置においてアミノ酸修飾（例えば置換）を含むヒトFc領域の配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のFc領域）を含んでもよい。

#### 【0213】

ある実施態様において、本発明は、インビボにおける複合体の半減期が重要であるが、ある種のエフェクター機能（例えば補体およびADC Cなど）が不要または有害である用途のための望ましい候補とならしめる、全てではないが一部のエフェクター機能を有するFc領域変異体を意図している。インビトロ及び／又はインビボでの細胞毒性アッセイを、CDC活性及び／又はADC C活性の減少／枯渇を確認するために行うことができる。例えば、Fc受容体（FcR）結合アッセイは、複合体がFcR結合を欠くが（それゆえ、おそらくADC C活性を欠く）、FcRn結合能力を保持していることを確認するために行うことができる。ADC C、NK細胞を媒介する初代細胞は、FcR IIIのみを発現するが、単球はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血細胞におけるFcRの発現は、Ravetch, J.V. and Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492の464ページの表3に要約されている。目的の分子のADC C活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5500362号（例えばHellstrom, I., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063；及びHellstrom, I., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502を参照）；米国特許第5821337号（Bruggemann, M., et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361を参照）に説明される。あるいは、非放射性アッセイ法を用いることができる（例えば、フローサイトメトリー用のACTIT<sup>TM</sup>非放射性細胞傷害性アッセイ（Cell Technology, Inc. Mountain View, CA；及びCytoTox 96（登録商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（Promega, Madison, WI）を参照。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。あるいは、又は更に、目的の分子のADC C活性は、Clynes, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656に開示されるように、インビボで、例えば動物モデルにおいて評価することができる。C1q結合アッセイはまた、抗体が体C1qを結合することができないこと、したがって、CDC活性を欠いていることを確認するために行うことができる。例えば、国際公開第2006/029879号及び国際公開第2005/100402号のC1qおよびC3c結合ELISAを参照。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行うことができる（例えば、Gazzano-Santoro, H., et al., J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171；Cragg, M.S., et al., Blood 101 (2003) 1045-1052；及びCragg, M.S. and Glennie, M.J., Blood 103 (2004) 2738-2743を参照）。FcRn結合及びインビボでのクリアランス／半減期の測定は当該分野で公知の方法を用いても行うことができる（例えば、Petkova, S.B., et al., Int. Immunol. 18 (2006) 1759-1769を参照）。

#### 【0214】

エフェクター機能が減少したFc領域は、Fc領域の残基234、235、238、265、269、270、297、327及び329の一つ以上の置換を有するものが含まれる。

10

20

30

40

50

れる（米国特許第6,737,056号）。そのようなFc変異体は、残基265及び297のアラニンへの置換を有する、いわゆる「DANA」Fc変異体を含む、アミノ酸位置265、269、270、297及び327の二つ以上の置換を有するFc変異体を含む（米国特許第7332581号）。

【0215】

FcRへの結合を改善又は減少させた特定のFc領域変異体が記載されている。（例えば、米国特許第6,737,056号；国際公開第2004/056312号、及びShields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604）を参照）。

【0216】

所定の実施態様において、ポリペプチド変異体はADCCを改善する1つまたは複数のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の位置298、333、及び/又は334における置換（EUの残基番号付け）を有するFc領域を含む。

【0217】

幾つかの実施態様において、改変された（すなわち改善されたか減少した）C1q結合及び/又は補体依存性細胞傷害（CDC）を生じる、Fc領域における改変がなされ、例えば、米国特許第6,194,551号、国際公開第99/51642号、及びIdusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184に説明される。

【0218】

増加した半減期を持ち、胎仔への母性IgGの移送を担う、新生児Fc受容体（FcRn）への結合が改善された抗体（Guyer, R.L., et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593及びKim, J.K., et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434）が、米国特許出願公開第2005/0014934号に記載されている。これらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改善する1つまたは複数の置換をその中に有するFc領域を含む。このようなFc領域変異体は、Fc領域の残基：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424又は434の1以上の置換、例えば、Fc領域の残基434の置換が含まれる（米国特許第7371826号）。

【0219】

Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740；米国特許第5648260号；米国特許第5624821号；及び、Fc領域の変異体の他の例に関しては国際公開第94/29351号も参照のこと。

【0220】

d) 誘導体

ある実施態様において、本明細書で提供される複合体は、当技術分野で知られ容易に入手可能な追加の非タンパク質部分を含むように更に改変することができる。複合体の誘導体化に適した部分としては、限定されないが、水溶性ポリマーが含まれる。水溶性ポリマーの非限定的な例は、限定されないが、ポリエチレングリコール（PEG）、エチレングリコール/プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキソラン、エチレン/無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸（単独重合体又はランダム共重合体の何れか）及びデキストラン又はポリ（n-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコール単独重合体、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール（例えばグリセロール）、ポリビニルアルコール及びこれらの混合物を包含する。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドはその水中での安定性に起因して製造における利点を有し得る。ポリマーは何れかの分子量のものであってよく、そして分枝鎖又は未分枝鎖であってよい。抗体に結合するポリマーの数は変動してよく、そして、一以上の重合体が結合する場合は、それらは同じか又は異なる分子であることができる。一般的に、誘導体化に使用するポリマーの数及び/又は種類は、限定されないが、向上させるべき抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体が限定された条件下で治療に使用されるのか等を含む考慮に基づいて決定する

10

20

30

40

50

ことができる。

【0221】

別の実施態様において、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る複合体と非タンパク質部分とのコンジュゲートが提供される。一実施態様において、非タンパク質部分はカーボンナノチューブである(Kam, N.W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605)。放射線は、任意の波長であって良いが、限定されないものの、通常の細胞に害を与えないが、抗体-非タンパク質部分の近位細胞が死滅される温度に非タンパク質部分を加熱する波長が含まれる。

【0222】

B. 組換え方法及び組成物

10

複合体は、例えば米国特許第4816567号で説明したように、組換えの方法および組成物を用いて作成することができる。一実施態様において、本明細書に記載される複合体のポリペプチドをコードする単離された核酸が提供される。更なる実施態様において、そのような核酸を含む1つ以上のベクター(例えば、発現ベクター)が提供される。更なる実施態様において、そのような核酸を含む宿主細胞が提供される。一実施態様において、宿主細胞は以下を含む(例えば、以下で形質転換される)：(1)抗体のVLを含むアミノ酸配列、及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、又は(2)抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第一ベクター、及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第二ベクター。一実施態様において、宿主細胞は、真核生物、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、またはリンパ系細胞(例えば、Y0、NS0、Sp2/0細胞)である。一実施態様において、本明細書に報告されるように複合体を作る方法が提供され、その方法は、上記のように、ポリペプチドの発現及び複合体の形成に適した条件下で、複合体のポリペプチドをコードする核酸を含む宿主細胞を培養することを含み、および必要に応じて、宿主細胞(または宿主細胞培養培地)から複合体を回収することを含む。

20

【0223】

複合体の組換え生産のために、例えば上述したように、複合体のポリペプチドをコードする核酸が単離され、宿主細胞内でのさらなるクローニングおよび/または発現のために1つ以上のベクターに挿入される。このような核酸は、容易に単離され、従来の手順を用いて(例えば、抗体の重鎖と軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)配列決定することができる。

30

【0224】

ベクターのクローニング又は発現に適切な宿主細胞は、本明細書に記載の原核細胞又は真核細胞を含む。例えば、特に、グリコシリ化及びFcエフェクター機能が必要ない場合には、抗体は、細菌で産生することができる。細菌における抗体断片およびポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5648237号、第5789199号及び第5840523号を参照(また、大腸菌における抗体断片の発現を記述しているCharlton, K.A., In: *Methods in Molecular Biology*, 248巻, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), 頁245-254も参照)。発現の後、複合体は可溶性画分において細菌の細胞ペーストから単離され更に精製することができる。

40

【0225】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、菌類や酵母菌株を含むポリペプチドをコードするベクターのための、適切なクローニング宿主又は発現宿主であり、そのグリコシリ化経路が、「ヒト化」されており、部分的または完全なヒトのグリコシリ化パターンを有する抗体の生成をもたらす。Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; 及びLi, H., et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215を参照。

【0226】

グリコシリ化複合体の発現に適した宿主細胞はまた、多細胞生物(無脊椎動物と脊椎動物)から派生している。無脊椎動物細胞の例としては、植物および昆虫細胞が挙げられる。多数のバキュロウイルス株が同定され、これらは特にSpodoptera frugiperda細胞のト

50

ランスフェクションのために、昆虫細胞と組み合わせて使用することができる。

【0227】

植物細胞培養を宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5959177号、第6040498号、第6420548号、第7125978号及び第6417429号（トランスジェニック植物における抗体産生に関するPLANTIBODIES™技術を記載）を参照。

【0228】

脊椎動物細胞もまた宿主として用いることができる。例えば、懸濁液中で増殖するよう10に適応された哺乳動物細胞株は有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40 (COS-7) で形質転換されたサル腎臓CV1株、ヒト胚腎臓株 (Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74) に記載されたHEK293又は293細胞、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK)、マウスのセルトリ細胞 (Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252) に記載されるTM4細胞)、サル腎細胞 (CV1)、アフリカミドリザル腎細胞 (VERO-76)、ヒト子宮頸癌細胞 (HeLa)、イヌ腎臓細胞 (MDCK；バッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A)、ヒト肺細胞 (W138)；ヒト肝細胞 (HepG2)、マウス乳腺腫瘍 (MMT060562)、例えばMather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68) に記載されるTRI細胞、MRC5細胞、およびFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、DHFR-CHO細胞 (Urlaub, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220) を含むチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、及びY0、NS0 およびSp2/0などの骨髓腫細胞株を含む。抗体産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞系の総説については、例えばYazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, 248巻, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), 頁255-268を参照。

【0229】

C. 薬学的製剤

本明細書に記載の複合体の薬学的製剤は、所望の程度の純度を有するその複合体と任意の薬学的に許容される担体 (RemingtonのPharmaceutical Sciences 第16版, Osol, A. 編: Williams and Wilkins PA, USA (1980)) とを、凍結乾燥製剤または水性溶液の形態で混合することによって調製される。薬学的に許容される担体は、使用される投薬量および濃度でレシピエントに毒性でなく、そしてこれには、限定しないが、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸のような緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチオルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジン；マンノサッカライド、ジサッカライド、およびグルコース、マンノースまたはデキストリンを含む他の炭水化物；キレート剤、例えば、EDTA；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム、金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び/又はポリエチレングリコール (PEG) 等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。本明細書における典型的な薬学的に許容される担体は、介在性薬物分散剤、例えば、水溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質 (sHASEGP)、例えば、rhuPH20 (HYLINEX (登録商標)、Baxter International, Inc.) などのヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質を更に含む。所定の典型的なsHASEGP及び使用法は、rhuPH20を含み、米国特許出願公開第2005/0260186号及び第2006/0104968に開示されている。一態様において、sHASEGPは、コンドロイチナーゼなどの1つまたは複数の追加のグルコサミノグリカンと組み合わされる。

10

20

30

40

50

## 【0230】

典型的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第6267958号に記載されている。水性の抗体製剤は、米国特許第6171586号及び国際公開第2006/044908号に記載されているものが含まれ、後者の製剤はヒスチジン・酢酸緩衝液を含む。

## 【0231】

本明細書の製剤はまた、治療を受けている特定の徴候のために必要な一以上の活性成分、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものが含まれる場合がある。このような活性成分は、意図した目的のために有効な量で組み合わされ適切に存在する。

## 【0232】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術又は界面重合法によって、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン・マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル)、コロイド薬物送達系で(例えばリポソーム、アルブミンミクロスフィア、ミクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロ・エマルジョンで調製されたマイクロカプセルに封入されてもよい。このような技術は、RemingtonのPharmaceutical Sciences、第16版、O s o l , A . (編)(1980)に開示される。

10

## 【0233】

徐放性製剤が調製されてもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスが成形品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形をしている。

20

## 【0234】

インピボ投与に使用される製剤は、一般的に無菌である。無菌性は、例えば、滅菌濾過膜を通して濾過することにより、達成することができる。

## 【0235】

## D. 治療的方法及び組成物

本明細書で提供される任意の複合体を治療方法に使用することができる。

## 【0236】

一態様では、医薬として使用するための本明細書に報告される複合体が提供される。

## 【0237】

更なる態様では、癌の治療において使用するための本明細書に報告される複合体が提供される。

30

## 【0238】

所定の実施態様において、治療の方法における使用のための本明細書に報告される複合体が提供される。

## 【0239】

所定の実施態様において、本発明は、個体に本明細書に報告される複合体の有効量を投与することを含む、癌又はウイルス感染を有する個体を治療する方法における使用のための本明細書に報告される複合体を提供する。一つのそのような実施態様において、本方法は、例えば後述するように、少なくとも1つの追加の治療薬の有効量を個体に投与することを更に含む。

40

## 【0240】

更なる実施態様において、本発明は、癌細胞の除去に使用のための又はウイルス感染細胞の除去のための本明細書に報告される複合体を提供する。ある実施態様において、癌細胞又はウイルス感染細胞を除去/分解するために、本明細書に報告されるように複合体の有効量を個体に投与することを含む、個体において癌細胞の除去又はウイルス感染細胞の除去の方法に使用のための本明細書に報告される複合体を提供する。上記実施態様の何れかに記載の「個体」は、ヒトであり得る。

## 【0241】

更なる態様にて、本発明は、医薬の製造または調製における本明細書に報告される複合体の使用を提供する。一実施態様において、医薬は癌又はウイルス感染の治療のためであ

50

る。更なる実施態様において、本医薬は、癌又はウイルス感染を有する個体に、医薬の有効量を投与することを含む、癌又はウイルス感染を治療する方法で使用するためのものである。一つのそのような実施態様において、この方法は少なくとも1つのさらなる治療剤の有効量を個体に投与することを更に含む。更なる実施態様において、本医薬は癌細胞の除去ための又はウイルス感染細胞の除去のためのものである。更なる実施態様において、本医薬は癌細胞を除去又はウイルス感染細胞を除去するために、医薬の有効量を個体に投与することを含む、個体において癌細胞の除去又はウイルス感染細胞の除去の方法に使用のためのものである。上記実施態様の何れかに記載の「個体」は、ヒトであり得る。

#### 【0242】

更なる態様にて、本発明は、癌又はウイルス感染を治療するための方法を提供する。一実施態様において、本方法はそのような癌又はウイルス感染を有する個体に、本明細書に報告される複合体の有効量を投与することを含む。一つのそのような実施態様において、この方法は少なくとも1つのさらなる治療剤の有効量を個体に投与することを更に含む。上記実施態様の何れかに記載の「個体」は、ヒトであり得る。

10

#### 【0243】

更なる態様において、本発明は個体において癌細胞又はウイルス感染細胞の除去のための方法を提供する。一実施態様において、本方法は、癌細胞又はウイルス感染細胞を除去するために、本明細書に報告されるように個体に複合体の有効量を投与することを含む。一実施態様において、「個体」はヒトである。

#### 【0244】

20

更なる態様において、本発明は、例えば、上記の治療法のいずれかに使用される、本明細書に報告される複合体の何れかを含む薬学的製剤を提供する。一実施態様において、薬学的製剤は、本明細書で報告される複合体の何れか及び薬学的に許容される担体を含む。その他の実施態様において、薬学的製剤は、本明細書で報告される複合体の何れか、及び少なくとも1つの更なる治療剤を含む。

#### 【0245】

本発明の複合体は、治療において、単独で、または他の薬剤と組み合わせて使用することができる。例えば、本発明の複合体は、少なくとも一つの追加の治療剤と共に投与される。

#### 【0246】

30

上記のこうした併用療法は、併用投与（2つ以上の治療剤が、同一または別々の製剤に含まれている）、及び、本発明の複合体の投与が、追加の治療剤及び／又はアジュバントの投与の前、同時、及び／又はその後に起きうる分離投与を包含する。本発明の複合体はまた放射線治療と併用して用いることができる。

#### 【0247】

本発明の複合体（及び任意の追加の治療剤）は、任意の適切な手段によって投与することができ、経口、肺内、および鼻腔内、及び局所治療が所望される場合病巣内投与が含まれる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与が含まれる。投薬は、その投与が短期間か又は長期であるかどうかに部分的に依存し、任意の適切な経路、例えば、静脈内または皮下注射などの注射により行うことができる。限定するものではないが、単回又は様々な時点にわたる複数回投与、ボーラス投与、及びパルス注入を含む様々な投与スケジュールがここで考えられる。

40

#### 【0248】

本発明の複合体は良好な医療行為に合致した方法で処方され、投与され、投薬される。この観点において考慮すべき要因は、治療すべき特定の障害、治療すべき特定の哺乳類、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤送達部位、投与方法、投与日程及び医療従事者が知る他の要因を包含する。複合体は、必要ではないが任意で、問題となる障害の予防又は治療のために、現在使用中の一又は複数の薬剤とともに処方される。かかる他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する複合体の量、疾患又は治療のタイプ、及び上で検討した他の因子に依存する。これらは一般的には本明細書に記載されるのと同じ用量及び投与経路にお

50

いて、又は、本明細書に記載された用量の 1 % から 99 % で、又は経験的に / 臨床的に妥当であると決定された任意の用量及び任意の経路により使用される。

#### 【 0249 】

疾患の予防又は治療のためには、本発明の複合体の適切な用量（単独で使用されるか、又は、一以上の更なる治療的薬剤との組み合わされる場合）は治療すべき疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度及び経過、複合体を予防又は治療目的のいずれにおいて投与するか、以前の治療、患者の臨床的履歴及び複合体に対する応答性、及び担当医の判断に依存する。複合体は、患者に対して、単回、又は一連の治療にわたって適切に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば一回以上の別個の投与によるか、連続注入によるかに関わらず、複合体約  $1 \mu\text{g} / \text{kg}$  から  $15 \text{mg} / \text{kg}$ （例えば  $0.5 \text{mg} / \text{kg}$  から  $10 \text{mg} / \text{kg}$ ）が患者への投与のための初期候補用量となり得る。1つの典型的な一日当たり用量は上記した要因に応じて約  $1 \mu\text{g} / \text{kg}$  から  $100 \text{mg} / \text{kg}$  又はそれ以上の範囲である。数日間以上に渡る反復投与の場合には、状態に応じて、治療は疾患症状の望まれる抑制が起こるまで持続するであろう。1つの例示される抗体用量は約  $0.05 \text{mg} / \text{kg}$  から約  $10 \text{mg} / \text{kg}$  の範囲である。従って、約  $0.5 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $2.0 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $4.0 \text{mg} / \text{kg}$  又は  $10 \text{mg} / \text{kg}$  の1つ以上の用量（又はこれらの何れかの組み合わせ）を患者に投与してよい。このような用量は断続的に、例えば毎週又は3週毎（例えば患者が約2から約20、例えば抗体の約6投与量を受けるように）投与してよい。初期の高負荷投与量の後に一以上の低投与量が投与され得る。しかしながら、他の投与量レジメンも有益であり得る。この治療の進行は、従来技術及びアッセイにより容易にモニターされる。

#### 【 0250 】

上記の製剤または治療方法のいずれかが、本明細書に報告される複合体の代わりか又は複合体に加えて、本発明のイムノコンジュゲートを用いて行うことができる事が理解される。

#### 【 0251 】

本明細書に報告される一態様は、患者の癌又はウイルス感染を治療する方法において使用のための本明細書に報告される複合体であり、本複合体は複合体に含まれるウイルス由来ペプチドによる患者の免疫感作の前、同時又は後で投与されるべきである。

#### 【 0252 】

本明細書に報告される一態様は、複合体に含まれるウイルス由来ペプチドに対する免疫感作と併用して癌又はウイルス感染を治療するための医薬の製造のための本明細書に報告される複合体の使用である。

#### 【 0253 】

第一段階において、複合体に含有されるようなウイルス由来ペプチドが治療されるべき個体に最初に投与される。所定の期間の後、即ち4日と28日の間で、本明細書に報告される複合体が個体に投与される。

#### 【 0254 】

ウイルス由来ペプチドのこの連続かつ分離した適用により、本明細書で報告される複合体の第一段階単独及び第二段階において、ウイルス由来ペプチド特異的T細胞の数を増加させ、よって治療の有効性を増加させることができる。

#### 【 0255 】

##### I I I . 製造品

本発明の他の態様では、上記の疾患の治療、予防及び / 又は診断に有用な物質を含む製造品が提供される。製造品は、容器とラベルまたは容器上にある又は容器に付属するパッケージ挿入物を含む。好適な容器は、例としてボトル、バイアル、シリング、IV輸液バッグ等を含む。容器はガラス又はプラスチックなどの様々な物質から形成されうる。容器は、疾患の治療、予防、及び / 又は診断に有効である、それ自体か、又はその他の組成物と併用される化合物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針による穴あきストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組

10

20

30

40

50

成物中の少なくとも一の活性剤は本発明の複合体である。ラベルまたはパッケージ挿入物は、組成物が特定の症状の治療のために使用されることを示している。更に、製造品は、(a) 本発明の複合体を含有する組成物を中に収容する第一の容器と (b) 更なる細胞障害剤又は別の治療薬を含有する組成物を中に収容する第二の容器とを含みうる。本発明の本実施態様における製造品は、組成物が特定の疾患を治療することに用いることができることを示すパッケージ挿入物をさらに含んでいてもよい。別法として、または加えて、製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えは注射用静菌水 (BWF I)、リン酸緩衝化塩水、リンガー溶液およびデキストロース溶液を含む第二 (または第三) の容器をさらに含んでもよい。これは、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、およびシリングを含む、商業的およびユーザーの立場から望まれる他の物質のさらに含んでもよい。

10

上記の製造品のいずれかは、本明細書に報告される複合体の代わりか又はそれに加えて、本発明のイムノコンジュゲートを含み得ることが理解される。

#### 【0256】

#### I V . 実施例

以下は本発明の方法および組成物の例である。上記提供される一般的な説明を前提として、他の様々な実施態様が実施され得ることが理解される。

#### 【0257】

#### 実施例 1 :

ヒトドナーからの CMV 特異的 CD8 陽性 T 細胞の単離及び刺激のための手順

#### PBL (複数) の単離

20

PBL は、ヒトのドナーの血液からフィコール勾配遠心分離により単離した (Greiner bio-one, カタログ番号 227290)。PBL は 5 % のヒト血清 (Sigma カタログ番号 H 2520)、2 mM の L グルタミン (PAN Biotech、カタログ番号 P 04-80100)、100 µg / ml のペニシリン / ストレプトマイシン (Roche、カタログ番号 14001100) を補充された RPMI 中で培養した。

#### 【0258】

#### PBL (複数) の刺激

細胞 ( $2 \times 10^7$  細胞 / ml) は、50 µg / ml の CMV pp65 由来ペプチド (配列番号 01) を補充した細胞培養培地で、細胞培養条件下で (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>、80 % 湿度) 2 時間培養した。その後、細胞懸濁液を培養培地で 20 倍希釈し、96 のウェル当たり  $2 \times 10^5$  細胞の播種密度で平底 96 ウェルプレート中で培養した。4 から 5 日後、20 U / ml の IL-2 (Roche、カタログ番号 11011456001)、25 ng / ml の IL-7 (Peprotech、カタログ番号 200-01) 及び 25 ng / ml の IL-15 (Peprotech、カタログ番号 200-15) が添加され、細胞を更に 7 ~ 8 日間培養した。T 細胞の刺激は、細胞クラスターとして顕微鏡下で目に見える。

30

#### 【0259】

#### PBL (複数) の再刺激

T 細胞は、ペプチドをパルスした同じドナーの自己の一次 PBL (新たに調製され又は凍結ストックから由来したのいずれか) である刺激細胞と共に培養した。刺激細胞を、上記のようにペプチドでパルスした。ペプチドのインキュベーションの 2 時間後に、PBL を放射線照射し (4000 ラド; STS GmbH OB29 Nr. 9510-5)、ペプチドを含まない培養培地で 2 回洗浄した。再刺激は、96 ウェルプレートの丸底プレート中で行った。96 ウェルあたり、 $8 \times 10^4$  から  $1 \times 10^5$  の刺激細胞を使用した。初代培養からの細胞を培養培地で 2 回洗浄し、200 µl の培養培地中に再懸濁し、80 µl を刺激細胞の各ウェルに移した。3 日後、20 U / ml の IL-2、25 ng / ml の IL-7 及び 25 ng / ml の IL-15 が添加された。細胞は増殖し、新鮮な培地を使用して新しいウェル中で 2 ~ 3 日ごとに増殖された。

40

#### 【0260】

#### T 細胞の分析

細胞は、CD8 の発現 (BD、カタログ番号 345772) 及び CMV 特異的 T 細胞受

50

容体（Proimmune、カタログ番号F 0 0 8 - 4 A - E）について染色され、F A C Sで分析した。

【0261】

細胞培養培地

R P M I 1 6 4 0 (PAN Biotech, カタログ番号P 0 4 - 1 7 5 0 0), 5 %のヒト血清 (H S ; Sigmaカタログ番号H 2 5 2 0)、2 mMのL - グルタミン (PAN Biotech、カタログ番号P 0 4 - 8 0 1 0 0)、1 0 0  $\mu$  g / m lのペニシリン / ストレプトマイシン (Roche、カタログ番号1 4 0 0 1 1 0 0)。

【0262】

結果

10

末梢血リンパ球 (P B L) に由来する4人のヒトドナーのF A C S分析を実施した。細胞を、A P C結合P r o 5五量体 (Proimmune、カタログ番号F 0 0 8 - 4 A - E)と組み合わされたF I T C結合抗C D 8抗体 (BD、カタログ番号3 4 5 7 7 2)で標識し、C M V由来ペプチド (N L V P M V A T V (配列番号0 1))を搭載した、T細胞受容体 (T C R)を認識するM H C - クラスI (H L A - A \* 0 2 0 1)を担持するT細胞を染色した。結果は図4を参照。第0日に、ドナー1と4は少数のC M V特異的C D 8 T細胞を保有する (それぞれ0 . 0 8 %と0 . 1 %)。ドナー2と3は、より多くのC M V特異的C D 8 T細胞を末梢血中に保有する (それぞれ0 . 2 5 %と3 . 1 2 %)。C M V由来ペプチドでパルスした自己細胞による刺激の14日後、ドナー2と3のみがC M V特異的C D 8 T細胞の有意な増加を示し (それぞれ6 . 2 %と7 1 . 2 %)、一方ドナー1と4はC M V特異的C D 8 T細胞数の増加を示していない (それぞれ0 . 0 1 %と0 . 0 5 %)。C M V由来ペプチドでパルスした自己細胞による二次刺激の14日後、ドナー2と3はC M V特異的C D 8 T細胞の更なる増加を示している (それぞれ1 5 . 1 %と9 6 . 6 %)。

20

【0263】

実施例2

細胞毒性試験

急性リンパ芽球性白血病細胞M N 6 0は、A \* 0 2 0 1、H L A - 対立遺伝子を保有する。M N 6 0細胞 (1  $\times$  1 0  $^6$  細胞 / m l) 5 0  $\mu$  g / m lのC M V p p 6 5ペプチド

(配列番号0 1)と共に細胞培養条件下で (3 7 ° C、5 % C O <sub>2</sub>、8 0 % 湿度) 4 5分間インキュベートした。インキュベーションによってH L A - A \* 0 2 0 1ペプチド結合の溝においてペプチド交換を生じる。ペプチド交換したM N 6 0細胞は遠心分離されP B S (PanBiotech、カタログ番号P 0 4 - 3 6 5 0 0)で1  $\times$  1 0  $^6$  細胞 / m lの密度へ希釈され、1  $\mu$  Mの細胞トレーサカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル (CFSE, Invitrogen、カタログ番号3 4 5 5 4)で、室温 (R T) で1 5分間染色した。細胞をその後P B Sで一回洗浄し、A I M - V培地で1  $\times$  1 0  $^5$  細胞 / m lに希釈した (Gibco、カタログ番号0 8 7 0 1 1 2 D K)。アッセイにおいて、M N 6 0細胞 (標的細胞)を9 6 ウエル丸底プレート中で、C M V特異的ヒトドナー3由来のC D 8 <sup>+</sup> - T細胞 (エフェクター細胞、実施例1を参照のこと)と細胞培養条件下で4時間共培養した。エフェクター対標的細胞の比は4 : 1であった。死滅細胞を、1  $\mu$  l / 1 0 0  $\mu$  lのヨウ化プロピジウム (P I、Sigma、カタログ番号P - 4 8 6 4)で染色し、F A C Sで分析した。

30

【0264】

結果

C M Vペプチドを負荷されたM N 6 0腫瘍細胞の溶解を介する刺激されたC T Lの細胞溶解能力を分析するためにフローサイトメトリー分析を行った。

40

【0265】

図5 aに、C M V由来ペプチドを負荷していないM N 6 0細胞の共培養物のF A C S分析を示す。M N 6 0細胞は、F I T C陽性である。エフェクター細胞は、F I T C - 陰性である。死滅細胞は、P I陽性であり、生細胞は、P I陰性である。C M V由来ペプチド

50

が負荷されていない場合、M N 6 0 細胞の 8 5 % 以上が生存していることが見てとれる。図 5 b に、C M V 由来ペプチドを負荷されたM N 6 0 細胞のF A C S 分析を示す。M N 6 0 細胞の 8 0 % 以上が死んでいるが (Q 2 とQ 4 ) 、一方図 5 a 及び図 5 b に示すF A C S 分析の間ににおいて生きているエフェクター細胞と死んだエフェクター細胞の割合が顕著に変化しないこと (図 5 a と図 5 b のQ 1 とQ 3 を比較) が見てとれ、C M V - ペプチド負荷標的細胞の特異的溶解を示している。

【 0 2 6 6 】

エフェクター対標的細胞の比率に依存する、C M V ペプチドを負荷されたM N 6 0 腫瘍細胞の溶解を介する刺激されたC T L の細胞溶解能力を分析するためのフローサイトメトリー分析。

10

【 0 2 6 7 】

細胞毒性アッセイは上述のように実施した。エフェクター細胞と標的細胞の様々な比を、標的細胞あたり 0 . 5 エフェクター細胞から標的細胞あたり 4 エフェクター細胞の範囲で適用した (図 6 参照)。インキュベーション時間は 4 時間であった。C M V 由来ペプチドを負荷されなかったM N 6 0 細胞は、エフェクター対標的の比率が増加し、即ち、0 . 5 : 1 から 4 : 1 の比率を伴い 8 % から 1 3 % まで、死滅細胞の数の増加を示していない。

【 0 2 6 8 】

C M V 由来ペプチドを負荷されたM N 6 0 細胞のほぼ 2 0 % は、4 時間以内にエフェクターの標的に対する比率が 0 . 5 : 1 と低く、すでに死滅している。

20

【 0 2 6 9 】

死滅した細胞の数は、エフェクター対標的の比率の増加に伴い急激に増加し、標的細胞あたりのエフェクター細胞の比率が 4 : 1 で最大 8 3 % にまで達する。

【 0 2 7 0 】

D N A の調製、トランスフェクション、発現、精製及び分析

D N A の調製

細菌の一晩 L B 培養液 2 5 0 m l を回収し、プラスミドD N A を、製造業者のプロトコルに従って抽出した (High speed Maxi kit, Qiagen、カタログ番号 1 2 6 6 3 )。得られたプラスミドD N A を 1 m l のT E 緩衝液中に溶出し、D N A 濃度を分光光度測定により測定した (Epoch, BioTek)。

30

【 0 2 7 1 】

最終的な発現ベクターは、以下の要素を含んでいた。

- エンドヌクレアーゼ制限部位 H i n d I I I 、 N h e I 、
- C M V - プロモーター、
- 5 ' U T R 1 (ヒトC M V から由来)、
- イントロンA、
- 5 ' U T R 2 ,
- アンピシリン耐性遺伝子、
- B G H ポリA部位 (ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル)、
- p U C O r i .

40

【 0 2 7 2 】

複合体の要素のアミノ酸配列

【 0 2 7 3 】

C M V p p 6 5 ペプチド : 配列番号 0 1

N L V P M V A T V

【 0 2 7 4 】

リンカー 1 : 配列番号 2 1

G G G G S G G G G S G G G G S

【 0 2 7 5 】

50

2 - ミクログロブリン : 配列番号 1 0

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

【 0 2 7 6 】

リンカー 2 : 配列番号 2 2

G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S

【 0 2 7 7 】

H L A - A \* 0 2 0 1 1 - 3 : 配列番号 1 1

G S H S M R Y F F T S V S R P G R G E P R F I A V G Y V D D T Q F V R F D S D A 10  
A S Q R M E P R A P W I E Q E G P E Y W D G E T R K V K A H S Q T H R V D L G T  
L R G Y Y N Q S E A G S H T V Q R M Y G C D V G S D W R F L R G Y H Q Y A Y D G  
K D Y I A L K E D L R S W T A A D M A A Q T T K H K W E A A H V A E Q L R A Y L  
E G T C V E W L R R Y L E N G K E T L Q R T D A P K T H M T H H A V S D H E A T  
L R C W A L S F Y P A E I T L T W Q R D G E D Q T Q D T E L V E T R P A G D G T  
F Q K W A A V V V P S G Q E Q R Y T C H V Q H E G L P K P L T L R W

【 0 2 7 8 】

リンカー 3 : 配列番号 1 2

G S

【 0 2 7 9 】

リンカー 4 : 配列番号 2 2

G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S

【 0 2 8 0 】

I g 軽鎖 : 配列番号 4 1

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P  
G Q A P R L L I Y D A S K R A T G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P  
E D F A V Y Y C Q Q R S K W P P W T F G Q G T K V E S K R T V A A P S V F I F P  
P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S  
Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q  
G L S S P V T K S F N R G E C 30

【 0 2 8 1 】

I g 重鎖 ( I g G 1 - L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A 变異体 ) : 配列番号 4 2

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

【 0 2 8 2 】

I g 重鎖 ( ノブ变異を有する I g G 1 - L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A 变異体 ) : 配列番号 4 3

Q V E L V E S G G G V V Q P G R S Q R L S C A A S G F T F S S Y G M H W V R Q A  
P G K G L E W V A I I W F D G S S T Y Y A D S V R G R F T I S R D N S K N T L Y  
L Q M N S L R A E D T A V Y F C A R E L G R R Y F D L W G R G T L V S V S S A S  
T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N 50

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

## 【0283】

Ig重鎖（ホール変異を有するIgG1-L234A、L235A変異体）：配列番号4 10  
 4

Q V E L V E S G G G V V Q P G R S Q R L S C A A S G F T F S S Y G M H W V R Q A  
 P G K G L E W V A I I W F D G S S T Y Y A D S V R G R F T I S R D N S K N T L Y  
 L Q M N S L R A E D T A V Y F C A R E L G R R Y F D L W G R G T L V S V S S A S  
 T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N  
 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I  
 C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E A A G G P S  
 V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V  
 D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y  
 K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V C T L P P S R D E L T 20  
 K N Q V S L S C A V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D  
 S D G S F F L V S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K  
 S L S L S P G K

## 【0284】

Ig重鎖Fc-領域（ホール変異を有するIgG1-L234A、L235A変異体Fc-領域）：配列番号45

E P K S A D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R  
 T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q  
 Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T  
 I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P C R D E L T K N Q V S L W C L V K G F Y P S 30  
 D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S  
 R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

## 【0285】

s c F v : 配列番号46

Q V E L V E S G G G V V Q P G R S Q R L S C A A S G F T F S S Y G M H W V R Q A  
 P G K C L E W V A I I W F D G S S T Y Y A D S V R G R F T I S R D N S K N T L Y  
 L Q M N S L R A E D T A V Y F C A R E L G R R Y F D L W G R G T L V S V S S G G  
 G G S G G G G S G G G G S G G G G S E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S  
 C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S K R A T G I P A R F  
 S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S K W P P W T F G C G 40  
 T K V E S K

## 【0286】

トランスフェクション

HEK293細胞を、トランスフェクションの前日に $8 \times 10^5$ 細胞/m<sup>2</sup>に希釈した。約1~1.6×10<sup>6</sup>細胞/m<sup>2</sup>を、製造業者のプロトコールに従ってトランスフェクトした。30m<sup>2</sup>の最終トランスフェクション容積に対して、30μgのDNAをOpti-MEM（登録商標）I還元型血清培地（Gibco、カタログ番号31985070）で最終容量1m<sup>2</sup>に希釈した。1μgのDNAあたり2μlの293fectin<sup>TM</sup>試薬（Invitrogen、カタログ番号12347019）をOpti-MEM（登録商標）培地で1ミリリットルの最終容量に均等に希釈し、5分間インキュベートした。インキュベーシ 50

ヨンの後、希釈されたDNAは、希釈された293fection<sup>TM</sup>試薬に添加され、穏やかに混合し、更に20~30分間インキュベートし、その後HEK293細胞の28ミリリットルに滴下ピペットイングし、30mlの最終容量を得た。細胞は、125rpmで回転するオービタルシェーカーで細胞培養条件下(37°、8%CO<sub>2</sub>、80%湿度)でインキュベートし、72時間後に回収した。回収物は、1000rpmで10分間、3000rpmで10分間遠心分離し、22μmの滅菌フィルターを通して濾過した(Millipore、カタログ番号SCGPUT05RE)。

#### 【0287】

##### ウェスタンブロッティング

細胞培養上清の500μlをポールナノセップオメガメンブレン30KD遠心分離デバイス(Pall、カタログ番号OD030C33)を用いて50μlの体積に濃縮した。各濃度の17.5μlを、4×XTサンプルバッファー(Bio Rad、カタログ番号161-0791)及び20×XT還元剤(BioRad、カタログ番号161-0792)で最終体積25μlに希釈し、96°で8分間加熱し、4~12%のクライテリオンXTプレキャストゲル(カタログ番号345-0124)へ適用した。ブロッティングは、トランスプロットピュアニトロセルロース膜(0.45μm)(Bio Rad、カタログ番号162-0117)上で、20Vで30分間、トランスプロットSDセミドライトランസ്ഫা-セル(Bio Rad)を用いて行った。膜のブロッキングは、室温で1時間、1Xウエスタンブロッキング試薬(Roche、カタログ番号11921681001)を用いて行った。染色は、室温で1時間、ペルオキシダーゼ結合ポリクローナルウサギ抗ヒト 軽鎖(DAKO、カタログ番号P0129、1:3000に希釈)、及びポリクローナルウサギ抗ヒトIgG抗体HRPコンジュゲート(DAKO、カタログ番号P0214、1:5000に希釈)を用いて行った。発光検出はLUMI-イメージヤF1(Roche)を用いて行った。

#### 【0288】

##### 精製

細胞を遠心分離によって培地から取り出した。複合体は、プロテインAアフィニティークロマトグラフィー(AKTA-Avant上のMabSelectセファロース)により上清から精製した。溶出された複合体は、アミコン遠心チューブを用いて3mg/mlのタンパク質濃度に濃縮した。アリコートを、サイズ排除クロマトグラフィーで分析した(HPLC TSKgel GFC300 Sys89)。スーパーデックス200上で調製用SECを行い、凝集物を除去し、20mMのヒスチジン、140mMのNaCl、pH6.0の中に融合タンパク質をバッファリングした。溶出された複合体は、アミコン遠心管を用いて1mg/mlのタンパク質濃度に濃縮し、滅菌濾過した(0.2μmのポアサイズ)。

#### 【0289】

##### 分析論

複合体サンプルは、UV分光光度計を用いてOD280により分析し、溶液中のタンパク質濃度を決定した。このために必要な吸光係数は、Paceに記載のアミノ酸配列から計算した(Pace, et al., Protein Science 4 (1995) 2411-2423)。試料中において単量体で、凝集し、分解した種の含有量を決定するために、サイズ排除クロマトグラフィー(SE-HPLC)を、移動相として、0.25MのKCl、pHが7.0を含む0.2Mのリン酸カリウム緩衝液を用いて、TSK-Gel 300 SWXL又はスーパーデックス200カラムで行った。デシル硫酸ナトリウム(SDS)ポリアクリルアミドゲル電気泳動(還元及び非還元)を、製品関連の分解生成物及び無関係な不純物に関して、複合体製剤の純度を分析するために実施した。エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)を、還元され(TCEP)、脱グリコシル化した(N-グリコシダーゼF)のサンプルを用いて行い、各鎖の正確な質量/同一性を確認し、化学的修飾を検出した。脱グリコシル化されたサンプルのESI-MSを行い、完全に構築されたタンパク質の性質と質を分析し、生成物に関連する潜在的な副生成物を検出するために行った。

#### 【0290】

10

20

20

30

40

50

## S D S - P A G E 及びクーマシー染色の方法

デバイス：インビトロジエン XCell Sure Lock Mini-Cell

ゲル：4 - 20 % ト里斯 - グリシングル、インビトロジエン E C 6 0 2 5 B O X

緩衝液：ト里斯 - グリシン S D S ランニングバッファー ( 10 × ) 、インビトロジエン L C 2 6 7 5 - 5

サンプルバッファー：ト里斯 - グリシン S D S ランニングバッファー ( 2 × ) 、インビトロジエン L C 2 6 7 6

還元緩衝液：N u P A G E サンプル還元剤 ( 10 × ) 、インビトロジエン N P 0 0 0 4

分子量マーカー：マーク 12 , 分子量標準、インビトロジエン L C 5 6 7 7

【 0 2 9 1 】

10

## タンパク質サンプル調製

サンプルを緩衝液により 1 m g / m l のタンパク質濃度に調整した。サンプルの還元のために以下の手順を行った：

- 還元緩衝液：4 m l のサンプルバッファー ( 2 × ) 及び 1 m l の還元緩衝液 ( 10 × )
- サンプルを 1 : 1 に還元緩衝液で希釈する
- 70 で 5 分間インキュベートする

ゲル電気泳動は、90 分間 125 V で行った。ゲルは Simply Blue Safe Stain ( Invitrogen 、カタログ番号 L C 6 0 6 5 ) で染色した。

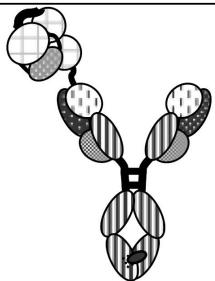
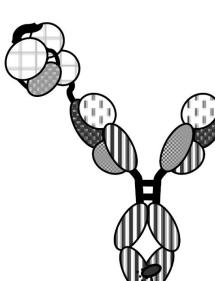
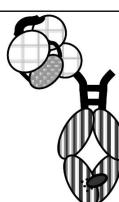
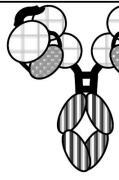
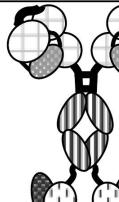
【 0 2 9 2 】

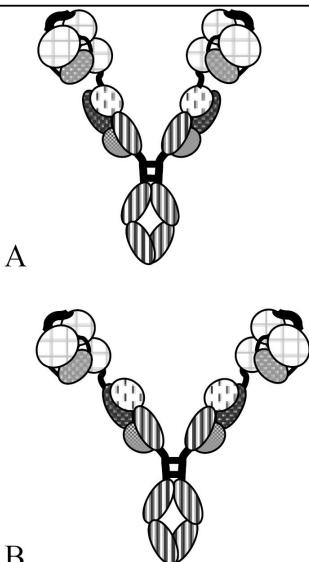
20

## 結果

## 表

番号	複合体に含まれる ポリペプチド	模式図	収率
1	<p>1. [CMV-pp65-ペプチド]-[リンカ ー 1]-[<math>\beta</math>2-ミクログロブリン]-[リ ンカー 2]-[HLA-A-<math>\alpha</math>1-<math>\alpha</math>2-<math>\alpha</math>3]-[リン カー 3]-[ホール変異を有する IgG1-L234A, L235A ]</p> <p>2. Ig 重鎖(ノブ変異を有する IgG1-L234A, L235A 変異体)</p> <p>3. Ig 軽鎖</p>		10 5 mg/l
2	<p>A:</p> <p>1. [CMV-pp65-ペプチド]-[リンカ ー 1]-[<math>\beta</math>2-ミクログロブリン]-[リ ンカー 2]-[HLA-A-<math>\alpha</math>1-<math>\alpha</math>2-<math>\alpha</math>3]-[リン カー 3]-[ホール変異を有する IgG1-L234A, L235A 変異体]</p> <p>2. IgG1-L234A, L235A 変異体 Fc- 領域ノブ変異体</p> <p>3. Ig 軽鎖</p> <p>B: Ig 軽鎖への融合</p>	<p>A</p> <p>B</p>	20 A: 5 -18 mg/l 30

番号	複合体に含まれる ポリペプチド	模式図	収率
3	<p>A:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>[CMV-pp65-ペプチド]-[リンカー1]-[β2-ミクログロブリン]-[リンカー2]-[HLA-A-α1-α2-α3]-[リンカー3]-[ホール変異を有する IgG1-L234A, L235A 変異体]</li> <li>ノブ変異を有する IgG1-L234A, L235A 変異体</li> <li>Ig 軽鎖</li> </ol> <p>B: Ig 軽鎖への融合</p>	 	A: 4 - 23 mg/l
4	<ol style="list-style-type: none"> <li>[CMV-pp65-ペプチド]-[リンカー1]-[β2-ミクログロブリン]-[リンカー2]-[HLA-A-α1-α2-α3]-[リンカー3]-[ホール変異を有する IgG1-L234A, L235A 変異体]</li> <li>ノブ変異を有する IgG1-L234A, L235A 変異体</li> </ol>		4 mg/l
5	<ol style="list-style-type: none"> <li>[CMV-pp65-ペプチド]-[リンカー1]-[β2-ミクログロブリン]-[リンカー2]-[HLA-A-α1-α2-α3]-[リンカー3]-[IgG1-L234A, L235 A-Fc-領域]</li> </ol>		4 mg/l
6	<ol style="list-style-type: none"> <li>[CMV-pp65-ペプチド]-[リンカー1]-[β2-ミクログロブリン]-[リンカー2]-[HLA-A-α1-α2-α3]-[リンカー3]-[IgG1-L234A, L235A 変異体 Fc-領域]-[リンカー4]-[scFv]</li> </ol>		< 1 μg/l

番号	複合体に含まれる ポリペプチド	模式図	収率
7	<p>A: 1. [CMV-pp65-ペプチド]-[リンカーネオペンドウ]-[β2-ミクログロブリン]-[リンカーネオペンドウ]-[HLA-A-α1-α2-α3]-[リンカーネオペンドウ]-[IgG1-L234A, L235A変異体]</p> <p>2. Ig 軽鎖</p> <p>B: Ig 軽鎖への融合</p>		10 $< 1 \mu\text{g/l}$ 20

## 【0293】

前の表に従って選択された複合体の番号 1 及び 2 a のクーマシー染色による SDS ゲル及び対応する SEC クロマトグラムを図 7 と 8 に示す。定義された複合体が得られることが分かる。

## 【0294】

## 実施例 4

## ヒト IgF - 1 R 陽性細胞株に対する MHC - 抗体融合体の結合

H460M2 細胞を、 AIM - V 培地で  $8 \times 10^5$  細胞 / ml に希釈した (Gibco、カタログ番号 0870112DK)。細胞懸濁液の 500  $\mu\text{l}$  を、本明細書に報告されるように 4 又は 37 の何れかで 1 時間、 10  $\mu\text{g}$  の複合体で染色した。その後、細胞を氷冷した AIM - V 培地で 1 回洗浄し、 R - PE にコンジュゲートしたヤギ F(ab')2 抗ヒト IgG (H + L) 抗体である (Dianova、カタログ番号 109-116-088、希釈 1 : 50) 第二の抗体で 4 で 30 分間染色した。その後、細胞を氷冷 AIM - V 培地で 1 回洗浄し、蛍光は、生細胞をゲーティングして FACS カントリー (BD Bioscience) を介して測定した。二重特異性抗体は、アイソタイプ対照として役割を果たし、抗 IgF - 1 R 抗体 (例えば国際公開第 2004/087756 号及び国際公開第 2007/115814 号を参照) は陽性対照として役割を果たした。

## 【0295】

## 結果

結果を図 9 に示す。PE - 蛍光測定のシフト (X 軸) を考慮すると、本明細書で報告されるように複合体は、対照抗体 (図 9 - 6) と比較して H460M2 標的細胞 (図 9 - 2) への結合には目に見える違いを示さない。また、本明細書に報告される複合体とのインキュベーションが 4 又は 37 で達成されるかの違いは無い (図 9 - 2 対図 9 - 3)。アイソタイプ対照との (図 9 - 4) 又は蛍光標識した二次抗体のみ (図 9 - 5) でのインキュベーションのどちらも PE の蛍光測定にいかなるシフトをも示さない。クラス I の MHC 分子の融合にも関わらず、本明細書に報告される複合体の抗体可変ドメインはなお H460M2 標的細胞へ結合する。

## 【0296】

前述の発明は、理解を明確にする目的のために図解及び実施例によってある程度詳細に

10

20

30

40

50

説明してきたが、説明や例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。すべての特許および本明細書に引用される科学文献の開示は参照によりその全体が援用される。

【0297】

実施例 5

抗原発現細胞のインビトロでの除去

I 2 4 標的細胞 ( $1 \times 10^5$  細胞 / m l) が、2 4 から 4 8 時間かけてウイルコガラスボトムディッシュ (FA. WillCo Wells BV, REF GWST-3522) 上で細胞培養培地 (2 mM の L - グルタミン、1 mM のビルビン酸ナトリウム、0.1 mM の N E A A、及び 10% (v / w) F C S を補充した R P M I 1 6 4 0) に播種された。 10

【0298】

ウイルコガラスボトムディッシュは 50  $\mu$  g / m l のポリ - L - リジン塩酸塩 (Sigma Aldrich、カタログ番号 P 2 6 5 8) で皿当たり 30 分間予めコーティングした。皿をコーティングした後に、徹底的に滅菌組織培養グレードの水でリーンスし、2 時間乾燥した。

【0299】

培養後、細胞培養培地は除去され、一の [ C M V - p p 6 5 - ペプチド ] - リンカー 1 ] - [ 2 - ミクログロブリン ] - リンカー 2 ] - [ H L A - A - 1 - 2 - 3 ] - リンカー 3 ] - [ ホール変異を有する I g G 1 - L 2 3 4 A、L 2 3 5 A 变異体 ] 融合ポリペプチド、一の I g G 1 - L 2 3 4 A、L 2 3 5 A 变異体 F c - 領域ノブ変異体ジスルフィド結合ポリペプチド及び一の I g 軽鎖を含んでなる抗原結合複合体であって、本明細書に報告されるようにヒト I G F - 1 R へ特異的に結合する複合体を、3 mM の K<sup>+</sup> クレブスリンガ - H E P E S 緩衝液 pH 7.3 (0.5 mM の D L - ジチオスレイトール、1 mM のアスコルビン酸、及び 4 mM のグルタチオンを補充した) 中で 5  $\mu$  g / m l の最終濃度になるよう添加された。 20

【0300】

T 細胞は標的細胞対エフェクター細胞比を 1 : 1 0 で添加した。イメージングはツァイスの Axiovert 135 顕微鏡で 4 時間行った。

【0301】

結果

図 1 0 に、一の [ C M V - p p 6 5 - ペプチド ] - リンカー 1 ] - [ 2 - ミクログロブリン ] - リンカー 2 ] - [ H L A - A - 1 - 2 - 3 ] - リンカー 3 ] - [ ホール変異を有する I g G 1 - L 2 3 4 A、L 2 3 5 A 变異体 ] 融合ポリペプチド、一の I g G 1 - L 2 3 4 A、L 2 3 5 A 变異体 F c - 領域ノブ変異体ジスルフィド結合ポリペプチド及び一の I g 軽鎖を含んでなる抗原結合複合体であって、ヒト I G F - 1 R へ特異的に結合する抗原結合複合体のインキュベーションの顕微鏡像を示す。複合体はヒト I G F - 1 R を発現する I 2 4 3 T 3 細胞 (大きく粘着性に増殖している細胞、白い矢印) の溶解を媒介したことが分かる。溶解は、ヒト M V 特異的 T 細胞によって媒介される (各円形の小細胞、白矢印、又はアーマー状に移行する細胞、黒い矢印)。I 2 4 細胞は 5  $\mu$  g / m l の濃度での複合体、及び (H L A - A 0 2 0 1<sup>+</sup> / C M V ペプチドパルス化 A P C で予め活性化された) ヒト C M V 特異的 T 細胞とインキュベートした。時間の経過は、それぞれの画像の下に表示される。5 6 分及び 7 6 分での T 細胞との I 2 4 細胞の相互作用、及びその後 1 2 5 分後での I 2 4 細胞の崩壊に注意のこと。 30

【0302】

図 1 1 は、本明細書に報告される抗原結合複合体の欠如の下、ヒト C M V 特異的 T 細胞 (各円形の小細胞、白矢印、又はアーマー状に移行する細胞、黒い矢印) による I 2 4 3 T 3 細胞 (大きく粘着性に増殖している細胞、白い矢印) の溶解の欠如を示す対照の顕微鏡像である。I 2 4 細胞は (H L A - A 0 2 0 1<sup>+</sup> / C M V ペプチドパルス化 A P C で予め活性化された) 特異的細胞傷害性 T 細胞とともにインキュベートされる。時間の経過は、それぞれの画像の下に表示される。

【0303】

10

20

30

40

50

## 実施例 6

## 細胞毒性試験

細胞培養培地 (50 μl) を、バックグラウンド測定を行うため X c e l l i g e n c e 96 ウエル E - プレート (Roche、カタログ番号 05232368001) の各ウェルにピペッティングした。

## 【0304】

I 2 4 細胞は細胞培養培地中 (R P M I 1 6 4 0、2 mM の L - グルタミン、1 mM のピルビン酸ナトリウム、0.1 mM の N E A A、10% (w / v) の F C S) で 1 × 10 6 細胞 / ml に希釈され、50 μl (2 × 10<sup>4</sup> 細胞 / ウェル) を X c e l l i g e n c e 96 ウエルプレートの各ウェルに最終容量 100 μl にピペッティングし、24 時間培養した (37°、8% C O 2、80% 湿度)。24 時間後、培地を除去し、細胞を 200 μl の A I M - V (無血清培地 (Invitrogen) T 細胞培地 (カタログ番号) : 12055 - 083) 培地で洗浄した。本明細書に報告される、一の [ C M V - p p 6 5 - ペプチド] - リンカー-1] - [ 2 - ミクログロブリン] - リンカー-2] - [ H L A - A - 1 - 2 - 3] - リンカー-3] - [ ホール変異を有する I g G 1 - L 2 3 4 A、L 2 3 5 A 变異体] 融合ポリペプチド、一の I g G 1 - L 2 3 4 A、L 2 3 5 A 变異体 F c - 領域ノブ変異体ジスルフィド結合ポリペプチド及び一の I g 軽鎖を含んでなる抗原結合複合体であって、ヒト I G F - 1 R へ特異的に結合する抗原結合複合体が洗浄された標的細胞に、A I M - V 培地中で最終濃度 1 μg / ml になるよう添加された。エフェクター細胞がかなりの比率で 150 μl の最終容量となるまで A I M - V 培地に添加された。ヒト I G F - 1 R に対して指向されるアフコシル化 I g G 1 モノクローナル抗体 (抗 I G F - 1 R 抗体 - アフコシル化) 及び非結合ヒト抗ジゴキシゲニン抗体 (抗ジゴキシゲニン抗体) はそれぞれ、アイソタイプ対照体及び特異的抗体対照体とした。測定は X C E L L i g e n c e システム (Roche) によりそれぞれ 6 から 9 時間行った。

## 【0305】

## 結果

本明細書に報告される複合体は、ヒト C M V 特異的 T 細胞を介して H 4 6 0 M 2 の腫瘍細胞の溶解を引き起こす。

腫瘍細胞は、一の [ C M V - p p 6 5 - ペプチド] - リンカー-1] - [ 2 - ミクログロブリン] - リンカー-2] - [ H L A - A - 1 - 2 - 3] - リンカー-3] - [ ホール変異を有する I g G 1 - L 2 3 4 A、L 2 3 5 A 变異体] 融合ポリペプチド、一の I g G 1 - L 2 3 4 A、L 2 3 5 A 变異体 F c - 領域ノブ変異体ジスルフィド結合ポリペプチド及び一の I g 軽鎖を含んでなる複合体であって、ヒト I G F - 1 R、及び特異的 T 細胞へかなりの比率 (1 : 1.5 から 1 : 0.5) で特異的に結合する複合体の 1 μg / ml とともに 4 時間インキュベートした (図 12 を参照)。溶解のパーセンテージは、各棒の上に示されている。ヒト I G F - 1 R (M A B I G F - 1 R - a f u) に対して指向されるアフコシル化 I g G 1 モノクローナル抗体は有意な腫瘍細胞溶解を引き起こさなかった。

## 【0306】

本明細書に報告される複合体は、ヒト C M V 特異的 T 細胞を介して I 2 4 3 T 3 腫瘍細胞の溶解を引き起こす。

## 【0307】

標的細胞は、一の [ C M V - p p 6 5 - ペプチド] - リンカー-1] - [ 2 - ミクログロブリン] - リンカー-2] - [ H L A - A - 1 - 2 - 3] - リンカー-3] - [ ホール変異を有する I g G 1 - L 2 3 4 A、L 2 3 5 A 变異体] 融合ポリペプチド、一の I g G 1 - L 2 3 4 A、L 2 3 5 A 变異体 F c - 領域ノブ変異体ジスルフィド結合ポリペプチド及び一の I g 軽鎖を含んでなる抗原結合複合体であって、ヒト I G F - 1 R、及び特異的 T 細胞へかなりの比率 (1 : 1.5 から 1 : 0.5) で特異的に結合する抗原結合複合体の 1 μg / ml とともに 4 時間インキュベートした (図 13 を参照)。溶解のパーセンテージは、各棒の上に示されている。ヒト I G F - 1 R に対して指向されるアフコシル化

IgG1モノクローナル抗体（抗IGF-1R抗体-アフコシル化）及び非結合ヒト抗ジゴキシゲニン抗体（抗ジゴキシゲニン抗体）は標的細胞の著しい溶解を引き起こさなかった。

【0308】

実施例7

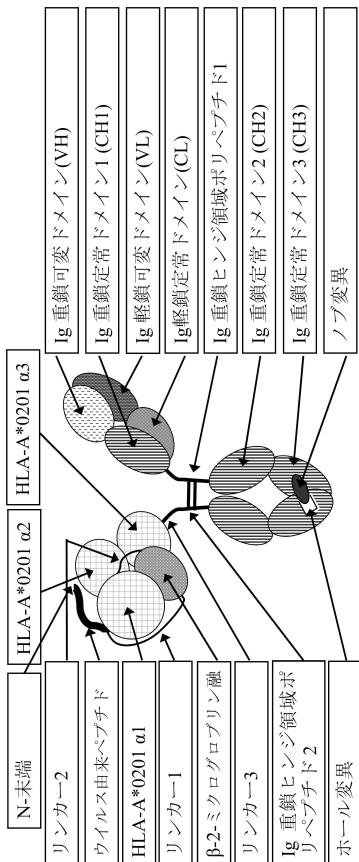
インビトロの有効性

IGF-1R陽性の肺腺癌細胞株H460M2を、hCMV由来ペプチド及び抗IGF-1R抗体及びヒトCMV-特異的CD8陽性T細胞を、エフェクター細胞対標的細胞の低比率（腫瘍細胞あたり1.5から0.5特異的T細胞）で含んでなる複合体の1μg/mlとインキュベートした。対照抗体は、糖操作型抗IGF-1R抗体であった。インキュベーション時間は6時間であった。複合体とのインキュベーションでH460M2腫瘍細胞の強力な除去をもたらす結果となる。

10

【図1】

Fig.1



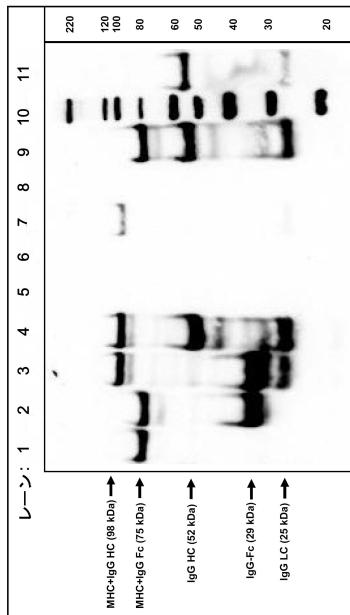
【図2】

Fig.2

シグナルペプチド	ウイルス由来ペプチド	B2-ミクログロブリン	MHC1 α1-α2-α3	抗体軽鎖/抗体重鎖ヒンジ領域を含むペプチド
シグナルペプチド	B2-ミクログロブリン	MHC1 α1-α2-α3	抗体軽鎖/抗体重鎖ヒンジ領域を含むペプチド	リベプチド
シグナルペプチド	MHC1 α1-α2-α3	B2-ミクログロブリン	抗体軽鎖/抗体重鎖ヒンジ領域を含むペプチド	リベプチド

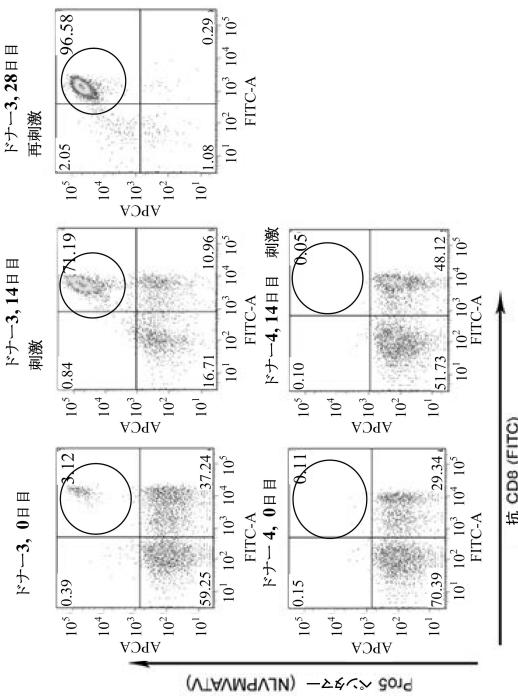
【图3】

Fig. 3



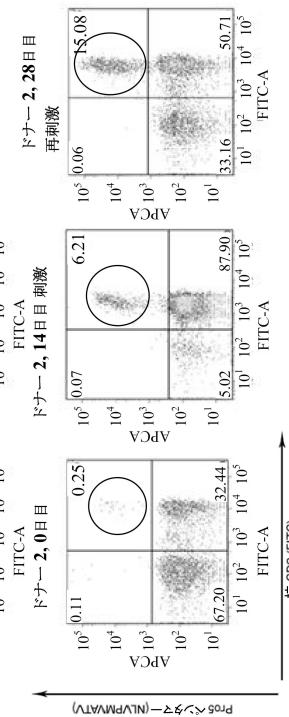
【図4b】

Fig. 4b



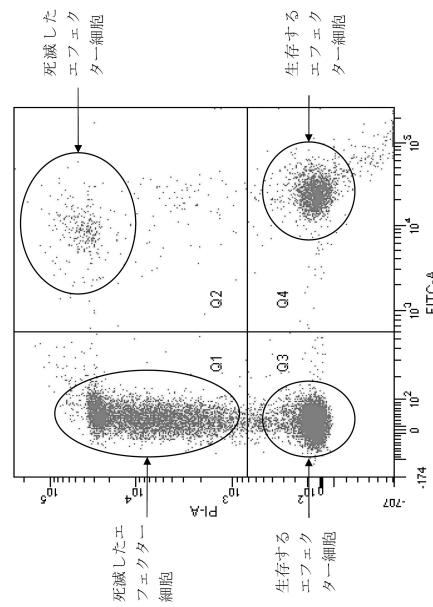
【図4a】

Fig. 4a



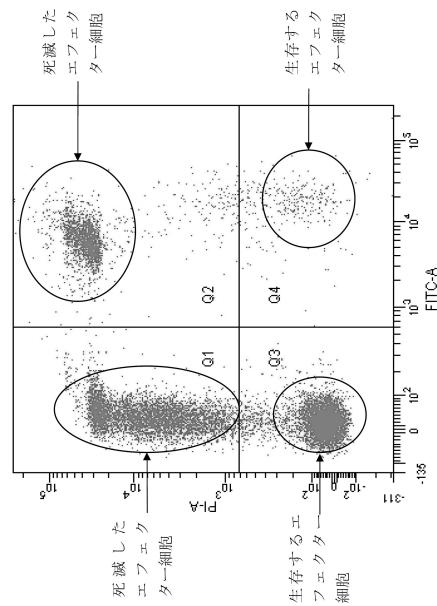
### 【図5a】

Fig. 5a



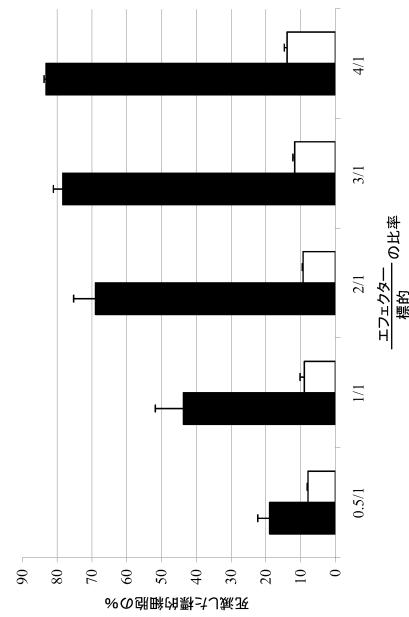
【図 5 b】

Fig.5b



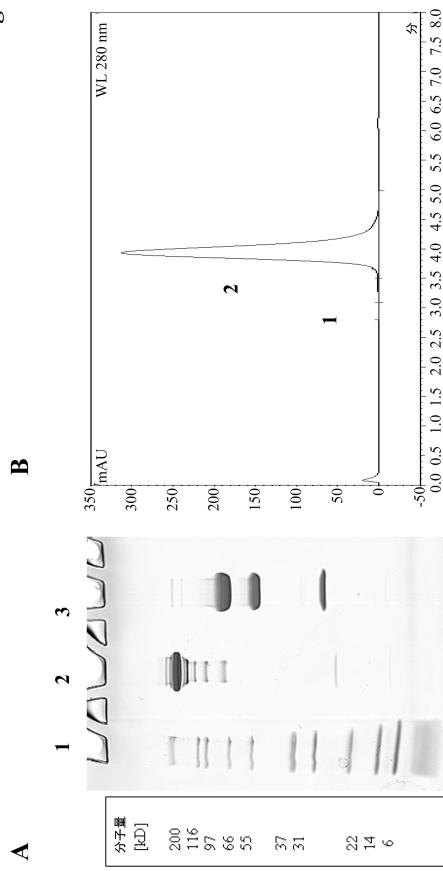
【図 6】

Fig. 6



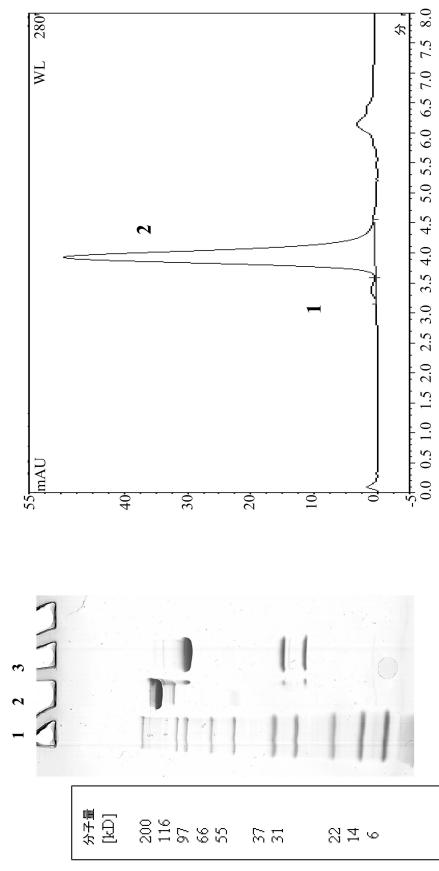
【図 7】

Fig.7



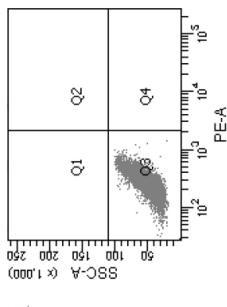
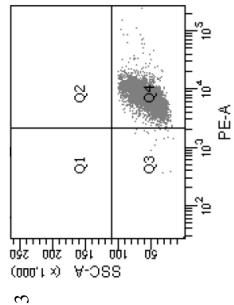
【図 8】

Fig.8

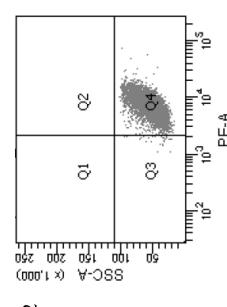


【図 9 a】

Fig. 9a



1

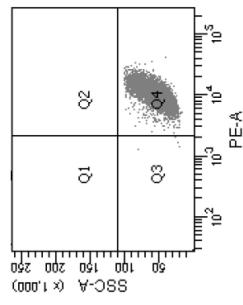


2

3

【図 9 b】

Fig. 9b



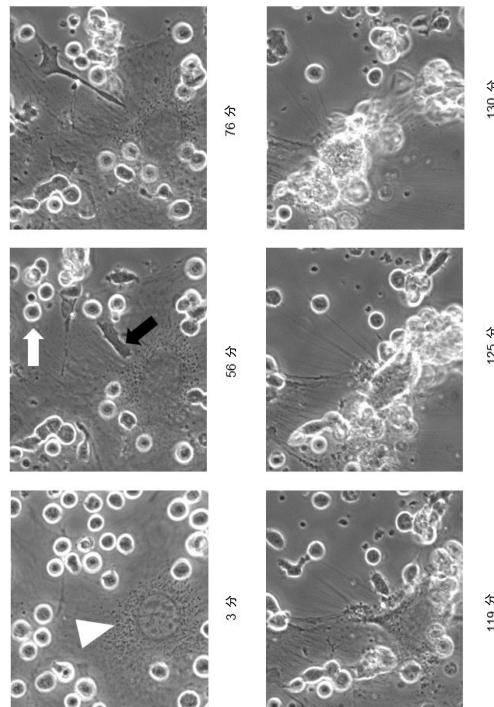
4

5

6

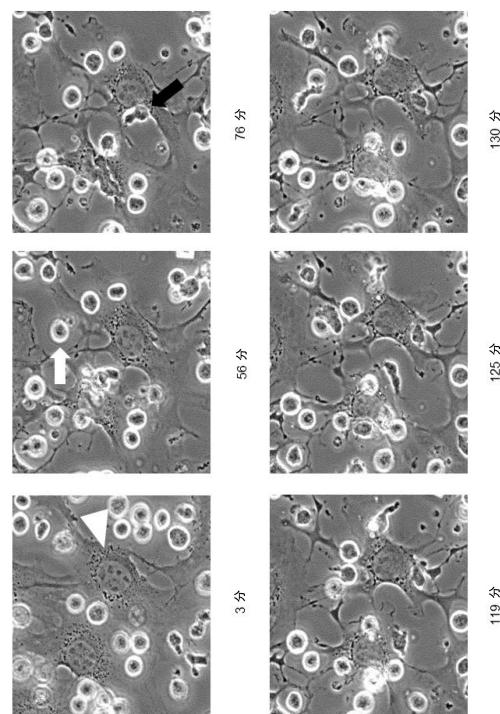
【図 10】

Fig. 10



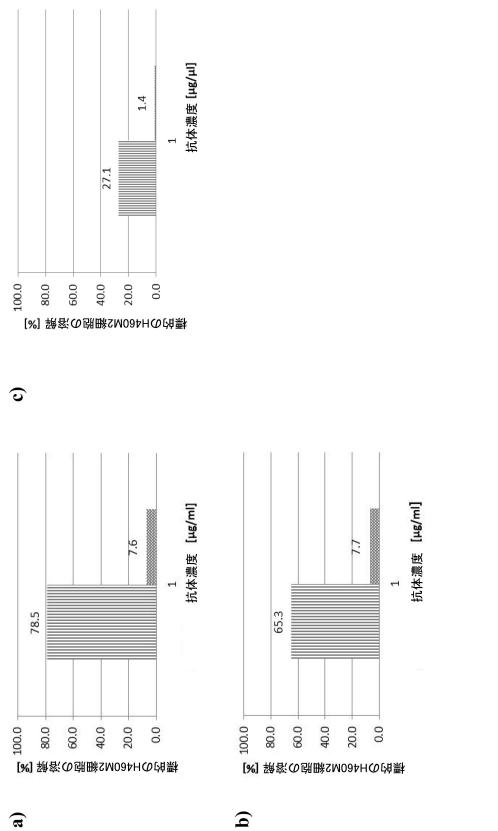
【図 11】

Fig. 11



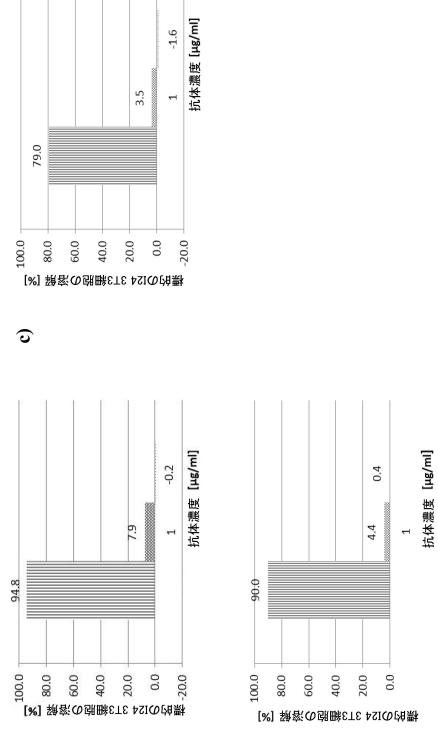
【図 1 2】

Fig. 12



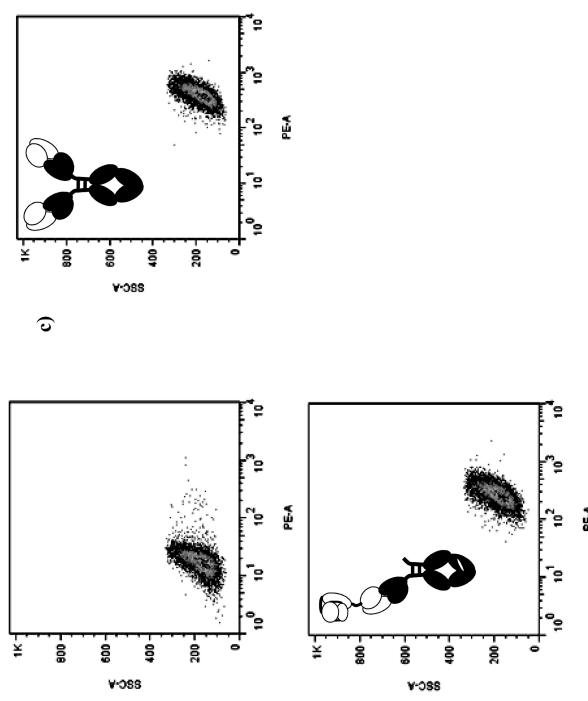
【図 1 3】

Fig. 13



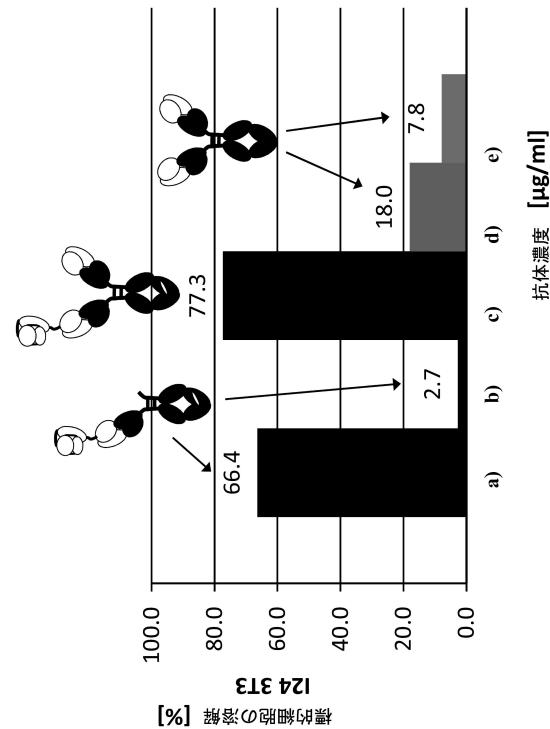
【図 1 4】

Fig. 14



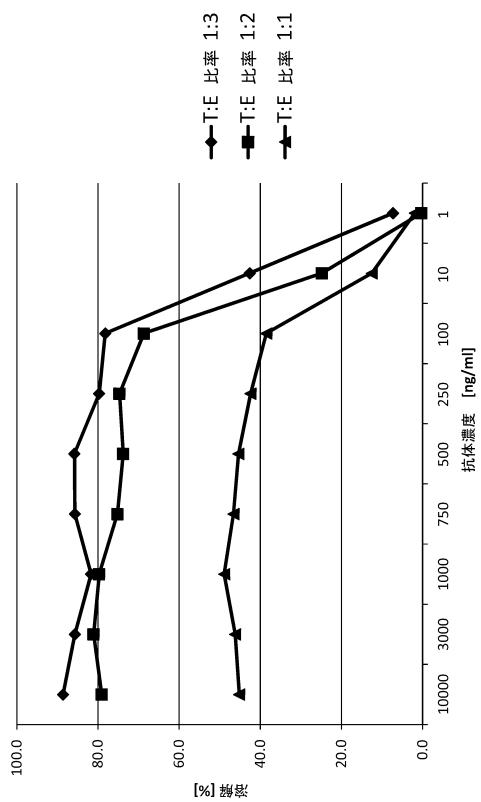
【図 1 5】

Fig. 15



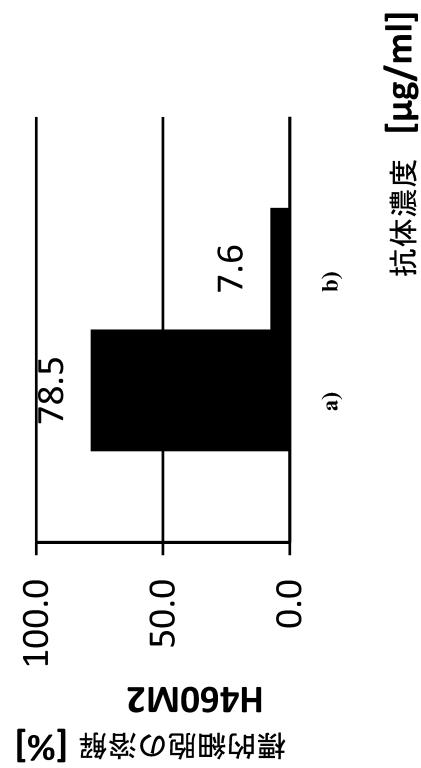
【図 1 6】

Fig. 16



【図 1 7】

Fig. 17



【配列表】

[0006246711000001.app](#)

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 0 7 K 14/74 (2006.01)	C 0 7 K 14/74
C 0 7 K 14/005 (2006.01)	C 0 7 K 14/005
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10

(56)参考文献 特表2005-506058 (JP, A)  
国際公開第2005/099361 (WO, A1)  
特開平02-104599 (JP, A)  
特表2004-503213 (JP, A)  
European Journal of Immunology, 2000年, Vol.30, p.3165-3170

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00 - 15/90  
C 0 7 K 16/00 - 16/46  
C 0 7 K 19/00  
JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)  
Caplus / MEDLINE / BIOSIS / EMBASE (STN)