

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成26年8月7日(2014.8.7)

【公表番号】特表2014-512812(P2014-512812A)

【公表日】平成26年5月29日(2014.5.29)

【年通号数】公開・登録公報2014-028

【出願番号】特願2014-502699(P2014-502699)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 K 16/32 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

G 0 1 N 33/48 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 0 7 K 16/32

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 1 0 1

A 6 1 K 39/395 E

A 6 1 K 39/395 T

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02

A 6 1 K 39/395 C

A 6 1 K 39/395 L

G 0 1 N 33/48 P

G 0 1 N 33/53 Y

G 0 1 N 33/53 D

【手続補正書】

【提出日】平成26年6月18日(2014.6.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(A)(i)配列番号2、3、及び4のアミノ酸配列をそれぞれ含むHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号8、9、及び10のアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含む軽鎖可変領域；

( i i ) 配列番号 2 0、2 1、及び 2 2 のアミノ酸配列をそれぞれ含む H C - C D R 1、H C - C D R 2、及び H C - C D R 3 を含む重鎖可変領域、並びに配列番号 2 6、2 7、及び 2 8 のアミノ酸配列をそれぞれ含む L C - C D R 1、L C - C D R 2、及び L C - C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

( i i i ) 配列番号 3 8、3 9、及び 4 0 のアミノ酸配列をそれぞれ含む H C - C D R 1、H C - C D R 2、及び H C - C D R 3 を含む重鎖可変領域、並びに配列番号 4 4、4 5、及び 4 6 から選択されるアミノ酸配列をそれぞれ含む L C - C D R 1、L C - C D R 2、及び L C - C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

( i v ) 配列番号 5 6、5 7、及び 5 8 のアミノ酸配列をそれぞれ含む H C - C D R 1、H C - C D R 2、及び H C - C D R 3 を含む重鎖可変領域、並びに配列番号 6 2、6 3、及び 6 4 のアミノ酸配列をそれぞれ含む L C - C D R 1、L C - C D R 2、及び L C - C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

( v ) 配列番号 7 4、7 5、及び 7 6 のアミノ酸配列をそれぞれ含む H C - C D R 1、H C - C D R 2、及び H C - C D R 3 を含む重鎖可変領域、並びに配列番号 8 0、8 1、及び 8 2 のアミノ酸配列をそれぞれ含む L C - C D R 1、L C - C D R 2、及び L C - C D R 3 を含む軽鎖可変領域；若しくは

( v i ) 配列番号 9 2、9 3、及び 9 4 のアミノ酸配列をそれぞれ含む H C - C D R 1、H C - C D R 2、及び H C - C D R 3 を含む重鎖可変領域、並びに配列番号 9 8、9 9、及び 1 0 0 のアミノ酸配列をそれぞれ含む L C - C D R 1、L C - C D R 2、及び L C - C D R 3 を含む軽鎖可変領域；又は

( B ) 配列番号 1 4 及び 1 6、3 2 及び 3 4、5 0 及び 5 2、6 8 及び 7 0、8 6 及び 8 8、並びに 1 0 4 及び 1 0 6 から選択される第一及び第二アミノ酸配列を含む V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub>；又は

( C ) 配列番号 1 8、3 6、5 4、7 2、9 0、及び 1 0 8 から選択されるアミノ酸配列のうち 1 を含む単離された抗体、若しくはその抗原結合性断片。

【請求項 2】

( A ) ( i ) 配列番号 2、3、及び 4；( i i ) 2 0、2 1、及び 2 2；( i i i ) 3 8、3 9、及び 4 0；( i v ) 5 6、5 7、及び 5 8；( v ) 7 4、7 5、及び 7 6；並びに ( v i ) 9 2、9 3、及び 9 4 から選択されるアミノ酸配列をそれぞれ含む H C - C D R 1、H C - C D R 2、及び H C - C D R 3 を含む重鎖可変領域；及び

( B ) ( i ) 配列番号 8、9、及び 1 0；( i i ) 2 6、2 7、及び 2 8；( i i i ) 4 4、4 5、及び 4 6；( i v ) 6 2、6 3、及び 6 4；( v ) 8 0、8 1、及び 8 2；並びに ( v i ) 9 8、9 9、及び 1 0 0 から選択されるアミノ酸配列をそれぞれ含む L C - C D R 1、L C - C D R 2、及び L C - C D R 3 を含む軽鎖可変領域

を含む単離された抗体、若しくはその抗原結合性断片。

【請求項 3】

( i ) 配列番号 1 4 及び 1 6；( i i ) 3 2 及び 3 4；( i i i ) 5 0 及び 5 2；( i v ) 6 8 及び 7 0；( v ) 8 6 及び 8 8；並びに ( v i ) 1 0 4 及び 1 0 6 から選択される第一及び第二アミノ酸配列をそれぞれ含む V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> を含む単離された抗体、若しくはその抗原結合性断片。

【請求項 4】

配列番号 1 8、3 6、5 4、7 2、9 0、及び 1 0 8 から選択されるアミノ酸配列を含む単離された抗体、若しくはその抗原結合性断片。

【請求項 5】

抗体が、ヒト可変領域フレームワーク領域を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 6】

抗体が、完全ヒト抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 7】

抗体が、H L A - A 2 に結合した W T 1 ペプチドに特異的に結合する、請求項 1 ~ 4 の

いずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 8】

WT 1 が、アミノ酸配列 R M F P N A P Y L を有する、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

H L A - A 2 が、H L A - A 0 2 0 1 である、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 10】

抗体の抗原結合性領域が、F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、F v、又は単鎖 F v ( s c F v ) である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 11】

治療薬に結合した、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 12】

治療薬が、薬剤、毒素、放射性同位体、タンパク質、又はペプチドである、請求項 1 1 に記載の抗体。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体をコードしている単離された核酸。

【請求項 14】

( A ) ( i ) 配列番号 5、6、及び 7 ; 2 3、2 4、及び 2 5 ; 4 1、4 2、及び 4 3 ; 5 8、5 9、及び 6 0 ; 7 7、7 8、及び 7 9 ; 並びに 9 5、9 6、及び 9 7 からなる群から選択される第一、第二、及び第三ヌクレオチド配列 ; 及び

( i i ) 配列番号 1 1、1 2、及び 1 3 ; 2 9、3 0、及び 3 1 ; 4 7、4 8、及び 4 9 ; 6 5、6 6、及び 6 7 ; 8 3、8 4、及び 8 5 ; 並びに 1 0 1、1 0 2、及び 1 0 3 からなる群から選択される第四、第五、及び第六ヌクレオチド配列 ; 又は

( B ) 配列番号 1 5 及び 1 7、3 3 及び 3 5、5 1 及び 5 3、6 9 及び 7 1、8 7 及び 8 9、並びに 1 0 5 及び 1 0 7 からなる群から選択される第一及び第二ヌクレオチド配列 ; 又は

( C ) 配列番号 1 9、3 7、5 5、7 3、9 1、及び 1 0 9 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸。

【請求項 15】

( A ) 配列番号 ( i ) 5、6、及び 7 ; ( i i ) 2 3、2 4、及び 2 5 ; ( i i i ) 4 1、4 2、及び 4 3 ; ( i v ) 5 8、5 9、及び 6 0 ; ( v ) 7 7、7 8、及び 7 9 ; 並びに ( v i ) 9 5、9 6、及び 9 7 からなる群から選択される第一、第二、及び第三ヌクレオチド配列 ; 及び

( B ) 配列番号 ( v i i ) 1 1、1 2、及び 1 3 ; ( v i i i ) 2 9、3 0、及び 3 1 ; ( i x ) 4 7、4 8、及び 4 9 ; ( x ) 6 5、6 6、及び 6 7 ; ( x i ) 8 3、8 4、及び 8 5 ; 並びに ( x i i ) 1 0 1、1 0 2、及び 1 0 3 からなる群から選択される第四、第五、及び第六ヌクレオチド配列

を含む単離された核酸。

【請求項 16】

第一、第二、及び第三ヌクレオチド配列が、抗体の H C - C D R 1、H C - C D R 2、及び H C - C D R 3 をそれぞれコードし、第四、第五、及び第六ヌクレオチド配列が、抗体の L C - C D R 1、L C - C D R 2、及び L C - C D R 3 をそれぞれコードする、請求項 1 5 に記載の核酸。

【請求項 17】

配列番号 ( i ) 1 5 及び 1 7 ; ( i i ) 3 3 及び 3 5 ; ( i i i ) 5 1 及び 5 3 ; ( i v ) 6 9 及び 7 1 ; ( v ) 8 7 及び 8 9 ; 並びに ( v i ) 1 0 5 及び 1 0 7 からなる群から選択される第一及び第二ヌクレオチド配列をそれぞれ含む単離された核酸。

【請求項 18】

第一ヌクレオチド配列が、抗体の V<sub>H</sub> をコードし、第二ヌクレオチド配列が抗体の V<sub>L</sub> をコードする、請求項 1 7 に記載の核酸。

## 【請求項 19】

配列番号 19、37、55、73、91、及び 109 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸。

## 【請求項 20】

核酸が、s c F v をコードする、請求項 19 に記載の核酸。

## 【請求項 21】

請求項 13 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の核酸を含むベクター。

## 【請求項 22】

請求項 13 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む細胞。

## 【請求項 23】

その表面に請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を発現させる、請求項 22 に記載の細胞。

## 【請求項 24】

全細胞又は組織中の W T 1 を探知する方法であって、

(A) 細胞又は組織に、H L A - A 2 に結合する W T 1 ペプチドに特異的に結合する、探知可能な標識を含む抗体又はその抗原結合性断片と接触させ；

(B) 抗体に結合した量が、細胞又は組織中の W T 1 の量を示し、細胞又は組織に関連した探知可能な標識の量を測定することにより、細胞又は組織に結合した抗体の量を決定すること

を含む方法。

## 【請求項 25】

抗体が、アミノ酸配列 R M F P N A P Y L (配列番号 1) を有する H L A - A 2 に結合した W T 1 ペプチドに特異的に結合する、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 26】

W T 1 ペプチドが、H L A - A 0 2 0 1 に結合する、請求項 25 に記載の方法。

## 【請求項 27】

請求項 24 に記載の方法であって、抗体が、

(A) (i) 配列番号 2、3、及び 4 のアミノ酸配列をそれぞれ含む H C - C D R 1、H C - C D R 2、及び H C - C D R 3 を含む重鎖可変領域；並びに配列番号 8、9、及び 10 のアミノ酸配列をそれぞれ含む L C - C D R 1、L C - C D R 2、及び L C - C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

(i i) 配列番号 20、21、及び 22 のアミノ酸配列をそれぞれ含む H C - C D R 1、H C - C D R 2、及び H C - C D R 3 を含む重鎖可変領域；並びに配列番号 26、27、及び 28 のアミノ酸配列をそれぞれ含む L C - C D R 1、L C - C D R 2、及び L C - C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

(i i i) 配列番号 38、39、及び 40 のアミノ酸配列をそれぞれ含む H C - C D R 1、H C - C D R 2、及び H C - C D R 3 を含む重鎖可変領域；並びに配列番号 44、45、及び 46 から選択されるアミノ酸配列をそれぞれ含む L C - C D R 1、L C - C D R 2、及び L C - C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

(i v) 配列番号 56、57、及び 58 のアミノ酸配列をそれぞれ含む H C - C D R 1、H C - C D R 2、及び H C - C D R 3 を含む重鎖可変領域；並びに配列番号 62、63、及び 64 のアミノ酸配列をそれぞれ含む L C - C D R 1、L C - C D R 2、及び L C - C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

(v) 配列番号 74、75、及び 76 のアミノ酸配列をそれぞれ含む H C - C D R 1、H C - C D R 2 及び H C - C D R 3 を含む重鎖可変領域；並びに配列番号 80、81、及び 82 のアミノ酸配列をそれぞれ含む L C - C D R 1、L C - C D R 2、及び L C - C D R 3 を含む軽鎖可変領域；若しくは

(v i) 配列番号 92、93、及び 94 のアミノ酸配列をそれぞれ含む H C - C D R 1、H C - C D R 2、及び H C - C D R 3 を含む重鎖可変領域；並びに配列番号 98、99、及び 100 のアミノ酸配列をそれぞれ含む L C - C D R 1、L C - C D R 2、及び L C

- C D R 3 を含む軽鎖可変領域；又は  
( B ) 配列番号 1 4 及び 1 6 ； 3 2 及び 3 4 ； 5 0 及び 5 2 ； 6 8 及び 7 0 ； 8 6 及び 8 8 ；並びに 1 0 4 及び 1 0 6 から選択される第一及び第二アミノ酸配列を含む V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub>、又は  
( C ) 配列番号 1 8、3 6、5 4、7 2、9 0 及び 1 0 8 から選択されるアミノ酸配列のうち 1 を含む単離された抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を含むキット。

【請求項 2 9】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、W T 1 陽性疾患治療用の医薬組成物。

【請求項 3 0】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体及び薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

【請求項 3 1】

治療的に効果のある量の請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合性断片を含む W T 1 陽性疾患患者治療用の医薬組成物。

【請求項 3 2】

W T 1 陽性疾患が、慢性白血病、急性白血病、又は W T 1<sup>+</sup> 腫瘍である、請求項 3 1 に記載の 医薬組成物。

【請求項 3 3】

W T 1 陽性疾患が、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫 ( M M )、急性リンパ性白血病 ( A L L )、急性骨髄 / 骨髄性白血病 ( A M L )、骨髄異形成症候群 ( M D S )、中皮腫、卵巣癌、消化管癌、乳癌、前立腺癌、及びグリア芽腫からなる群から選択される、請求項 3 1 に記載の 医薬組成物。

【請求項 3 4】

抗体が、抗体に結合する細胞傷害性部分を有する結合体である、請求項 3 1 に記載の 医薬組成物。

【請求項 3 5】

治療的に効果のある量の請求項 1 3 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む、W T 1 陽性疾患患者 治療用の医薬組成物。

【請求項 3 6】

W T 1 陽性疾患が、慢性白血病、急性白血病、又は W T 1<sup>+</sup> 腫瘍である、請求項 3 5 に記載の 医薬組成物。

【請求項 3 7】

W T 1 陽性疾患が、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫 ( M M )、急性リンパ性白血病 ( A L L )、急性骨髄 / 骨髄性白血病 ( A M L )、骨髄異形成症候群 ( M D S )、中皮腫、卵巣癌、消化管癌、乳癌、前立腺癌、及びグリア芽腫からなる群から選択される、請求項 3 6 に記載の 医薬組成物。

【請求項 3 8】

請求項 1 3 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む、W T 1 陽性疾患治療用の医薬組成物。

【請求項 3 9】

請求項 1 3 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む、医薬組成物。

【請求項 4 0】

H L A - A 2 に結合した W T 1 ペプチドに特異的に結合する抗体又はその抗原結合性断片を含む、W T 1<sup>+</sup> 細胞を死滅させるための医薬組成物。

【請求項 4 1】

抗体又はその抗原結合性断片が、それらに結合する細胞傷害性部分を有する、請求項 4 0 に記載の 医薬組成物。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0112

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0112】

その他の実施態様においては、抗体又は抗原結合性タンパク質は、抗WT1-scFvであるか、又はHLA-A0201と連結してアミノ酸配列RMFPNAPYL（配列番号1）を有するペプチドに特異的に結合する、配列番号36のアミノ酸配列を含む抗原結合性領域を有するその抗原結合性断片である。他の実施態様においては、抗WT1抗体は、scFv-Fc融合タンパク質、又はVH及びVL領域若しくは表2から選択されるCDRを有する完全長ヒトIgGである。

【表 2】

抗原	WT1 (Ext002 #5)		
ペプチド	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs :	1	2	3
VH	GDSVSSNSAAWN (SEQ ID NO: 20)	RTYYGSKWYNDYAVS VKS (SEQ ID NO: 21)	GRLGDAFDI (SEQ ID NO: 22)
DNA	ggggacagtgtctctagc aacagtgtgcttgaac (SEQ ID NO: 23)	aggacatactacgggtccaag tggtataatgattatgcagatct gtgaaaagt (SEQ ID NO: 24)	ggtcgcttaggggatgctttga tatac (SEQ ID NO: 25)
VL	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 26)	AASSLQS (SEQ ID NO: 27)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 28)
DNA	cgggcaagttagagcatt agcagctatttaaat (SEQ ID NO: 29)	gctgcatccagttgcaaagt (SEQ ID NO: 30)	caacagagttacagaccct ctcact (SEQ ID NO: 31)
Full VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGL EWLGRYYGSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTA VYYCARGRLGDAFDIWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 32)		
DNA	caggtacagctgcagcagctcaggtccaggactgggaagccctcgagaccctctcactcactgt gccatctcggggacagtgtctctagcaacagtgtgcttgaactggatcagcagctcccatcg agaggccttgagtggtgggaaggacatactacgggtccaagtggtataatgattatgcagatctg tgaaaagtgaataaacatcaaccagacacatccaagaaccagttcctcctgcagctgaactct gtgactccgaggacacggctgtgtattactgtgcaagaggtcgcttaggggatgctttgatactgg ggcaaggacaatggcaccgtctctca (SEQ ID NO: 33)		
Full VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLT FGGGTKVDIKR (SEQ ID NO: 34)		
DNA	gacatccagatgaccagctcctcctcctctgctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttg ccgggcaagttagagcattagcagctatttaattggtatcagcagaaaccagggaaagcccta agctcctgatctatgctgcatccagttgcaaagtgggtccatcaagggtcagtgccagtgatct gggacagattcactctcaccatcagcagctgcaacctgaagatttgcaactactactgtaaca gagttacagtaccctctcacttccgagggagggcaaaagtgatatacaactg (SEQ ID NO: 35)		
scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLT FGGGTKVDIKR <b>SRGGGGSGGGGSLEMA</b> QVQLQQSGPGLVK PSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYGSKWY NDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGRLGDAF DIWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 36)		
DNA	gacatccagatgaccagctcctcctcctctgctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttg ccgggcaagttagagcattagcagctatttaattggtatcagcagaaaccagggaaagcccta agctcctgatctatgctgcatccagttgcaaagtgggtccatcaagggtcagtgccagtgatct gggacagattcactctcaccatcagcagctgcaacctgaagatttgcaactactactgtaaca gagttacagtaccctctcacttccgagggagggcaaaagtgatatacaactg <b>ttcagaggtg</b> <b>gtgggtgtagcggcggcggcggcctctgggtggtggatccctcagatggcc</b> caggtac agctgcagcagtcaggtccaggactgggaagccctcgagaccctctcactcactcactgtgccatc ccggggacagtgtctctagcaacagtgtgcttgaactggatcaggcagtcctcctcagagggc cttgagtggtgggaaggacatactacgggtccaagtggtataatgattatgcagatctgtgaaa gtcgaataaacatcaaccagacacatccaagaaccagttcctcctgcagctgaactctgtgactc ccgaggacacggctgtgtattactgtgcaagaggtcgcttaggggatgctttgatactggggccaa gggacaatggcaccgtctctca (SEQ ID NO: 37)		

## 【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0113

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0113】

その他の実施態様においては、抗体又は抗原結合性タンパク質は、抗WT1-scFvであるか、又はHLA-A0201と連結してアミノ酸配列RMFPNAPYL（配列番号1）を有するペプチドに特異的に結合する、配列番号54のアミノ酸配列を含む抗原結合性領域を有するその抗原結合性断片である。他の実施態様においては、抗WT1抗体は

、 s c F v - F c 融合タンパク質、又は V H 及び V L 領域若しくは表 3 から選択される C D R を有する完全長ヒト I g G である。

【表 3】

抗原	WT1 (Ext002 #13)		
ペプチド	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs:	1	2	3
VH	GYSFTNFWIS (SEQ ID NO: 38)	RVDPGYSYSTYSPSF QG (SEQ ID NO: 39)	VQYSGYYDWFDP (SEQ ID NO: 40)
DNA	ggatacagctcaccact tctggatcagc (SEQ ID NO: 41)	aggggtgatcctggctactcta tagcacctacagccgccttc caaggc (SEQ ID NO: 42)	gtacaatatagtgctactatg actggttcgacccc (SEQ ID NO: 43)
VL	SGSSSNIGSNTVN (SEQ ID NO: 44)	SNNQRPS (SEQ ID NO: 45)	AAWDDSLNGWV (SEQ ID NO: 46)
DNA	tctggaagcagctccaac atcggaagtaataactgtaa ac (SEQ ID NO: 47)	agtaataatcagcggccctca (SEQ ID NO: 48)	gcagcatgggatgacagcct gaatggtgggtg (SEQ ID NO: 49)
Full VH	QMQLVQSGAEVKEPGESLRISCKGSGYSFTNFWISWVRQMPGKGLE WMGRVDPGYSYSTYSPSFQGHVTISADKSTSTAYLQWNSLKASDTA MYYCARVQYSGYYDWFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 50)		
DNA	cagatgcagctgggtcagtcaggagcagaggtgaagagccggggagctctgaggatctct gtaagggttctggatacagctcaccactctggatcagctgggtgcagatgccgggaaa ggcctggagtgatggggaggtgatcctggctactctatagcacctacagccgcctccaag gccagtcaccatctcagctgacaagctaccagcactgcctacctgagtggaacagcctgaag gctcggacaccgcatgtattactgtgcgagagtaacaatatagtgctactatgactggtcgacc cctggggccaggaaccctggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO: 51)		
Full VL	QAVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQVPGTAPK LLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWD DSLNGWVFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 52)		
DNA	caggctgtgggtgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggagagggcaccatctctgt tctggaagcagctccaacatcggaagtaatactgtaaacctgtaccagcaggtcccaggaacgg ccccaaactcctcatctatagtaataatcagcggccctcaggggtcctgaccgatctctggctc caagctggcacctcagcctccctggccatcagtggtcctcagctgaggatgaggctgattattac tgtgcagcatgggatgacagcctgaatggtgggtgtcggcggagggaaccaagctgaccgtct aggt (SEQ ID NO: 53)		
scFv	QAVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQVPGTAPK LLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWD DSLNGWVFGGGTKLTVLGS <b>SRGGGSGGGGSGGGGSLEMA</b> QMQLV QSGAEVKEPGESLRISCKGSGYSFTNFWISWVRQMPGKGLEWMGR VDPGYSYSTYSPSFQGHVTISADKSTSTAYLQWNSLKASDTAMYICA RVQYSGYYDWFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 54)		
DNA	caggctgtgggtgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggagagggcaccatctctgt tctggaagcagctccaacatcggaagtaatactgtaaacctgtaccagcaggtcccaggaacgg ccccaaactcctcatctatagtaataatcagcggccctcaggggtcctgaccgatctctggctc caagctggcacctcagcctccctggccatcagtggtcctcagctgaggatgaggctgattattac tgtgcagcatgggatgacagcctgaatggtgggtgtcggcggagggaaccaagctgaccgtct aggttctagaggtgggtggtagcggcggcggcctctggtgggtggatccctcgagatgg cccagatgagctgggtcagtcaggagcagaggtgaagagccggggagctctgaggatct cctgtaagggttctggatacagctcaccactctggatcagctgggtgcgccagatgcccggga aaggcctggagtgatggggaggggtgatcctggctactctatagcacctacagccgcctcca aggccagtcaccatctcagctgacaagctaccagcactgcctacctcagtggaacagcctga aggcctcggacaccgcatgtattactgtgcgagagtaacaatatagtgctactatgactggtcga ccccggggccaggaaccctggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO: 55)		

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0114

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0114】

その他の実施態様においては、抗体又は抗原結合性タンパク質は、抗 WT1 - s c F v であるか、又は H L A - A 0 2 0 1 と連結してアミノ酸配列 R M F P N A P Y L (配列番号 1) を有するペプチドに特異的に結合する、配列番号 7 2 のアミノ酸配列を含む抗原結





であるか、又はHLA - A0201と連結してアミノ酸配列RMFPNAPYL（配列番号1）を有するペプチドに特異的に結合する、配列番号90のアミノ酸配列を含む抗原結合性領域を有するその抗原結合性断片である。他の実施態様においては、抗WT1抗体は、scFv - Fc融合タンパク質、又はVH及びVL領域若しくは表5から選択されるCDRを有する完全長ヒトIgGである。

【表5】

抗原	WT1 (Ext002 #18)		
ペプチド	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs:	1	2	3
VH	GFTFDDYGMS (SEQ ID NO: 74)	GINWNGGSTGYADS VRG (SEQ ID NO: 75)	ERGYGYHDPHDY (SEQ ID NO: 76)
DNA	gggttcaccttgatgattat ggcatgagc (SEQ ID NO: 77)	ggtattaattggaatgggtg agcacaggtatgcagactc tgtgaggggc (SEQ ID NO: 78)	gagcgtggctacgggtacca tgatccccatgactac (SEQ ID NO: 79)
VL	GRNIGSKSVH (SEQ ID NO: 80)	DDSDRPS (SEQ ID NO: 81)	QVWDSSSDHVV (SEQ ID NO: 82)
DNA	gggagaacaacattgg aagtaaaagtgtgcac (SEQ ID NO: 83)	gatgatagcgaccggccctc a (SEQ ID NO: 84)	caggtgtgggatagtagtagt gatcatgtgta (SEQ ID NO: 85)
Full VH	EVQLVQSGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSSWVRQAPGKGL LEWVSGINWNGGSTGYADSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE DTALYICARERGYGYHDPHDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 86)		
DNA	gaagtgcagctggtgcagctcggggagggtggtacggcctgggggctccctgagactctct gtgcagcctcgggtcaccttgatgattatggcatgagctgggtccccaagctccagggaag ggctgagtggtctctgttattaattggaatgggtgtagcacaggtatgcagactctgtgagg ggccgatcccatcagagacaacgccaagaactccctgatctgcaaatgaacagctctg agagccgaggacacggcctgtattactgtgcgagagagcgtggctacgggtaccatgatccc catgactactgggccaaggcaccctggtgaccgtctctca (SEQ ID NO: 87)		
Full VL	QSVVTQPPSVSVAPGKTARITCGRNIGSKSVHWYQQKPGQAPVL VYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVW DSSSDHVVFGGKTLTVLG (SEQ ID NO: 88)		
DNA	cagtctgtctgacgcagccgctcgggtgctcagtgccccaggaaagacggccaggattac ctgtgggagaacaacattggaagtaaaagtgtgactgtaccagcagaagccaggccag gcccctgtctggtctctatgatgatagcgaccgcccctcaggatccctgagcattctctgg ctccaactctgggaacacggccaccctgaccatcagcagggctgaagccgggatgaggcc gactattactgtcaggtgtggatagtagtagtcatgtggtattcggcggagggaaccaagct gaccgtcctaggt (SEQ ID NO: 89)		
scFv	QSVVTQPPSVSVAPGKTARITCGRNIGSKSVHWYQQKPGQAPVL VYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVW DSSSDHVVFGGKTLTVLGSRRGGGSGGGGSGGSLEMAEVQLVQ SGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSSWVRQAPGKGL LEWVSGINWNGGSTGYADSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALY ICARERGYGYHDPHDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 90)		
DNA	cagtctgtctgacgcagccgctcgggtgctcagtgccccaggaaagacggccaggattac ctgtgggagaacaacattggaagtaaaagtgtgactgtaccagcagaagccaggccag gcccctgtctggtctctatgatgatagcgaccgcccctcaggatccctgagcattctctgg ctccaactctgggaacacggccaccctgaccatcagcagggctgaagccgggatgaggcc gactattactgtcaggtgtggatagtagtagtcatgtggtattcggcggagggaaccaagct gaccgtcctaggtctagaggtggtggtgtagcggcggcggcctctggtggatccc tcgagatggccgaagtgcagctgtgactgtggggagggtgtgtagcggcctgggggtcc ctccagggaagggctgagtggtctctgttattaattggaatgggtgtagcacaggtatgca gactctgtgagggccgattaccatcagagacaacgccaagaactccctgtatctgcaa atgaacagctcagagccgaggacacggcctgtattactgtgcgagagagcgtggctacggg taccatgatccccatgactactgggccaaggcaccctggtgaccgtctctca (SEQ ID NO: 91)		

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0116

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【 0 1 1 6 】

その他の実施態様においては、抗体又は抗原結合性タンパク質は、抗WT1 - s c F v であるか、又はHLA - A 0 2 0 1 と連結してアミノ酸配列 R M F P N A P Y L ( 配列番号 1 ) を有するペプチドに特異的に結合する、配列番号 1 0 8 のアミノ酸配列を含む抗原結合性領域を有するその抗原結合性断片である。他の実施態様においては、抗WT1 抗体は、s c F v - F c 融合タンパク質、又はVH 及びVL 領域若しくは表 6 から選択される C D R を有する完全長ヒト I g G である。

【表 6】

抗原	WT1 (Ext002 #23)		
ペプチド	RMFPNAPYL (SEQ ID NO. 1)		
CDRs :	1	2	3
VH	GFSVSGTYMG (SEQ ID NO. 92)	LLYSGGGTYHPASLQ G (SEQ ID NO. 93)	GGAGGGHFDS (SEQ ID NO. 94)
DNA	gggttctccgtcagtgccac ctacatgggc(SEQ ID NO. 95)	cttcttatagtggtggcggcac ataccaccagcgtccctgca gggc (SEQ ID NO. 96)	gaggggcaggaggtggcc acttgactcc (SEQ ID NO. 97)
VL	TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO. 98)	GNSNRPS (SEQ ID NO. 99)	AAWDDSLNGYV (SEQ ID NO. 100)
DNA	actgggagcagctccaac atcggggcaggttatgatg acac (SEQ ID NO. 101)	ggtaacagcaatcgccctca (SEQ ID NO. 102)	gcagcatgggatgacagcct gatggttatgtc (SEQ ID NO. 103)
Full VH	EVQLVETGGGLLQPGGSLRLSCAASGFSVSGTYMGWVRQAPGKGLE WVALLYSGGGTYHPASLQGRFIVSRDSSKNMVYLMNSLKAEDTAVY YCAKGGAGGGHFDSWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 104)		
DNA	gagtgagcagctggtagacccgagaggctgtccagccggggggctcctcagactctctg tgagcctctgggtctccgtcagtgccactacatggcgtgggtccgagcctcagggagg actggagtggtgcactcttatagtggtggcggcacataccaccagcgtccctgagggcgg attcatcgtctccagagacagctccaagaataggtctatcttcaaatgaatagcctgaaagccgag gacacggcctctattactgtgcaaaaggaggggagggaggtggcactttgactcctggggcca aggcaccctggtgacgctcctca (SEQ ID NO. 105)		
Full VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPK LLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWD DSLNGYVFGTGKTLTVLG (SEQ ID NO. 106)		
DNA	cagtcgtgtgacgcagccctcagtgctggggcccagggcagagggtccacctctctgc actgggagcagctccaacatcggggcaggttatgatgtacactggtaccagcagctccaggaac agcccccactcctcatctatggtaacagcaatcgccctcaggggtccctgaccgattctctggc tccaagtctggcaccctcagcctccctggccatcagtggtccagctgaggatgaggctgattatta ctgtgcagcatgggatgacagcctgaatggttatgtctcggaaactgggaccaagctgaccgctca ggt (SEQ ID NO. 107)		
scFv	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPK LLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWD DSLNGYVFG TGKTLTVLGSRRGGGSGGGGSGGGGSLMAEVQLVETGGGLLQPG GSLRLSCAASGFSVSGTYMGWVRQAPGKGLEWVALLYSGGGTYHPA SLQGRFIVSRDSSKNMVYLMNSLKAEDTAVYYCAKGGAGGGHFDS WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 108)		
DNA	cagtcgtgtgacgcagccctcagtgctggggcccagggcagagggtccacctctctgc actgggagcagctccaacatcggggcaggttatgatgtacactggtaccagcagctccaggaac agcccccactcctcatctatggtaacagcaatcgccctcaggggtccctgaccgattctctggc tccaagtctggcaccctcagcctccctggccatcagtggtccagctgaggatgaggctgattatta ctgtgcagcatgggatgacagcctgaatggttatgtctcggaaactgggaccaagctgaccgctca ggtctagagggtggtggtgtagcggcggcggcctctggtggtggtggatccctcag atggccgagggtcagctggtggagaccgaggaggctgtccagccgggggggtccctcaga ctcctctgtcagcctctgggtctccgtcagtgccactacatgggtgggtccgcaaggctccagg gaaggactggagtggtgcactcttatagtggtggcggcacataccaccagcgtccctgca ggcccgattcatcgtctccagagacagctccaagaataggtctatcttcaaatgaatagcctgaaa gcccaggacacggcgtctattactgtgcaaaaggaggggagggaggtggcactttgactcctg ggccaaggcaccctggtgaccgtcctca (SEQ ID NO. 109)		

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0120

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0120】

ある実施態様では、定常領域/フレームワーク領域は、例えば、アミノ酸の置換により抗体の特性を修正するために改変される（例えば、1又はそれ以上の、抗原結合親和性、Fc受容体結合、例えば、グリコシル化、フコシル化などの抗体の炭水化物、システイン残基の数、エフェクター細胞の機能、補完機能、又は結合部位の導入を増加又は減少させるため）。さらに、薬物、毒素、放射性同位体、サイトカイン、炎症性ペプチド、又は細胞傷害性剤に対する抗体の結合も考えられる。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0139

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0139】

一旦選択すると、陽性のs c F vクローンを、間接的なフローサイトメトリーによって、T2生細胞表面上のHLA-A2/ペプチド複合体へのそれらの結合について試験する。簡潔には、ファージクローンを、WT1-Aペプチド又は無関係なペプチド（コントロール）でパルスしたT2細胞とともにインキュベートする。細胞を、次いで、マウス抗M13コートタンパク質モノクローナル抗体とともに洗浄する。細胞を再び洗浄し、フローサイトメトリーに先立って、FITC-ヤギ(Fab)<sub>2</sub>抗マウスIgで標識する。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0155

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0155】

《材料》

細胞サンプル、細胞株、及び抗体

メモリアルスローンケタリングがんセンター治験審査委員会のインフォームドコンセントにプロトコルが承認された後、HLA型の健康ドナー及び患者からの末梢血単核細胞(PBMC)を、フィコール密度遠心分離によって得た。ヒト中皮腫細胞株を得るためのソースは、前述されている(29)。細胞株は、H-Meso1A、JMN、VAMT、H2452、H2373、H28、MSTO、Meso11、Meso34、Meso37、Meso47、及びMeso56を含む。すべての細胞は、メモリアルスローンケタリングがんセンターの細胞免疫学教室によってHLA型とされた。白血病細胞株LAM81、BV173、及び697、(WT1+、A0201+)は、HJ Staus博士(ロンドン大学、ロンドン、イギリス)によって、親切にも提供された。メラノーマ細胞株MeWo(WT1-、A201+)、SKLY16(B細胞リンパ腫、WT1、A0201+)、K562、RwLeu4、及びHL60、全てのWT1+白血病、及びTAP欠損T2細胞株を、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから得た。細胞株を、5% FCS、ペニシリン、ストレプトマイシン、グルタミン2 mmol/L、及び2-メルカプトエタノールを補充したRPMI 1640中で、37℃、5%のCO<sub>2</sub>で培養した。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0166

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0166】

造血細胞株、付着細胞株[非酵素的細胞ストリッパー(name)を用いて回収]、正常なドナー及びAML患者由来の末梢血単核細胞を、前述のように得た。細胞をPBSで一度洗浄し、PBS中の2%ヒト血清中において、0℃で10<sup>7</sup>細胞/mLで再懸濁した

。細胞（ $10^6$  チューブで2回実施）を、氷上で45分間、125 - I 標識 WT1 AB 1（ $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ ）とともにインキュベートし、次に、PBS内の1%ウシ血清アルブミンを用いて、0\_\_で広範囲に洗浄した。特異的結合を決定するために、50 過剰量非標識 WT1 AB 1 存在下で、氷上で20分間プレインキュベーションした後に、細胞の2つのセットを評価した。結合放射線を、ガンマカウンターによって測定し、特異的結合を決定し、細胞辺りの結合した抗体の数を、比放射能から計算した。

【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0185

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0185】

次の重要な問題は、WT1 ab 1 が細胞表面上の HLA - A 0 2 0 1 分子によって提示され、自然に処理された WT1 エピトープ R M F を認識できたかどうかであった。細胞株のパネルは、WT1 mRNA 及び HLA 遺伝子型（表 1 3）の発現に基づいて選択された。

【表 1 3】

中皮腫／固形腫瘍	HLA-A2 遺伝子型	WT1 mRNA	WT1 AB 結合	BB7.2: Isotype の割合
JMN	+	+	+	248
Meso 37	+	+	+	68
Meso 47	+(02xx)	+	+	17
H2452	+	+	+	20
Meso34	+	+	+	37.3
Meso-56	+(02xx)	+	+	23
H2373	+	+	-	1.6
MSTO	-	+	-	1.4
VAMT	-	3+	-	NT
Mewo	+	-	-	3
白血病及び造血細胞株				
BV173	+	++	+	196
BA25	+	?	+	117.5
ALL-3	+	+	+	60
U266	+	+	-	1.8
697	+	5+	-	4.1
LAMA	+	2+	-	6
SKLY-16	+	-	-	1.9
HL-60	-	3+	-	0.4
K562	-	2+	-	1.5
T2	+	NT	-	>20

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0189

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0189】

予想されたように、WT1AB1の結合の強さも、中皮腫細胞H2373、白血病細胞株697とLAMA、及び骨髓腫細胞株U266に示すように、直接HLA-A0201分子の発現レベルと関連付けられているように思われた。これらの細胞株は、WT1転写物及びHLA-A2の両方に陽性であり、HLA-A2の発現レベルは低く(表13)、モノクローナル抗体は結合を示さなかった。一方、T2細胞を用いて得られた結果は、HLA-A2分子を高レベルで発現させたT2細胞として単独でHLA-A0201へ結合する、WT1ab1の可能性に反論する。特に、WT1ab1は単独では、又はR3及びEwing肉腫由来のような他のHLA-A0201結合ペプチド、又はRMFペプチドのヘテロクリティックペプチドであるWT1-A1でパルスしても、T2細胞に結合しない。これら2種のペプチドは、T2安定化アッセイ(28)において、HLA-A0201分子に対する高い親和性が示されている。これらの結果は、WT1ab1認識が、複合体においてRMFペプチドとA0201分子の共同で構成されるエピトープに特異的であったという強い証拠を提供した。WT1ab3及びWT1ab5の2つの他のモノクローナル抗体の、BV173及びJMN細胞に対する結合もまた、WT1ab1より弱かった。

。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0190

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0190】

《実施例5》

細胞上のWT1ab1結合部位の定量化

125I標識WT1ab1を用いた放射免疫測定を、抗体のWT1<sup>+</sup>HLA-A0201<sup>+</sup>細胞株に対する特異性を確認するため、親和定数を決定するため、かつ細胞株のパネル上の細胞当たりの抗体結合部位の数を評価するために、用いた。JMN細胞への結合に基づくスキャッチャード分析は、約0.2nMの親和定数を示した(図23)。この数値は、ForteBio装置を用いて、干渉分光法により確認した。125I標識WT1ab1を、抗体のWT1<sup>+</sup>HLA-A0201<sup>+</sup>細胞株に対する特異性を確認するため、及び細胞株のパネル上の抗体結合部位の数を評価するために用いた(図24)。二価のモノクローナル抗体が表面上の1又は2の複合体に結合しているかどうかを、我々は判断できないため、細胞当たりのエピトープの合計は、モノクローナル抗体結合部位の数の二倍になることがある。再度、WT1ab1は、HLA-A0201及びWT1mRNAの両方に陽性である、JMN、ALL-3、BA25、BV173に結合したが、HLA-A0201陰性(HL60)又はWT1mRNA陰性(SKLY-16)には結合しなかった。WT1ab1は、HLA-A0201及びWT1の両方に陽性の697細胞には結合しなかったが、低レベルのHLA-A0201(表13)を含んでおり、あるレベルのMHC複合体の総数が、WT1ab1結合のための十分なWT1ペプチドが存在するために必要であると確認した。RMFでパルスしたT2は最も多い数のモノクローナル抗体と結合し(50000/細胞)、次いで、細胞辺り~ $6 \times 10^3$ WT1ab1分子と結合したJMN細胞であり、これは、それぞれが一価又は二価抗体結合だと想定して、1細胞辺り、 $6 \times 10^3$ 及び $1.2 \times 10^4$ RMFペプチド/A2複合体を翻訳したこととなる。3個の白血病陽性細胞株は、 $1 \times 10^3$ 及び $2 \times 10^3$ WT1ab1分子、又は $2 \times 10^3$ 及び $4 \times 10^3$ の結合部位と結合した(図24)。これらの結果を、定量的フローサイトメトリーによって確認した。

