

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-512812

(P2014-512812A)

(43) 公表日 平成26年5月29日(2014.5.29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 16/32 (2006.01)	C O 7 K 16/32	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-502699 (P2014-502699)	(71) 出願人	513099485
(86) (22) 出願日	平成24年4月2日 (2012.4.2)		メモリアル スローン-ケタリング キャンサー センター
(85) 翻訳文提出日	平成25年12月2日 (2013.12.2)		Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/031892		アメリカ合衆国, ニューヨーク州 10065, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1275
(87) 国際公開番号	W02012/135854	(74) 代理人	100090251
(87) 国際公開日	平成24年10月4日 (2012.10.4)		弁理士 森田 憲一
(31) 優先権主張番号	61/470, 635	(74) 代理人	100139594
(32) 優先日	平成23年4月1日 (2011.4.1)		弁理士 山口 健次郎
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100185915
(31) 優先権主張番号	61/491, 392		弁理士 長山 弘典
(32) 優先日	平成23年5月31日 (2011.5.31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H L A - A 2 により提示される W T 1 ペプチドへの T 細胞受容体様抗体

(57) 【要約】

本発明は、W T 1、抗体断片、キメラ抗原受容体 (C A R s)、融合タンパク質、及びそれらの結合体に対するヒト化、キメラ及び完全ヒト抗体を含むウィルムス腫瘍タンパク質 (W T 1) に特異的に結合する抗原結合性タンパク質を提供する。抗原結合性タンパク質や抗体は、H L A - A 0 2 0 1 拘束性 W T 1 ペプチドに結合する。このような抗体、断片、融合タンパク質、及びその結合体は、例えば、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、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)、及び骨髄異形成症候群 (M D S) のような W T 1 関連腫瘍の治療に有用である。より具体的な実施態様では、抗 W T 1 / A 抗体は、タンパク質の安定性、抗体の結合、及び / 又は発現レベルを向上させるために設計された 1 又はそれ以上のフレームワーク領域のアミノ酸置換を含むことができる。

【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 - CDR 1、HC - CDR 2、及び HC - CDR 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 LC - CDR 1、LC - CDR 2、及び LC - CDR 3 を含む軽鎖可変領域；

(ii) 配列番号 20、21、及び 22 のアミノ酸配列をそれぞれ含む HC - CDR 1、HC - CDR 2、及び HC - CDR 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 LC - CDR 1、LC - CDR 2、及び LC - CDR 3 を含む軽鎖可変領域；

(iii) 配列番号 38、39、及び 40 のアミノ酸配列をそれぞれ含む HC - CDR 1、HC - CDR 2、及び HC - CDR 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 LC - CDR 1、LC - CDR 2、及び LC - CDR 3 を含む軽鎖可変領域；

(iv) 配列番号 56、57、及び 58 のアミノ酸配列をそれぞれ含む HC - CDR 1、HC - CDR 2、及び HC - CDR 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 LC - CDR 1、LC - CDR 2、及び LC - CDR 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 HC - CDR 1、HC - CDR 2、及び HC - CDR 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 LC - CDR 1、LC - CDR 2、及び LC - CDR 3 を含む軽鎖可変領域；若しくは

(vi) 配列番号 92、93、及び 94 のアミノ酸配列をそれぞれ含む HC - CDR 1、HC - CDR 2、及び HC - CDR 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 LC - CDR 1、LC - CDR 2、及び LC - CDR 3 を含む軽鎖可変領域；又は

(B) 配列番号 14 及び 16、32 及び 34、50 及び 52、68 及び 70、86 及び 88、並びに 104 及び 106 から選択される第一及び第二アミノ酸配列を含む V_H 及び V_L；又は

(C) 配列番号 18、36、54、72、90、及び 108 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；(ii) 20、21、及び 22；(iii) 38、39、及び 40；(iv) 56、57、及び 58；(v) 74、75、及び 76；並びに (vi) 92、93、及び 94 から選択されるアミノ酸配列をそれぞれ含む HC - CDR 1、HC - CDR 2、及び HC - CDR 3 を含む重鎖可変領域；及び

(B) (i) 配列番号 8、9、及び 10；(ii) 26、27、及び 28；(iii) 44、45、及び 46；(iv) 62、63、及び 64；(v) 80、81、及び 82；並びに (vi) 98、99、及び 100 から選択されるアミノ酸配列をそれぞれ含む LC - CDR 1、LC - CDR 2、及び LC - CDR 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 14 及び 16；(ii) 32 及び 34；(iii) 50 及び 52；(iv) 68 及び 70；(v) 86 及び 88；並びに (vi) 104 及び 106 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_H 及び V_L 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 18、36、54、72、90、及び 108 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】

10

20

30

40

50

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、HLA - A 2 に結合した WT 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】

HLA - A 2 が、HLA - 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、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、又は単鎖 Fv (scFv) 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 11 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；23、24、及び 25；41、42、及び 43；58、59、及び 60；77、78、及び 79；並びに 95、96、及び 97 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

(ii) 配列番号 11、12、及び 13；29、30、及び 31；47、48、及び 49；65、66、及び 67；83、84、及び 85；並びに 101、102、及び 103 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 15 及び 17、33 及び 35、51 及び 53、69 及び 71、87 及び 89、並びに 105 及び 107 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 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

を含む単離された核酸。

【請求項 15】

(A) 配列番号 (i) 5、6、及び 7；(ii) 23、24、及び 25；(iii) 41、42、及び 43；(iv) 58、59、及び 60；(v) 77、78、及び 79；並びに (vi) 95、96、及び 97 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 (vii) 11、12、及び 13；(viii) 29、30、及び 31；(ix) 47、48、及び 49；(x) 65、66、及び 67；(xi) 83、84、及び 85；並びに (xii) 101、102、及び 103 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 HC - CDR 1、HC - CDR 2、及び HC - CDR 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 LC - CDR 1、LC - CDR 2、及び LC - CDR 3 をそれぞれコードする、請求項 15 に記載の核酸。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

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 1 8】

第一ヌクレオチド配列が、抗体の V_H をコードし、第二ヌクレオチド配列が抗体の V_L をコードする、請求項 1 7 に記載の核酸。

【請求項 1 9】

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核酸。

【請求項 2 0】

核酸が、s c F v をコードする、請求項 1 9 に記載の核酸。

【請求項 2 1】

請求項 1 3 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 2 2】

請求項 1 3 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む細胞。

【請求項 2 3】

その表面に請求項 1 ~ 4 に記載の抗体を発現させる、請求項 2 2 に記載の細胞。

【請求項 2 4】

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 2 5】

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 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

W T 1 ペプチドが、H L A - A 0 2 0 1 に結合する、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

請求項 2 4 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 1 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；

(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

10

20

30

40

50

び 8 2 のアミノ酸配列をそれぞれ含む LC - CDR 1、LC - CDR 2、及び LC - CDR 3 を含む軽鎖可変領域；若しくは

(vi) 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 HC - CDR 1、HC - CDR 2、及び HC - CDR 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 LC - CDR 1、LC - CDR 2、及び LC - CDR 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_H 及び V_L、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。

10

【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】

WT 1 陽性疾患の治療への請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体の使用。

【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患者に投与することを含む WT 1 陽性疾患患者の治療方法。

20

【請求項 3 2】

WT 1 陽性疾患が、慢性白血病、急性白血病、又は WT 1 + 腫瘍である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

WT 1 陽性疾患が、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫 (MM)、急性リンパ性白血病 (ALL)、急性骨髄/骨髄性白血病 (AML)、骨髄異形成症候群 (MDS)、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 に記載の方法。

【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 4 に記載の方法。

30

【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 項に記載の核酸を患者に投与することを含む、WT 1 陽性疾患患者の治療方法。

【請求項 3 6】

WT 1 陽性疾患が、慢性白血病、急性白血病、又は WT 1 + 腫瘍である、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

WT 1 陽性疾患が、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫 (MM)、急性リンパ性白血病 (ALL)、急性骨髄/骨髄性白血病 (AML)、骨髄異形成症候群 (MDS)、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 に記載の方法。

40

【請求項 3 8】

WT 1 陽性疾患の治療への、請求項 1 3 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の核酸の使用。

【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】

WT 1 + 細胞を死滅させる方法であって、細胞に、HLA - A 2 に結合した WT 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接触させることを含む方法。

50

【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 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願に関する相互参照】

【0001】

本出願は、米国仮出願第 61 / 470635 号 (2011 年 4 月 1 日出願) 及び米国仮出願第 61 / 491392 号 (2011 年 3 月 31 日出願) の優先権を主張する。前記出願の全開示は参照することにより本明細書に組み込まれる。

【0002】

《連邦政府による資金提供を受けた研究》

以下の発明は、米国国立衛生研究所によって授与された契約番号 P01CA23766 及び R01CA55349 の下で、米国政府支援によりなされたものである。米国政府は、この発明において一定の権利を有する。

【0003】

《配列表》

本出願は配列表を含む。配列表は、3314013AWO__Sequence__Listing__ST25.txt のファイル名で 2012 年 3 月 29 日に作成された ASCII 形式のファイルとして提出される。電子フォーマットでの配列表の情報は、参照によりその全体が本明細書に取り込まれる。

【0004】

《発明の分野》

本発明は、一般に細胞質タンパク質に対する抗体に関する。特に、本発明は、ウィルムス腫瘍遺伝子タンパク質 (WT1) に対する抗体であって、主要な組織適合抗原と一体となって WT1 ペプチドを認識する特異的抗体にも関する。

【0005】

《発明の背景》

ウィルムス腫瘍遺伝子タンパク質 (WT1) は、大抵の白血病及び広い範囲の癌の免疫療法の魅力的な標的である。WT1 は、通常は、胚発生の間の中胚葉性組織において発現されるジンクフィンガー転写因子である。正常な成体組織において、WT1 発現は、CD34 造血幹細胞内で低レベルに制限されるが、多系統の白血病及び広い範囲の固形腫瘍 (1-2) において過剰発現される。最近では、WT1 発現は微小残存病変のマーカーになることが報告されている。形態学的寛解にある急性骨髄性白血病 (AML) 患者における転写レベルの増加は明白な臨床的再発の前兆であった (3、4)。さらに、WT1 に対する抗体は、造血性悪性腫瘍及び固形腫瘍を有する患者において検出され、このことは、WT1 が高い免疫原性抗原であることを示す (7)。

【0006】

大抵は、臨床的に承認された治療用モノクローナル抗体 (mAbs) は、細胞表面タンパク質の構造を認識する。WT1 は、しかしながら、核タンパク質であり、それゆえ、古典的な抗体療法には到達し難い。今まで、WT1 を対象とした免疫療法は、細胞のアプローチに制限され、もっぱら MHC クラス I 分子によって細胞表面に提示されるペプチドを認識する WT1 特異的細胞傷害性 CD8 T 細胞 (CTL) 応答を発生させることを目的としていた。

【0007】

CTL 応答を誘導するため、細胞内のタンパク質は、通常プロテアソーム又は内部リソソームによって分解され、得られたペプチド断片は、MHC クラス I 又は II 分子に結合する。これらのペプチド-MHC 複合体は、ペプチド-MHC (pMHC) - T 細胞受容体 (TCR) 相互作用を介して、それらに T 細胞認識のための標的を提供するために細胞表面に表示されている (8、9)。WT1 タンパク質由来ペプチドによるワクチン接種は、腫瘍細胞を死滅させることができる HLA 拘束性細胞傷害性 CD8 T 細胞を誘導する。

10

20

30

40

50

【0008】

有効性を改善させるために、腫瘍抗原はモノクローナル抗体治療の標的とされることが出来る。モノクローナル抗体 (mAb) 療法は、補体依存性細胞傷害 (CDC)、抗体依存性細胞傷害 (ADCC)、及び標的分子を過剰発現する腫瘍細胞に対する直接細胞阻害又はアポトーシス誘導効果を含む複数のメカニズムによって、強力な抗腫瘍効果を発揮することが示されている。さらに、モノクローナル抗体は、腫瘍細胞に対する放射性核種、細胞傷害性薬、又は毒素などの細胞傷害性部分を特異的に運搬するために、担体として用いることができる (18)。

【0009】

細胞の免疫療法のアプローチに加えて、液性免疫療法のアプローチが非細胞表面腫瘍抗原を標的とすることが可能であった場合、多大なメリットが存在するであろう。それゆえ、MHC分子と連結する細胞内タンパク質断片を含む標的に特異的であることから、T細胞受容体を模倣するモノクローナル抗体 (mAb)、例えばWT1ペプチド/HLA-A2複合体は、単独で、又は、薬物、毒素、若しくは放射性元素などの強力な抗癌薬を送達することができる媒体として、新規かつ効果的な治療剤になるであろう。このようなモノクローナル抗体はまた、診断や予後のツールとして有用であろう。

10

【0010】

《発明の要約》

本出願による開示は、細胞質/細胞内タンパク質、例えばWT1腫瘍タンパク質を標的とすることができる抗体などの抗原結合性タンパク質を、識別し特徴付ける。開示される抗体は、一般的に、細胞による提示及びWT1タンパク質の抗原処理に続いて細胞表面に現れるものとして、ペプチド/MHC複合体を標的とする。この点において、ペプチドがMHC抗原に結合したときに、MHCで拘束される現象において、抗体が特異的に認識する能力を有し、ペプチドに結合する能力を有するということから、T細胞受容体を模倣する。ペプチド/MHC複合体は、一般的に、T細胞へのWT1タンパク質の提示及び抗原処理に続いて細胞表面に現れるものとして、抗原を再現する。

20

【0011】

開示された抗体は、特異的に認識し、ペプチド/HLA-A2複合体のエピトープ、特にWT1/HLA-A0201複合体に結合する。HLA-ペプチド複合体の一部として、本発明の抗原結合性タンパク質によって認識されるペプチドの例としては、表7に示すもの例えば、アミノ酸配列RMFPNAPYL (配列番号1)を有するペプチドを含むが、これに限定されるものではない。

30

【0012】

ある観点においては、それゆえに、本発明は、前記ペプチドがHLA-A2のようなMHC抗原に結合したときに単離される抗体、又はアミノ酸配列RMFPNAPYLを有するペプチドに結合する、その抗原結合性断片に関する。

【0013】

別の観点においては、本発明は(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(HC)可変領域；並びに、配列番号8、9、そして10のアミノ酸配列をそれぞれ含むLC-CDR1、LC-CDR2、そしてLC-CDR3を含む軽鎖(LC)可変領域；(ii)配列番号20、21、及び22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(HC)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LC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含む軽鎖(LC)可変領域；(iii)配列番号38、39、及び40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(HC)可変領域；並びに、配列番号44、45、及び46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(LC)可変領域；(iv)配列番号56、57、及び58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(HC)可変領域；並びに、配列番号

40

50

62、63、及び64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(LC)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HC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含む重鎖(HC)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LC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含む軽鎖(LC)可変領域；又は、(vi)配列番号92、93、及び94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(HC)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LC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含む軽鎖(LC)可変領域を含む単離された抗原結合性タンパク質、抗体、又はその抗原結合性断片に関する。

10

【0014】

別の観点においては、本発明は、配列番号14及び16；32及び34；50及び52；68及び70；86及び88；並びに104及び106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_H及びV_Lを含む単離された抗原結合性タンパク質、抗体、又はその抗原結合性断片に関する。

【0015】

さらに別の観点においては、本発明は、配列番号18、36、54、72、90、及び108から選択されるアミノ酸配列を含む単離された抗原結合性タンパク質、抗体、又はその抗原結合性断片に関する。

【0016】

関連する観点においては、単離された抗原結合性タンパク質は、表1～8のいずれかに開示された抗原結合性領域を含む。抗原結合性タンパク質は融合タンパク質であってもよい。

20

【0017】

別の観点においては、本発明は、抗原結合性タンパク質、抗体、又はその抗原結合性断片として開示されている第一の成分を含む免疫結合体に関するものである。前記免疫結合体は、細胞毒素、検出可能な標識、放射性同位体、治療剤、結合タンパク質、又は第二のアミノ酸配列を有する分子である第二成分を含む。第二成分が結合タンパク質又は二次抗体である場合、結合タンパク質又は二次抗体は、最初に特定されたHLA-ペプチド複合体とは異なる標的に対する結合特異性を有する。

30

【0018】

関連する観点においては、それゆえ、本発明は、本明細書に記載されたようにその抗原結合性タンパク質又はその機能的断片を含む二重特異性抗体に関する。

【0019】

さらに別の観点においては、本発明は、WT1ペプチド/HLA複合体、特にWT1ペプチドRMFPNAPYL/HLA-A0201に特異的な抗体及びキメラ抗原受容体を含む抗原結合性タンパク質をコードする核酸に関する。

【0020】

別の関連する観点においては、本発明は、本明細書に開示された核酸又は抗原結合性タンパク質を含む細胞に関し、前記細胞には本開示による抗原結合性領域を含むキメラ抗原受容体を発現するように遺伝的に改変されたT細胞のような組換え免疫エフェクター細胞が含まれる。本開示に従って、抗体を産生するように操作された細胞もまた、本発明に含まれる

40

【0021】

関連する観点においては、本発明は、本明細書に開示された抗原結合性タンパク質をコードする核酸を含むベクターに関し、前記ベクターは、本開示による抗体又はキメラ抗原受容体のような抗原結合性タンパク質の発現及び/又は分泌を容易にするベクターを含む。

【0022】

関連する観点においては、抗原結合性タンパク質、抗体、核酸、ベクター、又は細胞を含む医薬組成物に関し、細胞は、薬学的に許容される担体とともに、本明細書に開示され

50

る核酸又は抗原結合性領域を含む細胞を含む。

【0023】

別の観点においては、本発明は、本発明のWT1抗体を用いて細胞又は組織の表面のWT1を検出する方法に関するものである。

【0024】

さらに別の観点においては、本発明は、WT1陽性疾患を有する被験者を治療する方法に関し、前記方法は、治療上有効な量の抗原結合性タンパク質、抗体若しくはその抗原結合性断片、又は抗原結合性タンパク質をコードする核酸若しくは抗体若しくは核酸又は本開示によるタンパク質を含む細胞を投与することを含む。WT1陽性疾患は、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫(MM)、急性リンパ性白血病(ALL)、急性骨髄/骨髄性白血病(AML)、骨髄異形成症候群(MDS)、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慢性白血病、急性白血病、又はWT1⁺癌である。いくつかの実施態様では、抗原結合性タンパク質又は抗体は、それらに結合する細胞傷害性部分を有する結合体である。

10

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】ウィルムス腫瘍タンパク質のアミノ酸配列(GenBankアクセッション番号P19544)であり、太字はHLA拘束性ペプチドを示す図である。121~140番目のペプチドはさらに9merが下線を引いてあり、このRMFPNAPYL(配列番号1)は、そのアナログであるのに加えて、WT1特異的細胞傷害性T細胞活性を誘導する。

20

【0026】

【図2】WT1⁺白血病細胞に対する細胞傷害性T細胞を誘導するWT1ペプチドのワクチン接種を示すグラフである。

【0027】

【図3】PBSコントロール又はR3/HLAA0201(R3)に対するWT1/A2(WA)の特異的結合のためのファージELISAの結果を示す図である。

【0028】

【図4】WT1AペプチドでパルスしたT2細胞と結合するWT1ファージ抗体のみの特異的結合が選択されたことを示す図である。

30

【0029】

【図5】様々な濃度の抗体のタイトレーションによりテストされた、RMF/A0201複合体へのWT1抗体の完全長IgG1の結合親和性を示す図である。結果は50µg/mLのRMF(上のパネル)でパルスしたT2細胞として示される。コントロールの抗体は、下のパネルに示される。

【0030】

【図6】RMF(上のパネル)又はコントロールであるRHAMM-R3(下のパネル)でパルスしたT2細胞上のWT1抗体により認識されたRMF/HLA-A0201複合体の濃度依存性を示す図である。

【0031】

【図7】ヒト抗体の発現のための発現ベクターを示す図である。

40

【0032】

【図8】還元又は非還元条件下におけるWT1/A2抗体のSDS-PAGE分析結果を示す図である。

【0033】

【図9】WT1/A2に対する抗体の親和性を明らかにするWT1/A2抗体の動的結合分析の結果を示す図である。

【0034】

【図10】WT1/A2複合体に結合する抗体の親和性(K_D)を示す図である。

【0035】

50

【図11】様々な濃度のペプチド、すなわち、WT1-A、WT1-A1、又はコントロールでパルスしたT2生細胞に対するいくつかの実施態様、すなわち、mAbクローン5（上のパネル）、クローン15（中央のパネル）そして、コントロール（下のパネル）の結合のペプチド滴定のフローサイトメトリーによる平均蛍光強度（MFI）を示す図である。

【0036】

【図12】様々な濃度のWT1AペプチドでパルスしたT2生細胞に対する、WT1抗体、mAb5（上のパネル）、mAb15（下のパネル）の結合のペプチド滴定の結果を示す図である。

【0037】

【図13】ペプチド（R3、WT1-A1、WT1-A、又はペプチドなし）の異なった濃度（50 µg/mL上；25 µg/mL中央；及び12.5 µg/mL下）での、一つの実施態様であるmAb5の結合特異性を示す図である。

【0038】

【図14】ペプチド（R3、WT1-A1、WT1-A、又はペプチドなし）の異なった濃度（50 µg/mL上；25 µg/mL中央；12.5 µg/mL下）での、一つの実施態様であるmAb15の結合特異性を示す図である。

【0039】

【図15】WT1-A、WT1-A1、又はRHAMM-R3ペプチドでパルスしたT2細胞に対する、mAb5（上のパネル）及びmAb15（下のパネル）の用量依存的結合を示す図である。

【0040】

【図16】mAb5及び15の、骨髄腫細胞株であるU266への結合を示す図である。

【0041】

【図17】mAb15の、(Ph1)陽性急性白血病を有する患者由来の細胞株であるBV173への結合を示す図である。

【0042】

【図18】WT1ペプチドでパルスしたT2細胞表面上にあるWT1/A2複合体へ対するESK1(13)の特異的結合を示す図である。

【0043】

【図19-20】図19及び図20は、アラニンで異なる位置の置換をしたRMFペプチドを、WT1抗体が認識できること（表10参照）、及びアラニン（WT1-A1-B）又はチロシン（WT1-A1）のいずれかによる、1位における置換とともに見られた結合の喪失は、HLA-A2分子に対するペプチド結合親和性減少のためではなく、クローンBB7であるHLA-A2分子に特異的なモノクローナル抗体を使用したT2安定化アッセイにおいて、両方のペプチドが最も強い結合を示したためであることを示す図である。

【0044】

【図21】ヒト中皮腫細胞株であるJMN(WT1⁺/A0201⁺)の細胞表面のRMF/HLA-A0201複合体により自然に提示されるWT1抗体を認識するが、MSTO(WT1⁺/HLA-A0201⁻)は認識しないことを示す図である。

【0045】

【図22】ヒトCML由来細胞であるBV173に対するWT1抗体の結合を示す図である。

【0046】

【図23】WT1抗体のJMN細胞への結合に基づいたスキャッチャード解析及び0.2nmの定数についてのアビディティを示す図である。

【0047】

【図24】中皮腫及び白血病細胞のパネルに結合するWT1抗体を示す図である。

【0048】

10

20

30

40

50

【図25】HLA-A2陽性の患者からのCD33及びCD34二重陽性のAML芽球細胞にゲートされたフローサイトメトリー分析の結果を示す図である。ESK1は、白血病芽球に結合する。

【0049】

【図26】HLA-A2陰性の患者からのCD33及びCD34二重陽性のAML芽球細胞にゲートされたフローサイトメトリー分析の結果を示す図である。WT1 mAb ESK1は、芽球に結合しなかった。

【0050】

【図27】RMFペプチドでパルスしたT2細胞に対するADCCで媒介されるWT1 mAb ESK1を示す図である。

10

【0051】

【図28】JMN及び白血病細胞株であるBV173(下のパネル)において、ヒトエフェクターにADCCを媒介させる能力をWT1抗体が有すること、及びMSTOにおいては能力を有しないことを示す図である。

【0052】

【図29】WT1 mAbはヒト白血病細胞であるBV173に有効であり、HLA-A2+でないHL60に有効ではないことを示す図である。

【0053】

【図30】WT1抗体は、HLA-A2陽性患者からの一次性AML芽球に対して、ADCCを誘導することを示す図である。

20

【0054】

【図31】本発明の抗体を使用したNSGマウスにおけるヒトBV173処理の結果を示す図である。

【0055】

【図32】後の時点で、WT1抗体のみを処理したマウスは再発が始まり、一方、エフェクターとともに抗体を処理した5匹のマウスは、そのうち2匹が治癒したことを示す図である。

【0056】

【図33】用量依存的方法において、WT1抗体が全身腫瘍組織量を有意に減少させることを示す図である。

30

【0057】

【図34】Fc(MAGE)中に変更した糖鎖を有する抗体が、ADCCにおいて、もとの抗体より活性があることを示す図である。

【発明の詳細な説明】

【0058】

本明細書に引用される全ての刊行物、特許、及びその他の参考文献は、本開示にその全体が参照として組み込まれる。

【0059】

本発明の実施において、分子生物学、微生物学、細胞生物学、生化学、及び免疫学の多くの従来技術が使用されており、これらは当業者の技術の範囲内である。これらの技術は例えば、Molecular Cloning: a Laboratory Manual 3rd edition, J.F. Sambrook and D.W. Russell, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001; Recombinant Antibodies for Immunotherapy, Melvyn Little, ed. Cambridge University Press 2009; "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (

40

50

F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "a Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: a Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001)において、より詳細に記載されている。これらの参考文献及び基本的なプロトコルを含むその他の参考文献の内容は、当業者に広く知られるとともに信頼されており、前記プロトコルにはメーカーの説明書等も含まれ、これらは本開示の一部として本明細書に組み込まれる。次の略語は出願全体を通して使用される。

【0060】

Ab: 抗体

【0061】

ADCC: 抗体依存性細胞傷害

【0062】

ALL: 急性リンパ性白血病

【0063】

AML: 急性骨髄性白血病

【0064】

APC: 抗原提示細胞

【0065】

2M: 2 - ミクログロブリン

【0066】

BiTE: 二重特異性T細胞結合抗体

【0067】

CAR: キメラ抗体受容体

【0068】

CDC: 補体依存性細胞傷害

【0069】

CMC: 補体依存性細胞傷害

【0070】

CDR: 相補性決定領域 (下記HVR参照)

【0071】

C_L: 軽鎖定常領域

【0072】

CH₁: 第一重鎖定常領域

【0073】

CH_{1, 2, 3}: 第一、第二、及び第三重鎖定常領域

【0074】

CH_{2, 3}: 第二及び第三重鎖定常領域

【0075】

CHO: チャイニーズハムスター卵巣

【0076】

CTL: 細胞傷害性T細胞

【0077】

E:T Ratio: エフェクター: 標的 比率

【0078】

Fab: 抗体結合部分

【0079】

FACS: フローアシスティッドサイトメトリックセルソーティング

10

20

30

40

50

【 0 0 8 0 】	F B S : ウシ胎児血清	
【 0 0 8 1 】	F R : フレームワーク領域	
【 0 0 8 2 】	H C : 重鎖	
【 0 0 8 3 】	H L A : ヒト白血球抗原	
【 0 0 8 4 】	H V R - H : 重鎖超可変領域 (C D R 参照)	10
【 0 0 8 5 】	H V R - L : 軽鎖超可変領域 (C D R 参照)	
【 0 0 8 6 】	I g : 免疫グロブリン	
【 0 0 8 7 】	I R E S : インターナルリボソームエントリーサイト	
【 0 0 8 8 】	K _d : 解離定数	
【 0 0 8 9 】	K _{off} : 解離速度	20
【 0 0 9 0 】	K _{on} : 会合速度	
【 0 0 9 1 】	M H C : 主要組織適合性遺伝子複合体	
【 0 0 9 2 】	M M : 多発性骨髄腫	
【 0 0 9 3 】	s c F v : 単鎖可変領域断片	
【 0 0 9 4 】	T C R : T細胞受容体	30
【 0 0 9 5 】	V _H : 重鎖超可変領域、及び重鎖可変フレームワーク領域を含む可変重鎖	
【 0 0 9 6 】	V _L : 軽鎖超可変領域、及び軽鎖可変フレームワーク領域を含む可変軽鎖	
【 0 0 9 7 】	W T 1 : ウィルムス腫瘍タンパク質 1	
【 0 0 9 8 】	以下の記載においては、用語の使用に関しては、一定の規則に従うことになる。一般に、本明細書で使用される用語は、当業者に知られているようなそれらの用語の意味に一貫して解釈されることを意図している。	40
【 0 0 9 9 】	「抗原結合性タンパク質」は、ある抗原結合性領域又はその抗原結合性部分を含むタンパク質又はポリペプチドであり、それが結合する他の分子への強い親和性を有する。抗原結合性タンパク質は、抗体、キメラ抗原受容体 (C A R S) との融合タンパク質を包含する。	
【 0 1 0 0 】	用語「抗体 (A n t i b o d y) 」及び「抗体 (a n t i b o d i e s) 」は、当該技術分野で知られているように、免疫系の抗原結合性タンパク質を指す。本明細書で使用される用語「抗体 (a n t i b o d y) 」という用語は、抗原結合性領域を有する完全長の抗体、そして、「抗原結合性部分」若しくは「抗原結合性領域」は、保持されたその任意	50

の断片又は単鎖を含み、例えば、単鎖可変領域断片 (s c F v) が挙げられる。天然に存在する「抗体 (antibody)」は、ジスルフィド結合により相互に連結された少なくとも2つの重 (H) 鎖及び2つの軽 (L) 鎖を含む糖タンパク質である。各重鎖には、重鎖可変領域 (本明細書では V_H と略記される) 及び重鎖定常領域 (CH) が含まれる。重鎖定常領域は、CH1、CH2、及びCH3の3つのドメインから構成される。各軽鎖には、軽鎖可変領域 (本明細書では V_L と略記される) 及び軽鎖定常領域 (C_L) が含まれる。軽鎖定常領域は、 C_L という1つのドメインから構成される。 V_H 及び V_L の領域はさらに、相補性決定領域 (CDR) という超可変性を有する領域、及びフレームワーク領域 (FR) という散在するより保存されている領域に細分することができる。 V_H 及び V_L ではアミノ末端からカルボキシ末端へ、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順に、3つのCDR及び4つのFRが、それぞれ配列されている。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞 (例えばエフェクター細胞) 及び古典的な補体系の第一補体 (C1q) を含む宿主組織又は宿主因子への免疫グロブリンの結合を媒介できる。

10

20

30

40

50

【0101】

本明細書において使用される抗体の「抗原結合性部分」又は「抗原結合性領域」という用語は、抗体に対して結合し、そして抗原に対する特異性を抗体に付与するその領域又は部分や抗原結合性タンパク質の断片として言及され、例えば、抗体には、抗原に特異的に結合する能力を維持する抗体の1又はそれ以上の断片が含まれる (例えば、ペプチド/HLA複合体)。抗体の抗原結合機能は完全長抗体の断片で行うことができることが示されている。抗体の「抗体断片」という用語に含まれる抗原結合性断片の例としては、 V_L 、 V_H 、 C_L 及びCH1ドメインから構成される一価の断片であるFab断片、ヒンジ部のジスルフィド結合により結合した二つのFab断片を含む二価の断片であるF(ab)₂断片、 V_H 及びCH1ドメインから構成されるFd断片、抗体の単腕の V_L 及び V_H から構成されるFv断片、 V_H ドメインから構成されるdAb断片 (Ward et al., 1989 Nature 341: 544-546)、及び単離された相補性決定領域 (CDR) が含まれる。

【0102】

さらに、Fv断片の2つのドメインである V_L 及び V_H は、別々の遺伝子によりコードされており、一価の分子を形成する対の V_L 及び V_H を有する単鎖タンパク質としてそれらを作ることができる合成リンカーにより、組換え法を用いて接合することができる。これらは単鎖Fv (s c F v) として知られている; Bird et al., 1988 Science. 242: 423-426及びHouston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879-5883参照。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来技術を用いて得られ、完全な抗体と同様に、断片は有用性のためにスクリーニングされる。

【0103】

「単離された抗体」又は「単離された抗原結合性タンパク質」は、その自然環境の成分から同定され、及び分離され、及び/又は回収されたものである。「合成抗体」又は「組み換え抗体」は、一般に、組換え技術を用いて、又は当業者に公知のペプチド合成技術を用いて生成される。

【0104】

伝統的に、MHC-ペプチド複合体のみが、T細胞受容体 (TCR) によって認識されることができ、このことが、T細胞ベースの読み出しアッセイを用いて、目的のエピトープを検出する我々の能力を制限する。本開示では、組換えHLA-ペプチド複合体を用いたヒトのs c F vファージディスプレイライブラリーから選択されたs c F vをもとにして抗原結合性領域を有する抗体を含む抗原結合性タンパク質が記載されている。これらの分子は、例えば、HLA-A2-RMFPNAPYLのみ認識する抗WT1抗体で示されるように、強い特異性を実証する。加えて、他のペプチドを含有するHLA-複合体に結合することができず、その分子はペプチドそれ自身に結合することもできず、さらに、そ

これらのTCR様の特異性を実証する。

【0105】

ファージディスプレイにより選択した本開示のscFvを、最初はHLA陽性細胞の表面に提示されるペプチドに結合する能力について試験した。

T2細胞が、ペプチドの存在下でインキュベートされた後、フローサイトメトリーを使用して、抗原パルス細胞を選択的に認識するために蛍光標識抗体を使用することができた。

【0106】

いくつかの実施態様においては、本発明は、全体的な親和性と安定性が増加した二価タンパク質を得るためのヒト免疫グロブリンのFc領域を有する抗体を形成するために、一つ又はそれ以上重鎖定常ドメインに融合したscFv配列を有する抗体を含む。また、Fc部分は、他の分子が抗体に直接結合することを可能とし、前記分子には蛍光色素、細胞毒素、放射性同位体などが含まれるがこれに限られないものとし、例えば、抗原定量調査のため、親和性測定の目的で抗体を固定するため、治療薬の標的遺伝子導入のため、免疫エフェクター細胞及びその他の多くのアプリケーションを利用して、Fc媒介性細胞傷害性を試験するために用いられる。

10

【0107】

ここに提示した結果は、MHC-ペプチド複合体を標的とする本発明の抗体の特異性、反応性、及び有用性を強調する。

【0108】

本発明の分子は、ファージディスプレイを使用した単鎖可変領域断片(scFv)の同定及び選択に基づいており、そのアミノ酸配列は、興味のあるMHC拘束性ペプチドに分子特異性を付与し、本開示の抗原結合性タンパク質の主成分を形成する。scFvは、それゆえに、抗体(antibody)分子の多様なアレイの設計に使用することができ、抗体分子には、例えば、完全長抗体、Fab及びF(ab')₂のようなその断片、ミニボディ(minibodies)、scFv-Fv融合を含む融合タンパク質、及び多価抗体、すなわち、例えば、T細胞結合性抗体(BiTe)、トリボディ(tribodies)などのような1以上の同じ抗原若しくは異なった抗原に対して特異性を有する抗体が含まれる(Cuesta et al., Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. Trends in Biotechnology 28:355-362 2010参照)。

20

30

【0109】

抗原結合性タンパク質が完全長抗体である実施態様においては、本発明の抗体の重鎖及び軽鎖は、完全長とすることができ(例えば、少なくとも1つ、好ましくは2つの完全な重鎖、及び少なくとも1つ、好ましくは2つの完全な軽鎖を含むことができる抗体)、又は、抗原結合性部分[Fab、F(ab')₂、Fv、若しくは単鎖Fv断片(「scFv」)]を含む。その他の実施態様では、抗体の重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD、及びIgEから選択される。いくつかの実施態様においては、免疫グロブリンアイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4から、より具体的にはIgG1(例えばヒトIgG1)から選択される。抗体の種類を選択は、抗体が誘発されるように設計されている免疫エフェクター機能に依存する。

40

【0110】

組換え免疫グロブリンの構築において、様々な免疫グロブリンアイソタイプ定常領域に適切なアミノ酸配列及び豊富な抗体の製造方法は、当業者によく知られている。

【0111】

ある実施態様においては、抗体又は他の抗原結合性タンパク質は、抗WT1/HLA-A2-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18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。いくつか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

50

表 1 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 1】

抗原	WT1 (Ext002 #3)		
ペプチド	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs:	1	2	3
VH	GGTFSSYAIS (SEQ ID NO: 2)	GIIPFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 3)	RIPPPYGMVDV (SEQ ID NO: 4)
DNA	ggaggcacctcagcag ctatgctatcagc (SEQ ID NO: 5)	gggatcatccctatcttggtac agcaaaactacgcacagaagt ccagggc (SEQ ID NO: 6)	cggattccccgtactacggtat ggacgctc (SEQ ID NO: 7)
VL	SGSSSNIGSNYYVY (SEQ ID NO: 8)	RSNQRPS (SEQ ID NO: 9)	AAWDDSLNGVV (SEQ ID NO: 10)
DNA	tctggaagcagctccaac atcggaagtaattatgtat ac (SEQ ID NO: 11)	aggagtaatcagcggccctca (SEQ ID NO: 12)	gcagcatgggatgacagcctg aatggtgtggtgta (SEQ ID NO: 13)
Full VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARRIPPPYGMVDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 14)		
DNA	cagggtcagctgggtcagctctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggatgaggtcctctgc aaggcttctggaggcacctcagcagctatgctatcagctgggtgcgacaggcccctggacaagg gctgagtgatggaggatcatccctatcttggtacagcaaaactacgcacagaagtccagg cagagtcacgattaccgaggacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgag atctgaggacacggcctgtattactgtgcgagacggattccccgtactacggtatggacgctctgg ggccaagggaccacgggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO: 15)		
Full VL	QTVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYYVYQQLPGTAPKL LIYRSNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGPRSVDEADYYCAAWDD SLNGVVFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 16)		
DNA	cagactgtggtgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctctgtt ctggaagcagctccaacatcggaagtaattatgtatactggtaccaacagctcccaggaaacggcc cccaaaactctcatatagtagtaatacagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggtcca agtctggcacctcagcctcctggccatcagtgggccccggctcctggtgagcagctgattactgt gcagcatgggatgacagcctgaatgggtggtattcggcggagggaaccaagctgaccgtcctagg t (SEQ ID NO: 17)		
scFv	QTVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYYVYQQLPGTAPKL LIYRSNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGPRSVDEADYYCAAWDD SLNGVVFGGGTKLTVLGS SRGGGGSGGGGSGGGG SLEMAQVQLVQSG AEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFG TANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRIPPPY GMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 18)		
DNA	cagactgtggtgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctctgtt ctggaagcagctccaacatcggaagtaattatgtatactggtaccaacagctcccaggaaacggcc cccaaaactctcatatagtagtaatacagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggtcca agtctggcacctcagcctcctggccatcagtgggccccggctcctggtgagcagctgattactgt gcagcatgggatgacagcctgaatgggtggtattcggcggagggaaccaagctgaccgtcctagg ttctagaggtggtggtggtgagcggcggcggcctggtggtggtatccctcagatggc ccagggtcagctggtgagctctgggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggatgaggtcctctg caaggctctggaggcacctcagcagctatgctatcagctgggtgcgacaggcccctggacaag ggcttgagtggtggaggatcatccctatcttggtacagcaaaactacgcacagaagtccagg gcagagtcacgattaccgaggacgaatccacgagcagcctacatggagctgagcagcctga gatctgaggacacggcctgtattactgtgcgagacggattccccgtactacggtatggacgctg ggccaagggaccacgggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO: 19)		

10

20

30

40

【 0 1 1 2 】

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WT - 1 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	ggggacagtgctctagc aacagtgctgcttgaac (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	cgggcaagtcagagcatt agcagctatttaaat (SEQ ID NO: 29)	gctgcacccagttgcaaagt (SEQ ID NO: 30)	caacagagttacagtacccct ctcact (SEQ ID NO: 31)
Full VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGL EWLGRYYGSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTA VYYCARGRLGDAFDIWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 32)		
DNA	caggtacagctgcagcagctcaggtccaggactgggaagccctcgagaccctctcactcactgt gccatctcggggacagtgctctagcaacagtgctgcttgaactggatcagcagtcctccatcg agaggccttgagtggtgggaaggacatactacgggtccaagtgataatgattatgcagatctg tgaaaagtcgaataaacatcaaccagacacatccaagaaccagttcctcctgcagctgaactct gtgactccgaggacacggctgtgtattactgtgcaagaggtcgcttaggggatgctttgatactgg ggcaaggacaatggcaccgtctctca (SEQ ID NO: 33)		
Full VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLT FGGGTKVDIKR (SEQ ID NO: 34)		
DNA	gacatccagatgaccagctcctcctcctctgctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttg ccgggcaagtcagagcattagcagctatttaattggatcagcagaaaccagggaaagcccta agctcctgatctatgctgcatccagttgcaaagtgggtccatcaagggtcagtgccagtgatct gggacagattcactctcaccatcagcagctgcaacctgaagatttgcaactactactgcaaca gagttacagtaccctctcacttccggcggaggaccaagtgatatacaacct (SEQ ID NO: 35)		
scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLT FGGGTKVDIKR SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA QVQLQQSGPGLVK PSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYGSKWY NDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGRLGDAF DIWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 36)		
DNA	gacatccagatgaccagctcctcctcctctgctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttg ccgggcaagtcagagcattagcagctatttaattggatcagcagaaaccagggaaagcccta agctcctgatctatgctgcatccagttgcaaagtgggtccatcaagggtcagtgccagtgatct gggacagattcactctcaccatcagcagctgcaacctgaagatttgcaactactactgcaaca gagttacagtaccctctcacttccggcggaggaccaagtgatatacaacct cttagaggtg gtgggtgtagcggcggcggcggcctctgggtggtggatccctcagatggcc caggtac agctgcagcagtcaggtccaggactggtaagccctcgagaccctcactcactcactgctccatct ccggggacagtgctctagcaacagtgctgcttggactggatcaggcagtcctcctcagaggc cttgagtggtgggaaggacatactacgggtccaagtgataatgattatgcagatctgtgaaaa gtcgaataaacatcaaccagacacatccaagaaccagttcctcctgcagctgaactctgtgactc ccgaggacacggctgtgtattactgtgcaagaggtcgcttaggggatgctttgatactggggcca gggacaatggcaccgtctctca (SEQ ID NO: 37)		

10

20

30

40

【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WT-1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3から選択されるCDRを有する完全長ヒトIgG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	ggatacagcttccaact tctggatcagc (SEQ ID NO: 41)	aggggtgatcctggctactctta tagcacctacagcccgtcctc caaggc (SEQ ID NO: 42)	gtacaatatagtggtactatg actggttcgacccc (SEQ ID NO: 43)
VL	SGSSNIGSNTVN (SEQ ID NO: 44)	SNNQRPS (SEQ ID NO: 45)	AAWDDSLNGWV (SEQ ID NO: 46)
DNA	tctggaagcagctccaac atcggaagtaactgtaa ac (SEQ ID NO: 47)	agtaataatcagcggccctca (SEQ ID NO: 48)	gcagcatgggatgacagcct gaatggtgggtg (SEQ ID NO: 49)
Full VH	QMQLVQSGAEVKEPGESLRISCKGSGYSFTNFWISWVRQMPGKGLE WMGRVDPGYSYSTYSPSFQGHVTISADKSTSTAYLQWNSLKASDTA MYYCARVQYSGYYDWFDPWGQGLTIVTSS (SEQ ID NO: 50)		
DNA	cagatgcagctggtgactcagcagcagaggtgaaagagccccgggagctctgaggatctct gtaaggttctggatacagcttccaactctggatcagctgggtgcccagatgccccggaaa ggcctggatggatggggaggtgatcctggctactctttagcacctacagcccgtcctccaag gccacgtcaccatctcagctgacaagctaccagcactgcctacctcagtggaacagcctgaag gctcggacaccgcatgtattactgtgagagtagacaatatagtggtactatgactggttcgacc cctggggccaggaaccctggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO: 51)		
Full VL	QAVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNTVNWYQQVPGTAPK LLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWD DSLNGWVFGGKTLTVLG (SEQ ID NO: 52)		
DNA	caggctgtggtgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggagagggcaccatctctgt tctggaagcagctccaacatcggaagtaatactgtaaacctggtaccagcaggtcccaggaacgg ccccaaactcctcatctatagtaataatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggtc caagctggcacctcagcctccctggccatcagtggtcctcagctgaggatgaggctgattattac tgtcagcatgggatgacagcctgaatggtgggtgttcggcggagggaaccaagctgaccgtcct aggt (SEQ ID NO: 53)		
scFv	QAVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNTVNWYQQVPGTAPK LLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWD DSLNGWVFGGKTLTVLGS RRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA QMQLV QSGAEVKEPGESLRISCKGSGYSFTNFWISWVRQMPGKGLEWMGR VDPGYSYSTYSPSFQGHVTISADKSTSTAYLQWNSLKASDTAMYCA RVQYSGYYDWFDPWGQGLTIVTSS (SEQ ID NO: 54)		
DNA	caggctgtggtgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggagagggcaccatctctgt tctggaagcagctccaacatcggaagtaatactgtaaacctggtaccagcaggtcccaggaacgg ccccaaactcctcatctatagtaataatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggtc caagctggcacctcagcctccctggccatcagtggtcctcagctgaggatgaggctgattattac tgtcagcatgggatgacagcctgaatggtgggtgttcggcggagggaaccaagctgaccgtcct aggttctagaggtggtggtgtagcggcggcggcgtctggtggtggatcccctgagatgg cccagatgcagctggtcagctccggagcagaggtgaaagagccccgggagctctgaggatct cctgtaagggttctggatacagcttccaactctggatcagctgggtgcgagatgccccggga aaggcctggagtgatggggaggtgacccctggctactctttagcacctacagcccgtcctcca aggccacgtcaccatctcagctgacaagctaccagcactgcctacctcagtggaacagcctga aggcctcggacaccgcatgtattactgtgagagtagacaatatagtggtactatgactggttcga cccctggggccaggaaccctggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO: 55)		

10

20

30

【0114】

40

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72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WT-1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4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)	ggtattaattggaatggtggt agcacaggtatgcagactc tgtgaggggc (SEQ ID NO: 78)	gagcgtggctacgggtacca tgatccccatgactac (SEQ ID NO: 79)
VL	GRNIGSKSVH (SEQ ID NO: 80)	DDSDRPS (SEQ ID NO: 81)	QWVDSDDHVV (SEQ ID NO: 82)
DNA	gggagaaacaacattgg aagtaaaagtgtgcac (SEQ ID NO: 83)	gatgatagcgaccggccctc a (SEQ ID NO: 84)	caggtgtgggatagtagtagt gatcatgtgta (SEQ ID NO: 85)
Full VH	EVQLVQSGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGL LEWVSGINWNGGSTGYADSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE DTALYYCARERGYGYHDPHDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 86)		
DNA	gaagtcagctgtgctgagctctggggaggtgtggtacggcctgggggctccctgagactctct gtgcagcctctgggtcaccttgatgattatggcatgagctgggtccgccaagctccagggaag ggctggagtggtctctgttattaattggaatggtgtagcacaggtatgcagactctgtgagg ggcggattcaccatctccagagacaacgccaagaactccctgtatctgcaaatgaacagctctg agagccgaggacacggcctgtattactgtgcgagagagcgtggctacgggtaccatgatccc catgactactgggccaaggcaccctggtgaccgtctctca (SEQ ID NO: 87)		
Full VL	QSVVTQPPSVSVAPGKTARITCGRNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLL VYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVW DSSSDHVVFGGGTKLTVLGS SRGGGGSGGGGSGGSLEMA EVQLVQ SGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSG GINWNGGSTGYADSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYY CARERGYGYHDPHDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 88)		
DNA	cagtctgtctgacgcagcgcgcccctcggtgtcagtggtggccccaggaaagacggccaggattac ctgtgggagaaacaacattggaagtaaaagtgtgactgtaccagcagaagccaggccag gcccctgtctggtctatgatgatagcagccgcccctcaggatccctgagcagattctctgg ctccaactctgggaacacggccaccctgaccatcagcagggctgaagccggggatgaggcc gactattactgtcaggtgtgggatagtagtagtgatcatgtggtattcggcggaggaccaggct gaccgtcctaggt (SEQ ID NO: 89)		
scFv	QSVVTQPPSVSVAPGKTARITCGRNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLL VYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVW DSSSDHVVFGGGTKLTVLGS SRGGGGSGGGGSGGSLEMA EVQLVQ SGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSG GINWNGGSTGYADSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYY CARERGYGYHDPHDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 90)		
DNA	cagtctgtctgacgcagcgcgcccctcggtgtcagtggtggccccaggaaagacggccaggattac ctgtgggagaaacaacattggaagtaaaagtgtgactgtaccagcagaagccaggccag gcccctgtctggtctatgatgatagcagccgcccctcaggatccctgagcagattctctgg ctccaactctgggaacacggccaccctgaccatcagcagggctgaagccggggatgaggcc gactattactgtcaggtgtgggatagtagtagtgatcatgtggtattcggcggaggaccaggct gaccgtcctaggt cttagaggtggtggtgtagcggcggcggcctctggtggtacc tcgagatggcc aagtcagctggtgactctggggaggtgtggtacggcctgggggtcc ctgagactctctgtgacgctctgggtcaccttgatgattatggcatgagctgggtccgccaag ctccaggaagggctggagtggtctctgttattaattggaatggtgtagcacaggtatgca gactctgtgagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactccctgatctgcaa atgaaacagctgagagccgaggacacggcctgtattactgtgagagagcgtggctacggg taccatgatccccatgactactgggccaaggcaccctggtgaccgtctctca (SEQ ID NO: 91)		

10

20

30

40

【0116】

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108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WT-1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6から選択されるCDRを有する完全長ヒトIgG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	gggttctccgtagtgccac 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 gatggttatgctc (SEQ ID NO. 103)
Full VH	EVQLVETGGGLLQPGGSLRLSCAASGFSVSGTYMGWVRQAPGKGLE WVALLYSGGGTYHPASLQGRFIVSRDSSKNMVYLMNSLKAEDTAVY YCAKGGAGGGHFDSWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 104)		
DNA	gaggtcagctggtggagaccggagaggctgtccagccggggggctcctcagactctctg tgcagcctctgggtctccgtagtgccactacatgggctgggtccgaggtccagggagg actggagtggtgcactcttatagtggtggcggcacataccaccagcgtccctgagggcgg attcatcgtctccagagacagctccaagaataggtctatctcaaatgaatagcctgaaagccgag gacacggcctctattactgtgcaaaaggaggggcaggaggtggcacttgactctggggcca aggcaccctggtgaccgtctctca (SEQ ID NO. 105)		
Full VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPK LLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWD DSLNGYVFGTGKTLTVLG (SEQ ID NO. 106)		
DNA	cagctctgtgtgacgcagccctcagtgctggggcccagggcagagggtccacctctctgc actgggagcagctccaacatcggggcaggttatgatgtacactggtaccagcagctccaggaac agcccccactcctcatctatgtaacagcaatcgccctcaggggtccctgaccgattctctggc tccaagtctggcaccctcagcctccctggccatcagtggtccagctgaggatgaggctgattatta ctgtgcagcatgggatgacagcctgaatggttatgtctcggaaactgggaccaagctgaccgtccta ggt (SEQ ID NO. 107)		
scFv	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPK LLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWD DSLNGYVFG TGKTLTVLGSRRGGGSGGGGSGGGGSLMAEVQLVETGGGLLQPG GSLRLSCAASGFSVSGTYMGWVRQAPGKGLEWVALLYSGGGTYHPA SLQGRFIVSRDSSKNMVYLMNSLKAEDTAVYYCAKGGAGGGHFDS WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 108)		
DNA	cagctctgtgtgacgcagccctcagtgctggggcccagggcagagggtccacctctctgc actgggagcagctccaacatcggggcaggttatgatgtacactggtaccagcagctccaggaac agcccccactcctcatctatgtaacagcaatcgccctcaggggtccctgaccgattctctggc tccaagtctggcaccctcagcctccctggccatcagtggtccagctgaggatgaggctgattatta ctgtgcagcatgggatgacagcctgaatggttatgtctcggaaactgggaccaagctgaccgtccta ggtctagagggtggtggtgtagcggcggcggcctctggtggtggtggatccctcagag atggccgagggtcagctggtggagaccggaggaggtgtctccagccgggggggtccctcaga ctctctgtgcagcctctgggtctccgtagtgccactacatgggctgggtccgcaaggctccagg gaagggactggagtggtgcactcttatagtggtggcggcacataccaccagcgtccctgca ggccgattcatcgtctccagagacagctccaagaataggtctatctcaaatgaatagcctgaaa gcccaggacacggcgtctattactgtgcaaaaggaggggcaggaggtggcacttgactctg ggccaaggcaccctggtgaccgtctctca (SEQ ID NO. 109)		

10

20

30

40

【 0 1 1 7 】

開示された抗体及び抗原結合性タンパク質のその他の実施態様は、例えば、表 7（重鎖）、8（軽鎖）、及び 9（定常領域）として示される軽鎖及び重鎖超可変領域及び定常領域を含む。

【表 7】

Group I	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	SEQ ID NO.
EXT002-12(166)	SNAVAWN	RTYRGSTYY---ALSV	G-SNSAFDF	119-121
EXT002-5(184)	SNSAAWN	RTYYGSKWYNDYAVSV	GRLGDAFDI	122-124
EXT002-8(184)	SDGAAWN	RTYYRSKWYNDYAVSV	GDYYYGMDV	125-127
Consensus(191)	SNAAAWN	RTYYGSKWYNDYAVSV	G AFDI	128-130
Group II				
EXT002-14(163)	SYWIS	RIDPSDSYTNYSFSFQG	GD-----YDFYLDP--	131-133
EXT002-25(163)	SYGIS	WISAYNGNTNYAQKLQG	DLYSSGWYESYYYGMDV	134-136
EXT002-3(186)	SYAIS	GIIPIFGTANYAQKFQG	RIP-P-----YYGMDV	137-139
EXT002-30(163)	SYGIS	WISAHNGNTNYAQKLQG	DR-----VWFGDLSD	134, 140, 141
EXT002-33(163)	SYAIS	GIIPIFGTANYAQKEQG	NYDFWSG-----DAFDI	137, 142, 143
Consensus(188)	SYAIS	I P G TNYAQKFQG	FY GMDV	137, 144, 145
Group III				
EXT002-34(161)	DYGMS	GINWNGGSTGYADSV	ERGY-GYHDPHDY	146-148
EXT002-40(157)	NYTMN	SISLSGAYIYYADSL	EGYSSSVYDAFDL	149-151
EXT002-45(165)	SYGMH	GILSDGGKDYYVDSV	CSSN-YGNDAFDI	152-154
EXT002-48(165)	TYSMN	SISSGAYSIFYADSV	DQYYGDKWDAFDI	155-157
Consensus (170)	SYGMN	SISS GGSIIYADSV	E YY WDAFDI	158-160

10

20

30

40

【表 8】

	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	SEQ ID NOS.
Group I				
EXT002-1 (46)	CSGSSSNIGS-NTVN	SNNQRPSG	AAWDDSLNG--WVFG	161-163
EXT002-10 (46)	CSGSSSNIGS-NTVN	SNNQRPSG	EAWDDSLKG--PVFG	161, 162, 164
EXT002-12 (22)	CTGSSSNIGAGYDVH	GNSNRPSG	QSYDSSLADNYVFG	165-167
EXT002-13 (46)	CSGSSSNIGS-NTVN	SNNQRPSG	AAWDDSLNG--WVFG	161-163
EXT002-2 (46)	CSGSSSNIGR-NIVN	SNIERPSG	ASWDDSLNG--VLFV	168-170
EXT002-20 (46)	CSGSRSNIAS-NGVG	KNDQRPSG	SAWDDSLDGH-VVFG	171-173
EXT002-23 (46)	CTGSSSNIGAGYDVH	GNSNRPSG	AAWDDSLNG--YVFG	165, 166, 174
EXT002-25 (22)	CSGSSSNIGS-STVN	SNSQRPSG	AAWDDSLNG--VVFG	175-177
EXT002-3 (46)	CSGSSSNIGS-NYVY	RSNQRPSG	AAWDDSLNG--VVFG	178, 179, 177
EXT002-30 (22)	CSGSSSNIGR-NTVN	SNNQRPSG	AAWDDSLNG--YVFG	180, 162, 174
EXT002-33 (22)	CSGSSSNIGN-DYVS	DNNKRPSG	GTWDNSLSA--WVFG	181-183
EXT002-36 (22)	CSGSSSNIGS-NSVY	NNNQRPSG	ATWDDSLSG--WVFG	184-186
EXT002-40 (22)	CSGSSSNIGS-NYVY	RNNQRPSG	AAWDDSLSA--WVFG	178, 187, 188
EXT002-42 (46)	CSGSTSNIGS-YYVS	DNNNRPSG	GTWDSSLSA--WVFG	189-191
EXT002-45 (22)	CSGSSSNIGN-NYVS	DNNKRPSG	GTWDSSLSA--WVFG	192, 182, 191
EXT002-48 (22)	CSGSSSNIGT-NTVT	SNFERPSG	SAWDDSFNG--PVFG	193-195
EXT002-6 (46)	CSGSSSNIGS-NYVS	RNNQRPSG	AAWDDGLRG--YVFG	196, 187, 197
EXT002-9 (22)	CSGSSSNIGS-NTVN	SNNQRPSG	EAWDDSLKG--PVFG	161, 162, 164
Consensus (46)	CSGSSSNIGS N V	NNQRPSG	AAWDDSL G WVFG	161-163

10

20

30

Group II				
EXT002-24 (24)	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTP--T	198-200
EXT002-31 (24)	RASQGISNYLA	AASTLQS	QKYNAPGVT	201-203
EXT002-35 (24)	RASQSINGWLA	RASTLQS	QQSSSLP-FT	204-206
EXT002-5 (48)	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTP-LT	198-200
EXT002-7 (48)	RASQGISYLLA	AASTLKS	QQLNSYP-LT	207-209
EXT002-B (48)	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTP-WT	198-200
Consensus (48)	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTP LT	198-200
Group III				
EXT002-16 (23)	GGNNIGSKSVH	DDSDRPS	QVWDSSSDHPV	210-212
EXT002-17 (47)	GGNNIGSKSVH	DDSDRPS	QVWDSSGDHPV	210, 211, 213
EXT002-19 (47)	GGNNIGSKSVH	YDSDRPS	QVWDSSSDHPV	210, 214, 212
EXT002-21 (19)	GGTNIGSRFVH	DDSDRPS	QVWDSSGDHPV	215, 211, 213
EXT002-22 (47)	GGNNVESKSVH	YDRDRPS	EVWDSGSDHPV	216-218
EXT002-32 (23)	GGKNIGSKSVH	YDSDRPS	QVWDSSGDHYV	219, 214, 220
EXT002-34 (23)	GGNNIGSKSVH	DDSDRPS	QVWISSGDRVI	210, 211, 221
EXT002-43 (23)	GGDNIGSQGVH	YDTRDRPS	QVWGASSDHPV	222-224
Consensus (47)	GGNNIGSKSVH	YDSDRPS	QVWDSSSDHPV	210, 214, 212
Group IV				
EXT002-11 (47)	TGTSSDVGGYNYVS	DVSKRPS	GIYTYSDSW--V	225-227
EXT002-14 (23)	TGTSSDVGGYNYVS	DVGNRPS	SSYTSSSTR--V	225, 228, 229
EXT002-26 (23)	TGTRSDVGLYNYVA	DVIYRPG	SSYTNTGTV--L	230-232
EXT002-4 (47)	TGTSSDFGDYDYVS	DVSDRPS	QSYDSSLSGSGV	233-235
Consensus (47)	TGTSSDVGGYNYVS	DVS RPS	SSYTSS S V	225, 234, 229

10

20

30

40

【表 9】

定常領域	
ヒト重鎖定常領域及び IgG1 Fcドメイン配列	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO. 236)
ヒト軽鎖 (カッパ)	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO. 237)
ヒト軽鎖 (カッパ)	QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGS PVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEG STVEKTVAPTECS (SEQ ID NO. 238)

10

20

【0118】

本発明は、細胞内タンパク質由来のペプチド/タンパク質断片複合体エピトープを特異的に認識する組み換え抗原結合性タンパク質、抗体、及びその抗原結合性断片、並びに、例えば、抗原提示の間に細胞表面に表示されることができるとような複合体MHCクラスI分子に関する。本発明の抗体の重鎖及び軽鎖は、完全長（例えば、少なくとも1つの、好ましくは2つの完全な重鎖、及び少なくとも1つの、好ましくは2つの軽鎖を含むことができる抗体）であることができ、又は抗原結合性部分[Fab、F(ab')₂、Fv、又は単鎖Fv断片(「scFv」)]を含むことができる。その他の実施態様では、抗体の重鎖定常領域は、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD、及びIgEから、具体的には、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4から、より具体的には、IgG1（例えばヒトIgG1）から選択される。そのほかの実施態様では、抗体の軽鎖定常領域は、例えば、カッパ又はラムダ、具体的にはカッパから選択される。

30

【0119】

本発明の抗体及び抗原結合性タンパク質は、二重特異性T細胞結合性抗体、すなわち2つの分離した抗原に結合することができる単鎖ポリペプチド上の2つの抗体可変領域を有する抗体を含む二重特異性抗体を包含することを意図している。例えば、二重特異性抗体の第一部分が腫瘍細胞上の抗原に結合する部位、及び二重特異性抗体の第二部分がヒト免疫エフェクター細胞の表面の抗原を認識する部位によって、抗体は、エフェクター細胞がヒト免疫エフェクター細胞上のエフェクター抗原に特異的に結合することにより、活性を回復させることができる。場合によっては、二重特異性抗体は、それゆえに、エフェクター細胞の、例えば、T細胞及び腫瘍細胞の結合を形成することができ、そこで、エフェクター機能を活性化する。

40

【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

50

残基の数、エフェクター細胞の機能、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。

【0121】

ある実施態様では、抗体は抗WT1/A2抗体であり、表9に示されるヒトIgG1定常領域及びFcドメインを含む。ある実施態様では、抗WT1/A2抗体は表9に示される配列を有するヒトカッパ配列又はヒトラムダ配列を含む。発明に係る抗体のいくつかの相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列は、表1-8に示される。

【0122】

本発明は、様々な抗原結合性タンパク質を生産することができる抗原特異的結合配列の同定に基づいている。T細胞へのタンパク質の提示及び抗原処理後のT細胞受容体によって、典型的に認識されるものと同様のタンパク質断片(ペプチド)/HLA複合体を表す抗原に特異的な抗体に加えて、抗体の調製のために本明細書に開示されるようなアミノ酸配列及び核酸配列の同定もまた、タンパク質断片(ペプチド)/HLA複合体に対する特異性を、キメラ抗原受容体(CAR)を含む他の抗原結合分子を生成するために使用することができる。これらは、抗原発現細胞に対して特異的に細胞傷害性となるように細胞に組み込むことができる。

10

【0123】

本発明は、細胞表面に発現させていないため、得がたいタンパク質を含む任意のタンパク質への治療用抗体を得るための新規なアプローチを採用している。ほぼ全ての細胞質内又は核内タンパク質は、(細胞表面タンパク質に加えて)本明細書に記載されたアプローチの潜在的な標的である。これには、発癌性タンパク質、転写因子、酵素などが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0124】

細胞内又は核タンパク質に由来する腫瘍抗原を標的とするために、治療用抗体の開発はありふれていないアプローチが必要とされた。このアプローチは、T細胞受容体(TCR)と同じ特異性を有する、細胞表面上に発現させたペプチド/MHC複合体を認識するモノクローナル抗体を生成することである。このようなモノクローナル抗体は、ターゲット認識に関してのTCRとの機能的相同性を共有するが、その抗体を特徴づける強力な細胞傷害性薬剤を付与する高い親和性と能力を与える。技術的には、TCR様モノクローナル抗体は、ヒト、ヒト化、又はキメラ抗体を産生するための当業者に公知の従来のハイブリドーマ技術によって生成することができる。

30

【0125】

さらに、マウス抗体を人に投与したときは、HAMMA(ヒト抗マウス抗体)反応(24、25)として知られる免疫原性反応を引き起こし、アナフィラキシー及び過敏性反応を含む重篤な副作用を生じさせるため、完全ヒトモノクローナル抗体が、人における治療的使用に好ましい。この免疫原性反応は、天然のヒト抗体とは若干異なるアミノ酸配列であるため、マウス抗体を異質であると認識するヒト免疫系によって引き起こされる。当該技術分野で知られているヒト化法(26、27)は、マウス由来抗体(28)の免疫原性を低減するために使用することができる。

40

【0126】

近年、ファージディスプレイライブラリーを用いることにより、たくさんの抗体レパートリーから特定のエピトープに対して独特で珍しい抗体を選択することが可能になる(ファージディスプレイのさらに詳細についてはMcCafferty et al., Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature, 348: 552-554参照)。腫瘍抗原由来ペプチド-MHC複合体分子に対する非常に特異的なヒトFab又は単鎖Fv(scFv)断片の迅速な同定は、このように可能になった(19-22)。より最近では、シュドモナスエンドトキシンのメラノーマAg-MART 1-26 35/A2又はgp100-280 288/A2欠失型に特異的なT

50

CR様Fabを融合することにより生成される免疫毒素は、インビトロ及びインビボの両方で、ヒトメラノーマの増殖を阻害することが示されている。加えて、Fab断片を用いた完全長モノクローナル抗体を遺伝子工学で作ることにより、治療用モノクローナル抗体の開発に通常必要である数か月の時間を消費する作業を行わずして、治療用ヒトモノクローナル抗体を直接生成することが可能となる。本発明は、例えば、癌治療のためのWT1ペプチド/HLA-A2複合体(RMFPNAPYL：配列番号1)を認識するTCR様完全ヒトモノクローナルの開発を含む。

【0127】

TCR様特異性を有する組み換え抗体は、腫瘍免疫学及び免疫療法の研究と治療への応用のための新しい貴重なツールを表している。予後因子及び治療標的のマーカとして世界中で調査され続けてきた、よく検証され、確立された腫瘍抗原である。それは、最近NCITaskフォース(29)によって最優先腫瘍抗原として優先順位付けされた。

10

【0128】

《HLA分子に対して高い予測結合を有するペプチドの同定》

ある実施形態において、本発明は、HLA拘束性ペプチドに特異的に結合する抗体の生成に関し、前記ペプチドは、ペプチド/MHC複合体の一部として提示されたときに、特異的な細胞傷害性T細胞応答を誘発することができる。HLAクラスI分子は、CD8⁺細胞傷害性Tリンパ球の長さで約8-12のアミノ酸の、内在性誘導ペプチドを示す。本発明の方法において使用されるペプチドは、一般的に約6-22個の長さのアミノ酸であり、いくつかの実施態様では約9及び20個のアミノ酸の長さであり、対象のタンパク質に由来するアミノ酸配列、例えば、ヒトWT1タンパク質(GenBankアクセッション番号P19544)又はそのアナログを含む。

20

【0129】

本発明の方法に従って、抗体を生成する際に使用するのに適したペプチドはHLA-A0201結合モチーフの存在及びプロテアソーム及び免疫プロテアソームの切断部位に基づいて、当業者に周知のコンピュータ予測モデルを使用して、決定することができる。MHCクラスI結合部位を予測するために、Propred1(さらに詳細は、Singh and Raghava, Propred: prediction of HLA-DR binding sites. BIOINFORMATICS 17(12):1236-1237 2001に記載されている)、及びSYFPEITHI(Schuler et al. SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, vol 409(1):75-93 2007参照)のようなモデルが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0130】

HLA-A*0201は、すべての白人の39-46パーセントで発現し、従って、本発明の方法において使用するためMHC抗原の適切な選択を表している。WT1ペプチド抗原のある実施態様の調整のため、HLA-A0201分子に対する結合予測した推定上のCD8⁺のエピトープおよびアミノ酸配列はSYFPEITHIデータベース(Schuler et al. SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, vol 409(1):75-93 2007参照)の予測アルゴリズムを用いて同定される。

40

【0131】

一旦適切なペプチドが同定されれば、ペプチド合成は、当業者に周知のプロトコルに従って行うことができる。それらの比較的小さいサイズのために、本発明のペプチドは、直接溶液中又は従来ペプチド合成技術による固体支持体上で合成することができる。様々な自動シンセサイザーが市販されており、公知のプロトコルに従って使用することができ

50

る。液相中のペプチドの合成は、合成ペプチドの大規模生産のための十分に確立された手順となり、それ自体は本発明のペプチドを調製するための適切な代替方法である。(例えばSolid Phase Peptide Synthesis by John M orrow Stewart and Martin et al. Application of Almez-mediated Amidation Reactions to Solution Phase Peptide Synthesis, Tetrahedron Letters Vol. 39, pages 1517 - 1520 1998. 参照)

【0132】

本明細書に記載されているプロトコルで使用されているそれぞれのペプチドは、Genemed Synthesis, Inc. (サンアントニオ、テキサス州)が、フルオレニルメトキシカルボニル化学及び固層合成を用いて合成し、高圧液体クロマトグラフィーにより精製し、購入した。ペプチドの品質は、高速液体クロマトグラフィー分析により評価し、予想分子量は、マトリックス支援レーザー脱離質量分析法を用いて観察した。ペプチドは無菌であり、純度70%~90%であった。ペプチドをDMSOに溶解し、PBS (pH 7.4)又は生理食塩水5mg/mLで希釈し、-80で保存した。

【0133】

ペプチドの選択の後で、選択したペプチドの結合活性は、抗原提示溝におけるペプチドによって安定化させたときにHLA-Aの発現を増加させる、抗原プロセッシング欠損T2細胞株を用いて試験する。簡単に述べると、T2細胞は、HLA-A発現を誘導するのに十分な時間ペプチドでパルスしている。T2細胞のHLA-A発現は、次いで、HLA-A (例えばBB7.2)に特異的な蛍光標識モノクローナル抗体を用いた免疫染色及びフローサイトメトリーによって測定する。蛍光指数(FL)は、式 $FI = [MFI(\text{ペプチドとT2細胞}) / MFI(\text{ペプチドなしのT2細胞})] - 1$ を用いた蛍光活性化細胞ソーティング分析によって決定する、T2細胞上のHLA-A0201平均蛍光強度(MFI)として計算する。

【0134】

ウィルムス腫瘍遺伝子タンパク質(WT1)に対する完全ヒトT細胞受容体(TCR)様抗体は、本明細書に開示した方法を用いて製造した。ファージディスプレイ技術によって生成したTCR様抗WT1抗体は、HLA拘束性細胞傷害性CD8T細胞を誘導したものと同様のWT1ペプチド/HLA複合体に特異的である。

【0135】

WT1タンパク質配列は、SYFPEITHIアルゴリズム及び複数の白人人口において高度に発現したHLA分子への高親和性結合を予測していたことが確認されたWT1ペプチド(例えば、428、328、および122の設計されたペプチド)を使用してスクリーニングした。ペプチド428は、WT1のアミノ酸428~459、ペプチド328はWT1アミノ酸の328~349、そしてペプチド122はWT1アミノ酸122~140にわたる(図1参照)。

【0136】

ヘテロクリティックペプチドは、予測アルゴリズムによって予測されたとして、MHCクラス1対立遺伝子に対して親和性を高めることが期待されるMHC結合性残基の保存アミノ酸置換によって設計することができる。WT1ペプチド122は、公知のCD8⁺エピトープ(126-134)を含む。したがって、一実施形態では、WT1のアミノ酸残基126-134にわたり、その位置における修飾されたアミノ酸を含有するペプチドである、修飾されたペプチドを使用することができる。WT1A(そうでなければ、RFMとして設計)のアラニン変異誘発に使用するペプチドは、置換が行われた位置に基づいて命名した。使用することができるWT1ペプチドの例を無関係な(irrelevant)ペプチドであるRHAMM-R3及びEWとともに、表10に示す。

【表 1 0】

WT1A (RMF)	RMFPNAPYL	SEQ ID NO.: 1
WT1A1-B	AMFPNAPYL	SEQ ID NO.: 110
WT1A-3	RMAPNAPYL	SEQ ID NO.: 111
WT1A-4	RMFANAPYL	SEQ ID NO.: 112
WT1A-5	RMFPAAPYL	SEQ ID NO.: 113
WT1A-7	RMFPNAAYL	SEQ ID NO.: 114
WT1A-8	RMFPNAPAL	SEQ ID NO.: 115
RHAMM-R3	ILSLELMKL	SEQ ID NO.: 116
EW	QLQNPSYDK	SEQ ID NO.: 117
RSDELVRHHNMHQQRNMTKL		SEQ ID NO.: 118
PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG		SEQ ID NO.: 119
SGQARMFPNAPYLPSICLES		SEQ ID NO.: 120
SGQAYMFPNAPYLPSICLES		SEQ ID NO.: 121

10

【 0 1 3 7】

一旦適切なペプチドを同定すると、ペプチド/HLA複合体（例えば、WT1ペプチド/HLA-A0201）であるファージディスプレイライブラリースクリーニングに使用する標的抗原は、複合体を形成するために、溶液中でペプチド及び組織適合抗原をとにもたらすことによって調整される。

20

【 0 1 3 8】

《WT1ペプチドに対して高親和性のscFVの選択》

次のステップは、結合しないか、若しくは弱い親和性で結合するかのどちらかのヒトファージディスプレイライブラリーにおけるファージから高親和性で関心のある標的抗体に結合するファージの選択である。これは、例えば、ビーズ又は哺乳動物細胞に続いて、結合していないファージを除去し、及び特異的に結合したファージを溶出することにより、固体支持体に結合している抗原に対するファージの結合を反復することによって達成される。ある実施形態では、抗原は、例えば、ストレプトアビジン結合ダイナビーズM-280への固定化のためにまず、ビオチン化される。ファージライブラリーを、細胞、ビーズ又は他の固体支持体とともにインキュベートし、結合していないファージは洗浄により除去する。結合するクローンを選択し、試験する。

30

【 0 1 3 9】

一旦選択すると、陽性のscFv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)₂抗マウスIgで標識する。

40

【 0 1 4 0】

他の実施形態では、抗WT1/A抗体は、タンパク質の安定性、抗体結合、発現レベルを向上させるため又は治療薬の結合のための部位を導入するように設計した1つ又はそれ以上のフレームワーク領域のアミノ酸置換を含むことができる。これらのscFvを、次いで、当業者に公知の方法に従って組換えヒトモノクローナルIgを生成するために使用する。

【 0 1 4 1】

白血病細胞の増殖を減少させる方法もまた含まれており、本発明のWT1抗体と白血病細胞を接触させることも含む。関連する態様において、本発明の抗体を、白血病の予防又は治療に使用することができる。治療用抗体の投与は、当該技術分野で公知である。

【 0 1 4 2】

50

《抗腫瘍剤と結合する抗体》

モノクローナル抗体は、細胞毒、放射性核種、又は免疫調節サイトカインの抗体に基づいた送達を含む、生物活性剤を腫瘍部位へ標的送達する好ましい媒体を表している。本発明の抗体と治療薬の結合体は、薬物（カリケアミシン、オーリスタチン、ドキシソルピシンなど）、又は毒素（リシン、ジフテリア、ゲロニンなど）、又はアルファ若しくはベータ粒子を放出する放射性同位体（ ^{90}Y 、 ^{131}I 、 ^{225}Ac 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 、及び ^{227}Th など）、炎症性ペプチド（IL2、TNF、IFN- など）が本発明に包含されるが、これに限定されるものではない。

【0143】

《医薬組成物及び治療方法》

【0144】

本発明のWT1抗体は、予防、阻害、若しくは腫瘍又は病的状態の進行を減少させるのに十分な量を、腫瘍又はWT1関連の病的状態を患う患者への治療的処置のために投与することができる。進行には、例えば、成長、侵襲、転移、及び/又は腫瘍若しくは病的状態の再発が含まれる。この使用のために有効な量は、疾患の重症度及び患者自身の免疫系の一般的な状態に依存するであろう。投与スケジュールはまた、疾患状態及び患者の状態に応じて変化し、通常、単一のボラス投与若しくは持続注入から一日あたり複数回の投与（例えば、4 - 6時間ごと）の範囲又は治療する医師によって示されたものである。

【0145】

本発明のWT1抗体によって治療可能な病状の同定は、当業者の能力及び知識の範囲内である。例えば、臨床的に有意な白血病疾患に苦しんでいる人間又は臨床的に有意な症状が発生する個人のいずれかは、WT1抗体の投与に適している。個人がこのような治療のための候補者であれば、当業者である臨床医は容易に、例えば、臨床試験、理学的診察、及び医療/家族歴のテストを使用することにより、判断することができる。

【0146】

WT1発現により特徴づけられる病理学的状態の非限定的な例には、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、及び骨髄異形成症候群（MDS）を含む。また、固形腫瘍、特に、中皮腫、卵巣癌、消化器癌、乳癌、前立腺癌、及び神経膠芽腫に関連する腫瘍は、一般にWT1抗体を用いた治療に適している。

【0147】

別の実施態様では、従って、本発明は、1又はそれ以上の他の薬剤と組み合わせた本発明のWT1抗体を投与することによって、病状を治療する方法を提供する。例えば、本発明の実施形態は、抗腫瘍剤又は抗血管新生剤とともに、本発明のWT1抗体を投与することによって病状を治療する方法を提供する。WT1抗体は、1又はそれ以上の抗腫瘍剤又は抗血管新生剤に、化学的又は生合成的に結合させることができる。

【0148】

任意の適切な方法又は経路は、本発明のWT1抗体を投与するため、及び必要に応じて、抗腫瘍剤及び/又は他の受容体のアンタゴニストと併用するために使用することができる。投与経路は、例えば、経口、静脈内、腹腔内、皮下、又は筋肉内投与を含む。本発明は、しかしながら、任意の特定の経路又は投与経路に限定されないことを強調すべきである。

【0149】

本発明のWT1抗体は、リガンド毒素の内在化の後に、受容体に特異的に結合し毒性のある致命的なペイロード（payload）を運搬する結合体として投与することができることに留意する。

【0150】

本発明のWT1抗体を、さらに、薬学的に許容可能な担体を含む組成物の形態で投与することが理解される。好ましい薬学的に許容可能な担体としては、例えば、1又はそれ以上の水、生理食塩水、リン酸緩衝水溶液、デキストロース、グリセロール、エタノール、及びそれらの組み合わせを含む。薬学的に許容可能な担体は、さらに、保存可能期間又は

10

20

30

40

50

結合タンパク質の有効性を高める湿潤剤又は乳化剤、防腐剤又は緩衝剤のような少量の補助物質を含むことができる。当技術分野でよく知られているように、哺乳動物への投与後に迅速で、持続的な又は遅効的な活性成分の放出を提供するように、注入する組成物を製剤化することができる。

【0151】

本発明の他の観点としては、細胞及び組織におけるWT1探索のための研究ツールとしての使用と同様に、診断及び予知の用途でWT1関連疾患の治療のためにそれらをコードする抗体及び核酸の使用も含むが、これに限定されない。開示された抗体及び核酸を含む医薬組成物は、本発明に包含される。ベクター免疫療法による抗体ベースの治療のための本発明の核酸を含むベクターも、本発明によって企図される。ベクターには、キメラ抗原受容体などの抗原結合性タンパク質の細胞表面発現に向けられるベクターと同様に、抗体の発現及び分泌を可能にする発現ベクターが含まれる。

10

【0152】

核酸を含む細胞、例えば、本発明のベクターでトランスフェクトされた細胞は本開示に包含される。

【0153】

診断及び研究用途に使用するため、キットはまた、WT1抗体又は本発明の核酸、アッセイ試薬、緩衝液などを含有して提供される。

【0154】

本発明の方法を、代表的な実施態様に関して、より詳細に説明する。

20

【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2mmol/L、及び2-メルカプトエタノールを補充したRPMI1640中で、37C、5%のCO2で培養した。

30

【0156】

FITC又はAPCに結合させたヒトHLA-A2に対するモノクローナル抗体、及びヒト又はマウスCD3、CD19、CD56、CD33、CD34(BD Biosciences社、サンディエゴ)に対するそのアイソタイプコントロールマウスIgG2b/FITC又はAPC、PE、又はFITCに結合させたヤギF(AB)2抗ヒトIgG及び蛍光(In Vitrogen、シティー)に結合させたヤギF(AB)2抗マウスIgGを購入した。HLA-クラスI(W6/32)に対するモノクローナル抗体を、MSKCCモノクローナル抗体基盤施設から得た。

40

【0157】

ペプチド

すべてのペプチドは、Genemed Synthesis社(サンアントニオ、テキサス州)によって合成され、購入した。ペプチドは、>90%の純度であった(表1)。

50

ペプチドを、DMSOに溶解し、生理食塩水5mg/mLで希釈し、-180で凍結させた。ビオチン化された単鎖のWT1ペプチド/HLA-A0201とRHAMM-3/HLA-A0201複合体は、MSKCCのテトラマー施設(Tetramer facility)において、組換えHLA-A2と2マイクログロブリン(2M)とともにペプチドをリフォールディングすることにより合成した。

【0158】

動物

8-10週齢のNOD scid gamma (NSG)として知られるNOD.Cg-Prkdc scid IL2rgtm1Wjl/SzJマウスを、ジャクソン研究所(バーハーバー、メイン州)から購入し、又はMSKCC動物飼育施設から得た。

10

【0159】

《方法》

フローサイトメトリー分析

細胞表面染色のため、細胞を、適切なモノクローナル抗体とともに氷上で30分間インキュベートし、洗浄し、必要なときは、二次抗体試薬とともにインキュベートした。フローサイトメトリーのデータは、FACS Calibur (Becton Dickinson)上に集め、FlowJo V8.7.1及び9.4.8ソフトウェアで分析した。

【0160】

WT1ペプチド/HLA-A0201複合体に特異的なscFvの選択及び同定

20

ヒトscFv抗体ファージディスプレイライブラリーを、モノクローナル抗体クローンの選択のために使用した。プラスチックの表面に固定化することによるMHC1複合体導入の立体構造変化を低減するために、従来のプレートパニング(plate panning)の代わりに、溶液パニング法(solution panning method)を用いた。手短に言うと、まず、ビオチン化抗原を、ヒトscFvファージライブラリーと混合し、次いで、抗原scFv抗体複合体を、磁気ラックを通してストレプトアビジン結合ダイナビーズM-280によって、プルダウンした。結合したクローンを、その後溶出し、大腸菌XL1-ブルーに感染させるために使用した。細菌中で発現させたscFvファージクローンを、精製した(35, 36)。パニングを、HLA-A0201/WT1複合体に特異的に結合したscFvファージクローンを豊富にするために3-4サイクル行った。陽性のクローンを、ビオチン化された単鎖HLA-A0201/WT1ペプチド複合体に対する標準的なELISA法によって決定した。陽性クローンをさらに、TAP欠損、HLA-A0201+細胞株、T2を使用して、フローサイトメトリーによる生細胞表面上のHLA-A2/ペプチド複合体への結合について試験した。T2細胞を、20µg/mL 2マイクログロブリンの存在下において、無血清RPMI1640培地中のペプチド(50µg/mL)で、一晚パルスした。細胞を洗浄し、染色を、以下の手順で行った。

30

【0161】

細胞をまず、精製したscFvファージクローンで染色し、続いて、マウス抗M13モノクローナル抗体で染色し、そして最終的にヤギF(ab)2抗マウスIgがFITCに結合させた。染色の各ステップを、氷上で30-60分の間で行い、細胞を染色の各工程間で2回洗浄した。

40

【0162】

選択したscFv断片を用いた完全長モノクローナル抗体の作製

選択したファージクローンの完全長ヒトIgG1を、前述(37)のように、HEK293及びチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株において作製した。手短に言うと、抗体の可変領域を、ヒトラムダ又はカップ軽鎖定常領域及びヒトIgG1定常領域配列と一致させるとともに、哺乳動物発現ベクターにサブクローニングした。精製した完全長IgG抗体の分子量を、電気泳動によって、還元及び非還元条件下の両方で測定した。

【0163】

50

キメラ抗原受容体及び免疫エフェクター細胞の作製

本明細書において同定されている抗体及び抗原結合性タンパク質をコードする核酸は、組換え免疫エフェクター細胞の作製に用いることができる。遺伝子改変したT細胞を発生させる方法及びベクターは、例えば、当技術分野で公知である (Brentjens et al., Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias in Blood 118 (18) : 4817 - 4828, November 2011 参照)。

10

【0164】

WT1p/A2複合体の全長ヒトIgG1の特性評価

初めに、WT1ペプチド/A2複合体の完全ヒトIgG1モノクローナル抗体の特異性を、RMF又はRHANN-R3コントロールペプチドあり、又はなしの状態、パルスしたT2細胞を染色することにより決定した。続いて、二次ヤギF(ab)2抗ヒトIgGモノクローナル抗体を、PE又はFITCに結合させた。蛍光強度は、フローサイトメトリーにより測定した。同様の方法を、新鮮腫瘍細胞及び細胞株に対するモノクローナル抗体の結合を決定するために用いた。

【0165】

放射免疫測定

WT1ab1を、125-I (PerkinElmer) をクロラミン-T法 (38) を用いて標識した。抗体100µgを、1mCi-125-I及びクロラミン T20µgと反応させ、ピロ亜硫酸ナトリウム200µgとクエンチングし、その後、PBS中の2%ウシ血清アルブミンと平衡させた10DGカラム (company) を用いて、遊離した125-Iと分離した。生成物の比放射能は、7-8mCi/mgの範囲であった。

20

【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、0⁰で10⁷細胞/mLで再懸濁した。細胞 (10⁶チューブで2回実施) を、氷上で45分間、125-I標識WT1AB1 (1µg/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、0⁰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WT1AB1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。

30

【0167】

抗体依存性細胞傷害 (ADCC)

ADCCに使用される標的細胞は、WT1若しくはRHAAAM-3ペプチドあり、又はなしの状態パルスしたT2細胞、及びペプチドでパルスをしなかった腫瘍細胞株である。WT1ab1又は様々な濃度におけるそのアイソタイプコントロールヒトIgG1を、標的細胞及び新鮮な末梢血単核細胞とともに、異なったエフェクター：標的 (E:T) 比率で16時間インキュベートした。上清を採取し、それらの操作の後に、細胞傷害性を、Promega社のCytotox 96 non-radioreactiveキットを用いて、LDH放出アッセイにより測定した。細胞傷害性をまた、標準4時間⁵¹Cr放出アッセイにより測定した。

40

【0168】

ルシフェラーゼ/GFP陽性細胞の選択及び導入

Luc/GFPをコードしているプラスミドを含むレンチウイルス (39) を用いて、高レベル発現のGFP-ルシフェラーゼ融合タンパク質を作出した。単細胞クローニングを使用して、高レベルのGFPの発現を示す細胞のみを、フローサイトメトリー分析によ

50

り選択し、維持し、動物実験に使用した。

【0169】

ヒト白血病異種移植 NSG モデルにおける WT 1 a b 1 の治療試験

BV173 ヒト白血病細胞 200 万個を、NSG マウスに静脈内注射した。5 日目に、腫瘍の生着を、処置された全てのマウスにおけるホタルシフェラーゼイメージングによって確認した。次いで、マウスを異なる処置群に無作為に分けた。6 日目と 10 日目に、モノクローナル抗体 WT 1 a b 1 又はアイソタイプコントロールモノクローナル抗体を静脈内注射した。モノクローナル抗体あり、又はなしの状態、ヒトエフェクター細胞を受けた動物において、細胞 (CD34 及び CD3 枯渇健康ドナーヒト末梢血単核細胞) を、モノクローナル抗体注入の 4 時間前にマウス (10^7 細胞/マウス) に静脈内注射した。腫瘍の増殖を、一週間に 1 回から 2 回発光イメージングにより評価し、臨床活性は毎日評価した。

10

【0170】

WT 1 ペプチド / HLA - A 0 2 0 1 複合体に特異的な s c F v の選択及び同定

WT 1 特異的 s c F v の選択を、WT 1 の 1 2 6 ~ 1 3 4 (配列番号 1 R M F P N A P Y L) のアミノ酸を含む 9 m e r の WT 1 由来のペプチドを用いて達成した。このペプチドは、WT 1 陽性腫瘍細胞を死滅させる細胞傷害性 CD 8 + T 細胞を誘導するために、HLA - A 0 2 0 1 により提示され、処理されることが示されている。

【0171】

WT 1 - R M F ペプチドの 6 回のワクチン接種後の A M L 患者からの代表的なデータは、WT 1 ペプチドが、ヒトにおいて免疫原性であることを示す証拠として、図 2 に示されている。CD 3 T 細胞は WT 1 ペプチド (アミノ酸 1 2 6 - 1 3 4) により刺激され、そして、細胞傷害性は、6 9 7 (A 0 2 0 1 + W T 1 +) 又は S K L Y - 1 6 (A 0 2 0 1 + W T 1) 細胞株に対して標準クロム 5 1 放出アッセイを用いて測定された。WT 1 - A 又は無関係なペプチドである E W でパルスした S K L Y - 1 6 細胞を、死滅の特異性のためのポジティブ又はネガティブコントロールとして使用した。エフェクター : 標的 (E : T) 比率は X 軸上に示されている。データは、HLA - A 0 2 0 1 拘束法において、T 細胞が WT 1 + 腫瘍細胞を死滅させたことの証拠となる。

20

【0172】

当業者に公知の十分に確立されたファージディスプレイライブラリー及びスクリーニング方法を、WT 1 ペプチド / HLA - A 2 複合体に高度に特異的な s c F v 断片を選択するために使用した。ある実施態様では、ヒト s c F v 抗体のファージディスプレイライブラリー (7×10^{10} クローン) を、モノクローナル抗体クローンの選択のために使用した。プラスチックの表面に固定化することによって導入された M H C 1 複合体の立体構造変化を低減するために、溶液パニング法を、従来プレートパニングの代わりに用いた。手短に言うと、まず、ビオチン化抗原を、ト s c F v ファージライブラリーと混合し、次いで、抗原 s c F v 抗体複合体を、磁気ラックを通してストレプトアビジン結合ダイナミーズ M - 2 8 0 によって、ブルダウンした。

30

【0173】

結合させたクローンは、その後溶出し、大腸菌 X L 1 - ブルーに感染させるために使用した。細菌中で発現させた s c F v ファージクローンを、精製した (35, 36)。パニングを、HLA - A 0 2 0 1 / W T 1 複合体に特異的に結合させた s c F v ファージクローンを豊富にするために 3 - 4 サイクル行った。陽性のクローンを、ビオチン化された単鎖 HLA - A 0 2 0 1 / W T 1 ペプチド複合体に対する標準的な E L I S A 法によって決定した (図 3)。陽性クローンをさらに、T A P 欠損、HLA - A 0 2 0 1 + 細胞株、T 2 を使用して、フローサイトメトリーによる生細胞表面上の HLA - A 2 / ペプチド複合体への結合について試験した。T 2 細胞は、 $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ 2 ミクログロブリンの存在下において、無血清 R P M I 1 6 4 0 培地中のペプチド ($50 \mu\text{g} / \text{mL}$) で、一晚パルスした。細胞を洗浄し、染色を以下の手順で行った。

40

【0174】

50

細胞をまず、精製した s c F v フェージクローンで染色し、続いて、マウス抗 M 1 3 モノクローナル抗体で染色し、そして最終的にヤギ F (a b)₂ 抗マウス I g を、F I T C に結合させた。染色の各ステップを氷上で 3 0 - 6 0 分の間で行い、細胞を、染色の各工程間で 2 回洗浄した。結果は図 4 に示されている。W T 1 a b 1 のフェージクローンは、W T 1 - A ペプチド (R M F P N A P Y L : 本明細書中で R M F と略記) でパルスした T 2 細胞にのみ結合し、T 2 細胞単独やコントロール E W 又はヘテロクリティックペプチドである W T 1 - A ペプチドでパルスした T 2 細胞には結合しないことが示された。

【 0 1 7 5 】

ペプチド / A 0 2 0 1 複合体への W T 1 a b 1 の完全長 I g G の結合親和性を、示された濃度の W T 1 a b 1 の滴定によりテストした。T 2 細胞は、5 0 μ g / m L 又は 1 0 μ g / m L、続いて二次ヤギ F (a b) 抗ヒト I g G / P E でパルスした。結果を図 5 に示す。

10

【 0 1 7 6 】

図 6 は、W T 1 抗体により認識されたペプチド / H L A - A 0 2 0 1 複合体の濃度を示す。T 2 細胞を、R M F (上のパネル) 又は R H A M M - R 3 ペプチド (下のパネル) により示された濃度で一晩パルスし、1 μ g / m L 濃度における W T 1 a b 1、W T 1 a b 3、及び W T 1 a b 5 を、フローサイトメトリーによって分析した。

W T I / A 2 に関するフェージパニングの概要

【 表 1 1 】

W T I / A 2 のフェージパニングの概要

20

フェージライブラリー	パニングのラウンド数	スクリーニングされたフェージクローンの数	溶液ELISA陽性率	ユニーククローンの数
<i>scFv-spleen A</i>	4	72	41/96	13
<i>scFv-spleen B</i>	4	47	3/47	2
<i>scFv-spleen C</i>	3	58	0/58	0
<i>scFv-PBMC A</i>	4	68	34/68	10
<i>scFv-PBMC B</i>	3	90	19/90	7
<i>Fab-spleen A</i>	4	12	2/12	0
<i>Fab-spleen B</i>	4	36	0/36	0
<i>Fab-spleen C</i>	4	24	2/24	1
<i>Fab-spleen C</i>	3	72	38/72	5
<i>Fab-spleen D</i>	4	72	4/72	1
<i>Fab-spleen D</i>	4	72	4/72	3

30

40

【 0 1 7 7 】

陽性の s c F v クローンを、(i) W T 1 ペプチド又は無関係のペプチドでパルスした T A P 欠損 H L A - A 0 2 0 1⁺ T 2 細胞 ; (i i) ペプチドでパルスしない、B V 1 7 3、U 2 6 6 のような W T 1 + H L A - A 0 2 0 1⁺ T 2 細胞、及びコントロール W T I - H L A - A 0 2 0 1⁺ 細胞株である S K L Y - 1 6、又は W T 1⁺ H L A - A 0 2 0 1⁺ 細胞株である K 5 6 2 の間接的なフローサイトメトリーによって、生細胞表面上の H L

50

A - A 2 / ペプチド複合体への結合を試験した。後者は、自然に処理された腫瘍細胞上の WT 1 p / A 2 複合体への s c F v の認識及び結合親和性を決定する。

【 0 1 7 8 】

合計 28 フェージクローンを、WT I - A ペプチド / A 2 複合体に特異的なモノクローナル抗体を産生する能力についてスクリーニングした。生細胞上の WT 1 p / A 2 複合体の認識を、WT I - A ペプチドでパルスした T 2 細胞及びその他の H L A - A 2 結合ペプチド (5 0 μ g / m L) へのフェージ s c F v の結合によって測定した。これらは、T 2 細胞単独 ; WT I - A ペプチドでパルスした T 2 細胞 ; ヘテロクリティックペプチドである WT 1 - A 1 でパルスした T 2 細胞 ; 無関係の E W ペプチド (ユーイング肉腫由来の H L A - A 0 2 0 1 に結合する 9 m e r のペプチド) 又は R H A M M - R 3 でパルスした T 2 細胞を含む (図 4) 。

10

【 表 1 2 】

Clone #	WT1AでパルスしたT2に対する結合の陽性	完全長IgG1のコンストラクションの選択
1	+	
2	+	
3	+	+
4	+	
5	+	+
6	+	
7		
8	+	
9		
10		
11		
12		
13	+	+
14		
15	+	+
16		
17	+	
18	+	+
19	+	
20	+	
21		
22	+	
23	+	+
24-28		

20

30

40

【 0 1 7 9 】

《 選択した s c F v 断片を使用した完全長モノクローナル抗体の作製 》

フェージディスプレイ技術により、抗原特異性 s c F v 及び F a b 断片の迅速な選択及び生産ができるようになり、これ自体が有用であり、又は、完全抗体、抗原結合性タンパク質、又はその抗原結合性断片を提供するためにさらに開発することができる。 F c ドメ

50

インを有する完全モノクローナル抗体は、s c F v 及び F a b 抗体に比べて多くの利点を有している。まず、完全長抗体のみが F c ドメインにより媒介される C D C 及び A D C C のような免疫学的機能を発揮する。第二に、二価のモノクローナル抗体は、単量体の F a b 抗体よりも強い抗原結合親和性を提供する。第三に、血漿内半減期と腎クリアランスは、F a b 及び二価のモノクローナル抗体とは異なるものになる。各々の特定の特徴および利点は、計画したエフェクター戦略に合わせることができる。第四に、二価のモノクローナル抗体を、s c F v 及び F a b よりも異なった割合で内在化することができ、免疫機能又は担体機能を変更する。アルファ放射体を、例えば、標的を殺すために内在化する必要はない。しかし、多くの薬物や毒素は、免疫複合体の内在化の恩恵を受ける。ある実施態様では、従って、一旦 W T 1 p / A 2 に特異的な s c F v クローンを、ファージディスプレイライブラリーから獲得すれば、s c F v フラグメントを用いた完全長 I g G モノクローナル抗体が生産される。

10

【0180】

チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞で組換えヒトモノクローナル I g G 抗体を生成するために、完全長 I g G モノクローナル抗体を、当業者に公知の方法に基づいて設計した。(Tomomatsu et al., Production of human monoclonal antibodies against FcεRIα by a method combining in vitro immunization with phage display. Biosci Biotechnol Biochem 73 (7): 1465 - 1469 2009)。簡潔には、抗体可変領域を、ラムダ又はカッパ軽鎖定常配列、及び I g G 1 サブクラス F c (例えば、表 9 参照) (33、34) で、哺乳動物発現ベクター (図 7) 内にサブクロニングした。精製した完全長 I g G 抗体は、還元及び非還元条件下 (図 8) の両方において、予測された分子量を示した。動的結合分析 (35) は、ナノモル範囲の K D (図 9、図 10) で、W T 1 / A 2 に対する完全長 I g G の特異的結合を確認した。

20

【0181】

《実施例 1》

完全ヒトファージディスプレイライブラリーを用いた W T 1 p / A 2 複合体に特異的な s c F v の選択

H L A - A 0 2 0 1 / W T 1 ペプチド複合体に対するファージディスプレイは、H L A - A 0 2 0 1 / W T 1 ペプチド複合体に特異的に結合した s c F v ファージクローンを豊富にするために 3 - 4 パニングラウンドを行った。W T 1 ペプチド / A 2 複合体に陽性の個々の s c F v ファージクローンは、E L I S A 及びさらなる特徴づけの対象となる独特の D N A をコードする配列を有するクローンにより決定された。s c F v が生細胞上の W T 1 p / A 2 複合体に結合するかどうかをテストするために、陽性のファージクローンは、T A P 欠損株であり、H L A - A 0 2 0 1 陽性細胞株である T 2 への結合について試験した。T 2 細胞は、外来性ペプチドを提示することができ、それゆえに H L A - A 2 分子によって提示される特定のエピトープを検出するために広く使用されている。合計 35 個のファージクローンは、T 2 細胞上でスクリーニングされ、15 個のクローンは、W T 1 - R M F ペプチドのみでパルスした T 2 細胞への特異的結合を示し、T 2 細胞単独又はコントロールの R H A M M 3 ペプチド (図 4) でパルスしたものに対しては特異的結合を示さなかった。s c F v のファージクローンは、完全長二価モノクローナル抗体に比べ、s c F v の親和性が弱いことを示唆する W T 1 - 及び H L A - A 2 陽性のいくつかの腫瘍細胞株に結合することができなかった。

30

40

【0182】

《実施例 2》

完全長ヒト I g G 1 の生成

C D C や A D C C のような免疫機能は二価 I g G の F c ドメインに依存する。また、二価モノクローナル抗体は、単量体 s c F v 抗体よりも強力な抗原結合親和性を提供する。したがって、H E K 2 9 3 及びチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞において、1

50

5個の陽性のファージクローンのうち、6個のs c F vファージクローンを、全長ヒトIgG1のモノクローナルを生成するように選択した。簡潔に言うと、モノクローナル抗体の可変領域を、ヒト若しくは軽鎖定常領域、及びヒトIgG1定常領域配列が一致する哺乳動物発現ベクターにサブクローニングした。精製した完全長IgG抗体は、還元及び非還元条件下(図8)の両方において、予測された分子量を示した。5個のクローンを首尾よくヒトIgG1に設計した。

《実施例3》

IgG1モノクローナル抗体の特異性及び結合親和性 ヒト細胞株への結合

初めに、RMF又はRHAMM-R3ペプチドあり、又はなしの状態、パルスしたT2細胞を、モノクローナル抗体の結合特異性を決定するために使用した。WT1ab1を含む5個のヒトIgG1のうち3個では、WT1ペプチドのみでパルスしたT2細胞に対して特異的な結合を示し、T2単独又はコントロールペプチドRHAMM-R3でパルスしたT2に対しては、特異的な結合を示さなかった。モノクローナル抗体の結合親和性は、それらの親のs c F vファージクローンに比べて、実質的に強化された(50~100倍)。結合は、RMFペプチドで細胞をパルスすることによって大幅に強化されたが、5個のうち2個のモノクローナル抗体は、T2細胞単独又はコントロールペプチドRHAMM-R3でパルスしたものへの結合を示した。これは、これらの2個のモノクローナル抗体が、単独でもHLA-A2分子上のエピトープに対する高い親和性を有していたことを示唆しており、それゆえに、さらなる調査から除外された。それは複合体中のMHCクラスI分子のエピトープの優位性を考えると、ペプチド/MHC複合体に対して、このようなモノクローナル抗体を製造するための共通の問題となっているので、これは予想外ではなかった。また、複合体のモノクローナル抗体の正確な特異性は、二価IgG1モノクローナル抗体に比べて低い親和性のために、s c F vの段階で容易に決定されることがない可能性を示唆している。

【0183】

まず、WT1p/A2複合体に特異的な3個の残りのモノクローナル抗体の結合親和性を、モノクローナル抗体の滴定により、RMFあり、又はなしの状態及びコントロールRHAMM-R3ペプチド(50µg/mL)でパルスしたT2細胞上で、調査した。0.01µg/mL濃度に至るまでは、モノクローナル抗体WT1ab1が、最も強い結合を示した。アイソタイプコントロールヒトIgG1は、試験されたいずれの濃度においても、結合を示さなかった(図5)。WT1ab1に加えて、2つの他のモノクローナル抗体WT1ab3及びWT1ab5は、<1µg/mLの使用されたモノクローナル抗体濃度の範囲で特異的結合を示した。モノクローナル抗体の特異的認識はまた、細胞表面上の抗原濃度に依存していた。T2細胞はRMF又はR3ペプチドで、50、25、12.5、6.25、3.13及び1.6µg/mLでパルスされ、T2結合アッセイのために、テストのモノクローナル抗体を、1µg/mLで使用した。WT1ab1は、他の2つのモノクローナル抗体(図6)よりも有意に高い蛍光強度があり、1.6µg/mLのような低濃度でも、濃度依存的にT2細胞上でRMFペプチド/A2複合体を検出することができた。これらの結果は、WT1ab1がRMFp/A0201複合体に最も高い親和力を有していることをさらに確認した。

【0184】

《実施例4》

エピトープマッピング

より正確にWT1ab1認識のためのエピトープを調査するために、RMFペプチドの1、3、4、5、6、7及び8位をアラニンで置換し、T2細胞上でパルスし、WT1ab1の結合について試験した。RMFの2位および9位は、これらはHLA-A0201分子に結合するペプチドのアンカー残基として、そのまま残された。1位を除いて、他の位置でのアラニン置換は、ネイティブのRMFペプチド(図19)と比較して、WT1ab1結合に大きく影響しなかった。しかしながら、アラニン(WT1-A1-B)又はチ

ロシン (WT1-A1) のどちらかによる 1 位の置換は、WT1ab1 の結合を完全に排除した。両ペプチドが、HLA-A2 分子、クローン BB7 (図 20) に特異的なモノクローナル抗体を使用して T2 安定化アッセイにおける最も強い結合を示したように、結合の喪失は、HLA-A2 分子へのペプチド結合親和性の減少によるものではなかった。これらの結果は、RMF ペプチドの 1 位のアルギニンは、WT1ab1 認識のための最も重要なものの一つであることを示している。位置における残基の役割は #2 と 9 については、評価することができなかった。

【0185】

次の重要な問題は、WT1ab1 が細胞表面上の HLA-A0201 分子によって提示され、自然に処理された WT1 エピトープ RMF 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 12) の発現に基づいて選択された。

【表 12】

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

【0186】

WT1-mRNA 発現レベルを、定量的 RT-PCR によって、前の研究 (Rena) に従って推定した。

【0187】

HLA-A0201 と WT1 mRNA の両方に陽性である 7 個のヒト中皮腫細胞株のう

ち、WT1ab1は、7細胞株のうち6個に結合したが、メラノーマ細胞株であるMewoのようなHLA-A0201陰性(MSTO及びVAMT)又はWT1-mRNA陰性のいずれかであった細胞には結合しなかった(図21)。

【0188】

同様に、試験した9白血病細胞株のうち、WT1ab1は、WT1-mRNA及びHLA-A0201の両方に対して陽性であるBV173(図22)、BA25、及びALL-3の3細胞株に結合したが、多くの研究においてWT1転写物を高レベルに発現することが示されているHLA-A2陰性細胞株であるHL60及びK562には結合しなかった。

【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12)、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。

【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⁺HLA-A0201⁺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⁺HLA-A0201⁺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12)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 $\sim 6 \times 10^3$ 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、 6×10^3 及び 1.2×10^4 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、 1×10^3 及び 2×10^3 WT1ab1分子、又は 2×10^3 及び 4×10^3 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。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 1 】

《 実施例 6 》

白血病患者サンプルに対する WT 1 a b 1 の結合

私たちは次に、一次性AML細胞上のRMFエピトープをWT 1 a b 1分子が探知することができるかどうかを調査した。放射免疫測定は、HLA-A2陽性及びWT 1 - mRNA⁺である患者1のAML芽球に対する、WT 1 A B 1の有義な結合を示した。WT 1 a b 1は、細胞集団全体の83%以上の割合を占めるCD33⁺及びCD34⁺二重陽性細胞に結合した(図25)。WT 1 a b 1は、HLA-A2陽性だがmRNA陰性、又はHLA-A2陰性のいずれかである他の3人の細胞には結合しなかった。WT 1 a b 1は、HLA-A2陽性又はHLA-A2陰性のいずれかである健康なドナーからの末梢血単核細胞には結合しなかった。結果をフローサイトメトリー分析によって確認した。WT 1 A B 1はA0201陰性の患者からの芽球に有意な結合を示さなかった。結果は、細胞のmRNA発現で得られた結果と一致した。これらのデータにより、白血病患者細胞の表面上のRMFp/HLA-A0201のレベルは、WT 1 a b 1の反応性のために十分であり、WT 1陰性健康細胞のレベルが重要ではないことを確認した。

10

【 0 1 9 2 】

《 実施例 7 》

WT 1 A B 1は、腫瘍細胞に対するADCCを媒介する

ADCCは、ヒトにおける治療用モノクローナル抗体の主要なエフェクター機構の一つであると考えられている。ヒト末梢血単核細胞の存在下で、WT 1 a b 1は、RMFペプチドをロードしたT2細胞に対する、用量依存的な末梢血単核細胞のADCCを媒介したが、T2細胞単独又はコントロールR3ペプチドでパルスしたT2細胞に対しては媒介しなかった(図27)。重要なのは、WT 1 a b 1は、中皮腫細胞株、JMN(図33)、及び白血病患者細胞株BV173(図34)のような腫瘍細胞上のHLA-A0201によって自然に提示されるRMFエピトープに対するADCCを媒介したが、HLA-A2陰性細胞であるMSTO(図28)又はHL-60(図29)に対しては媒介しなかった。死滅を、複数の健康なドナーからのエフェクター細胞として末梢血単核細胞を用いたWT 1 a b 1の1µg/mL又はそれより低い濃度で、一貫して観察した。重要なことに、WT 1 a b 1も、WT 1 a b 1結合に陽性である一次性A0201陽性AML芽球を死滅させたが、HLA-A0201陰性の芽球を死滅させなかった(図30)。これらの結果は、WT 1 a b 1が、細胞株上と同様に生理学的なレベルで、RMF及びHLA-A0201複合体を自然に発現した細胞に対する特異的なADCCを媒介することを実証した。

20

30

【 0 1 9 3 】

《 実施例 8 》

WT 1 A B 1は、NSGマウスにおけるヒト白血病患者細胞を排除する

*in vivo*でのWT 1 a b 1の有効性を、BV173-bcr/abl陽性急性リンパ性白血病で6日以前に静脈内に異種移植されたNOD-SCIDガンマ(NSG)マウスで試験した。治療の際に、マウスはその肝臓、脾臓、及び骨髄(BM)において、ルシフェラーゼイメージングにより認識できる白血病患者細胞を有していた。NSGマウスは、成熟したB⁻、T⁻、及びNK細胞を欠いており、そして、我々は、WT 1 a b 1治療とともに、人間のエフェクター細胞(CD3⁺、CD34⁺、末梢血単核細胞)を導入すると、*in vitro*で観察されたADCCによって媒介された抗腫瘍効果が、生体内においても再現されるという仮説を立てた。WT 1 a b 1の2回の100µg用量とともにされたエフェクターの注入は、コントロールに比べて、腫瘍の増殖を、ほぼ除去した(図31)。この効果は、実験の間持続した(図32)。興味深いことに、実験の初期に、エフェクター細胞単独又はコントロールIgGと結合したエフェクター細胞は、白血病患者細胞を単独で注入したマウスに対する白血病患者細胞の迅速な成長をさらに促進するよう見え、これは、抗腫瘍効果は、それ自体でエフェクターとは無関係であったことを実証している。エフェクターを与えられたマウスのいくつかは(モノクローナル抗体あり又はなしで)、BV173の広範囲に及ぶ浸潤を伴い、実験の早い段階で死亡した。

40

50

【0194】

驚くべきことに、ヒトエフェクターなしのWT1ab1治療もまた、エフェクターと結合されたWT1ab1同様に、約30日の間、劇的に全身腫瘍組織量を減少させるが(図32)、エフェクターと結合したWT1ab1と比べた場合には、WT1ab1単独グループにおいては、腫瘍は結局、はるかに早く再発する(図32)。我々は、WT1ab1単独での効果を確認し、有効性を評価するために用量を漸増させた。WT1ab1単独では、試験したすべての用量(25-100 μ gの用量を2回投与)の早期の時点で、全身腫瘍組織量の顕著な減少が生じた。全ての治療群の腫瘍は、抗体治療が停止した後ゆっくりと再発し、23日目(最後の抗体注入後13日)までに、25 μ g群では100 μ g群と比較して有意に多い再発した腫瘍が観察された。これは、WT1ab1治療の用量反応を示している(図33)。治療の前に、肝臓に最も大きい腫瘍組織量を示したマウスは、WT1ab1により直ちに除去された。再発中は、最も多い用量を投与した群の腫瘍は主に骨髄で発生し、一方、最も少ない用量を投与したマウスは、直ちに肝臓に腫瘍が再発した。

10

【0195】

《実施例9》

細胞傷害性を強めた抗体の作製

ヒトIgG1-Fcで述べたように(43、44)、二重特異性抗体を、免疫T細胞のWT1/A2複合体及びCD3の両方を認識するように設計した。二重特異性抗体は、Fcエフェクター機能及び*in vivo*における長半減期を維持する一方で、WT1/A2陽性腫瘍細胞に対する細胞傷害性T細胞を回復させ、そして標的とすると予想されている。i)活性化T細胞による死滅、ii)ADCC活性、iii)CDC活性、の3つのメカニズムが、二重特異性抗体によって媒介される腫瘍細胞の特異的死滅に参与している。二重特異性抗体の他の形式は、タンデム型のscFv分子(taFv)、ダイアボディー(Db)、又は単鎖ダイアボディー(scDb)のように、そしてヒト血清アルブミンとの融合タンパク質のように設計されることができ(45、46、47、48)、はっきりとした薬物動態の特徴のFcエフェクター機能を欠く。

20

【0196】

WT1/A2標的的特異的ADCC活性は、米国特許第8,025,879号、第8,080,415号、及び第8,084,022号に記載されているように、グリコールで操作されたCHO細胞において、組換え抗体を発現させることによって強められる。Asn297上のN-グリカン修正オリゴ糖は、次のようにエフェクター機能を変化させる、すなわち、1)ヒトナチュラルキラー細胞によって媒介される改良されたADCC活性のためのCD16/FcRIIIaへの、より高い結合親和性、2)マクロファージ及びDC細胞によって提示される抗原及び好中菌のようなエフェクターセルによって媒介される改良されたADCC活性のための(50、51、52)、多くのタイプの免疫細胞(NK細胞を除く)で発現している抑制性受容体であるCD32b/FcRIIIbとの低下した結合親和性、である。強化した抗体は、*in vivo*での腫瘍治療のための優れた効果を達成することが期待される。

30

【0197】

IgGのFcのグリコシル化(とりわけフコシル化)変異体は、米国特許第8,025,879号、第8,080,415号、及び第8,084,022号に記載の宿主発現細胞及び方法を用いて製造することができ、その記載内容は参照として取り込まれる。簡単に述べると、本明細書に開示された抗体の重鎖又は軽鎖をコードするメッセンジャーRNA(mRNA)は、RNA単離精製及び任意のサイズに基づく分離の標準的な技術を用いることによって得られる。重鎖又は軽鎖をコードするmRNAに対応するcDNAは、次いで、cDNAライブラリーの構築、ファージライブラリーの構築及び特異的関連プライマーを使用したスクリーニング又はRT-PCRのような、当該技術分野において公知の技術を用いて作製され、単離される。いくつかの実施態様ではcDNA配列は、特定の所望のcDNAを生成するために、公知の*in vitro*のDNA操作技術を使用して、

40

50

完全に又は部分的に製造されるものであってもよい。cDNA配列は、次いで、遺伝子及び低フコース変性宿主細胞と互換性を持つリーディングフレーム内にあるプロモーターを含むベクターに配置されることができる。

【0198】

適当なプロモーター、制御配列、リボソーム結合部位、及び転写終結部位を含んでいる多数のプラスミド及び任意の便利なマーカーは、当技術分野で公知であり、これらは米国特許4,663,283号及び米国特許4,456,748号に記載のベクターを含むが、これらに限定されない。ある実施態様において、軽鎖及び重鎖をコードするcDNA及び重鎖をコードするcDNAは、別々の発現プラスミドに挿入されることができる。別の実施態様においては、軽鎖をコードするcDNA及び重鎖をコードするcDNAは、それぞれが適切なプロモーター及び翻訳調節下にあるようであれば、同じプラスミドと一緒に挿入することができる。結果を図34に示す。

《参考文献》

- 1 Mundlos S, et al. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* 1993;119: 1329-41.
- 2 Keilholz U, et al. Wilms' tumor gene 1 (WT1) in human neoplasia. *Leukemia* 2005; 19: 1318-1323.
- 3 Inoue K, et al. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1994; 84 (9): 3071-3079.
- 4 Ogawa H, et al. The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood* 2003; 101 (5): 1698- 1704.
- 5 Yarnagarni T, et al. Growth Inhibition of Human Leukemic Cells by WT1(Wilms Tumor Gene) Antisense Oligodeoxynucleotides: Implications for the Involvement of WT1 in Leukemogenesis. *Blood* 1996; 87: 2878- 2884.
- 6 Bellantuono I, et al. Two distinct HLA-A0201-presented epitopes of the Wilms tumor antigen 1 can function as targets for leukemia-reactive CTL. *Blood* 2002; 100 (10): 3835-3837.
- 7 Gaiger A, et al. WT1- specific serum antibodies in patients with leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7 (suppl 3): 761-765.
- 8 Oka Y, et al. WT1 peptide cancer vaccine for patients with hematopoietic malignancies and solid cancers. *The Scientific World Journal* 2007; 7: 649-665.
- 9 Kobayashi H, et al. Defining MHC class II T helper epitopes from WT1 antigen. *Cancer Immunol.Immunother.* 2006; 55 (7): 850-860.
- 10 Pinilla-Ibarz J, et al. Improved human T-cell responses against synthetic HLA-A0201 analog peptides derived from the WT1 oncoprotein. *Leukemia* 2006; 20 (11): 2025-2033.
- 11 May RJ, et al. Peptide epitopes from the Wilms tumor 1 oncoprotein stimulate CD4+ and CD8+ T cells that recognize and kill human malignant mesothelioma tumor cells. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:4547-4555.
- 12 Keilholz U, et al. A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood* 2009; 113: 6541-6548.
- 13 Rezwani K, et al. Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies. *Blood* 2008; 111 (1): 236-242.
- 14 Maslak P, et al.. Vaccination with synthetic analog peptides derived from WT1 oncoprotein induces T cell responses in patients with complete remission from acute myeloid leukemia. *Blood* 2010; Accpt Minor rev.

- 1 5 Krug LM, et al. WT1 peptide vaccinations induce CD4 and CD8 T cell immune responses in patients with mesothelioma and non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2010; in revision.
- 1 6 Morris E, et al. Generation of tumor-specific T-cell therapies. *Blood Reviews* 2006; 20: 61-69.
- 1 7 Houghton AN et al. Monoclonal antibody therapies- a "constant" threat to cancer. *Nat Med* 2000; 6:373- 374.
- 1 8 Miederer M, et al. Realizing the potential of the Actinium-225 radionuclide generator in targeted alpha particle therapy applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60 (12): 1371-1382. 10
- 1 9 Noy R, T-cell-receptor-like antibodies: novel reagents for clinical cancer immunology and immunotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2005; 5 (3): 523-536.
- 2 0 Chames P, et al. Direct selection of a human antibody fragment directed against the tumor T-cell epitope HLA-A1-MAGE-A1 from a nonimmunized phage-Fab library. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7969-7974.
- 2 1 Held G, et al. Dissecting cytotoxic T cell responses towards the NY-ESO-1 protein by peptide/MHC- specific antibody fragments. *Eur J Immunol*. 2004; 34:2919-2929.
- 2 2 Lev A, et al. Isolation and characterization of human recombinant antibodies endowed with the antigen- specific, major histocompatibility complex-restricted specificity of T cells directed toward the widely expressed tumor T cell-epitopes of the telomerase catalytic subunit. *Cancer Res* 2002; 62: 3184-3194. 20
- 2 3 Klechevsky E, et al. Antitumor activity of immunotoxins with T-cell receptor-like specificity against human melanoma xenografts. *Cancer Res* 2008; 68 (15): 6360-6367.
- 2 4 Azinovic I, et al. Survival benefit associated with human anti-mouse antibody (HAMA) in patients with B-cell malignancies. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55(12):1451-8.
- 2 5 Tjandra JJ, et al. Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients. *Immunol Cell Biol* 1990; 68(6):367-76. 30
- 2 6 Riechmann L, et al. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 1988; 332 (6162): 332:323.
- 2 7 Queen C, et al. A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86 (24): 10029-33.
- 2 8 Gerd R, et al. Serological Analysis of Human Anti-Human Antibody Responses in Colon Cancer Patients Treated with Repeated Doses of Humanized Monoclonal Antibody A33. *Cancer Res* 2001; 61, 6851- 6859.
- 2 9 Cheever MA, et al. The prioritization of cancer antigens: A national Cancer Institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* 2009; 15 (17): 5323-5337. 40
- 3 0 Drakos E, et al. Differential expression of WT1 gene product in non-Hodgkin lymphomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13 (2): 132-137.
- 3 1 Asemussen AM, et al. Identification of a highly immunogenic HLA-A*01-binding T cell epitope of WT1. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (24):7476-7482.
- 3 2 Tomimatsu K, et al. Production of human monoclonal antibodies against FcεR1a by a method combining in vitro immunization with phage display. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; 73 (7): 1465-1469.
- 3 3 Lidija P, et al. An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries. *Gene* 1997; 187(1): 9-18. 50

- 3 4 Lisa JH, et al. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *Journal of Molecular Biology* 1998; 275 (5): 861-872.
- 3 5 Yasmina NA, et al. Probing the binding mechanism and affinity of tanezumab, a recombinant humanized anti-NGF monoclonal antibody, using a repertoire of biosensors. *Protein Science* 2008; 17(8): 1326-1335.
- 3 6 Roberts WK, et al. Vaccination with CD20 peptides induces a biologically active, specific immune response in mice. *Blood* 2002; 99 (10): 3748-3755.
- 3 7 Caron PC, Class K, Laird W, Co MS, Queen C, Scheinberg DA. Engineered humanized dimeric forms of IgG are more effective antibodies. *J Exp Med* 176:1191-1195. 1992. 10
- 3 8 McDevitt M, et al. Tumor targeting with antibody-functionalized, radiolabeled carbon nanotubes. *J. Nuclear Med* 2207; 48 (7):1180-1189.
- 3 9 Xue SA, et al. Development of a Wilms' tumor-specific T-cell receptor for clinical trials: engineered patient's T cells can eliminate autologous leukemia blasts in NOD/SCID mice. *Haematologica* 2010; 95 (1): 126-134.
- 4 0 McDevitt MR, et al. Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators. *Science* 2001; 294 (5546): 1537-1540.
- 4 1 Borchardt PE, et al. Targeted Actinium-225 in vivo generators for therapy of ovarian cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 5084-5090. 20
- 4 2 Singh Jaggi J, et al. Selective alpha-particle mediated depletion of tumor vasculature with vascular normalization. *Plos One* 2007; 2 (3): e267.
- 4 3 Yan W, et al. Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 19637-19646.
- 4 4 Rossi EA, et al. Stably tethered multi-functional structures of defined composition made by the dock and lock method for use in cancer targeting. *Proc Natl Aca Sci USA* 2006; 103:6841-6.
- 4 5 Ryutaro A, et al. Cytotoxic enhancement of a bispecific diabody by format conversion to tandem single-chain variable fragment (taFv). *J Biol Chem* 2011; 286: 1812-1818.
- 4 6 Anja L, et al. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 2000; 95(6): 2098-2103. 30
- 4 7 Weiner GJ, et al. The role of T cell activation in anti-CD3 x antitumor bispecific antibody therapy. *J. Immunology* 1994; 152(5): 2385-2392.
- 4 8 Dafne M, et al. Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin. *J Biol Chem* 2007; 282: 12650-12660.
- 4 9 Liu C, et al. Modified host cells and uses thereof, PCT/US2010/0081195.
- 5 0 Francisco J, et al. Neutrophils Contribute to the Biological Antitumor Activity of Rituximab in a Non-Hodgkin's Lymphoma Severe Combined Immunodeficiency Mouse Model. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5866. 40
- 5 1 Kavita M, et al. Selective blockade of inhibitory Fc receptor enables human dendritic cell maturation with IL-12p70 production and immunity to antibody-coated tumor cells. *Proc natl Aca Sci USA* 2005; 102(8): 2910-2915.
- 5 2 Raphael A, et al. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature Medicine* 2000; 6:443-446.
- 5 3 Milenic ED. Monoclonal antibody-based therapy strategies: providing options for the cancer patient. *Curr Pharm Des.* 2002; 8: 1794-1764.
- 5 4 Grillo-Lopez AJ. Anti-CD20 mAbs: modifying therapeutic strategies and outcomes in the treatment of lymphoma patients. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2002; 2 50

(3): 323-329.

5 5 Jones KL & Buzdar AU. Evolving novel anti-Her2 strategies. *Lancet Oncol.* 2009; 10 (12): 1179-1187.

5 6 Reddy MM, Deshpande A & Sattler M. targeting JAK2 in the therapy of myeloproliferative neoplasms. *Exper Opin Ther targets* 2012; 3: 313-324.

5 7 Takeuchi K & Ito F. Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics. *Biol Pharm Bull.* 2011; 34 (12) 1774-1780.

5 8 Roychowdhury S & Talpaz M. Managing resistance in chronic myeloid leukemia. *Blood Rev.* 2011; (6): 279- 290.

5 9 Konnig R. Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. *Curr Opin Immunol* 2002; 14 (1) 75-83. 10

6 0 Sergeeva A, Alatrash G, He H, Ruisaard K, Lu S, Wygant J, McIntyre BW, Ma Q, Li D, St John L, Clise-Dwyer K & Molldrem JJ. An anti-PR1/HLA-A2 T-cell receptor-like antibody mediated complement-dependent cytotoxicity against acute myeloid leukemia progenitor cells. *Blood* 2011; 117 (16): 4262-4272).

6 1 Takigawa N, Kiura K & Kishimoto T. Medical Treatment of Mesothelioma: Anything New? *Curr Oncol Rep* 2011; DOI 10.1007/s11912-011-0172-1.

6 2 Raja S, Murthy SC & Mason DP. Malignant Pleural Mesothelioma. *Curr Oncol Rep* 2011; DOI 10.1007/s11912-0177-9.

6 3 Gerber JM, Qin L, Kowalski J, Smith D, Griffin CA, Vala MS, Collector MI, Perkins B, Zahurak M, Matsui W, Gocke CD, Sharkis S, Levitsky H & Jones RJ. Characterization of chronic myeloid leukemia stem cells. 2011; *Am J Hematol.* 86: 31-37. 20

6 4 Rezwani K, Yong AS, Savani BN, Mielke S, Keyvanfar K, Gostick E, Price DA, Douek DC & Barrett AJ. Graft-versus-leukemia effects associated with detectable Wilms tumor-1 specific T lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007; 110 (6): 1924-1932.

6 5 Persic L, Roberts A, Wilton J et al. An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries. *Gene* 1997; 187(1): 9-18. 30

6 6 Cheng L, Xiang JY, Yan S et al. Modified host cells and uses thereof. PCT/US2010/0081195.

6 7 Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, Fedorko J & Bunn PA Jr. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Methods.* 1984; 72 (1): 77-89.

6 8 Feng M, Zhang JL, Anver M, Hassan R & Ho M. In vivo imaging of human malignant mesothelioma growth orthotopically in the peritoneal cavity of nude mice. *J Cancer* 2011; 2: 123-131.

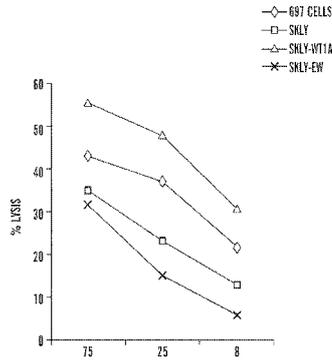
【 図 1 】

```

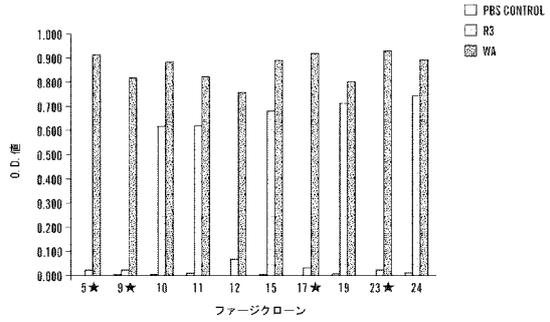
1 mndrdndna lhpvrslvg qvocalpvsq aqwvpuidf wppgsayge lgpapvwpq
41 ppppppprha fikqevwqr sspheeqis afvtfarf tgvvbaarys pfppvppsq
121 saqqaemfqn ayzlpscles qviltqqys rvfdqtpay qhrpshhac fpolafkhd
181 qmccqpsicd qvteppppv achtkdect qviallrp yevndlyant sglcwtwq
241 mlqat_kqv aagsssvkx taqssnhtg yevndhtpi -ogayrnt tvqrtrigr
301 rzyqvagll vrsstsek vplncaypgo nkryfklsbl qmhzkhtgc kpyqcfkdc
361 ariszrsqil kbqqrhgv kpgqkfoqr kfivndhlt hrtbtgks aqplacrvps
421 sqkfarde lvzhnmhqr nmtklqia. (SEQ ID NO: 118)

```

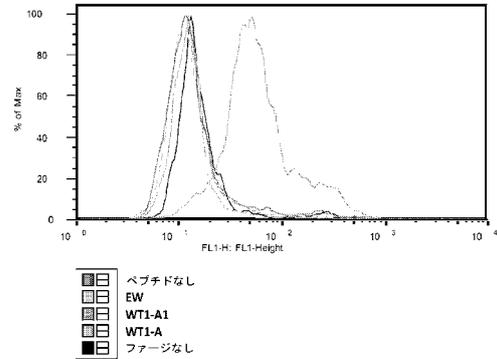
【 図 2 】



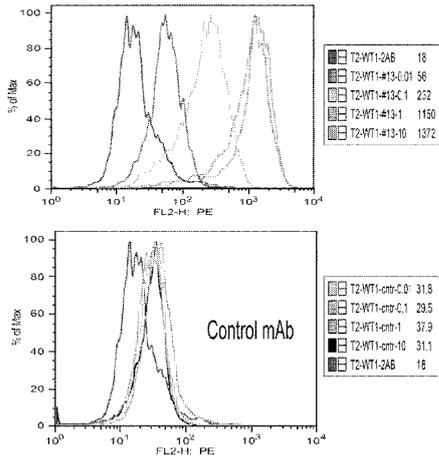
【 図 3 】



【 図 4 】

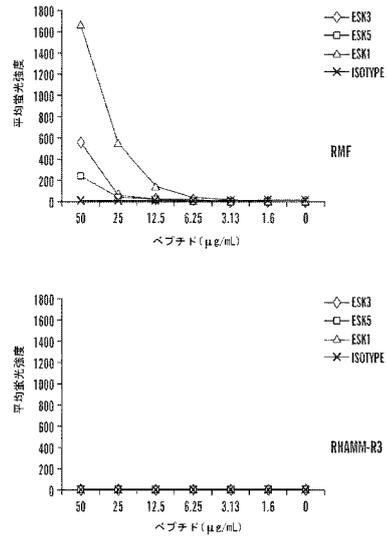


【 図 5 】

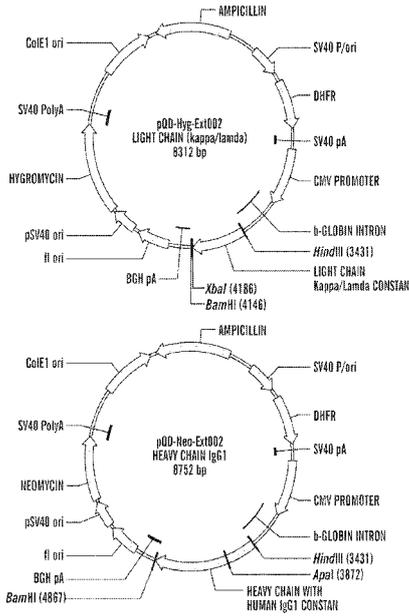


w/WT1ベブチドでバルスされたT2細胞上のmAb#13のフローサイトメトリータイテーション

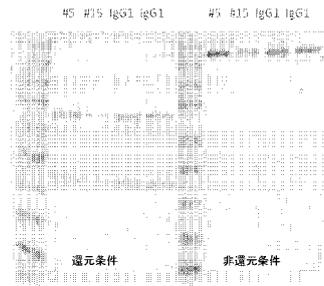
【 図 6 】



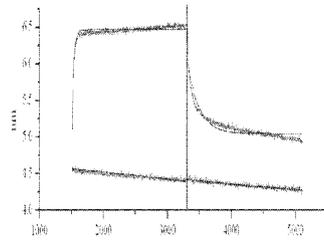
【 図 7 】



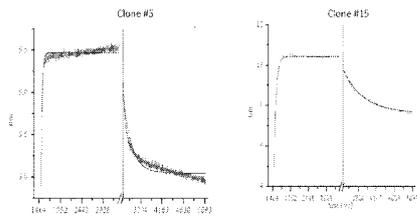
【 図 8 】



【 図 9 】

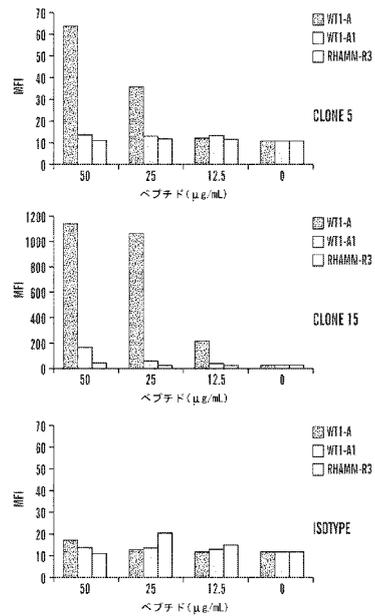


【 図 10 】

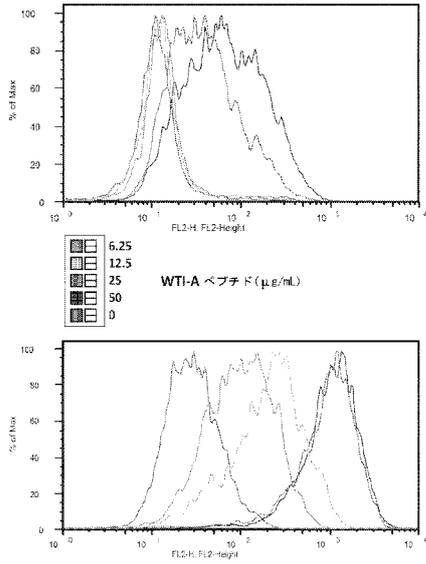


Samples	k_d [1/s]	Error in k_d	k_s [1/Ms]	K_D [M]
EXT002-Clone #5 IgG1	5.48E-3	1.12E-4	4.68E5	1.17E-6
EXT002-Clone #15 IgG1	1.88E-3	2.25E-5	2.45E5	7.68E-9

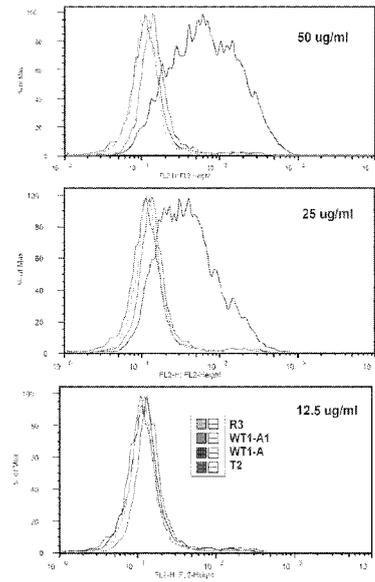
【 図 11 】



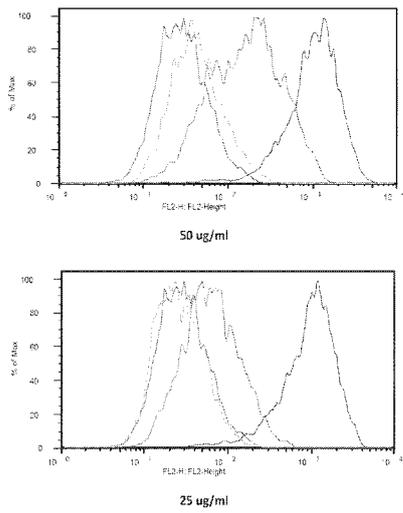
【 図 1 2 】



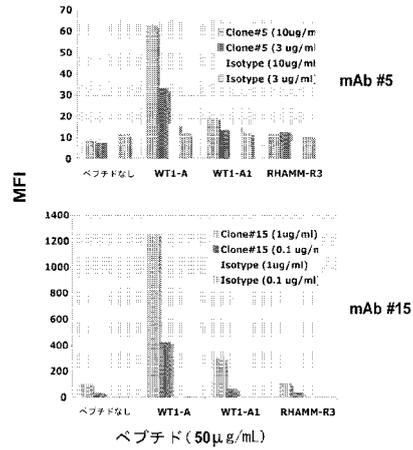
【 図 1 3 】



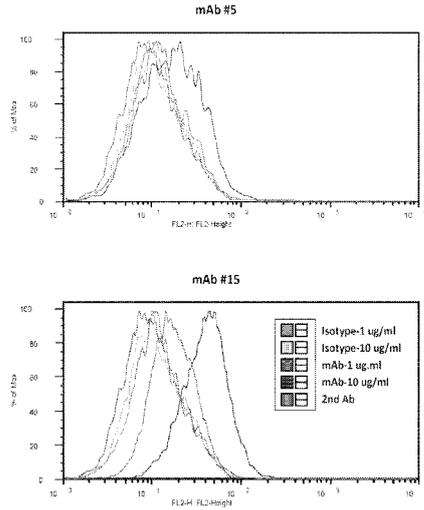
【 図 1 4 】



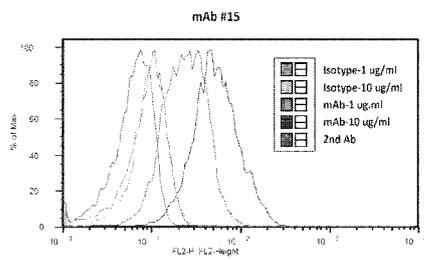
【 図 1 5 】



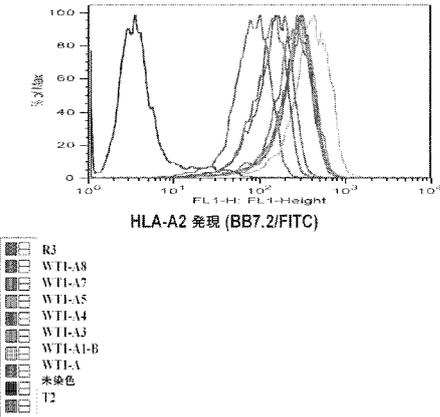
【 図 1 6 】



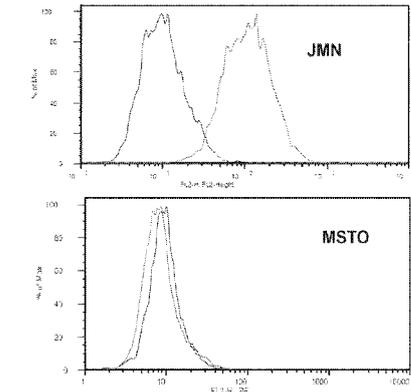
【 図 1 7 】



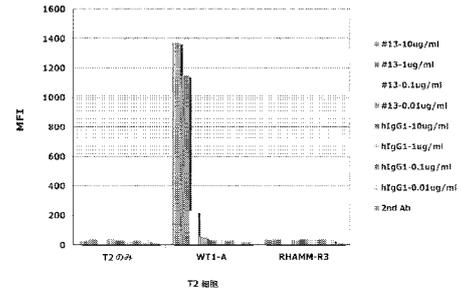
【 図 2 0 】



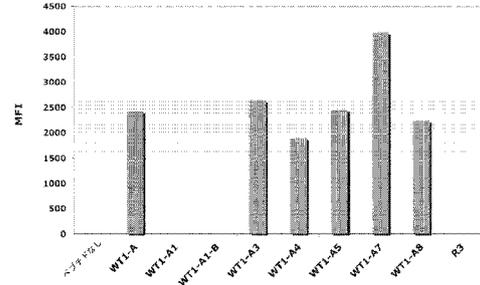
【 図 2 1 】



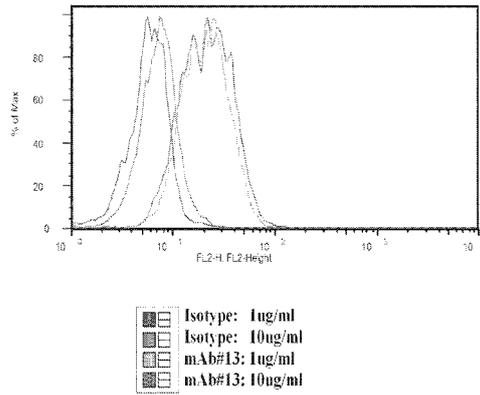
【 図 1 8 】



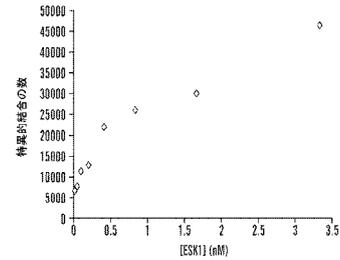
【 図 1 9 】



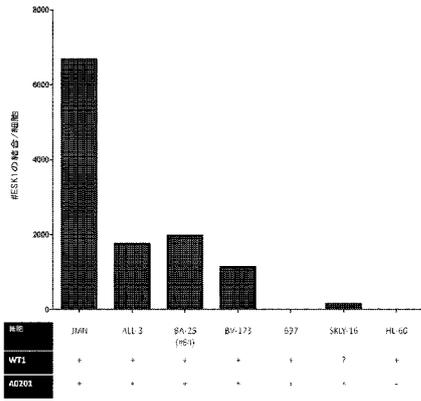
【 図 2 2 】



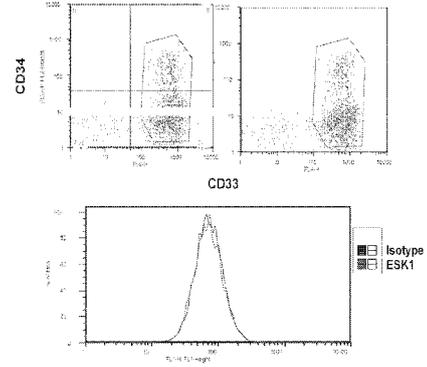
【 図 2 3 】



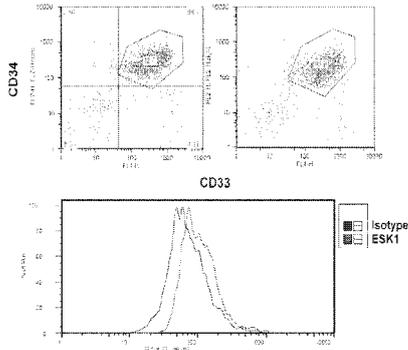
【 図 2 4 】



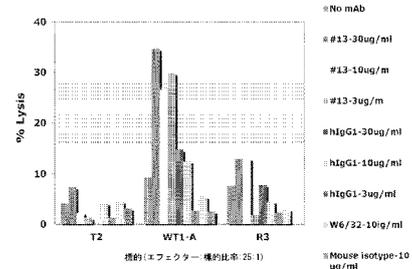
【 図 2 6 】



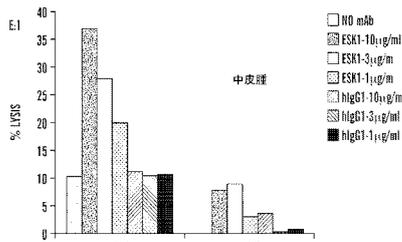
【 図 2 5 】



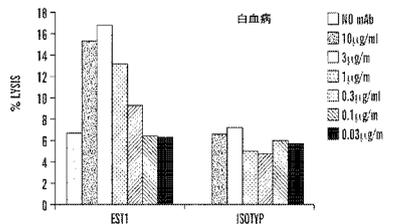
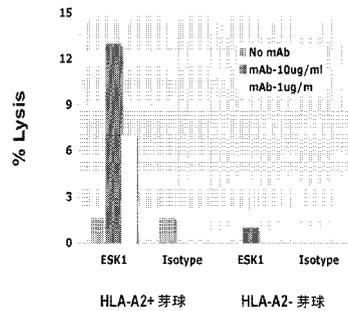
【 図 2 7 】



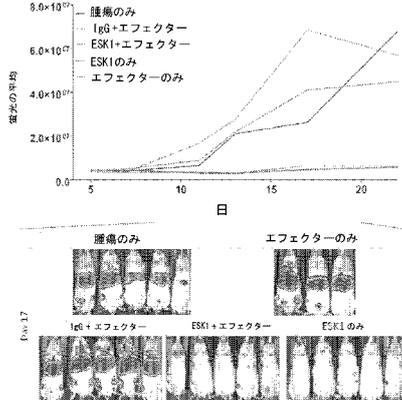
【 図 2 8 】



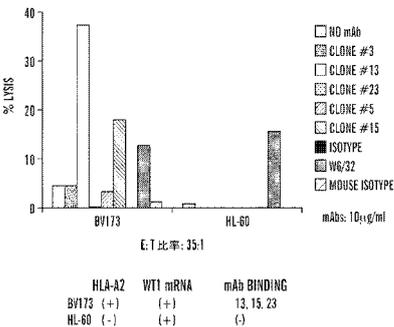
【 図 3 0 】



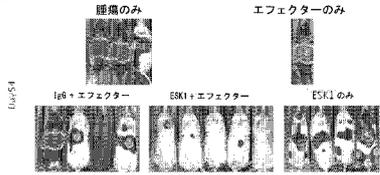
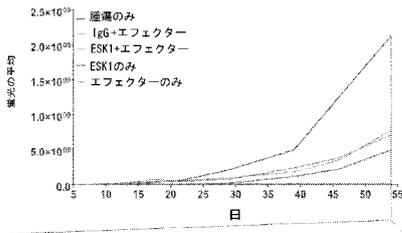
【 図 3 1 】



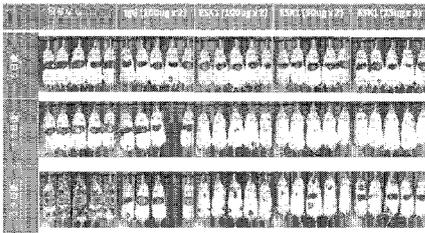
【 図 2 9 】



【 図 3 2 】

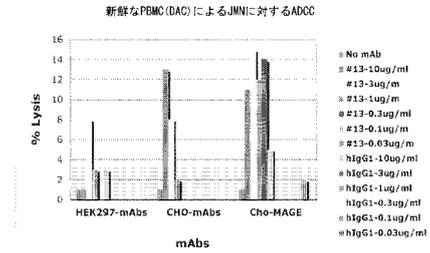


【 図 3 3 】



【 図 3 4 】

	HEK297-mAbs	CHO-mAbs	Cho-MAGE
No mAb	1	1	1
#13-10ug/ml	1	13	11
#13-3ug/ml	8	8	15
#13-1ug/ml	3	2	12
#13-0.3ug/ml	0		14
#13-0.1ug/ml	3		5
#13-0.03ug/ml	0		0
hIgG1-10ug/ml		0	0
hIgG1-3ug/ml		0	0
hIgG1-1ug/ml		0	0
hIgG1-0.3ug/ml			0
hIgG1-0.1ug/ml			2
hIgG1-0.03ug/ml			0



【 配列表 】

2014512812000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/031892

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K16/28 A61K47/48 G01N33/574 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/056595 A2 (IMP COLLEGE INNOVATIONS LTD [GB]; STAUSS HANS JOSEF [GB]; GAO LIQUAN []) 23 June 2005 (2005-06-23) examples 1-2 claims 1.20-24	1-41
Y	WO 2009/108372 A2 (RECEPTOR LOGIC INC [US]; WEIDANZ JON A [US]) 3 September 2009 (2009-09-03) paragraph [0120] - paragraph [0122] table I claim 1 sequence 55	1-41
Y	WO 03/070752 A2 (DYAX CORP [US]; TECHNION RES & DEV FOUNDATION [IL]; HOOGENBOOM HENRICU) 28 August 2003 (2003-08-28) page 42, line 14 - page 70, line 17	1-41
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
27 November 2012		18/12/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ulbrecht, Matthias

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/031892

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/068201 A2 (TECHNION RES & DEV FOUNDATION [IL]; REITER YORAM [IL]; DENKBERG GALIT) 21 August 2003 (2003-08-21) claims 1-61 -----	1-41
Y	DENKBERG G ET AL: "Recombinant antibodies with T-cell receptor-like specificity: Novel tools to study MHC class I presentation", AUTOIMMUNITY REVIEWS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 5, no. 4, 1 April 2006 (2006-04-01), pages 252-257, XP024977451, ISSN: 1568-9972, DOI: 10.1016/J.AUTREV.2005.07.004 [retrieved on 2006-04-01] the whole document -----	1-41
Y	U. KEILHOLZ ET AL: "A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS", BLOOD, vol. 113, no. 26, 25 June 2009 (2009-06-25), pages 6541-6548, XP55045499, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2009-02-202598 abstract page 6541, left-hand column, paragraph 2 - page 6542, left-hand column, paragraph 2 -----	1-41
Y	OKA Y ET AL: "Development of WT1 Peptide Cancer Vaccine Against Hematopoietic Malignancies and Solid Cancers", CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS BV, BE, vol. 13, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 2345-2352, XP007906253, ISSN: 0929-8673, DOI: 10.2174/092986706777935104 the whole document -----	1-41
Y	WO 00/18795 A2 (CORIXA CORP [US]; GAIGER ALEXANDER [US]; CHEEVER MARTIN [US]) 6 April 2000 (2000-04-06) example 4 tables III-V claims 39,41,56.58 sequence 185 -----	1-41
A	US 6 225 051 B1 (SUGIYAMA HARUO [JP] ET AL) 1 May 2001 (2001-05-01) the whole document -----	1-41

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/031892

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005056595 A2	23-06-2005	EP 1692172 A2	23-08-2006
		US 2007191496 A1	16-08-2007
		US 2011274675 A1	10-11-2011
		WO 2005056595 A2	23-06-2005
WO 2009108372 A2	03-09-2009	EP 2262834 A2	22-12-2010
		WO 2009108372 A2	03-09-2009
WO 03070752 A2	28-08-2003	AU 2003216341 A1	09-09-2003
		CA 2476625 A1	28-08-2003
		EP 1485075 A2	15-12-2004
		JP 2005533486 A	10-11-2005
		US 2003223994 A1	04-12-2003
		US 2007196369 A1	23-08-2007
		US 2010228007 A1	09-09-2010
		WO 03070752 A2	28-08-2003
		WO 03068201 A2	21-08-2003
AU 2003208582 A1	04-09-2003		
AU 2010214669 A1	16-09-2010		
CA 2474782 A1	21-08-2003		
EP 1474120 A2	10-11-2004		
EP 2072045 A2	24-06-2009		
EP 2329814 A1	08-06-2011		
ES 2332175 T3	28-01-2010		
HK 1068810 A1	20-05-2010		
JP 4272535 B2	03-06-2009		
JP 2005521389 A	21-07-2005		
US 2005255101 A1	17-11-2005		
US 2005287141 A1	29-12-2005		
US 2011318369 A1	29-12-2011		
WO 03068201 A2	21-08-2003		
WO 0018795 A2	06-04-2000	AR 021849 A1	07-08-2002
		AT 399179 T	15-07-2008
		AU 6407899 A	17-04-2000
		BR 9914116 A	15-01-2002
		CA 2349442 A1	06-04-2000
		CN 1336935 A	20-02-2002
		CZ 20011144 A3	12-06-2002
		EP 1117687 A2	25-07-2001
		ES 2310052 T3	16-12-2008
		HK 1039782 A1	14-11-2008
		HU 0103598 A2	28-01-2002
		IL 142216 A	15-06-2009
		JP 4235984 B2	11-03-2009
		JP 4243792 B2	25-03-2009
		JP 2002525099 A	13-08-2002
		JP 2007001984 A	11-01-2007
		JP 2008069172 A	27-03-2008
		MX PA01003344 A	21-04-2004
		MY 139226 A	28-08-2009
		NO 20011613 A	29-05-2001
		NZ 510600 A	19-12-2003
		PL 348595 A1	03-06-2002
		RU 2237674 C2	10-10-2004
		TR 200101482 T2	21-01-2002
		TW I285648 B	21-08-2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/031892

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 0018795 A2	06-04-2000
US 6225051	B1 01-05-2001	AT 298887 T	15-07-2005
		CA 2224970 A1	23-10-1997
		DE 69733629 D1	04-08-2005
		DE 69733629 T2	18-05-2006
		EP 0846949 A1	10-06-1998
		ES 2242221 T3	01-11-2005
		JP 3122771 B2	09-01-2001
		TW 562928 B	21-11-2003
		US 6225051 B1	01-05-2001
		WO 9739354 A1	23-10-1997

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	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	

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

(72) 発明者 シャインバーグ, デービッド エー.
アメリカ合衆国, 1 0 0 2 5 ニューヨーク州, ニューヨーク, セントラル パーク ウェスト
3 2 5

(72) 発明者 ダオ, タオ
アメリカ合衆国, 1 0 1 2 8 ニューヨーク州, ニューヨーク, イースト 8 7 ストリート 2
4 5, アpartment 1 4 F

(72) 発明者 リュー, チェン
アメリカ合衆国, 9 4 6 1 8 カリフォルニア州, オークランド, ノース ヒル コート 2 4

(72) 発明者 ヤン, スー
アメリカ合衆国, 1 6 8 0 3 ペンシルベニア州, ステート カレッジ, パートリッジ レーン
7 3 1

F ターム (参考) 2G045 AA02 AA24 AA29 AA40 BA13 BB24 CA11 CA18 CA23 CB01
CB02 DA36 FA37 FB03 FB12 GC15
4B024 AA01 AA12 BA44 CA01 GA11 HA01
4B065 AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
4C085 AA13 AA14 AA21 BB01 BB11 BB41 BB43 CC22 CC23 DD62
DD88 EE01 GG01
4H045 AA11 BA10 BA41 CA40 DA76 EA28 FA74