(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2017-500057
(P2017-500057A)
(43)公表日　平成29年1月5日(2017.1.5)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B064
C07K 16/32	(2006.01)	C07K	16/32	ZNA	4B065
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4C085
C12N 5/0783	(2010.01)	C12N	5/0783		4C087
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 87 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-553248 (P2016-553248)
(86)(22)出願日　平成26年11月7日 (2014.11.7)
(85)翻訳文提出日　平成28年5月11日 (2016.5.11)
(86)国際出願番号　PCT/US2014/064621
(87)国際公開番号　WO2015/070061
(87)国際公開日　平成27年5月14日 (2015.5.14)
(31)優先権主張番号　62/037,875
(32)優先日　平成26年8月15日 (2014.8.15)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/901,310
(32)優先日　平成25年11月7日 (2013.11.7)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　500213834
メモリアル　スローン－ケタリング　キャンサー　センター
アメリカ合衆国　ニューヨーク　１００６５，　ニューヨーク，　ヨーク　アベニュー　１２７５
(71)出願人　516133674
ユーリカ　セラピューティックス，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４６０８，　エメリービル，　ホートン　ストリート　５８５８，　スイート　３６２
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗ＷＴ１／ＨＬＡ二重特異性抗体

(57)【要約】
本明細書では、ヒト免疫エフェクター細胞抗原及びＷＴ１ペプチド／ＨＬＡ－Ａエピトープに対して反応性を持つ、二重特異性型のＴ細胞受容体模倣（ＴＣＲｍ）ｍＡｂが開示される。この抗体は、ＷＴ１及びＨＬＡ－Ａを発現する白血病及び固形腫瘍細胞、ならびに活性化した静止ヒトＴ細胞に選択的に結合して、インターフェロン（ＩＦＮ－γ）を放出し、標的癌細胞をインビトロで死滅させた。重要なことには、この抗体は、自己Ｔ細胞増殖を媒介し、新鮮な卵巣癌細胞に対して強力な細胞傷害活性を向けた。この抗体のインビボ治療活性は、播種性Ｐｈ＋急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、播種性急性骨髄性白血病、及び腹膜中皮腫を含む、ＷＴ１／ＨＬＡ－Ａ２を発現する３つの異なるヒト癌を持つＮＯＤ　ＳＣＩＤ　ＳＣＩＤ　γｃ＊（ＮＳＧ）マウスにおいて実証された。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
組換え抗体であって、
（ｉ）第１の抗原結合部分であって、
（Ａ）表１～６に記載のアミノ酸配列を含む、ＨＣ－ＣＤＲ１、ＨＣ－ＣＤＲ２、及びＨＣ－ＣＤＲ３を含む重鎖（ＨＣ）可変領域、ならびにＬＣ－ＣＤＲ１、ＬＣ－ＣＤＲ２、及びＬＣ－ＣＤＲ３を含む軽鎖（ＬＣ）可変領域、
（Ｂ）表１～６に記載の第１及び第２のアミノ酸配列を含むV_H及びV_L、または
（Ｃ）表１～６に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦｖ、を含む、第１の抗原結合部分と、
（ｉｉ）表７に記載のアミノ酸配列を含む、第２の抗原結合部分と、を含む、前記組換え抗体。
【請求項２】
前記第１の抗原結合部分及び／または前記第２の抗原結合部分が、Ｆａｂ断片；前記ＶＬ、ＶＨ、ＣＬ、及びＣＨ１ドメインからなる一価断片；Ｆ（ａｂ）２断片；ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結される２つのＦａｂ断片を含む、二価断片；前記ＶＨ及びＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片；抗体の単一アームのＶＬ及びＶＨドメインからなるＦｖ断片；ｄＡｂ断片；単離したＣＤＲ；ならびにｓｃＦｖからなる群より選択される抗体断片である、請求項１に記載の前記組換え抗体。
【請求項３】
前記第１の抗原結合部分及び／または前記第２の抗原結合部分が、ｓｃＦｖである、請求項２に記載の前記組換え抗体。
【請求項４】
前記第１の抗原結合部分が、ＷＴ１／ＨＬＡに特異的に結合し、前記第２の抗原結合部分が、免疫エフェクター細胞表面抗原に特異的に結合する、請求項１～３のいずれか一項に記載の前記組換え抗体。
【請求項５】
前記免疫エフェクター細胞が、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、マクロファージ、及びＴ細胞からなる群より選択される、請求項４に記載の前記組換え抗体。
【請求項６】
前記免疫エフェクター細胞が、$CD3^+$細胞であり、前記組換え抗体が、ＣＤ３に特異的に結合する、請求項４に記載の前記組換え抗体。
【請求項７】
前記組換え抗体が、ＷＴ１／$HLA2^+$細胞に結合する、請求項１～６のいずれか一項に記載の前記組換え抗体。
【請求項８】
前記ＷＴ１／$HLA2^+$細胞が、低密度のＷＴ１／ＨＬＡ２をその表面上に有する、請求項７に記載の前記組換え抗体。
【請求項９】
前記組換え抗体が、ＣＤ３に特異的に結合する、請求項１～８のいずれか一項に記載の前記組換え抗体。
【請求項１０】
前記組換え抗体が、$CD3^+$細胞に結合する、請求項１～９のいずれか一項に記載の前記組換え抗体。
【請求項１１】
配列番号１１０に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載の前記組換え抗体。
【請求項１２】
請求項１～１１のいずれか一項に記載の組換え抗体をコードする、核酸。
【請求項１３】

請求項１～１１のいずれか一項に記載の前記組換え抗体、または請求項１２に記載の前記核酸を含む、薬学的組成物。
【請求項１４】
ＷＴ１$^{+}$細胞を死滅させるための方法であって、前記細胞を、請求項１～１１のいずれか一項に記載の前記抗体及び免疫エフェクター細胞と接触させることを含む、前記方法。
【請求項１５】
前記免疫エフェクター細胞が、細胞傷害性細胞である、請求項１４に記載の前記方法。
【請求項１６】
ＷＴ１陽性疾患を有する対象の治療方法であって、治療有効量の請求項１～１１のいずれか一項に記載の前記抗体を前記対象に投与することを含む、前記方法。
【請求項１７】
対象におけるＷＴ１陽性疾患の前記治療のための薬剤の製造における、請求項１～１１のいずれか一項に記載の前記抗体の使用。
【請求項１８】
対象においてＷＴ１陽性疾患を治療するための方法における使用のための、請求項１～１１のいずれか一項に記載の前記抗体。
【請求項１９】
免疫エフェクター細胞を前記対象に投与することをさらに含む、請求項１６～１８のいずれか一項に記載の前記方法または使用。
【請求項２０】
前記免疫エフェクター細胞が、細胞傷害性細胞である、請求項１９に記載の前記方法または使用。
【請求項２１】
前記細胞傷害性細胞が、ＣＤ３$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞である、請求項２０に記載の前記方法または使用。
【請求項２２】
前記ＣＤ３$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞が、自己Ｔ細胞である、請求項２１に記載の前記方法または使用。
【請求項２３】
前記ＷＴ１陽性疾患が、慢性白血病または急性白血病またはＷＴ１$^{+}$癌である、請求項１６～２２のいずれか一項に記載の前記方法または使用。
【請求項２４】
前記ＷＴ１陽性疾患が、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫（ＭＭ）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性（ｍｙｅｌｏｉｄ）／骨髄性（ｍｙｅｌｏｇｅｎｏｕｓ）白血病（ＡＭＬ）、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、中皮腫、卵巣癌、消化器癌、乳癌、前立腺癌、及びグリア芽腫からなる群より選択される、請求項２３に記載の前記方法または使用。
【請求項２５】
組換え抗体であって、
（Ｉ）第１の抗原結合部分であって、
（Ａ）配列番号１８、３６、５４、７２、９０、１０８、及び１３２からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、一本鎖可変断片（ｓｃＦＶ）、または
（Ｂ）重鎖可変ドメイン（ＶＨ）及び軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）であって、前記ＶＨ及びＶＬがそれぞれ、配列番号（ｉ）１４及び１６、（ｉｉ）３２及び３４、（ｉｉｉ）５０及び５２、（ｉｖ）６８及び７０、（ｖ）８６及び８８、（ｖｉ）１０４及び１０６、ならびに（ｖｉｉ）１２８及び１３０からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域（ＶＨ）及び軽鎖可変領域（ＶＬ）、または
（Ｃ）（ｉ）次の３つのＶＨ相補性決定領域（ＣＤＲ）、すなわち（ａ）配列番号２、２０、３８、５６、７４、９２、及び１１６からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、（ｂ）配列番号３、２１、３９、５７、７５、９３、及び１１７から

なる群より選択されるアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び（ｃ）配列番号４、２２、４０、５８、７６、９４、及び１１８からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３、ならびに、

（ｉｉ）次の３つのＶＬ　ＣＤＲ、すなわち（ａ）配列番号８、２６、４４、６２、８０、９８、及び１２２からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ１、（ｂ）配列番号９、２７、４５、６３、８１、９９、及び１２３からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び（ｃ）配列番号１０、２８、４６、６４、８２、１００、及び１２４からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３、のうちの１つを含む、第１の抗原結合部分と、

（ＩＩ）第２の抗原結合部分であって、

（Ａ）配列番号１１３に記載のアミノ酸配列を含む、一本鎖可変断片（ｓｃＦＶ）、または（Ｂ）重鎖可変ドメイン（ＶＨ）及び軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）であって、前記ＶＨ及びＶＬがそれぞれ、配列番号１１１及び１１２、または配列番号１３４及び１３６に記載のアミノ酸配列を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）及び軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む、第２の抗原結合部分と、を含む、前記組換え抗体。

【請求項２６】

前記第１の抗原結合部分が、

（Ａ）配列番号１８に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦＶ、または

（Ｂ）配列番号１４に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号１６に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ、または

（Ｃ）配列番号２に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号３に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、配列番号４に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３、配列番号８に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号９に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号１０に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３、のうちの１つを含む、請求項２５に記載の前記組換え抗体。

【請求項２７】

前記第１の抗原結合部分が、

（Ａ）配列番号３６に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦＶ、または

（Ｂ）配列番号３２に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ、または

（Ｃ）配列番号２０に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号２１に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、配列番号２２に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３、配列番号２６に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号２７に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号２８に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３、のうちの１つを含む、請求項２５に記載の前記組換え抗体。

【請求項２８】

前記第１の抗原結合部分が、

（Ａ）配列番号５４に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦＶ、または

（Ｂ）配列番号５０に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号５２に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ、または

（Ｃ）配列番号３８に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号３９に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、配列番号４０に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３、配列番号４４に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号４５に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号４６に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３、のうちの１つを含む、請求項２５に記載の前記組換え抗体。

【請求項２９】

前記第１の抗原結合部分が、

（Ａ）配列番号７２に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦＶ、または

（Ｂ）配列番号６８に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号７０に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ、または

（Ｃ）配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号５７に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、配列番号５８に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３、配列番号６２に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号６３に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号６４に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３、のうちの１つを含む、請求項２５に記載の前記組換え抗体。

【請求項３０】

前記第１の抗原結合部分が、

（Ａ）配列番号９０に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦＶ、または

（Ｂ）配列番号８６に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号８８に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ、または

（Ｃ）配列番号７４に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号７５に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、配列番号７６に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３、配列番号８０に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号８１に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号８２に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３、のうちの１つを含む、請求項２５に記載の前記組換え抗体。

【請求項３１】

前記第１の抗原結合部分が、

（Ａ）配列番号１０８に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦＶ、または

（Ｂ）配列番号１０４に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号１０６に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ、または

（Ｃ）配列番号９２に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号９３に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、配列番号９４に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３、配列番号９８に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号９９に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号１００に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３、のうちの１つを含む、請求項２５に記載の前記組換え抗体。

【請求項３２】

請求項２５～３１の組換え抗体をコードする、核酸。

【請求項３３】

請求項２５～３１のいずれか一項に記載の前記組換え抗体、または請求項３２に記載の前記核酸を含む、薬学的組成物。

【請求項３４】

ＷＴ１$^{+}$細胞を死滅させるための方法であって、前記細胞を、請求項２５～３１のいずれか一項に記載の前記抗体及び免疫エフェクター細胞と接触させることを含む、前記方法。

【請求項３５】

前記免疫エフェクター細胞が、細胞傷害性細胞である、請求項３４に記載の前記方法。

【請求項３６】

ＷＴ１陽性疾患を有する対象の治療方法であって、治療有効量の請求項２５～３１のいずれか一項に記載の前記抗体を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項３７】

対象におけるＷＴ１陽性疾患の前記治療のための薬剤の製造における、請求項２５～３１のいずれか一項に記載の前記抗体の使用。

【請求項３８】

対象においてＷＴ１陽性疾患を治療するための方法における使用のための、請求項２５～３１のいずれか一項に記載の前記抗体。

【請求項３９】

免疫エフェクター細胞を前記対象に投与することをさらに含む、請求項３６～３８のいずれか一項に記載の前記方法または使用。

【請求項４０】

前記免疫エフェクター細胞が、細胞傷害性細胞である、請求項３９に記載の前記方法ま

たは使用。
【請求項４１】
前記細胞傷害性細胞が、ＣＤ３$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞である、請求項４０に記載の前記方法または使用。
【請求項４２】
前記ＣＤ３$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞が、自己Ｔ細胞である、請求項４１に記載の前記方法または使用。
【請求項４３】
前記ＷＴ１陽性疾患が、慢性白血病または急性白血病またはＷＴ１$^{+}$癌である、請求項３６～４２のいずれか一項に記載の前記方法または使用。
【請求項４４】
前記ＷＴ１陽性疾患が、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫（ＭＭ）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性（ｍｙｅｌｏｉｄ）／骨髄性（ｍｙｅｌｏｇｅｎｏｕｓ）白血病（ＡＭＬ）、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、中皮腫、卵巣癌、消化器癌、乳癌、前立腺癌、及びグリア芽腫からなる群より選択される、請求項４３に記載の前記方法または使用。
【請求項４４】
組換え抗体を含む組成物を投与することを含む、対象において一次Ｔ細胞応答及び二次Ｔ細胞応答を刺激する方法であって、前記組換え抗体が、第１の抗原結合部分及び第２の抗原結合部分を含み、前記第１の抗原結合部分が、第１の腫瘍抗原に特異的に結合し、前記第２の抗原結合部分が、免疫エフェクター細胞表面抗原に特異的に結合し、
前記一次Ｔ細胞応答が、前記第１の腫瘍抗原に対して細胞傷害性Ｔ細胞を刺激することを含み、
前記二次Ｔ細胞応答が、前記第１の腫瘍抗原に対して及び／または第２の腫瘍抗原に対して、エフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞を刺激することを含む、前記方法。
【請求項４５】
対象において一次Ｔ細胞応答及び二次Ｔ細胞応答を刺激するための薬剤の製造における組換え抗体の使用であって、前記組換え抗体が、第１の抗原結合部分及び第２の抗原結合部分を含み、前記第１の抗原結合部分が、第１の腫瘍抗原に特異的に結合し、前記第２の抗原結合部分が、免疫エフェクター細胞表面抗原に特異的に結合し、
前記一次Ｔ細胞応答が、前記第１の腫瘍抗原に対して細胞傷害性Ｔ細胞を刺激することを含み、
前記二次Ｔ細胞応答が、前記第１の腫瘍抗原に対して及び／または第２の腫瘍抗原に対して、エフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞を刺激することを含む、前記使用。
【請求項４６】
組換え抗体を含む組成物を投与することを含む、対象において一次Ｔ細胞応答及び二次Ｔ細胞応答を刺激するための方法で使用するための前記組換え抗体であって、前記組換え抗体が、前記第１の抗原結合部分及び第２の抗原結合部分を含み、前記第１の抗原結合部分が、第１の腫瘍抗原に特異的に結合し、前記第２の抗原結合部分が、免疫エフェクター細胞表面抗原に特異的に結合し、
前記一次Ｔ細胞応答が、前記第１の腫瘍抗原に対して細胞傷害性Ｔ細胞を刺激することを含み、
前記二次Ｔ細胞応答が、前記第１の腫瘍抗原に対して及び／または第２の腫瘍抗原に対して、エフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞を刺激することを含む、前記組換え抗体。
【請求項４７】
前記第１の腫瘍抗原が、ＷＴ１／ＨＬＡであり、前記第２の腫瘍抗原が、非ＷＴ１－ＲＭＦ腫瘍抗原である、請求項４４～４６のいずれか一項に記載の前記方法または使用。

【請求項４８】
前記非ＷＴ１－ＲＭＦ腫瘍抗原が、ＨＥＲ２－ｎｅｕ、メソテリン、Ｔｅｒｔ、Ｍｕｃ１６、Ｍｕｃ１、ＰＳＭＡ、及びＰｒ１からなる群より選択される、請求項４７に記載の前記方法または使用。
【請求項４９】
請求項１～１１または請求項２５～３１のいずれか一項に記載の前記組換え抗体を含む組成物を投与することを含む、請求項４４～４８のいずれか一項に記載の前記方法または使用。
【請求項５０】
前記二次Ｔ細胞応答が、抗原提示細胞または共刺激分子を必要としない、請求項４４～４９のいずれか一項に記載の前記方法または使用。
【請求項５１】
前記二次Ｔ細胞応答が、前記第２の腫瘍抗原に対してエフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞を刺激することを含む、請求項４４～５０のいずれか一項に記載の前記方法または使用。
【請求項５２】
前記二次Ｔ細胞応答が、ＣＤ８　Ｔ細胞の増加を含む、請求項４４～５１のいずれか一項に記載の前記方法または使用。
【請求項５３】
前記二次Ｔ細胞応答が、１週間を超えて続く、請求項４４～５２のいずれか一項に記載の前記方法または使用。
【請求項５４】
前記二次Ｔ細胞応答が、以前にアネルギー性であったＴ細胞及び／または非ＷＴ１－ＲＭＦ抗原で以前に活性化されたＴ細胞を含む、請求項４４～５３のいずれか一項に記載の前記方法または使用。
【請求項５５】
前記一次Ｔ細胞応答及び／または前記二次Ｔ細胞応答が、腫瘍部位でのＴ細胞の増加を含む、請求項４４～５４のいずれか一項に記載の前記方法または使用。
【請求項５６】
前記腫瘍部位が、骨髄、肺、肝臓、脳、尿生殖路、胃腸管、及び脾臓からなる群より選択される、請求項５５に記載の前記方法または使用。
【請求項５７】
前記一次Ｔ細胞応答及び／または二次Ｔ細胞応答が、インビボで起こる、請求項４４～５６のいずれか一項に記載の前記方法または使用。
【請求項５８】
前記一次Ｔ細胞応答及び／または前記二次Ｔ細胞応答が、エクスビボで起こる、請求項４４～５６のいずれか一項に記載の前記方法または使用。
【請求項５９】
請求項１～１１または２５～３１のいずれか一項に記載の前記組換え抗体を用いてＴ細胞を活性化することを含む、腫瘍抗原に対してエフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞を生成する方法。
【請求項６０】
前記Ｔ細胞が、前記活性化ステップの後に１週間を超えて生存できる、請求項５９に記載の前記方法。
【請求項６１】
前記腫瘍抗原が、非ＷＴ１－ＲＭＦ腫瘍抗原である、請求項５９または６０に記載の前記方法。
【請求項６２】
前記非ＷＴ１－ＲＭＦ腫瘍抗原が、ＨＥＲ２－ｎｅｕ及びメソテリン、Ｔｅｒｔ、Ｍｕｃ１６、Ｍｕｃ１、ＰＳＭＡ、ならびにＰｒ１からなる群より選択される、請求項６１

に記載の前記方法。
【請求項６３】
前記エフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞が、エクスビボで生成される、請求項５９～６２のいずれか一項に記載の前記方法。
【請求項６４】
前記エフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞が、インビボで生成される、請求項５９～６２のいずれか一項に記載の前記方法。
【請求項６５】
免疫エフェクター細胞を投与することをさらに含む、請求項４４～６４のいずれか一項に記載の前記方法または使用。
【請求項６６】
前記免疫エフェクター細胞が、細胞傷害性細胞である、請求項６５に記載の前記方法または使用。
【請求項６７】
前記細胞傷害性細胞が、ＣＤ３$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞である、請求項６６に記載の前記方法または使用。
【請求項６８】
前記ＣＤ３$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞が、自己Ｔ細胞である、請求項６７に記載の前記方法または使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
２０１３年１１月７日出願の米国仮特許出願第６１／９０１，３１０号、及び２０１４年８月１５日出願の米国仮特許出願第６２／０３７，８７５号の米国特許法第１１９条（ｅ）の下の利益は、本明細書によって主張され、両方の優先権書類の開示全体は、参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
本願は、２０１１年４月１日出願の米国仮出願第６１／４７０，６３５号、及び２０１１年５月３１日出願の米国仮出願第６１／４９１，３９２号、及び「Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｒｅｃｅｐｔｏｒ　Ｌｉｋｅ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　Ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｆｏｒ　ＷＴ１　Ｐｅｐｔｉｄｅｓ」と題する、２０１３年９月２７日出願の米国非仮出願第１４／００８，４４７号、ならびに２０１３年３月１５日出願の「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ｔｏ　Ｃｙｔｏｓｏｌｉｃ　Ｐｅｐｔｉｄｅｓ」と題する、同一出願人による米国仮出願第６１／７９８，５６３号の主題と関連した主題を含み、それぞれの内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。
連邦支援の研究に基づいた権利に関する声明
【０００３】
本発明は、米国国立衛生研究所からの助成金Ｐ０１ＣＡ２３７６６及びＲ０１ＣＡ５５３４９の下で米国政府の支援によりなされた。政府は、本発明におけるある特定の権利を有する。
配列表
【０００４】
本願は、開示の別個の部分として、コンピュータ可読形式の配列表を含み（ファイル名：４８３１７＿ＳｅｑＬｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔ、作成日：２０１４年１１月７日、サイズ：９３，８４１バイト）、参照によりその全体が本願に組み込まれる。
【０００５】
本発明は、概して、細胞質タンパク質に対する抗体に関する。より具体的には、本発明は、ウィルムス腫瘍癌遺伝子タンパク質（ＷＴ１）、特に、主要組織適合抗原と併せてＷＴ１ペプチド、ならびに免疫エフェクター細胞の表面上に提示される抗原を認識する二重

特異性抗体に関する。

【背景技術】

【０００６】

ＭＨＣクラスＩ分子の関連において重要な細胞内タンパク質のペプチド断片を認識する、治療的Ｔ細胞受容体様モノクローナル抗体（ＴＣＲｍ　ｍＡｂ）の開発は、細胞内腫瘍特異性抗原（Ａｇ）を標的とする新たな手法として出現している。ほとんどの腫瘍特異性Ａｇは、古典的ｍＡｂ療法が利用できない細胞内タンパク質である。これらのタンパク質は、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）のＴＣＲによって認識されるペプチド／ＭＨＣ複合体として、ＭＨＣクラスＩ分子によって分解、プロセス、及び提示される。結果として、低密度の腫瘍特異性ペプチド／ＭＨＣ複合体に向かってＴ細胞応答を誘起することを目的とする多くの手法が試みられたが、限られた成果しか収めていない。ウィルムス腫瘍タンパク質（ＷＴ１）は、Ｔ細胞免疫療法のための十分に確証されたヒト腫瘍特異性Ａｇである。ＷＴ１は、広範囲の造血器悪性腫瘍、白血病幹細胞、及び多様な固形腫瘍において過剰発現される。正常な成人組織において、このタンパク質は限られた低い発現を有し、これにより理想的な癌特異性標的になる（Ｇｅｓｓｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ．１９９０；３４６（６２８０）：１９４－１９７、Ｍｅｎｓｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．　Ｌｅｕｋｅｍｉａ．１９９５；９（６）：１０６０－１０６７、Ｏｊｉ　ｅｔ　ａｌ．Ｊｐｎ　Ｊ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．１９９９；９０（２）：１９４－２０４）。ＷＴ１エピトープ特異性Ｔ細胞及びＷＴ１総タンパク質に対する抗体の両方は、造血器悪性腫瘍及び固形腫瘍患者において検出され、ＷＴ１が高度に免疫原性の抗原であることを示す（Ｇａｉｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｃａｎｃｅｒ　ｒｅｓｅａｒｃｈ：ｔｈｅ　Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　ｆｏｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈの公報．２００１；７（３　Ｓｕｐｐｌ）：７６１ｓ－５ｓ、Ｇｉｌｌｍｏｒｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｃａｎｃｅｒ　ｒｅｓｅａｒｃｈ：ｔｈｅ　Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　ｆｏｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈの公報．２００６；１２（１）：３４－４２）。さらに、同種幹細胞移植後の移植片対白血病と検出可能なＷＴ１特異性ＣＴＬとの間の相関が観察され、これらのＴ細胞の治療活性をさらに実証した。

【０００７】

ＷＴ１由来ペプチド断片、ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（ＲＭＦ、配列番号１）は、ＨＬＡ－Ａ０２０１分子との関連でＣＤ８　Ｔ細胞認識について最もよく研究され、最も確証されたエピトープである。ＲＭＦエピトープは、ペプチドワクチンにおいて、または急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、及び様々な固形腫瘍患者からエクスビボで増殖された養子移入ＣＤ８　Ｔ細胞の標的として広く使用されてきた。これらの研究は、一部の患者において臨床応答と関連付けられたペプチドエピトープの免疫原性を実証した（Ｋｒｕｇ　ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１０；５９（１４６７－１４７９）、Ｍａｓｌａｋ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｌｏｏｄ．２０１０；１１６（２）：１７１－９、Ｋｅｉｌｈｏｌｚ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｌｏｏｄ．２００９；１１３（２６）：６５４１－８、Ｏｋａ　ｅｔ　ａｌ．ＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃＷｏｒｌｄＪｏｕｒｎａｌ．２００７；７：６４９－６５、Ｏｋａ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ａｃａｄｅｍｙ　ｏｆ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　ｏｆ　Ａｍｅｒｉｃａ．２００４；１０１（３８）：１３８８５－９０、Ｌｅｔｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．ａｎｄ　Ｋｅｉｈｏｌｚ，Ｕ．，ｅｄｉｔｏｒ．Ａｓｓｏｃｉａｔｅ　ｆｏｒ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ　ｏｆ　Ｃａｎｃｅｒ：Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ－２ｎｄ　Ａｎｎｕａｌ　Ｍｅｅｔｉｎｇ；２００４；Ｍａｉｎｚ，Ｇｅｒｍａｎｙ）。

【０００８】

Ｔ細胞免疫療法の著しい進歩にもかかわらず、客観的臨床応答は、依然として滅多に見られない。Ｔ細胞系療法の無効性は、低いＴＣＲ親和性、高い腫瘍量に対する限られたインビボの強力な細胞傷害性応答、エフェクター細胞残存率の不足、自己腫瘍Ａｇに対する耐性、ならびにＴ調節性（Ｔ－ｒｅｇ）細胞及びサイトカインによる免疫抑制に起因する

とされてきた（Ｍｏｒｒｉｓ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ Ｒｅｖｉｅｗｓ ２００６；２０：６１－６９、Ｋｏｎｎｉｇ Ｒ．Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００２：１４（１）７５－８３）。ＷＴ１のこの重要なエピトープを標的とするための異なる手法を開発するために、ＲＭＦ／ＨＬＡ－Ａ０２０１複合体に特異的な完全ヒトＴＣＲｍ ｍＡｂが生成された。このｍＡｂは、ＷＴ１発現白血病及び固形腫瘍に対して、インビトロ及びインビボの両方で、抗体依存性細胞性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ）を介した強力な治療活性を示した（Ｄａｏ ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉ Ｔｒａｎｓｌ Ｍｅｄ．２０１３；５（１７６）：１７６ｒａ１３３）。

ＡＤＣＣは、白血病または癌患者において、特に治療後に極めて異種であり得る、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、マクロファージ、好中球、及び他の免疫エフェクター細胞の存在に依存する。ｍＡｂ細胞溶解療法を媒介するための代替及び有効な手法は、Ｔ細胞をエフェクター細胞として使用することである。Ｔ細胞は、最も強力な細胞傷害性細胞の１つであり、循環細胞傷害性細胞のうちの最多数を占める。抗体系キメラ抗原受容体（ＣＡＲとして知られる）ならびに腫瘍Ａｇ及びＣＤ３ Ｔ細胞に対して二重特異性を持つ二重特異性ｍＡｂを用いて操作されたＴ細胞を養子移入するなどの、Ｔ細胞に対するｍＡｂ特異性を付加する最近の手法は、ポリクローナルヒトＴ細胞を十分に定義された腫瘍関連Ａｇに向け直すための効率的な戦略として出現した。二重特異性抗体構築物は、癌細胞上の表面ＡｇをＴ細胞上のＴＣＲ／ＣＤ３複合体に架橋するように設計されている。分子は、細胞の内因性Ａｇ特異性ＴＣＲ認識、共刺激性分子、及び腫瘍細胞上のＨＬＡ発現から独立している連鎖的様態で腫瘍細胞を死滅させるように、ＣＤ４及びＣＤ８ Ｔ細胞の両方を向け直すことができる。それはまた、ワクチン接種、サイトカイン投与、またはＡｇ特異的な患者由来Ｔ細胞のエクスビボ増殖及び注入も回避する（Ｆｒａｎｋｅｌ ａｎｄ Ｂａｅｕｅｒｌｅ．Ｃｕｒｒｅｎｔ ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ ｃｈｅｍｉｃａｌ ｂｉｏｌｏｇｙ．２０１３；１７（３）：３８５－９２、Ｂｒｉｓｃｈｗｅｉｎ ｅｔ ａｌ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ．２００７；３０（８）：７９８－８０７、Ｎａｇｏｒｓｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ&ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ．２０１２；１３６（３）：３３４－４２、Ａｉｇｎｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｌｅｕｋｅｍｉａ．２０１３；２７（５）：１１０７－１５、Ｓｐｉｅｓｓ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ．２０１３；３１（８）：７５３－８、Ｎａｇｏｒｓｅｎ ａｎｄ Ｂａｅｕｅｒｌｅ．Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ ｃｅｌｌ ｒｅｓｅａｒｃｈ．２０１１；３１７（９）：１２５５－６０）。ＴＣＲの汎Ｂ細胞Ａｇ ＣＤ１９及びＣＤ３ｅシグナル伝達鎖に特異的な二重特異性ｔ細胞係合子（ＢｉＴＥ（登録商標）抗体ブリナツモマブ（Ａｍｇｅｎ，Ｔｈｏｕｓａｎｄ Ｏａｋｓ，ＣＡ）は、非ホジキンリンパ腫及び急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）の治療に対してＦＤＡ承認されている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００９】

【非特許文献１】Ｇｅｓｓｌｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ．１９９０；３４６（６２８０）：１９４－１９７

【非特許文献２】Ｍｅｎｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ． Ｌｅｕｋｅｍｉａ．１９９５；９（６）：１０６０－１０６７

【非特許文献３】Ｏｊｉ ｅｔ ａｌ．Ｊｐｎ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１９９９；９０（２）：１９４－２０４

【非特許文献４】Ｇａｉｇｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ ｃａｎｃｅｒ ｒｅｓｅａｒｃｈ：ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈの公報．２００１；７（３ Ｓｕｐｐｌ）：７６１ｓ－５ｓ

【非特許文献５】Ｇｉｌｌｍｏｒｅ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ ｃａｎｃｅｒ ｒｅｓｅａｒｃｈ：ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈの公報．２００６；１２（１）：３４－４２

【非特許文献６】Ｋｒｕｇ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｉｍｍｕｎｏ

ｔｈｅｒ．２０１０；５９（１４６７－１４７９）
【非特許文献７】Ｍａｓｌａｋ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ．２０１０；１１６（２）：１７１－９
【非特許文献８】Ｋｅｉｌｈｏｌｚ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ．２００９；１１３（２６）：６５４１－８、Ｏｋａ ｅｔ ａｌ．ＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃＷｏｒｌｄＪｏｕｒｎａｌ．２００７；７：６４９－６５、Ｏｋａ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ．２００４；１０１（３８）：１３８８５－９０
【非特許文献９】Ｌｅｔｓｃｈ ｅｔ ａｌ．ａｎｄ Ｋｅｉｈｏｌｚ，Ｕ．，ｅｄｉｔｏｒ．Ａｓｓｏｃｉａｔｅ ｆｏｒ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ：Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ－２ｎｄ Ａｎｎｕａｌ Ｍｅｅｔｉｎｇ；２００４；Ｍａｉｎｚ，Ｇｅｒｍａｎｙ
【非特許文献１０】Ｍｏｒｒｉｓ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ Ｒｅｖｉｅｗｓ ２００６；２０：６１－６９、Ｋｏｎｎｉｇ Ｒ．Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００２：１４（１）７５－８３
【非特許文献１１】Ｄａｏ ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉ Ｔｒａｎｓｌ Ｍｅｄ．２０１３；５（１７６）：１７６ｒａ１３３
【非特許文献１２】Ｆｒａｎｋｅｌ ａｎｄ Ｂａｅｕｅｒｌｅ．Ｃｕｒｒｅｎｔ ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ ｃｈｅｍｉｃａｌ ｂｉｏｌｏｇｙ．２０１３；１７（３）：３８５－９２、Ｂｒｉｓｃｈｗｅｉｎ ｅｔ ａｌ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ．２００７；３０（８）：７９８－８０７
【非特許文献１３】Ｎａｇｏｒｓｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ＆ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ．２０１２；１３６（３）：３３４－４２
【非特許文献１４】Ａｉｇｎｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｌｅｕｋｅｍｉａ．２０１３；２７（５）：１１０７－１５、Ｓｐｉｅｓｓ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ．２０１３；３１（８）：７５３－８
【非特許文献１５】Ｎａｇｏｒｓｅｎ ａｎｄ Ｂａｅｕｅｒｌｅ．Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ ｃｅｌｌ ｒｅｓｅａｒｃｈ．２０１１；３１７（９）：１２５５－６０

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１０】

以前に記載された二重特異性抗体は全て、腫瘍特異性ではない周知の高密度細胞表面Ａｇを対象とする。本開示は、ＥＳＫと指定される、ＴＣＲｍ ｍＡｂ由来の二重特異性抗体を提供する。ＥＳＫ二重特異性抗体は、ＷＴ１／ＨＬＡ－Ａ０２０１陽性腫瘍細胞を選択的に結合することができ、ヒトＴ細胞の細胞傷害活性を向け直すことによって、複数のヒト癌モデルにおいて強力な治療活性を示した。Ｔ細胞集団の癌への向け直しは、二重標的、ならびにエフェクター細胞追跡及び画像解析によって実証された。本明細書に記載されるＴＣＲｍ ｍＡｂ二重特異性抗体は、広く発現された低密度細胞内腫瘍特異性Ａｇ、例えば、ＷＴ１を標的とする強力な治療薬である。本明細書に記載される二重特異性抗体は、ＷＴ１以外の抗原に特異的な二次Ｔ細胞応答を誘導することもできる。

【００１１】

一態様では、本発明は、ＨＬＡ－Ａ２などの主要組織適合性複合体抗原と複合されたＷＴ１ペプチドに特異的に結合する第１の抗原部分を含み、したがって、ＷＴ１が低密度で存在する場合でもＷＴ１／ＨＬＡ－Ａ２$^{+}$細胞に結合することができる、組換え抗体に関する。抗体は、免疫エフェクター細胞上の表面抗原、例えば、ＣＤ３に特異的に結合する二次抗原結合部分をさらに含み、したがって、免疫エフェクター細胞にも結合することができる。

【００１２】

一態様では、本発明は、組換え抗体に関し、該組換え抗体は、（ｉ）（Ａ）表１～６に

記載のアミノ酸配列を含む、ＨＣ－ＣＤＲ１、ＨＣ－ＣＤＲ２、及びＨＣ－ＣＤＲ３を含む重鎖（ＨＣ）可変領域、ならびにＬＣ－ＣＤＲ１、ＬＣ－ＣＤＲ２、及びＬＣ－ＣＤＲ３を含む軽鎖（ＬＣ）可変領域、（Ｂ）表１～６に記載の第１及び第２のアミノ酸配列を含むＶＨ及びＶＬ、または（Ｃ）表１～６に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦｖ、を含む、第１の抗原結合部分と、（ｉｉ）表７に記載のアミノ酸配列を含む、第２の抗原結合部分と、を含む。一実施形態では、組換え抗体は、図１０に示されるアミノ酸配列（配列番号１１０）を含む。

【００１３】

別の態様では、本発明は、本明細書に開示される組換え二重特異性抗体をコードする核酸に関する。

【００１４】

関連態様では、本発明は、組換え二重特異性抗体及び薬学的に許容される賦形剤を含む、薬学的組成物に関する。別の態様では、本発明は、組換え二重特異性抗体をコードする核酸、及び薬学的に許容される賦形剤を含む、薬学的組成物に関する。

【００１５】

さらに別の態様では、ＷＴ１$^{+}$細胞を死滅させるための方法に関し、該方法は、ＷＴ１$^{+}$細胞を、配列番号１のアミノ酸配列に対して特異性を有する抗体及び細胞傷害性Ｔ細胞と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、細胞傷害性Ｔ細胞は、自己細胞である。

【００１６】

さらに別の関連態様では、本発明は、ＷＴ１陽性疾患を有する対象の治療方法に関し、該方法は、治療有効量の本明細書に記載される組換え二重特異性抗体を対象に投与することを含む。一実施形態では、方法は、自己性であるＣＤ３$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞を対象に投与することをさらに含む。一実施形態では、ＷＴ１陽性疾患は、慢性白血病もしくは急性白血病、またはＷＴ１$^{+}$癌、例えば、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫（ＭＭ）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性（ｍｙｅｌｏｉｄ）／骨髄性（ｍｙｅｌｏｇｅｎｏｕｓ）白血病（ＡＭＬ）、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、中皮腫、卵巣癌、消化器癌、乳癌、前立腺癌、及びグリア芽腫である。

【００１７】

一態様では、本発明は、（Ａ）配列番号１８、３６、５４、７２、９０、１０８、及び１３２からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、一本鎖可変断片（ｓｃＦＶ）、または（Ｂ）重鎖可変ドメイン（ＶＨ）及び軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）であって、該ＶＨ及びＶＬがそれぞれ、配列番号（ｉ）１４及び１６、（ｉｉ）３２及び３４、（ｉｉｉ）５０及び５２、（ｉｖ）６８及び７０、（ｖ）８６及び８８、（ｖｉ）１０４及び１０６、（ｖｉｉ）１２８及び１３０からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）及び軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、または（Ｃ）（ｉ）次の３つのＶＨ相補性決定領域（ＣＤＲ）、すなわち（ａ）配列番号２、２０、３８、５６、７４、９２、及び１１６からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、（ｂ）配列番号３、２１、３９、５７、７５、９３、及び１１７からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び（ｃ）配列番号４、２２、４０、５８、７６、９４、及び１１８からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３、ならびに、次の３つのＶＬ　ＣＤＲ、すなわち（ａ）配列番号８、２６、４４、６２、８０、９８、及び１２２からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ１、（ｂ）配列番号９、２７、４５、６３、８１、９９、及び１２３からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び（ｃ）配列番号１０、２８、４６、６４、８２、１００、及び１２４からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３、のうちの１つを含む、第１の抗原結合部分を含む、組換え二重特異性抗体に関する。組換え二重特異性抗体は、（Ａ）配列番号１１３に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦＶ、または（Ｂ）重鎖可変ドメイン（ＶＨ）及び軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）であって、該ＶＨ及びＶＬがそれぞれ、配列番号１１１及び１１２、または配列番号１３４及び１３６に記載のアミノ酸配列を含む、

重鎖可変ドメイン（ＶＨ）及び軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む、第２の抗原結合部分をさらに含む。

【００１８】

別の態様では、組換え抗体を含む組成物を投与することを含む、対象において一次Ｔ細胞応答及び二次Ｔ細胞応答を刺激する方法であって、該組換え抗体が、第１の抗原結合部分及び第２の抗原結合部分を含み、該第１の抗原結合部分が、第１の腫瘍抗原に特異的に結合し、該第２の抗原結合部分が、免疫エフェクター細胞表面抗原に特異的に結合し、一次Ｔ細胞応答が、第１の腫瘍抗原に対して細胞傷害性Ｔ細胞を刺激することを含み、二次Ｔ細胞応答が、第１の腫瘍抗原に対して及び／または第２の腫瘍抗原に対して、エフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞を刺激することを含む、方法を提供する。一態様では、二次Ｔ細胞応答は、抗原提示細胞または共刺激分子を必要としない。別の態様では、二次Ｔ細胞応答は、第２の腫瘍抗原に対して、エフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞を刺激することを含む。一態様では、第２の腫瘍抗原は、非ＷＴ１－ＲＭＦ腫瘍抗原である。

【００１９】

さらに別の態様では、本発明は、本明細書に開示される組換え二重特異性抗体を用いてＴ細胞を活性化することを含む、腫瘍抗原に対するエフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞を生成する方法を提供する。エフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞は、インビボまたはエクスビボで生成されてもよい。一態様では、エフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞は、非ＷＴ１－ＲＭＦ腫瘍抗原、例えば、ＨＥＲ２－ｎｅｕに対して生成される。

【００２０】

前述の概要は、本発明のあらゆる態様を定義することを意図せず、本開示の他の特徴及び利点は、図面を含む以下の詳細な説明から明らかとなるであろう。本開示は、統一文書として関連していることを意図し、特徴の組み合わせが、本開示の同じ文章、段落、または節において一緒に見出されない場合でも、本明細書に記載される特徴の全ての組み合わせが企図されることを理解されたい。さらに、本開示は、追加の態様として、本発明の全ての実施形態を、いかなる点においても上で具体的に述べられる変形より狭い範囲で含む。「１つの（ａ）」または「１つの（ａｎ）」と共に記載または特許請求される本開示の態様に関して、これらの用語は、文脈がより制限された意味を明白に必要としない限り、「１つ以上」を意味することを理解されたい。１つの組内の１つ以上として記載される要素に関して、その組内の全ての組み合わせが企図されることを理解されたい。本開示の態様が１つの特徴を「含む」と記載される場合、実施形態は、その特徴「からなる」または「本質的になる」ことも企図する。本開示の追加の特徴及び変形は、本願の全体から当業者には明らかとなり、全てのそのような特徴は、本開示の態様として意図される。

【図面の簡単な説明】

【００２１】

【図１Ａ】フローサイトメトリーによって測定された腫瘍細胞及びヒトＴ細胞へのＥＳＫ二重特異性抗体の一実施形態の選択的結合を示す。ＳＥＴ－２（１Ａ）、ＨＬ－６０（１Ｂ）、または精製されたヒトＣＤ３　Ｔ細胞（１Ｃ）を、１０μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、もしくは０．１μｇ／ｍＬの濃度のＥＳＫ二重特異性抗体または対照、その後にＦＩＴＣに複合されたＨｉｓタグに特異的な二次ｍＡｂで染色した。ＥＳＫ二重特異性抗体は、１０μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、及び０．１μｇ／ｍＬの濃度でＳＥＴ－２細胞への選択的結合を示した。示された濃度での対照二次ｍＡｂ単独及び対照二重特異性抗体は、細胞に結合しなかった。ＥＳＫも対照二重特異性抗体も、試験した全ての濃度でＨＬ－６０に結合しなかった。静止ヒトＴ細胞に対しては、ＥＳＫ二重特異性抗体は、対照二重特異性抗体よりも弱い結合を示した。ＥＳＫ二重特異性抗体のメジアン蛍光強度（ＭＦＩ）は、１０μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、及び０．１μｇ／ｍＬの濃度でそれぞれ９１．４、４１、及び１３．２であった。対照二重特異性抗体の場合、１０μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、及び０．１μｇ／ｍＬの濃度でそれぞれ１８８、１５３、及び２６．２。（１Ｄ）ＥＳＫ

二重特異性抗体は、ＷＴ１＋／ＨＬＡ－Ａ０２０１＋腫瘍細胞の存在下でＩＦＮ－γ分泌を誘導する。ヒトＴ細胞及びＳＥＴ－２細胞を、１５：１の比で、ＥＳＫ二重特異性抗体または対照二重特異性抗体を用いるか、または用いずに、３μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、０．３μｇ／ｍＬ、０．１μｇ／ｍＬ、または０．０３μｇ／ｍＬの濃度で一晩インキュベートした。上清を採取し、ＩＦＮ－γ放出をＥＬＩＳＡキットによって測定した。Ｔ細胞単独、またはＳＥＴ－２細胞を持つＴ細胞＋対照二重特異性抗体の培養物は、いかなる検出可能なＩＦＮ－γも示さなかった。したがって、示されるデータからそれらの値を差し引いた。データは、二重培養物の平均を示し、２つの類似実験のうちの１つを表す。

【図１Ｂ】フローサイトメトリーによって測定された腫瘍細胞及びヒトＴ細胞へのＥＳＫ二重特異性抗体の一実施形態の選択的結合を示す。ＳＥＴ－２（１Ａ）、ＨＬ－６０（１Ｂ）、または精製されたヒトＣＤ３　Ｔ細胞（１Ｃ）を、１０μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、もしくは０．１μｇ／ｍＬの濃度のＥＳＫ二重特異性抗体または対照、その後にＦＩＴＣに複合されたＨｉｓタグに特異的な二次ｍＡｂで染色した。ＥＳＫ二重特異性抗体は、１０μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、及び０．１μｇ／ｍＬの濃度でＳＥＴ－２細胞への選択的結合を示した。示された濃度での対照二次ｍＡｂ単独及び対照二重特異性抗体は、細胞に結合しなかった。ＥＳＫも対照二重特異性抗体も、試験した全ての濃度でＨＬ－６０に結合しなかった。静止ヒトＴ細胞に対しては、ＥＳＫ二重特異性抗体は、対照二重特異性抗体よりも弱い結合を示した。ＥＳＫ二重特異性抗体のメジアン蛍光強度（ＭＦＩ）は、１０μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、及び０．１μｇ／ｍＬの濃度でそれぞれ９１．４、４１、及び１３．２であった。対照二重特異性抗体の場合、１０μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、及び０．１μｇ／ｍＬの濃度でそれぞれ１８８、１５３、及び２６．２。（１Ｄ）ＥＳＫ二重特異性抗体は、ＷＴ１＋／ＨＬＡ－Ａ０２０１＋腫瘍細胞の存在下でＩＦＮ－γ分泌を誘導する。ヒトＴ細胞及びＳＥＴ－２細胞を、１５：１の比で、ＥＳＫ二重特異性抗体または対照二重特異性抗体を用いるか、または用いずに、３μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、０．３μｇ／ｍＬ、０．１μｇ／ｍＬ、または０．０３μｇ／ｍＬの濃度で一晩インキュベートした。上清を採取し、ＩＦＮ－γ放出をＥＬＩＳＡキットによって測定した。Ｔ細胞単独、またはＳＥＴ－２細胞を持つＴ細胞＋対照二重特異性抗体の培養物は、いかなる検出可能なＩＦＮ－γも示さなかった。したがって、示されるデータからそれらの値を差し引いた。データは、二重培養物の平均を示し、２つの類似実験のうちの１つを表す。

【図１Ｃ】フローサイトメトリーによって測定された腫瘍細胞及びヒトＴ細胞へのＥＳＫ二重特異性抗体の一実施形態の選択的結合を示す。ＳＥＴ－２（１Ａ）、ＨＬ－６０（１Ｂ）、または精製されたヒトＣＤ３　Ｔ細胞（１Ｃ）を、１０μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、もしくは０．１μｇ／ｍＬの濃度のＥＳＫ二重特異性抗体または対照、その後にＦＩＴＣに複合されたＨｉｓタグに特異的な二次ｍＡｂで染色した。ＥＳＫ二重特異性抗体は、１０μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、及び０．１μｇ／ｍＬの濃度でＳＥＴ－２細胞への選択的結合を示した。示された濃度での対照二次ｍＡｂ単独及び対照二重特異性抗体は、細胞に結合しなかった。ＥＳＫも対照二重特異性抗体も、試験した全ての濃度でＨＬ－６０に結合しなかった。静止ヒトＴ細胞に対しては、ＥＳＫ二重特異性抗体は、対照二重特異性抗体よりも弱い結合を示した。ＥＳＫ二重特異性抗体のメジアン蛍光強度（ＭＦＩ）は、１０μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、及び０．１μｇ／ｍＬの濃度でそれぞれ９１．４、４１、及び１３．２であった。対照二重特異性抗体の場合、１０μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、及び０．１μｇ／ｍＬの濃度でそれぞれ１８８、１５３、及び２６．２。（１Ｄ）ＥＳＫ二重特異性抗体は、ＷＴ１＋／ＨＬＡ－Ａ０２０１＋腫瘍細胞の存在下でＩＦＮ－γ分泌を誘導する。ヒトＴ細胞及びＳＥＴ－２細胞を、１５：１の比で、ＥＳＫ二重特異性抗体または対照二重特異性抗体を用いるか、または用いずに、３μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、０．３μｇ／ｍＬ、０．１μｇ／ｍＬ、または０．０３μｇ／ｍＬの濃度で一晩インキュベートした。上清を採取し、ＩＦＮ－γ放出をＥＬＩＳＡキットによって測定した。Ｔ細胞単独、またはＳＥＴ－２細胞を持つＴ細胞＋対照二重特異性抗体の培養物は、いかなる検出可能なＩＦＮ－γも示さなかった。したがって、示されるデータからそれらの値を差し引いた。データは、二重培養物の平均を示し、２つの類似実験のうちの１つを表す。

【図１Ｄ】フローサイトメトリーによって測定された腫瘍細胞及びヒトＴ細胞へのＥＳＫ二重特異性抗体の一実施形態の選択的結合を示す。ＳＥＴ－２（１Ａ）、ＨＬ－６０（１Ｂ）、または精製されたヒトＣＤ３　Ｔ細胞（１Ｃ）を、１０μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、もしくは０．１μｇ／ｍＬの濃度のＥＳＫ二重特異性抗体または対照、その後にＦＩＴＣに複合されたＨｉｓタグに特異的な二次ｍＡｂで染色した。ＥＳＫ二重特異性抗体は、１０μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、及び０．１μｇ／ｍＬの濃度でＳＥＴ－２細胞への選択的結合を示した。示された濃度での対照二次ｍＡｂ単独及び対照二重特異性抗体は、細胞に結合しなかった。ＥＳＫも対照二重特異性抗体も、試験した全ての濃度でＨＬ－６０に結合しなかった。静止ヒトＴ細胞に対しては、ＥＳＫ二重特異性抗体は、対照二重特異性抗体よりも弱い結合を示した。ＥＳＫ二重特異性抗体のメジアン蛍光強度（ＭＦＩ）は、１０μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、及び０．１μｇ／ｍＬの濃度でそれぞれ９１．４、４１、及び１３．２であった。対照二重特異性抗体の場合、１０μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、及び０．１μｇ／ｍＬの濃度でそれぞれ１８８、１５３、及び２６．２。（１Ｄ）ＥＳＫ二重特異性抗体は、ＷＴ１＋／ＨＬＡ－Ａ０２０１＋腫瘍細胞の存在下でＩＦＮ－γ分泌を誘導する。ヒトＴ細胞及びＳＥＴ－２細胞を、１５：１の比で、ＥＳＫ二重特異性抗体または対照二重特異性抗体を用いるか、または用いずに、３μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ、０．３μｇ／ｍＬ、０．１μｇ／ｍＬ、または０．０３μｇ／ｍＬの濃度で一晩インキュベートした。上清を採取し、ＩＦＮ－γ放出をＥＬＩＳＡキットによって測定した。Ｔ細胞単独、またはＳＥＴ－２細胞を持つＴ細胞＋対照二重特異性抗体の培養物は、いかなる検出可能なＩＦＮ－γも示さなかった。したがって、示されるデータからそれらの値を差し引いた。データは、二重培養物の平均を示し、２つの類似実験のうちの１つを表す。

【図２Ａ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＷＴ１＋／ＨＬＡ－Ａ０２０１＋腫瘍細胞に対してＴ細胞の細胞傷害活性を向けることを示す。精製されたＴ細胞を、ＳＥＴ－２（２Ａ）またはＨＬ－６０細胞（２Ｂ）と共に、４０：１のＥ：Ｔ比で、示された濃度のＥＳＫまたは対照二重特異性抗体の存在下または不在下でインキュベートした。Ｔ細胞の細胞傷害活性を、^{51}Ｃｒ放出によって、５時間のインキュベーション後に測定した。同様に、患者からのＢＶ１７３（２Ｃ）及びＣＭＬ芽球（２Ｄ）に対する、ＰＢＭＣのＥＳＫにより向けられたＰＢＭＣの細胞傷害活性は、６時間－^{51}Ｃｒ放出アッセイにおいて、１００：１のＥ：Ｔ比で。ＥＢＶ刺激されたヒトＴ細胞によるＥＳＫ二重特異性抗体媒介性細胞傷害活性は、５時間－^{51}Ｃｒ放出アッセイによって、ＢＶ１７３（２Ｅ）、ＪＭＮ（２Ｆ）、及び原発性卵巣癌細胞（２Ｇ）に対して、示されたＥ：Ｔ比で測定した。二重特異性抗体は、０．１μｇ／ｍＬで使用した。全てのデータ点は、三重培養物の平均であり、２つ～３つの類似実験のうちの１つを表す。

【図２Ｂ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＷＴ１＋／ＨＬＡ－Ａ０２０１＋腫瘍細胞に対してＴ細胞の細胞傷害活性を向けることを示す。精製されたＴ細胞を、ＳＥＴ－２（２Ａ）またはＨＬ－６０細胞（２Ｂ）と共に、４０：１のＥ：Ｔ比で、示された濃度のＥＳＫまたは対照二重特異性抗体の存在下または不在下でインキュベートした。Ｔ細胞の細胞傷害活性を、^{51}Ｃｒ放出によって、５時間のインキュベーション後に測定した。同様に、患者からのＢＶ１７３（２Ｃ）及びＣＭＬ芽球（２Ｄ）に対する、ＰＢＭＣのＥＳＫにより向けられたＰＢＭＣの細胞傷害活性は、６時間－^{51}Ｃｒ放出アッセイにおいて、１００：１のＥ：Ｔ比で。ＥＢＶ刺激されたヒトＴ細胞によるＥＳＫ二重特異性抗体媒介性細胞傷害活性は、５時間－^{51}Ｃｒ放出アッセイによって、ＢＶ１７３（２Ｅ）、ＪＭＮ（２Ｆ）、及び原発性卵巣癌細胞（２Ｇ）に対して、示されたＥ：Ｔ比で測定した。二重特異性抗体は、０．１μｇ／ｍＬで使用した。全てのデータ点は、三重培養物の平均であり、２つ～３つの類似実験のうちの１つを表す。

【図２Ｃ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＷＴ１＋／ＨＬＡ－Ａ０２０１＋腫瘍細胞に対してＴ細胞の細胞傷害活性を向けることを示す。精製されたＴ細胞を、ＳＥＴ－２（２Ａ）またはＨＬ－６０細胞（２Ｂ）と共に、４０：１のＥ：Ｔ比で、示された濃度のＥＳＫまたは対照二重特異性抗体の存在下または不在下でインキュベートした。Ｔ細胞の細胞傷害活性を、^{51}Ｃｒ放出によって、５時間のインキュベーション後に測定した。同様に、患者

からのＢＶ１７３（２Ｃ）及びＣＭＬ芽球（２Ｄ）に対する、ＰＢＭＣのＥＳＫにより向けられたＰＢＭＣの細胞傷害活性は、６時間－^{51}Ｃｒ放出アッセイにおいて、１００：１のＥ：Ｔ比で。ＥＢＶ刺激されたヒトＴ細胞によるＥＳＫ二重特異性抗体媒介性細胞傷害活性は、５時間－^{51}Ｃｒ放出アッセイによって、ＢＶ１７３（２Ｅ）、ＪＭＮ（２Ｆ）、及び原発性卵巣癌細胞（２Ｇ）に対して、示されたＥ：Ｔ比で測定した。二重特異性抗体は、０．１μｇ／ｍＬで使用した。全てのデータ点は、三重培養物の平均であり、２つ～３つの類似実験のうちの１つを表す。

【図２Ｄ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＷＴ１＋／ＨＬＡ－Ａ０２０１＋腫瘍細胞に対してＴ細胞の細胞傷害活性を向けることを示す。精製されたＴ細胞を、ＳＥＴ－２（２Ａ）またはＨＬ－６０細胞（２Ｂ）と共に、４０：１のＥ：Ｔ比で、示された濃度のＥＳＫまたは対照二重特異性抗体の存在下または不在下でインキュベートした。Ｔ細胞の細胞傷害活性を、^{51}Ｃｒ放出によって、５時間のインキュベーション後に測定した。同様に、患者からのＢＶ１７３（２Ｃ）及びＣＭＬ芽球（２Ｄ）に対する、ＰＢＭＣのＥＳＫにより向けられたＰＢＭＣの細胞傷害活性は、６時間－^{51}Ｃｒ放出アッセイにおいて、１００：１のＥ：Ｔ比で。ＥＢＶ刺激されたヒトＴ細胞によるＥＳＫ二重特異性抗体媒介性細胞傷害活性は、５時間－^{51}Ｃｒ放出アッセイによって、ＢＶ１７３（２Ｅ）、ＪＭＮ（２Ｆ）、及び原発性卵巣癌細胞（２Ｇ）に対して、示されたＥ：Ｔ比で測定した。二重特異性抗体は、０．１μｇ／ｍＬで使用した。全てのデータ点は、三重培養物の平均であり、２つ～３つの類似実験のうちの１つを表す。

【図２Ｅ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＷＴ１＋／ＨＬＡ－Ａ０２０１＋腫瘍細胞に対してＴ細胞の細胞傷害活性を向けることを示す。精製されたＴ細胞を、ＳＥＴ－２（２Ａ）またはＨＬ－６０細胞（２Ｂ）と共に、４０：１のＥ：Ｔ比で、示された濃度のＥＳＫまたは対照二重特異性抗体の存在下または不在下でインキュベートした。Ｔ細胞の細胞傷害活性を、^{51}Ｃｒ放出によって、５時間のインキュベーション後に測定した。同様に、患者からのＢＶ１７３（２Ｃ）及びＣＭＬ芽球（２Ｄ）に対する、ＰＢＭＣのＥＳＫにより向けられたＰＢＭＣの細胞傷害活性は、６時間－^{51}Ｃｒ放出アッセイにおいて、１００：１のＥ：Ｔ比で。ＥＢＶ刺激されたヒトＴ細胞によるＥＳＫ二重特異性抗体媒介性細胞傷害活性は、５時間－^{51}Ｃｒ放出アッセイによって、ＢＶ１７３（２Ｅ）、ＪＭＮ（２Ｆ）、及び原発性卵巣癌細胞（２Ｇ）に対して、示されたＥ：Ｔ比で測定した。二重特異性抗体は、０．１μｇ／ｍＬで使用した。全てのデータ点は、三重培養物の平均であり、２つ～３つの類似実験のうちの１つを表す。

【図２Ｆ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＷＴ１＋／ＨＬＡ－Ａ０２０１＋腫瘍細胞に対してＴ細胞の細胞傷害活性を向けることを示す。精製されたＴ細胞を、ＳＥＴ－２（２Ａ）またはＨＬ－６０細胞（２Ｂ）と共に、４０：１のＥ：Ｔ比で、示された濃度のＥＳＫまたは対照二重特異性抗体の存在下または不在下でインキュベートした。Ｔ細胞の細胞傷害活性を、^{51}Ｃｒ放出によって、５時間のインキュベーション後に測定した。同様に、患者からのＢＶ１７３（２Ｃ）及びＣＭＬ芽球（２Ｄ）に対する、ＰＢＭＣのＥＳＫにより向けられたＰＢＭＣの細胞傷害活性は、６時間－^{51}Ｃｒ放出アッセイにおいて、１００：１のＥ：Ｔ比で。ＥＢＶ刺激されたヒトＴ細胞によるＥＳＫ二重特異性抗体媒介性細胞傷害活性は、５時間－^{51}Ｃｒ放出アッセイによって、ＢＶ１７３（２Ｅ）、ＪＭＮ（２Ｆ）、及び原発性卵巣癌細胞（２Ｇ）に対して、示されたＥ：Ｔ比で測定した。二重特異性抗体は、０．１μｇ／ｍＬで使用した。全てのデータ点は、三重培養物の平均であり、２つ～３つの類似実験のうちの１つを表す。

【図２Ｇ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＷＴ１＋／ＨＬＡ－Ａ０２０１＋腫瘍細胞に対してＴ細胞の細胞傷害活性を向けることを示す。精製されたＴ細胞を、ＳＥＴ－２（２Ａ）またはＨＬ－６０細胞（２Ｂ）と共に、４０：１のＥ：Ｔ比で、示された濃度のＥＳＫまたは対照二重特異性抗体の存在下または不在下でインキュベートした。Ｔ細胞の細胞傷害活性を、^{51}Ｃｒ放出によって、５時間のインキュベーション後に測定した。同様に、患者からのＢＶ１７３（２Ｃ）及びＣＭＬ芽球（２Ｄ）に対する、ＰＢＭＣのＥＳＫにより向けられたＰＢＭＣの細胞傷害活性は、６時間－^{51}Ｃｒ放出アッセイにおいて、１００：

１のＥ：Ｔ比で。ＥＢＶ刺激されたヒトＴ細胞によるＥＳＫ二重特異性抗体媒介性細胞傷害活性は、５時間－^{51}Ｃｒ放出アッセイによって、ＢＶ１７３（２Ｅ）、ＪＭＮ（２Ｆ）、及び原発性卵巣癌細胞（２Ｇ）に対して、示されたＥ：Ｔ比で測定した。二重特異性抗体は、０．１μｇ／ｍＬで使用した。全てのデータ点は、三重培養物の平均であり、２つ～３つの類似実験のうちの１つを表す。

【図３Ａ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、自己卵巣癌細胞の存在下でＴ細胞の活性化を誘導することを示す。１ウェルあたり示された数の患者からのＰＢＭＣを、０．１μｇ／ｍＬのＥＳＫまたは対照二重特異性抗体の存在下で最初の３日間、自己の照射卵巣癌細胞と共にインキュベートした。（３Ａ）細胞を全７日間培養し、８日目に、^{51}Ｃｒ標識された自己腫瘍細胞を、エフェクター細胞に１ウェルあたり１０００細胞で添加した。^{51}Ｃｒ放出を６時間後に測定した。（３Ｂ）ＰＢＭＣ、自己卵巣癌細胞、またはＰＢＭＣ＋卵巣癌細胞を、ＥＳＫまたは対照二重特異性抗体を用いるか、または用いずに０．１μｇ／ｍＬで７日間インキュベートした。^{3}Ｈ－チミジンを一晩添加し、細胞を翌日採取した。データは、三重培養物を表す。

【図３Ｂ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、自己卵巣癌細胞の存在下でＴ細胞の活性化を誘導することを示す。１ウェルあたり示された数の患者からのＰＢＭＣを、０．１μｇ／ｍＬのＥＳＫまたは対照二重特異性抗体の存在下で最初の３日間、自己の照射卵巣癌細胞と共にインキュベートした。（３Ａ）細胞を全７日間培養し、８日目に、^{51}Ｃｒ標識された自己腫瘍細胞を、エフェクター細胞に１ウェルあたり１０００細胞で添加した。^{51}Ｃｒ放出を６時間後に測定した。（３Ｂ）ＰＢＭＣ、自己卵巣癌細胞、またはＰＢＭＣ＋卵巣癌細胞を、ＥＳＫまたは対照二重特異性抗体を用いるか、または用いずに０．１μｇ／ｍＬで７日間インキュベートした。^{3}Ｈ－チミジンを一晩添加し、細胞を翌日採取した。データは、三重培養物を表す。

【図４Ａ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＮＳＧマウスにおいてＢＶ１７３及びＡＬＬを効果的に治療することを示す。２００万個のＢＶ１７３細胞を、０日目にマウスに静脈内注入し、腫瘍生着を５日目に確認し、マウスを治療群に無作為に分けた。１０００万個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞を、６日目に静脈内付与し、続いて２０μｇのＥＳＫ１または対照二重特異性抗体を、４～５時間後に静脈内注入した。Ｔ細胞を週１回付与し、二重特異性抗体を週２回、全３週間にわたって付与した。（４Ａ）腫瘍量は、生物発光画像解析（ＢＬＩ）によってマウスの前面から示された。６日目のＢＬＩは、治療前の腫瘍生着を示した。Ｔ細胞及びＥＳＫ二重特異性抗体を受けたマウスは、特に骨髄において腫瘍量の著しい低減を示した。（４Ｂ）腫瘍量は、後位及び前位の２位置における各マウスの発光シグナルを合計することによって計算し、各群（ｎ＝５）の平均シグナルをプロットした。（４Ｃ）マウスを毎週計量することによってＧＶＨＤを評価したところ、ＧＶＨＤは最大４９日間観察されなかった。（４Ｄ）ＥＳＫ二重特異性抗体は、ＮＳＧマウスにおいて原発性ＡＬＬ細胞増殖を阻害した。５００万個の原発性腫瘍ＡＬＬ細胞を、ＮＳＧマウスに静脈内注入した。６日目に、ホタルＢＬＩによって腫瘍生着を確認した後、マウスを異なる治療群に無作為に分けた。３０００万個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞を、マウスに静脈内注入し、続いて２０μｇのＥＳＫ二重特異性抗体またはその対照二重特異性抗体を静脈内注入した。二重特異性抗体注入を毎日付与し、Ｔ細胞を週２回、全２週間にわたって付与した。腫瘍播種後１８日目及び２３日目の腫瘍阻害は、各時点の平伏及び仰臥図において示される。（４Ｅ）ＡＬＬマウスモデルからのデータ：５匹のマウスからの１秒あたりの平均光子は、ＥＳＫ二重特異性抗体で治療したマウスにおいて、３週間を超えた後に腫瘍量のほぼ百倍の低減を示した。

【図４Ｂ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＮＳＧマウスにおいてＢＶ１７３及びＡＬＬを効果的に治療することを示す。２００万個のＢＶ１７３細胞を、０日目にマウスに静脈内注入し、腫瘍生着を５日目に確認し、マウスを治療群に無作為に分けた。１０００万個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞を、６日目に静脈内付与し、続いて２０μｇのＥＳＫ１または対照二重特異性抗体を、４～５時間後に静脈内注入した。Ｔ細胞を週１回付与し、二重特異性抗体を週２回、全３週間にわたって付与した。（４Ａ）腫瘍量は、生物発光画像解析（ＢＬＩ）

によってマウスの前面から示された。６日目のＢＬＩは、治療前の腫瘍生着を示した。Ｔ細胞及びＥＳＫ二重特異性抗体を受けたマウスは、特に骨髄において腫瘍量の著しい低減を示した。（４Ｂ）腫瘍量は、後位及び前位の２位置における各マウスの発光シグナルを合計することによって計算し、各群（ｎ＝５）の平均シグナルをプロットした。（４Ｃ）マウスを毎週計量することによってＧＶＨＤを評価したところ、ＧＶＨＤは最大４９日間観察されなかった。（４Ｄ）ＥＳＫ二重特異性抗体は、ＮＳＧマウスにおいて原発性ＡＬＬ細胞増殖を阻害した。５００万個の原発性腫瘍ＡＬＬ細胞を、ＮＳＧマウスに静脈内注入した。６日目に、ホタルＢＬＩによって腫瘍生着を確認した後、マウスを異なる治療群に無作為に分けた。３０００万個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞を、マウスに静脈内注入し、続いて２０μｇのＥＳＫ二重特異性抗体またはその対照二重特異性抗体を静脈内注入した。二重特異性抗体注入を毎日付与し、Ｔ細胞を週２回、全２週間にわたって付与した。腫瘍播種後１８日目及び２３日目の腫瘍阻害は、各時点の平伏及び仰臥図において示される。（４Ｅ）ＡＬＬマウスモデルからのデータ：５匹のマウスからの１秒あたりの平均光子は、ＥＳＫ二重特異性抗体で治療したマウスにおいて、３週間を超えた後に腫瘍量のほぼ百倍の低減を示した。

【図４Ｃ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＮＳＧマウスにおいてＢＶ１７３及びＡＬＬを効果的に治療することを示す。２００万個のＢＶ１７３細胞を、０日目にマウスに静脈内注入し、腫瘍生着を５日目に確認し、マウスを治療群に無作為に分けた。１０００万個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞を、６日目に静脈内付与し、続いて２０μｇのＥＳＫ１または対照二重特異性抗体を、４～５時間後に静脈内注入した。Ｔ細胞を週１回付与し、二重特異性抗体を週２回、全３週間にわたって付与した。（４Ａ）腫瘍量は、生物発光画像解析（ＢＬＩ）によってマウスの前面から示された。６日目のＢＬＩは、治療前の腫瘍生着を示した。Ｔ細胞及びＥＳＫ二重特異性抗体を受けたマウスは、特に骨髄において腫瘍量の著しい低減を示した。（４Ｂ）腫瘍量は、後位及び前位の２位置における各マウスの発光シグナルを合計することによって計算し、各群（ｎ＝５）の平均シグナルをプロットした。（４Ｃ）マウスを毎週計量することによってＧＶＨＤを評価したところ、ＧＶＨＤは最大４９日間観察されなかった。（４Ｄ）ＥＳＫ二重特異性抗体は、ＮＳＧマウスにおいて原発性ＡＬＬ細胞増殖を阻害した。５００万個の原発性腫瘍ＡＬＬ細胞を、ＮＳＧマウスに静脈内注入した。６日目に、ホタルＢＬＩによって腫瘍生着を確認した後、マウスを異なる治療群に無作為に分けた。３０００万個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞を、マウスに静脈内注入し、続いて２０μｇのＥＳＫ二重特異性抗体またはその対照二重特異性抗体を静脈内注入した。二重特異性抗体注入を毎日付与し、Ｔ細胞を週２回、全２週間にわたって付与した。腫瘍播種後１８日目及び２３日目の腫瘍阻害は、各時点の平伏及び仰臥図において示される。（４Ｅ）ＡＬＬマウスモデルからのデータ：５匹のマウスからの１秒あたりの平均光子は、ＥＳＫ二重特異性抗体で治療したマウスにおいて、３週間を超えた後に腫瘍量のほぼ百倍の低減を示した。

【図４Ｄ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＮＳＧマウスにおいてＢＶ１７３及びＡＬＬを効果的に治療することを示す。２００万個のＢＶ１７３細胞を、０日目にマウスに静脈内注入し、腫瘍生着を５日目に確認し、マウスを治療群に無作為に分けた。１０００万個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞を、６日目に静脈内付与し、続いて２０μｇのＥＳＫ１または対照二重特異性抗体を、４～５時間後に静脈内注入した。Ｔ細胞を週１回付与し、二重特異性抗体を週２回、全３週間にわたって付与した。（４Ａ）腫瘍量は、生物発光画像解析（ＢＬＩ）によってマウスの前面から示された。６日目のＢＬＩは、治療前の腫瘍生着を示した。Ｔ細胞及びＥＳＫ二重特異性抗体を受けたマウスは、特に骨髄において腫瘍量の著しい低減を示した。（４Ｂ）腫瘍量は、後位及び前位の２位置における各マウスの発光シグナルを合計することによって計算し、各群（ｎ＝５）の平均シグナルをプロットした。（４Ｃ）マウスを毎週計量することによってＧＶＨＤを評価したところ、ＧＶＨＤは最大４９日間観察されなかった。（４Ｄ）ＥＳＫ二重特異性抗体は、ＮＳＧマウスにおいて原発性ＡＬＬ細胞増殖を阻害した。５００万個の原発性腫瘍ＡＬＬ細胞を、ＮＳＧマウスに静脈内注入した。６日目に、ホタルＢＬＩによって腫瘍生着を確認した後、マウスを異なる治療群

に無作為に分けた。３０００万個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞を、マウスに静脈内注入し、続いて２０μｇのＥＳＫ二重特異性抗体またはその対照二重特異性抗体を静脈内注入した。二重特異性抗体注入を毎日付与し、Ｔ細胞を週２回、全２週間にわたって付与した。腫瘍播種後１８日目及び２３日目の腫瘍阻害は、各時点の平伏及び仰臥図において示される。（４Ｅ）ＡＬＬマウスモデルからのデータ：５匹のマウスからの１秒あたりの平均光子は、ＥＳＫ二重特異性抗体で治療したマウスにおいて、３週間を超えた後に腫瘍量のほぼ百倍の低減を示した。

【図４Ｅ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＮＳＧマウスにおいてＢＶ１７３及びＡＬＬを効果的に治療することを示す。２００万個のＢＶ１７３細胞を、０日目にマウスに静脈内注入し、腫瘍生着を５日目に確認し、マウスを治療群に無作為に分けた。１０００万個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞を、６日目に静脈内付与し、続いて２０μｇのＥＳＫ１または対照二重特異性抗体を、４～５時間後に静脈内注入した。Ｔ細胞を週１回付与し、二重特異性抗体を週２回、全３週間にわたって付与した。（４Ａ）腫瘍量は、生物発光画像解析（ＢＬＩ）によってマウスの前面から示された。６日目のＢＬＩは、治療前の腫瘍生着を示した。Ｔ細胞及びＥＳＫ二重特異性抗体を受けたマウスは、特に骨髄において腫瘍量の著しい低減を示した。（４Ｂ）腫瘍量は、後位及び前位の２位置における各マウスの発光シグナルを合計することによって計算し、各群（ｎ＝５）の平均シグナルをプロットした。（４Ｃ）マウスを毎週計量することによってＧＶＨＤを評価したところ、ＧＶＨＤは最大４９日間観察されなかった。（４Ｄ）ＥＳＫ二重特異性抗体は、ＮＳＧマウスにおいて原発性ＡＬＬ細胞増殖を阻害した。５００万個の原発性腫瘍ＡＬＬ細胞を、ＮＳＧマウスに静脈内注入した。６日目に、ホタルＢＬＩによって腫瘍生着を確認した後、マウスを異なる治療群に無作為に分けた。３０００万個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞を、マウスに静脈内注入し、続いて２０μｇのＥＳＫ二重特異性抗体またはその対照二重特異性抗体を静脈内注入した。二重特異性抗体注入を毎日付与し、Ｔ細胞を週２回、全２週間にわたって付与した。腫瘍播種後１８日目及び２３日目の腫瘍阻害は、各時点の平伏及び仰臥図において示される。（４Ｅ）ＡＬＬマウスモデルからのデータ：５匹のマウスからの１秒あたりの平均光子は、ＥＳＫ二重特異性抗体で治療したマウスにおいて、３週間を超えた後に腫瘍量のほぼ百倍の低減を示した。

【図５Ａ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＮＳＧマウスにおいてＳＥＴ－２　ＡＭＬを有効に治療することを示す。このモデルにおいて、１０００万個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞を、週２回静脈内付与し、２０μｇ二重特異性抗体を、４日目に腫瘍生着を確認した後、毎日、全６日間にわたって静脈内注入した。（５Ａ）全郡の白血病量を示すために、脊髄性白血病の浸潤を示すようにマウスの背面からの腫瘍量を示した。ＢＬＩスケールは、７日目以降から画像上で約１０倍増加した。（５Ｂ）腫瘍量は、後位及び前位の２位置における各マウスの発光シグナルを合計することによって計算し、各群（ｎ＝５）の平均シグナルをプロットした。（５Ｃ）白血病浸潤は、中枢神経系の損傷によって引き起こされた四肢麻痺によっても評価した。Ｔ細胞及びＥＳＫ二重特異性抗体を受けたマウスは、ＣＮＳ麻痺を示さなかった。各バーは、１群あたり５匹のマウスの平均を示す。

【図５Ｂ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＮＳＧマウスにおいてＳＥＴ－２　ＡＭＬを有効に治療することを示す。このモデルにおいて、１０００万個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞を、週２回静脈内付与し、２０μｇ二重特異性抗体を、４日目に腫瘍生着を確認した後、毎日、全６日間にわたって静脈内注入した。（５Ａ）全郡の白血病量を示すために、脊髄性白血病の浸潤を示すようにマウスの背面からの腫瘍量を示した。ＢＬＩスケールは、７日目以降から画像上で約１０倍増加した。（５Ｂ）腫瘍量は、後位及び前位の２位置における各マウスの発光シグナルを合計することによって計算し、各群（ｎ＝５）の平均シグナルをプロットした。（５Ｃ）白血病浸潤は、中枢神経系の損傷によって引き起こされた四肢麻痺によっても評価した。Ｔ細胞及びＥＳＫ二重特異性抗体を受けたマウスは、ＣＮＳ麻痺を示さなかった。各バーは、１群あたり５匹のマウスの平均を示す。

【図５Ｃ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＮＳＧマウスにおいてＳＥＴ－２　ＡＭＬを有効に治療することを示す。このモデルにおいて、１０００万個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞を、週２

回静脈内付与し、２０μｇ二重特異性抗体を、４日目に腫瘍生着を確認した後、毎日、全６日間にわたって静脈内注入した。（５Ａ）全郡の白血病量を示すために、脊髄性白血病の浸潤を示すようにマウスの背面からの腫瘍量を示した。ＢＬＩスケールは、７日目以降から画像上で約１０倍増加した。（５Ｂ）腫瘍量は、後位及び前位の２位置における各マウスの発光シグナルを合計することによって計算し、各群（ｎ＝５）の平均シグナルをプロットした。（５Ｃ）白血病浸潤は、中枢神経系の損傷によって引き起こされた四肢麻痺によっても評価した。Ｔ細胞及びＥＳＫ二重特異性抗体を受けたマウスは、ＣＮＳ麻痺を示さなかった。各バーは、１群あたり５匹のマウスの平均を示す。

【図６Ａ】ＥＳＫ二重特異性抗体は、腫瘍担持マウスの骨髄中のＴ細胞保持を媒介する。（６Ａ）２０００万個のウミシイタケ導入ＥＢＶ特異性Ｔ細胞を、ＳＥＴ－２細胞で生着されたマウスに静脈内注入した。４時間後、２０μｇのＥＳＫまたは対照二重特異性抗体を、静脈内注入によって付与した。Ｔ細胞分布を、Ｔ細胞注入直後（０時間）、二重特異性抗体注入後４時間、次いで毎日全３日間にわたって、ウミシイタケ生物発光画像解析によって監視した。（６Ｂ）Ｔ細胞シグナルは、各マウスの発光シグナルを合計することによって計算し、各群（ｎ＝３）の平均シグナルをプロットした。（６Ｃ）ＳＥＴ－２白血病量を、ホタル生物発光画像解析によって、示された時点で同時に監視した。Ｔ細胞単独を受けたマウスは、ホタルシグナルを示さなかった。Ｔ細胞及びＥＳＫ二重特異性抗体を受けたマウスは、ＳＥＴ－２細胞を受けたマウスと比較して、白血病量の劇的な低減を示した。腫瘍阻害は、図７Ｂに示されるように、Ｔ細胞保持と相関していた。

【図６Ｂ】ＥＳＫ二重特異性抗体は、腫瘍担持マウスの骨髄中のＴ細胞保持を媒介する。（６Ａ）２０００万個のウミシイタケ導入ＥＢＶ特異性Ｔ細胞を、ＳＥＴ－２細胞で生着されたマウスに静脈内注入した。４時間後、２０μｇのＥＳＫまたは対照二重特異性抗体を、静脈内注入によって付与した。Ｔ細胞分布を、Ｔ細胞注入直後（０時間）、二重特異性抗体注入後４時間、次いで毎日全３日間にわたって、ウミシイタケ生物発光画像解析によって監視した。（６Ｂ）Ｔ細胞シグナルは、各マウスの発光シグナルを合計することによって計算し、各群（ｎ＝３）の平均シグナルをプロットした。（６Ｃ）ＳＥＴ－２白血病量を、ホタル生物発光画像解析によって、示された時点で同時に監視した。Ｔ細胞単独を受けたマウスは、ホタルシグナルを示さなかった。Ｔ細胞及びＥＳＫ二重特異性抗体を受けたマウスは、ＳＥＴ－２細胞を受けたマウスと比較して、白血病量の劇的な低減を示した。腫瘍阻害は、図７Ｂに示されるように、Ｔ細胞保持と相関していた。

【図６Ｃ】ＥＳＫ二重特異性抗体は、腫瘍担持マウスの骨髄中のＴ細胞保持を媒介する。（６Ａ）２０００万個のウミシイタケ導入ＥＢＶ特異性Ｔ細胞を、ＳＥＴ－２細胞で生着されたマウスに静脈内注入した。４時間後、２０μｇのＥＳＫまたは対照二重特異性抗体を、静脈内注入によって付与した。Ｔ細胞分布を、Ｔ細胞注入直後（０時間）、二重特異性抗体注入後４時間、次いで毎日全３日間にわたって、ウミシイタケ生物発光画像解析によって監視した。（６Ｂ）Ｔ細胞シグナルは、各マウスの発光シグナルを合計することによって計算し、各群（ｎ＝３）の平均シグナルをプロットした。（６Ｃ）ＳＥＴ－２白血病量を、ホタル生物発光画像解析によって、示された時点で同時に監視した。Ｔ細胞単独を受けたマウスは、ホタルシグナルを示さなかった。Ｔ細胞及びＥＳＫ二重特異性抗体を受けたマウスは、ＳＥＴ－２細胞を受けたマウスと比較して、白血病量の劇的な低減を示した。腫瘍阻害は、図７Ｂに示されるように、Ｔ細胞保持と相関していた。

【図７Ａ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＮＳＧマウスにおいて腹膜中皮腫細胞ＪＭＮを排除することを示す。３０００個のＪＭＮ細胞を、６０００個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞と混合し、マウスに腹腔内注入した。１時間後、ＥＳＫまたは対照二重特異性抗体を、静脈内注入し、５日間連続して繰り返した。腫瘍発達を、ホタル生物発光画像解析によって、示された時点で監視した。（７Ａ）１日目（治療後１日）は、ＥＳＫ二重特異性抗体で治療されたマウスにおいて眼に見える腫瘍を示さず、腫瘍細胞の排除を示唆している。（７Ｂ）５匹のマウスからの１秒あたりの平均光子は、ＥＳＫ二重特異性抗体で治療したマウスにおいて、３週間を超えた後に腫瘍量のほぼ百倍の低減を示した。

【図７Ｂ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＮＳＧマウスにおいて腹膜中皮腫細胞ＪＭＮを排除

することを示す。３０００個のＪＭＮ細胞を、６０００個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞と混合し、マウスに腹腔内注入した。１時間後、ＥＳＫまたは対照二重特異性抗体を、静脈内注入し、５日間連続して繰り返した。腫瘍発達を、ホタル生物発光画像解析によって、示された時点で監視した。（７Ａ）１日目（治療後１日）は、ＥＳＫ二重特異性抗体で治療されたマウスにおいて眼に見える腫瘍を示さず、腫瘍細胞の排除を示唆している。（７Ｂ）５匹のマウスからの１秒あたりの平均光子は、ＥＳＫ二重特異性抗体で治療したマウスにおいて、３週間を超えた後に腫瘍量のほぼ百倍の低減を示した。

【図８】ＥＳＫ１－Ｌ２Ｋ二重特異性抗体の、ＥＴ９０１＋Ｌ２Ｋ二重特異性抗体及びＥＴ９０１＋ＯＫＴ３二重特異性抗体との結合を比較する、ＦＡＣＳ結合分析の結果を示す。

【図９】ＥＳＫ１－Ｌ２Ｋ二重特異性抗体の、ＥＴ９０１＋Ｌ２Ｋ二重特異性抗体及びＥＴ９０１＋ＯＫＴ３二重特異性抗体との結合を比較する、ＦＡＣＳ結合分析の結果を示す。

【図１０】ＷＴ１／ＨＬＡ－Ａ２に特異的に結合するｓｃＦｖと、Ｃｄ３に特異的に結合するｓｃＦｖとを含む、二重特異性抗体の実施形態のアミノ酸配列（配列番号１１０）を示す。

【図１１Ａ】１１Ａは、１）ＥＳＫ１／ＯＫＴ３（２μｇ、低減）、２）９０１／ＯＫＴ３（２μｇ、低減）、３）ＳｅｅＢｌｕｅ　Ｐｌｕｓ染色済み標準物質、４）ＥＳＫ１／ＯＫＴ３（２μｇ、非低減）、５）９０１／ＯＫＴ３（２μｇ、非低減）のＰＡＧＥである。１１Ｂは、標準を示す。

【図１１Ｂ】１１Ａは、１）ＥＳＫ１／ＯＫＴ３（２μｇ、低減）、２）９０１／ＯＫＴ３（２μｇ、低減）、３）ＳｅｅＢｌｕｅ　Ｐｌｕｓ染色済み標準物質、４）ＥＳＫ１／ＯＫＴ３（２μｇ、非低減）、５）９０１／ＯＫＴ３（２μｇ、非低減）のＰＡＧＥである。１１Ｂは、標準を示す。

【図１２】ＷＴ１／ＨＬＡ－Ａ２複合体に対するＥＳＫ１二重特異性モノクローナル抗体の会合及び解離を示す。

【図１３Ａ】ＥＳＫ１／ＯＫＴ３二重特異性モノクローナル抗体（１３Ａ）ならびにＥＳＫ１及びＯＫＴ３の混合物（１３Ｂ）のカチオン交換クロマトグラフィーによる精製の結果を示す。

【図１３Ｂ】ＥＳＫ１／ＯＫＴ３二重特異性モノクローナル抗体（１３Ａ）ならびにＥＳＫ１及びＯＫＴ３の混合物（１３Ｂ）のカチオン交換クロマトグラフィーによる精製の結果を示す。

【図１４Ａ】ＥＴ９０１／ＯＫＴ３二重特異性モノクローナル抗体（１４Ａ）ならびに９０１及びＯＫＴ３の混合物（１４Ｂ）のカチオン交換クロマトグラフィーによる精製の結果を示す。

【図１４Ｂ】ＥＴ９０１／ＯＫＴ３二重特異性モノクローナル抗体（１４Ａ）ならびに９０１及びＯＫＴ３の混合物（１４Ｂ）のカチオン交換クロマトグラフィーによる精製の結果を示す。

【図１５】ＦＡＣＳによるＣＤ３陽性Ｊｕｒｋａｔ細胞との結合を示す。

【図１６Ａ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、自己設定においてＴ細胞の活性化を誘導することを示す。ＡＭＬ（再発前）のＨＬＡ－Ａ２＋患者からのＰＢＭＣを、２０μｇ／ｍＬのＥＳＫまたは対照二重特異性抗体の存在下または不在下で、精製された自己ＣＤ３３＋骨髄性芽球（再発後）で共培養し、細胞を採取し、３日目及び４日目に、芽球の場合はＣＤ３３（１６Ｂ）及びＴ細胞の場合はＣＤ３（１６Ａ）で二重染色して、ＣＤ３　Ｔ細胞及び芽球の割合を評価した。ＣＤ３＋（１６Ｃ）及びＣＤ３３＋（１６Ｄ）培養物からの生細胞を、トリパンブルーによってカウントし、各集団×全細胞数の割合を掛けることによって絶体細胞数を得た。

【図１６Ｂ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、自己設定においてＴ細胞の活性化を誘導することを示す。ＡＭＬ（再発前）のＨＬＡ－Ａ２＋患者からのＰＢＭＣを、２０μｇ／ｍＬのＥＳＫまたは対照二重特異性抗体の存在下または不在下で、精製された自己ＣＤ３３＋骨髄

性芽球（再発後）で共培養し、細胞を採取し、３日目及び４日目に、芽球の場合はＣＤ３３（１６Ｂ）及びＴ細胞の場合はＣＤ３（１６Ａ）で二重染色して、ＣＤ３　Ｔ細胞及び芽球の割合を評価した。ＣＤ３＋（１６Ｃ）及びＣＤ３３＋（１６Ｄ）培養物からの生細胞を、トリパンブルーによってカウントし、各集団×全細胞数の割合を掛けることによって絶体細胞数を得た。

【図１６Ｃ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、自己設定においてＴ細胞の活性化を誘導することを示す。ＡＭＬ（再発前）のＨＬＡ－Ａ２＋患者からのＰＢＭＣを、２０μｇ／ｍＬのＥＳＫまたは対照二重特異性抗体の存在下または不在下で、精製された自己ＣＤ３３＋骨髄性芽球（再発後）で共培養し、細胞を採取し、３日目及び４日目に、芽球の場合はＣＤ３３（１６Ｂ）及びＴ細胞の場合はＣＤ３（１６Ａ）で二重染色して、ＣＤ３　Ｔ細胞及び芽球の割合を評価した。ＣＤ３＋（１６Ｃ）及びＣＤ３３＋（１６Ｄ）培養物からの生細胞を、トリパンブルーによってカウントし、各集団×全細胞数の割合を掛けることによって絶体細胞数を得た。

【図１６Ｄ】ＥＳＫ二重特異性抗体が、自己設定においてＴ細胞の活性化を誘導することを示す。ＡＭＬ（再発前）のＨＬＡ－Ａ２＋患者からのＰＢＭＣを、２０μｇ／ｍＬのＥＳＫまたは対照二重特異性抗体の存在下または不在下で、精製された自己ＣＤ３３＋骨髄性芽球（再発後）で共培養し、細胞を採取し、３日目及び４日目に、芽球の場合はＣＤ３３（１６Ｂ）及びＴ細胞の場合はＣＤ３（１６Ａ）で二重染色して、ＣＤ３　Ｔ細胞及び芽球の割合を評価した。ＣＤ３＋（１６Ｃ）及びＣＤ３３＋（１６Ｄ）培養物からの生細胞を、トリパンブルーによってカウントし、各集団×全細胞数の割合を掛けることによって絶体細胞数を得た。

【図１７Ａ】ＥＳＫ二重特異性抗体の薬物動態を示す。データは、１群あたり３匹のマウスの平均を表す。（１７Ａ）ＥＳＫ二重特異性抗体の薬物動態は、Ｃ５７　ＢＬ６／Ｊに静脈内、またはＢＡＬＢ／ｃマウスに腹腔内のいずれかで注入したトレース^{125}Ｉ標識構築物を使用して決定し、血液放射活性を４８～５２時間にわたって測定した。静脈内注入された二重特異性抗体は、３０分のα半減期で血液から組織へ速やかに再分布し、続いて５時間のβ半減期でクリアランスした。腹腔内送達後に、二重特異性抗体レベルは血中で増加し、注入後３時間でピークに達した。次に、構築物を同じβ半減期でクリアランスした。静脈内注入からの全曝露（曲線下面積）は、腹腔内注入を用いる場合よりも大きかった。（１７Ｂ）同じ放射標識構築物を使用して、抗体の体内分布パターンを決定した。２時間後、脱ハロゲンヨウ素をクリアランスする胃及び腸管以外の主要組織内で、１グラムあたり３％以下の注入用量が検出された。４時間後、胃以外の主要組織内で１グラムあたり２％以下の注入用量が検出された。７時間後、胃以外の主要組織内で１グラムあたり１％以下の注入用量が検出された。

【図１７Ｂ】ＥＳＫ二重特異性抗体の薬物動態を示す。データは、１群あたり３匹のマウスの平均を表す。（１７Ａ）ＥＳＫ二重特異性抗体の薬物動態は、Ｃ５７　ＢＬ６／Ｊに静脈内、またはＢＡＬＢ／ｃマウスに腹腔内のいずれかで注入したトレース^{125}Ｉ標識構築物を使用して決定し、血液放射活性を４８～５２時間にわたって測定した。静脈内注入された二重特異性抗体は、３０分のα半減期で血液から組織へ速やかに再分布し、続いて５時間のβ半減期でクリアランスした。腹腔内送達後に、二重特異性抗体レベルは血中で増加し、注入後３時間でピークに達した。次に、構築物を同じβ半減期でクリアランスした。静脈内注入からの全曝露（曲線下面積）は、腹腔内注入を用いる場合よりも大きかった。（１７Ｂ）同じ放射標識構築物を使用して、抗体の体内分布パターンを決定した。２時間後、脱ハロゲンヨウ素をクリアランスする胃及び腸管以外の主要組織内で、１グラムあたり３％以下の注入用量が検出された。４時間後、胃以外の主要組織内で１グラムあたり２％以下の注入用量が検出された。７時間後、胃以外の主要組織内で１グラムあたり１％以下の注入用量が検出された。

【図１８Ａ】原発性卵巣癌細胞上の腫瘍抗原の発現を示す。（１８Ａ）原発性卵巣癌細胞上のＨＬＡ－Ａ２の発現は、腫瘍細胞を、ＦＩＴＣ及びそのアイソタイプ対照マウスＩｇＧ２ｂ／ＦＩＴＣに複合された抗ヒトＨＬＡ－Ａ２　ｍＡｂクローンＢＢ７．２で染色す

ることによって測定した。（１８Ｂ）同じ腫瘍細胞上のＷＴ１　ＲＭＦ／ＨＬＡ－Ａ２複合体の発現は、細胞を、３μｇ／ｍＬのＡＰＣ及びそのアイソタイプ対照、ヒトＩｇＧ１／ＡＰＣに複合されたｍＡｂ　ＥＳＫで染色することによって測定した。（１８Ｃ）同じ腫瘍細胞上のＨｅｒ２－ｎｅｕ発現は、細胞を、１０μｇ／ｍＬまたは１μｇ／ｍＬのヘルセプチン、続いてＦＩＴＣに複合されたヤギ抗ヒトＩｇＧ１　ｍＡｂで染色することによって測定した。リツキシマブを、アイソタイプ対照として使用した。

【図１８Ｂ】原発性卵巣癌細胞上の腫瘍抗原の発現を示す。（１８Ａ）原発性卵巣癌細胞上のＨＬＡ－Ａ２の発現は、腫瘍細胞を、ＦＩＴＣ及びそのアイソタイプ対照マウスＩｇＧ２ｂ／ＦＩＴＣに複合された抗ヒトＨＬＡ－Ａ２　ｍＡｂクローンＢＢ７．２で染色することによって測定した。（１８Ｂ）同じ腫瘍細胞上のＷＴ１　ＲＭＦ／ＨＬＡ－Ａ２複合体の発現は、細胞を、３μｇ／ｍＬのＡＰＣ及びそのアイソタイプ対照、ヒトＩｇＧ１／ＡＰＣに複合されたｍＡｂ　ＥＳＫで染色することによって測定した。（１８Ｃ）同じ腫瘍細胞上のＨｅｒ２－ｎｅｕ発現は、細胞を、１０μｇ／ｍＬまたは１μｇ／ｍＬのヘルセプチン、続いてＦＩＴＣに複合されたヤギ抗ヒトＩｇＧ１　ｍＡｂで染色することによって測定した。リツキシマブを、アイソタイプ対照として使用した。

【図１８Ｃ】原発性卵巣癌細胞上の腫瘍抗原の発現を示す。（１８Ａ）原発性卵巣癌細胞上のＨＬＡ－Ａ２の発現は、腫瘍細胞を、ＦＩＴＣ及びそのアイソタイプ対照マウスＩｇＧ２ｂ／ＦＩＴＣに複合された抗ヒトＨＬＡ－Ａ２　ｍＡｂクローンＢＢ７．２で染色することによって測定した。（１８Ｂ）同じ腫瘍細胞上のＷＴ１　ＲＭＦ／ＨＬＡ－Ａ２複合体の発現は、細胞を、３μｇ／ｍＬのＡＰＣ及びそのアイソタイプ対照、ヒトＩｇＧ１／ＡＰＣに複合されたｍＡｂ　ＥＳＫで染色することによって測定した。（１８Ｃ）同じ腫瘍細胞上のＨｅｒ２－ｎｅｕ発現は、細胞を、１０μｇ／ｍＬまたは１μｇ／ｍＬのヘルセプチン、続いてＦＩＴＣに複合されたヤギ抗ヒトＩｇＧ１　ｍＡｂで染色することによって測定した。リツキシマブを、アイソタイプ対照として使用した。

【図１９－１】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＨＬＡ－Ａ２分子の関連において、ＷＴ１　ＲＭＦ以外のエピトープに対する二次Ｔ細胞応答を誘導することを示す。（１９Ａ）卵巣癌患者からのＰＢＭＣを、５：１のエフェクター：標的比で、０．１μｇ／ｍＬのＥＳＫ二重特異性抗体または対照二重特異性抗体、ヒトＩＬ－５（５ｎｇ／ｍＬ）、及びヒトＩＬ－２（１０単位／ｍＬ）の存在下で１週間、自己腫瘍細胞により刺激し、エピトープ特異性応答を、２０μｇ／ｍＬの示されたペプチドでパルスされたＴ２細胞に対して、ＩＦＮ－ｇエリスポットアッセイによって測定した。（１９Ｂ）（Ａ）における実験からの残留ＰＢＭＣを、同じ方法で９：１のエフェクター：標的比で再刺激し、エピトープ特異性Ｔ細胞応答を、ＩＦＮ－ｇエリスポットアッセイによって測定した。同じ刺激プロトコル及びＩＦＮ－ｇエリスポットアッセイを行い、（１９Ｃ）精製ＣＤ３＋Ｔ細胞と、ＮＫ及びマクロファージが枯渇したＰＢＭＣ（Ｔ＋Ｂと示される）、または（１９Ｄ）ＰＢＭＣと、精製ＣＤ３＋Ｔ細胞もしくは死自己腫瘍細胞で刺激されたＴ細胞との間のエピトープ特異性Ｔ細胞応答を比較した。死腫瘍細胞は、頻繁な凍結融解によってＤＭＳＯなしに生成した。データは、三重培養物＋／－ＳＤの平均を表す。０．１μｇ／ｍＬの二重特異性抗体の存在下または不在下での、ＰＢＭＣまたは精製Ｔ細胞と、自己卵巣癌細胞との共培養物からの上清を、３時間後、３日後、及び６日後に収集し、ＩＦＮ－γ（１９Ｅ）及びＴＮＦ－α（１９Ｆ）をＥＬＩＳＡキットによって測定した。

【図１９－２】ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＨＬＡ－Ａ２分子の関連において、ＷＴ１　ＲＭＦ以外のエピトープに対する二次Ｔ細胞応答を誘導することを示す。（１９Ａ）卵巣癌患者からのＰＢＭＣを、５：１のエフェクター：標的比で、０．１μｇ／ｍＬのＥＳＫ二重特異性抗体または対照二重特異性抗体、ヒトＩＬ－５（５ｎｇ／ｍＬ）、及びヒトＩＬ－２（１０単位／ｍＬ）の存在下で１週間、自己腫瘍細胞により刺激し、エピトープ特異性応答を、２０μｇ／ｍＬの示されたペプチドでパルスされたＴ２細胞に対して、ＩＦＮ－ｇエリスポットアッセイによって測定した。（１９Ｂ）（Ａ）における実験からの残留ＰＢＭＣを、同じ方法で９：１のエフェクター：標的比で再刺激し、エピトープ特異性Ｔ細胞応答を、ＩＦＮ－ｇエリスポットアッセイによって測定した。同じ刺激プロトコル及

びＩＦＮ－ｇエリスポットアッセイを行い、（１９Ｃ）精製ＣＤ３＋Ｔ細胞と、ＮＫ及びマクロファージが枯渇したＰＢＭＣ（Ｔ＋Ｂと示される）、または（１９Ｄ）ＰＢＭＣと、精製ＣＤ３＋Ｔ細胞もしくは死自己腫瘍細胞で刺激されたＴ細胞との間のエピトープ特異性Ｔ細胞応答を比較した。死腫瘍細胞は、頻繁な凍結融解によってＤＭＳＯなしに生成した。データは、三重培養物＋／－ＳＤの平均を表す。０．１μｇ／ｍＬの二重特異性抗体の存在下または不在下での、ＰＢＭＣまたは精製Ｔ細胞と、自己卵巣癌細胞との共培養物からの上清を、３時間後、３日後、及び６日後に収集し、ＩＦＮ－γ（１９Ｅ）及びＴＮＦ－α（１９Ｆ）をＥＬＩＳＡキットによって測定した。

【図２０】異なる濃度のマウス抗ヒトＣＤ８６　ｍＡｂ／ＰｅｒＣｐまたはそのアイソタイプ対照で細胞を染色することによって測定された、患者からの正常なドナー及び卵巣癌細胞（下パネル）からのＰＢＭＣ上の共刺激分子ＣＤ８６発現（上パネル）を示す。アイソタイプ対照：１：５０、１００、及び２００希釈。抗ＣＤ８６抗体：１：５０、１００、及び２００希釈。

【図２１Ａ】長命の細胞傷害性エフェクター細胞の生成を示す。（２１Ａ）図１９における患者からのＰＢＭＣを、自己腫瘍細胞の存在下でＥＳＫ二重特異性抗体（０．１μｇ／ｍＬ）で活性化される前、及びその７週間後にＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ４５ＲＯ、及びＣＣＲ７で染色した。ＣＤ４５ＲＡ及びＣＤ４５ＲＯ対ＣＣＲ７は、ゲートＣＤ８　Ｔ細胞上で示された。（２１Ｂ）フローサイトメトリー及び細胞計数によって測定された、二重特異性抗体活性化の７週間後のＣＤ８　Ｔ細胞の大きな選択的増加。（２１Ｃ）図１９に示される実験からのエフェクター細胞を、５週間にわたるＩＬ－１５（５ｎｇ／ｍＬ）及びＩＬ－２（１０Ｕ／ｍＬ）の毎週補充によって増殖させ、標準^{51}Ｃｒ放出アッセイによって、自己腫瘍、ＳＥＴ－２及びＨＬ－６０細胞に対する細胞傷害活性を測定した。データは、三重ウェルの平均を表す。

【図２１Ｂ】長命の細胞傷害性エフェクター細胞の生成を示す。（２１Ａ）図１９における患者からのＰＢＭＣを、自己腫瘍細胞の存在下でＥＳＫ二重特異性抗体（０．１μｇ／ｍＬ）で活性化される前、及びその７週間後にＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ４５ＲＯ、及びＣＣＲ７で染色した。ＣＤ４５ＲＡ及びＣＤ４５ＲＯ対ＣＣＲ７は、ゲートＣＤ８　Ｔ細胞上で示された。（２１Ｂ）フローサイトメトリー及び細胞計数によって測定された、二重特異性抗体活性化の７週間後のＣＤ８　Ｔ細胞の大きな選択的増加。（２１Ｃ）図１９に示される実験からのエフェクター細胞を、５週間にわたるＩＬ－１５（５ｎｇ／ｍＬ）及びＩＬ－２（１０Ｕ／ｍＬ）の毎週補充によって増殖させ、標準^{51}Ｃｒ放出アッセイによって、自己腫瘍、ＳＥＴ－２及びＨＬ－６０細胞に対する細胞傷害活性を測定した。データは、三重ウェルの平均を表す。

【図２１Ｃ】長命の細胞傷害性エフェクター細胞の生成を示す。（２１Ａ）図１９における患者からのＰＢＭＣを、自己腫瘍細胞の存在下でＥＳＫ二重特異性抗体（０．１μｇ／ｍＬ）で活性化される前、及びその７週間後にＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ４５ＲＯ、及びＣＣＲ７で染色した。ＣＤ４５ＲＡ及びＣＤ４５ＲＯ対ＣＣＲ７は、ゲートＣＤ８　Ｔ細胞上で示された。（２１Ｂ）フローサイトメトリー及び細胞計数によって測定された、二重特異性抗体活性化の７週間後のＣＤ８　Ｔ細胞の大きな選択的増加。（２１Ｃ）図１９に示される実験からのエフェクター細胞を、５週間にわたるＩＬ－１５（５ｎｇ／ｍＬ）及びＩＬ－２（１０Ｕ／ｍＬ）の毎週補充によって増殖させ、標準^{51}Ｃｒ放出アッセイによって、自己腫瘍、ＳＥＴ－２及びＨＬ－６０細胞に対する細胞傷害活性を測定した。データは、三重ウェルの平均を表す。

【発明を実施するための形態】

【００２２】

本明細書に列挙される全ての出版物、特許、及び他の参考文献は、それらの全体が参照により本開示に組み込まれる。参照により組み込まれる主題は、別段の明示的な指示がない限り、任意の請求項を限定するものの代替と解釈されるべきではない。

【００２３】

本明細書において別途定義されない限り、本発明との関連で使用される科学的及び技術

的用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈によって別途必要とされない限り、単数の用語は、複数を含むものとし、複数の用語は、単数を含むものとする。一般に、本明細書に記載される細胞及び組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝子学及びタンパク質及び核酸化学、ならびにハイブリダイゼーションとの関連で使用される専門用語、及び技術は、当該技術分野において周知であり、一般に使用されるものである。本発明の実施において、免疫学における多くの従来の技術が使用され、そ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、「Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ」（Ｊｏｈｎ　Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎ　ｅｔ　ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．（１９９１年及び定期的更新））；Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ｆｏｒ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ（Ｍｅｌｖｙｎ　Ｌｉｔｔｌｅ，ｅｄ．Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ（２００９年））により詳細に記載される。製造業者の説明書及び投与量情報を含む、当業者に広く知られ当業者によって信頼されている、標準的なプロトコルを含む、これらの参考文献及び他の参考文献の内容は、参照により本開示の一部として組み込まれる。

【００２４】

以下の省略形は、本願全体で使用され、一般に、当該技術分野において既知であるようなそれらの用語の意味と一致して解釈されることを目的とする。

【００２５】

Ａｂ：抗体

【００２６】

ＡＤＣＣ：抗体依存性細胞性細胞傷害活性

【００２７】

ＡＬＬ：急性リンパ性白血病

【００２８】

ＡＭＬ：急性骨髄性白血病

【００２９】

ＢｉＴＥ：二重特異性Ｔ細胞係合子

【００３０】

ＣＤＣ：補体依存性細胞傷害活性

【００３１】

ＣＭＣ：補体媒介性細胞傷害活性

【００３２】

ＣＤＲ：相補性決定領域（以下のＨＶＲも参照されたい）

【００３３】

ＣＬ：軽鎖の定常ドメイン

【００３４】

ＣＨ１：重鎖の第１の定常ドメイン

【００３５】

ＣＨ１、２、３：重鎖の第１、第２、及び第３の定常ドメイン

【００３６】

ＣＨ２、３：重鎖の第２及び第３の定常ドメイン

【００３７】

ＣＨＯ：チャイニーズハムスター卵巣

【００３８】

ＣＭＬ：慢性骨髄性（ｍｙｅｌｏｇｅｎｏｕｓ）白血病、慢性骨髄性（ｍｙｅｌｏｃｙｔｉｃ）白血病及び慢性骨髄性（ｍｙｅｌｏｉｄ）白血病とも称される

【００３９】

ＣＴＬ：細胞傷害性Ｔ細胞

【００４０】

Ｅ：Ｔ比：エフェクター：標的比
【００４１】
Ｆａｂ：抗体結合断片
【００４２】
ＦＡＣＳ：蛍光活性化細胞分類
【００４３】
ＦＢＳ：ウシ胎仔血清
【００４４】
ＦＲ：フレームワーク領域
【００４５】
ＧＶＨＤ：移植片対宿主病
【００４６】
ＨＣ：重鎖
【００４７】
ＨＬＡ：ヒト白血球抗原
【００４８】
ＨＶＲ－Ｈ：超可変領域重鎖（ＣＤＲも参照されたい）
【００４９】
ＨＶＲ－Ｌ：超可変領域軽鎖（ＣＤＲも参照されたい）
【００５０】
Ｉｇ：免疫グロブリン
【００５１】
ＫＤ：解離定数
【００５２】
k_{off}：解離速度
【００５３】
k_{on}：会合速度
【００５４】
ＭＨＣ：主要組織適合性複合体
【００５５】
ＭＭ：多発性骨髄腫
【００５６】
ｓｃＦｖ：一本鎖可変断片
【００５７】
V_H：可変重鎖は、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
【００５８】
V_L：可変軽鎖は、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
【００５９】
ＷＴ１：ウィルムス腫瘍タンパク質１
【００６０】
以下に続く記載において、本明細書で使用される用語は、当業者に既知であるようなそれらの用語の意味と一致して解釈されることを目的とする。本明細書で以下に提供される定義は、定義される用語を限定するのではなく、明確にするよう意図される。
【００６１】
本明細書で使用される場合、「投与すること」及び「投与」は、対象の身体への活性成分の適用を指す。
【００６２】
「抗体」及び「複数の抗体」は、それらの用語が当該技術分野において既知であるように、免疫系の抗原結合タンパク質を指す。用語「抗体」は、本明細書で言及されるように、抗原結合領域、及び「抗原結合部分」もしくは「抗原結合領域」が保持されるその任意

の断片、またはその一本鎖、例えば、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）を有する、全、完全長抗体を含む。自然発生「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互接続される、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。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書においてＶＨと略される）及び重鎖定常（ＣＨ）領域からなる。重鎖定常領域は、３つのドメインＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書においてＶＬと略される）及び軽鎖定常ＣＬ領域からなる。軽鎖定常領域は、１つのドメインＣＬからなる。ＶＨ及びＶＬ領域は、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる、より保存された領域が組み入れられている、相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分化され得る。各ＶＨ及びＶＬは、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端に配列される、３つのＣＤＲ及び４つのＦＲ、すなわちＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４からなる。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有する。抗体の定常領域は、免疫系の種々の細胞（例えば、エフェクター細胞）、及び古典的補体系の第１成分（Ｃ１ｑ）を含む、宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を仲介し得る。

【００６３】

本明細書で使用される場合、抗体の用語「抗原結合部分」または「抗原結合領域」は、抗原に結合し、抗体に対する抗原特異性を与える、抗体の領域または部分；抗原結合タンパク質の断片を指し、例えば、抗体は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の１つ以上の断片を含む（例えば、ペプチド／ＨＬＡ複合体）。抗体の抗原結合機能が完全長抗体の断片によって実施され得ることが示されている。抗体の用語「抗体断片」内に包含される抗原結合断片の例としては、Ｆａｂ断片、ＶＬ、ＶＨ、ＣＬ、及びＣＨ１ドメインからなる一価断片；ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって結合される２つのＦａｂ断片を含む、二価断片である、Ｆ（ａｂ）２断片；ＶＨ及びＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片；抗体の単一アームのＶＬ及びＶＨドメインからなるＦｖ断片；ＶＨドメインからなるｄＡｂ断片（Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．，１９８９ Ｎａｔｕｒｅ ３４１：５４４－５４６）；ならびに単離した相補性決定領域（ＣＤＲ）が挙げられる。

【００６４】

さらに、Ｆｖ断片の２つのドメインＶＬ及びＶＨが別々の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え方法を使用して、それらが、ＶＬ及びＶＨ領域が対になって一価分子を形成する、単一タンパク質鎖として作製されることを可能にする、合成リンカーによって、結合され得る。これらは、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として既知であり、例えば、Ｂｉｒｄ ｅｔ ａｌ．，１９８８ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３－４２６、及びＨｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９８８ Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８５：５８７９－５８８３を参照されたい。これらの抗体断片は、当業者に既知の従来の技術を使用して得られ、断片は、無傷抗体と同様の方法で実用性に関してスクリーニングされる。

【００６５】

本明細書で使用される場合、用語「有効量」は、例えば、研究者または臨床医によって求められている、組織、体系、動物、またはヒトの生物学的または医学的反応を引き起こす、化合物または治療薬の量を意味する。

【００６６】

用語「治療有効量」は、そのような治療有効量を投与されていない対応する対象と比較して、疾病、疾患、もしくは副作用の改善された治療、治癒、予防、もしくは改善、または疾病もしくは疾患の進行速度の低下をもたらす、任意の量を意味する。用語はまた、正常な生理的機能を強化するのに有効な量もその範囲内に含む。

【００６７】

本開示は、組換え二重特異性抗体に関する治療の組成物及び方法を提供する。一態様では、本発明は、組換え抗体を含む組成物を投与することを含む、対象において一次Ｔ細胞応答及び二次Ｔ細胞応答を刺激する方法であって、該組換え抗体が、第１の抗原結合部分及び第２の抗原結合部分を含み、該第１の抗原結合部分が、第１の腫瘍抗原に特異的に結合し、該第２の抗原結合部分が、免疫エフェクター細胞表面抗原に特異的に結合し、一次

Ｔ細胞応答が、第１の腫瘍抗原に対して細胞傷害性Ｔ細胞を刺激することを含み、二次Ｔ細胞応答が、第１の腫瘍抗原に対して及び／または第２の腫瘍抗原に対して、エフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞を刺激することを含む、方法を提供する。一態様では、第１の腫瘍抗原は、ＷＴ１／ＨＬＡであり、第２の腫瘍抗原は、非ＷＴ１－ＲＭＦ腫瘍抗原である。関連態様では、本発明は、腫瘍抗原、随意にＨＥＲ２－ｎｅｕなどの非ＷＴ１－ＲＭＦ腫瘍抗原に対して、エフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞を生成する方法を提供する。本開示の方法は、免疫エフェクター細胞、例えば、ＣＤ３＋細胞傷害性Ｔ細胞などの細胞傷害性細胞を投与することをさらに含んでもよい。腫瘍抗原に対するエフェクターＴ細胞、例えば、細胞傷害性Ｔ細胞及び／またはメモリーＴ細胞の生成を通して、本開示の二重特異性抗体は、故に腫瘍細胞に対するワクチン効果を達成することができ、養子性Ｔ細胞療法における使用のための細胞を生成するために使用できる。

【００６８】

別の態様では、本発明は、ＷＴ１陽性細胞を死滅させるために有用な改良された抗ＷＴ１抗体を提供する。改良された抗ＷＴ１抗体は、組織適合性制限的に提示されるときにＷＴ１に特異的に結合する第１の抗原結合部分、及び免疫エフェクター細胞の表面上の細胞表面抗原、例えば、ＣＤ３に特異的に結合する第２の抗原結合部分を持つ、二重特異性抗体であり、したがって免疫エフェクター細胞、例えば、ＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞（すなわち、細胞傷害性Ｔ細胞）に係合することができる。一態様では、本開示による組換え抗体またはその誘導体もしくは断片は、（ｉ）（Ａ）表１～６に記載のアミノ酸配列を含む、ＨＣ－ＣＤＲ１、ＨＣ－ＣＤＲ２、及びＨＣ－ＣＤＲ３を含む重鎖（ＨＣ）可変領域、ならびにＬＣ－ＣＤＲ１、ＬＣ－ＣＤＲ２、及びＬＣ－ＣＤＲ３を含む軽鎖（ＬＣ）可変領域、（Ｂ）表１～６に記載の第１及び第２のアミノ酸配列を含むＶＨ及びＶＬ、または（Ｃ）表１～６に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦｖ、を含む、第１の抗原結合部分と、（ｉｉ）表７に記載のアミノ酸配列を含む、第２の抗原結合部分と、を含む。一態様では、第１の抗原結合部分及び／または第２の抗原結合部分は、抗体断片である。抗体断片の例として、Ｆａｂ断片；ＶＬ、ＶＨ、ＣＬ、及びＣＨ１ドメインからなる一価断片；Ｆ（ａｂ）２断片；ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結される２つのＦａｂ断片を含む、二価断片；ＶＨ及びＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片；抗体の単一アームのＶＬ及びＶＨドメインからなるＦｖ断片；ｄＡｂ断片；単離したＣＤＲ；ならびにｓｃＦｖが挙げられるが、これらに限定されない。

【００６９】

一実施形態では、二重特異性抗体は、配列番号５０のアミノ酸配列を含む可変重鎖領域、及び配列番号５２のアミノ酸配列を含む可変軽鎖領域、または配列番号５４のアミノ酸配列を持つｓｃＦＶを持つ、第１の結合部分を有する。さらに、二重特異性抗体は、配列番号１１１のアミノ酸配列を含むＬ２Ｋ重鎖可変領域と、配列番号１１２のアミノ酸配列を含むＬ２Ｋ軽鎖可変領域とを含む、第２の結合部分を有する。

【００７０】

他の実施形態では、本発明の二重特異性抗ＷＴ１抗体のＷＴ１／ＨＬＡ結合部分は、表１～６または８に列挙されるアミノ酸配列（ｓｃＦｖ、ＶＨ及びＶＬ領域またはＣＤＲ）のうちの１つ以上を含む。

【００７１】

表１～７に続く配列において、太字のテキストは、超可変重鎖及び軽鎖配列間のリンカー配列を示す。

【００７２】

いくつかの実施形態では、抗体は、精製のためのヒスチジンタグを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、シグナルペプチドと、グリシン及びセリン残基を含む１つ以上のリンカーとを含む。

【表１－１】

表１

抗原	WT１		
ペプチド	RMFPNAPYL（配列番号１）		
CDR：	1	2	3
VH	GGTFSSYAIS（配列番号２）	GIIPIFGTANYAQKFQG（配列番号３）	RIPPYYGMDV（配列番号４）
DNA	ggaggcaccttcagcagctatgctatcagc（配列番号５）	gggatcatccctatctttggtacagcaaactacgcacagaagttccagggc（配列番号６）	cggattcccccgtactacggtatggacgtc（配列番号７）
VL	SGSSSNIGSNYVY（配列番号８）	RSNQRPS（配列番号９）	AAWDDSLNGVV（配列番号１０）
DNA	tctggaagcagctccaacatcggaagtaattatgtatac（配列番号１１）	aggagtaatcagcgggccctca（配列番号１２）	gcagcatgggatgacagcctgaatggtgtggta（配列番号１３）
完全VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRIPPYYGMDVWGQGTTVTVSS（配列番号１４）		
DNA	caggtgcagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggtgaaggtctcctgcaaggcttctggaggcaccttcagcagctatgctatcagctgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatgggagggatcatccctatctttggtacagcaaactacgcacagaagttccagggcagagtcacgattaccgcggacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgttattactgtgcgagacggattccccccgtactacggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcaccgtctcctca（配列番号１５）		
完全VL	QTVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRSNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGPRSVDEADYYCAAWDDSLNGVVFGGGTKLTVLG（配列番号１６）		

【表１－２】

抗原	ＷＴ１
ペプチド	ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号１）
ＤＮＡ	ｃａｇａｃｔｇｔｇｇｔｇａｃｔｃａｇｃｃａｃｃｃｔｃａｇｃｇｔｃｔｇｇ ｇａｃｃｃｃｃｇｇｇｃａｇａｇｇｇｔｃａｃｃａｔｃｔｃｔｔｇｔｔｃｔｇ ｇａａｇｃａｇｃｔｃｃａａｃａｔｃｇｇａａｇｔａａｔｔａｔｇｔａｔａｃ ｔｇｇｔａｃｃａａｃａｇｃｔｃｃｃａｇｇａａｃｇｇｃｃｃｃｃａａａｃｔ ｃｃｔｃａｔｃｔａｔａｇｇａｇｔａａｔｃａｇｃｇｇｃｃｃｔｃａｇｇｇｇ ｔｃｃｃｔｇａｃｃｇａｔｔｃｔｃｔｇｇｃｔｃｃａａｇｔｃｔｇｇｃａｃｃ ｔｃａｇｃｃｔｃｃｃｔｇｇｃｃａｔｃａｇｔｇｇｇｃｃｃｃｇｇｔｃｃｇｔ ｇｇａｔｇａｇｇｃｔｇａｔｔａｔｔａｃｔｇｔｇｃａｇｃａｔｇｇｇａｔｇ ａｃａｇｃｃｔｇａａｔｇｇｔｇｔｇｇｔａｔｔｃｇｇｃｇｇａｇｇｇａｃｃ ａａｇｃｔｇａｃｃｇｔｃｃｔａｇｇｔ（配列番号１７）
ｓｃＦｖ	ＱＴＶＶＴＱＰＰＳＡＳＧＴＰＧＱＲＶＴＩＳＣＳＧＳＳＳＮＩＧＳＮＹＶＹ ＷＹＱＱＬＰＧＴＡＰＫＬＬＩＹＲＳＮＱＲＰＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＫＳＧＴ ＳＡＳＬＡＩＳＧＰＲＳＶＤＥＡＤＹＹＣＡＡＷＤＤＳＬＮＧＶＶＦＧＧＧＴ ＫＬＴＶＬＧＳＲＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＳＬＥＭＡＱＶＱＬＶＱＳＧＡ ＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＧＴＦＳＳＹＡＩＳＷＶＲＱＡＰＧＱＧ ＬＥＷＭＧＧＩＩＰＩＦＧＴＡＮＹＡＱＫＦＱＧＲＶＴＩＴＡＤＥＳＴＳＴＡ ＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＲＩＰＰＹＹＧＭＤＶＷＧＱＧＴＴ ＶＴＶＳＳ （配列番号１８）
ＤＮＡ	ｃａｇａｃｔｇｔｇｇｔｇａｃｔｃａｇｃｃａｃｃｃｔｃａｇｃｇｔｃｔｇｇ ｇａｃｃｃｃｃｇｇｇｃａｇａｇｇｇｔｃａｃｃａｔｃｔｃｔｔｇｔｔｃｔｇ ｇａａｇｃａｇｃｔｃｃａａｃａｔｃｇｇａａｇｔａａｔｔａｔｇｔａｔａｃ ｔｇｇｔａｃｃａａｃａｇｃｔｃｃｃａｇｇａａｃｇｇｃｃｃｃｃａａａｃｔ ｃｃｔｃａｔｃｔａｔａｇｇａｇｔａａｔｃａｇｃｇｇｃｃｃｔｃａｇｇｇｇ ｔｃｃｃｔｇａｃｃｇａｔｔｃｔｃｔｇｇｃｔｃｃａａｇｔｃｔｇｇｃａｃｃ ｔｃａｇｃｃｔｃｃｃｔｇｇｃｃａｔｃａｇｔｇｇｇｃｃｃｃｇｇｔｃｃｇｔ ｇｇａｔｇａｇｇｃｔｇａｔｔａｔｔａｃｔｇｔｇｃａｇｃａｔｇｇｇａｔｇ ａｃａｇｃｃｔｇａａｔｇｇｔｇｔｇｇｔａｔｔｃｇｇｃｇｇａｇｇｇａｃｃ ａａｇｃｔｇａｃｃｇｔｃｃｔａｇｇｔｔｃｔａｇａｇｇｔｇｇｔｇｇｔｇｇ ｔａｇｃｇｇｃｇｇｃｇｇｃｇｇｃｔｃｔｇｇｔｇｇｔｇｇａｔｃｃｃｔｃｇ ａｇａｔｇｇｃｃｃａｇｇｔｇｃａｇｃｔｇｇｔｇｃａｇｔｃｔｇｇｇｇｃｔ ｇａｇｇｔｇａａｇａａｇｃｃｔｇｇｇｔｃｃｔｃｇｇｔｇａａｇｇｔｃｔｃ ｃｔｇｃａａｇｇｃｔｔｃｔｇｇａｇｇｃａｃｃｔｔｃａｇｃａｇｃｔａｔｇ ｃｔａｔｃａｇｃｔｇｇｇｔｇｃｇａｃａｇｇｃｃｃｃｔｇｇａｃａａｇｇｇ ｃｔｔｇａｇｔｇｇａｔｇｇｇａｇｇｇａｔｃａｔｃｃｃｔａｔｃｔｔｔｇｇ ｔａｃａｇｃａａａｃｔａｃｇｃａｃａｇａａｇｔｔｃｃａｇｇｇｃａｇａｇ ｔｃａｃｇａｔｔａｃｃｇｃｇｇａｃｇａａｔｃｃａｃｇａｇｃａｃａｇｃｃ ｔａｃａｔｇｇａｇｃｔｇａｇｃａｇｃｃｔｇａｇａｔｃｔｇａｇｇａｃａｃ ｇｇｃｃｇｔｇｔａｔｔａｃｔｇｔｇｃｇａｇａｃｇｇａｔｔｃｃｃｃｃｇｔ ａｃｔａｃｇｇｔａｔｇｇａｃｇｔｃｔｇｇｇｇｃｃａａｇｇｇａｃｃａｃｇ ｇｔｃａｃｃｇｔｃｔｃｃｔｃａ（配列番号１９）

【表２－１】

表２

抗原	ＷＴ１（Ｅｘｔ００２　＃５）		
ペプチド	ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号１）		
ＣＤＲ：	１	２	３

【表２－２】

抗原	ＷＴ１（Ｅｘｔ００２　＃５）		
ペプチド	ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号１）		
ＶＨ	ＧＤＳＶＳＳＮＳＡＡＷＮ（配列番号２０）	ＲＴＹＹＧＳＫＷＹＮＤＹＡＶＳＶＫＳ（配列番号２１）	ＧＲＬＧＤＡＦＤＩ（配列番号２２）
ＤＮＡ	ｇｇｇｇａｃａｇｔｇｔｃｔｃｔａｇｃａａｃａｇｔｇｃｔｇｃｔｔｇｇａａｃ（配列番号２３）	ａｇｇａｃａｔａｃｔａｃｇｇｇｇｔｃｃａａｇｔｇｇｔａｔａａｔｇａｔｔａｔｇｃａｇｔａｔｃｔｇｔｇａａａａｇｔ（配列番号２４）	ｇｇｔｃｇｃｔｔａｇｇｇｇａｔｇｃｔｔｔｔｇａｔａｔｃ（配列番号２５）
ＶＬ	ＲＡＳＱＳＩＳＳＹＮ（配列番号２６）	ＡＡＳＳＬＱＳ（配列番号２７）	ＱＱＳＹＳＴＰＬＴ（配列番号２８）
ＤＮＡ	ｃｇｇｇｃａａｇｔｃａｇａｇｃａｔｔａｇｃａｇｃｔａｔｔｔａａａｔ（配列番号２９）	ｇｃｔｇｃａｔｃｃａｇｔｔｔｇｃａａａｇｔ（配列番号３０）	ｃａａｃａｇａｇｔｔａｃａｇｔａｃｃｃｃｔｃｔｃａｃｔ（配列番号３１）
完全ＶＨ	ＱＶＱＬＱＱＳＧＰＧＬＶＫＰＳＱＴＬＳＬＴＣＡＩＳＧＤＳＶＳＳＮＳＡＡＷＮＷＩＲＱＳＰＳＲＧＬＥＷＬＧＲＴＹＹＧＳＫＷＹＮＤＹＡＶＳＶＫＳＲＩＴＩＮＰＤＴＳＫＮＱＦＳＬＱＬＮＳＶＴＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＧＲＬＧＤＡＦＤＩＷＧＱＧＴＭＶＴＶＳＳ（配列番号３２）		
ＤＮＡ	ｃａｇｇｔａｃａｇｃｔｇｃａｇｃａｇｔｃａｇｇｔｃｃａｇｇａｃｔｇｇｔｇａａｇｃｃｃｔｃｇｃａｇａｃｃｃｔｃｔｃａｃｔｃａｃｃｔｇｔｇｃｃａｔｃｔｃｃｇｇｇｇａｃａｇｔｇｔｃｔｃｔａｇｃａａｃａｇｔｇｃｔｇｃｔｔｇｇａａｃｔｇｇａｔｃａｇｇｃａｇｔｃｃｃｃａｔｃｇａｇａｇｇｃｃｔｔｇａｇｔｇｇｃｔｇｇｇａａｇｇａｃａｔａｃｔａｃｇｇｇｔｃｃａａｇｔｇｇｔａｔａａｔｇａｔｔａｔｇｃａｇｔａｔｃｔｇｔｇａａａａｇｔｃｇａａｔａａｃｃａｔｃａａｃｃｃｃａｇａｃａｃａｔｃｃａａｇａａｃｃａｇｔｔｃｔｃｃｃｔｇｃａｇｃｔｇａａｃｔｃｔｇｔｇａｃｔｃｃｃｇａｇｇａｃａｃｇｇｃｔｇｔｇｔａｔｔａｃｔｇｔｇｃａａｇａｇｇｔｃｇｃｔｔａｇｇｇｇａｔｇｃｔｔｔｔｇａｔａｔｃｔｇｇｇｇｃｃａａｇｇｇａｃａａｔｇｇｔｃａｃｃｇｔｃｔｃｔｔｃａ（配列番号３３）		
完全ＶＬ	ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＳＩＳＳＹＬＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＡＡＳＳＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＳＹＳＴＰＬＴＦＧＧＧＴＫＶＤＩＫＲ（配列番号３４）		
ＤＮＡ	ｇａｃａｔｃｃａｇａｔｇａｃｃｃａｇｔｃｔｃｃａｔｃｃｔｃｃｃｔｇｔｃｔｇｃａｔｃｔｇｔａｇｇａｇａｃａｇａｇｔｃａｃｃａｔｃａｃｔｔｇｃｃｇｇｇｃａａｇｔｃａｇａｇｃａｔｔａｇｃａｇｃｔａｔｔｔａａａｔｔｇｇｔａｔｃａｇｃａｇａａａｃｃａｇｇｇａａａａｇｃｃｃｃｔａａｇｃｔｃｃｔｇａｔｃｔａｔｇｃｔｇｃａｔｃｃａｇｔｔｔｇｃａａａｇｔｇｇｇｇｔｃｃｃａｔｃａａｇｇｔｔｃａｇｔｇｇｃａｇｔｇｇａｔｃｔｇｇｇａｃａｇａｔｔｔｃａｃｔｃｔｃａｃｃａｔｃａｇｃａｇｔｃｔｇｃａａｃｃｔｇａａｇａｔｔｔｔｇｃａａｃｔｔａｃｔａｃｔｇｔｃａａｃａｇａｇｔｔａｃａｇｔａｃｃｃｃｔｃｔｃａｃｔｔｔｃｇｇｃｇｇａｇｇｇａｃｃａａａｇｔｇｇａｔａｔｃａａａｃｇｔ（配列番号３５）		

【表２－３】

抗原	ＷＴ１（Ｅｘｔ００２　＃５）
ペプチド	ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号１）
ｓｃＦｖ	ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＳＩＳＳＹＬ ＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＡＡＳＳＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧ ＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＳＹＳＴＰＬＴＦＧ ＧＧＴＫＶＤＩＫＲＳＲＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＬＥＭＡＱＶＱ ＬＱＱＳＧＰＧＬＶＫＰＳＱＴＬＳＬＴＣＡＩＳＧＤＳＶＳＳＮＳＡＡＷ ＮＷＩＲＱＳＰＳＲＧＬＥＷＬＧＲＴＹＹＲＳＫＷＹＮＤＹＡＶＳＶＫＳ ＲＩＴＩＮＰＤＴＳＫＮＱＦＳＬＱＬＮＳＶＴＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＧ ＲＬＧＤＡＦＤＩＷＧＱＧＴＭＶＴＶＳＳ （配列番号３６）
ＤＮＡ	ｇａｃａｔｃｃａｇａｔｇａｃｃｃａｇｔｃｔｃｃａｔｃｃｔｃｃｃｔｇ ｔｃｔｇｃａｔｃｔｇｔａｇｇａｇａｃａｇａｇｔｃａｃｃａｔｃａｃｔ ｔｇｃｃｇｇｇｃａａｇｔｃａｇａｇｃａｔｔａｇｃａｇｃｔａｔｔｔａ ａａｔｔｇｇｔａｔｃａｇｃａｇａａａｃｃａｇｇｇａａａｇｃｃｃｃｔ ａａｇｃｔｃｃｔｇａｔｃｔａｔｇｃｔｇｃａｔｃｃａｇｔｔｔｇｃａａ ａｇｔｇｇｇｇｔｃｃｃａｔｃａａｇｇｔｔｃａｇｔｇｇｃａｇｔｇｇａ ｔｃｔｇｇｇａｃａｇａｔｔｔｃａｃｔｃｔｃａｃｃａｔｃａｇｃａｇｔ ｃｔｇｃａａｃｃｔｇａａｇａｔｔｔｔｇｃａａｃｔｔａｃｔａｃｔｇｔ ｃａａｃａｇａｇｔｔａｃａｇｔａｃｃｃｃｔｃｔｃａｃｔｔｔｃｇｇｃ ｇｇａｇｇｇａｃｃａａａｇｔｇｇａｔａｔｃａａａｃｇｔｔｃｔａｇａ ｇｇｔｇｇｔｇｇｔｇｇｔａｇｃｇｇｃｇｇｃｇｇｃｇｇｃｔｃｔｇｇｔ ｇｇｔｇｇｔｇｇａｔｃｃｃｔｃｇａｇａｔｇｇｃｃｃａｇｇｔａｃａｇ ｃｔｇｃａｇｃａｇｔｃａｇｇｔｃｃａｇｇａｃｔｇｇｔｇａａｇｃｃｃ ｔｃｇｃａｇａｃｃｃｔｃｔｃａｃｔｃａｃｃｔｇｔｇｃｃａｔｃｔｃｃ ｇｇｇｇａｃａｇｔｇｔｃｔｃｔａｇｃａａｃａｇｔｇｃｔｇｃｔｔｇｇ ａａｃｔｇｇａｔｃａｇｇｃａｇｔｃｃｃｃａｔｃｇａｇａｇｇｃｃｔｔ ｇａｇｔｇｇｃｔｇｇｇａａｇｇａｃａｔａｃｔａｃｇｇｇｔｃｃａａｇ ｔｇｇｔａｔａａｔｇａｔｔａｔｇｃａｇｔａｔｃｔｇｔｇａａａａｇｔ ｃｇａａｔａａｃｃａｔｃａａｃｃｃａｇａｃａｃａｔｃｃａａｇａａｃ ｃａｇｔｔｃｔｃｃｃｔｇｃａｇｃｔｇａａｃｔｃｔｇｔｇａｃｔｃｃｃ ｇａｇｇａｃａｃｇｇｃｔｇｔｇｔａｔｔａｃｔｇｔｇｃａａｇａｇｇｔ ｃｇｃｔｔａｇｇｇｇａｔｇｃｔｔｔｔｇａｔａｔｃｔｇｇｇｇｃｃａａ ｇｇｇａｃａａｔｇｇｔｃａｃｃｇｔｃｔｃｔｔｃａ（配列番号３７）

【表３－１】

表３

抗原	ＷＴ１（Ｅｘｔ００２　＃１３）		
ペプチド	ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号１）		
ＣＤＲ：	１	２	３
ＶＨ	ＧＹＳＦＴＮＦＷＩＳ （配列番号３８）	ＲＶＤＰＧＹＳＹＳＴＹ ＳＰＳＦＱＧ（配列番号 ３９）	ＶＱＹＳＧＹＹＤＷＦ ＤＰ （配列番号４０）
ＤＮＡ	ｇｇａｔａｃａｇｃｔ ｔｃａｃｃａａｃｔｔ ｃｔｇｇａｔｃａｇｃ （配列番号４１）	ａｇｇｇｔｔｇａｔｃｃ ｔｇｇｃｔａｃｔｃｔｔ ａｔａｇｃａｃｃｔａｃ ａｇｃｃｃｇｔｃｃｔｔ ｃｃａａｇｇｃ （配列番号４２）	ｇｔａｃａａｔａｔａ ｇｔｇｇｃｔａｃｔａ ｔｇａｃｔｇｇｔｔｃ ｇａｃｃｃｃ （配列番号４３）

【表３－２】

抗原	ＷＴ１（Ｅｘｔ００２　＃１３）		
ペプチド	ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号１）		
ＶＬ	ＳＧＳＳＳＮＩＧＳＮＴＶＮ（配列番号４４）	ＳＮＮＱＲＰＳ（配列番号４５）	ＡＡＷＤＤＳＬＮＧＷＶ（配列番号４６）
ＤＮＡ	ｔｃｔｇｇａａｇｃａｇｃｔｃｃａａｃａｔｃｇｇａａｇｔａａｔａｃｔｇｔａａａｃ（配列番号４７）	ａｇｔａａｔａａｔｃａｇｃｇｇｃｃｃｔｃａ（配列番号４８）	ｇｃａｇｃａｔｇｇｇａｔｇａｃａｇｃｃｔｇａａｔｇｇｔｔｇｇｇｔｇ（配列番号４９）
完全ＶＨ	ＱＭＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＥＰＧＥＳＬＲＩＳＣＫＧＳＧＹＳＦＴＮＦＷＩＳＷＶＲＱＭＰＧＫＧＬＥＷＭＧＲＶＤＰＧＹＳＹＳＴＹＳＰＳＦＱＧＨＶＴＩＳＡＤＫＳＴＳＴＡＹＬＱＷＮＳＬＫＡＳＤＴＡＭＹＹＣＡＲＶＱＹＳＧＹＹＤＷＦＤＰＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号５０）		
ＤＮＡ	ｃａｇａｔｇｃａｇｃｔｇｇｔｇｃａｇｔｃｃｇｇａｇｃａｇａｇｇｔｇａａａｇａｇｃｃｃｇｇｇｇａｇｔｃｔｃｔｇａｇｇａｔｃｔｃｃｔｇｔａａｇｇｇｔｔｃｔｇｇａｔａｃａｇｃｔｔｃａｃｃａａｃｔｔｃｔｇｇａｔｃａｇｃｔｇｇｇｇｔｇｃｇｃｃａｇａｔｇｃｃｃｇｇｇａａａｇｇｃｃｔｇｇａｇｔｇｇａｔｇｇｇｇａｇｇｇｔｔｇａｔｃｃｔｇｇｃｔａｃｔｃｔｔａｔａｇｃａｃｃｔａｃａｇｃｃｃｇｔｃｃｔｔｃｃａａｇｇｃｃａｃｇｔｃａｃｃａｔｃｔｃａｇｃｔｇａｃａａｇｔｃｔａｃｃａｇｃａｃｔｇｃｃｔａｃｃｔｇｃａｇｔｇｇａａｃａｇｃｃｔｇａａｇｇｃｃｔｃｇｇａｃａｃｃｇｃｃａｔｇｔａｔｔａｃｔｇｔｇｃｇａｇａｇｔａｃａａｔａｔａｇｔｇｇｃｔａｃｔａｔｇａｃｔｇｇｔｔｃｇａｃｃｃｃｔｇｇｇｇｃｃａｇｇｇａａｃｃｃｔｇｇｔｃａｃｃｇｔｃｔｃｃｔｃａ（配列番号５１）		
完全ＶＬ	ＱＡＶＶＴＱＰＰＳＡＳＧＴＰＧＱＲＶＴＩＳＣＳＧＳＳＳＮＩＧＳＮＴＶＮＷＹＱＱＶＰＧＴＡＰＫＬＬＩＹＳＮＮＱＲＰＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＫＳＧＴＳＡＳＬＡＩＳＧＬＱＳＥＤＥＡＤＹＹＣＡＡＷＤＤＳＬＮＧＷＶＦＧＧＧＴＫＬＴＶＬＧ（配列番号５２）		
ＤＮＡ	ｃａｇｇｃｔｇｔｇｇｔｇａｃｔｃａｇｃｃａｃｃｃｔｃａｇｃｇｔｃｔｇｇｇａｃｃｃｃｃｇｇｇｃａｇａｇｇｇｔｃａｃｃａｔｃｔｃｔｔｇｔｔｃｔｇｇａａｇｃａｇｃｔｃｃａａｃａｔｃｇｇａａｇｔａａｔａｃｔｇｔａａａｃｔｇｇｔａｃｃａｇｃａｇｇｔｃｃｃａｇｇａａｃｇｇｃｃｃｃｃａａａｃｔｃｃｔｃａｔｃｔａｔａｇｔａａｔａａｔｃａｇｃｇｇｃｃｃｔｃａｇｇｇｇｔｃｃｃｔｇａｃｃｇａｔｔｃｔｃｔｇｇｃｔｃｃａａｇｔｃｔｇｇｃａｃｃｔｃａｇｃｃｔｃｃｃｔｇｇｃｃａｔｃａｇｔｇｇｇｃｔｃｃａｇｔｃｔｇａｇｇａｔｇａｇｇｃｔｇａｔｔａｔｔａｃｔｇｔｇｃａｇｃａｔｇｇｇａｔｇａｃａｇｃｃｔｇａａｔｇｇｔｔｇｇｇｔｇｔｔｃｇｇｃｇｇａｇｇｇａｃｃａａｇｃｔｇａｃｃｇｔｃｃｔａｇｇｔ（配列番号５３）		
ｓｃＦｖ	ＱＡＶＶＴＱＰＰＳＡＳＧＴＰＧＱＲＶＴＩＳＣＳＧＳＳＳＮＩＧＳＮＴＶＮＷＹＱＱＶＰＧＴＡＰＫＬＬＩＹＳＮＮＱＲＰＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＫＳＧＴＳＡＳＬＡＩＳＧＬＱＳＥＤＥＡＤＹＹＣＡＡＷＤＤＳＬＮＧＷＶＦＧＧＧＴＫＬＴＶＬＧＳＲＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＬＥＭＡＱＭＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＥＰＧＥＳＬＲＩＳＣＫＧＳＧＹＳＦＴＮＦＷＩＳＷＶＲＱＭＰＧＫＧＬＥＷＭＧＲＶＤＰＧＹＳＹＳＴＹＳＰＳＦＱＧＨＶＴＩＳＡＤＫＳＴＳＴＡＹＬＱＷＮＳＬＫＡＳＤＴＡＭＹＹＣＡＲＶＱＹＳＧＹＹＤＷＦＤＰＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号５４）		

【表３－３】

抗原	ＷＴ１（Ｅｘｔ００２　＃１３）
ペプチド	ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号１）
ＤＮＡ	ｃａｇｇｃｔｇｔｇｇｔｇａｃｔｃａｇｃｃａｃｃｃｔｃａｇｃｇｔｃｔｇ ｇｇａｃｃｃｃｃｇｇｇｃａｇａｇｇｇｔｃａｃｃａｔｃｔｃｔｔｇｔｔｃ ｔｇｇａａｇｃａｇｃｔｃｃａａｃａｔｃｇｇａａｇｔａａｔａｃｔｇｔａ ａａｃｔｇｇｔａｃｃａｇｃａｇｇｔｃｃｃａｇｇａａｃｇｇｃｃｃｃｃａ ａａｃｔｃｃｔｃａｔｃｔａｔａｇｔａａｔａａｔｃａｇｃｇｇｃｃｃｔｃ ａｇｇｇｇｔｃｃｃｔｇａｃｃｇａｔｔｃｔｃｔｇｇｃｔｃｃａａｇｔｃｔ ｇｇｃａｃｃｔｃａｇｃｃｔｃｃｃｔｇｇｃｃａｔｃａｇｔｇｇｇｃｔｃｃ ａｇｔｃｔｇａｇｇａｔｇａｇｇｃｔｇａｔｔａｔｔａｃｔｇｔｇｃａｇｃ ａｔｇｇｇａｔｇａｃａｇｃｃｔｇａａｔｇｇｔｔｇｇｇｇｔｇｔｔｃｇｇｃ ｇｇａｇｇｇａｃｃａａｇｃｔｇａｃｃｇｔｃｃｔａｇｇｔｔｃｔａｇａｇ ｇｔｇｇｔｇｇｔｇｇｔａｇｃｇｇｃｇｇｃｇｇｃｇｇｃｔｃｔｇｇｔｇｇ ｔｇｇｔｇｇａｔｃｃｃｔｃｇａｇａｔｇｇｃｃｃａｇａｔｇｃａｇｃｔｇ ｇｔｇｃａｇｔｃｃｇｇａｇｃａｇａｇｇｔｇａａａｇａｇｃｃｃｇｇｇｇｇ ａｇｔｃｔｃｔｇａｇｇａｔｃｔｃｃｔｇｔａａｇｇｇｔｔｃｔｇｇａｔａ ｃａｇｃｔｔｃａｃｃａａｃｔｔｃｔｇｇａｔｃａｇｃｔｇｇｇｔｇｃｇｃ ｃａｇａｔｇｃｃｃｇｇｇｇａａａｇｇｃｃｔｇｇａｇｔｇｇａｔｇｇｇｇａ ｇｇｇｔｔｇａｔｃｃｔｇｇｃｔａｃｔｃｔｔａｔａｇｃａｃｃｔａｃａｇ ｃｃｃｇｔｃｃｔｔｃｃａａｇｇｃｃａｃｇｔｃａｃｃａｔｃｔｃａｇｃｔ ｇａｃａａｇｔｃｔａｃｃａｇｃａｃｔｇｃｃｔａｃｃｔｇｃａｇｔｇｇａ ａｃａｇｃｃｔｇａａｇｇｃｃｔｃｇｇａｃａｃｃｇｃｃａｔｇｔａｔｔａ ｃｔｇｔｇｃｇａｇａｇｔａｃａａｔａｔａｇｔｇｇｃｔａｃｔａｔｇａｃ ｔｇｇｔｔｃｇａｃｃｃｃｔｇｇｇｇｃｃａｇｇｇａａｃｃｃｔｇｇｔｃａ ｃｃｇｔｃｔｃｃｔｃａ（配列番号５５）

【表４－１】

表４

抗原	ＷＴ１（Ｅｘｔ００２　＃１５）		
ペプチド	ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号１）		
ＣＤＲ：	１	２	３
ＶＨ	ＧＹＮＦＳＮＫＷＩＧ （配列番号５６）	ＩＩＹＰＧＹＳＤＩＴＹ ＳＰＳＦＱＧ （配列番号５７）	ＨＴＡＬＡＧＦＤＹ （配列番号５８）
ＤＮＡ	ｇｇｃｔａｃａａｃｔ ｔｔａｇｃａａｃａａ ｇｔｇｇａｔｃｇｇｃ （配列番号５９）	ａｔｃａｔｃｔａｔｃｃ ｃｇｇｔｔａｃｔｃｇｇ ａｃａｔｃａｃｃｔａｃ ａｇｃｃｃｇｔｃｃｔｔ ｃｃａａｇｇｃ（配列番号６０）	ｃａｃａｃａｇｃｔｔ ｔｇｇｃｃｇｇｃｔｔ ｔｇａｃｔａｃ（配列番号６１）
ＶＬ	ＲＡＳＱＮＩＮＫＷＬＡ （配列番号６２）	ＫＡＳＳＬＥＳ （配列番号６３）	ＱＱＹＮＳＹＡＴ （配列番号６４）
ＤＮＡ	Ｃｇｇｇｃｃａｇｔｃ ａｇａａｔａｔｃａａ ｔａａｇｔｇｇｃｔｇ ｇｃｃ （配列番号６５）	ａａｇｇｃｇｔｃｔａｇ ｔｔｔａｇａａａｇｔ（配列番号６６）	ｃａａｃａａｔａｔａ ａｔａｇｔｔａｔｇｃ ｇａｃｇ（配列番号６７）

【表４－２】

抗原	ＷＴ１（Ｅｘｔ００２　＃１５）
ペプチド	ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号１）
完全ＶＨ	ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＥＳＬＫＩＳＣＫＧＳＧＹＮＦＳＮＫＷ ＩＧＷＶＲＱＬＰＧＲＧＬＥＷＩＡＩＩＹＰＧＹＳＤＩＴＹＳＰＳＦＱＧ ＲＶＴＩＳＡＤＴＳＩＮＴＡＹＬＨＷＨＳＬＫＡＳＤＴＡＭＹＹＣＶＲＨ ＴＡＬＡＧＦＤＹＷＧＬＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号６８）
ＤＮＡ	ｃａｇｇｔｇｃａｇｃｔｇｇｔｇｃａｇｔｃｔｇｇａｇｃａｇａｇｇｔｇ ａａａａａｇｃｃｃｇｇａｇａｇｔｃｔｃｔｇａａｇａｔｃｔｃｃｔｇｔ ａａｇｇｇｔｔｃｔｇｇｃｔａｃａａｃｔｔｔａｇｃａａｃａａｇｔｇｇ ａｔｃｇｇｃｔｇｇｇｔｇｃｇｃｃａａｔｔｇｃｃｃｇｇｇａｇａｇｇｃ ｃｔｇｇａｇｔｇｇａｔａｇｃａａｔｃａｔｃｔａｔｃｃｃｇｇｔｔａｃ ｔｃｇｇａｃａｔｃａｃｃｔａｃａｇｃｃｃｇｔｃｃｔｔｃｃａａｇｇｃ ｃｇｃｇｔｃａｃｃａｔｃｔｃｃｇｃｃｇａｃａｃｇｔｃｃａｔｔａａｃ ａｃｃｇｃｃｔａｃｃｔｇｃａｃｔｇｇｃａｃａｇｃｃｔｇａａｇｇｃｃ ｔｃｇｇａｃａｃｃｇｃｃａｔｇｔａｔｔａｔｔｇｔｇｔｇｃｇａｃａｃ ａｃａｇｃｔｔｔｇｇｃｃｇｇｃｔｔｔｇａｃｔａｃｔｇｇｇｇｃｃｔｇ ｇｇｃａｃｃｃｔｇｇｔｃａｃｃｇｔｃｔｃｃｔｃａ （配列番号６９）
完全ＶＬ	ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＴＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＮＩＮＫＷＬ ＡＷＹＱＱＲＰＧＫＡＰＱＬＬＩＹＫＡＳＳＬＥＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧ ＳＧＴＥＹＴＬＴＩＳＳＬＱＰＤＤＦＡＴＹＹＣＱＱＹＮＳＹＡＴＦＧＱ ＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号７０）
ＤＮＡ	ｇａｃａｔｃｃａｇａｔｇａｃｃｃａｇｔｃｔｃｃｔｔｃｃａｃｃｃｔｇ ｔｃｔｇｃａｔｃｔｇｔａｇｇａｇａｃａｇａｇｔｃａｃａａｔｃａｃｔ ｔｇｃｃｇｇｇｃｃａｇｔｃａｇａａｔａｔｃａａｔａａｇｔｇｇｃｔｇ ｇｃｃｔｇｇｔａｔｃａｇｃａｇａｇａｃｃａｇｇｇａａａｇｃｃｃｃｔ ｃａｇｃｔｃｃｔｇａｔｃｔａｔａａｇｇｃｇｔｃｔａｇｔｔｔａｇａａ ａｇｔｇｇｇｇｔｃｃｃａｔｃｔａｇｇｔｔｃａｇｃｇｇｃａｇｔｇｇａ ｔｃｔｇｇｇａｃａｇａａｔａｃａｃｔｃｔｃａｃｃａｔｃａｇｃａｇｃ ｃｔｇｃａｇｃｃｔｇａｔｇａｔｔｔｔｇｃａａｃｔｔａｔｔａｃｔｇｃ ｃａａｃａａｔａｔａａｔａｇｔｔａｔｇｃｇａｃｇｔｔｃｇｇｃｃａａ ｇｇｇａｃｃａａｇｇｔｇｇａａａｔｃａａａｃｇｔ（配列番号７１）
ｓｃＦｖ	ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＴＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＮＩＮＫＷＬ ＡＷＹＱＱＲＰＧＫＡＰＱＬＬＩＹＫＡＳＳＬＥＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧ ＳＧＴＥＹＴＬＴＩＳＳＬＱＰＤＤＦＡＴＹＹＣＱＱＹＮＳＹＡＴＦＧＱ ＧＴＫＶＥＩＫＲＳＲＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＬＥＭＡＱＶＱＬ ＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＥＳＬＫＩＳＣＫＧＳＧＹＮＦＳＮＫＷＩＧＷＶ ＲＱＬＰＧＲＧＬＥＷＩＡＩＩＹＰＧＹＳＤＩＴＹＳＰＳＦＱＧＲＶＴＩ ＳＡＤＴＳＩＮＴＡＹＬＨＷＨＳＬＫＡＳＤＴＡＭＹＹＣＶＲＨＴＡＬＡ ＧＦＤＹＷＧＬＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号７２）

【表４－３】

抗原	ＷＴ１（Ｅｘｔ００２　＃１５）
ペプチド	ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号１）
ＤＮＡ	ｇａｃａｔｃｃａｇａｔｇａｃｃｃａｇｔｃｔｃｃｔｔｃｃａｃｃｃｔｇ ｔｃｔｇｃａｔｃｔｇｔａｇｇａｇａｃａｇａｇｔｃａｃａａｔｃａｃｔ ｔｇｃｃｇｇｇｃｃａｇｔｃａｇａａｔａｔｃａａｔａａｇｔｇｇｃｔｇ ｇｃｃｔｇｇｔａｔｃａｇｃａｇａｇａｃｃａｇｇｇｇａａａｇｃｃｃｃｔ ｃａｇｃｔｃｃｔｇａｔｃｔａｔａａｇｇｃｇｔｃｔａｇｔｔｔａｇａａ ａｇｔｇｇｇｇｔｃｃｃａｔｃｔａｇｇｔｔｃａｇｃｇｇｃａｇｔｇｇａ ｔｃｔｇｇｇａｃａｇａａｔａｃａｃｔｃｔｃａｃｃａｔｃａｇｃａｇｃ ｃｔｇｃａｇｃｃｔｇａｔｇａｔｔｔｔｇｃａａｃｔｔａｔｔａｃｔｇｃ ｃａａｃａａｔａｔａａｔａｇｔｔａｔｇｃｇａｃｇｔｔｃｇｇｃｃａａ ｇｇｇａｃｃａａｇｇｔｇｇａａａｔｃａａａｃｇｔｔｃｔａｇａｇｇｔ ｇｇｔｇｇｔｇｇｔａｇｃｇｇｃｇｇｃｇｇｃｇｇｃｔｃｔｇｇｔｇｇｔ ｇｇｔｇｇａｔｃｃｃｔｃｇａｇａｔｇｇｃｃｃａｇｇｔｇｃａｇｃｔｇ ｇｔｇｃａｇｔｃｔｇｇａｇｃａｇａｇｇｔｇａａａａａｇｃｃｃｇｇａ ｇａｇｔｃｔｃｔｇａａｇａｔｃｔｃｃｔｇｔａａｇｇｇｇｔｔｃｔｇｇｃ ｔａｃａａｃｔｔｔａｇｃａａｃａａｇｔｇｇａｔｃｇｇｃｔｇｇｇｇｔｇ ｃｇｃｃａａｔｔｇｃｃｃｇｇｇａｇａｇｇｃｃｔｇｇａｇｔｇｇａｔａ ｇｃａａｔｃａｔｃｔａｔｃｃｃｇｇｔｔａｃｔｃｇｇａｃａｔｃａｃｃ ｔａｃａｇｃｃｃｇｔｃｃｔｔｃｃａａｇｇｃｃｇｃｇｔｃａｃｃａｔｃ ｔｃｃｇｃｃｇａｃａｃｇｔｃｃａｔｔａａｃａｃｃｇｃｃｔａｃｃｔｇ ｃａｃｔｇｇｃａｃａｇｃｃｔｇａａｇｇｃｃｔｃｇｇａｃａｃｃｇｃｃ ａｔｇｔａｔｔａｔｔｇｔｇｔｇｃｇａｃａｃａｃａｇｃｔｔｔｇｇｃｃ ｇｇｃｔｔｔｇａｃｔａｃｔｇｇｇｇｃｃｔｇｇｇｃａｃｃｃｔｇｇｔｃ ａｃｃｇｔｃｔｃｃｔｃａ（配列番号７３）

【表５－１】

表５

抗原	ＷＴ１（Ｅｘｔ００２　＃１８）		
ペプチド	ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号１）		
ＣＤＲ：	１	２	３
ＶＨ	ＧＦＴＦＤＤＹＧＭＳ（配列番号７４）	ＧＩＮＷＮＧＧＳＴＧＹＡＤＳＶＲＧ（配列番号７５）	ＥＲＧＹＧＹＨＤＰＨＤＹ（配列番号７６）
ＤＮＡ	ｇｇｇｔｔｃａｃｃｔｔｔｇａｔｇａｔｔａｔｇｇｃａｔｇａｇｃ（配列番号７７）	ｇｇｔａｔｔａａｔｔｇｇａａｔｇｇｔｇｇｔａｇｃａｃａｇｇｔｔａｔｇｃａｇａｃｔｃｔｇｔｇａｇｇｇｇｃ（配列番号７８）	ｇａｇｃｇｔｇｇｃｔａｃｇｇｇｔａｃｃａｔｇａｔｃｃｃｃａｔｇａｃｔａｃ（配列番号７９）
ＶＬ	ＧＲＮＮＩＧＳＫＳＶＨ（配列番号８０）	ＤＤＳＤＲＰＳ（配列番号８１）	ＱＶＷＤＳＳＳＤＨＶＶ（配列番号８２）
ＤＮＡ	ｇｇｇａｇａａａｃａａｃａｔｔｇｇａａｇｔａａａａｇｔｇｔｇｃａｃ（配列番号８３）	ｇａｔｇａｔａｇｃｇａｃｃｇｇｃｃｃｔｃａ（配列番号８４）	ｃａｇｇｔｇｔｇｇｇａｔａｇｔａｇｔａｇｔｇａｔｃａｔｇｔｇｇｔａ（配列番号８５）

【表５－２】

抗原	ＷＴ１（Ｅｘｔ００２　＃１８）
ペプチド	ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号１）
完全ＶＨ	ＥＶＱＬＶＱＳＧＧＧＶＶＲＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＤＤＹＧ ＭＳＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＳＧＩＮＷＮＧＧＳＴＧＹＡＤＳＶＲＧ ＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＳＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＬＹＹＣＡＲＥ ＲＧＹＧＹＨＤＰＨＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号８６）
ＤＮＡ	ｇａａｇｔｇｃａｇｃｔｇｇｔｇｃａｇｔｃｔｇｇｇｇｇｇａｇｇｔｇｔｇ ｇｔａｃｇｇｃｃｔｇｇｇｇｇｇｇｔｃｃｃｔｇａｇａｃｔｃｔｃｃｔｇｔ ｇｃａｇｃｃｔｃｔｇｇｇｔｔｃａｃｃｔｔｔｇａｔｇａｔｔａｔｇｇｃ ａｔｇａｇｃｔｇｇｇｔｃｃｇｃｃａａｇｃｔｃｃａｇｇｇａａｇｇｇｇ ｃｔｇｇａｇｔｇｇｇｔｃｔｃｔｇｇｔａｔｔａａｔｔｇｇａａｔｇｇｔ ｇｇｔａｇｃａｃａｇｇｔｔａｔｇｃａｇａｃｔｃｔｇｔｇａｇｇｇｇｃ ｃｇａｔｔｃａｃｃａｔｃｔｃｃａｇａｇａｃａａｃｇｃｃａａｇａａｃ ｔｃｃｃｔｇｔａｔｃｔｇｃａａａｔｇａａｃａｇｔｃｔｇａｇａｇｃｃ ｇａｇｇａｃａｃｇｇｃｃｔｔｇｔａｔｔａｃｔｇｔｇｃｇａｇａｇａｇ ｃｇｔｇｇｃｔａｃｇｇｇｔａｃｃａｔｇａｔｃｃｃｃａｔｇａｃｔａｃ ｔｇｇｇｇｃｃａａｇｇｃａｃｃｃｔｇｇｔｇａｃｃｇｔｃｔｃｃｔｃａ （配列番号８７）
完全ＶＬ	ＱＳＶＶＴＱＰＰＳＶＳＶＡＰＧＫＴＡＲＩＴＣＧＲＮＮＩＧＳＫＳＶＨ ＷＹＱＱＫＰＧＱＡＰＶＬＶＶＹＤＤＳＤＲＰＳＧＩＰＥＲＦＳＧＳＮＳ ＧＮＴＡＴＬＴＩＳＲＶＥＡＧＤＥＡＤＹＹＣＱＶＷＤＳＳＳＤＨＶＶＦ ＧＧＧＴＫＬＴＶＬＧ（配列番号８８）
ＤＮＡ	ｃａｇｔｃｔｇｔｃｇｔｇａｃｇｃａｇｃｃｇｃｃｃｔｃｇｇｔｇｔｃａ ｇｔｇｇｃｃｃｃａｇｇａａａｇａｃｇｇｃｃａｇｇａｔｔａｃｃｔｇｔ ｇｇｇａｇａａａｃａａｃａｔｔｇｇａａｇｔａａａａｇｔｇｔｇｃａｃ ｔｇｇｔａｃｃａｇｃａｇａａｇｃｃａｇｇｃｃａｇｇｃｃｃｃｔｇｔｇ ｃｔｇｇｔｃｇｔｃｔａｔｇａｔｇａｔａｇｃｇａｃｃｇｇｃｃｃｔｃａ ｇｇｇａｔｃｃｃｔｇａｇｃｇａｔｔｃｔｃｔｇｇｃｔｃｃａａｃｔｃｔ ｇｇｇａａｃａｃｇｇｃｃａｃｃｃｔｇａｃｃａｔｃａｇｃａｇｇｇｔｃ ｇａａｇｃｃｇｇｇｇａｔｇａｇｇｃｃｇａｃｔａｔｔａｃｔｇｔｃａｇ ｇｔｇｔｇｇｇａｔａｇｔａｇｔａｇｔｇａｔｃａｔｇｔｇｇｔａｔｔｃ ｇｇｃｇｇａｇｇｇａｃｃａａｇｃｔｇａｃｃｇｔｃｃｔａｇｇｔ（配列番号８９）
ｓｃＦｖ	ＱＳＶＶＴＱＰＰＳＶＳＶＡＰＧＫＴＡＲＩＴＣＧＲＮＮＩＧＳＫＳＶＨ ＷＹＱＱＫＰＧＱＡＰＶＬＶＶＹＤＤＳＤＲＰＳＧＩＰＥＲＦＳＧＳＮＳ ＧＮＴＡＴＬＴＩＳＲＶＥＡＧＤＥＡＤＹＹＣＱＶＷＤＳＳＳＤＨＶＶＦ ＧＧＧＴＫＬＴＶＬＧＳＲＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＳＬＥＭＡＥＶＱＬ ＶＱＳＧＧＧＶＶＲＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＤＤＹＧＭＳＷＶ ＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＳＧＩＮＷＮＧＧＳＴＧＹＡＤＳＶＲＧＲＦＴＩ ＳＲＤＮＡＫＮＳＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＬＹＹＣＡＲＥＲＧＹＧ ＹＨＤＰＨＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号９０）

【表５－３】

抗原	ＷＴ１（Ｅｘｔ００２　＃１８）
ペプチド	ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号１）
ＤＮＡ	ｃａｇｔｃｔｇｔｃｇｔｇａｃｇｃａｇｃｃｇｃｃｃｔｃｇｇｔｇｔｃａ ｇｔｇｇｃｃｃｃａｇｇａａａｇａｃｇｇｃｃａｇｇａｔｔａｃｃｔｇｔ ｇｇｇａｇａａａｃａａｃａｔｔｇｇａａｇｔａａａａｇｔｇｔｇｃａｃ ｔｇｇｔａｃｃａｇｃａｇａａｇｃｃａｇｇｃｃａｇｇｃｃｃｃｔｇｔｇ ｃｔｇｇｔｃｇｔｃｔａｔｇａｔｇａｔａｇｃｇａｃｃｇｇｃｃｃｔｃａ ｇｇｇａｔｃｃｃｔｇａｇｃｇａｔｔｃｔｃｔｇｇｃｔｃｃａａｃｔｃｔ ｇｇｇａａｃａｃｇｇｃｃａｃｃｃｔｇａｃｃａｔｃａｇｃａｇｇｇｔｃ ｇａａｇｃｃｇｇｇｇａｔｇａｇｇｃｃｇａｃｔａｔｔａｃｔｇｔｃａｇ ｇｔｇｔｇｇｇａｔａｇｔａｇｔａｇｔｇａｔｃａｔｇｔｇｇｔａｔｔｃ ｇｇｃｇｇａｇｇｇａｃｃａａｇｃｔｇａｃｃｇｔｃｃｔａｇｇｔｔｃｔ ａｇａｇｇｔｇｇｔｇｇｔｇｇｔａｇｃｇｇｃｇｇｃｇｇｃｇｇｃｔｃｔ ｇｇｔｇｇａｔｃｃｃｔｃｇａｇａｔｇｇｃｃｇａａｇｔｇｃａｇｃｔｇ ｇｔｇｃａｇｔｃｔｇｇｇｇｇａｇｇｔｇｔｇｇｔａｃｇｇｃｃｔｇｇｇ ｇｇｇｔｃｃｃｔｇａｇａｃｔｃｔｃｃｔｇｔｇｃａｇｃｃｔｃｔｇｇｇ ｔｔｃａｃｃｔｔｔｇａｔｇａｔｔａｔｇｇｃａｔｇａｇｃｔｇｇｇｔｃ ｃｇｃｃａａｇｃｔｃｃａｇｇｇａａｇｇｇｇｃｔｇｇａｇｔｇｇｇｔｃ ｔｃｔｇｇｔａｔｔａａｔｔｇｇａａｔｇｇｔｇｇｔａｇｃａｃａｇｇｔ ｔａｔｇｃａｇａｃｔｃｔｇｔｇａｇｇｇｇｃｃｇａｔｔｃａｃｃａｔｃ ｔｃｃａｇａｇａｃａａｃｇｃｃａａｇａａｃｔｃｃｃｔｇｔａｔｃｔｇ ｃａａａｔｇａａｃａｇｔｃｔｇａｇａｇｃｃｇａｇｇａｃａｃｇｇｃｃ ｔｔｇｔａｔｔａｃｔｇｔｇｃｇａｇａｇａｇｃｇｔｇｇｃｔａｃｇｇｇ ｔａｃｃａｔｇａｔｃｃｃｃａｔｇａｃｔａｃｔｇｇｇｇｃｃａａｇｇｃ ａｃｃｃｔｇｇｔｇａｃｃｇｔｃｔｃｃｔｃａ（配列番号９１）

【表６－１】

表６

抗原	ＷＴ１（Ｅｘｔ００２　＃２３）		
ペプチド	ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号１）		
ＣＤＲ：	１	２	３
ＶＨ	ＧＦＳＶＳＧＴＹＭＧ （配列番号９２）	ＬＬＹＳＧＧＧＴＹＨＰ ＡＳＬＱＧ （配列番号９３）	ＧＧＡＧＧＧＨＦＤ Ｓ （配列番号９４）
ＤＮＡ	ｇｇｇｔｔｃｔｃｃｇ ｔｃａｇｔｇｇｃａｃ ｃｔａｃａｔｇｇｇｃ （配列番号９５）	ｃｔｔｃｔｔｔａｔａｇ ｔｇｇｔｇｇｃｇｇｃａ ｃａｔａｃｃａｃｃｃａ ｇｃｇｔｃｃｃｔｇｃａ ｇｇｇｃ （配列番号９６）	ｇａｇｇｇｇｃａｇ ｇａｇｇｔｇｇｃｃ ａｃｔｔｔｇａｃｔ ｃｃ（配列番号９７ ）
ＶＬ	ＴＧＳＳＳＮＩＧＡＧ ＹＤＶＨ （配列番号９８）	ＧＮＳＮＲＰＳ （配列番号９９）	ＡＡＷＤＤＳＬＮＧ ＹＶ （配列番号１００）
ＤＮＡ	ａｃｔｇｇｇａｇｃａ ｇｃｔｃｃａａｃａｔ ｃｇｇｇｇｃａｇｇｔ ｔａｔｇａｔｇｔａｃ ａｃ （配列番号１０１）	ｇｇｔａａｃａｇｃａａ ｔｃｇｇｃｃｃｔｃａ （配列番号１０２）	ｇｃａｇｃａｔｇｇ ｇａｔｇａｃａｇｃ ｃｔｇａａｔｇｇｔ ｔａｔｇｔｃ （配列番号１０３）

【表６－２】

抗原	ＷＴ１（Ｅｘｔ００２　＃２３）
ペプチド	ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号１）
完全ＶＨ	ＥＶＱＬＶＥＴＧＧＧＬＬＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＳＶＳＧＴＹ ＭＧＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＡＬＬＹＳＧＧＧＴＹＨＰＡＳＬＱＧＲ ＦＩＶＳＲＤＳＳＫＮＭＶＹＬＱＭＮＳＬＫＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＫＧＧ ＡＧＧＧＨＦＤＳＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号１０４）
ＤＮＡ	ｇａｇｇｔｇｃａｇｃｔｇｇｔｇｇａｇａｃｃｇｇａｇｇａｇｇｃｔｔｇ ｃｔｃｃａｇｃｃｇｇｇｇｇｇｇｔｃｃｃｔｃａｇａｃｔｃｔｃｃｔｇｔ ｇｃａｇｃｃｔｃｔｇｇｇｔｔｃｔｃｃｇｔｃａｇｔｇｇｃａｃｃｔａｃ ａｔｇｇｇｃｔｇｇｇｔｃｃｇｃｃａｇｇｃｔｃｃａｇｇｇａａｇｇｇａ ｃｔｇｇａｇｔｇｇｇｔｃｇｃａｃｔｔｃｔｔｔａｔａｇｔｇｇｔｇｇｃ ｇｇｃａｃａｔａｃｃａｃｃｃａｇｃｇｔｃｃｃｔｇｃａｇｇｇｃｃｇａ ｔｔｃａｔｃｇｔｃｔｃｃａｇａｇａｃａｇｃｔｃｃａａｇａａｔａｔｇ ｇｔｃｔａｔｃｔｔｃａａａｔｇａａｔａｇｃｃｔｇａａａｇｃｃｇａｇ ｇａｃａｃｇｇｃｃｇｔｃｔａｔｔａｃｔｇｔｇｃｇａａａｇｇａｇｇｇ ｇｃａｇｇａｇｇｔｇｇｃｃａｃｔｔｔｇａｃｔｃｃｔｇｇｇｇｃｃａａ ｇｇｃａｃｃｃｔｇｇｔｇａｃｃｇｔｃｔｃｃｔｃａ （配列番号１０５）
完全ＶＬ	ＱＳＶＬＴＱＰＰＳＶＳＧＡＰＧＱＲＶＴＩＳＣＴＧＳＳＳＮＩＧＡＧＹ ＤＶＨＷＹＱＱＬＰＧＴＡＰＫＬＬＩＹＧＮＳＮＲＰＳＧＶＰＤＲＦＳＧ ＳＫＳＧＴＳＡＳＬＡＩＳＧＬＱＳＥＤＥＡＤＹＹＣＡＡＷＤＤＳＬＮＧ ＹＶＦＧＴＧＴＫＬＴＶＬＧ（配列番号１０６）
ＤＮＡ	ｃａｇｔｃｔｇｔｇｔｔｇａｃｇｃａｇｃｃｇｃｃｃｔｃａｇｔｇｔｃｔ ｇｇｇｇｃｃｃｃａｇｇｇｃａｇａｇｇｇｔｃａｃｃａｔｃｔｃｃｔｇｃ ａｃｔｇｇｇａｇｃａｇｃｔｃｃａａｃａｔｃｇｇｇｇｇｃａｇｇｔｔａｔ ｇａｔｇｔａｃａｃｔｇｇｔａｃｃａｇｃａｇｃｔｔｃｃａｇｇａａｃａ ｇｃｃｃｃｃａａａｃｔｃｃｔｃａｔｃｔａｔｇｇｔａａｃａｇｃａａｔ ｃｇｇｃｃｃｔｃａｇｇｇｇｔｃｃｃｔｇａｃｃｇａｔｔｃｔｃｔｇｇｃ ｔｃｃａａｇｔｃｔｇｇｃａｃｃｔｃａｇｃｃｔｃｃｃｔｇｇｃｃａｔｃ ａｇｔｇｇｇｃｔｃｃａｇｔｃｔｇａｇｇａｔｇａｇｇｃｔｇａｔｔａｔ ｔａｃｔｇｔｇｃａｇｃａｔｇｇｇａｔｇａｃａｇｃｃｔｇａａｔｇｇｔ ｔａｔｇｔｃｔｔｃｇｇａａｃｔｇｇｇａｃｃａａｇｃｔｇａｃｃｇｔｃ ｃｔａｇｇｔ（配列番号１０７）
ｓｃＦｖ	ＱＳＶＬＴＱＰＰＳＶＳＧＡＰＧＱＲＶＴＩＳＣＴＧＳＳＳＮＩＧＡＧＹ ＤＶＨＷＹＱＱＬＰＧＴＡＰＫＬＬＩＹＧＮＳＮＲＰＳＧＶＰＤＲＦＳＧ ＳＫＳＧＴＳＡＳＬＡＩＳＧＬＱＳＥＤＥＡＤＹＹＣＡＡＷＤＤＳＬＮＧ ＹＶＦＧ　ＴＧＴＫＬＴＶＬＧＳＲＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＬＥ ＭＡＥＶＱＬＶＥＴＧＧＧＬＬＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＳＶＳＧ ＴＹＭＧＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＡＬＬＹＳＧＧＧＴＹＨＰＡＳＬＱ ＧＲＦＩＶＳＲＤＳＳＫＮＭＶＹＬＱＭＮＳＬＫＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＫ ＧＧＡＧＧＧＨＦＤＳＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号１０８）

【表６－３】

抗原	ＷＴ１（Ｅｘｔ００２　＃２３）
ペプチド	ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号１）
ＤＮＡ	ｃａｇｔｃｔｇｔｇｔｔｇａｃｇｃａｇｃｃｇｃｃｃｔｃａｇｔｇｔｃｔ ｇｇｇｇｃｃｃｃａｇｇｇｃａｇａｇｇｇｔｃａｃｃａｔｃｔｃｃｔｇｃ ａｃｔｇｇｇａｇｃａｇｃｔｃｃａａｃａｔｃｇｇｇｇｃａｇｇｔｔａｔ ｇａｔｇｔａｃａｃｔｇｇｔａｃｃａｇｃａｇｃｔｔｃｃａｇｇａａｃａ ｇｃｃｃｃｃａａａｃｔｃｃｔｃａｔｃｔａｔｇｇｔａａｃａｇｃａａｔ ｃｇｇｃｃｃｔｃａｇｇｇｇｔｃｃｃｔｇａｃｃｇａｔｔｃｔｃｔｇｇｃ ｔｃｃａａｇｔｃｔｇｇｃａｃｃｔｃａｇｃｃｔｃｃｃｔｇｇｃｃａｔｃ ａｇｔｇｇｇｃｔｃｃａｇｔｃｔｇａｇｇａｔｇａｇｇｃｔｇａｔｔａｔ ｔａｃｔｇｔｇｃａｇｃａｔｇｇｇａｔｇａｃａｇｃｃｔｇａａｔｇｇｔ ｔａｔｇｔｃｔｔｃｇｇａａｃｔｇｇｇａｃｃａａｇｃｔｇａｃｃｇｔｃ ｃｔａｇｇｔｔｃｔａｇａｇｇｔｇｇｔｇｇｔｇｇｔａｇｃｇｇｃｇｇｃ ｇｇｃｇｇｃｔｃｔｇｇｔｇｇｔｇｇｔｇｇａｔｃｃｃｔｃｇａｇａｔｇ ｇｃｃｇａｇｇｔｇｃａｇｃｔｇｇｔｇｇａｇａｃｃｇｇａｇｇａｇｇｃ ｔｔｇｃｔｃｃａｇｃｃｇｇｇｇｇｇｇｇｔｃｃｃｔｃａｇａｃｔｃｔｃｃ ｔｇｔｇｃａｇｃｃｔｃｔｇｇｇｔｔｃｔｃｃｇｔｃａｇｔｇｇｃａｃｃ ｔａｃａｔｇｇｇｃｔｇｇｇｔｃｃｇｃｃａｇｇｃｔｃｃａｇｇｇｇａａｇ ｇｇａｃｔｇｇａｇｔｇｇｇｔｃｇｃａｃｔｔｃｔｔｔａｔａｇｔｇｇｔ ｇｇｃｇｇｃａｃａｔａｃｃａｃｃｃａｇｃｇｔｃｃｃｔｇｃａｇｇｇｃ ｃｇａｔｔｃａｔｃｇｔｃｔｃｃａｇａｇａｃａｇｃｔｃｃａａｇａａｔ ａｔｇｇｔｃｔａｔｃｔｔｃａａａｔｇａａｔａｇｃｃｔｇａａａｇｃｃ ｇａｇｇａｃａｃｇｇｃｃｇｔｃｔａｔｔａｃｔｇｔｇｃｇａａａｇｇａ ｇｇｇｇｃａｇｇａｇｇｔｇｇｃｃａｃｔｔｔｇａｃｔｃｃｔｇｇｇｇｃ ｃａａｇｇｃａｃｃｃｔｇｇｔｇａｃｃｇｔｃｔｃｃｔｃａ（配列番号１０９）

【表７－１】

表７

抗原	ＣＤ３／Ｌ２Ｋ
完全ＶＨ	ＤＤＩＶＬＴＱＳＰＡＴＬＳＬＳＰＧＥＲＡＴＬＳＣＲＡＳＱＳＶＳＹＭＮ ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＶＡＳＧＶＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧ ＴＤＹＳＬＴＩＮＳＬＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＬＴＦＧＧＧＴ ＫＶＥＩＫ　（配列番号１１１）
完全ＶＬ	ＤＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭ ＨＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＩＧＹＩＮＰＳＲＧＹＴＮＹＡＤＳＶＫＧＲＦ ＴＩＴＴＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＴＹＹＣＡＲＹＹＤＤ ＨＹＣＬＤＹＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳ （配列番号１１２）
ｓｃＦｖ	ＤＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭ ＨＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＩＧＹＩＮＰＳＲＧＹＴＮＹＡＤＳＶＫＧＲＦ ＴＩＴＴＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＴＹＹＣＡＲＹＹＤＤ ＨＹＣＬＤＹＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳＧＥＧＴＳＴＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＡ ＤＤＩＶＬＴＱＳＰＡＴＬＳＬＳＰＧＥＲＡＴＬＳＣＲＡＳＱＳＶＳＹＭＮ ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＶＡＳＧＶＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧ ＴＤＹＳＬＴＩＮＳＬＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＬＴＦＧＧＧＴ ＫＶＥＩＫ （配列番号１１３）

【表７－２】

抗原	ＣＤ３／Ｌ２Ｋ
ＤＮＡ（シグナル配列及びｈｉｓタグなし）	c a g g c t g t c g t g a c t c a g c c t c c t t c t g c t t c t g g c a c c c c t g g c c a g a g a g t g a c c a t c t c c t g c t c c g g c t c c t c c t c c a a c a t c g g c t c c a a c a c c g t g a a c t g g t a t c a g c a g g t g c c c g g c a c c g c c c c c a a g c t g c t g a t c t a c t c t a a c a a c c a g c g g c c c t c c g g c g t g c c c g a c a g a t t c t c t g g c t c t a a g t c c g g c a c c t c c g c c t c c c t g g c t a t c t c t g g c c t g c a g t c t g a g g a c g a g g c c g a c t a c t a c t g c g c c g c c t g g g a c g a t t c t c t g a a c g g c t g g g g t g t t c g g c g g a g g c a c c a a g c t g a c a g t g c t g g g a a g t a g a g g c g g t g g c g g a t c t g g t g g c g g a g g a t c t g g c g g a g g g g g c t c t c t g g a a a t g g c c c a g a t g c a g c t g g t g c a g t c t g g c g c c g a a g t g a a a g a g c c t g g c g a g t c c c t g c g g a t c t c c t g c a a g g g c t c c g g c t a c a g c t t t a c c a a c t t c t g g a t c a g c t g g g g t g c g a c a g a t g c c c g g c a a g g g c c t g g a a t g g a t g g g c a g a g t g g a c c c c g g c t a c t c c t a c t c c a c c t a c t c c c c c a g c t t c c a g g g c c a c g t g a c c a t c a g c g c c g a c a a g t c t a c c t c c a c c g c c t a c c t g c a g t g g a a c t c c c t g a a g g c c t c c g a c a c c g c c a t g t a c t a c t g t g c c c g g g g t g c a g t a c a g c g g c t a c t a c g a t t g g t t c g a c c c c t g g g g c c a g g g c a c c c t c g t g a c a g t g t c t a g t g g c g g g g g g a g g a t c c g a c g t g c a g c t g g t g c a g a g c g g a g c t g a a g t g a a g a a a c c t g g c g c c t c c g t g a a g g t g t c c t g c a a a g c t a g c g g c t a t a c c t t c a c c c g g t a c a c c a t g c a c t g g g t g c g c c a g g c a c c t g g a c a g g g g a c t g g a a t g g a t c g g c t a c a t c a a c c c c t c c c g g g g c t a c a c c a a c t a c g c c g a c t c t g t g a a g g g c c g g t t c a c c a t c a c c a c c g a t a a g t c c a c c a g c a c c g c t t a c a t g g a a c t g t c c t c c c t g a g a t c c g a g g a c a c c g c t a c c t a c t a t t g c g c c c g g t a c t a c g a c g a c c a c t a c t g c c t g g a c t a c t g g g g a c a g g g g a a c c a c a g t g a c c g t g t c c t c t g g c g a g g g c a c c t c t a c t g g a t c t g g g g g a a g t g g t g g t t c t g g c g g c g c t g a c g a c a t c g t g c t g a c c c a g t c t c c a g c c a c c c t g t c t c t g a g c c c a g g c g a g a g a g c t a c c c t g t c c t g c a g a g c c t c c c a g t c c g t g t c c t a c a t g a a t t g g t a t c a g c a g a a g c c t g g c a a g g c c c c t a a g c g g t g g a t c t a c g a c a c c t c c a a g g t g g c c t c t g g c g t g c c a g c c c g g t t t t c c g g a t c t g g c t c t g g c a c c g a c t a c t c c c t g a c c a t c a a c a g c c t g g a a g c c g a g g a c g c t g c c a c c t a t t a c t g c c a g c a g t g g t c c t c c a a c c c c c c t g a c c t t t g g a g g c g g c a c c a a g g t g g a a a t c a a g （配列番号１１４）

【表７－３】

抗原	ＣＤ３／Ｌ２Ｋ
ＤＮＡ（シグナル配列及びヘキサヒスチジンタグを持つ	atggctggtcctgcatcatcctgttctggtgg ctaccgccaccggccaggctgtcgtgactcagcc tccttctgcttctggcaccccctggccagagagtg accatctcctgctccggctcctcctccaacatcg gctccaacaccgtgaactggtatcagcaggtgcc cggcaccgccccccaagctgctgatctactctaac aaccagcggccctccgggcgtgccccgacagattct ctggctctaagtccggcacctccgccctcccctggc tatctctggccctgcagtctgaggacgaggccgac tactactgcgccgccctgggacgatttctctgaacg gctgggtgttcggcggaggcaccaagctgacagt gctgggaagtagaggcggtggcggatctggtggc ggaggatctggcgggaggggggctctctggaaatgg cccagatgcagctggtgcagtctggcgccgaagt gaaagagcctggcgagtccctgcggatctcctgc aagggctccggctacagctttaccaacttctgga tcagctgggtgcgacagatgcccgggcaagggcct ggaatggatgggcagagtggacccccggctactcc tactcccacctactcccccccagcttccagggccacg tgaccatcagcgccgacaagtctacctccaccgc ctaccctgcagtggaactccctgaaggcctccgac accgccatgtactactgtgcccgggtgcagtaca gcggctactacgattggttcgaccccctggggccca gggcaccctcgtgacagtgtctagtggcgggggga ggatccgacgtgcagctggtgcagagcggagctg aagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaagctagcggctataccttcaccccggtac accatgcactgggtgcgccaggcacctggacagg gactggaatggatcggctacatcaaccccctcccg gggctacaccaactacgccgactctgtgaagggc cggttcaccatcaccaccgataagtccaccagca ccgcttacatggaactgtcctccctgagatccga ggacaccgctacctactattgcgcccggtactac gacgaccactactgcctggactactggggacagg gaaccacagtgaccgtgtcctctggcgagggcac ctctactggatctgggggaagtggtggttctggc ggcgctgacgacatcgtgctgacccagtctccag ccaccctgtctctgagcccaggcgagagagctac cctgtccctgcagagcctcccagtccgtgtcctac atgaattggtatcagcagaagcctggcaaggccc ctaagcggtggatctacgacacctccaaggtggc ctctggcgtgcccagccccggttttccggatctggc tctggcaccgactactccctgaccatcaacagcc tggaagccgaggacgctgccacctattactgcca gcagtggtcctccaaccccctgacctttggaggc ggcaccaaggtggaaatcaagcaccaccatcatc accactgatag （配列番号１１５）

【００７３】

一実施形態では、ＥＳＫ１二重特異性抗体は、ＷＴ１／ＨＬＡ－Ａ２に特異的に結合する第１の抗体結合部分を含み、表１～６に記載されるＷＴ１／ＨＬＡ－Ａ２抗体のアミノ酸配列のうちの１つと、ＣＤ３に結合する抗原結合部分とを含み、上記表７に示されるア

ミノ酸配列を含む。一実施形態では、抗体は、図１０に示されるアミノ酸配列（配列番号１１０）を有する。別の実施形態では、ＥＳＫ１二重特異性抗体は、ＷＴ１／ＨＬＡ－Ａ２に特異的に結合する第１の抗体結合部分を含み、表８に記載されるＷＴ１／ＨＬＡ－Ａ２抗体のアミノ酸配列のうちの１つと、ＯＫＴ３に結合する抗原結合部分とを含み、表９に示されるアミノ酸配列を含む。

【表８－１】

表８

抗原	ＷＴ１		
ＣＤＲ：	1	2	3
ＶＨ	ＧＹＳＦＴＮＦＷＩＳ（配列番号１１６）	ＲＶＤＰＧＹＳＹＳＴＹＳＰＳＦＱ（配列番号１１７）	ＶＱＹＳＧＹＹＤＷＦＤＰ（配列番号１１８）
ＤＮＡ	ｇｇａｔａｃａｇｃｔｔｃａｃｃａａｃｔｔｃｔｇｇａｔｃａｇｃ（配列番号１１９）	ａｇｇｇｔｔｇａｔｃｃｔｇｇｃｔａｃｔｃｔｔａｔａｇｃａｃｃｔａｃａｇｃｃｃｇｔｃｃｔｔｃｃａａｇｇｃ（配列番号１２０）	ｇｔａｃａａｔａｔａｇｔｇｇｃｔａｃｔａｔｇａｃｔｇｇｔｔｃｇａｃｃｃｃ（配列番号１２１）
ＶＬ	ＳＧＳＳＳＮＩＧＳＮＴＶＮ（配列番号１２２）	ＳＮＮＱＲＰＳ（配列番号１２３）	ＡＡＷＤＤＳＬＮＧＷＶ（配列番号１２４）
ＤＮＡ	ｔｃｔｇｇａａｇｃａｇｃｔｃｃａａｃａｔｃｇｇａａｇｔａａｔａｃｔｇｔａａａｃ（配列番号１２５）	ａｇｔａａｔａａｔｃａｇｃｇｇｃｃｃｔｃａ（配列番号１２６）	ｇｃａｇｃａｔｇｇｇａｔｇａｃａｇｃｃｔｇａａｔｇｇｔｔｇｇｇｔｇ（配列番号１２７）
完全ＶＨ	ＱＭＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＥＰＧＥＳＬＲＩＳＣＫＧＳＧＹＳＦＴＮＦＷＩＳＷＶＲＱＭＰＧＫＧＬＥＷＭＧＲＶＤＰＧＹＳＹＳＴＹＳＰＳＦＱＧＨＶＴＩＳＡＤＫＳＴＳＴＡＹＬＱＷＮＳＬＫＡＳＤＴＡＭＹＹＣＡＲＶＱＹＳＧＹＹＤＷＦＤＰＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＲＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＡＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＲＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ*（配列番号１２８）		

【表８－２】

抗原	WT１
DNA	cagatgcagctggtgcagtctggcgccgaagtga aagagcctggcgagtccctgcggatctcctgcaa gggctccggctactcctttaccaacttctggatc agctgggtgcgacagatgcccgggcaagggcctgg aatggatggggcagagtggacccccggctacagcta ctccacctactcccccagcttccagggccacgtg accatctccgccgacaagtctacctccaccgcct acctgcagtggaactccctgaaggcctccgacac cgccatgtactactgcgccagagtgcagtacagc ggctactacgattggttcgaccccctggggccagg gcaccctcgtgacagtgtcctctgcttccaccaa gggcccatcggtcttccccctggcaccctcctcc aagagcacctctgggggcacagcggccctgggct gcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgac ggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggc gtgcacaccttcccggccgtcctacagtcctcag gactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcc ctccagcagcttgggcacccagacctacatctgc aacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgg acaagagagttgagcccaaatcttgtgacaaaac tcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactc ctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaa aacccaaggacaccctcatgatctcccggacccc tgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccac gaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtgg acggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagcc gcggggaggagcagtacgccagcacgtaccgtgtg gtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc tgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaa caaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatc tccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagg tgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgac caagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaa ggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtggg agagcaatgggcagccggagaacaactacaagac cacgcctcccgtgctggactccgacggctccttc ttcctctacagcaggctcaccgtggacaagagca ggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgt gatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcag aagagcctctccctgtctccgggtaaatga （配列番号１２９）

【表８－３】

抗原	ＷＴ１
完全ＶＬ	ＱＡＶＶＴＱＰＰＳＡＳＧＴＰＧＱＲＶＴＩＳＣＳＧＳＳＳＮＩＧＳＮＴＶ ＮＷＹＱＱＶＰＧＴＡＰＫＬＬＩＹＳＮＮＱＲＰＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＫＳ ＧＴＳＡＳＬＡＩＳＧＬＱＳＥＤＥＡＤＹＹＣＡＡＷＤＤＳＬＮＧＷＶＦＧ ＧＧＴＫＬＴＶＬＧＱＰＫＡＮＰＴＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮＫＡＴＬ ＶＣＬＩＳＤＦＹＰＧＡＶＴＶＡＷＫＡＤＧＳＰＶＫＡＧＶＥＴＴＫＰＳＫ ＱＳＮＮＫＹＡＡＳＳＹＬＳＬＴＰＥＱＷＫＳＨＲＳＹＳＣＱＶＴＨＥＧＳ ＴＶＥＫＴＶＡＰＴＥＣＳ* （配列番号１３０）
ＤＮＡ	ＣＡＧＧＣＴＧＴＣＧＴＧＡＣＴＣＡＧＣＣＴＣＣＴＴＣＴＧＣＴＴＣＴＧ ＧＣＡＣＣＣＣＴＧＧＣＣＡＧＡＧＡＧＴＧＡＣＣＡＴＣＴＣＣＴＧＣＴＣ ＣＧＧＣＴＣＣＴＣＣＴＣＣＡＡＣＡＴＣＧＧＣＴＣＣＡＡＣＡＣＣＧＴＧ ＡＡＣＴＧＧＴＡＴＣＡＧＣＡＧＧＴＧＣＣＣＧＧＣＡＣＣＧＣＣＣＣＣＡ ＡＧＣＴＧＣＴＧＡＴＣＴＡＣＴＣＴＡＡＣＡＡＣＣＡＧＣＧＧＣＣＣＴＣ ＣＧＧＣＧＴＧＣＣＣＧＡＣＡＧＡＴＴＣＴＣＴＧＧＣＴＣＴＡＡＧＴＣＣ ＧＧＣＡＣＣＴＣＣＧＣＣＴＣＣＣＴＧＧＣＴＡＴＣＴＣＴＧＧＣＣＴＧＣ ＡＧＴＣＴＧＡＧＧＡＣＧＡＧＧＣＣＧＡＣＴＡＣＴＡＣＴＧＣＧＣＣＧＣ ＣＴＧＧＧＡＣＧＡＴＴＣＴＣＴＧＡＡＣＧＧＣＴＧＧＧＴＧＴＴＣＧＧＣ ＧＧＡＧＧＣＡＣＣＡＡＧＣＴＧＡＣＡＧＴＧＣＴＧＧＧＣＣＡＧＣＣＴＡ ＡＧＧＣＣＡＡＣＣＣＴＡＣＣＧＴＧＡＣＣＣＴＧＴＴＣＣＣＣＣＣＡＴＣ ＣＴＣＣＧＡＧＧＡＡＣＴＧＣＡＧＧＣＴＡＡＣＡＡＧＧＣＣＡＣＣＣＴＣ ＧＴＧＴＧＣＣＴＧＡＴＣＴＣＣＧＡＣＴＴＣＴＡＣＣＣＴＧＧＣＧＣＣＧ ＴＧＡＣＣＧＴＧＧＣＣＴＧＧＡＡＧＧＣＴＧＡＴＧＧＡＴＣＴＣＣＴＧＴ ＧＡＡＧＧＣＣＧＧＣＧＴＧＧＡＡＡＣＣＡＣＣＡＡＧＣＣＣＴＣＣＡＡＧ ＣＡＧＴＣＣＡＡＣＡＡＣＡＡＡＴＡＣＧＣＣＧＣＣＴＣＣＴＣＣＴＡＣＣ ＴＧＴＣＣＣＴＧＡＣＣＣＣＴＧＡＧＣＡＧＴＧＧＡＡＧＴＣＣＣＡＣＣＧ ＧＴＣＣＴＡＣＡＧＣＴＧＣＣＡＡＧＴＧＡＣＣＣＡＣＧＡＧＧＧＣＴＣＣ ＡＣＣＧＴＧＧＡＡＡＡＧＡＣＣＧＴＧＧＣＴＣＣＴＡＣＣＧＡＧＴＧＣＴ ＣＣＴＡＧ （配列番号１３１）
ｓｃＦｖ	ＱＡＶＶＴＱＰＰＳＡＳＧＴＰＧＱＲＶＴＩＳＣＳＧＳＳＳＮＩＧＳＮＴＶ ＮＷＹＱＱＶＰＧＴＡＰＫＬＬＩＹＳＮＮＱＲＰＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＫＳ ＧＴＳＡＳＬＡＩＳＧＬＱＳＥＤＥＡＤＹＹＣＡＡＷＤＤＳＬＮＧＷＶＦＧ ＧＧＴＫＬＴＶＬＧＳＲＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＬＥＭＡＱＭＱＬ ＶＱＳＧＡＥＶＫＥＰＧＥＳＬＲＩＳＣＫＧＳＧＹＳＦＴＮＦＷＩＳＷＶＲ ＱＭＰＧＫＧＬＥＷＭＧＲＶＤＰＧＹＳＹＳＴＹＳＰＳＦＱＧＨＶＴＩＳＡ ＤＫＳＴＳＴＡＹＬＱＷＮＳＬＫＡＳＤＴＡＭＹＹＣＡＲＶＱＹＳＧＹＹＤ ＷＦＤＰＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ （配列番号１３２）

【表８－４】

抗原	ＷＴ１
ｓｃＦｖ ＤＮＡ	ｃａｇｇｃｔｇｔｇｇｔｇａｃｔｃａｇｃｃａｃｃｃｔｃａｇｃｇｔｃｔｇ ｇｇａｃｃｃｃｃｇｇｇｃａｇａｇｇｇｔｃａｃｃａｔｃｔｃｔｔｇｔｔｃ ｔｇｇａａｇｃａｇｃｔｃｃａａｃａｔｃｇｇａａｇｔａａｔａｃｔｇｔａ ａａｃｔｇｇｔａｃｃａｇｃａｇｇｔｃｃｃａｇｇａａｃｇｇｃｃｃｃｃａ ａａｃｔｃｃｔｃａｔｃｔａｔａｇｔａａｔａａｔｃａｇｃｇｇｃｃｃｔｃ ａｇｇｇｇｔｃｃｃｔｇａｃｃｇａｔｔｃｔｃｔｇｇｃｔｃｃａａｇｔｃｔ ｇｇｃａｃｃｔｃａｇｃｃｔｃｃｃｔｇｇｃｃａｔｃａｇｔｇｇｇｃｔｃｃ ａｇｔｃｔｇａｇｇａｔｇａｇｇｃｔｇａｔｔａｔｔａｃｔｇｔｇｃａｇｃ ａｔｇｇｇａｔｇａｃａｇｃｃｔｇａａｔｇｇｔｔｇｇｇｔｇｔｔｃｇｇｃ ｇｇａｇｇｇａｃｃａａｇｃｔｇａｃｃｇｔｃｃｔａｇｇｔｔｃｔａｇａｇ ｇｔｇｇｔｇｇｔｇｇｔａｇｃｇｇｃｇｇｃｇｇｃｇｇｃｔｃｔｇｇｔｇｇ ｔｇｇｔｇｇａｔｃｃｃｔｃｇａｇａｔｇｇｃｃｃａｇａｔｇｃａｇｃｔｇ ｇｔｇｃａｇｔｃｃｇｇａｇｃａｇａｇｇｔｇａａａｇａｇｃｃｃｇｇｇｇ ａｇｔｃｔｃｔｇａｇｇａｔｃｔｃｃｔｇｔａａｇｇｇｔｔｃｔｇｇａｔａ ｃａｇｃｔｔｃａｃｃａａｃｔｔｃｔｇｇａｔｃａｇｃｔｇｇｇｔｇｃｇｃ ｃａｇａｔｇｃｃｃｇｇｇａａａｇｇｃｃｔｇｇａｇｔｇｇａｔｇｇｇｇａ ｇｇｇｔｔｇａｔｃｃｔｇｇｃｔａｃｔｃｔｔａｔａｇｃａｃｃｔａｃａｇ ｃｃｃｇｔｃｃｔｔｃｃａａｇｇｃｃａｃｇｔｃａｃｃａｔｃｔｃａｇｃｔ ｇａｃａａｇｔｃｔａｃｃａｇｃａｃｔｇｃｃｔａｃｃｔｇｃａｇｔｇｇａ ａｃａｇｃｃｔｇａａｇｇｃｃｔｃｇｇａｃａｃｃｇｃｃａｔｇｔａｔｔａ ｃｔｇｔｇｃｇａｇａｇｔａｃａａｔａｇｔｇｇｃｔａｃｔａｔｇａｃ ｔｇｇｔｔｃｇａｃｃｃｃｔｇｇｇｇｃｃａｇｇｇａａｃｃｃｔｇｇｔｃａ ｃｃｇｔｃｔｃｃｔｃａ （配列番号１３３）

【表９－１】

表９

抗原	ＯＫＴ３
完全ＶＨ	ＱＶＱＬＶＱＳＧＧＧＶＶＱＰＧＲＳＬＲＬＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＲＹＴＭＨ ＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＩＧＹＩＮＰＳＲＧＹＴＮＹＮＱＫＦＫＤＲＦＴＩ ＳＲＤＮＳＫＮＴＡＦＬＱＭＤＳＬＲＰＥＤＴＧＶＹＦＣＡＲＹＹＤＤＨＹＣ ＬＤＹＷＧＱＧＴＰＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧ ＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶ ＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮ ＴＫＶＤＫＲＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦ ＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹ ＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＡＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷ ＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶ ＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳ ＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＬＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱ ＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ* （配列番号１３４）

【表９－２】

抗原	ＯＫＴ３
ＤＮＡ	ＣＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＧＴＧＣＡＧＴＣＣＧＧＣＧＧＣＧＧＣＧＴＧＧＴ ＧＣＡＧＣＣＣＧＧＣＣＧＧＴＣＣＣＴＧＣＧＧＣＴＧＴＣＣＴＧＣＡＡＧＧ ＣＣＴＣＣＧＧＣＴＡＣＡＣＣＴＴＣＡＣＣＣＧＧＴＡＣＡＣＣＡＴＧＣＡＣ ＴＧＧＧＴＧＣＧＧＣＡＧＧＣＣＣＣＣＧＧＣＡＡＧＧＧＣＣＴＧＧＡＧＴＧ ＧＡＴＣＧＧＣＴＡＣＡＴＣＡＡＣＣＣＣＴＣＣＣＧＧＧＧＣＴＡＣＡＣＣＡ ＡＣＴＡＣＡＡＣＣＡＧＡＡＧＴＴＣＡＡＧＧＡＣＣＧＧＴＴＣＡＣＣＡＴＣ ＴＣＣＣＧＧＧＡＣＡＡＣＴＣＣＡＡＧＡＡＣＡＣＣＧＣＣＴＴＣＣＴＧＣＡ ＧＡＴＧＧＡＣＴＣＣＣＴＧＣＧＧＣＣＣＧＡＧＧＡＣＡＣＣＧＧＣＧＴＧＴ ＡＣＴＴＣＴＧＣＧＣＣＣＧＧＴＡＣＴＡＣＧＡＣＧＡＣＣＡＣＴＡＣＴＧＣ ＣＴＧＧＡＣＴＡＣＴＧＧＧＧＣＣＡＧＧＧＣＡＣＣＣＣＣＧＴＧＡＣＣＧＴ ＧＴＣＣＴＣＣＧＣＣＴＣＣＡＣＣＡＡＧＧＧＣＣＣＡＴＣＧＧＴＣＴＴＣＣ ＣＣＣＴＧＧＣＡＣＣＣＴＣＣＴＣＣＡＡＧＡＧＣＡＣＣＴＣＴＧＧＧＧＧＣ ＡＣＡＧＣＧＧＣＣＣＴＧＧＧＣＴＧＣＣＴＧＧＴＣＡＡＧＧＡＣＴＡＣＴＴ ＣＣＣＣＧＡＡＣＣＧＧＴＧＡＣＧＧＴＧＴＣＧＴＧＧＡＡＣＴＣＡＧＧＣＧ ＣＣＣＴＧＡＣＣＡＧＣＧＧＣＧＴＧＣＡＣＡＣＣＴＴＣＣＣＧＧＣＣＧＴＣ ＣＴＡＣＡＧＴＣＣＴＣＡＧＧＡＣＴＣＴＡＣＴＣＣＣＴＣＡＧＣＡＧＣＧＴ ＧＧＴＧＡＣＣＧＴＧＣＣＣＴＣＣＡＧＣＡＧＣＴＴＧＧＧＣＡＣＣＣＡＧＡ ＣＣＴＡＣＡＴＣＴＧＣＡＡＣＧＴＧＡＡＴＣＡＣＡＡＧＣＣＣＡＧＣＡＡＣ ＡＣＣＡＡＧＧＴＧＧＡＣＡＡＧＡＧＡＧＴＴＧＡＧＣＣＣＡＡＡＴＣＴＴＧ ＴＧＡＣＡＡＡＡＣＴＣＡＣＡＣＡＴＧＣＣＣＡＣＣＧＴＧＣＣＣＡＧＣＡＣ ＣＴＧＡＡＣＴＣＣＴＧＧＧＧＧＧＡＣＣＧＴＣＡＧＴＣＴＴＣＣＴＣＴＴＣ ＣＣＣＣＣＡＡＡＡＣＣＣＡＡＧＧＡＣＡＣＣＣＴＣＡＴＧＡＴＣＴＣＣＣＧ ＧＡＣＣＣＣＴＧＡＧＧＴＣＡＣＡＴＧＣＧＴＧＧＴＧＧＴＧＧＡＣＧＴＧＡ ＧＣＣＡＣＧＡＡＧＡＣＣＣＴＧＡＧＧＴＣＡＡＧＴＴＣＡＡＣＴＧＧＴＡＣ ＧＴＧＧＡＣＧＧＣＧＴＧＧＡＧＧＴＧＣＡＴＡＡＴＧＣＣＡＡＧＡＣＡＡＡ ＧＣＣＧＣＧＧＧＡＧＧＡＧＣＡＧＴＡＣＧＣＣＡＧＣＡＣＧＴＡＣＣＧＴＧ ＴＧＧＴＣＡＧＣＧＴＣＣＴＣＡＣＣＧＴＣＣＴＧＣＡＣＣＡＧＧＡＣＴＧＧ ＣＴＧＡＡＴＧＧＣＡＡＧＧＡＧＴＡＣＡＡＧＴＧＣＡＡＧＧＴＣＴＣＣＡＡ ＣＡＡＡＧＣＣＣＴＣＣＣＡＧＣＣＣＣＣＡＴＣＧＡＧＡＡＡＡＣＣＡＴＣＴ ＣＣＡＡＡＧＣＣＡＡＡＧＧＧＣＡＧＣＣＣＣＧＡＧＡＡＣＣＡＣＡＧＧＴＧ ＴＡＣＡＣＣＣＴＧＣＣＣＣＣＡＴＣＣＣＧＧＧＡＴＧＡＧＣＴＧＡＣＣＡＡ ＧＡＡＣＣＡＧＧＴＣＡＧＣＣＴＧＡＣＣＴＧＣＣＴＧＧＴＣＡＡＡＧＧＣＴ ＴＣＴＡＴＣＣＣＡＧＣＧＡＣＡＴＣＧＣＣＧＴＧＧＡＧＴＧＧＧＡＧＡＧＣ ＡＡＴＧＧＧＣＡＧＣＣＧＧＡＧＡＡＣＡＡＣＴＡＣＡＡＧＡＣＣＡＣＧＣＣ ＴＣＣＣＧＴＧＣＴＧＧＡＣＴＣＣＧＡＣＧＧＣＴＣＣＴＴＣＣＴＣＣＴＣＴ ＡＣＡＧＣＡＡＧＣＴＣＡＣＣＧＴＧＧＡＣＡＡＧＡＧＣＡＧＧＴＧＧＣＡＧ ＣＡＧＧＧＧＡＡＣＧＴＣＴＴＣＴＣＡＴＧＣＴＣＣＧＴＧＡＴＧＣＡＴＧＡ ＧＧＣＴＣＴＧＣＡＣＡＡＣＣＡＣＴＡＣＡＣＧＣＡＧＡＡＧＡＧＣＣＴＣＴ ＣＣＣＴＧＴＣＴＣＣＧＧＧＴＡＡＡＴＧＡ （配列番号１３５）
完全ＶＬ	ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＳＡＳＳＳＶＳＹＭＮＷＹ ＱＱＴＰＧＫＡＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＬＡＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＹ ＴＦＴＩＳＳＬＱＰＥＤＩＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＦＴＦＧＱＧＴＫＬＱＩ ＴＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰ ＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳ ＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲ ＧＥＣ＊ （配列番号１３６）

【表９－３】

抗原	ＯＫＴ３
ＤＮＡ	ＧＡＣＡＴＣＣＡＧＡＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣＣＣＣＣＴＣＣＴＣＣＣＴＧＴＣ ＣＧＣＣＴＣＣＧＴＧＧＧＣＧＡＣＣＧＧＧＴＧＡＣＣＡＴＣＡＣＣＴＧＣＴ ＣＣＧＣＣＴＣＣＴＣＣＴＣＣＧＴＧＴＣＣＴＡＣＡＴＧＡＡＣＴＧＧＴＡＣ ＣＡＧＣＡＧＡＣＣＣＣＣＧＧＣＡＡＧＧＣＣＣＣＣＡＡＧＣＧＧＴＧＧＡＴ ＣＴＡＣＧＡＣＡＣＣＴＣＣＡＡＧＣＴＧＧＣＣＴＣＣＧＧＣＧＴＧＣＣＣＴ ＣＣＣＧＧＴＴＣＴＣＣＧＧＣＴＣＣＧＧＣＴＣＣＧＧＣＡＣＣＧＡＣＴＡＣ ＡＣＣＴＴＣＡＣＣＡＴＣＴＣＣＴＣＣＣＴＧＣＡＧＣＣＣＧＡＧＧＡＣＡＴ ＣＧＣＣＡＣＣＴＡＣＴＡＣＴＧＣＣＡＧＣＡＧＴＧＧＴＣＣＴＣＣＡＡＣＣ ＣＣＴＴＣＡＣＣＴＴＣＧＧＣＣＡＧＧＧＣＡＣＣＡＡＧＣＴＧＣＡＧＡＴＣ ＡＣＣＣＧＧＡＣＣＧＴＧＧＣＣＧＣＣＣＣＣＴＣＣＧＴＧＴＴＣＡＴＣＴＴ ＣＣＣＣＣＣＣＴＣＣＧＡＣＧＡＧＣＡＧＣＴＧＡＡＧＴＣＣＧＧＣＡＣＣＧ ＣＣＴＣＣＧＴＧＧＴＧＴＧＣＣＴＧＣＴＧＡＡＣＡＡＣＴＴＣＴＡＣＣＣＣ ＣＧＧＧＡＧＧＣＣＡＡＧＧＴＧＣＡＧＴＧＧＡＡＧＧＴＧＧＡＣＡＡＣＧＣ ＣＣＴＧＣＡＧＴＣＣＧＧＣＡＡＣＴＣＣＣＡＧＧＡＧＴＣＣＧＴＧＡＣＣＧ ＡＧＣＡＧＧＡＣＴＣＣＡＡＧＧＡＣＴＣＣＡＣＣＴＡＣＴＣＣＣＴＧＴＣＣ ＴＣＣＡＣＣＣＴＧＡＣＣＣＴＧＴＣＣＡＡＧＧＣＣＧＡＣＴＡＣＧＡＧＡＡ ＧＣＡＣＡＡＧＧＴＧＴＡＣＧＣＣＴＧＣＧＡＧＧＴＧＡＣＣＣＡＣＣＡＧＧ ＧＣＣＴＧＴＣＣＴＣＣＣＣＣＧＴＧＡＣＣＡＡＧＴＣＣＴＴＣＡＡＣＣＧＧ ＧＧＣＧＡＧＴＧＣＴＡＧ （配列番号１３７）

【００７４】

本開示の組換え二重特異性抗体は、表１～９に記載されるペプチドと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の抗原結合部分を有する、実質的に相同のポリペプチドも含む。

【００７５】

本開示による二重特異性抗体は、多くの従来技法のうちのいずれかによって調製されてもよい。例えば、それらは、当該技術分野において既知のいずれかの技法を使用して、組換え発現系において生成されてもよい。例えば、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ：Ａ Ｎｅｗ Ｄｉｍｅｎｓｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｎａｌｙｓｅｓ，Ｋｅｎｎｅｔ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８０）、及びＡｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｄ（ｅｄｓ．），Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，（１９８８）を参照されたい。ある特定の技法は、対象とする抗体のポリペプチド鎖（またはその部分）をコードする核酸を単離することと、組換えＤＮＡ技法によって核酸を操作することとを必要とする。核酸は、対象とする別の核酸に融合されてもよく、または１つ以上のアミノ酸残基を付加、欠失、もしくは置換するように（例えば、突然変異誘発または他の従来技法によって）改変されてもよい。

【００７６】

当該技術分野において既知のいかなる発現系も、本開示の組換え二重特異性抗体を作製するために使用することができる。一般に、宿主細胞は、所望のポリペプチドをコードするＤＮＡを含む、組換え発現ベクターで形質転換される。宿主細胞の中で、原核生物、酵母、またはより高次の真核細胞が用いられてもよい。原核生物として、グラム陰性またはグラム陽性生物、例えば、大腸菌または桿菌が挙げられる。より高次の真核細胞としては、昆虫細胞及び哺乳類起源の確立された細胞株が挙げられる。好適な哺乳類宿主細胞株の例として、サル腎細胞のＣＯＳ－７株（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６５１）（Ｇｌｕｚｍａｎ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ｃｅｌｌ ２３：１７５）、Ｌ細胞、２９３細胞、Ｃ１２７細胞、３Ｔ３細胞（ＡＴＣＣ ＣＣＬ １６３）、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ

）細胞、ＨｅＬａ細胞、ＢＨＫ（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１０）細胞株、及びＭｃＭａｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９１，ＥＭＢＯ　Ｊ．１０：２８２１によって記載されるアフリカミドリザル腎細胞株ＣＶＩ由来のＣＶＩ／ＥＢＮＡ細胞株（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７０）が挙げられる。細菌、真菌、酵母、及び哺乳類細胞性宿主と共に使用するための適切なクローニング及び発現ベクターは、当該技術分野において、例えば、Ｐｏｕｗｅｌｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８５により記載されている。

【００７７】

形質転換細胞は、ポリペプチドの発現を促進する条件下で培養されることができ、ポリペプチドは、従来のタンパク質精製手順によって回収される。１つのそのような精製手順として、例えば、それに結合された抗原の全てまたは一部分を有するマトリックスにわたる、親和性クロマトグラフィーの使用が挙げられる。本明細書において使用が企図されるポリペプチドとして、汚染内因性物質を実質的に含まない実質的に同種の組換え二重特異性抗体が挙げられる。

【００７８】

一態様では、本開示による二重特異性抗体は、第１の抗原結合部分及び第２の抗原結合部分を有するペプチドをコードする組換え発現ベクターで形質転換された宿主細胞から生成される。別の態様では、本開示の二重特異性抗体は、例えば、ジスルフィド結合を使用して連結される、２つの別個の抗体、すなわち、第１の抗原結合部分を有する抗体及び第２の抗原結合部分を有する抗体から生成される。

【００７９】

本明細書に開示される二重特異性抗体のアミノ酸配列は、当該技術分野において既知の任意の手段によって検証されてもよく、表１～９において本明細書に開示される配列と同一であってもよく、またはプロセシングの結果として１つ以上のアミノ酸残基において、それらの配列と異なってもよい。例えば、実質的に同種の二重特異性抗体の全てまたは一部分上の、軽鎖または重鎖（もしくは関連一本鎖分子）のいずれかからのＣ末端アミノ酸は、タンパク質分解プロセシングまたは培養中に起こる他のプロセシング、例えば、Ｃ末端Ｌｙｓ残基のプロセシングによって除去されてもよい。代替として、１つより多くのＣ末端アミノ酸残基、例えば、２つのＣ末端アミノ酸、または３つ、４つ、もしくは５つのＣ末端アミノ酸が除去されてもよい。同様に、Ｎ末端アミノ酸は不在であってもよく、例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、または５つのＮ末端アミノ酸が不在であってもよい。

【００８０】

代替として、または追加として、二重特異性抗体は、翻訳後修飾を受けてもよく、例えば、グルタミンが環化またはピログルタミン酸に変換されてもよく、追加または代替として、アミノ酸は、脱アミド化、異性化、糖化、及び／もしくは酸化を受けてもよい。本発明のポリペプチドは、当該技術分野において周知の部位において、グリコシル化、例えば、Ｎ－結合またはＯ結合グリコシル化を含む、追加の翻訳後修飾を受けてもよい。前述のように、ポリペプチドのアミノ酸配列において変更を行い、そのような改変が起こらないようにする、もしくは最小限に抑えることができ、またはそのようなプロセシングが有益である状況においてそれらを促進することができる。

【００８１】

本開示による二重特異性抗体は、任意の方法及び任意の理由で、例えば、（１）タンパク質分解への感受性を低減する、（２）酸化への感受性を低減する、（３）タンパク質複合体を形成するための結合親和性を改変する、（４）結合親和性を改変する、及び（４）他の物理化学または機能的特性を付与もしくは修飾するために修飾されたポリペプチドを含む。追加として、表１～９のうちのいずれかに記載される配列内（例えば、分子間接触を形成するドメイン（複数可）の外側のポリペプチドの部分内）で行われた単数または複数のアミノ酸置換（例えば、保存アミノ酸置換）は、本開示によって包含される。コンセンサス配列の１つ以上のアミノ酸の、同種のＤ－アミノ酸との組織的置換（例えば、Ｌ－リシンの代わりにＤ－リシン）を使用して、例えば、より安定なペプチドを生成してもよ

い。さらに、コンセンサス配列を使用して、置換のためのアミノ酸残基を選択することができ、当業者は、追加のアミノ酸残基が置換されてもよいことを認識する。コンセンサス配列または実質的に同一のコンセンサス配列多様性を含む拘束性ペプチドは、当該技術分野において既知の方法によって生成されてもよい（Ｒｉｚｏ ａｎｄ Ｇｉｅｒａｓｃｈ Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６１：３８７（１９９２））、参照により本明細書に組み込まれる）。

【００８２】

本開示による二重特異性抗体は、当該技術分野において既知の任意の定常領域を含むことができる。軽鎖定常領域は、例えば、κ－またはλ－型軽鎖定常領域、例えば、ヒトκ－またはλ型軽鎖定常領域であり得る。重鎖定常領域は、例えば、α－、δ－、ε－、γ－、またはμ－型重鎖定常領域、例えば、ヒトα－、δ－、ε－、γ－、またはμ－型重鎖定常領域であり得る。一態様では、軽鎖または重鎖定常領域は、天然に存在する定常領域の断片、誘導体、変異型、変異タンパク質である。

【００８３】

別の態様では、本発明は、本開示の二重特異性抗体の誘導体または類似体に関する。誘導体は、特定用途における半減期の増加などの所望の特性を付与する、任意の分子または物質を含むことができる。誘導体を形成するために使用できる分子の例として、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン）及びポリエチレングリコール（ＰＥＧ）が挙げられるが、これらに限定されない。抗体のアルブミン結合及びＰＥＧ化誘導体などの誘導体は、当該技術分野において周知の技法を使用して調製することができる。類似体は、本明細書に記載される二重特異性抗体の非ペプチド類似体であってもよい。非ペプチド類似体は、テンプレートペプチドのものに類似する特性を持つ薬物として、製薬産業において一般に使用される。これらの種類の非ペプチド化合物は、「ペプチド模倣体（ｐｅｐｔｉｄｅ ｍｉｍｅｔｉｃｓ）」または「ペプチド模倣体（ｐｅｐｔｉｄｏｍｉｍｅｔｉｃｓ）」と呼ばれ、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Ｆａｕｃｈｅｒｅ，Ｊ．Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｒｅｓ．１５：２９（１９８６）、Ｖｅｂｅｒ ａｎｄ Ｆｒｅｉｄｉｎｇｅｒ ＴＩＮＳ ｐ．３９２（１９８５）、及びＥｖａｎｓ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３０：１２２９（１９８７）を参照されたい。本開示の二重特異性抗体に構造的に類似するペプチド模倣体を使用して、同等の治療的または予防的効果をもたらすことができる。一般に、ペプチド模倣体は、ヒト抗体などのパラダイムペプチド（すなわち、所望の生化学特性または薬学的活性を有するポリペプチド）と構造的に類似しているが、－ＣＨ$_2$ＮＨ－、－ＣＨ$_2$Ｓ－、－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ＝ＣＨ－（シス及びトランス）、－ＣＯＣＨ$_2$－、－ＣＨ（ＯＨ）ＣＨ$_2$－、及び－ＣＨ$_2$ＳＯ－からなる群より選択される結合によって、当該技術分野において周知の方法で随意に置換される１つ以上のペプチド結合を有する。

【００８４】

一態様では、本開示による組換え二重特異性抗体は、（Ｉ）（Ａ）配列番号１８、３６、５４、７２、９０、１０８、及び１３２からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むｓｃＦＶ、または（Ｂ）重鎖可変ドメイン（ＶＨ）及び軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）であって、該ＶＨ及びＶＬがそれぞれ、配列番号（ｉ）１４及び１６、（ｉｉ）３２及び３４、（ｉｉｉ）５０及び５２、（ｉｖ）６８及び７０、（ｖ）８６及び８８、（ｖｉ）１０４及び１０６、（ｖｉｉ）１２８及び１３０からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）及び軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、または（Ｃ）（ｉ）次の３つのＶＨ相補性決定領域（ＣＤＲ）、すなわち（ａ）配列番号２、２０、３８、５６、７４、９２、及び１１６からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むＶＨ ＣＤＲ１、（ｂ）配列番号３、２１、３９、５７、７５、９３、及び１１７からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むＶＨ ＣＤＲ２、及び（ｃ）配列番号４、２２、４０、５８、７６、９４、及び１１８からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むＶＨ ＣＤＲ３、ならびに、（ｉｉ）次の３つのＶＬ ＣＤＲ、すなわち（ａ）配列番号８、２６、４４、６２、８０、９８、及び１２２からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むＶＬ ＣＤＲ１、

（ｂ）配列番号９、２７、４５、６３、８１、９９、及び１２３からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び（ｃ）配列番号１０、２８、４６、６４、８２、１００、及び１２４からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３、のうちの１つを含む、第１の抗原結合部分と、（ＩＩ）（Ａ）配列番号１１３に記載のアミノ酸配列を含む一本鎖可変断片（ｓｃＦＶ）、または（Ｂ）重鎖可変領域（ＶＨ）及び軽鎖可変領域（ＶＬ）であって、該ＶＨ及びＶＬがそれぞれ、配列番号１１１及び１１２もしくは配列番号１３４及び１３６に記載のアミノ酸配列を含む第２の抗原結合部分とを含む。

【００８５】

一態様では、組換え抗体は、（Ａ）配列番号１８に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦＶ、または（Ｂ）配列番号１４に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１６に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ、（Ｃ）配列番号２に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号３記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、配列番号４に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３、配列番号８に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号９記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、配列番号１０に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３、のうちの１つを含む、第１の抗原結合部分を含む。

【００８６】

別の態様では、組換え抗体は、（Ａ）配列番号３６に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦＶ、または（Ｂ）配列番号３２に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ、または（Ｃ）配列番号２０に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号２１記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、配列番号２２に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３、配列番号２６に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号２７記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号２８に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３、のうちの１つを含む、第１の抗原結合部分を含む。

【００８７】

別の態様では、組換え抗体は、（Ａ）配列番号５４に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦＶ、または（Ｂ）配列番号５０に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号５２に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ、または（Ｃ）配列番号３８に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号３９記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、配列番号４０に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３、配列番号４４に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号４５記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、配列番号４６に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３、のうちの１つを含む、第１の抗原結合部分を含む。

【００８８】

別の態様では、組換え抗体は、（Ａ）配列番号７２に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦＶ、または（Ｂ）配列番号６８に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号７０に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ、または（Ｃ）配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号５７記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、配列番号５８に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３、配列番号６２に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号６３に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号６４に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３、のうちの１つを含む、第１の抗原結合部分を含む。

【００８９】

別の態様では、組換え抗体は、（Ａ）配列番号９０に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦＶ、または（Ｂ）配列番号８６に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号８８に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ、または（Ｃ）配列番号７４に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号７５に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、配列番号７６に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３、配列番号８０に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号８１に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、配列番号８２

に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３、のうちの１つを含む、第１の抗原結合部分を含む。

【００９０】

別の態様では、組換え抗体は、（Ａ）配列番号１０８に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦＶ、または（Ｂ）配列番号１０４に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１０６に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ、または（Ｃ）配列番号９２に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号９３に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、配列番号９４に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３、配列番号９８に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号９９に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号１００に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３、のうちの１つを含む、第１の抗原結合部分を含む。

【００９１】

別の態様では、組換え抗体は、（Ａ）配列番号１３２に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦＶ、または（Ｂ）配列番号１２８に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１３０に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ、または（Ｃ）配列番号１１６に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号１１７に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、配列番号１１８に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３、配列番号１２２に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号１２３に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号１２４に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３、のうちの１つを含む、第１の抗原結合部分を含む。

【００９２】

一態様では、本開示による組換え抗体は、表１～６または８のうちのいずれかにおける、ＶＨ配列からのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む重鎖可変領域と、ＶＬ配列からのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域とを含む、第１の抗原結合部分を含む。例えば、一態様では、本開示による組換え抗体は、配列番号５０からのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む重鎖可変領域と、配列番号５２からのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域とを含む。別の態様では、本開示による組換え抗体は、そのＶＨ配列と少なくとも９０％同一である、表１～６または８のうちのいずれかにおけるＶＨ配列からのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む重鎖可変領域を含み、ならびに／またはそのＶＬ配列と少なくとも９０％同一である、同じ表におけるＶＬ配列からのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む、第１の抗原結合部分を含む。例えば、一態様では、本開示による組換え抗体は、配列番号５０と少なくとも９０％同一である配列番号５０からのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む重鎖可変領域を含み、ならびに／または配列番号５２と少なくとも９０％同一である配列番号５２からのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む。

【００９３】

別の態様では、本開示による組換え抗体は、表７または表９における、ＶＨ配列からのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む重鎖可変領域と、ＶＬ配列からのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域とを含む、第２の抗原結合部分を含む。例えば、一態様では、本開示による組換え抗体は、配列番号１１１からのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む重鎖可変領域と、配列番号１１２からのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域とを含む。別の態様では、本開示による組換え抗体は、そのＶＨ配列と少なくとも９０％同一である、表７または表９におけるＶＨ配列からのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む重鎖可変領域を含み、ならびに／またはそのＶＬ配列と少なくとも９０％同一である、同じ表におけるＶＬ配列からのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む、第１の抗原結合部分を含む。例えば、一態様では、本開示による組換え抗体は、配列番号１１１と少なくとも９０％同一である配列番号１１１からのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む重鎖可変領域を含み、ならびに／または配列番号１１２と少なくとも９０％同一である配列番号１１２からのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む。

【００９４】
一態様では、本開示の二重特異性抗体の第１の抗原結合部分及び／または第２の抗原結合部分は、ｓｃＦｖである。一態様では、本発明による二重特異性抗体は、配列番号１８、３６、５４、７２、９０、１０８、もしくは１３２に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦＶを含む、第１の抗原結合部分、及び／または配列番号１１３に記載のアミノ酸配列を含むｓｃＦＶを含む、第２の抗原結合部分を含む。別の態様では、本発明による二重特異性抗体は、配列番号１８、３６、５４、７２、９０、１０８、もしくは１３２に記載の、そのｓｃＦＶ配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列からの６つのＣＤＲ（ＶＨ　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３、ならびにＶＬ　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３）を含む第１の抗原結合部分を含み、及び／または配列番号１１３に記載の、そのｓｃＦＶ配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列からの６つのＣＤＲ（ＶＨ　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３、ならびにＶＬ　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３）を含む。

【００９５】
一態様では、本開示の組換え二重特異性抗体の第１の抗原結合部分は、ＷＴ１　ＨＬＡに特異的に結合し、第２の抗原結合部分は、免疫エフェクター細胞の表面上の抗原に特異的に結合する。別の態様では、免疫エフェクター細胞は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、マクロファージ、Ｔ細胞、及びこれらの組み合わせからなる群より選択される。別の態様では、免疫エフェクター細胞は、ＣＤ３＋細胞である。さらなる態様では、組換え抗体は、ＣＤ３に特異的に結合する。一態様では、組換え抗体は、ＷＴ１－ＨＬＡ２＋細胞、例えば、低密度のＷＴ１／ＨＬＡ２をその表面上に有するＷＴ１／ＨＬＡ２＋細胞に結合する。

【００９６】
一態様では、本発明は、本明細書に記載される組換え抗体をコードする核酸を提供する。関連態様では、宿主細胞は、本開示の核酸を含む発現ベクターで形質転換される。一態様では、核酸は、表１～９のうちのいずれかに記載のＤＮＡ配列を含む。

【００９７】
別の態様では、本開示は、本明細書に記載される組換え二重特異性抗体、及び生理学的に許容される希釈剤、賦形剤、または担体を含む、薬学的組成物を提供する。随意に、この組成物は、追加として１つ以上の生理学的に活性な薬剤、例えば、抗癌剤、補助剤、または他の免疫刺激物質、抗血管新生物質、鎮痛剤などを含む。様々な特定の実施形態では、この組成物は、組換え二重特異性抗体に加えて、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの生理学的に活性な薬剤を含む。

【００９８】
一態様では、本開示の薬学的組成物は、緩衝液、抗酸化剤（アスコルビン酸など）、低分子量ポリペプチド（１０個より少ないアミノ酸を有するものなど）、タンパク質、アミノ酸、炭水化物（グルコース、スクロース、またはデキストリンなど）、キレート剤（ＥＤＴＡなど）、グルタチオン、安定剤、及び賦形剤からなる群より選択される、１つ以上の物質を持つ本明細書に記載される組換え抗体を含む。中性緩衝生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、適切な希釈剤の例である。適切な産業基準に従い、ベンジルアルコールなどの保存剤が添加されてもよい。液体薬学的組成物として、例えば次のうち、すなわち注射用水などの滅菌希釈液、生理食塩水、好ましくは生理的食塩液、リンガー溶液、等張塩化ナトリウム、溶媒または懸濁媒質として機能し得る固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の溶媒、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの等張性を調整するための緩衝液及び薬剤を上げることができる。非経口調製物は、アンプル、使い捨てシリンジ、またはガラスもしくはプラスチック製の多用量バイアルに封入することができる。生理的食塩液の使用が好ましく、注入可能な薬学的組成物は、好ましくは滅菌である。一態様では、組成物は、適切な賦形剤溶液（例えば、スクロース）を希釈剤として使用し、凍結乾燥物として製剤化されてもよい。好適な成分は、用いられる投薬量及び濃度でレシピエン

トに対して非毒性である。薬学的製剤中で用いられ得る成分のさらなる例は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ′ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１６ｔｈ Ｅｄ．（１９８０）ａｎｄ ２０ｔｈ Ｅｄ．（２０００），Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａに提示されている。

【００９９】

当該技術分野において理解されるように、本開示の二重特異性抗体を含む薬学的組成物は、適応に適した方法で対象に投与される。本明細書に記載される組換え抗体を含む本開示の薬学的組成物は、有効量の二重特異性抗体を提供する、任意の経路による送達のために製剤化されてもよい。薬学的組成物は、任意の好適な技法によって投与されてもよく、非経口的、局所的、または吸入によるものを含むが、これらに限定されない。注入される場合、薬学的組成物は、例えば、動脈内、静脈内、筋内、病巣内、腹腔内、または皮下経路を介して、ボーラス注入、または持続点滴によって投与することができる。経皮送達及び移植片からの持続放出のように、例えば、腫瘍部位における局所投与が企図される。吸入による送達として、例えば、鼻腔または口腔吸入、噴霧器の使用、エアロゾル形態の拮抗薬の吸入、及び同様のものが挙げられる。他の代替例として、点眼液；錠剤、カプセル、シロップ、トローチ、またはチューイングガムを含む口腔調製物；ならびにローション、ゲル、スプレー、パッチ、及び軟膏などの局所調製物が挙げられる。

【０１００】

一態様では、本開示は、ＷＴ１陽性細胞を死滅させるための方法を提供し、この細胞を、本明細書に記載の組換え二重特異性抗体及び免疫エフェクター細胞と接触させることを含む。本開示は、ＷＴ１陽性疾患を有する対象の治療方法も提供し、治療有効量の本明細書に記載される組換え二重特異性抗体を、この対象に投与することを含む。一態様では、この方法は、免疫エフェクター細胞を対象に投与することをさらに含む。一態様では、免疫エフェクター細胞は、細胞傷害性細胞、例えば、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、またはＴ細胞である。一態様では、細胞傷害性Ｔ細胞は、ＣＤ３＋細胞傷害性Ｔ細胞、随意に自己Ｔ細胞である。一態様では、ＷＴ１陽性疾患は、白血病（慢性もしくは急性）またはＷＴ１陽性癌である。ＷＴ１陽性癌の例として、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫（ＭＭ）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性（ｍｙｅｌｏｉｄ）／骨髄性（ｍｙｅｌｏｇｅｎｏｕｓ）白血病（ＡＭＬ）、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、中皮腫、卵巣癌、消化器癌、乳癌、前立腺癌、及びグリア芽腫が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０１】

本開示は、故に、治療有効量の組換え抗体または本明細書に記載される組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む、癌を治療する方法を提供する。一態様では、癌は、副腎癌、腺房細胞癌、聴神経腫瘍、末端黒子型黒色腫、先端汗腺腫、急性好酸球性白血病、急性赤血球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性巨核芽球性白血病、急性単球性白血病、急性前骨髄球性白血病、腺癌、腺様嚢胞癌、腺腫、腺様歯原性腫瘍、腺扁平上皮癌、脂肪組織腫瘍、副腎皮質癌、成人Ｔ－細胞白血病／リンパ腫、侵攻性ＮＫ細胞白血病、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、胞巣状横紋筋肉腫、胞状軟部肉腫、エナメル上皮線維腫、未分化大細胞リンパ腫、組織非形成性甲状腺癌、血管免疫芽細胞性Ｔ細胞リンパ腫、血管筋脂肪腫、血管肉腫、星状細胞腫、非定型奇形腫様腫瘍、Ｂ細胞慢性リンパ球性白血病、Ｂ細胞前リンパ球性白血病、Ｂ細胞リンパ腫、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、芽腫、骨癌、ブレンナー腫瘍、ブラウン腫瘍、バーキットリンパ腫、乳癌、脳癌、癌腫、上皮内癌、癌肉腫、軟骨腫瘍、セメント質腫、骨髄肉腫、軟骨腫、脊索腫、絨毛癌、脈絡叢乳頭腫、腎臓の明細胞肉腫、頭蓋咽頭腫皮膚Ｔ細胞リンパ腫、子宮頸癌、結腸癌、結腸直腸癌、デゴス病、線維形成性小円形細胞腫瘍、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、胚芽異形成性神経上皮腫瘍、未分化胚細胞腫、胚性癌細胞、内分泌腺腫瘍、内胚葉洞腫瘍、腸症関連Ｔ細胞リンパ腫、食道癌、ユーイング肉腫、胎児内胎児、線維腫、線維肉腫、濾胞性リンパ腫、濾胞性甲状腺癌、神経節細胞腫、消化管癌、胚細胞腫瘍、妊娠性絨毛腫、巨大細胞線維芽細胞腫、骨の巨大細胞腫瘍、神経膠腫、膠芽腫、グリオーマ、脳神経膠腫症、グルカゴノ

ーマ、性腺芽腫、顆粒膜細胞腫、半陰陽性卵巣腫瘍、胆嚢癌、胃癌、有毛細胞白血病、血管芽腫、頭頸部癌、血管外皮腫、血液系腫瘍、肝芽腫、肝脾Ｔ細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、浸潤性小葉癌、腸癌、腎癌、咽頭癌、悪性黒子、致死性正中部癌腫、白血病、ライディッヒ細胞腫、脂肪肉腫、肺癌、リンパ管腫、リンパ管肉腫、リンパ上皮腫、リンパ腫、急性リンパ性白血病、急性急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、肝臓癌、小細胞癌、非小細胞癌腫、非小細胞肺癌、ＭＡＬＴリンパ腫、悪性線維性組織球腫、悪性末梢神経鞘腫、悪性トリトン腫瘍、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、マスト細胞白血病、縦隔胚細胞腫瘍、乳房の髄様癌、甲状腺髄様癌、髄芽細胞腫、黒色腫、髄膜腫、メルケル細胞癌、中皮腫、尿路上皮癌、ミュラー管混合腫瘍、粘液性腫瘍、多発性骨髄腫、筋組織新生物、菌状息肉腫、粘液性脂肪肉腫、粘液腫、粘液肉腫、上咽頭癌、神経鞘腫，神経芽腫、神経線維腫、神経腫、結節性メラノーマ、眼球癌、乏突起星細胞腫、乏突起神経膠腫、膨大細胞腫、視神経鞘髄膜腫、視神経腫瘍、口腔癌、骨肉種、卵巣癌、パンコースト腫瘍、乳頭様甲状腺癌、傍神経節腫、松果体芽腫、松果体細胞腫、下垂体細胞腫、下垂体腺腫、下垂体腫瘍、形質細胞腫、多胚腫、前駆体Ｔリンパ芽球性リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、原発性体液性リンパ腫、原発性腹膜癌、前立腺癌、膵癌、咽頭癌、腹膜偽粘液腫、腎細胞癌腫、腎髄質癌腫、網膜芽腫、横紋筋腫、横紋筋肉腫、リヒタートランスフォーメーション、直腸癌、肉腫、シュワン細胞腫、精上皮腫、セルトリ細胞腫、性索性腺間質腫瘍、印環細胞癌、皮膚癌、小青色円形細胞腫瘍、小細胞癌腫、軟部組織肉腫、ソマトスタチノーマ、煤煙性いぼ、脊椎腫瘍、脾臓周辺帯リンパ腫、扁平細胞癌、滑膜肉腫、セザリー病、小腸癌、扁平上皮癌、胃癌、Ｔ細胞リンパ腫、精巣癌、莢膜腫、甲状腺癌、移行上皮癌、咽頭癌、尿膜管癌、泌尿生殖器癌、尿路上皮癌腫、ブドウ膜黒色腫、子宮癌、疣状癌、視経路グリオーマ、外陰癌、膣癌、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、ワルチン腫瘍、及びウィルムス腫瘍からなる群より選択される。

【０１０２】

別の態様では、本発明は、組換え抗体を含む組成物を投与することを含む、対象において一次Ｔ細胞応答及び二次Ｔ細胞応答を刺激する方法を提供し、該組換え抗体が、第１の抗原結合部分及び第２の抗原結合部分を含み、該第１の抗原結合部分が、第１の腫瘍抗原に特異的に結合し、該第２の抗原結合部分が、免疫エフェクター細胞表面抗原に特異的に結合し、一次Ｔ細胞応答が、第１の腫瘍抗原に対して細胞傷害性Ｔ細胞を刺激することを含み、二次Ｔ細胞応答が、第１の腫瘍抗原に対して及び／または第２の腫瘍抗原に対して、エフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞を刺激することを含む。一態様では、第１の腫瘍抗原は、ＷＴ１－ＨＬＡであり、第２の腫瘍抗原は、非ＷＴ１／ＲＭＦ腫瘍抗原である。非ＷＴ１／ＲＭＦ腫瘍抗原の例として、ＨＥＲ２－ｎｅｕ、メソテリン、Ｔｅｒｔ、Ｍｕｃ　１６、Ｍｕｃ１、ＰＳＭＡ、及び当該技術分野において既知の他の抗原が挙げられるが、これらに限定されない（Ｃｈｅｅｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｃａｎｃｅｒ　ｒｅｓｅａｒｃｈ：ａｎ　ｏｆｆｉｃｉａｌ　ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　ｆｏｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ．２００９；１５（１７）：５３２３－３７）。一態様では、一次Ｔ細胞応答及び／または二次Ｔ細胞応答は、腫瘍部位、例えば、骨髄、肺、肝臓、脳、尿生殖路、消化管、及び／または脾臓におけるＴ細胞の増加を含む。

【０１０３】

一態様では、二次Ｔ細胞応答は、第１の腫瘍抗原に対して及び／または第２の腫瘍抗原に対して、エフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞を刺激することを含む。別の態様では、二次Ｔ細胞応答は、第１の腫瘍抗原に対してではなく第２の腫瘍抗原に対して、エフェクターＴ細胞を刺激することを含む。一態様では、二次Ｔ細胞応答は、抗原提示細胞（すなわち、交差提示）またはＣＤ８６などの共刺激分子もしくは誘導性共刺激分子リガンド（ＩＣＯＳＬ）を必要としない。別の態様では、二次Ｔ細胞応答は、ＣＤ８　Ｔ細胞の増加を含む。関連態様では、二次Ｔ細胞応答は長命であり、例えば、１週間を超えて、２週間を超えて、３週間を超えて、１ヶ月を超えて、または２ヶ月を超えて存続する

。一態様では、二次Ｔ細胞応答は、以前にアネルギー性であったＴ細胞を含む。
【０１０４】
一態様では、本開示による一次Ｔ細胞応答及び二次Ｔ細胞応答を刺激する方法は、本明細書に記載される組換え二重特異性抗体、例えば、配列番号１１０に記載のアミノ酸配列を含む組換え二重特異性抗体を含む組成物を投与することを含む。別の態様では、この方法は、ＷＴ１／ＨＬＡに特異的に結合する第１の抗原結合部分を含む二重特異性抗体を投与することを含み、二次Ｔ細胞応答は、非ＷＴ１－ＲＭＦ抗原で以前に活性化されたＴ細胞を含む。
【０１０５】
一態様では、一次Ｔ細胞応答及び／または二次Ｔ細胞応答は、インビボで起こる。例えば、本明細書に記載される二重特異性抗体は、ＷＴ１／ＨＬＡに対する一次Ｔ細胞応答及び非ＷＴ１－ＲＭＦ腫瘍抗原に対する二次Ｔ細胞応答を刺激するために有効な量で、それを必要とする患者に投与され得る。別の態様では、一次Ｔ細胞応答及び／または二次Ｔ細胞応答は、エクスビボで起こる。例えば、本開示による二重特異性抗体を、インビトロで細胞に投与し、腫瘍抗原、例えば、非ＷＴ１－ＲＭＦ腫瘍抗原に対して特異性を有するＴ細胞の集団を活性化し、増殖させることができる。次いで、治療有効量のＴ細胞を、例えば、自己的に癌を治療するために、それを必要とする対象に投与することができる。
【０１０６】
理論に拘束されるものではないが、一次Ｔ細胞応答及び／または二次Ｔ細胞応答は、直接腫瘍上で追加のＭＨＣ／ペプチドエピトープを認識するために、Ｔ細胞のＴＣＲを腫瘍細胞に十分に近づける二重特異性抗体の能力から生じ得る。一態様では、Ｔ細胞刺激相中の二重特異性抗体の第１の抗原結合部分の、第１の腫瘍抗原、例えば、ＷＴ１／ＨＬＡへの結合は、Ｔ細胞の同起源ＴＣＲからの第１の腫瘍抗原の認識を遮断することができ、それにより第１の腫瘍抗原以外の腫瘍抗原に特異的な二次Ｔ細胞応答をもたらす。
【０１０７】
したがって本開示は、Ｔ細胞を本明細書に記載される組換え抗体で活性化することを含む、腫瘍抗原に対するエフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞を生成する方法を提供する。一態様では、活性化の後に生成された該Ｔ細胞は、長期間にわたって、例えば、少なくとも１週間、少なくとも２週間、少なくとも３週間、少なくとも１ヶ月、または少なくとも２ヶ月間生存可能である。一態様では、組換え抗体は、ＷＴ１／ＨＬＡに結合する第１の抗原結合部分を含むが、生成されるエフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞は、非ＷＴ１－ＲＭＦ腫瘍抗原、例えば、ＨＥＲ２－ｎｅｕ、メソテリン、Ｔｅｒｔ、Ｍｕｃ　１６、Ｍｕｃ１、ＰＳＭＡ、及び当該技術分野において既知の他のものに対する。一態様では、エフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞は、インビボで生成される。別の態様では、エフェクターＴ細胞及び／またはメモリーＴ細胞は、例えば、養子性Ｔ細胞療法において使用するためにエクスビボで生成される。一態様では、二重特異性抗体を投与することは、ＣＤ８　Ｔ細胞の生成を増加させ、長命なエフェクターメモリーをもたらす。ＷＴ１／ＨＬＡに特異的な第１の結合部分を有する本開示による二重特異性抗体は、したがって非ＷＴ１腫瘍抗原に対するワクチン応答を誘導することができ、広範かつ有効な抗腫瘍療法をもたらす。
【０１０８】
本開示の治療方法は、障害の少なくとも１つの症状もしくは他の態様の軽減もしくは予防、または疾患重症度の低減などを包含する。一態様では、治療有効量の本発明の組換え二重特異性抗体または薬学的組成物は、ＷＴ１陽性細胞の増殖を阻害する、腫瘍サイズ／量を低減する、腫瘍細胞転移／浸潤を防止する、及び／または例えば、アポトーシスもしくは壊死を介して細胞死をもたらすために有効な量である。別の態様では、例えば、二次Ｔ細胞応答を予防的に誘導し、メモリーＴ細胞を生成するために二重特異性抗体を投与することを含む方法は、発症もしくは再発を防止する、または疾患の重症度を低減するために有効である。本明細書に記載される二重特異性抗体または薬学的組成物は、実現可能な治療薬を構築するために、完全治癒をもたらす、または疾患のあらゆる症状もしくは兆候

を根絶する必要はない。当該技術分野において認識されるように、治療薬は、所与の疾患状態の重症度を低減し得るが、有用であると見なされる疾患のあらゆる兆候を排除する必要はない。同様に、予防的に投与される治療は、実現可能な予防薬を構築するために、状態の発症を防止することにおいて完全に有効である必要はない。単に疾患の影響を低減する（例えば、その症状の数もしくは重症度を低減することによって、または別の治療の有効性を高めることによって、または別の有益な効果をもたらすことによって）、または疾患が対照において発生もしくは悪化する可能性を低減するだけで十分である。

【０１０９】

本開示の方法において使用するための投薬量及び投与頻度は、投与経路、用いられる特定の二重特異性抗体、治療される疾患の性質及び重症度、状態が急性または慢性であるか、ならびに対象の大きさ及び一般状態などの要因によって異なり得る。適切な投薬量は、関連技術分野において既知の手順によって、例えば、用量上昇研究を必要とし得る臨床治験において決定され得る。

【０１１０】

本開示の組換え二重特異性抗体は、例えば、１回または１回より多く、例えば、ある期間にわたって一定の間隔で投与されてもよい。一般に、組換え抗体または薬学的組成物は、対象が、選択された指標または複数の指標に対して、ベースラインよりも医学的に関連のある程度の改善を呈するまで対象に投与される。

【０１１１】

一般に、用量中に存在するか、または用量中に存在するコードポリヌクレオチドによって原位置で生成される、本明細書に記載される組換え二重特異性抗体の量は、約１０μｇ／ｋｇ～約２０ｍｇ／ｋｇの宿主の範囲である。有効な治療法を提供するために十分な最小投薬量の使用が、通常好ましい。患者は、一般に、治療または予防される状態に好適なアッセイを使用して、治療的または予防的有効性について監視されてもよく、アッセイは、当業者によく知られておいり、いくつかは本明細書に記載される。

【０１１２】

本明細書に開示される方法は、本明細書に記載される二重特異性抗体の経口投与、または液体薬学的組成物の注入による送達を含み得る。液体形態で投与される場合、好適な用量サイズは、対象の大きさによって異なるが、典型的には、１０～６０ｋｇの対象に対して約１ｍＬ～約５００ｍＬの範囲である（約０．０１μｇ～約１０００μｇ／ｋｇを含む）。最適用量は、一般に、実験モデル及び／または臨床治験を使用して決定されてもよい。最適用量は、対象の体質量、体面積、体重、または血液量に依存し得る。本明細書に記載されるように、適切な用量は、疾患の段階、一般健康状態、年齢、性別、体重、及び医学技術分野における当業者によく知られている他の要因にも依存し得る。

【０１１３】

本明細書に記載される方法の特定の実施形態では、対象は、ヒトまたは非ヒト動物である。本明細書に記載される治療を必要とする対象は、本明細書に記載される疾患の症状もしくは続発症、障害、または状態を呈し得るか、またはその疾患、障害、もしくは状態を発達させる危険性があり得る。治療され得る非ヒト動物として、哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類（例えば、サル、チンパンジー、ゴリラ）、齧歯類（例えば、ラット、マウス、アレチネズミ、ハムスター、フェレット、ウサギ）、ウサギ類、ブタ（例えば、ブタ、ミニブタ）、ウマ、イヌ、ネコ、ウシ、ならびに他の家畜農場及び動物園動物が挙げられる。

【０１１４】

本開示は、例証によって提供され、限定するものとは見なされない、以下の実施例を参照してより容易に理解されるであろう。

【実施例】

【０１１５】

材料及び方法

細胞試料、細胞株、及び抗体。ＨＬＡ型健康ドナー及び患者からの末梢血単核細胞（Ｐ

ＢＭＣ）は、フィコール密度濃度によって入手された。ヒト白血病及び固形腫瘍細胞株を入手するための供給源は、既述であった（Ｄａｏら、上記）。この研究のための細胞株は、ＡＭＬ株ＨＬ６０、ＳＥＴ－２、Ｐｈ＋ＡＬＬ株ＢＶ１７３、中皮腫細胞株ＪＭＮ及びＭＳＴＯを含んでいた。全ての細胞はＨＬＡ型であった。３７Ｃ／５％CO_2で、５％ＦＣＳ、ペニシリン、ストレプトマイシン、２ミリモル／Ｌのグルタミン、及び２－メルカプトエタノールが補充されたＲＰＭＩ　１６４０中で細胞株を培養した。全ての動物研究のための腫瘍細胞は、前述されるようにＧＦＰ／ルシフェラーゼで形質導入された（Ｄａｏら、上記）。ＥＳＫ１及びその対照ヒトＩｇＧ１は、Ｅｕｒｅｋａ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ　Ｉｎｃ（Ｅｍｅｒｙｖｉｌｌｅ，ＣＡ）によって生成され、ＡＰＣ複合は、製造者の指示に従って行われた（Ｄａｏら、上記）。ＦＩＴＣまたはＡＰＣに複合されたヒトＨＬＡ－Ａ２（クローンＢＢ７．２）に対するモノクローナル抗体（ｍＡｂ）、及びそのアイソタイプ対照マウスＩｇＧ２ｂ／ＦＩＴＣまたはＡＰＣは、ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から購入された。ヒトＩＦＮ－γのためのＦＩＴＣまたはＰＥ及びＥＬＩＳＡキットに複合されたマウス抗ＨｉｓタグｍＡｂは、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（ＮＹ）から購入された。ウミシイタケルシフェラーゼ基質ＶｉｖｉＲｅｎ（商標）は、Ｐｒｏｍｅｇａ（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）から購入された。

【０１１６】

ペプチド。全てのペプチドは、Ｇｅｎｅｍｅｄ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｉｎｃ．（Ｓａｎ　Ａｎｔｏｎｉｏ，ＴＸ）によって購入し、合成した。ＨＥＲ２－ｎｅｕ－３６９－３７７のアミノ酸配列：ＫＩＦＧＳＬＡＦＬ（配列番号１３８）、ｐ５３　２６４－２７２：ＬＦＥＶＲＶＣＡＣ（配列番号１３９）、ＷＴ１：ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号１）、Ｐｒａｍｅ－３００：ＡＬＹＶＤＳＬＦＦＬ（配列番号１４０）、ｐ４３５：ＮＬＴＨＶＬＹＰＶ（配列番号１４１）。ＷＴ１－ＮＱＭ、ＡＩＬＤＦ、ＬＤＦ、及び全プールペプチドは、既述であった（Ｄｏｕｂｒｏｖｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｌｏｏｄ．２０１２　Ａｕｇ　２３；１２０（８）：１６３３－４６）。対照ＨＬＡ－Ａ２結合ペプチドは、ユーイング肉腫：ＱＬＱＮＰＳＹＤＫ（配列番号１４２）から得られた。

【０１１７】

ＥＳＫ二重特異性抗体の構築、発現、及び精製。一実施形態では、ＥＳＫ１二重特異性抗体は、Ｎ末端にＥＳＫ１　ｓｃＦｖと、Ｃ末端にマウスモノクローナル抗体の抗ヒトＣＤ３ε　ｓｃＦｖとを含む、一本鎖二重特異性抗体である（図１０）。ＥＳＫ１　ｓｃＦｖ抗体及び抗ヒトＣＤ３ε　ｓｃＦｖ抗体をコードするＤＮＡ断片を、ＧｅｎｅＡｒｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）によって合成し、標準ＤＮＡ技術を使用して、ユリイカの哺乳類発現ベクターｐＧＳＮ－Ｈｙｇにサブクローニングした。ヘキサヒスチジン（Ｈｉｓ）タグを、抗体精製及び検出のために、Ｃ末端においてＥＳＫ１二重特異性抗体の下流に挿入した。

【０１１８】

チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞を、ＥＳＫ１二重特異性抗体発現ベクターで形質転換し、メチオニンスルホキシミン（ＭＳＸ）、グルタミン合成酵素（ＧＳ）に基づく方法（Ｆａｎ，ｅｔ　ａｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．１０９（４），１００７－１００５（２０１２））標準薬物選択によって安定した発現が達成された。分泌されたＥＳＫ１二重特異性抗体分子を含有するＣＨＯ細胞上清を回収した。Ｈｉｓ　Ｔｒａｐ　ＨＰカラム（ＧＥヘルスケア）を使用し、ＦＰＬＣ　ＡＫＴＡシステムによって、ＥＳＫ１二重特異性抗体を精製した。つまり、ＣＨＯ細胞培養物を清澄し、低いイミダゾール濃度（２０ｍＭ）でカラムの上に負荷した後、均一濃度の高イミダゾール濃度溶出緩衝液（５００ｍＭ）を使用して、結合されたＥＳＫ１二重特異性タンパク質を溶出した。陰性対照二重特異性抗体は、ＥＳＫ１　ｓｃＦｖを置換する無関係のヒトＩｇＧ１抗体（Ｃａｔ＃ＥＴ９０１、Ｅｕｒｅｋａ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ）から構築された。

【０１１９】

フローサイトメトリー分析ＥＳＫ二重特異性抗体染色の場合、ヒトＴ細胞、腫瘍細胞、

または細胞株を、異なる濃度のＥＳＫ二重特異性抗体または対照二重特異性抗体と共に３０分間、氷上でインキュベートし、洗浄し、そしてＨｉｓタグに対する二次ｍＡｂと共にインキュベートした。原発性卵巣癌細胞上のＨＥＲ２－ｎｅｕ発現は、腫瘍細胞をトラスツズマブで、その後に二次ヤギ抗ヒトＩｇＧで染色することによって測定した。ＨＬＡ－Ａ２発現及びＥＳＫ結合は、それぞれのｍＡｂでの細胞の直接染色によって決定した。患者試料からのＰＢＭＣまたはＴ細胞の表現型は、様々なフルオロフォアに複合されたＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４５　ＲＡ、ＣＤ４５　ＲＯ、ＣＣＲ７、ＣＤ１９、またはＣＤ３３に対する、ｍＡｂによる細胞の直接染色を特徴とする。フローサイトメトリーデータを、ＦＡＣＳ　Ｃａｌｉｂｕｒ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）上で回収し、ＦｌｏｗＪｏ　Ｖ８．７．１及び９．４．８ソフトウェアで分析した。

【０１２０】

結合研究を行い、Ｊｕｒｋａｔ（ＣＤ３$^{+}$ヒト癌細胞株）細胞へのＥＳＫ１＋Ｌ２Ｋ二重特異性抗体を調べた。つまり、３倍連続希釈中の二重特異性抗体を、１０μｇ／ｍＬから開始して、０．５×１０^{6}Ｊｕｒｋａｔ細胞に添加した。細胞を、１００倍希釈のＦＩＴＣ複合抗Ｈｉｓタグ抗体（Ｔｈｅｒｍｏ　＃ＭＡ１－８１８９１）、または１０００倍希釈のアロフィコシアニン（ＡＰＣ）抗マウスＩｇＧ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ＃Ｐｏｌｙ４０５３）を用いたもしくは用いないマウス抗Ｈｉｓタグ抗体と共にインキュベートし、Ｇｕａｖａ　ＥａｓｙＣｙｔｅ　６ＨＴ（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）上でフローサイトメトリーにより分析した。結果が図８に示される。

【０１２１】

次に、ＥＳＫ１＋Ｌ２Ｋ、ＥＴ９０１＋Ｌ２Ｋ、及びＥＴ９０１＋ＯＫＴ３抗体を１０μｇ／ｍＬで使用し、ＦＩＴＣ抗ＨｉｓによるＪｕｒｋａｔ細胞の染色を調べた。ＦＩＴＣ　ＥＴ９０１及びＡＰＣ　ＥＴ９０１（ＥＴ９０１は、完全ヒトＩｇＧ１である）を対照として使用した。結果が図９に示される。

【０１２２】

ＭＨＣ１／ＷＴ１ペプチド複合体へのＥＳＫ１及びＥＳＫ１二重特異性抗体結合の比較を、ＦｏｒｔｅＢｉｏ　Ｏｃｔｅ分析によって決定した。結果が以下の表に示される。

【表１０】

表１０

タンパク質	k_d［１／ｓ］	k_dの誤差	K_a［１／Ｍｓ］	K_D [nM]
ESK1 ScFv	1.16E-3	1.54E-5	3.68E3	315
ESK1 BiTE	7.04E-3	1.71E-4	1.98E4	355

完全長ＥＳＫ１二重特異性抗体：一実施形態では、ＥＳＫ－１二重特異性抗体は、全長抗体である。つまり、ＥＳＫ１またはＥＴ９０１（陰性対照）及び抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）は、等モル比で組み合わされ、０．５ｍＬ以内の各抗体の最終濃度０．８ｍｇ／ｍＬを生じた。１２．５μＬの１Ｍ　２－メルカプトエチルアミン（２－ＭＥＡ）を反応混合液に添加し、溶液を、３７℃で９０分間インキュベートした。２－ＭＥＡを、Ｚｅｂａ脱塩カラム（１００～２００μＬ、７－ｋＤＡ、Ｐｉｅｒｃｅ．）によって除去した。溶液を４℃で一晩保管し、ジスルフィド結合の再酸化を可能にした。生成値が表１１に示される。

【表１１】

表１１

タンパク質	濃度（ｍｇ／ｍＬ）	体積（ｍＬ）	量（ｍｇ）	理論的収量（ｍｇ）	回収率
ＥＳＫ１	１．３３	０．５	０．６７	０．８	８４％
９０１	１．２９	０．５	０．６４	０．８	８０％

ＦｏｒｔｅＢｉｏ Ｏｃｔｅｔ ＱＫを使用して結合親和性を決定した。５μｇ／ｍＬのビオチン化ＭＨＣ－ＷＴ１を、ストレプトアビジンバイオセンサーの上に負荷した。過剰抗原を洗い流した後、ＥＳＫ－１－ＯＫＴ３、ＥＳＫ１、及びＯＫＴ３溶液を、それぞれ２０μｇ／ｍＬ、１０μｇ／ｍＬ、及び１０μｇ／ｍＬで、それらの会合及び解離定数について試験した。結合パラメータは、１：１結合部位モデルを使用して計算され、表１２に示される。

【表１２】

表１２

タンパク質	k_d［１／ｓ］	k_dの誤差	K_a［１／Ｍｓ］	K_D［ｎＭ］
ＥＳＫ１－ＯＫＴ３（二重特異性）	３．３０Ｅ－３	４．１７Ｅ－５	３．５８Ｅ４	９２．２
ＥＳＫ１	４．９９Ｅ－３	６．７８Ｅ－５	５．４７Ｅ５	９．１２
ＯＫＴ３	－	－	－	－

【０１２３】

ＥＳＫ二重特異性抗体により媒介されるＴ細胞活性化。ＣＤ３ Ｔ細胞を、汎Ｔ細胞単離キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を使用して、陰性免疫磁気細胞分離によってＰＢＭＣから単離した。ＥＳＫ二重特異性抗体またはその対照二重特異性抗体を、様々な濃度で、標的細胞及び精製されたＣＤ３ Ｔ細胞と共に、異なるエフェクター：標的（Ｅ：Ｔ）比で一晩または異なる期間でインキュベートした。上清液を採取し、ＩＦＮ－γ及びＴＮＦ－αに対して、ＥＬＩＳＡによってサイトカイン放出を測定した。さらに、ＥＳＫ二重特異性抗体により媒介されるＴ細胞活性化を、卵巣癌患者からの自己腫瘍細胞の存在下で細胞増殖によって評価し、７日間の共インキュベーション後に一晩３Ｈ－チミジン組み込みによって測定した。

【０１２４】

ＥＢＶ特異性Ｔ細胞の増殖及びレポーター遺伝子の形質導入。Ｔ細胞を、接着による単球の枯渇によってＰＢＭＣから富化した。非接着細胞を、２０：１の応答体：刺激体（Ｒ：Ｓ）比でＥＢＶのＢ９５．８株を用いる形質転換により生成された照射自己ＥＢＶ形質転換Ｂ細胞（ＥＢＶ－ＢＬＣＬ）により刺激し、５％ ＨＳ（ＹＨ５、Ｇｅｍｉｎｉ）を含有するＹｓｓｅｌ培地内で培養した。７日目から開始して、１０～３０単位／ｍＬのインターロイキン－２（ＩＬ－２）をＴ細胞培養物に２～３日毎に添加し（Ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｖｅ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｂｅｄｆｏｒｄ，ＭＡ）、同じＥＢＶ－ＢＬＣＬを用いて４：１のＲ：Ｓ比で週１回再刺激した。

【０１２５】

既述のように（Ｄｏｕｂｒｏｖｉｎａ，Ｅ．ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ １１９（１１），２６４４－２６５５（２０１２））、ＥＢＶ特異性Ｔリンパ球を、レトロウイルスベクターｔｄｒｒｓＲＬｕｃで形質導入し、ＰＥの分類によって増殖及び富化した。形質導入されたＥＢＶ特異性Ｔリンパ球を、Ｇ－ｒｅｘフラスコ（Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）内で培養した。インビボＴ細胞追跡

研究の場合、１０００万個の細胞をマウスに注入し、４時間後にウミシイタケルシフェラーゼ基質ＶｉｖｉＲｅｎ（商標）を静脈内付与した。

【０１２６】

ＥＳＫ二重特異性抗体により向け直されたＴ細胞の細胞傷害活性。ＥＳＫ二重特異性抗体またはその対照二重特異性抗体を、様々な濃度で、標的細胞及びＰＢＭＣ、精製されたＣＤ３　Ｔ細胞またはＥＢＶ特異性Ｔ細胞と共に、異なるエフェクター：標的（Ｅ：Ｔ）比で５時間または一晩インキュベートした。細胞傷害活性を、ＰｒｏｍｅｇａからのＣｙｔｏｔｏｘ　９６非放射活性キットをそれらの指示に従って使用し、^{51}Ｃｒ放出アッセイ（５時間のインキュベーション後）またはＬＤＨ放出アッセイ（一晩インキュベーション後）によって測定した。ＡＭＬ患者の一症例では、ＰＢＭＣ及び自己芽球を、２０μｇ／ｍＬのＥＳＫまたは対照二重特異性抗体の存在下または不在下で共インキュベートし、細胞を採取して、白血病芽球の場合はＣＤ３３、及びＴ細胞の場合はＣＤ３を用いて３日目及び４日目に二重染色した。卵巣癌患者の症例の場合、ＰＢＭＣを自己卵巣癌細胞と共に１週間インキュベートし、細胞傷害活性を^{51}Ｃｒ放出アッセイによって測定した。

【０１２７】

薬物動態及び体内分布研究。ＥＳＫ二重特異性抗体または対照二重特異性抗体を、クロラミン－Ｔ方法を使用して^{125}Ｉ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で標識した。１００μｇの抗体を、１ｍＣｉ^{125}Ｉ及び２０μｇクロラミン－Ｔと反応させ、２００μｇのＮａメタ重亜硫酸塩で急冷した後、ＰＢＳ中の２％ウシ血清アルブミンで平衡した１０ＤＧカラムを使用して、遊離^{125}Ｉから分離した。生成物の特異的活性は、６ｍＣｉ／ｍｇであった。放射標識二重特異性抗体（２μｇ）を、非標識二重特異性抗体で１用量あたり２０μｇまで希釈し、マウスに後眼窩的に注入した。様々な時点で血液を採取し、計量してγカウンター上で測定した。２４時間目に臓器を採取し、計量して、γカウンター上で活性を測定した。

【０１２８】

ヒト腫瘍異種移植ＮＳＧモデルにおけるＥＳＫ二重特異性抗体の治験。ヒトＥＢＶ特異性Ｔ細胞を、それらの抗原特異性がＥＢＶ　Ａｇに大きく偏向していたため、全ての異種移植モデルに使用した（それらはＧＶＨＤを誘導してはならない）。ＢＶ１７３　ＡＬＬモデルの場合、２００万個のＢＶ１７３ヒト白血病細胞をＮＳＧマウスに静脈内注入した。５日目、治療されることになっていた全てのマウスにおけるホタルルシフェラーゼ画像解析によって腫瘍生着を確認し、次いで、マウスを異なる治療群に無作為に分けた。６日目、１０００万個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞をマウスに静脈内注入した。４～６時間後、２０μｇのＥＳＫ二重特異性抗体またはその対照二重特異性抗体を静脈内注入し、週２回、３週間の治療にわたって全６回繰り返し、それと共に週１回×２でＴ細胞を静脈内注入した。ＳＥＴ－２　ＡＭＬモデルの場合、１００万個の細胞をマウスに静脈内注入し、腫瘍生着を生物発光画像解析によって３日目に確認し、マウスを治療群に無作為に分けた。４日目、１０００万個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞を静脈内注入し、６時間後、２０μｇのＥＳＫ二重特異性抗体またはその対照二重特異性抗体を静脈内注入した。治療経過にわたって、Ｔ細胞を週２回付与し、二重特異性抗体を毎日全６日間にわたって付与した。原発性ＡＬＬモデルにおいて、５００万個のＡＬＬ細胞をＮＳＧマウスに静脈内注入した。６日目、治療されることになっていた全てのマウスにおけるホタルルシフェラーゼ画像解析によって腫瘍生着を確認し、次いで、マウスを異なる治療群に無作為に分けた。３０００万個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞をマウスに静脈内注入し、その後に２０μｇのＥＳＫ二重特異性抗体またはその対照二重特異性抗体を静脈内注入した。二重特異性抗体注入を毎日付与し、Ｔ細胞を週２回、全２週間にわたって付与した。ＪＭＮ中皮腫モデルの場合、３０万個の腫瘍細胞を６０万個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞と混合し、腹腔内（ｉ．ｐ．）注入して１時間後、２０μｇのＥＳＫ二重特異性抗体または対照二重特異性抗体をマウスに静脈内注入した。二重特異性抗体を、毎日全５日間にわたって付与した。腫瘍増殖を、全ての動物モデルに対して、少なくとも週２回、ホタルルシフェラーゼ画像解析によって監視した。

【０１２９】

ＥＳＫ二重特異性抗体により誘導された二次Ｔ細胞応答。ＰＢＭＣ、卵巣癌患者からのＮＫ細胞及びマクロファージまたは精製されたＣＤ３　Ｔ細胞を枯渇したＰＢＭＣを、照射（３０００ｒａｄ）自己卵巣癌細胞を用いて、４～５：１のＥ：Ｔ比で、０．１μｇ／ｍＬのＥＳＫ二重特異性抗体または対照二重特異性抗体の存在または不在下、ならびに１０％自己血漿（ＡＰ）を補充したＲＰＭＩ１６４０培地中のヒトＩＬ－５（５ｎｇ／ｍＬ）及びヒトＩＬ－２（１０μｇ／ｍＬ）の存在下で６日間培養した。７日目、細胞を採取し、洗浄してＩＦＮ－ｇ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイのためのエフェクターとして使用した。つまり、ＨＡ－マルチスクリーンプレート（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を、ＰＢＳ中の１００μＬのマウス抗ヒトＩＦＮ－ｇ抗体（１０Ａｇ／ｍＬ、クローン１－Ｄ１Ｋ、Ｍａｂｔｅｃｈ）で被覆し、一晩４℃でインキュベートし、ＰＢＳで洗浄して未結合抗体を除去し、ＲＰＭＩ　１６４０／１０％自己血漿（ＡＰ）で２時間、３７℃で遮断した。エフェクター細胞を、Ｔ２細胞（４：１のＥ：ＡＰＣ比）または照射自己腫瘍細胞または他の腫瘍細胞株のいずれかと共に蒔いた。様々な試験ペプチドを、２０μｇ／ｍＬでウェルに添加した。陰性対照ウェルは、ＡＰＣ及びＴ細胞を、ペプチドなし、または無関係のペプチドと共に含有した。陽性対照ウェルは、Ｔ細胞＋ＡＰＣ＋２０μｇ／ｍＬのフィトヘマグルチニン（ＰＨＡ、Ｓｉｇｍａ）を含有した。全ての条件を三重で行った。マイクロタイタープレートを、２０時間３７℃でインキュベートし、次いでＰＢＳ／０．０５％　Ｔｗｅｅｎで広範囲にわたって洗浄し、ヒトＩＦＮ－ｇ（２μｇ／ｍＬ、クローン７－Ｂ６－１、Ｍａｂｔｅｃｈ）に対する１００μＬ／ウェルのビオチン化検出抗体を添加した。プレートを追加で２時間、３７℃でインキュベートし、スポット現像を記載のとおり行った（Ｍａｙ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｃａｎｃｅｒ　ｒｅｓｅａｒｃｈ：ａｎ　ｏｆｆｉｃｉａｌ　ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　ｆｏｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ．２００７；１３（１５　Ｐｔ　１）：４５４７－５５．）。スポット数を、ＫＳ　ＥＬＩＳＰＯＴ４．０ソフトウェア（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ　Ｖｉｓｉｏｎ）を有するコンピュータ支援ビデオ画像分析器を用いて自動的に決定した。

【０１３０】

残留Ｔ細胞を、ＩＬ－１５及びＩＬ－２を含む新鮮培地を週１回、最大７～８週間添加することによって増殖させた。場合によっては、残留Ｔ細胞を、最初の刺激と同じ条件で１週間、９：１のエフェクター：標的比で自己腫瘍により再刺激し、Ｔ細胞応答をＩＦＮ－ｇ　ＥＬＩＳＰＯＴによって記載のとおり測定した。

結果

【０１３１】

ＷＴ１＋ＨＬＡ－Ａ０２０１＋腫瘍細胞及びＴ細胞への選択的結合。完全長ＥＳＫ１ｍＡｂは、ＷＴ１及びＨＬＡ－Ａ０２０１制限的に白血病細胞株及び中皮腫細胞株のパネルに結合する（Ｄａｏら、上記）。ＥＳＫ二重特異性抗体、ｓｃＦｖ構築物の結合特異性を試験した。ＦｏｒｔｅＢｉｏ　Ｏｃｔｅｔ（登録商標）（Ｍｅｎｌｏ　Ｐａｒｋ，ＣＡ）結合アッセイは、Ｋｄが３５５ｎＭのＥＳＫ二重特異性抗体を示した。ＥＳＫ二重特異性抗体は、ＳＥＴ－２、ＷＴ１、及びＨＬＡ－Ａ０２０１二重陽性ＡＭＬ細胞株に用量依存的に０．１μｇ／ｍＬ濃度でも結合したが、ＨＬ－６０、ＷＴ１陽性に結合せず、ＨＬＡ－Ａ０２０１陰性、ＡＭＬ細胞株には結合した（図１Ａ、１Ｂ）。対照二重特異性抗体の陽性結合は、試験した全ての濃度でＳＥＴ－２またはＨＬ－６０細胞のいずれに対しても見られず、ＥＳＫ二重特異性抗体の特異性を示す。しかしながら、両方の二重特異性抗体は、精製されたヒトＣＤ３Ｔ細胞に結合することができた（図１Ｃ）。これらの結果は、ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＷＴ１及びＨＬＡ－Ａ０２０１を発現する腫瘍細胞及びヒトＣＤ３　Ｔ細胞をも選択的に認識することができるという点において二重特異性を実証した。

【０１３２】

ＷＴ１及びＨＬＡ－Ａ０２０１陽性腫瘍細胞に対するＴ細胞活性及び細胞傷害活性。二重特異性抗体構築物によるＴ細胞の活性化が、Ｔ細胞と標的抗原を発現する標的細胞との

間の隣接面接触に依存することが示された。二重特異性抗体構築物の１つのアームが非変異形ＣＤ３シグナル伝達複合体を認識するため、これは、Ｔ細胞活性化によって引き起こされる望ましくない炎症応答を回避するために重要である。ＥＳＫ二重特異性抗体及び標的ＳＥＴ－２細胞の存在下、表示濃度のＥＳＫ二重特異性抗体での用量依存的ＩＦＮ－γ放出を観察した（図１Ｄ）。ＣＤ３　Ｔ細胞単独またはＳＥＴ－２細胞の存在下で対照二重特異性抗体と共にインキュベートされたものは、検出不能レベルのＩＦＮ－γを示し、それらの値をＥＳＫ二重特異性抗体群の値から差し引いた。

【０１３３】

ＷＴ１及びＨＬＡ－Ａ０２０１を共発現する標的細胞に対するＥＳＫ二重特異性抗体により向けられたＴ細胞の細胞傷害活性の能力を評価した。精製された静止Ｔ細胞を、連続的に希釈したＥＳＫまたは対照二重特異性抗体を持つ標的細胞を用いて５時間共インキュベートし、細胞溶解を^{51}Ｃｒ放出によって測定した。ＥＳＫ二重特異性抗体は、ＨＬ－６０ではないが、ＡＭＬ細胞株ＳＥＴ－２に対するＴ細胞の細胞傷害活性を用量依存的に誘導し、これは図１に示されるそれらの結合特異性と一致した（図２Ａ、２Ｂ）。共インキュベーション時間が１６時間に延長された場合、標的細胞溶解は、３μｇ／ｍＬ及び０．３μｇ／ｍＬのＥＳＫ二重特異性抗体でそれぞれ９０％及び８０％まで増加した。同様に、ＢＶ１７３及び原発性ＣＭＬ芽球（ＷＴ１＋／ＨＬＡ－Ａ０２０１＋）もまた、ＰＢＭＣによってＥＳＫ二重特異性抗体の存在下、用量依存的に６時間の共インキュベーションにおいて溶解したところ（図２Ｃ、２Ｄ）、ＢＶ１７３の死滅は、０．０１μｇ／ｍＬのＥＳＫ二重特異性抗体で明らかであった。ＣＭＬ芽球に対する相対的に弱い死滅は、この試料中のＨＬＡ－Ａ２及びＥＳＫ結合の低レベル発現に起因し得る。対照二重特異性抗体は、いかなる重要な細胞傷害活性も誘導せず、標的特異性がＴ細胞活性化に必要であることを示す。

【０１３４】

ＥＳＫ二重特異性抗体が異なるＡｇ（例えば、ＥＢＶ）で以前に繰り返し準備刺激されていたＴ細胞の細胞傷害活性を向け直す能力が説明された。Ｔ細胞の抗原特異性は、ＥＢＶ　Ａｇのみに向かって重く偏向されるべきであるため、そのようなＴ細胞を使用することは、異種移植動物モデルにおいて移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を潜在的に回避し得る。エフェクター：標的（Ｅ：Ｔ）比の滴定による、０．１μｇ／ｍＬのＥＳＫ二重特異性抗体を用いた５時間－５１Ｃｒ放出によるＴ細胞死滅の能力を試験した。試験された全ての標的細胞に対して、ＥＳＫ二重特異性抗体に対する強力な用量依存的死滅が観察された（図２Ｅ、２Ｆ、２Ｇ）。ＢＶ１７３の場合、より高いＥ：Ｔ比ではほぼ５０％の死滅が見られ、１．６：１のような低いＥ：Ｔ比では約２５％の死滅が見られた（図２Ｅ）。ＪＭＮ標的細胞に対して、３．１３のＥ：Ｔ比で特異的死滅が観察された（図２Ｆ）。同様に、原発性卵巣癌細胞に対する強力な細胞傷害活性は、様々なＥ：Ｔ比で５０％超～２０％の範囲の死滅が認められた（図２Ｇ）。Ｔ細胞単独、または中皮腫細胞株ＪＭＮ、ＡＬＬ　ＢＶ１７３、及び原発性卵巣癌細胞（全てＷＴ１及びＨＬＡ－Ａ０２０１を共発現する）中のＷＴ１＋／ＨＬＡ－Ａ０２０１＋に対する対照二重特異性抗体を含む培養物において、死滅は見られなかった。これらの結果は、ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＷＴ１以外に対して特異性を持つ、以前に活性化されたＴ細胞の強力な細胞傷害活性を特異的に向け直し、ＷＴ１及びＨＬＡ－Ａ０２０１陽性である腫瘍細胞を溶解できることを実証した。

【０１３５】

次に、ヒトインビボ状況を模倣する、自己設定におけるＴ細胞のＥＳＫ二重特異性抗体により媒介される活性化及び細胞傷害活性をより詳しく調査した。卵巣癌患者からのＰＢＭＣを、０．１μｇ／ｍＬのＥＳＫ二重特異性抗体の存在下で７日間、表示のとおり様々なＥ：Ｔ比で照射自己卵巣癌細胞により刺激した。８日目、６時間培養物中に^{51}Ｃｒ標識自己腫瘍細胞を添加することによって、細胞傷害活性を測定した。用量依存的死滅は、ＥＳＫ二重特異性抗体を含む培養物において、１００ＰＢＭＣでも刺激の開始時に観察された（図３Ａ）。全ての対照群において、死滅は観察されなかった。同時に、Ｔ細胞増殖を、８日培養の最後に３Ｈ－チミジン組み込みによって測定した（図３Ｂ）。ＥＳＫ二重

特異性抗体を含む培養物においてのみ、著しい細胞増殖が見られた。ＰＢＭＣのいずれも、腫瘍細胞単独も、ＥＳＫまたは対照二重特異性抗体のいずれにも反応しなかった。さらに、自己腫瘍細胞単独または対照二重特異性抗体とのＰＢＭＣの共培養は、Ｔ細胞増殖を示さず、Ｔ細胞が自己腫瘍Ａｇに対して耐性があることを示唆する。一緒に、これらのデータは、ＥＳＫ二重特異性抗体によるＴ細胞の特異的活性化が、腫瘍細胞の存在を必要とすること、及びＥＳＫ二重特異性抗体が、Ｔ細胞に自己耐性を克服させ得ることを実証した。ＥＳＫ二重特異性抗体が自己Ｔ細胞増殖及びその標的癌細胞の死滅を誘導する能力は、ＡＭＬ患者からの二次自己モデルにおいて例証された（図１６Ａ～１６Ｄ）。

【０１３６】

ＮＳＧマウスにおける、ＷＴ１／ＨＬＡ－Ａ０２０１を発現するヒト白血病の治療。以前にＢＶ１７３　Ｐｈ＋ＡＬＬ細胞を６日間静脈内的に異種移植したＮＳＧマウスにおける、ＥＳＫ二重特異性抗体のインビボ治療有効性を試験した。処置の時点で、マウスは、肝臓、脾臓、及び骨髄において目に見える播種性白血病を有していた。Ｔ細胞をマウスに静脈内注入し、続いて４時間後に二重特異性抗体を注入した。劇的な腫瘍阻害が観察され、これはＥＳＫ二重特異性抗体を受けたマウスの骨髄において特に顕著であり、処置後３日から始まり、最大３週間持続した（図４Ａ）。対照的に、腫瘍細胞、Ｔ細胞と共に腫瘍、ＥＳＫ二重特異性抗体と共に腫瘍、またはＴ細胞及び対照二重特異性抗体と共に腫瘍細胞を受けたマウスを含んでいた対照群の全てのマウスは、骨髄及び他の臓器において腫瘍増殖の増加及び大量の腫瘍量を示した（図４Ａ）。５匹のマウスからの光子強度の平均は、ＥＳＫ二重特異性抗体処置群において約１０倍の腫瘍低減を示した（図４Ｂ）。腫瘍播種後４９日まで、著しいＧＶＨＤは観察されなかった（図４Ｃ）。結果は、ＥＳＫ二重特異性抗体が効率的に係合し、強力なＴ細胞の細胞傷害活性がＢＶ１７３標的細胞を死滅させるようにすることを実証した。

【０１３７】

原発性ＡＬＬ細胞で静脈内的に異種移植されたＮＳＧマウスにおける、ＥＳＫ二重特異性抗体のインビボ治療有効性を試験した。Ｔ細胞を、マウスに静脈内注入し、続いてＥＳＫ二重特異性抗体を注入した。対照群の全てのマウスは、骨髄及び他の臓器において腫瘍増殖の増加及び大量の腫瘍量を示した。劇的な二重特異性抗体選択的腫瘍阻害が観察され、これはマウスの骨髄において特に顕著であり、処置を停止した９日後から３週間を超えて持続した（図４Ｄ）。５匹のマウスからの光子強度の平均は、他の対照群よりもＥＳＫ二重特異性抗体処置群において約１０倍～２０倍の腫瘍低減を示した（図４Ｅ）。腫瘍播種後４９日まで、臨床的に著しいＧＶＨＤは観察されなかった。

【０１３８】

これらの結果は、ＥＳＫ二重特異性抗体が効率的に係合し、強力なＴ細胞の細胞傷害活性が原発性白血病細胞を死滅させるようにすることを実証した。予想のとおり、ＥＢＶ特異的ヒトＴ細胞は、非特異的死滅を示さなかったため、それを使用して異種移植モデルにおける二重特異性抗体活性に対処することができた。このモデルは、その半減期がたった数時間であったため、ＥＳＫ二重特異性抗体の週２回投与が十分でなかったことを示唆し、薬物動態研究によって確認された。

【０１３９】

ＥＳＫ二重特異性抗体は、ＢＶ１７３モデルに示されるように、骨髄白血病を治療する際により有効であると思われたため、より侵襲性のＡＭＬ細胞ＳＥＴ－２モデルにおけるこの効果を調査した。ＳＥＴ－２細胞は、生着時に急速に骨髄に移行する傾向がある。投与及びスケジュールは、薬物動態研究に従い、ＥＳＫ二重特異性抗体の短い５時間のβ血漿半減期を示した（図１７Ａ）。治療投薬量は、連続する全６日間にわたって毎日の二重特異性抗体注入に対して増加された。細胞を週２回付与した。白血病生着がＢＬＩによって確認された場合、マウスは、腫瘍播種後４日目に開始する処置を受けた（図５Ａ、第１列）。ＳＥＴ－２細胞は、骨髄中で急速に増殖し、ＳＥＴ－２細胞またはＴ細胞と共にＳＥＴ－２を受けたマウスの骨髄中で白血病の大量浸潤が見られた。しかしながら、ＥＳＫ二重特異性抗体処置群において、１４日まで検出可能な白血病は見られず、処置を停止し

た後１週間を超えて、１８日後、つまり３２日目まで最小白血病量のみが観察された。前処置時点における低レベルの白血病を示すために、ＢＬＩスケール上の増加は、７～１８日の画像について、全ての群に対して均一に減少した。対照二重特異性抗体群は、最初にわずかに遅延した白血病量を示した。これは、二重特異性抗体の抗ＣＤ３アームによるＥＢＶ特異性Ｔ細胞の活性化によって引き起こされることができ、これはＥＳＫ二重特異性抗体よりも強いＴ細胞に対する結合親和性を有していた（図１Ｃ）。ＥＢＶ特異性Ｔ細胞は、既に活性化され、インビトロで複数回増殖されており、それらを強力なポリクローナル刺激を受け易くする。次いで、活性化されたＴ細胞は、炎症性サイトカインを放出し、これが腫瘍細胞に対する有害環境を創出し得る。ＥＳＫ二重特異性抗体処置群中の全てのマウスは、１ヶ月後も依然として生きていたが、Ｔ細胞単独で処置されたマウスまたは無処置の群において、生存率はわずか２０％であった（図５Ｂ）。ＥＳＫ二重特異性抗体処置群のマウスは、脊椎骨髄への白血病浸潤によって引き起こされる中枢神経系（ＣＮＳ）麻痺の兆候を最大４０日間示さなかったが、対照群のほぼ全ての動物は影響を受けた（図５Ｃ）。これらのデータは、ＥＳＫ二重特異性抗体が、骨髄中の侵襲性白血病細胞に対する強力な治療薬であることを実証した。

【０１４０】

ＥＳＫ二重特異性抗体は、腫瘍部位におけるＴ細胞保持を媒介する。二重特異性抗体は、Ｔ細胞に有効に係合して標的をインビトロで死滅させることは知られているが、インビボ機序を記録したインビボ研究は報告されていない。ＥＳＫ二重特異性抗体が、生きた動物における白血病の部位でのＴ細胞保持及び持続を誘起するその能力の結果であったかどうかを調査した。ウミシイタケ／ルシフェラーゼで形質導入された１０００万個のＥＢＶ特異性Ｔ細胞を、ＧＥＦ／ルシフェラーゼ陽性ＳＥＴ－２　ＡＭＬ細胞が生着した３日後、及び二重特異性抗体注入の４時間後にＮＳＧマウスに注入した。Ｔ細胞注入（０時間）、８時間（すなわち、二重特異性抗体注入後４時間）、２４時間、４８時間、及び７２時間の時点で発光画像解析によってＴ細胞移行を監視した。Ｔ細胞は、注入直後に肺に移行し、次いで８時間で肝臓、脾臓、及び骨髄を含む他の部分に分布した（図６Ａ）。Ｔ細胞シグナルは、７２時間にわたって徐々に減少した。Ｔ細胞に続く対照二重特異性抗体の注入は、Ｔ細胞単独と同様の分布パターン及び時間経過を示した。しかしながら、ＥＳＫ二重特異性抗体で処置されたマウスは、４～２０時間から肺及びＢＭにおいてＴ細胞シグナルの著しい増加を示し、７２時間まで続いた。細胞は、肺において大幅に減少したが、肝臓、脾臓、及びＢＭ中に残留していた。生物発光強度の定量は、ＥＳＫ二重特異性抗体注入の４時間後に、他の２つの対照群と比較して、肝臓、脾臓、及び骨髄への約３倍より多くのＴ細胞蓄積があった（図６Ｂ）。同時に白血病の進行を監視することは、Ｔ細胞保持と白血病量との間の逆相関を明らかにした（図６Ｃ）。これらの結果は、ＥＳＫ二重特異性抗体が、白血病部位においてＴ細胞の長期保持を媒介し、Ｔ細胞の細胞傷害活性を、ＷＴ１及びＨＬＡ－Ａ０２０１を発現する腫瘍細胞に有効に向けることができるという強力なインビボ証拠を提供した。

【０１４１】

ＮＳＧマウスにおける中皮腫の治療。２つの白血病異種移植モデルにおけるＥＳＫ二重特異性抗体の強力な治療活性が示され、侵襲性固形腫瘍を治療することにおけるＥＳＫ二重特異性抗体の有用性を腹腔内モデルを使用して調査して、腹腔中皮腫をシミュレートした。ＷＴ１＋／ＨＬＡ－Ａ０２０１＋ＪＭＮ中皮腫細胞を、１：２の標的－エフェクター比でＥＢＶ特異性Ｔ細胞と混合し、ＮＳＧマウスに腹腔内注入した。二重特異性抗体を、１時間後に静脈内注入し、連続して５日間繰り返した。１日後の生物発光画像解析は、ＥＳＫ二重特異性抗体で処置したマウスにおいて目に見える腫瘍を示さなかったが、３つの対照群のマウスは、目に見える腫瘍量を示し、ＥＳＫ二重特異性抗体が腫瘍細胞を排除したことを示唆する（図７Ａ）。ＥＳＫ二重特異性抗体による腫瘍抑制は、２３日目、すなわち処置を停止した後１８日まで持続し、マウスにおいて最小の腫瘍量のみが見られた。１群あたり５匹のマウスの生物発光強度を平均化することは、２３日目に持続的な約２０倍超の腫瘍抑制を示した（図７Ｂ）。

【０１４２】
薬物動態：ＥＳＫ二重特異性抗体の薬物動態を決定するために、トレース^{125}Ｉ標識構築物を静脈内でＣ５７　ＢＬ６／Ｊに、または腹腔内でＢＡＬＢ／ｃマウスに注入し、血液放射活性を４８時間～５２時間にわたって測定した。静脈内注入された二重特異性抗体は、３０分のα半減期で血液から組織に速やかに再分布し、その後、５時間のβ半減期でクリアランスした。腹腔内送達後に、二重特異性抗体レベルは血中で増加し、注入後３時間でピークに達した。次に、構築物を同じβ半減期でクリアランスした。静脈内注入からの全曝露（曲線下面積）は、腹腔内注入を用いる場合よりも大きかった。同じ放射標識構築物を使用して、抗体の体内分布パターンを決定した。２４時間後、全ての組織において１グラムあたり１％未満の注入用量が検出された（図１７Ａ、１７Ｂ）。

【０１４３】
ＥＳＫ二重特異性抗体は、ＨＬＡ－Ａ０２０１の関連において、ＨＥＲ２エピトープに対する二次Ｔ細胞応答を誘導した。二重特異性抗体の作用機序は、癌細胞標的及びＴ細胞を架橋して、細胞溶解シナプスを形成するそれらの直接効果に寄与した。そのような隣接面接触が、自己腫瘍細胞によって発現された他の腫瘍抗原に特異的な集団において既存のＴ細胞を直接活性化し得るかどうかを調査し、卵巣癌を持つＨＬＡ－Ａ＊０２：０１陽性患者からの自己インビトロモデルを使用して、二重特異性抗体がワクチン効果をもたらし得るかどうかを決定した。患者のＰＢＭＣを、低用量のＥＳＫ二重特異性抗体の存在下で自己腫瘍細胞と共培養し、１週間後、エピトープ特異的ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１により制限されたＴ細胞応答を、ＩＦＮ－ｇ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイによって評価した。細胞を単独で含む、または対照二重特異性抗体を持つ対照群は、いかなる特異的ＩＦＮ－ｇ放出も示さなかった。患者の腫瘍細胞は、それらの細胞表面上でＷＴ１　ＲＭＦ及びＨＥＲ２－ｎｅｕの両方を発現した（図１８Ａ～Ｃ）。驚いたことに、強力な二次Ｔ細胞応答は、ＥＳＫ二重特異的媒介性相互作用が終了したずっと後に、ＨＥＲ２－ｎｅｕ－３６９エピトープ、自己腫瘍細胞単独、及びＳＥＴ－２　ＡＭＬ細胞に対して誘導された（図１９Ａ～Ｆ）。これらの自己細胞において、５６個のプールされたＷＴ１由来エピトープ、ＷＴ１エピトープＲＭＦ、ＡＩＬＤＦ０５、もしくはＬＤＦ；ｐ５３由来エピトープ２６４－２７３；Ｐｒａｍｅ－３００、Ｐｒａｍｅ－４３５；ユーイング肉腫エピトープＥＷ、Ｍｕｃ１－１５、－１６、及び－１８；またはＨＬ６０細胞に対する応答は測定不能であった。ＳＥＴ－２は、ＨＥＲ２－ｎｅｕを発現せず、Ｔ細胞はＷＴ１　ＲＭＦを認識しなかったため、ＳＥＴ－２に対するＴ細胞応答は、ＷＴ１でもＨＥＲ２－ｎｅｕでもない、他のまだ定義されていないエピトープの認識を示した。これらの結果は、ＥＳＫ二重特異性抗体が、複数の腫瘍抗原に対する二次Ｔ細胞応答を誘導することができ、それにより予想外のワクチン効果を提供し得ることを明らかに実証した。

【０１４４】
原則として、二次Ｔ細胞応答は、腫瘍細胞死後に放出された細胞内抗原を取り込み、提示することができるＰＢＭＣの中でプロフェッショナルＡＰＣを必要とするはずである。代替として、腫瘍細胞は、Ｔ細胞と腫瘍との間の隣接面接触中に既存のエピトープ特異性Ｔ細胞を直接活性化することができる。この機序を明確にするために、ワクチン効果は、エフェクター細胞として、精製されたＴ細胞、ならびにＮＫ細胞枯渇及びマクロファージ枯渇ＰＢＭＣ（Ｔ＋Ｂ細胞）対全ＰＢＭＣを用いて起こり得るかどうかを調査した。興味深いことに、エフェクターとしてのＴ細胞単独は、依然として、Ｔ＋Ｂ細胞（図１９Ｃ）または全ＰＢＭＣ（図１９Ｄ）によってもたらされるものと同様の程度で、ＨＥＲ２－ｎｅｕ、自己腫瘍細胞、及びＳＥＴ－２細胞に対する応答が可能であった。これらの自己癌抗原のＴ細胞提示自体の可能性を排除するために、精製されたＴ細胞を、ＥＳＫ二重特異性抗体の存在または不在下で、繰返しの凍結乾燥によって生成された自己腫瘍細胞溶解物で共培養した。この設定において、ＨＥＲ２－ｎｅｕエピトープまたは腫瘍細胞に対してＴ細胞応答は見られなかった（図１９Ｄ）。これらの結果は、プロフェッショナルＡＰＣもエピトープ腫瘍も、ＨＥＲ２－ｎｅｕまたは腫瘍細胞中に存在する他のエピトープに対する二重特異性抗体により誘導された二次Ｔ細胞応答に必要でなく、したがって交差提示

が機序ではなかったことを実証した。

【０１４５】

腫瘍細胞抗原提示が、共刺激性分子に依存するかどうかも調べた。健康なドナーからのＣＤ１４＋単球が、強力なＣＤ８６発現を示した一方で、卵巣癌細胞は、ＣＤ８６の発現をほとんど有しなかった。結果は、重要な共刺激分子ＣＤ８６が腫瘍細胞抗原提示に関与する可能性は低いことを示した（図２０）。ＣＤ８６またはＩＣＯＳＬ発現は検出されなかった。共刺激分子の欠失は、腫瘍細胞が不良な光源提示細胞である理由のうちの１つであるが、ある特定のサイトカインは、共刺激性シグナルを提供し、腫瘍特異性Ｔ細胞活性化の要件を満たすことができる。ＥＳＫ二重特異性抗体は、ＰＢＭＣ及びＴ細胞の両方によってＩＦＮ－γ及びＴＮＦ－α分泌を誘導した（図１９Ｅ～Ｆ）。

【０１４６】

ＥＳＫ二重特異性抗体がＴ細胞集団に対して任意の長期効果を有していたかどうかを試験するために、Ｔ細胞は、ＥＳＫ二重特異性抗体による最初の活性化後に低用量のＩＬ－１５及びＩＬ－２においてインビトロで増殖された。対照群のＴ細胞は、培養物中で１週間を超えて生存しなかったが、ＥＳＫ二重特異性抗体によって活性化されたＴ細胞は、２ヶ月間さらなる活性化なしに増殖し続けた。表現型分析は、ＥＳＫ二重特異性抗体及び腫瘍による活性化の７週間後に、ＣＤ８＋Ｔ細胞は集団の８９％まで増加し、ＣＤ４＋Ｔ細胞は６％に減少した（図２１Ａ～Ｂ）。興味深いことに、ＣＤ８＋／ＣＣＲ７－細胞の中で、ＣＤ４５ＲＡ－／ＣＤ４５ＲＯ＋細胞が増加し、エフェクターメモリー表現型を示す。重要なことに、この後の時点でもこれらのＴ細胞は、依然として自己腫瘍及びＳＥＴ－２　ＡＭＬ細胞に対するそれらの元の特異性を保持していた（図２１Ｃ）。これらの結果は、ＥＳＫ二重特異性抗体が、長く続く二次特異性ＣＤ８　Ｔ細胞応答を誘導し得ることを示した。

考察

【０１４７】

本開示は、ＴＣＲ様ｍＡｂに由来する第１の二重特異性抗体構築物を提供する。ＥＳＫ二重特異性抗体は、ＨＬＡ－Ａ０２０１分子によって提示されるＷＴ１　ＲＭＦエピトープに特異的であった。ＥＳＫ二重特異性抗体は、インビトロ及びインビボの両方でＡＬＬ、ＡＭＬ、メソテリオーマ、及び原発性卵巣癌細胞を含む複数の癌に対する強力な抗腫瘍活性を示した。ここで提示される研究は、１）ｍＡｂがＴＣＲ様ｍＡｂであり、細胞内腫瘍特異性標的の認識を可能にする、２）腫瘍細胞上の標的密度が著しく低く、二重特異性抗体の適用を標的のはるかに大きな領域へ開くことができる概念証明を提供する、３）同時二重エフェクター細胞及び標的細胞追跡によるインビボのＥＳＫ二重特異性抗体活性の機序が実証された（以前の二重特異性抗体研究は、ほとんどの動物研究において、エフェクターＴ細胞及び標的細胞が注入前に混合されたため、これを示していなかった）、４）自己系を使用して、ＥＳＫ二重特異性抗体は、Ｔ細胞耐性を破壊して、原発性卵巣癌細胞を死滅させることができることが実証された、５）ＥＳＫ二重特異性抗体が、ＨＥＲ２－ｎｅｕなどの他の腫瘍抗原に対して長命の二次特異性Ｔ細胞応答を誘導したという点において、以前の研究とは異なる。さらに、二次Ｔ細胞応答は、古典的ＡＰＣによって引き起こされる交差提示によって媒介されなかったが、むしろ二重特異性抗体によって養育されたＴ細胞と腫瘍細胞との間の直接及び物理的に近い相互作用の結果であった。

【０１４８】

現在開発中の標的細胞表面タンパク質である全ての二重特異性抗体構築物、例えば、ＣＤ１９、ＣＤ３３、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）または上皮成長因子（ＥＧＦ）受容体は、正常細胞上で見出される系統または分化抗原である。対照的に、本開示は、ＴＣＲ様二重特異性抗体構築物が、腫瘍特異性標的のペプチド／ＭＨＣ複合体の低密度エピトープを認識できることを初めて実証する。これは、親和性が低すぎるか、またはＴ細胞によって細胞傷害活性を活性化する能力が不十分であるため、ｓｃＦｖ二重特異性抗体構築物が、低密度Ａｇを標的とするために好適でない場合があるという従来の見解に反論する。本開示は、ＴＣＲ模倣二重特異性抗体構築物が、造血性及び固形腫瘍の両方のいくつかの

マウスモデルにおいて強力な治療活性が可能であることを始めて実証し、他の癌特異的細胞内腫瘍抗原を標的とする二重特異性抗体の開発を大幅に広げるための概念の証拠を提供する。二重特異性抗体がＴ細胞を癌細胞と接触させるというインビトロアッセイから知られているが、そのような機序は、以前にインビボで観察されていなかった。本開示は、他の細胞内腫瘍Ａｇを標的とする二重特異性ｍＡｂのさらなる開発のための概念の証拠を提供する。故に、本明細書に記載されるＥＳＫ二重特異性抗体は、プラットフォームの治療適用を広げることができる。

【０１４９】

一実施形態では、ＥＳＫ二重特異性抗体は、リンパ球性及び骨髄性白血病、中皮腫、及び原発性卵巣癌細胞、共発現ＷＴ１及びＨＬＡ－Ａ０２０１に対して、インビトロで高速かつ強力な細胞傷害活性を誘導した。Ｔ細胞またはＥＢＶ特異性Ｔ細胞を静止させることによる標的細胞の溶解は、１６時間を超える培養後にＴ細胞死滅を示した様々な他の二重特異性抗体構築物による研究と比較して、５時間の共インキュベーションにおいて検出できた。ＥＳＫ二重特異性抗体の細胞溶解活性は、より長期間のインキュベーションによってさらに強化されることができ、ＳＥＴ－２　ＡＭＬ細胞により達成された最大８０～９０％の死滅によって示される。これは、ＣＤ３３及びＣＤ１９に特異的な他の二重特異性抗体と同様の特徴を共有し、ＥＳＫ二重特異性抗体がＴ細胞を標的に連続的に係合することを示唆する。ＩＦＮ－ｇの分泌は、ＥＳＫ二重特異性抗体媒介性の標的特異性Ｔ細胞活性化をさらに実証した。臨床的関連性を持つ重要な観察は、ＥＳＫ二重特異性抗体が、卵巣癌患者からの未操作Ｔ細胞を効率的に活性化して、自己腫瘍細胞を増殖及び死滅させることができ、ＥＳＫ二重特異性抗体の存在が、Ｔ細胞に自己腫瘍Ａｇに対する耐性を克服させ得ることを示唆する。Ｔ細胞の浸潤は、固形腫瘍において頻繁に観察されることが知られている。比較的低い分子量の二重特異性抗体は、ＥＳＫ二重特異性抗体の固形腫瘍へのより良好な進入を可能にし、アネルギー性また不応答性Ｔ細胞を活性化して周囲の腫瘍細胞を死滅させる。

【０１５０】

ＥＳＫ二重特異性抗体のインビトロ細胞傷害活性は、異種移植モデルにおけるＰｈ１＋ＡＬＬ、ＡＭＬ、及び中皮腫に対するその顕著に強力な治療活性によって示されるように、インビボで同様に証明された。両方の白血病モデルにおいて、腫瘍細胞の排除は、特に骨髄において明らかであった。さらに、ＥＳＫ二重特異性抗体は、脊椎骨髄の浸潤によって引き起こされる白血病の特長であるＣＮＳ麻痺を予防及び遅延させた。

【０１５１】

Ｔ細胞が腫瘍細胞とは別に注入された場合に（通常は前臨床二重特異性抗体実験において使用されないスケジュール）、ＥＳＫ二重特異性抗体が白血病細胞をインビボで死滅させる能力は、インビボでの二重特異性抗体活性の機序に関する疑問を提起した。ＳＥＴ－２細胞による研究は、ＥＳＫ二重特異性抗体が、標的においてＴ細胞エフェクターを活発に補充し、保持するかどうかという疑問をさらに提起した。これらの疑問は、二重生物発光画像解析を使用して、エフェクターＴ細胞及びＳＥＴ－２　ＡＭＬ細胞を同時に追跡することによって対処した。ＥＳＫ二重特異性抗体で処置したマウスの骨髄において、Ｔ細胞が約３倍増加した。Ｔ細胞保持は、腫瘍低減と良好に相関した。本開示は、ＥＳＫ二重特異性抗体が、Ｔ細胞を標的と効率的に係合し、腫瘍細胞を原位置で死滅させることができるという直接的インビボ証拠を提供する。

【０１５２】

ＮＳＧマウスにおいて腹腔ヒト中皮腫を持つ固形腫瘍モデルにおけるＥＳＫ二重特異性抗体の治療活性を調査した。ＰＫ研究は、ＥＳＫ二重特異性抗体の静脈内注入が、腹腔内注入よりも高い血流中レベルを付与したが、二重特異性抗体の血漿半減期は、特徴的に短かった。処置したマウスにおいて急速かつ劇的な腫瘍阻害が見られ、ＥＳＫ二重特異性抗体が腹腔腫瘍細胞への速やかなアクセスを得たことを示唆する。ＰＫ研究は、他の二重特異性抗体構築物からの薬物動態観察を確認し、ＥＳＫ二重特異性抗体の連続投与が最良の治療有効性を達成するために必要であり得ることを示唆する。

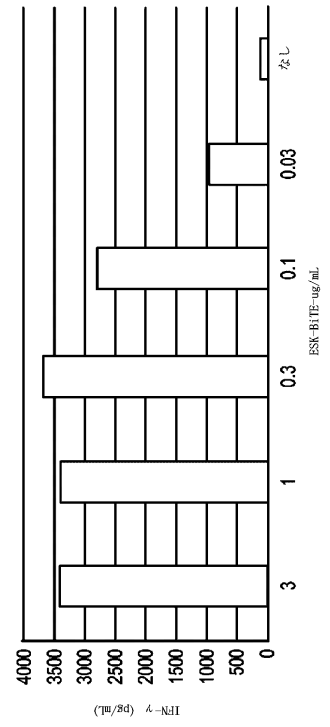
【０１５３】
他の二重特異性抗体構築物と同様に、ＥＳＫ二重特異性抗体の限定は、天然Ｆｃ領域の欠失でもあり、故に新生児ＦｃＲｎ受容体との相互作用を防止し、これはｍＡｂクリアランスを遅延させるため、及びより長い血液ＰＫのために必須である。二重標的特異性を持つｍＡｂの代替二重特異形態を操作しながら依然としてその天然アーキテクチャを維持することは、より長い半減期を提供することができ、また臨床適用におけるその有用性を著しく改善することができる。興味深いことに、完全長ｍＡｂ　ＥＳＫ１は、マウスの肺及び肝臓において播種された白血病ＢＶ１７３細胞を根絶させることにおいてより有効であったことが観察されたが、ＥＳＫ二重特異性抗体は、骨髄においてより有効であるように思われた。これは、体内の異なる臓器において見出されたエフェクターの内容及び型を反映し得る（例えば、肝臓におけるマクロファージ、ならびに血液及び骨髄におけるＴ細胞）。この矛盾は、適切な用量及びスケジュールが決定され得る場合、一緒に使用される完全長ＩｇＧ及び二重特異性抗体形態の組み合わせが、追加の効果を提供し得ることも示唆する。ｍＡｂの開発における治療的ＴＣＲは、比較的最近のことであり、それらの考えられる適用に関して多くの未回答の疑問が存在する。ＴＣＲｍ　ｍＡｂのための二重特異性ｍＡｂ手法の開発は、腫瘍特異性抗原だけでなく、細胞内標的及び他の重要な超低密度の標的も含むためにそれらの範囲の拡大を可能にする。
【０１５４】
これまで二重特異性抗体作用の機序は、Ｔ細胞とｍＡｂにより特定された細胞標的との間の直接相互作用に寄与していた。興味深い発見は、ＷＴ１　ＲＭＦエピトープに特異的なＥＳＫ二重特異性抗体が、自己卵巣癌モデルにおいて、ＨＥＲ２－ｎｅｕエピトープ３６９などの他の癌抗原（及びＷＴ１標的ではない）に高度に特異的な二次Ｔ細胞応答を誘導したことであった。Ｔ細胞と標的細胞との間のそのような隣接面接触は、患者に存在する耐性またはアネルギー性Ｔ細胞を（交差提示なしに）直接再活性化して、他の癌抗原と反応させることができることが示された。驚くべきことに、頑強かつ長く続くＨＥＲ２－ｎｅｕエピトープ特異性Ｔ細胞応答、ならびに他の癌特異的再活性が検出された。ＣＤ８Ｔ細胞は、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１制限エピトープに応答して増殖するように活性化されていなければならないため、エフェクターメモリー表現型を持つＣＤ８　Ｔ細胞の増加が見られ、新たなエピトープ特異性Ｔ細胞応答の観察をさらに支持する。単一ＥＳＫ二重特異性抗体活性化の程度及び期間は、一般的に観察される従来のペプチド／ＡＰＣ誘導型エピトープ特異性Ｔ細胞応答よりもはるかに優れていた（Ｄａｏら、上記）。興味深いことに、ＥＳＫ二重特異性抗体は、患者が前の養子性細胞療法の結果として循環中にＷＴ１反応性Ｔ細胞を有していたとしても、元の標的エピトープＷＴ１－ＲＭＦに対するＴ細胞応答を誘導しなかった。これらの発見は、二重特異性抗体が、Ｔ細胞のＴＣＲを腫瘍細胞に近付け、腫瘍上で直接新たなＭＨＣ／ペプチドエピトープを認識する、及びこのＴ細胞刺激相中のＥＳＫ二重特異性抗体のそのペプチド／ＭＨＣエピトープとの結合が、Ｔ細胞の同起源ＴＣＲからのＲＭＦ／Ａ０２０１エピトープのいかなる認識をも遮断するという仮説と一致した。
【０１５５】
元のワクチンに存在しない様々な腫瘍抗原に対するＴ細胞の増殖は、ワクチンまたはＴ細胞注入を付与された患者において検出され、臨床応答と関連付けられ、この現象は、「エピトープ拡散」と称され、アポトーシス腫瘍細胞をＡＰＣプロセシングすることによる交差提示によって媒介されると考えられる（Ｃｏｒｂｉｅｒｅ，Ｖ．ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．７１（４），１２５３－１２６２（２０１１））。ＣＤ２０に対するｍＡｂのワクチン効果が報告されており、その効果もＡＰＣへの標的細胞の抗体媒介性オプソニン作用によって媒介されるようである（Ｈｉｌｃｈｅｙ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｌｏｏｄ　１１３（１６），３８０９－３８１２（２００９））。
【０１５６】
二重特異性ｍＡｂの新たな機序に関する本明細書に開示される発見は、固形腫瘍におけるＴ細胞浸潤が臨床応答と相関しているため、さらなる治療のための特に重要な意味を有

し得る。その低分子量により、二重特異性抗体は、固形腫瘍に進入してアネルギー性または不応答性Ｔ細胞を活性化し、二重特異性抗体の既知の抗原標的だけでなく、他の定義されていない特異的腫瘍抗原も発現する腫瘍細胞を死滅させることができる。種々の新たなエピトープに対する二重特異性抗体により媒介される細胞傷害性Ｔ細胞クローン増殖は、癌細胞変異体または低抗原密度細胞の逃亡を防止することによって、ならびに長く存続する免疫性を促進することによって、その長期治療有効性に著しく貢献するはずである。さらに、ワクチン効果は、特定の養子性Ｔ細胞療法に先立って、エクスビボ増殖のために使用され得る。

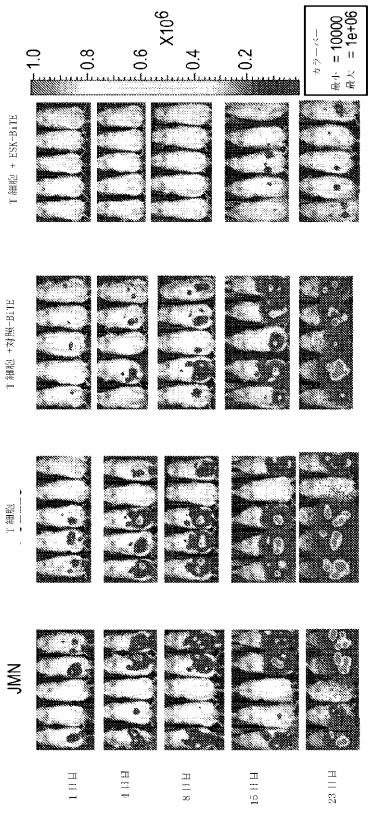
【０１５７】

前述の発明は、理解の明確性の目的で、例証及び実施例によってある程度詳細に説明されたが、本開示の教示に照らして、添付の特許請求の範囲の趣旨または範囲から逸脱することなく、ある特定の変更及び修正をそれに行ってもよいことは、当業者には容易に明らかとなるであろう。本明細書に列挙される全ての参考文献は、それらの全体が参照により本出願に組み込まれる。

【図１Ｄ】

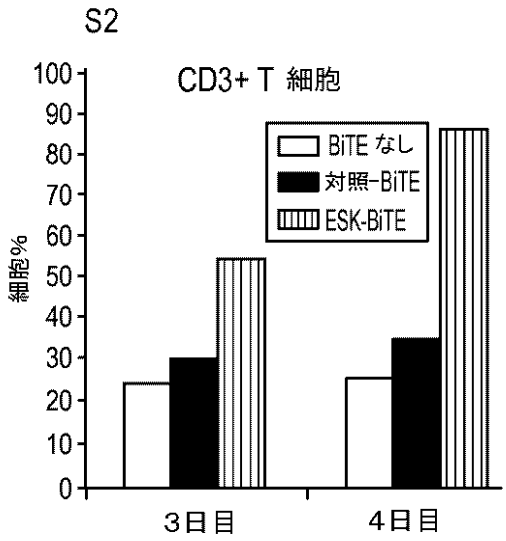


【図７Ａ】



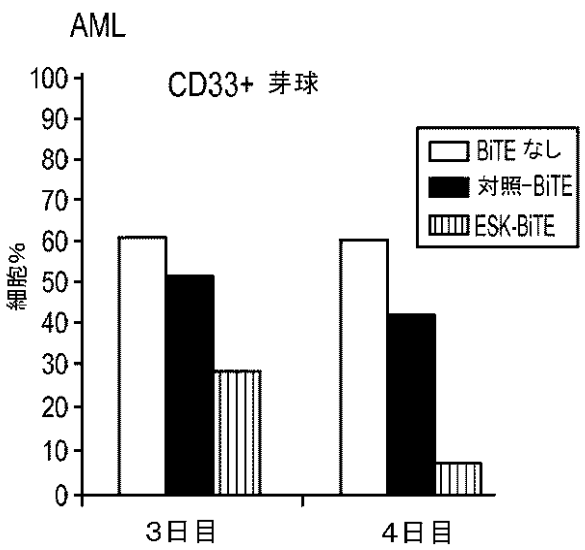
【図１６Ａ】

図 16A



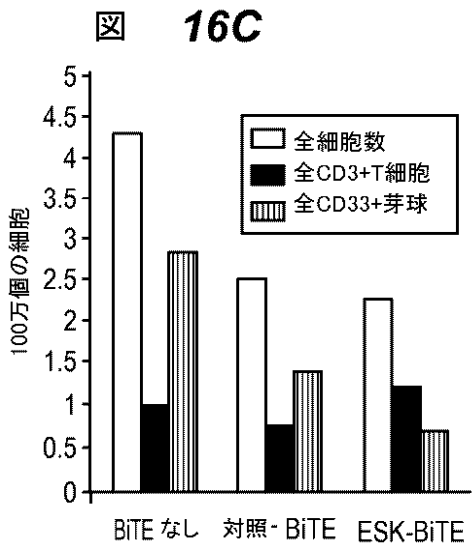
【図１６Ｂ】

図 16B



【図１６Ｃ】

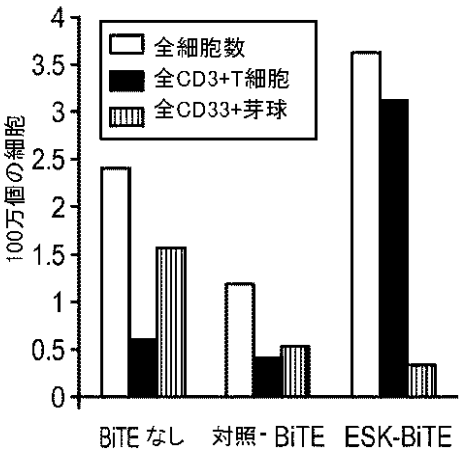
図 16C



3日目

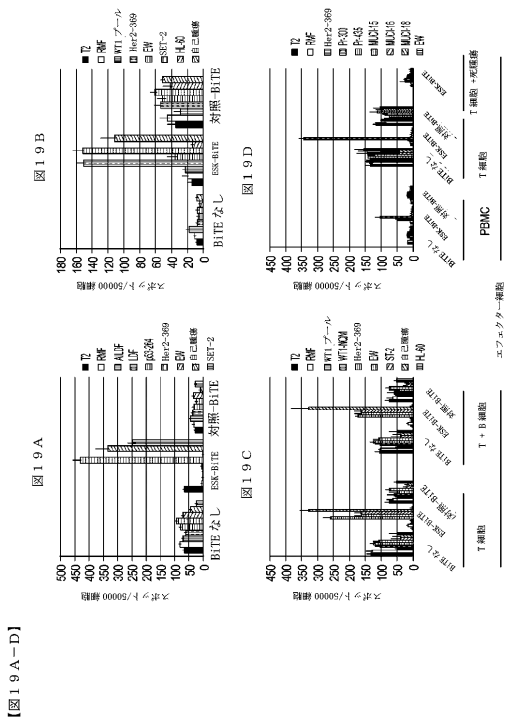
【図１６Ｄ】

図 16D

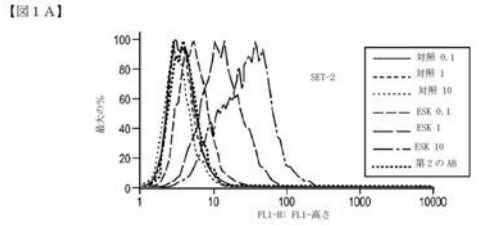


4日目

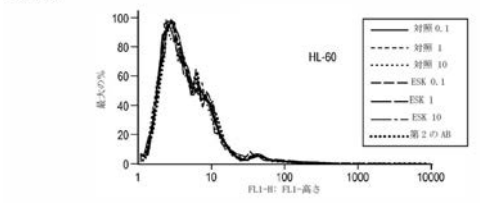
【図１９－１】



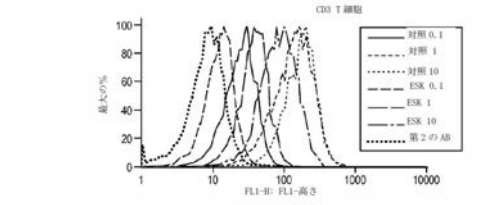
【図１Ａ】



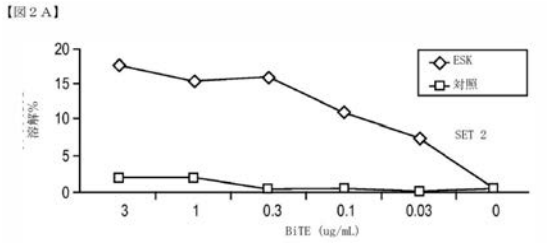
【図１Ｂ】



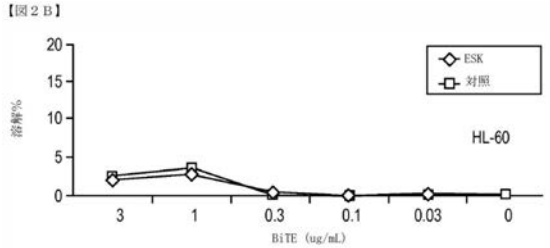
【図１Ｃ】



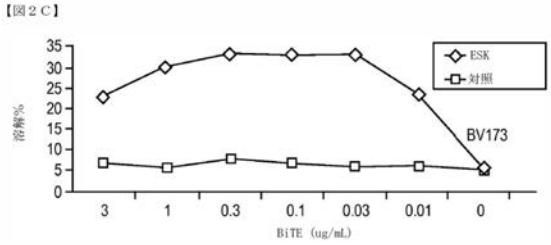
【図２Ａ】



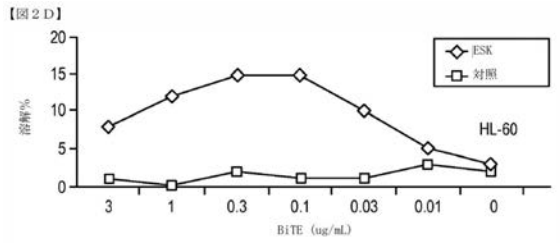
【図２Ｂ】



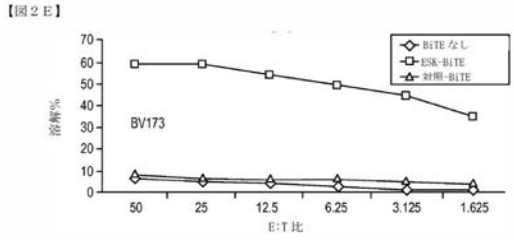
【図２Ｃ】



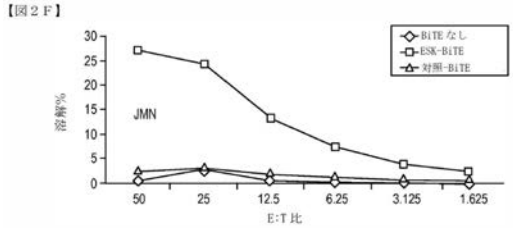
【図２Ｄ】



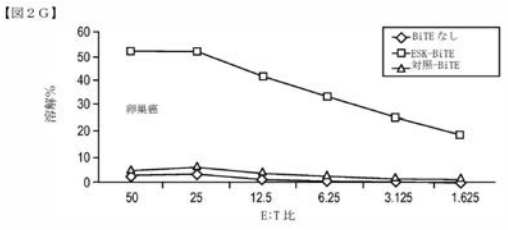
【図２Ｅ】



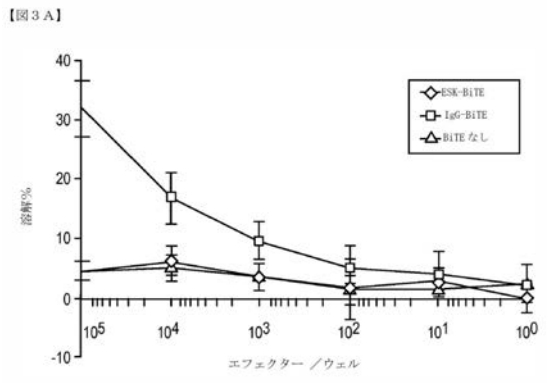
【図２Ｆ】



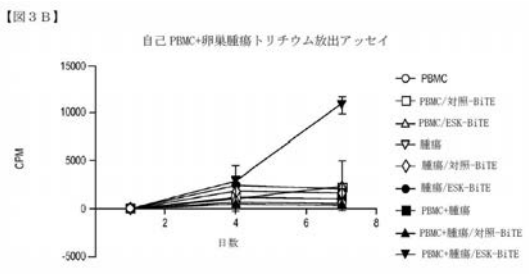
【図２Ｇ】



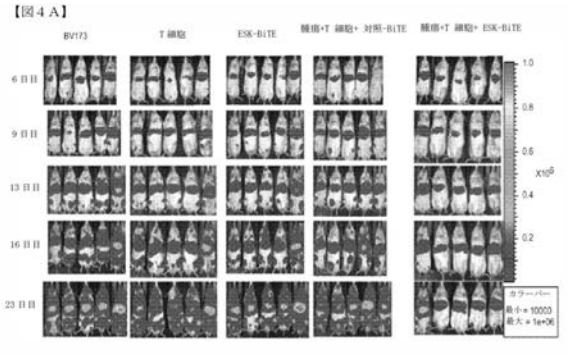
【図３Ａ】



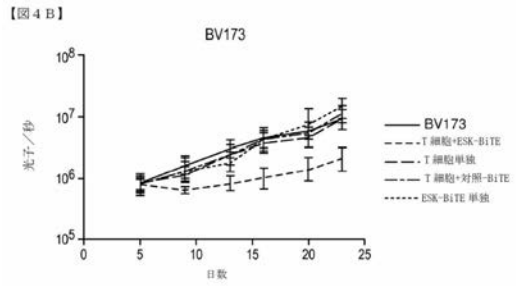
【図３Ｂ】



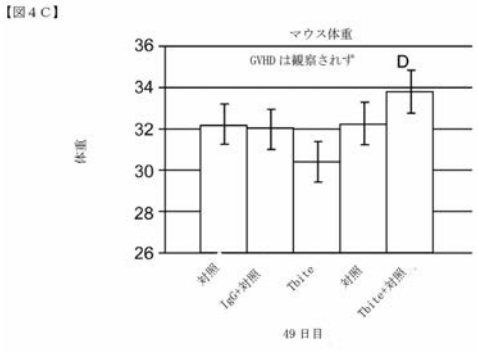
【図４Ａ】



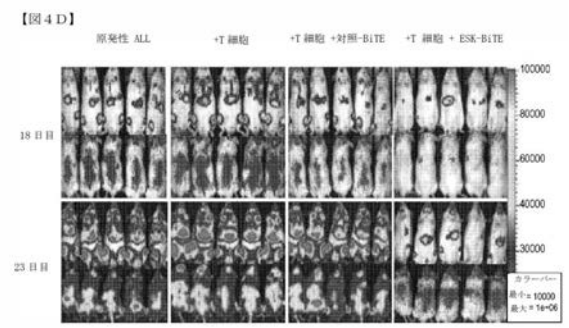
【図４Ｂ】



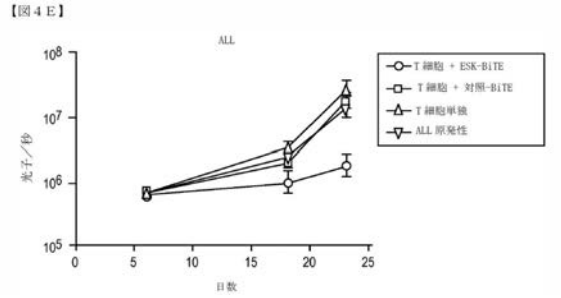
【図４Ｃ】



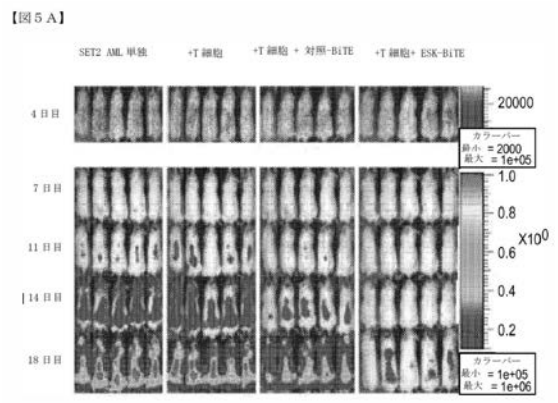
【図４Ｄ】



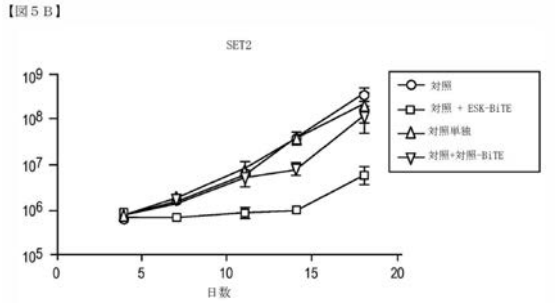
【図４Ｅ】



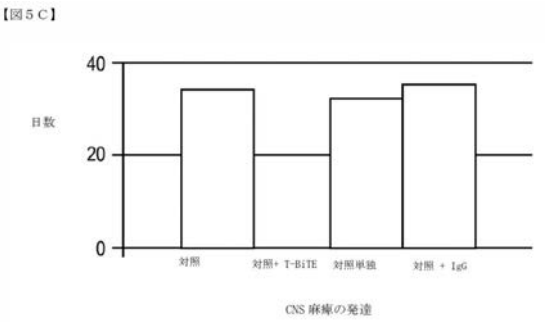
【図５Ａ】



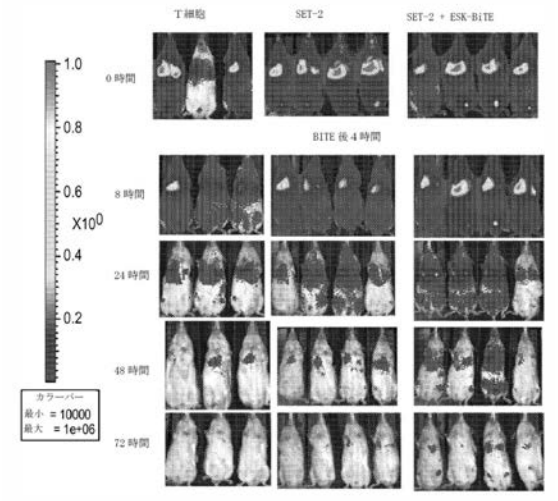
【図５Ｂ】



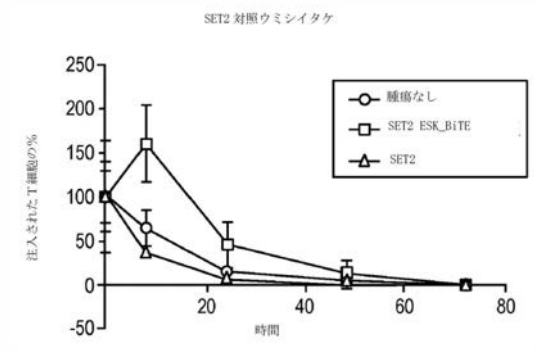
【図５Ｃ】



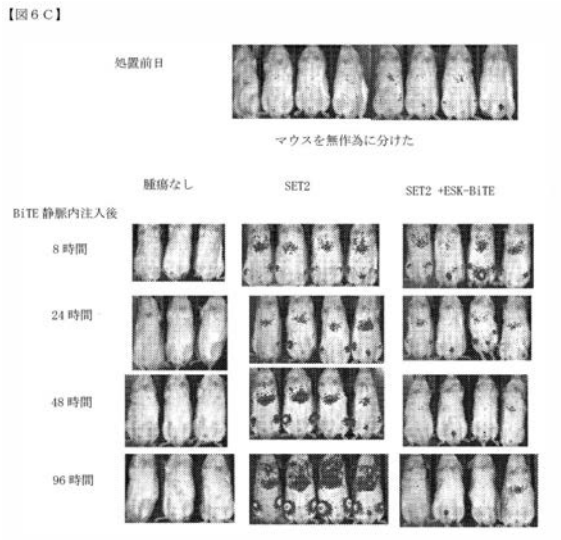
【図６Ａ】



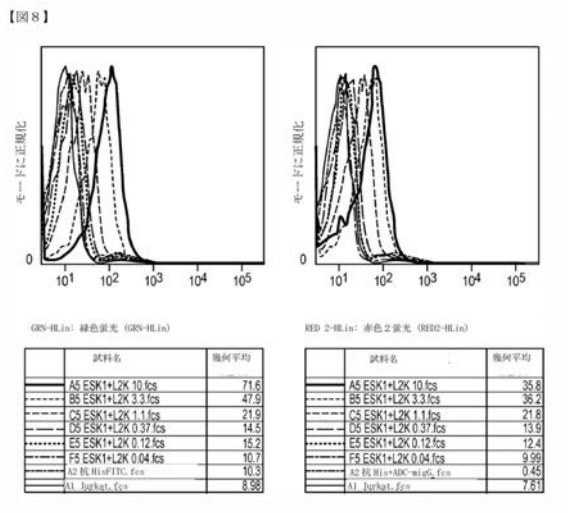
【図６Ｂ】



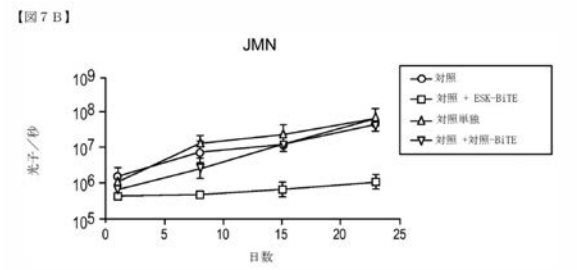
【図６Ｃ】



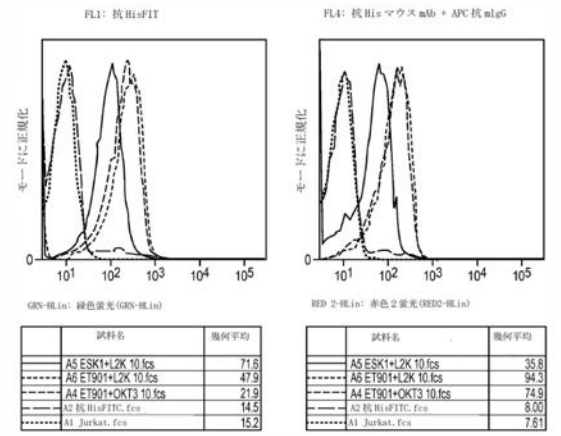
【図８】



【図７Ｂ】



【図９】



【図１０】

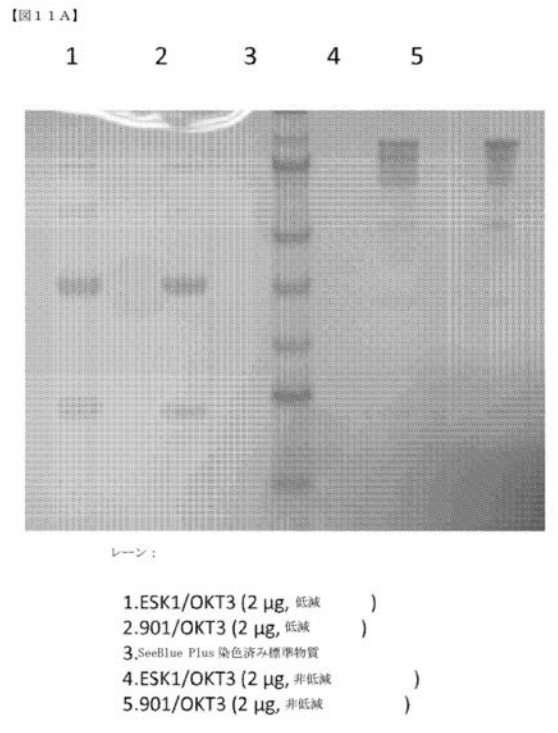
【図１０】

ESK1-T BITE AA配列

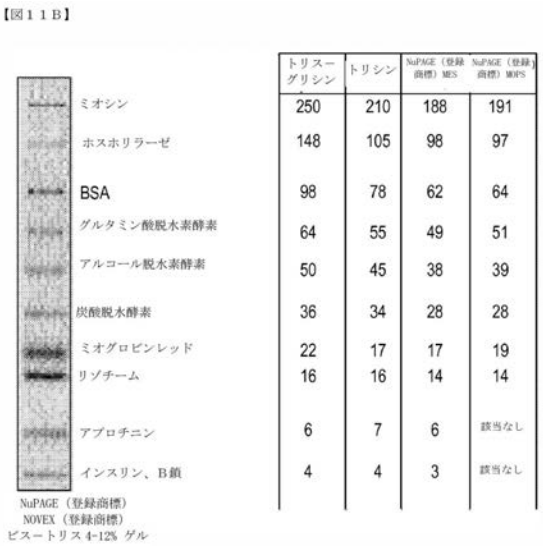
MGWSCIILFLVATATGQAVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQ
QVPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAW
DDSLNGWVFGGGTKLTVLGSRGGGGSGGGGSGGGGSLEMAQMQLVQSGAE
VKEPGESLRISCKGSGYSFTNFWISWVRQMPGKGLEWMGRVDPGYSYSTYSPS
FQGHVTISADKSTSTAYLQWNSLKASDTAMYYCARVQYSGYYDWFDPWGQG
TLVTVSSGGGGSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQA
PGQGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYYC
ARYYDDHYCLDYWGQGTTVTVSSGEGTSTGSGGSGGSGGADDIVLTQSPATLS
LSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSG
SGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIKHHHHHH**



【図１１Ａ】

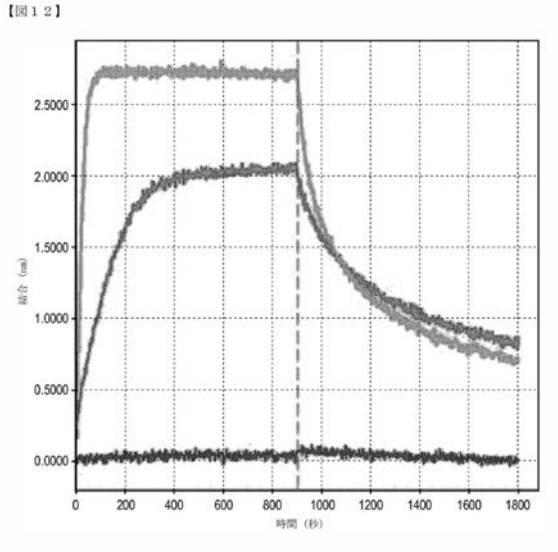


【図１１Ｂ】

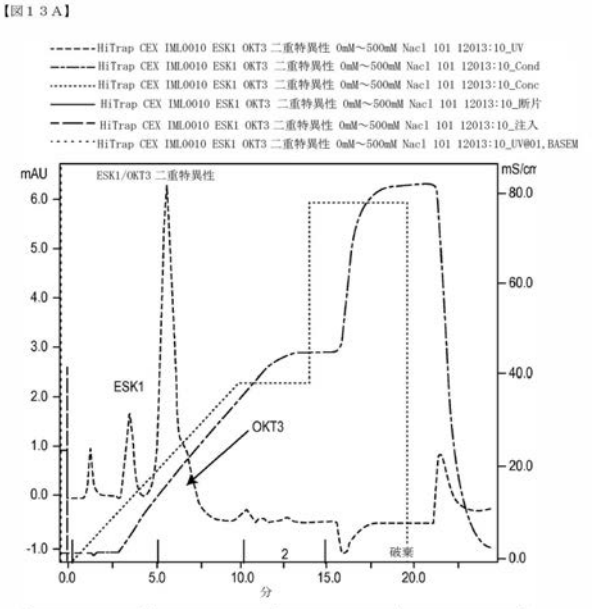


	トリス－グリシン	トリシン	NuPAGE（登録商標）MES	NuPAGE（登録商標）MOPS
ミオシン	250	210	188	191
ホスホリラーゼ	148	105	98	97
BSA	98	78	62	64
グルタミン酸脱水素酵素	64	55	49	51
アルコール脱水素酵素	50	45	38	39
炭酸脱水酵素	36	34	28	28
ミオグロビンレッド	22	17	17	19
リゾチーム	16	16	14	14
アプロチニン	6	7	6	該当なし
インスリン、B鎖	4	4	3	該当なし

【図１２】

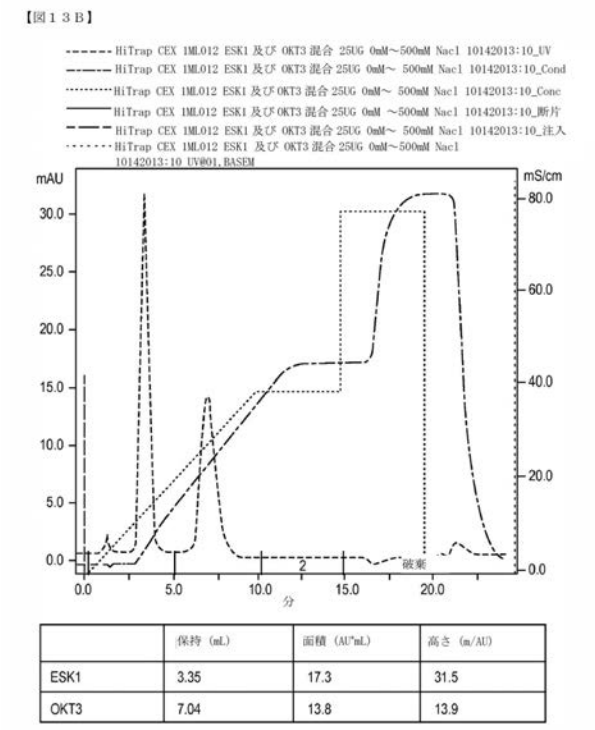


【図１３Ａ】



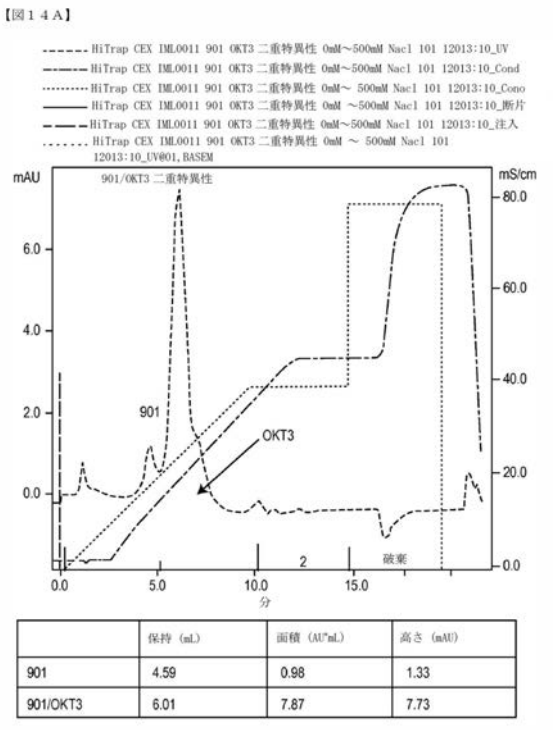
	保持（mL）	面積（AU*mL）	高さ（m/AU）
ESK1	3.5	1.12	1.89
ESK1/OKT3	5.66	6.52	6.45

【図１３Ｂ】



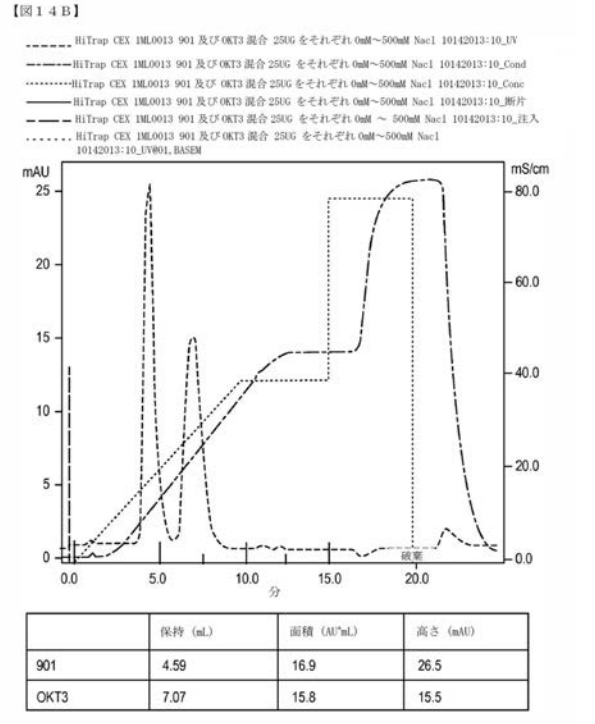
	保持（mL）	面積（AU*mL）	高さ（m/AU）
ESK1	3.35	17.3	31.5
OKT3	7.04	13.8	13.9

【図１４Ａ】



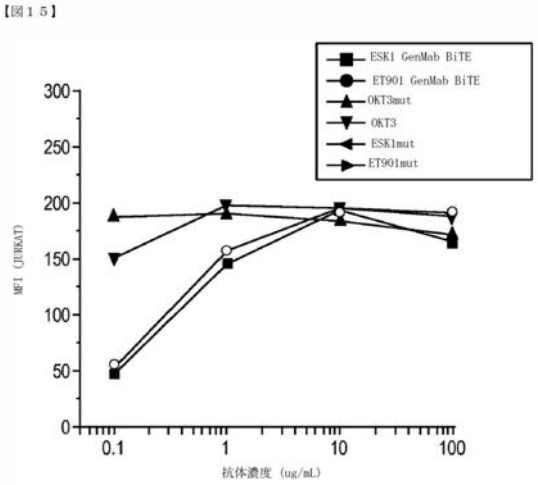
	保持（mL）	面積（AU*mL）	高さ（mAU）
901	4.59	0.98	1.33
901/OKT3	6.01	7.87	7.73

【図１４Ｂ】

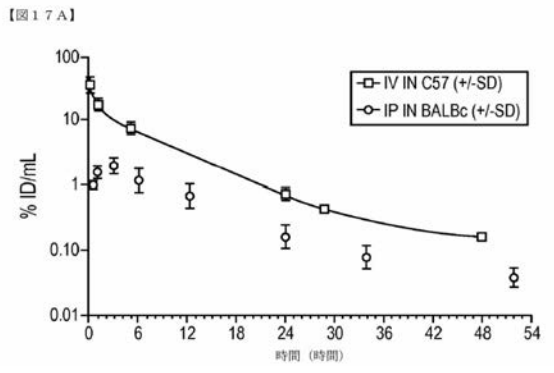


	保持（mL）	面積（AU*mL）	高さ（mAU）
901	4.59	16.9	26.5
OKT3	7.07	15.8	15.5

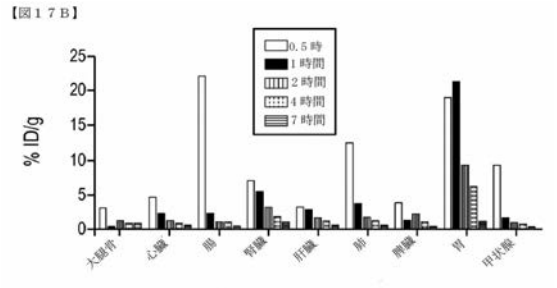
【図１５】



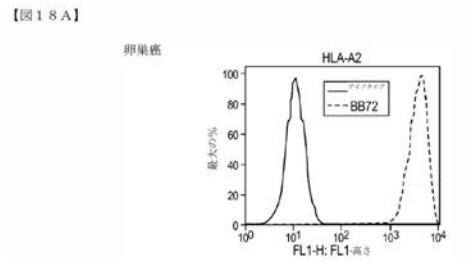
【図１７Ａ】



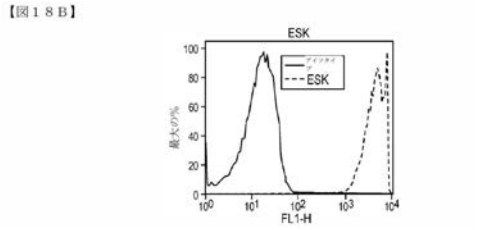
【図１７Ｂ】



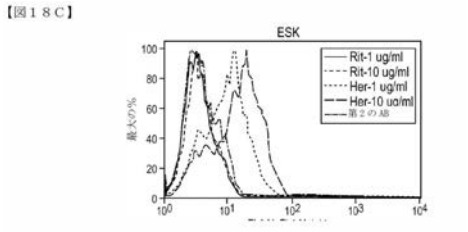
【図１８Ａ】



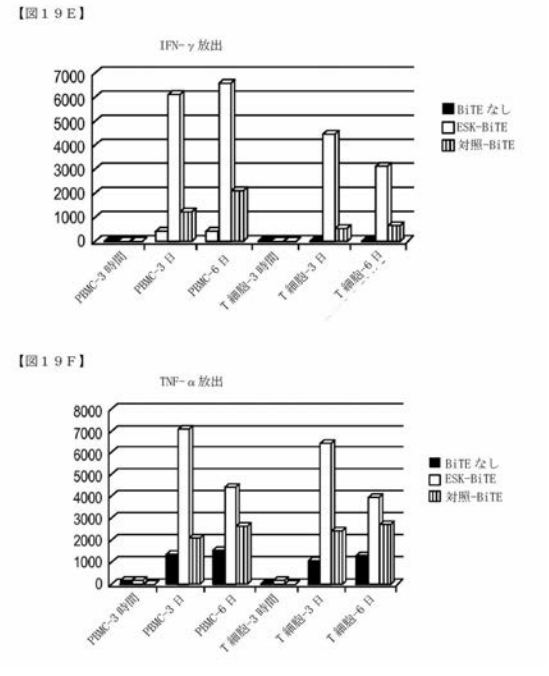
【図１８Ｂ】



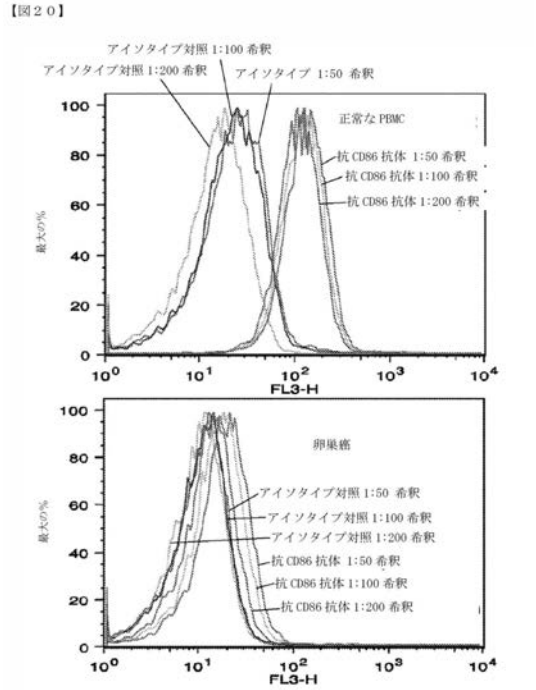
【図１８Ｃ】



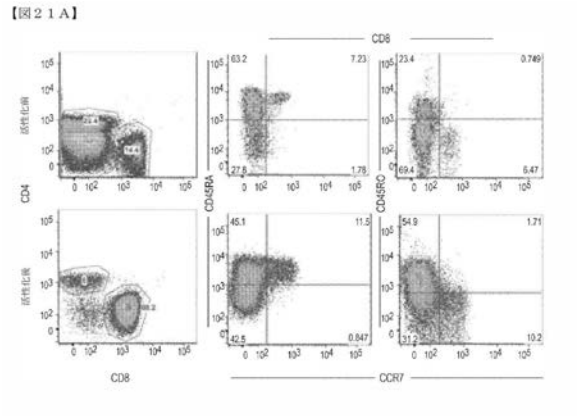
【図１９－２】



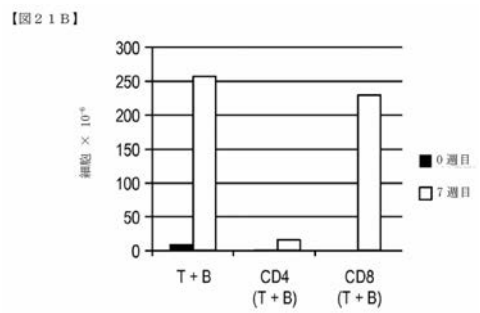
【図２０】



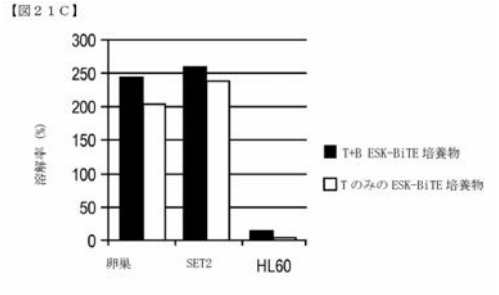
【図２１Ａ】



【図２１Ｂ】



【図２１Ｃ】



【配列表】

2017500057000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/064621

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/32 C07K16/28 C07K16/46 A61K39/395 A61P35/00
A61P35/02
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 A61P

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, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2012/135854 A2 (SLOAN KETTERING INST CANCER [US]; SCHEINBERG DAVID A [US]; DAO TAO [US) 4 October 2012 (2012-10-04) Examples 1-4, 7-9; Tables 1-6; sequence listing -----	1-9, 11-44, 50-69 10
X A	WO 2005/040220 A1 (MICROMET AG [DE]; HOFMEISTER ROBERT [DE]; KOHLEISEN BIRGIT [DE]; LENKK) 6 May 2005 (2005-05-06) page 36, paragraph 1; Examples 8.1, 8.4; Figures 15, 17; SEQ ID NOs 31, 37, 39 -----	1-9, 11-13, 25,32,33 10
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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
7 April 2015	13/04/2015

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Luyten, Kattie

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/064621

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DAO TAO ET AL: "Targeting the Intracellular WT1 Oncogene Product with a Therapeutic Human Antibody", SCIENCE TRANSLATION MEDICINE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 5, no. 176, 1 March 2013 (2013-03-01) , XP009178626, ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/SCITRANSLMED.3005661 the whole document	1-44, 50-69
A	WO 94/28027 A1 (ARCH DEV CORP [US]; BLUESTONE JEFFREY A [US]; ZIVIN ROBERT A [US]; JOL) 8 December 1994 (1994-12-08) sequences 9, 12-14	1-44, 50-69
X,P	DMITRY PANKOV ET AL: "A Bi-Specific T Cell Engaging Monoclonal Antibody (mAb) Derived From a TCR-Like Mab Specific For WT1/HLA-A0201 (ESK-BiTE) Shows a Potent Activity Against Human AML and Ph+ ALL In Mouse Models", BLOOD, vol. 122, no. 21, 15 November 2013 (2013-11-15), page 2521, XP055169088,	1-9, 11-44, 50-69
A,P	the whole document	10

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/064621

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/064621

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-44, 60-65(completely); 50-59, 66-69(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2014/064621

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-44, 60-65(completely); 50-59, 66-69(partially)

A recombinant antibody comprising:
(I) a first antigen-binding portion comprising one of:
(A) a single chain variable fragment (scFv) comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 18, 36, 54, 72, 90, 108 (as in Tables 1-6) and 132; or
(B) a heavy chain variable domain (VH) and a light chain variable domain (VL), wherein the VH and VL, respectively, comprise amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOS: (i) 14 and 16; (ii) 32 and 34; (iii) 50 and 52; (iv) 68 and 70; (v) 86 and 88; (vi) 104 and 106 (as in Tables 1-6); and (vii) 128 and 130; or
(C) (i) the following three VH complementarity determining regions (CDRs): (a) a VH CDR1 comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 2, 20, 38, 56, 74, 92 (as in Tables 1-6) and 116; and (b) a VH CDR2 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 3, 21, 39, 57, 75, 93 (as in Tables 1-6) and 117; and (c) a VH CDR3 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 4, 22, 40, 58, 76, 94 (as in Tables 1-6)and 118; and
(ii) the following three VL CDRs: (a) a VL CDR1 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 8, 26, 44, 62, 80, 98 (as in Tables 1-6) and 122; and (b) a VL CDR2 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 9, 27, 45, 63, 81, 99 (as in Tables 1-6) and 123; and (c) a VL CDR3 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 10, 28, 46, 64, 82, 100 (as in Tables 1-6) and 124;
and (II) a second antigen-binding portion comprising:
(A) a single chain variable fragment (scFv) comprising the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 113 (as in Table 7); or (B) a heavy chain variable domain (VH) and a light chain variable domain (VL), wherein the VH and VL, respectively, comprise the amino acid sequences set forth in SEQ ID NOS: 111 and 112 (as in Table 7) or SEQ ID NOS: 134 and 136.
Corresponding products, methods and uses.

---

2. claims: 45-49(completely); 50-59, 66-69(partially)

A method of stimulating a primary T cell response and a secondary T cell response in a subject comprising administering a composition comprising a recombinant antibody, said recombinant antibody comprising a first antigen-binding portion and second antigen-binding portion, wherein said first antigen-binding portion specifically binds to a first tumor antigen and said second

International Application No. PCT/US2014/064621

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

antigen-binding portion specifically binds to an immune effector cell surface antigen, wherein the primary T cell response comprises stimulating cytotoxic T cells against the first tumor antigen, and wherein the secondary T cell response comprises stimulating effector T cells and/or memory T cells against the first tumor antigen and/or against a second tumor antigen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2014/064621

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012135854 A2	04-10-2012	AU 2012236068 A1	17-10-2013
		CA 2831336 A1	04-10-2012
		CN 103619882 A	05-03-2014
		CO 6900116 A2	20-03-2014
		DO P2013000219 A	28-02-2014
		EA 201391449 A1	31-03-2014
		EP 2694553 A2	12-02-2014
		JP 2014512812 A	29-05-2014
		KR 20140033029 A	17-03-2014
		PE 12712014 A1	08-10-2014
		SG 193956 A1	29-11-2013
		US 2014294841 A1	02-10-2014
		WO 2012135854 A2	04-10-2012
WO 2005040220 A1	06-05-2005	AT 493441 T	15-01-2011
		AU 2004283850 A1	06-05-2005
		BR PI0415457 A	05-12-2006
		CA 2542239 A1	06-05-2005
		CN 1867586 A	22-11-2006
		DK 1673398 T3	18-04-2011
		EP 1673398 A1	28-06-2006
		EP 2292664 A2	09-03-2011
		ES 2358427 T3	10-05-2011
		HK 1086846 A1	02-09-2011
		HR P20110187 T1	30-04-2011
		IL 174902 A	31-07-2013
		JP 4948174 B2	06-06-2012
		JP 5599079 B2	01-10-2014
		JP 2007537714 A	27-12-2007
		JP 2012110340 A	14-06-2012
		KR 20060101485 A	25-09-2006
		KR 20120125634 A	16-11-2012
		MX PA06004035 A	31-08-2006
		NZ 546173 A	30-04-2009
		SI 1673398 T1	31-05-2011
		US 2009022738 A1	22-01-2009
		US 2013224205 A1	29-08-2013
		WO 2005040220 A1	06-05-2005
		ZA 200601699 A	30-05-2007
WO 9428027 A1	08-12-1994	AU 7098094 A	20-12-1994
		CA 2163989 A1	08-12-1994
		DE 69431797 D1	09-01-2003
		DE 69431797 T2	14-08-2003
		EP 0700402 A1	13-03-1996
		JP 3611573 B2	19-01-2005
		JP H09501824 A	25-02-1997
		US 5885573 A	23-03-1999
		WO 9428027 A1	08-12-1994

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	***39/395***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ａ６１Ｋ	***35/17***	***(2015.01)***	Ａ６１Ｋ	35/17	Ｚ	
Ａ６１Ｐ	***35/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	***35/02***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	35/02		
Ｃ１２Ｐ	*21/08*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/08		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,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,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,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,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(72)発明者 シャインバーグ, デイビッド
アメリカ合衆国 ニューヨーク １００２５, ニューヨーク, セントラル パーク ウエスト ３２５
(72)発明者 シャン, ジンイー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４５９７, ウォルナット クリーク, サン ルイス ロード ２１７０
(72)発明者 ダオ, タオ
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０１２８, ニューヨーク, イー. ８７ティーエイチ ストリート ２４５, アパートメント １４エフ
(72)発明者 ヤン, スー
アメリカ合衆国 ペンシルベニア １６８０３, ステイト カレッジ, パトリッジ レーン ７３１
(72)発明者 リウ, チェン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４６１８, オークランド, ノース ヒル コート ２４

Ｆターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA05
4B065 AA90X AC20 BB19 BB34 BC03 CA44
4C085 AA14 BB11 CC23 DD62 EE01 GG01
4C087 AA01 AA02 BB43 NA05 ZB26 ZB27
4H045 AA11 AA30 BA41 DA76 EA20 FA74 GA26