

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7231158号

(P7231158)

(45)発行日 令和5年3月1日(2023.3.1)

(24)登録日 令和5年2月20日(2023.2.20)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/30 (2006.01)

C 0 7 K 16/30

Z N A

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N 5/0783

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 0 7 K 16/46

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 16 (全70頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-521046(P2019-521046)

(86)(22)出願日 平成29年10月19日(2017.10.19)

(65)公表番号 特表2019-535670(P2019-535670  
A)

(43)公表日 令和1年12月12日(2019.12.12)

(86)国際出願番号 PCT/CA2017/051245

(87)国際公開番号 WO2018/072025

(87)国際公開日 平成30年4月26日(2018.4.26)

審査請求日 令和2年10月16日(2020.10.16)

(31)優先権主張番号 62/410,162

(32)優先日 平成28年10月19日(2016.10.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/472,209

(32)優先日 平成29年3月16日(2017.3.16)

最終頁に続く

(73)特許権者 512080756

ザ ガバニング カウンシル オブ ザ ユ  
ニバーシティ オブ トロントTHE GOVERNING COUNC  
IL OF THE UNIVERSITY  
OF TORONTOカナダ国 エム5ジー 1エル5 オンタ  
リオ州, トロント, スイート 4 1 3  
, 1 0 0 カレッジ ストリート

(73)特許権者 515297881

マクマスター ユニバーシティー

カナダ国, オンタリオ州 エル8ビー 0

エー 1, ハミルトン, 1 7 5 ロングウ

ッド ロード サウス, エムアイビー ス

イート 3 0 5, マクマスター インダス

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C D 1 3 3 結合剤およびその使用

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒト C D 1 3 3 に特異的に結合する抗原結合部位を形成する抗体軽鎖可変ドメインおよび抗体重鎖可変ドメインを含む、C D 1 3 3 結合剤であって、

i) 前記抗体軽鎖可変ドメインは、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域 (C D R) 1、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2、および配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3 を含み、ならびに前記抗体重鎖可変ドメインは、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1、配列番号 10 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2、および配列番号 11 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3、を含むか、または

i i) 前記抗体軽鎖可変ドメインは、配列番号 12 のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域 (C D R) 1、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2、および配列番号 14 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3 を含み、ならびに前記抗体重鎖可変ドメインは、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2、および配列番号 17 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3、を含む、C D 1 3 3 結合剤。

## 【請求項 2】

(a) 前記軽鎖は配列番号 2 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 2 のフレームワーク領域に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、および前記重鎖は配列番号 3 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 3 のフレームワーク領域に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、または (b) 前記軽鎖は配列番号

10

20

4のアミノ酸配列、もしくは配列番号4のフレームワーク領域に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、および前記重鎖は配列番号5のアミノ酸配列、もしくは配列番号5のフレームワーク領域に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のCD133結合剤。

【請求項3】

前記結合剤が、抗体、抗体断片、断片抗原結合性(Fab)、単鎖Fv(scFv)、二重特異性抗体、ファージFab、およびファージscFvからなる群から選択される、請求項1または2に記載のCD133結合剤。

【請求項4】

前記結合剤が、(a)CD133結合性単鎖Fabおよび非CD133結合性scFvを含む二重特異性抗体、(b)CD133結合性Fabおよび非CD133結合性scFvを含む二重特異性抗体、(c)CD133結合性およびCD3結合性の二重特異性抗体、(d)CD133結合性単鎖FabおよびCD3結合性scFvを含む二重特異性抗体、または(e)CD133結合性FabおよびCD3結合性scFvを含む二重特異性抗体である、請求項1～3のいずれか1項に記載のCD133結合剤。

10

【請求項5】

前記結合剤が、(i)CD133結合性抗体可変領域および(ii)1以上の免疫細胞受容体シグナル伝達ドメインを含むCARシグナル伝達ドメインを含む、キメラ抗原受容体(CAR)である、請求項1～4のいずれか1項に記載のCD133結合剤。

【請求項6】

前記CD133結合剤がヒト抗体定常領域を含む、請求項3～5のいずれか1項に記載のCD133結合剤。

20

【請求項7】

前記CD133結合剤がIgG分子である、および/または前記結合剤が検出剤で標識されている、請求項1～3のいずれか1項に記載のCD133結合剤。

【請求項8】

(1)請求項1～7のいずれか1項に記載の結合剤と、これに結合した(2)エフェクター剤とを含む、免疫複合体。

【請求項9】

前記エフェクター剤が抗新生物剤または毒素である、請求項8に記載の免疫複合体。

30

【請求項10】

請求項1～7のいずれか1項のCD133結合剤または請求項8もしくは9に記載の免疫複合体、および担体を含む医薬組成物。

【請求項11】

CD133発現細胞をターゲティングするため、CD133発現細胞を結合するため、CD133発現細胞を検出するため、細胞性CD133発現のレベルを定量化するため、および/またはCD133発現細胞におけるCD133タンパク質のレベルを低下させるための、請求項1～7のいずれか1項に記載のCD133結合剤、請求項8もしくは9に記載の免疫複合体、または請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項12】

癌を治療または予防するための、請求項1～7のいずれか1項に記載のCD133結合剤、請求項8もしくは9に記載の免疫複合体、または請求項10に記載の医薬組成物であって、任意選択で前記癌が転移性黒色腫、脳腫瘍、前立腺癌、膵臓癌または結腸癌である、CD133結合剤、免疫複合体、または医薬組成物。

40

【請求項13】

前記脳腫瘍が神経膠芽腫、任意選択でCD133を検出可能に発現する神経膠芽腫、または髄芽腫、任意選択でCD133を検出可能に発現する髄芽腫である、請求項12に記載の癌を治療または予防するためのCD133結合剤、免疫複合体、または医薬組成物。

【請求項14】

神経膠芽腫または髄芽腫を治療または予防するための、請求項4に記載のCD133結

50

合剤であって、任意選択で前記神経膠芽腫が検出可能にCD133を発現する神経膠芽腫であるか、または前記髄芽腫が検出可能にCD133を発現する髄芽腫である、CD133結合剤。

【請求項15】

前記二重特異性抗体が、

- (a) 配列番号22および配列番号23、
- (b) 配列番号24および配列番号25、
- (c) 配列番号26、または
- (d) 配列番号27、

を含むアミノ酸配列、またはそれらの機能的変異体を含む、請求項14に記載の神経膠芽腫または髄芽腫を治療または予防するためのCD133結合剤。

10

【請求項16】

神経膠芽腫または髄芽腫を治療するための、請求項5に記載のキメラ抗原受容体(CAR)を発現するT細胞であって、任意選択で前記神経膠芽腫が検出可能にCD133を発現する神経膠芽腫であるか、または前記髄芽腫が検出可能にCD133を発現する髄芽腫である、T細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

<関連出願の相互参照>

20

本出願は、2016年10月19日に出願された米国仮特許出願第62/410,162号および2017年3月16日に出願された米国仮出願第62/472,209号の優先権の利益を主張するものであり、それら両方の内容を全体として本明細書の一部として援用する。

【0002】

本開示は、一般にCD133結合剤、ならびに該結合剤の方法および使用に関する。

【背景技術】

【0003】

CD133は、黒色腫、脳腫瘍ならびに乳癌、結腸癌、胃癌、前立腺癌、肝臓癌、膵臓癌、肺癌および頭頸部扁平上皮癌を含む種々の癌腫におけるマーカーとして同定されている(Boman et al., 2008, Ferrandina et al., 2009)。CD133の発現は、しばしば生存率の低下、薬剤耐性、転移と関連している。CD133の過剰発現、病理組織学的因子および患者の予後不良の間の相関関係が、肝細胞癌で報告されている(Zhong et al., 2015)。CD133は膜結合型ペリカン糖タンパク質であり、その正確な生理学的役割は不明のままである。それは、原始細胞分化および表皮間葉相互作用に関与し(Bauer et al., 2008, Ulasov et al., 2011, Evangelista et al., 2006)、WNTシグナル伝達経路および関連の細胞増殖と関連していると考えられている(Rappa et al., 2008, Mak et al., 2012a, Takenobu et al., 2011)。転移性黒色腫細胞株におけるCD133のダウンレギュレーションは、異種移植片の転移能低下をもたらすことが示されている(Rappa et al., 2008)。

30

40

【0004】

神経膠芽腫(GBM)は、一様に致命的な原発性脳腫瘍であり、多様な細胞表現型および遺伝的異質性を特徴とする。外科的切除、放射線療法および化学療法を含む積極的な細胞マルチモーダル治療の使用にもかかわらず、GBM患者の予後は有意に改善し得ていない。多数の研究が、GBMにおける化学耐性および放射線耐性の推進因子として、CD33+脳腫瘍始原細胞(BTIC)を示唆している。また最近では、CD133による遺伝子シグネチャが全生存率の低さを予測し(Venugopal et al., 2015)、またCD133+治療抵抗性細胞をターゲティングすることが、GBM再発を阻止す

50

るための有効な戦略となり得ることも示されている。CD133+である髄芽腫細胞もまた、多分化能の増加および脳腫瘍幹細胞の活性増強と関連している (Singh et al., 2004)。

#### 【0005】

抗CD133抗体に基づく薬物が、癌の治療のために提案されている (Schmohl and Valleria, 2016に概説されている)。ヒト患者では、抗IL-13キメラ抗原受容体T細胞療法後の再発性神経膠芽腫において、有意ではあるが一時的な後退が報告されている (Brown et al., 2016)。高い親和性および特異性でCD133に結合する新規な薬剤が、いまだ必要とされている。

#### 【発明の概要】

#### 【0006】

本発明者らは、細胞表面発現型CD133および変性ヒトCD133の両方に特異的に結合できる新規な抗体可変領域RW01およびRW03を記載しており、またこれらCD133結合性可変領域を含む結合剤 (例えば抗体、Fab、scFv、Fabベースの二重特異性抗体/二重特異性T細胞エンゲージャー (BiTE) および/またはscFabベースの二重特異性抗体/ (BiTE)) による特異的CD133結合を実証した。本開示の可変領域を有する抗体は、ナノモル以下/ナノモルの範囲の解離定数 ( $K_D$ ) で、細胞表面発現型/天然ヒトCD133に特異的に結合することが示された。そのようなCD133結合性抗体を使用して、癌細胞 (例えば、膵臓癌細胞、結腸直腸癌細胞) などの細胞の表面上に発現されるCD133を特異的に検出し、例えば細胞溶解物中の変性CD133に特異的に結合して検出し、免疫蛍光分析により、細胞CD133を特異的に結合し、検出し、細胞内の位置を特定することができ、またCD133陽性 (CD133+) 癌細胞中のCD133タンパク質レベルを有意に減少できることが示された。さらに、抗体可変領域RW01を含むFabおよび抗体可変領域RW03を含むFabは、CD133への結合について、それぞれIgG RW03およびIgG RW01と競合しないことが示された。

#### 【0007】

本発明者らはまた、CD133特異的CAR-T細胞が、インビボにおいてCD133陽性神経膠芽腫 (GBM) の細胞死を特異的に誘導し、またGBM腫瘍の退縮を誘導することを示した。本発明者らはまた、CD133特異的BiTEが、T細胞をCD133+ヒトGBM細胞に動員して細胞死を引き起こすことを示した。さらに、CD133特異的BiTEで頭蓋内治療されたマウスの脳内に形成された腫瘍は、それほど高悪性でも侵襲的でもなかった。

#### 【0008】

従って、本開示は、細胞表面発現型/天然CD133に特異的に結合し、また変性CD133に特異的に結合する、CD133結合剤を提供する。

#### 【0009】

一実施形態において、CD133結合剤は、(a) 配列番号2のアミノ酸配列を有する軽鎖、および配列番号3のアミノ酸配列を有する重鎖、ならびに/または(b) 配列番号4のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号5のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体により結合されるCD133エピトープに特異的に結合する。

#### 【0010】

別の実施形態において、CD133結合剤は、配列番号2のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号3の重鎖を含む抗体、ならびに/または配列番号4のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号5のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体によって結合される、細胞表面発現型CD133のCD133エピトープに特異的に結合する。

#### 【0011】

さらなる実施形態において、CD133結合剤は、配列番号2のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号3のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、ならびに/または配列番号4のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号5のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗

10

20

30

40

50

体によって結合される、変性 C D 1 3 3 の C D 1 3 3 エピトープに特異的に結合する。

【 0 0 1 2 】

一実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は、ヒト C D 1 3 3 に特異的に結合する抗原結合部位を形成する抗体軽鎖可変ドメインおよび抗体重鎖可変ドメインを含む。

【 0 0 1 3 】

別の実施形態において、抗体軽鎖可変ドメインは、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域 ( C D R ) 1、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2、および配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3 を含み、ならびに抗体重鎖可変ドメインは、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1、配列番号 10 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2、およびアミノ酸配列 11 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 を含み、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインは、ヒト C D 1 3 3 に結合する抗原結合部位を形成する。任意選択で、重鎖可変ドメインはさらに、39 位に M e t 残基、55 位に S e r 残基、および 66 位に T y r 残基を含む。

10

【 0 0 1 4 】

さらなる実施形態において、抗体軽鎖可変ドメインは、配列番号 6 のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域 ( C D R ) 1、配列番号 7 のアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2、および配列番号 8 のアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 3 を含み、ならびに抗体重鎖可変ドメインは、配列番号 9 のアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 1、配列番号 10 のアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2、および配列番号 11 のアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 3 を含み、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインはヒト C D 1 3 3 に結合する抗原結合部位を形成する。任意選択で、重鎖可変ドメインはさらに、39 位に M e t 残基、55 位に S e r 残基、および 66 位に T y r 残基を含む。

20

【 0 0 1 5 】

別の実施形態において、抗体軽鎖は、配列番号 2 のアミノ酸配列、または配列番号 2 のフレームワーク領域に対して少なくとも 70 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 6 】

別の実施形態において、抗体軽鎖は配列番号 2 のアミノ酸配列からなる。

【 0 0 1 7 】

別の実施形態において、重鎖は、配列番号 3 のアミノ酸配列、または配列番号 3 のフレームワーク領域に対して少なくとも 70 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

【 0 0 1 8 】

別の実施形態において、抗体重鎖は配列番号 3 のアミノ酸配列からなる。

【 0 0 1 9 】

別の実施形態において、軽鎖は、( i ) 配列番号 2 のアミノ酸配列または配列番号 2 のフレームワーク領域に対して少なくとも 70 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、また ( i i ) 重鎖は、配列番号 3 のアミノ酸配列または配列番号 3 のフレームワーク領域に対して少なくとも 70 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 0 】

別の実施形態において、軽鎖は配列番号 2 のアミノ酸配列からなり、重鎖は配列番号 3 のアミノ酸配列からなる。

40

【 0 0 2 1 】

別の実施形態において、抗体軽鎖可変ドメインは、配列番号 12 のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域 ( C D R ) 1、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2、および配列番号 14 のアミノ酸配列を含む C D R 3 を含み、ならびに抗体重鎖可変ドメインは、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2、および配列番号 17 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 を含み、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインはヒト C D 1 3 3 に結合する抗原結合部位を形成する。任意選択で、重鎖可変ドメインはさらに、39 位に I l e 残基、55 位に T y r 残基、および 66 位に T y r 残基を含む。

【 0 0 2 2 】

50

一実施形態において、抗体軽鎖可変ドメインは、配列番号 12 のアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域 (CDR) 1、配列番号 13 のアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 2、および配列番号 14 のアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR 3 を含み、ならびに抗体重鎖可変ドメインは、配列番号 15 のアミノ酸配列からなる重鎖 CDR 1、配列番号 16 のアミノ酸配列からなる重鎖 CDR 2、および配列番号 17 のアミノ酸配列からなる重鎖 CDR 3 を含み、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインはヒト CD 133 に結合する抗原結合部位を形成する。任意選択で、重鎖可変ドメインはさらに、39 位に I l e 残基、55 位に T y r 残基、および 66 位に T y r 残基を含む。

【0023】

別の実施形態において、抗体軽鎖は配列番号 4 のアミノ酸配列、または配列番号 4 のフレームワーク領域に対して少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0024】

別の実施形態において、抗体軽鎖は配列番号 4 のアミノ酸配列からなる。

【0025】

別の実施形態において、抗体重鎖は配列番号 5 のアミノ酸配列、または配列番号 5 のフレームワーク領域に対して少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0026】

別の実施形態において、抗体重鎖は配列番号 5 のアミノ酸配列からなる。

【0027】

別の実施形態において、軽鎖は配列番号 4 のアミノ酸配列、または配列番号 4 のフレームワーク領域に対して少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、重鎖は配列番号 5 のアミノ酸配列、または配列番号 5 のフレームワーク領域に対して少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0028】

別の実施形態において、軽鎖は配列番号 4 のアミノ酸配列からなり、重鎖は配列番号 5 のアミノ酸配列からなる。

【0029】

別の実施形態において、CD 133 結合剤は、抗体、抗体断片、単鎖 F v ( s c F v )、二重特異性抗体、ファージ F a b (ここでの F a b は CD 133 に結合する)、およびファージ - s c F v (ここでの s c F v は CD 133 に結合する) からなる群から選択される。

30

【0030】

別の実施形態において、CD 133 結合剤は、ヒト CD 133 に結合する抗体を含む。

【0031】

別の実施形態において、CD 133 結合剤は、ヒト CD 133 に結合する抗体断片を含む。

【0032】

別の実施形態において、CD 133 結合剤は、ヒト CD 133 に結合する単鎖 F v ( s c F v ) を含む。

【0033】

別の実施形態において、CD 133 結合剤は、ヒト CD 133 に結合する二重特異性抗体を含む。

40

【0034】

別の実施形態において、CD 133 結合剤はファージ F a b を含み、F a b はヒト CD 133 に結合する。

【0035】

別の実施形態において、CD 133 結合剤は、ヒト CD 133 と結合するファージ s c F v を含み、s c F v はヒト CD 133 に結合する。

【0036】

さらに別の実施形態において、抗体断片は断片抗原結合性 ( F a b ) である。

50

## 【 0 0 3 7 】

別の実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は、( a ) C D 1 3 3 結合性単鎖 F a b および非 C D 1 3 3 結合性 s c F v を含む二重特異性抗体、( b ) C D 1 3 3 結合性 F a b および非 C D 1 3 3 結合性 s c F v を含む二重特異性抗体、または( c ) C D 1 3 3 結合性および C D 3 結合性二重特異性抗体である。

## 【 0 0 3 8 】

さらに別の実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は、( a ) C D 1 3 3 結合性単鎖 F a b および C D 3 結合性 s c F v を含む二重特異性抗体、または( b ) C D 1 3 3 結合性 F a b および C D 3 結合 s c F v を含む二重特異性抗体である。

## 【 0 0 3 9 】

別の実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は、( i ) C D 1 3 3 結合性抗体可変領域および( i i ) 1 以上の免疫細胞受容体シグナル伝達ドメインを含む C A R シグナル伝達ドメインを含む、キメラ抗原受容体( C A R )である。

## 【 0 0 4 0 】

一実施形態において、C D 1 3 3 結合剤はヒト抗体定常領域を含む。

## 【 0 0 4 1 】

他の実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は I g G 分子である。

## 【 0 0 4 2 】

さらなる実施形態において、I g G 分子は I g G 1 分子である。

## 【 0 0 4 3 】

別の実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は検出剤で標識される。

## 【 0 0 4 4 】

本開示はまた、( 2 ) エフェクター剤に結合した( 1 ) 上記の結合剤を含む免疫複合体を提供する。任意選択で、エフェクター剤は抗新生物剤または毒素である。

## 【 0 0 4 5 】

本開示はまた、上記で述べた C D 1 3 3 結合剤または免疫複合体と、担体とを含む医薬組成物を提供する。

## 【 0 0 4 6 】

本開示はまた、C D 1 3 3 発現細胞をターゲティングするための、上記で述べた C D 1 3 3 結合剤、免疫複合体または医薬組成物の使用を提供する。

## 【 0 0 4 7 】

本開示はまた、C D 1 3 3 発現細胞に結合するための、上記で述べた C D 1 3 3 結合剤、免疫複合体または医薬組成物の使用を提供する。

## 【 0 0 4 8 】

本開示はさらに、C D 1 3 3 発現細胞を検出し、かつ / または細胞の C D 1 3 3 発現レベルを定量化するための、上記で述べた C D 1 3 3 結合剤、免疫複合体または医薬組成物の使用を提供する。

## 【 0 0 4 9 】

本開示はさらに、C D 1 3 3 発現細胞における C D 1 3 3 タンパク質のレベルを低下させるための、本明細書に記載の C D 1 3 3 結合剤または医薬組成物の使用を提供する。

## 【 0 0 5 0 】

一実施形態において、C D 1 3 3 結合剤の使用は、細胞内において、細胞表面発現型 C D 1 3 3 のレベルを検出および / または定量化するためのものである。別の実施形態において、C D 1 3 3 結合剤の使用は、細胞内において、C D 1 3 3 の総レベルを検出および / または定量するためのものである。

## 【 0 0 5 1 】

任意選択で、C D 1 3 3 発現細胞の検出および / または細胞性 C D 1 3 3 発現レベルの定量は、ウエスタンブロッティング、酵素結合免疫吸着検定法( E L I S A )、免疫蛍光法、免疫組織化学またはフローサイトメトリーによって行われる。

## 【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

50

別の実施形態において、細胞は癌細胞、任意選択で、C D 1 3 3 発現癌細胞またはC D 1 3 3を検出可能に発現する癌細胞である。

【0053】

さらに別の実施形態において、癌細胞は黒色腫癌細胞、膵臓癌細胞、脳腫瘍細胞または結腸直腸癌細胞である。別の実施形態において、癌細胞は神経膠芽腫細胞である。別の実施形態において、癌細胞は髄芽腫細胞である。

【0054】

本開示はさらに、癌を治療または予防するための、本明細書に記載のC D 1 3 3 結合剤、免疫複合体または医薬組成物の使用を提供する。

【0055】

一実施形態において、癌はC D 1 3 3 発現癌、またはC D 1 3 3を検出可能に発現する癌である。他の実施形態において、癌は転移性黒色腫、脳腫瘍、前立腺癌、膵臓癌または結腸癌である。

【0056】

別の実施形態において、脳腫瘍は神経膠芽腫、場合によりC D 1 3 3 発現神経膠芽腫または検出可能にC D 1 3 3を発現する神経膠芽腫である。別の実施形態において、脳腫瘍は、髄芽腫、場合によりC D 1 3 3 発現髄芽腫または検出可能な程度にC D 1 3 3を発現する髄芽腫である。

【0057】

本開示はまた、神経膠芽腫、任意選択でC D 1 3 3 発現神経膠芽腫またはC D 1 3 3を検出可能に発現する神経膠芽腫を治療するための、(a) C D 1 3 3 結合性単鎖F a bおよび非C D 1 3 3 結合性s c F v、(b) C D 1 3 3 結合F a bおよび非C D 1 3 3 結合s c F vを含む二重特異性抗体、または(c) C D 1 3 3 結合性およびC D 3 結合性二重特異性抗体を含むC D 1 3 3 結合剤の使用を提供する。

【0058】

本開示はまた、神経膠芽腫、任意選択でC D 1 3 3 発現神経膠芽腫またはC D 1 3 3を検出可能に発現する神経膠芽腫を治療するための、(a) C D 1 3 3 結合性単鎖F a bおよびC D 3 結合性s c F v、または(b) C D 1 3 3 結合性F a bおよびC D 3 結合性s c F vを含む二重特異性抗体を含むC D 1 3 3 結合剤の使用を提供する。

【0059】

本開示はまた、髄芽腫、任意選択でC D 1 3 3 発現髄芽腫またはC D 1 3 3を検出可能に発現する髄芽腫を治療するための、(a) C D 1 3 3 結合性単鎖F a bおよび非C D 1 3 3 結合性s c F v、(b) C D 1 3 3 結合性F a bおよび非C D 1 3 3 結合性s c F vを含む二重特異性抗体、または(c) C D 1 3 3 結合性およびC D 3 結合性二重特異性抗体を含むC D 1 3 3 結合剤の使用を提供する。

【0060】

本開示はまた、髄芽腫、任意選択でC D 1 3 3 発現髄芽腫またはC D 1 3 3を検出可能に発現する髄芽腫を治療するための、(a) C D 1 3 3 結合性単鎖F a bおよびC D 3 結合性s c F v、または(b) C D 1 3 3 結合性F a bおよびC D 3 結合性s c F vを含む二重特異性抗体を含むC D 1 3 3 結合剤の使用を提供する。

【0061】

一実施形態において、二重特異性抗体は、  
 (a) 配列番号22および配列番号23、  
 (b) 配列番号24および配列番号25、  
 (c) 配列番号26、  
 (d) 配列番号27、またはそれらの機能的変異体、  
 を含むアミノ酸配列を含む。

【0062】

本開示はまた、神経膠芽腫、任意選択でC D 1 3 3 発現神経膠芽腫またはC D 1 3 3を検出可能に発現する神経膠芽腫を治療するための、本明細書に記載のキメラ抗原受容体(

10

20

30

40

50



CAR)を発現するT細胞の使用を提供する。

【0063】

本開示はさらに、髄芽腫、任意選択でCD133発現髄芽腫またはCD133を検出可能に発現する髄芽腫を治療するための、本明細書に記載のキメラ抗原受容体(CAR)を発現するT細胞の使用を提供する。

【0064】

本開示の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、当業者には、本開示の趣旨および範囲内での様々な変更および修正が明らかであろうから、詳細な説明および特定の例は本開示の実施形態を示すものではあるが、例示としてのみ与えられることを理解されたい。

【0065】

以下、図面に関連して実施形態を説明する

【図面の簡単な説明】

【0066】

【図1A】細胞表面CD133への結合について、ライブラリーFまたはライブラリーGからそれぞれ選択されたファージFabクローンおよびファージscFvクロンの、Celllectseq法を用いたCD133結合についての細胞ベースでのELISAの結果を示す表である。細胞を選択した後、各ライブラリーについてラウンド4のアウトプットファージを単一コロニーにプレティングした。これらのコロニーを一晩の培養で増殖させ、細胞ベースのELISAにより、細胞への結合について試験した。プレートを読み取り、OD450nmを検出して記録した。このアッセイにより、CD133過剰発現HEK293-CD133細胞(「CD133」欄見出しの下)vs.親HEK293細胞(「HEK293」欄見出しの下)に対するクロンの結合が測定された。

【図1B】Celllectseq法を用いた細胞表面CD133への結合に関して、ライブラリーFから選択され、かつDNA配列決定後にHEK293-CD133細胞に対して少なくとも1.5倍優先的に結合することが見出された77クローンに存在する、3つのユニークな抗体可変領域に対応することが見出された3つのクローン(ファージFabRW03、ファージFabC12およびファージFabF5)の、CD133結合に関する細胞ベースでのELISAを示すヒストグラムである。

【図2】ファージFabクローンRW03がCD133過剰発現細胞に特異的に結合することを示す一連の蛍光顕微鏡写真である。ライブラリーFの細胞ベースのELISAから得られた固有の配列を有する3つのクローンを、免疫蛍光アッセイにおけるプローブとして使用した。ファージFabクローンC12およびF5がHEK293細胞に非特異的に結合するのに対して、RW03クローンはHEK293-CD133細胞に特異的に結合し、HEK293細胞へのバックグラウンド結合はほとんどない。

【図3A-3B】それぞれ、精製FabRW03が、HEK293細胞とは対照的に、HEK293-CD133に対して特異的に結合することを示すヒストグラムおよび一組の蛍光顕微鏡写真である。発現および精製されたFabRW03が、細胞ベースのELISA(図3A)および免疫蛍光(IF)アッセイ(図3B)によって結合について試験された。

【図4A-4B】結合親和性(EC50)を推定するための、HEK293-CD133細胞に対するIgGRW01およびIgGRW03それぞれの結合についての結合曲線を示す折れ線グラフである。細胞をIgGRW01またはIgGRW03のいずれかの段階希釈と共にインキュベートして、抗体に対する半最大結合曲線を決定した。SigmaPlotグラフ作成ソフトウェアを使用して、IgGRW01のEC50は2.5nMと計算され(図4A)、IgGRW03のEC50は0.5nMと計算された(図4B)。

【図5】フローサイトメトリー分析に示されるのと同様に、IgGRW01およびIgGRW03を用いて、膵臓癌細胞および結腸直腸癌細胞における細胞表面CD133を特異的に結合および検出できることを示す一組の蛍光ヒストグラムである。

10

20

30

40

50

【図6】免疫蛍光分析によって示されるのと同様に、I g G R W 0 1 および I g G R W 0 3 を用いて細胞 C D 1 3 3 を特異的に結合し、検出し、細胞内の位置を特定ができることを示す一組の蛍光顕微鏡写真である。H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 および H E K 2 9 3 細胞への結合について、抗体類を試験した。

【図7】ウエスタンブロット分析によって示されるように、I g G R W 0 1 および I g G R W 0 3 を用いて、結腸直腸癌細胞中の変性 C D 1 3 3 / 細胞性 C D 1 3 3 を検出できることを示す一組のウエスタンブロット分析の写真である。H E K 2 9 3、H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 および C a c o - 2 細胞の全細胞溶解物を、I g G R W 0 1 および I g G R W 0 3 でプローブし、抗ヒト H R P 結合二次抗体を用いて結合を検出した。ローディング対照として アクチンを使用した。

10

【図8】抗体可変領域 R W 0 1 を含む F a b および抗体可変領域 R W 0 3 を含む F a b が、C D 1 3 3 への結合について、それぞれ I g G R W 0 3 および I g G R W 0 1 と競合しないことを示す。競合フローサイトメトリー実験において、R W 0 1 および R W 0 3 を、C D 1 3 3 への結合について試験した。( a ) では、F a b R W 0 3 ( 四角 ) の存在下に、I g G R W 0 1 ( 丸 ) または I g G R W 0 1 の段階希釈物と共に、細胞をインキュベートした。同様に、( b ) では、F a b R W 0 1 ( 四角 ) の存在下に、I g G R W 0 3 ( 丸 ) または I g G R W 0 3 の段階的希釈液と共に、細胞をインキュベートした。

【図9】I g G R W 0 1 または I g G R W 0 3 による処理が、C a c o - 2 結腸直腸癌細胞における C D 1 3 3 タンパク質の全細胞レベルを有意に低下させることを示す、一組のウエスタンブロット分析の写真である。C a c o - 2 細胞を指示された抗体と共に 3 7 で 2 4 時間インキュベーションし、全細胞溶解物を調製し、A C 1 3 3 抗 C D 1 3 3 抗体でプロービングした。抗ヒト I g G ( H + L ) 抗体を陰性抗体対照として使用し、また G A P D H をローディング対照として使用した。

20

【図10A】B i T E # 1、B i T E # 2、B i T E # 3 および B i T E # 4 の配置を示す一組の概略図である。

【図10B】B i T E # 1、B i T E # 2、B i T E # 3 および B i T E # 4 が、それぞれ、一過性トランスフェクションプロトコルにより H E K 2 9 3 細胞から発現および精製され得ることを示すウエスタンブロット分析の写真である。

【図11A - 11B】B i T E # 1 ( 図10A )、B i T E # 2 ( 図10A )、B i T E # 3 ( 図10B ) および B i T E # 4 ( 図10B ) の各々が、フローサイトメトリーで測定したときに、0 . 0 7 3 ~ 0 . 1 1 マイクログラム / m L という低い濃度でさえも、親 H E K 2 9 3 細胞よりも有意に多く H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 細胞に結合することを示す一組の蛍光ヒストグラムである。用いた B i T E 濃度を、各ヒストグラムに示す。各ヒストグラムにおいて、最も右側のピークは H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 細胞への結合を表し、最も左側のピークは親の H E K 2 9 3 細胞への結合を表す。

30

【図12】B i T E # 1、B i T E # 2、B i T E # 3 および B i T E # 4 の各々が、C D 3 イプシロン / ガンマおよび C D 3 イプシロン / デルタの形態で C D 3 に結合することを示す E L I S A の結果のヒストグラムである。抗 C D 3 抗体の U C H T 1 および O K T 3 を陽性抗体対照として使用し、B S A を抗体なしの対照として使用した。

【図13】C D 1 3 3 特異的キメラ抗原受容体 ( C A R ) を生成させるための構築物を示す。

40

【図14】C A R - T 細胞の特徴付けを示す。

【図15】C D 1 3 3 特異的 C A R - T 細胞の検証を示す。

【図16】C D 1 3 3 特異的 C A R - T 細胞が、C D 1 3 3 + ヒト G B M 細胞の存在下で活性化されることを示す。

【図17A - 17B】活性化された C D 1 3 3 特異的 C A R - T 細胞が増殖能力を増強して、C D 1 3 3 陽性の G B M 細胞死および C D 1 3 3 陽性の髄芽腫細胞死を特異的に誘導することを示す。C A R - T 細胞を、C D 1 3 3 <sup>h i g h</sup> および C D 1 3 3 <sup>l o w</sup> G B M 細胞、ならびに C D 1 3 3 <sup>h i g h</sup> 髄芽腫細胞と共培養した。フローサイトメトリーは、I R 染料を用いた生死染色に基づいていた。

50

【図 18 A - 18 C】CD 133 特異的 T 細胞が、インビボにおいて G B M 腫瘍の退縮を誘導することを示す。治療は、100 万細胞 × 2 の用量（2 週間）で頭蓋内に送達された。

【図 19 A - 19 B】CD 133 × CD 3 B i T E の発生を示す。

【図 20 A - 20 B】CD 133 × CD 3 B i T E が、CD 133 + G B M 腫瘍細胞および CD 3 + T リンパ球に結合することを示す。

【図 21】CD 133 特異的 B i T E が T 細胞を活性化することを示す。

【図 22 A - 22 C】CD 133 特異的 B i T E が、T 細胞を CD 133 + ヒト G B M 細胞に動員して細胞死を引き起こすことを示す。

【図 23 A - 23 D】CD 133 × CD 3 B i T E に媒介された抗腫瘍性応答を示す。

【発明を実施するための形態】

10

【0067】

他に定義しない限り、本開示に関して使用される科学のおよび技術的用語は、当業者が一般的に理解する意味を有するものとする。さらに、文脈によって別段の要求がない限り、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含むものとする。例えば、「細胞」という用語は、単一の細胞ならびに複数の、または集団の細胞を含む。一般に、本明細書に記載の細胞および組織培養、分子生物学、タンパク質、およびオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの化学的性質、ならびにハイブリダイゼーションと関連して利用される命名法およびそれらの技術は、当技術分野において周知かつ一般的に使用されているものである（例えば、Green and Sambrook, 2012 を参照されたい）。

20

【0068】

本明細書で使用される「約」、「実質的に」、および「およそ」等の程度を表す用語は、最終結果が有意に変化しないような修飾用語の妥当な量の偏差を意味する。これらの程度に関する用語は、修飾された単語の意味を否定しない限り、修飾された用語の少なくとも ± 5 % の偏差を含むと解釈されるべきである。

【0069】

< 問題の組成物 >

本発明者らは、表面発現型の / 天然ヒト CD 133 および変性ヒト CD 133 に特異的に結合することができ、かつナノモル以下 / ナノモルの範囲の解離定数（ $K_D$ ）でヒト CD 133 に特異的に結合する新規な合成抗体可変領域を提供した（以下の実施例 3 および 6 参照）。

30

【0070】

本発明者らは、特に、s c F v が CD 133 結合性抗体可変領域 RW 01 を含む CD 133 結合性ファージ s c F v クローン RW 01、および F a b が CD 133 結合性抗体可変領域 RW 03 を含む CD 133 結合性ファージ F a b クローン RW 03 を提供した。最初に酵素結合免疫吸着検定法（E L I S A、下記の実施例 1 および 2 参照）により確認されたように、これらのクローンは、CD 133 発現細胞に特異的に結合するそれらの能力について、ファージディスプレイライブラリーから選択された。本発明者らはさらに、CD 133 結合性抗体可変領域 RW 01 が、配列番号 2 の A s p 1 ~ L y s 106 セグメントに対応する抗体軽鎖可変ドメインを含み、軽鎖 C D R 1、軽鎖 C D R 2 および軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 6、配列番号 7、および配列番号 8 に対応する（以下の実施例 2 参照）ことを特に提供した。本発明者らはさらに、抗体可変領域 RW 01 が配列番号 3 の G l u 1 ~ T h r 120 セグメントに対応する抗体重鎖可変ドメインを含み、重鎖 C D R 1、重鎖 C D R 2 および重鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 9、配列番号 10、および配列番号 11 に対応し、また 39 位、55 位および 66 位の（フレームワーク領域）残基は M e t、S e r および T y r 残基である（以下の実施例 2 参照）ことを提供した。

40

【0071】

本発明者らはさらに、CD 133 結合性抗体可変領域 RW 03 が、配列番号 4 の A s p 1 ~ L y s 109 セグメントに対応する抗体軽鎖可変ドメインを含み、軽鎖 C D R 1、軽

50

鎖 C D R 2 および軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 1 2、配列番号 1 3、および配列番号 1 4 に対応する（以下の実施例 2 参照）ことを提供した。本発明者らはさらに、抗体可変領域 R W 0 3 が配列番号 5 の G l u 1 ~ S e r 1 1 8 セグメントに対応する抗体重鎖可変ドメインを含み、重鎖 C D R 1、重鎖 C D R 2 および重鎖 C D R 3 のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 1 5、配列番号 1 6 および配列番号 1 7 に対応し、また 3 9 位、5 5 位および 6 6 位の（フレームワーク領域）残基はそれぞれ I l e、T y r および T y r 残基である（下記の実施例 2 参照）ことを提供した。

#### 【 0 0 7 2 】

本発明者らはさらに、C D 1 3 3 結合性抗体可変領域 R W 0 1 および C D 1 3 3 結合抗体可変領域 R W 0 3 を含む I g G 1 抗体「I g G R W 0 1」および「I g G R W 0 3」をそれぞれ使用して、（i）フローサイトメトリー分析によって示されるように、膵臓癌細胞株および結腸直腸癌細胞株において細胞表面 C D 1 3 3 を特異的に結合および検出することができ（下記の実施例 4 参照）、（i i）免疫蛍光分析によって示されるように、C D 1 3 3 発現細胞中の細胞性 C D 1 3 3 を特異的に結合し、検出し、細胞内の位置を特定することができ（下記実施例 5 参照）、（i i i）ウエスタンブロット分析によって示されるように、結腸直腸癌細胞の全細胞溶解物中の変性 C D 1 3 3 を検出することができ（下記の実施例 6 参照）、ならびに（i v）結腸直腸癌細胞株中の全細胞 C D 1 3 3 タンパク質レベルを有意に減少させることが（下記の実施例 8 を参照）できることを提供した。本発明者らは、抗体 I g G R W 0 1 が、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号 3 のアミノ酸配列を有する重鎖を含み、また抗体 I g G R W 0 3 が、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号 5 のアミノ酸配列を有する重鎖（実施例 2）を含むことを開示する。本発明者らはさらに、抗体可変領域 R W 0 1 を含む F a b および抗体可変領域 R W 0 3 を含む F a b が、C D 1 3 3 への結合について、それぞれ I g G R W 0 3 および I g G R W 0 1 と競合しないことを開示した（以下の実施例 7）。

#### 【 0 0 7 3 】

本発明者らはまた、C D 1 3 3 + G B M 細胞を特異的にターゲティングするキメラ抗原受容体（C A R）T 細胞に基づく戦略も記載する。C D 1 3 3 特異的 C A R 発現 T 細胞は、C D 1 3 3 <sup>h i g h</sup> G B M 細胞の存在下で活性化され、活性化マーカー C D 6 9 および C D 2 5 の表面発現の増加を示した。C D 4 + および C D 8 + C D 1 3 3 特異的 C A R - T 細胞は両方とも、活性化マーカーの表面発現レベルのアップレギュレーションを示した。本発明者らはさらに、治療抵抗性で回避性の C D 1 3 3 + G B M B T I C に対する C A R - T 細胞に誘導された細胞傷害性を実証した（下記の実施例 1 0）。

#### 【 0 0 7 4 】

本発明者らはさらに、T 細胞共受容体 C D 3 に結合する s c F v を含み、さらに C D 1 3 3 結合性抗体可変領域 R W 0 3 を組み込んだ F a b または単鎖 F a b（s c F a b）を含む二重特異性抗体 / 二重特異性 T 細胞エンゲージャー（B i T E）の多重配置が、C D 1 3 3 陽性細胞および C D 3 の両方に特異的に結合できることを特に開示した（下記の実施例 9 参照）。本発明者らはまた、組換え C D 1 3 3 x C D 3 二重特異性 T 細胞エンゲージャー（B i T E）が、ヒトポリクローナル T 細胞を C D 1 3 3 + G B M 細胞へとリダイレクトし、強力な抗腫瘍応答を誘導することを示した（下記の実施例 1 1 参照）。

#### 【 0 0 7 5 】

C D 1 3 3 分子は、細胞外 N 末端領域、交互に短い細胞内ドメインおよび長い細胞外ドメインを有する 5 つの膜貫通ドメイン、ならびに細胞内 C 末端領域を有する膜貫通タンパク質である。本明細書中で使用するとき、C D 1 3 3 は任意の種または供給源に由来し、またそのような C D 1 3 3 タンパク質のアイソフォーム、類似体、変異体または機能的誘導体を含むことができる。一実施形態において、C D 1 3 3 はヒト C D 1 3 3 である。ヒト C D 1 3 3 遺伝子またはタンパク質は、G e n B a n k などの公的供給源から入手できる C D 1 3 3 についての公表された既知の配列のいずれかを有することができる。そのようなタンパク質配列の例には、配列番号 1 として示される配列が含まれるが、それには限定されない。ヒト C D 1 3 3 は、当技術分野では代替的にプロミン - 1 と呼ばれる。

10

20

30

40

50

## 【0076】

<CD-133結合性抗原>

したがって、本開示は、細胞表面発現型/天然CD133に特異的に結合し、かつ変性CD133に特異的に結合するCD133結合剤を提供する。

## 【0077】

本明細書で使用する時、「細胞表面発現型/天然CD133に特異的に結合する」CD133結合剤は、CD133発現細胞に結合する物質である。CD133を発現する細胞は、例えば実施例4に記載したように、フローサイトメトリー分析によって、それ自体として同定することができる。あるいは、「細胞表面発現型/天然CD133に特異的に結合する」CD133結合剤は、CD133を発現するCD133発現細胞を、検出不能なレベルで、例えばフローサイトメトリー分析のようなアッセイの検出限界未満のレベルで結合する物質である。本明細書中で使用する時、「変性CD133に特異的に結合する」CD133結合剤は、(例えば実施例6に記載したウエスタンブロット分析を介して測定されるように)サンプル中の他のポリペプチドとは対照的に、CD133発現細胞の変性全細胞タンパク質のサンプル中のCD133に対して結合する物質である。「CD133と免疫反応する」、または「CD133に対して向けられる」、または「抗CD133」として特徴付けられるという用語もまた、同じ目的のために本明細書で使われる。

10

## 【0078】

一実施形態において、CD133結合剤は、配列番号2のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号3のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体(すなわち、抗体IgG RW01)により結合されるCD133エピトープに特異的に結合し、かつ/または配列番号4のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号5のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体(すなわち抗体IgG RW03)により結合されるCD133エピトープに特異的に結合する。一実施形態において、CD133エピトープはヒトCD133エピトープである。

20

## 【0079】

本明細書で使用する時、「エピトープ」の用語は、抗体IgG RW01および/または抗体IgG RW03により結合される抗原上の特定の部位、または部位/アミノ酸の特定の組み合わせを指し、例えば、ヒトCD133の未修飾もしくは修飾された(例えば、翻訳後修飾、例えばグリコシル化)アミノ酸残基、これらアミノ酸残基を包含するヒトCD133の最小ポリペプチドセグメント、またはこれらアミノ酸残基を包含するヒトCD133のポリペプチドセグメントの任意の組み合わせを指す。エピトープ決定基は、通常は、アミノ酸または糖側鎖などの分子からなり、また通常は、特定の三次元構造特性および特定の電荷特性を有する。

30

## 【0080】

本明細書で使用する時、他に特定しない限り、単数形で「a」特異的軽鎖または「a」特異的重鎖を含むと称する抗体または2価抗体断片(例えばF(ab')<sub>2</sub>)は、両方の軽鎖または両方の重鎖がそれぞれ同一である抗体または2価抗体断片を指す。

## 【0081】

CD133結合剤の実施形態には、制限なしに、任意のタイプのCD133結合性の分子、マクロ分子、物質、化合物、材料、組成物、または複合体が含まれる。

40

## 【0082】

一実施形態において、CD133結合剤はポリペプチドである。他の実施形態において、CD133結合剤は、CD133結合性核酸またはCD133結合性有機化合物などの非ポリペプチド物質である。CD133結合剤は単量体または多量体であり得る。CD133結合剤はポリマー性または非ポリマー性であり得る。あるいは、CD133結合剤は、操作されたポリペプチド(例えば、修飾アミノ酸配列を有するように操作された天然ポリペプチド、または2以上の天然アミノ酸配列を含むように操作されたキメラポリペプチド、またはランダム化されたアミノ酸配列を有する操作されたポリペプチドのライブラリーから選択される操作されたポリペプチド)、または化学的に修飾されたポリペプチドであり得る。

50

## 【 0 0 8 3 】

－実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は、C D 1 3 3 結合性抗体可変領域を含む。

## 【 0 0 8 4 】

本明細書中で使用するとき、C D 1 3 3 結合性抗体可変領域は、抗体重鎖可変ドメインおよび抗体軽鎖可変ドメインの組み合わせであり、抗体重鎖可変ドメインおよび抗体軽鎖可変ドメインが、C D 1 3 3 と特異的に結合する結合部位を形成する。

## 【 0 0 8 5 】

C D 1 3 3 結合剤は、任意選択で、抗体、抗体の抗原結合断片、またはC D 1 3 3 結合性抗体可変領域を含む物質である。

## 【 0 0 8 6 】

本明細書で使用するときは、他に特定しない限り、「抗体」の用語は免疫グロブリン ( I g ) 分子を指す。基本的な抗体構造単位は、四量体を含むことが知られている。各四量体は2つの同一のポリペプチド鎖対で構成されており、各対は1本の軽 ( 「 L 」 ) 鎖 ( 約 2 5 k D a ) および1本の重 ( 「 H 」 ) 鎖 ( 約 5 0 ~ 7 0 k D a ) を有する。各鎖のアミノ末端部分は、抗原認識を主に担い、かつ以下でより詳細に記載する約 1 0 0 ~ 1 1 0 以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能を担う定常領域を規定する。用語「抗原結合部位」または「結合部分」は、抗原結合に関与する結合性タンパク質の部分の指す。抗体において、抗原結合部位は、重鎖および軽鎖の N 末端可変 ( 「 V 」 ) 領域のアミノ酸残基によって形成される。「超可変領域」と呼ばれる、重鎖および軽鎖の V 領域内の3つの非常に多様なストレッチは、「フレームワーク領域」または「 F R 」として知られるより保存された隣接するストレッチの間に挿入される。したがって、「 F R 」の用語は、免疫グロブリンの超可変領域の間にかつ隣接して、天然に存在するアミノ酸配列を指す。抗体分子において、軽鎖の3つの超可変領域および重鎖の3つの超可変領域は、三次元空間において互いに対して配置されて、抗原結合性表面を形成する。この抗原結合性表面は、結合した抗原の三次元表面に対して相補的であり、重鎖および軽鎖の各3つの超可変領域は、「相補性決定領域」または「 C D R 」と呼ばれる。本明細書に開示される全ての C D R およびフレームワーク領域 ( F R ) 、本明細書に開示される C D R および F R のアミノ酸配列、ならびに本明細書に開示される C D R をコードしまたは F R をコードする核酸配列は、 I M G T ナンバリングに従って定義されることが意図されている ( L e f r a n c e t a l . , 2 0 0 3 ) 。そのような定義のため

## 【 0 0 8 7 】

C D 1 3 3 結合剤は、操作された可変領域を含む ( 例えば操作された抗体可変領域を呈示するファージディスプレイライブラリー、例えばファージ F a b ライブラリーまたは例えば実施例 1 に記載のようなファージ s c F v ライブラリーから選択される可変領域を含む ) ヒト抗体、またはヒト定常領域および非ヒト哺乳動物の抗体可変領域を含むキメラ抗体のような抗体であり得る。C D 1 3 3 結合剤は、ヒト化抗体、例えばヒト定常領域、ヒト可変領域フレームワーク領域、および非ヒト哺乳動物において生成された C D 1 3 3 結合性 C D R を含む抗体であり得る。非ヒト哺乳動物は、マウス、ラット、ウサギ、モルモットまたはハムスターなどのげっ歯類であり得る。あるいは、非ヒト哺乳動物は、ラクダ科動物またはウシ科などの有蹄動物であり得る。C D 1 3 3 結合剤は、任意の種類のクラスまたはサブクラスに属する重鎖定常領域を含む抗体であり得る。 C D 1 3 3 結合剤は、任意の種類の軽鎖を含み得る。

## 【 0 0 8 8 】

－実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は I g G 1 抗体などのヒト抗体であり、重鎖定常領域はガンマ 1 重鎖定常領域である。他の実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は、 I g A 1 、 I g A 2 、 I g D 、 I g G 2 、 I g G 3 、 I g G 4 、 I g E または I g M 抗体などのヒト抗体であり、重鎖定常領域はそれぞれアルファ 1 、アルファ 2 、デルタ、ガンマ 2 、ガンマ 3 、ガンマ 4 、イプシロンまたはミュー重鎖定常領域である。

## 【0089】

なおさらなる実施形態において、CD133結合剤は、軽鎖がヒトカッパ軽鎖定常ドメインを含むか、または軽鎖がヒトカッパ軽鎖である抗体である。あるいは、CD133結合剤は、軽鎖がヒトラムダ軽鎖定常ドメインを含むか、または軽鎖がヒトラムダ軽鎖である抗体である。

## 【0090】

なおさらなる実施形態において、CD133結合剤は、ヒトガンマ1重鎖定常領域およびヒトカッパ軽鎖を含む抗体である。

## 【0091】

本開示のCD133結合剤の実施形態は、抗原結合性断片(Fab)、単鎖Fv(scFv)、単鎖Fab(scFab)、Fab'、Fv、化学連結されたF(ab')<sub>2</sub>、dsFv、dsFv'、sc(Fv)<sub>2</sub>、ds-scFv、(dsFv)<sub>2</sub>、scFv-Fc、scFvベースのキメラ抗原受容体(CAR)、FabベースのCAR、scFabベースのCAR、単鎖免疫グロブリン(例、scIgG)、単ドメイン抗体(sdAb、ナノボディ)、scFv-Fc、ミニボディ(scFv-CH3)、ダイアボディ、トリボディ、テトラボディ、多量体抗体(例、scFvダイマー、2価ダイアボディ)、多重特異性抗体(例、二重特異性抗体、三重特異性抗体、di-scFv、tri-scFv、二重特異性Fab<sub>2</sub>、三重特異性Fab<sub>2</sub>、三重特異性トリアボディ、三重特異性Fab<sub>3</sub>)、多量体/多重特異性抗体(例、scFvダイマー、二重特異性ダイアボディ、dsFv-dsFv')重鎖抗体、Fab<sub>3</sub>、2価VHH、5価VHH(ペンタボディ)、(scFv-SA)<sub>4</sub>、および[sc(Fv)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>をさらに含むが、これらに限定されない。

## 【0092】

別の実施形態において、CD133結合剤は、ファージFabまたはファージscFvのような、CD133結合性抗体可変領域を含むポリペプチドを提示するファージである(以下の実施例1および2を参照のこと)。

## 【0093】

本開示のCD133結合剤の実施形態はさらに、CD133結合性核酸アプタマー(例えば、RNAアプタマーまたはDNAアプタマー;例えば、Lipiet al., 2016参照)、ペプチドアプタマー(例えば、Parashar, 2016参照)、および化学的に合成された薬剤(例えば、合成抗体模倣物;例えば、McEnaney et al., 2014参照)を含む。

## 【0094】

別の実施形態において、CD133結合剤はペプチド類似体である。ペプチド類似体は、鑄型ペプチドの性質に類似した性質を有する非ペプチド薬として、製薬業界で一般的に使用されている。これらのタイプの非ペプチド化合物は、「ペプチド模倣物」または「ペプチド模倣薬」と呼ばれる(例えば、Fauchere, 1986、Veber and Freidinger, 1985、およびEvans et al., 1987参照)。そのような化合物は、しばしばコンピュータ化された分子モデリングを用いて開発される。生物学的に有用なペプチドと構造的に類似しているペプチド模倣物を使用して、同等の生物学的効果を生じ得る。一般に、ペプチド模倣薬は、ヒト抗体のようなパラダイムポリペプチド(すなわち、生化学的性質または薬理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、当該術分野で周知の方法により、-CH<sub>2</sub>NH-、-CH<sub>2</sub>S-、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-CH=CH-(シスおよびトランス)、-COCH<sub>2</sub>-、CH(OH)CH<sub>2</sub>-、および-CH<sub>2</sub>SO-からなる群から選択される結合によって任意選択的に置き換えられた1以上のペプチド結合を有している。同一タイプのD-アミノ酸(例えば、L-リジンの代わりにD-リジン)によるコンセンサス配列の1以上のアミノ酸の系統的な置換を使用して、より安定なペプチドを生成し得る。さらに、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変異を含む束縛性ペプチドは、例えば、ペプチドを環化する分子内ジスルフィド架橋を形成できる内部システイン残基を付加することによって、当技術分野において公知の方法(例えば、Rizzo and Gierasch, 19

10

20

30

40

50

9 2 参照) で生成され得る。

【0095】

一実施形態において、CD133 結合剤は抗体可変領域 RW01 を含み、これは (a) 配列番号 2 の Asp1 ~ Lys106 セグメントに対応する抗体軽鎖可変ドメイン (配列番号 28) であって、軽鎖 CDR1、軽鎖 CDR2 および軽鎖 CD3 のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号 6、配列番号 7 および配列番号 8 に対応する抗体軽鎖可変ドメイン (下記の実施例 2 を参照) と、(b) 配列番号 3 の Glu1 ~ Thr120 セグメントに対応する抗体重鎖可変ドメイン (配列番号 29) であって、重鎖 CDR1、重鎖 CDR2 および重鎖 CDR3 のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号 9、配列番号 10、および配列番号 11 に対応し、また 39 位、55 位および 66 位の (フレームワーク領域) 残基が Met、Ser、および Tyr 残基である抗体重鎖可変ドメイン (下記の実施例 2 を参照) と、を含む。

10

【0096】

一実施形態において、CD133 結合剤は抗体可変領域 RW03 を含み、これは (a) 配列番号 4 の Asp1 ~ Lys109 セグメントに対応する抗体軽鎖可変ドメイン (配列番号 30) であって、軽鎖 CDR1、軽鎖 CDR2 および軽鎖 CD3 のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号 12、配列番号 13 および配列番号 14 に対応する抗体軽鎖可変ドメイン (下記の実施例 2 を参照) と、(b) 配列番号 5 の Glu1 ~ Ser118 セグメントに対応する抗体重鎖可変ドメイン (配列番号 31) であって、重鎖 CDR1、重鎖 CDR2 および重鎖 CDR3 のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号 15、配列番号 16、および配列番号 17 に対応し、また 39 位、55 位および 66 位の (フレームワーク領域) 残基が Ile、Tyr、および Tyr 残基である抗体重鎖可変ドメイン (下記の実施例 2 を参照) と、を含む。

20

【0097】

また、本明細書に特に開示されるのは、配列番号 2 に示される軽鎖アミノ酸配列および配列番号 3 に示される重鎖アミノ酸配列を含む、CD133 結合剤 IgG RW01 である (以下の実施例 2 を参照のこと)。

【0098】

なおさらに本明細書で特に開示されるのは、配列番号 4 に示される軽鎖アミノ酸配列および配列番号 5 に示される重鎖アミノ酸配列を含む、CD133 結合剤 IgG RW03 である (以下の実施例 2 参照)。

30

【0099】

したがって、本開示はまた、CD133 結合剤であって、

(i) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR1、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR2、および / もしくは配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR3 を含む抗体軽鎖可変ドメイン、ならびに / または

(ii) 39 位に Met 残基および配列番号 9 のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR1、55 位の Ser 残基、66 位の Tyr 残基および配列番号 10 のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR2、および / または配列番号 11 のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR3 を含む抗体重鎖可変ドメインを含み、抗体軽鎖可変ドメインおよび抗体重鎖可変ドメインが、ヒト CD133 に結合する抗原結合部位を形成する、CD133 結合剤を提供する。

40

【0100】

一実施形態において、抗体軽鎖可変ドメインは、それぞれ配列番号 6、配列番号 7 および配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR1、軽鎖 CDR2、および軽鎖 CDR3 を含み、ならびに抗体重鎖可変ドメインは、それぞれ配列番号 9、配列番号 10 および配列番号 11 のアミノ酸配列を含む重鎖 CDR1、重鎖 CDR2、および重鎖 CDR3 を含み、抗体重鎖可変ドメインは、それぞれ 39 位、55 位および 66 位に Met 残基、Ser 残基および Tyr 残基を含む。

【0101】

別の実施形態において、抗体軽鎖可変ドメインは、それぞれ配列番号 6、配列番号 7 お

50



および配列番号 8 のアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1、軽鎖 C D R 2、および軽鎖 C D R 3 を含み、ならびに抗体重鎖可変ドメインは、配列番号 9 のアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 1 および 3 9 位において重鎖 C D R 1 に隣接する M e t 残基で構成されるアミノ酸配列（配列番号 3 2）、配列番号 1 0 のアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2、5 5 位において重鎖 C D R 2 に隣接する S e r 残基、および 6 6 位において重鎖 C D R 2 に隣接する T y r 残基、ならびに配列番号 1 1 のアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 3 で構成されるアミノ酸配列（配列番号 3 3）を含む。

【 0 1 0 2 】

さらなる実施形態において、軽鎖は、配列番号 2 のアミノ酸配列、または配列番号 2 のフレームワーク領域に対して少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、および / または重鎖は、配列番号 3 のアミノ酸配列、または配列番号 3 のフレームワーク領域に対して少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【 0 1 0 3 】

なおさらなる実施形態において、軽鎖は配列番号 2 のアミノ酸配列からなり、および / または重鎖は配列番号 3 のアミノ酸配列からなる。

【 0 1 0 4 】

したがって、本開示はまた、C D 1 3 3 結合剤であって、

（ i ）配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1、配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2、および / もしくは配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3 を含む抗体軽鎖可変ドメイン、ならびに / または

20

（ i i ）3 9 位に M e t 残基および配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1、5 5 位と 6 6 位の T y r 残基および配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2、および / もしくは配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3、を含む抗体重鎖可変ドメインを含み、抗体軽鎖可変ドメインおよび抗体重鎖可変ドメインは、ヒト C D 1 3 3 に結合する抗原結合部位を形成する、C D 1 3 3 結合剤を提供する。

【 0 1 0 5 】

一実施形態において、抗体軽鎖可変ドメインは、それぞれ配列番号 1 2、配列番号 1 3 および配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1、軽鎖 C D R 2、および軽鎖 C D R 3 を含み、ならびに抗体重鎖可変ドメインは、それぞれ配列番号 1 5、配列番号 1 6 および配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1、重鎖 C D R 2、および重鎖 C D R 3 を含み、抗体重鎖可変ドメインは、それぞれ 3 9 位、5 5 位および 6 6 位に I l e 残基、T y r 残基および T y r 残基を含む。

30

【 0 1 0 6 】

別の実施形態において、抗体軽鎖可変ドメインは、それぞれ配列番号 1 2、配列番号 1 3 および配列番号 1 4 のアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 1、軽鎖 C D R 2、および軽鎖 C D R 3 を含み、ならびに抗体重鎖可変ドメインは、配列番号 1 5 のアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 1 および 3 9 位において重鎖 C D R 1 に隣接する M e t 残基で構成されるアミノ酸配列（配列番号 3 4）、配列番号 1 6 のアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2、5 5 位において重鎖 C D R 2 に隣接する T y r 残基、および 6 6 位において重鎖 C D R 2 に隣接する T y r 残基で構成されるアミノ酸配列（配列番号 3 5）、ならびに配列番号 1 7 のアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 3、を含む。

40

【 0 1 0 7 】

さらなる実施形態において、抗体軽鎖は、配列番号 4 のアミノ酸配列、または配列番号 4 のフレームワーク領域に対して少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、および / または抗体重鎖は、配列番号 5 のアミノ酸配列、または配列番号 5 のフレームワーク領域に対して少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 1 0 8 】

なおさらなる実施形態において、軽鎖は配列番号 4 のアミノ酸配列からなり、重鎖は配列番号 5 のアミノ酸配列からなる。

【 0 1 0 9 】

50

本開示の任意の C D 1 3 3 結合剤は、周知の技術を使用して入手でき、また使用のために適切に調製され得る。

【 0 1 1 0 】

本開示のポリペプチド C D 1 3 3 結合剤は、当技術分野において周知であり、日常的に実施される組換え技術によって合成することができる。本開示のポリペプチド C D 1 3 3 結合剤は、組換え細胞株またはトランスジェニック動物などの組換え供給源において産生され得る。技術は、C D 1 3 3 に対して特異的な s c F v のような単鎖抗体の産生のために適合させることができる（例えば、米国特許第 4 , 9 4 6 , 7 7 8 号参照）。

【 0 1 1 1 】

あるいは、本開示の C D 1 3 3 結合抗体のような本開示のポリペプチド C D 1 3 3 結合剤は、動物の血清中において抗体を発生させるように、動物を C D 1 3 3 で、または適切な C D 1 3 3 エピトープを含むポリペプチドで免疫感作することによって得ることができる。

10

【 0 1 1 2 】

本開示の C D 1 3 3 結合性 I g G 抗体は、プロテイン A またはプロテイン G を使用するアフィニティークロマトグラフィーなどの技術によって、血清のような生物学的サンプルから精製することができる（例えば、Wilkinson, 2000 を参照されたい）。追加的または代替的に、C D 1 3 3 または C D 1 3 3 結合剤により特異的に結合されるそのエピトープを含むポリペプチドをカラムに固定化して、免疫親和性クロマトグラフィーにより、サンプルから C D 1 3 3 結合剤を精製することができる。

20

【 0 1 1 3 】

本開示の C D 1 3 3 結合抗体断片は、従来の技術を用いて抗体から得ることができる。例えば、F ( a b ' ) 2 断片は、抗体をペプシンで処理することにより生成させることができる。得られた F ( a b ' ) 2 断片は、F a b ' 断片を生成させるために、ジスルフィド架橋を還元するように処理することができる。

【 0 1 1 4 】

本開示のポリペプチド C D 1 3 3 結合剤を製造する方法を、以下にさらに詳細に記載する。

【 0 1 1 5 】

上記で述べたように、一実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は二重特異性抗体であり得る。

30

【 0 1 1 6 】

本明細書で使用する時、二重特異性抗体は、少なくとも 2 つの異なる抗原または同じ抗原の 2 つの異なるエピトープに対する結合特異性を付与する、2 つの異なる抗体可変領域を含む結合剤である。

【 0 1 1 7 】

本開示の二重特異性抗体は、C D 1 3 3 および他の抗原に特異的に結合するか、または C D 1 3 3 の異なるエピトープに特異的に結合する。任意選択で、二重特異性抗体は、C D 1 3 3 および細胞表面タンパク質、受容体または受容体サブユニットに結合する。

【 0 1 1 8 】

40

一実施形態において、二重特異性抗体は、C D 1 3 3 結合性単鎖 F a b および非 C D 1 3 3 結合性 s c F v を含む。あるいは、二重特異性抗体は、C D 1 3 3 結合性 F a b および非 C D 1 3 3 結合性 s c F v を含む。

【 0 1 1 9 】

別の実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は、T 細胞、マクロファージまたは N K 細胞などの免疫細胞をターゲティングし、それに結合および / または係合する二重特異性抗体である。この実施形態によれば、C D 1 3 3 結合剤は、一方の結合特異性が C D 1 3 3 に対するものであり、他方の結合特異性が T 細胞、マクロファージまたは N K 細胞の表面に発現された抗原に対するものである二重特異性抗体である。例えば、二重特異性抗体は、C D 1 3 3 および T 細胞の受容体のような免疫細胞受容体に結合することができ、結合

50

したときには免疫細胞の活性を活性化または阻害する。

【0120】

組換え細胞培養体から直接に、二重特異性抗体を作製および単離するための様々な技術が記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパー（例えばKostelný et al., 1992 参照）を用いて、「ダイアボディ」技術（例えばHollinger et al., 1993 参照）を用いて、および単鎖Fv（scFv）二量体（例えば、Gruber et al., 1994 参照）を用いて製造されている。

【0121】

T細胞と係合する二重特異性抗体は、二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）と呼ばれることがある。本開示の一実施形態では、二重特異性抗体/BiTEは、CD133とT細胞共受容体CD3の両方に特異的に結合する（本明細書ではCD133結合性/CD3結合性二重特異性抗体とも呼ばれる）。したがって、本開示のCD133結合性抗体可変領域およびCD3結合性抗体可変領域を含む二重特異性抗体/BiTEを本明細書で提供するような二重特異性抗体/BiTEは、癌細胞のような細胞へのT細胞のターゲティングを可能にし、表面CD133を発現する。二重特異性抗体/BiTEの様々な配置が本明細書において想定される。例えば、一実施形態において、二重特異性抗体/BiTEは、抗CD133 Fabおよび抗CD3 scFvを含む。任意選択で、抗CD133 Fabの軽鎖または重鎖のいずれかが、抗CD3 scFvの重鎖に結合している。別の実施形態において、二重特異性抗体/BiTEは、抗CD133単鎖Fab（scFab）および抗CD3 scFvを含む。任意選択で、抗CD133 Fabまたは抗CD133 scFabの軽鎖または重鎖のいずれかが、抗CD3 scFvの重鎖に結合する。一実施形態において、抗CD3 scFvは、CD3イプシロン/ガンマに結合する。一実施形態において、BiTE/二重特異性抗体は、CD3イプシロン/デルタに結合する。例えば、図10Aを参照されたい。BiTEの様々な実施形態の配置およびアミノ酸配列の例が表6に提供されている。したがって、本開示はまた、（a）配列番号22および配列番号23、（b）配列番号24および25、（c）配列番号26、および（d）配列番号27から選択される1以上のアミノ酸配列、またはそれらの機能的変異体を含むBiTEを提供する。一実施形態において、BiTEは、配列番号22～27のいずれか1つに対して、少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0122】

さらなる実施形態において、二重特異性抗体はCD133およびNK細胞表面受容体CD16に結合する。

【0123】

本開示の別の実施形態において、CD133結合剤は、抗体可変領域RW01および抗体可変領域RW03を含む二重特異性抗体である。

【0124】

上記のように、CD133結合剤は、任意の価数および/または特異性を有し得る。例えば、三重特異性および/または3価のCD133結合剤を調製することができる（例えば、Tuttle et al., 1991 参照）。

【0125】

さらに上述したように、CD133結合剤の実施形態はまた、CD133結合性キメラ抗原受容体（CAR）をも含む。

【0126】

したがって、本明細書では、（i）本開示のCD133結合剤、および（ii）1以上の免疫細胞受容体シグナル伝達ドメインを含むCARシグナル伝達ドメイン、を含むキメラ抗原受容体が提供される。キメラ抗原受容体は、本開示のCD133結合性可変領域を含むポリペプチド、例えばCD133結合性scFvが、例えばヒンジドメインおよび膜貫通ドメインを介して、1以上の免疫細胞受容体の1以上の細胞内シグナル伝達ドメイン

10

20

30

40

50

を含むCARシグナル伝達ドメインに融合されている。CARは、単量体ポリペプチド（例えば抗CD133 s c F vベースの）または多量体ポリペプチド（例えば抗CD133 F a bベースの）であり得る。免疫エフェクター細胞におけるそのようなCARの発現は、表面CD133を発現する細胞への免疫細胞のターゲティングを可能にし、細胞表面に発言されたCD133へのCARの結合が、免疫エフェクター細胞のエフェクター機能を活性化する。

#### 【0127】

一実施形態において、CARシグナル伝達ドメインは、T細胞共受容体CD3のシグナル伝達ドメイン（例えばCD3ゼータまたはCD3ガンマ）を含む。別の実施形態において、CARは、1以上のT細胞共刺激分子（例えば、CD28、4-1BB、CD137、OX40、ICOSおよび/またはCD27）のシグナル伝達ドメインに融合したT細胞共受容体CD3のシグナル伝達ドメインを含む。さらに別の実施形態において、CARシグナル伝達ドメインは、CD3ゼータ、ならびにCD8およびCD28の一部を含む。別の実施形態において、CARシグナル伝達ドメインは、ヒトCD8リーダー配列およびCD8a膜貫通ドメインを含む。一実施形態において、CARは、CD28シグナル伝達ドメインおよび末端CD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。さらなる実施形態において、CARシグナル伝達ドメインは、CD3ゼータシグナル伝達ドメイン、4-1BBシグナル伝達ドメイン、およびCD28シグナル伝達ドメインを含む。V L - リンカー - V HおよびV H - リンカー - V Lを含めて、CARに含まれるs c F vの異なる配置が想定される。抗原発現細胞をターゲティングするための適切なCARの構築およびそれらの使用は、当該技術分野は一般に「CAR T細胞療法」と称されるものであり、当該技術分野において周知である（例えば、Maus and June, 2016、Abate-Daga and Davila, 2016、Resetca et al., 2016、およびWang and Riviere, 2016参照）。

#### 【0128】

さらなる実施形態において、CD133結合剤はファージF a bまたはファージs c F vであり、ここでのF a bまたはs c F vはCD133に特異的に結合する。本開示はまた、本明細書に記載のようにCARを発現するT細胞を提供する。

#### 【0129】

CD133発現細胞への結合/ターゲティングにおけるその効果を高めるために、および/またはCD133発現細胞中のCD133レベルを低減することにおけるその有効性を高めるために、エフェクター機能に関して、本明細書に開示される結合剤を修飾することが望ましい場合があり得る。例えば、結合剤が抗体のような抗体Fc領域を含む場合、システイン残基をFc領域のCOOH末端に導入することができ、それによってこの領域において抗体モノマー間の鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にする。このようにして生成されたホモ二量体抗体は、改善された内在化能力および/または増加した補体媒介性細胞殺傷および抗体依存性細胞傷害(ADCC)を有することができる（例えば、Caron et al., 1992、およびShopes, 1992参照）。あるいは、抗体は二重のFc領域を有するよう操作され、それによって補体溶解およびADCC能力の増強を有することができる（例えば、Stevenson et al., 1989参照）。本開示には、本明細書に記載のCD133結合剤の機能的変異体も含まれる。本明細書で使用する「機能的変異体」の用語には、本明細書で開示されるアミノ酸および核酸配列の修飾または化学的等価物であって、本明細書に開示されたポリペプチドまたは核酸分子と実質的に同じ方法で、実質的に同じ機能を果たすものが含まれる。例えば、本明細書に開示されるポリペプチドの機能的変異体には、制限なしに、保存的アミノ酸置換が含まれる。

#### 【0130】

本明細書で使用する「保存的アミノ酸置換」とは、あるアミノ酸残基が別のアミノ酸残基で置換されることが、アミノ酸を類似の生化学的特性（例えば電荷、疎水性およびサイズ）を有する異なるアミノ酸に変える置換である。ポリペプチドの変異体には、本明細書に開示されるポリペプチド配列に対する付加および欠失も含まれる。加えて、変異体又

10

20

30

40

50

クレオチド配列には、その類似体および誘導体が含まれる。本明細書に開示される結合剤の変異体には、結合剤と同じ抗原またはエピトープに結合する物質が含まれる。

【0131】

一実施形態において、本開示には、本明細書に開示されるアミノ酸配列に対する機能的変異体が含まれる。特に、本開示は、I g G R W 0 1の軽鎖および重鎖のアミノ酸配列（それぞれ、配列番号2および配列番号3）の機能的変異体、抗体可変領域R W 0 1のC D Rのアミノ酸配列（配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10および配列番号11）の機能的変異体、ならびに抗体可変領域R W 0 1の重鎖の配列番号32および配列番号33に対応するアミノ酸配列の機能的変異体を提供する。本開示はさらに、特にI g G R W 0 3の軽鎖および重鎖のアミノ酸配列（それぞれ、配列番号4および配列番号5）の機能的変異体、抗体可変領域R W 0 3のC D Rのアミノ酸配列（配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16および配列番号17）の機能的変異体、ならびに抗体可変領域R W 0 3の重鎖の配列番号34および配列番号35に対応するアミノ酸配列の機能的変異体を提供する。

10

【0132】

別の実施形態において、本開示は、本明細書に開示されるアミノ酸配列をコードする核酸配列に対する機能的変異体を含むものである。I g G R W 0 1の軽鎖および重鎖をコードするヌクレオチド配列（それぞれ配列番号18および配列番号19）の機能的変異体、抗体可変領域R W 0 1の軽鎖および重鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列（それぞれ、配列番号52および配列番号53）の機能的変異体、抗体可変領域R W 0 1のC D Rのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40および配列番号41）の機能的変異体、ならびに抗体可変領域R W 0 1の重鎖の配列番号32および配列番号33に対応するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（それぞれ、配列番号42および配列番号43）の機能的変異体を特に提供する。

20

【0133】

本開示はさらに、特に、I g G R W 0 3の軽鎖および重鎖をコードするヌクレオチド配列（それぞれ、配列番号20および配列番号21）の機能的変異体、抗体可変領域R W 0 3の軽鎖および重鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列（それぞれ、配列番号54および配列番号55）の機能的変異体、抗体可変領域R W 0 3のC D Rのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48および配列番号49）の機能的変異体、ならびに抗体可変領域R W 0 3の重鎖の配列番号34および配列番号35に対応するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（それぞれ、配列番号50および配列番号51）の機能的変異体を提供する。

30

【0134】

加えて、機能的変異体には、少なくとも中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下において、本開示のアミノ酸配列をコードする核酸またはその相補体とハイブリダイズするヌクレオチド配列が含まれる。そのような機能的変異体には、少なくとも中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下において、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54または配列番号55、またはその相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列が含まれる。

40

【0135】

「少なくとも中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、溶液中の2つの相補的核酸分子間の選択的ハイブリダイゼーションを促進する条件が選択されることを意味する。ハイブリダイゼーションは、核酸配列分子の全部または一部に対して起こり得る。ハイブリダイズ部分は、典型的には少なくとも15（例えば、20、25、30、40または50）ヌクレオチド長である。当業者は、核酸二本鎖またはハイブリッド

50

の安定性が、ナトリウム含有緩衝液中ではナトリウムイオン濃度および温度の関数である  $T_m$  ( $T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\% (G + C) - 600 / L)$ 、または同様の式) によって決定されることを認識するであろう。したがって、ハイブリッドの安定性を決定する洗浄条件におけるパラメータは、ナトリウムイオン濃度および温度である。既知の核酸分子と類似するが同一ではない分子を同定するために、1%のミスマッチが  $T_m$  の約1%の減少をもたらすこと、例えば95%の同一性を有する核酸配列が探索されるならば、最終洗浄温度は約5%低下するであろうことを仮定することができる。これらの考察に基づいて、当業者は適切なハイブリダイゼーション条件を容易に選択することができるであろう。いくつかの実施形態では、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が選択される。例として、以下の条件を用いてストリンジェントなハイブリダイゼーションを達成することができる。すなわち、上記の式に基づいて、5×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)/5×デンハルト溶液/1.0% SDS ( $T_m - 5$ ) でのハイブリダイゼーションに続いて、0.2×SSC/0.1% SDSの60秒での洗浄である。中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には、42℃において3×SSC中での洗浄工程が含まれる。しかしながら、代替の緩衝液、塩および温度を用いて同等のストリンジェンシーが達成され得ることが理解される。ハイブリダイゼーション条件に関するさらなるガイダンスは、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 2002、および Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001の中に見出すことができる。

#### 【0136】

一実施形態において、本明細書に開示のアミノ酸配列の変異体アミノ酸配列には、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34または配列番号35に対して、少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有する配列が含まれる。

#### 【0137】

別の実施形態において、本明細書に開示されるアミノ酸配列の変異体アミノ酸配列は、配列番号2、3、4または5のフレームワーク領域に対して、少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含んでいる。別の実施形態において、本明細書に開示のアミノ酸配列をコードする変異体ヌクレオチド配列には、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54または配列番号55に対して、少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有する配列が含まれる。

#### 【0138】

別の実施形態において、本明細書に開示される重鎖および軽鎖可変ドメインを含むアミノ酸配列をコードする変異体ヌクレオチド配列には、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号52、配列番号53、配列番号54および配列番号55を含むそのようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に対して、少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有する配列が含まれる。

## 【 0 1 3 9 】

本明細書で使用される「配列同一性」という用語は、2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の間の配列同一性のパーセンテージを指す。2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の同一性パーセントを決定するために、当該配列は、最適な比較のために整列される（例えば、第2のアミノ酸または核酸配列との最適な整列のために、第1のアミノ酸配列または核酸配列にギャップを導入することができる）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第1の配列中のある位置が、第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められている場合、その分子はその位置において同一である。2つの配列間の同一性パーセントは、それら配列が共有する同一位置の数の関数である（すなわち、同一性% = 同一の重複位置の数 / 位置の総数 × 100%）。一実施形態において、2つの配列は同一の長さである。2つの配列間の同一性パーセントの決定はまた、数学的アルゴリズムを用いて達成することができる。2つの配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの非限定的な一例は、Karlin and Altschul, 1990のアルゴリズムを、Karlin and Altschul, 1993に修正したものである。このようなアルゴリズムは、Altschul et al., 1990のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれている。本開示の核酸分子に対して相同なヌクレオチド配列を得るために、NBLASTヌクレオチドプログラムパラメータセット（例えばスコア = 100、ワード長 = 12に対して）を用いて、BLASTヌクレオチド検索を実施することができる。本発明のタンパク質分子に対して相同なアミノ酸配列を得るためには、XBLASTプログラムパラメータセット（例えばスコア = 50、ワード長 = 3に対して）を用いて、BLASTタンパク質検索を実施することができる。比較目的のためのギャップ付きアライメントを得るためには、Altschul et al., 1997に記載されているように、ギャップ付きBLASTを利用することができる。あるいは、PSI-BLASTを使用して、分子間の離れた関係を検出する反復検索を行うことができる。BLAST、ギャップ付きBLAST、およびPSI-BLASTプログラムを利用するとき、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータを使用することができる（例えば、NCBIウェブサイト参照）。配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの他の非限定的な例は、Myers and Miller., 1988のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。アミノ酸配列を比較するためにALIGNプログラムを利用する場合、PAM120加重残基表、12のギャップ長ペナルティ、および4のギャップペナルティを使用することができる。2つの配列間の同一性パーセントは、ギャップを許容してまたは許容せずに、上記と同様の技術を用いて決定することができる。同一性パーセントの計算では、通常は完全一致のみがカウントされる。

## 【 0 1 4 0 】

## &lt; 核酸およびベクター &gt;

本明細書に記載の抗体可変領域をコードする核酸、およびこれらの抗体可変領域を含むポリペプチドをコードする核酸もまた提供される。本明細書で使用するとき、「核酸」の用語は単離された核酸を含む。

## 【 0 1 4 1 】

特に、本開示は、配列番号36～41に記載の、抗体可変領域RW01のCDR領域をコードする核酸、およびそれらの機能的変異体、ならびに配列番号42および43に記載のRW01の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列をコードする核酸、およびそれらの機能的変異体を提供する。また、配列番号44～49に記載のRW03のCDR領域をコードする核酸、およびそれらの機能的変異体、ならびに配列番号50および51に記載のRW03の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列をコードする核酸、ならびにそれらの機能的変異体も提供される。

## 【 0 1 4 2 】

抗体可変領域 R W 0 1 の軽鎖可変ドメインをコードする核酸（配列番号 5 2 ）、およびその機能的変異体がさらに提供される。一実施形態において、核酸は、（ a ）配列番号 2 8 のアミノ酸配列、または（ b ）配列番号 2 8 のフレームワーク領域に対して少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする。I g G R W 0 1 の重鎖をコードする核酸（配列番号 5 3 ）もまた提供される。一実施形態において、核酸は、（ a ）配列番号 2 9 のアミノ酸配列、または（ b ）配列番号 2 9 のフレームワーク領域に対して少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする。

【 0 1 4 3 】

抗体可変領域 R W 0 3 の軽鎖可変ドメインをコードする核酸（配列番号 5 4 ）、およびその機能的変異体をさらに提供する。一実施形態において、核酸は、（ a ）配列番号 3 0 のアミノ酸配列、または配列番号 3 0 のフレームワーク領域に対して少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする。抗体可変領域 R W 0 3 の重鎖可変ドメインをコードする核酸（配列番号 5 5 ）もまた提供される。一実施形態において、核酸は、（ a ）配列番号 3 1 のアミノ酸配列、または配列番号 3 1 のフレームワーク領域と少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする。

【 0 1 4 4 】

本開示はまた、配列番号 1 8 、 1 9 、 2 0 および 2 1 に記載の I g G R W 0 1 および I g G R W 0 3 の軽鎖および重鎖をコードする核酸、ならびにそれらの機能的変異体も提供する。

【 0 1 4 5 】

本開示はまた、配列番号 5 2 、 5 3 、 5 4 および 5 5 に記載の抗体可変領域 R W 0 1 および抗体可変領域 R W 0 3 の軽鎖および重鎖の可変ドメインをコードする核酸、ならびにそれらの機能的変異体をも提供する。

【 0 1 4 6 】

本明細書中で開示されるポリペプチド結合剤は、当該分野において周知でかつ日常的に実施される方法を使用して、目的のポリペプチドをコードする核酸を含むベクターによって発現され得る。したがって、本開示はまた、本明細書に記載の核酸のいずれかを発現するベクターをも提供する。

【 0 1 4 7 】

ポリペプチド結合剤は、ポリペプチド結合剤をコードする核酸を構築し、当該構築物を発現ベクターに挿入し、次いでそれを適切な宿主細胞中で発現させることによって調製することができる。本明細書に開示されるポリペプチド結合剤を発現させるために有用なベクターは、当技術分野において周知である。一実施形態において、ベクターは、機能的プロモーターによる動作可能な読み取り段階にある適切な翻訳開始および終結シグナルを含み、また、ベクターの維持を確実にし、望ましい場合には増幅をもたらす 1 以上の表現型選択マーカーおよび複製起点を含み得る。ベクターに加えて、本開示の核酸は、当技術分野で公知の他の任意の方法（リボソーム、裸の D N A 、アジュバント補助 D N A 、遺伝子銃、カテーテルなどを含むがこれらに限定されない）を介して、細胞または被験体に送達することができる。

【 0 1 4 8 】

< モノクローナルポリペプチド / モノクローナル抗体 >

上記のように、C D 1 3 3 結合剤は、C D 1 3 3 結合性抗体可変領域を含むポリペプチド、例えば抗体可変領域 R W 0 1 または抗体可変領域 R W 0 3 を特異的に含む抗体であり得る。したがって、本開示はさらに、本開示のモノクローナル C D 1 3 3 結合性抗体のような本開示のモノクローナルポリペプチド C D 1 3 3 結合剤を提供する。

【 0 1 4 9 】

本明細書で使用するとき、本開示の「モノクローナル」ポリペプチド C D 1 3 3 結合剤とは、同一のポリペプチド C D 1 3 3 結合剤分子の集団を指す。例えば、本開示のモノクローナル C D 1 3 3 結合性抗体のような、C D 1 3 3 結合性抗体可変領域を含む本開示のモノクローナルポリペプチド C D 1 3 3 結合剤の場合、C D R は当該集団の全ての分子に

10

20

30

40

50



において同一である。本開示のモノクローナル抗体のようなモノクローナルポリペプチドの産生のために、当該分野で既知の種々の手順が使用され得る（例えば、Greenfield, 2013 参照）。モノクローナル抗体は、一般に、「mAb」または「MAb」の略語を用いて指称される。

#### 【0150】

モノクローナル抗体は、米国特許第4,816,567号に記載されているような組換えDNA法によって作製することができる。モノクローナル抗体およびその抗原結合性断片をコードするDNAは、従来の手順を用いて（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより）容易に単離し、配列決定することができる。ハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましい供給源として役立つ。単離されたら、DNAを発現ベクターに入れ、次いでこれを、免疫グロブリンタンパク質を産生しないサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または他の方法ではミエローマ細胞のような宿主細胞にトランスフェクトして、組み換え宿主細胞中においてモノクローナル抗体の合成を得ることができる。

#### 【0151】

モノクローナル抗体もまた、動物をCD133、例えばマウス、ラットもしくはヒトのCD133またはその免疫原性断片、誘導体もしくは変異体などで免疫感作することにより生成させることができる。あるいは、発現されて、トランスフェクトされた細胞表面に結合するCD133をコードしている核酸分子を含有するベクターでトランスフェクトされた細胞を用いて、動物を免疫感作する。あるいは、抗体は、抗体または抗原結合性ドメイン配列を含むライブラリーを、CD133への結合についてスクリーニングすることにより得られる。このライブラリーは、例えば、構築したファージ粒子の表面に発現されるバクテリオファージコートタンパク質とのタンパク質またはペプチドの融合体、およびファージ粒子内に含まれるコーディングDNA配列（すなわち、「ファージディスプレイライブラリー」として、バクテリオファージで調製される。次いで、ミエローマ/B細胞融合から生じるハイブリドーマを、CD133に対する反応性についてスクリーニングする。

#### 【0152】

モノクローナル抗体は、例えばハイブリドーマ法を用いて調製することができる（例えば、Kohler and Milstein, 1975 参照）。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物を免疫剤で免疫感作して、免疫剤に特異的に結合する抗体を産生するかまたは産生できるリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫感作することができる。

#### 【0153】

##### <親和性>

免疫グロブリン分子と、免疫グロブリンが特異的である抗原との間に非共有相互作用が生じる。免疫学的結合相互作用の強度または親和性は、相互作用の解離定数（ $K_D$ ）に関して表すことができ、ここでより小さい $K_D$ はより高い親和性を表す。特定のポリペプチドの免疫学的結合特性は、当該技術分野で周知の方法を用いて定量化できる。そのような方法の1つは、抗原結合部位/抗原複合体の形成および解離の速度を測定することを含み、それらの速度は複合体パートナーの濃度、相互作用の親和性、および両方向の速度に等しく影響を及ぼす幾何学的パラメータに依存する。したがって、「オン速度定数」（ $K_{on}$ ）および「オフ速度定数」（ $K_{off}$ ）の両方は、濃度ならびに会合および解離の実際の速度の計算によって決定され得る（例えば、Malmqvist, 1993 参照）。 $K_{off}/K_{on}$ の比は、親和性に関連しない全てのパラメータの相殺を可能にし、そして解離定数 $K_D$ に等しい（例えば、Davies et al., 1990 参照）。

#### 【0154】

本明細書に開示される2価CD133結合剤、例えば2つのCD133結合性抗体可変領域（例えば、抗体または $F(ab')_2$ ）を含むCD133結合剤は、結合の解離定数（ $K_D$ ）が1マイクロモルであるときに、CD133に特異的に結合すると考えられる。

本明細書に開示される 1 価 C D 1 3 3 結合剤（すなわち、単一の C D 1 3 3 結合性抗体可変領域、例えば s c F v または F a b のような、単一の C D 1 3 3 結合部位を有するもの）は、2 価形態の C D 1 3 3 結合剤の結合の解離定数（ $K_D$ ）が 1 マイクロモル以下の場合に、C D 1 3 3 に特異的に結合すると言われる。本開示の 1 価結合剤を連結して、その適切な 2 価形態を生成するための方法は、当技術分野において周知である（例えば、1 価物質が単一の抗体可変領域を含む場合、2 コピーの抗体可変領域を含む 2 価抗体 / F（a b'）<sub>2</sub> の製造、または例えばポリペプチドリンカー、核酸リンカーまたは化学合成リンカーなどの適切なリンカーを使用することを含む）。

【0155】

様々な実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は、1 マイクロモル、900 nM、800 nM、700 nM、600 nM、500 nM、400 nM、300 nM、200 nM、100 nM、90 nM、80 nM、70 nM、60 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、2 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM ~ 0.3 nM、0.2 nM、または 100 pM ~ 約 1 pM の解離定数（ $K_D$ ）で C D 1 3 3 に結合する。

10

【0156】

さらなる様々な実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は、1 マイクロモル ~ 100 nM、100 nM ~ 10 nM、10 nM ~ 1 nM、1 nM ~ 0.1 nM、または 0.1 nM ~ 10 pM の解離定数（ $K_D$ ）で C D 1 3 3 に結合する。

20

【0157】

さらなる様々な実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は、3 nM ~ 2 nM、2.6 nM ~ 2.4 nM、2.5 nM、約 2.5 nM、2 nM ~ 1 nM、0.6 nM ~ 0.4 nM、0.5 nM、または約 0.5 nM の解離定数（ $K_D$ ）で C D 1 3 3 に結合する。

【0158】

本明細書に開示されているように、2 価 C D 1 3 3 結合剤、例えば本開示の C D 1 3 3 結合抗体または 2 価形態の 1 価 C D 1 3 3 結合剤の結合についての解離定数  $K_D$  は、フローサイトメトリーで測定したとき、H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 細胞のような C D 1 3 3 過剰発現細胞の集団への結合を飽和させるのに必要な C D 1 3 3 結合剤の最大半量の濃度（「E C 5 0」）に対応すると考えられる（下記の実施例 3 参照）。この方法は、C D 1 3 3 のような膜貫通タンパク質の場合にしばしばそうであるように、適切に精製できない細胞表面分子に対する結合剤の親和性を決定するために有用である。C D 1 3 3 結合剤の細胞表面発現 C D 1 3 3 への結合についての解離定数（ $K_D$ ）を決定する別の方法には、放射性リガンド結合アッセイ、および当業者に知られた同様のアッセイが含まれる。あるいは、本開示の C D 1 3 3 結合剤に結合された C D 1 3 3 またはその一部が精製形態で利用可能である場合、解離定数（ $K_D$ ）は表面プラズモン共鳴（S P R ; B i a c o r e）アッセイおよび他の適切なアッセイのような、当該分野で既知のアッセイによって測定される。

30

【0159】

上記のように、本開示は、抗体 I g G R W 0 1 により結合された C D 1 3 3 エピトープおよび / または抗体 I g G R W 0 3 により結合された C D 1 3 3 エピトープに特異的に結合する C D 1 3 3 結合剤を提供する。

40

【0160】

当技術分野において既知の様々な方法のうちのいずれか 1 つを用いて、抗体 I g G R W 0 1 により結合された C D 1 3 3 エピトープおよび / または抗体 I g G R W 0 3 により結合された C D 1 3 3 エピトープに特異的に結合する C D 1 3 3 結合剤を同定することができる。当業者であれば、この目的のために、競合的結合アッセイのような結合アッセイを使用できることを理解するであろう。当業者は、結合剤が、抗体 I g G R W 0 1 により結合される C D 1 3 3 エピトープおよび / または抗体 I g G R W 0 3 により結合され

50

るCD133エピトープを特異的に結合するかどうかを、結合剤が、抗体IgG RW01および/または抗体IgG RW03のヒトCD133への結合を阻害するかどうかを確かめることによって決定できる。抗体IgG RW01および/または抗体IgG RW03によるヒトCD133への結合の減少によって示されるように、試験される結合剤が抗体IgG RW01および/または抗体IgG RW03と競合する場合、当該結合剤は抗体IgG RW01および/または抗体IgG RW03と同じエピトープに結合する。結合剤の特異性を試験するための方法としては、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)および当該分野で既知の他の免疫学的に媒介される技術が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0161】

一実施形態において、抗体IgG RW01に結合されたCD133エピトープおよび/または抗体IgG RW03に結合されたCD133エピトープに特異的に結合するCD133結合剤は、CD133発現細胞の表面への結合について、抗体IgG RW01および/または抗体IgG RW03と競合するCD133結合剤である。一実施形態において、CD133エピトープはヒトCD133エピトープである。例えば、抗体IgG RW01に結合されるCD133エピトープおよび/または抗体IgG RW03に結合されるCD133エピトープに特異的に結合するCD133結合剤は、実施例7に開示された実験と類似したフローサイトメトリーにより決定されるように、そのような結合剤の飽和濃度でプレインキュベートされたCD133発現細胞への、抗体IgG RW01および/または抗体IgG RW03の結合を部分的または完全に阻害する。あるいは、膜がそのような結合剤の飽和濃度でプレインキュベートされている場合、抗体IgG RW01に結合されたCD133エピトープおよび/または抗体IgG RW03に結合されたCD133エピトープに特異的に結合するCD133結合剤は、変性CD133、例えば、全細胞溶解物の変性タンパク質の還元条件下での電気泳動分離(実施例6参照)の後に、膜(例えばニトロセルロースまたはPVDF)上にエレクトロブロットされた変性CD133への、抗体IgG RW01および/または抗体IgG RW03の結合を部分的または完全に阻害するであろう。

#### 【0162】

別の実施形態において、抗体IgG RW01に結合されるCD133エピトープおよび/または抗体IgG RW03に結合されるCD133エピトープに特異的に結合するCD133結合剤は、CD133発現細胞の表面への結合について抗体可変領域RW01を含むFabおよび/または抗体可変領域RW03を含むFabと競合する、1価のCD133結合剤(例えば、FabまたはscFv)である。一実施形態において、CD133エピトープはヒトCD133エピトープである。例えば、抗体IgG RW01に結合されるCD133エピトープおよび/または抗体IgG RW03に結合されるCD133エピトープに特異的に結合する1価CD133結合剤は、実施例7に開示された実験に類似したフローサイトメトリーによって決定されるように、そのような結合剤の飽和濃度でプレインキュベートされたCD133発現細胞への、抗体可変領域RW01を含むFabおよび/または抗体可変領域RW03を含むFabの結合を部分的または完全に阻害するであろう。あるいは、膜がそのような結合剤の飽和濃度でプレインキュベートされている場合、1価物質は、抗体可変領域RW01を含むFabおよび/または抗体可変領域RW03を含むFabの変性CD133への結合、例えば、全細胞溶解物を還元条件下で電気泳動分離(例えば実施例6参照)した後に、膜(例えばニトロセルロースまたはPVDF)上にエレクトロブロットされた変性CD133への結合を、部分的または完全に阻害するであろう。一実施形態において、CD133はヒトCD133である。

#### 【0163】

##### <検出抗原>

本明細書に記載される結合剤は、任意に検出剤で標識される。本明細書で使用するとき、「検出剤」の用語は、結合剤の存在を検出および/または定量化することを可能にする

10

20

30

40

50

任意の物質を指す。検出剤の例としては、ペプチドタグ、酵素（例えば、HRPまたはアルカリホスファターゼ）、タンパク質（例えば、フィコエリトリンまたはビオチン/ストレプトアビジン）、磁性粒子、発色団、蛍光分子、化学発光分子、放射性標識および染料が挙げられるが、これらに限定されない。結合剤は、検出剤で直接または間接に標識されてよい。

#### 【0164】

##### <ヒト化抗体>

本明細書に開示する非ヒト、例えばマウスのCD133結合剤をコードするヌクレオチド配列は、相同性の非ヒト、例えばマウス配列の代わりに、ヒト重鎖および軽鎖定常ドメインをコード配列に置換することによって（例えば、米国特許第4,816,567号、およびMorrisson, 1994参照）、または非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部または一部を、免疫グロブリンコード配列に共有結合することによって修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本明細書に開示される抗体の定常ドメインを置換し、または本明細書に開示される抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインを置換して、キメラ2価抗体を作製することができる。

10

#### 【0165】

Fc領域を含む非ヒト結合剤、例えば本明細書に記載の非ヒト抗体は、それらをヒトにおける使用に対してより寛容にするためにヒト化することができる。例えば、フレームワーク領域中のアミノ酸残基は、その置換で結合剤のCD133への結合能が損なわれない限り、それらをアミノ酸残基およびヒトフレームワーク領域で置換することによってヒト化されてよい（例えばVinccke et al., 2008参照）。

20

#### 【0166】

マウス抗体または他の種由来の抗体は、当該分野で周知の技術を使用して、ヒト化または霊長類化され得ることが理解されるであろう（例えば、Winter and Harris, 1993、およびWright et al., 1992参照）。抗体は、CH1、CH2、CH3、ヒンジドメイン、および/またはフレームワークドメインを対応するヒト配列で置換するために、組換えDNA技術によって操作することができる（例えば、WO92102190、ならびに米国特許第5,530,101号、5,585,089号、第5,569,761号、第5,693,762号、第5,693,762号、第5,714,350、および第5,777,085号参照）。また、キメラ免疫グロブリン遺伝子の構築のためのIg cDNAの使用が、当該技術分野において知られている（例えば、Liu et al., 1987a、およびLiu et al., 1987b参照）。mRNAは、ハイブリドーマまたは抗体を産生する他の細胞から単離されて、cDNAを産生するために使用される。目的のcDNAは、特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応によって増幅することができる（米国特許第4,683,195号および第4,683,202号）。あるいは、目的の配列を単離するために、ライブラリーが作製されてスクリーニングされる。次に、抗体の可変領域をコードするDNA配列を、ヒト定常領域配列に融合する。ヒトC領域遺伝子は既知のクローンから容易に入手可能である。アイソタイプの選択は、補体固定化などの所望のエフェクター機能、または抗体依存性細胞傷害性における活性によって導かれるであろう。ヒト軽鎖定常領域、カッパまたはラムダのいずれを使用してもよい。次いで、キメラヒト化抗体を従来の方法で発現させることができる。

30

40

#### 【0167】

上記のように、CD133結合剤はヒト抗体であり得る。完全ヒト抗体は、CDRを含む軽鎖および重鎖の両方の全配列がヒト遺伝子から生じる抗体分子である。そのような抗体は、本明細書において「ヒト抗体」または「完全ヒト抗体」と呼ばれる。ヒトモノクローナル抗体はトリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（例えば、Kozbor et al., 1983参照）、およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技術（例えば、Cole et al., 1985参照）を用いて調製することができる。ヒトモノクローナル抗体は、ヒトハイブリドーマを使用することにより（例えば

50

、Cote et al. , 1983 参照)、またはヒト B 細胞をインビトロにおいて Epstein Barr ウイルスで形質転換することによって(例えば、Cole et al. , 1985 参照) 利用および製造され得る。

【0168】

CD133 結合性 scFv または CD133 結合性 Fab のような CD133 結合性抗体可変領域を含む CD133 結合性ポリペプチドは、例えば、ヒト配列のみを含有する抗体を使用するファージディスプレイ法を使用して開発することができる。そのようなアプローチは当技術分野において周知である(例えば、本明細書の一部として援用する WO 92/01047 および米国特許第 6,521,404 号参照)。このアプローチでは、軽鎖および重鎖のランダムな対を担持するファージのコンピナトリアルライブラリーが、天然または組換えの CD133 またはその断片の供給源を用いてスクリーニングされる。別のアプローチにおいて、抗体または断片は、プロセスの少なくとも 1 つの工程がトランスジェニック非ヒト動物を CD133 タンパク質で免疫感作することを含むプロセスによって産生され得る。このアプローチでは、この異種/非ヒト動物の内因性重鎖および/または kappa 軽鎖遺伝子座のいくつかは無能化されており、抗原に应答して免疫グロブリンをコードする遺伝子を生成するために必要な再配列ができない。さらに、少なくとも 1 つのヒト重鎖遺伝子座および少なくとも 1 つのヒト軽鎖遺伝子座が、動物に安定にトランスフェクトされる。したがって、ヒト遺伝子座は、投与された抗原に应答して、抗原に対して免疫特異的なヒト可変領域をコードする遺伝子を提供するように再編成される。したがって、免疫感作されると、動物は完全なヒト免疫グロブリンを分泌する B 細胞を産生する。

【0169】

異種/非ヒト動物を産生するための様々な技術が当該分野で周知である(例えば、本明細書の一部として援用する米国特許第 6,075,181 号および第 6,150,584 号、その全体を本明細書の一部として援用する Green et al. , 1994、米国特許第 6,162,963 号、第 6,150,584 号、第 6,114,598 号、第 6,075,181 号、および第 5,939,598 号、日本国特許第 3,068,180 B2 号、第 3,068,506 B2 号および第 3,068,507 B2 号、欧州特許第 EP 0463151 B1 号、国際特許出願番号 WO 94/02602、WO 96/34096、WO 98/24893、および WO 00/76310 参照)。

【0170】

あるいは、「ミニフォーカス」アプローチが使用されてよく、ここでは外因性 Ig 遺伝子座が、Ig 遺伝子座からの断片(個々の遺伝子)を含めることによって模倣される(例えば、米国特許第 5,545,806 号、第 5,545,807 号、第 5,591,669 号、第 5,612,205 号、第 5,625,825 号、第 5,625,126 号、第 5,633,425 号、第 5,643,763 号、第 5,661,016 号、第 5,721,367 号、第 5,770,429 号、第 5,789,215 号、第 5,789,650 号、第 5,814,318 号、第 5,877,397 号、第 5,874,299 号、第 6,023,010 号、および第 6,255,458 号、欧州特許第 0546073 B1 号、および国際特許出願番号 WO 92/03918、WO 92/22645、WO 92/22647、WO 92/22670、WO 93/12227、WO 94/00569、WO 94/25585、WO 96/14436、WO 97/13852、および WO 98/24884 参照)。したがって、1 以上の VH 遺伝子、1 以上の DH 遺伝子、1 以上の JH 遺伝子、ミュー定常領域、および第 2 の定常領域(好ましくはガンマ定常領域)が、動物に挿入するための構築物の中に形成される。

【0171】

マイクロ細胞融合、大きな染色体片、または全染色体を介して導入されているマウス由来のヒト抗体の生成もまた証明されている(例えば、欧州特許出願第 773288 号および第 843961 号参照)。

【0172】

<免疫複合体>

本開示には、(2)エフェクター剤に結合されている(1)CD133結合剤、任意選択で抗体または抗体の抗原結合性断片を含む、免疫複合体もまた含まれる。本明細書で使用する、「免疫複合体」の用語は、抗体可変領域を含まない本開示のCD133結合剤を包含し、さらに抗体可変領域を含む本明細書で開示されるCD133結合剤を包含する。

【0173】

一実施形態において、エフェクター物質は標識であり、これは直接的または間接的に検出可能なシグナルを生成することができる。標識の例には、放射性同位元素が含まれる(すなわち放射性複合体)。

【0174】

別の実施形態において、エフェクター物質は治療剤である。治療剤には、癌治療薬/抗新生物薬が含まれるが、これらに限定されない。さらに別の実施形態では、治療剤は毒素である。

【0175】

本明細書では、「癌治療薬」または「抗新生物薬」の用語は、膵臓癌細胞、結腸直腸癌細胞、乳癌細胞、結腸癌細胞、胃癌細胞、前立腺癌細胞、肝臓癌細胞、肺癌細胞、黒色腫細胞、脳腫瘍細胞(場合により神経膠芽腫または髄芽腫細胞)および頭頸部扁平上皮癌細胞のような癌細胞におけるCD133のレベルを減少させる機能的性質を有する薬剤を指称するために使用される。

【0176】

毒素は、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素、またはそれらの断片であり得る。使用できる毒素およびその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖(Pseudomonas aeruginosa由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、-サルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアシンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウタンパク質(PAPI、PAPII、およびPAP-S)、ツルレイシ阻害剤、クルシン、クロチン、シャボンソウ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコセセンが含まれる。

【0177】

本開示の抗体のような本開示の放射性複合体CD133結合剤を使用して、例えば細胞を可視化するために、または細胞の細胞傷害性治療として、放射性核種をCD133発現細胞に結合させることができる。放射性複合体抗体の製造には、様々な放射性核種が利用可能である。例としては、<sup>212</sup>Bi、<sup>131</sup>I、<sup>131</sup>In、<sup>90</sup>Y、および<sup>186</sup>Reが挙げられる。

【0178】

当業者は、多種多様な可能性のある部分を、抗体可変領域を含むもの(例えば、CD133結合性抗体可変領域を含む抗体または抗体断片)など、本開示のポリペプチドCD133結合剤に結合できることを認識するであろう(例えば、その全体の内容を本明細書の一部として援用するCruse and Lewis, 1989参照)。カップリングは、それらがその意図した用途のためのそれぞれの活性/特徴を保持する限り、本開示の部分およびCD133結合剤を結合する任意の化学反応によって達成され得る。この連結には多くの化学的メカニズム、例えば、共有結合、親和性結合、インターカレーション、配位結合および複合体形成が含まれ得る。

【0179】

例えば、抗体のような本開示のポリペプチドCD133結合剤とエフェクター物質との複合体は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(アジブイミド酸ジメチルHCLなど)、活性エステル(スベリン酸ジサクシンイミジルなど)、アルデヒド(グルタルアルデヒドなど)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-

10

20

30

40

50

エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート(トルエン2,6-ジイソシアネートなど)、およびビス活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)のような、様々な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al., Science 238, 1098 (1987)に記載されているようにして調製することができる。

【0180】

炭素14で標識された1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、抗体に放射性ヌクレオチドを抱合させるための例示的キレート剤である(例えば、W094/11026参照)。

【0181】

<医薬組成物>

本開示はまた、有効成分としての本明細書に記載のCD133結合剤または免疫複合体または放射性複合体と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。

【0182】

本明細書で使用する時、「薬学的に許容される担体」の用語は、薬学的投与に適合する任意かつ全ての溶媒、分散媒、コーティング、等張剤および吸収遅延剤などを含むことを意図している。適切な担体は、その分野の標準的な参考書であるRemington's Pharmaceutical Sciencesの最新版に記載されており、これを本明細書の一部として援用する。そのような担体または希釈剤の任意の例としては、水、食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0183】

医薬組成物は、その意図された投与経路に適合するように処方される。投与経路の例には、非経口(例えば静脈内、皮内、皮下)、経口(例えば吸入)、経皮(すなわち局所)、経粘膜および直腸投与が含まれる。

【0184】

一実施形態において、活性成分は、インプラントおよびマイクロカプセル化送達システムを含む持続放出/制御放出製剤のように、それらを身体からの急速な排泄から保護する担体と共に調製される。エチレン-酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のような、生分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。そのような製剤の調製方法は当業者に明らかであろう。

【0185】

一実施形態において、経口または非経口の組成物は、投与の容易さおよび投与量の均一さのために、投与単位形態で製剤化される。本明細書で使用する投与単位形態は、治療される被検体のための単位投与量として適した、物理的に別々の単位を指す。各単位は、必要な薬学的担体と共に、所望の治療効果を生じるように計算された所定量の活性成分を含有する。投与単位形態の詳細は、活性成分の独特の特徴および達成されるべき特定の治療効果、ならびに個体の治療のために係る活性成分を調製する技術に固有の制限によって規定され、それに直接依存する。

【0186】

製剤はまた、治療すべき特定の適応症に必要な2以上の活性成分、場合によっては互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものを含むことができる。代替的に、またはそれに加えて、医薬組成物はその機能を増強する薬剤、例えば細胞傷害剤、サイトカイン、化学療法剤、または成長阻害剤を含むことができる。そのような分子は、意図する目的に有効な量での組み合わせにおいて適切に存在する。

【0187】

<方法および使用>

本開示はまた、本明細書に記載のCD133結合剤に関する使用および方法を提供する。

【0188】

<CD133発現細胞を検出する>

本開示のCD133結合剤、免疫複合体および医薬組成物は、CD133を発現する細胞を検出するために有用である。したがって、本開示は、CD133発現細胞をターゲティングし、結合し、かつ/または検出するための、本明細書に記載のCD133結合剤の使用を提供する。任意選択で、細胞は癌細胞であり、膵臓癌細胞、結腸直腸癌細胞、乳癌細胞、結腸癌細胞、胃癌細胞、前立腺癌細胞、肝臓癌細胞、肺癌細胞、黒色腫細胞、脳腫瘍細胞および頭頸部扁平上皮癌細胞が含まれるが、これらに限定されない。

【0189】

一実施形態において、本明細書に記載のCD133結合剤、免疫複合体、および医薬組成物は、CD133発現細胞の細胞表面発現をターゲティングし、結合し、かつ/または検出するために有用である。

【0190】

別の実施形態において、本明細書に記載のCD133結合剤、免疫複合体および医薬組成物は、細胞内CD133をターゲティングし、結合し、検出し、かつ/または位置特定するために有用である。

【0191】

別の実施形態において、本明細書に記載のCD133結合剤、免疫複合体および医薬組成物は、細胞溶解物中のCD133をターゲティングし、結合しおよび/または検出するために有用である。

【0192】

さらに別の実施形態において、本明細書に記載のCD133結合剤、免疫複合体および医薬組成物は、サンプル中、場合によってはCD133発現細胞中のCD133の発現レベルを検出および/または定量するために有用である。一実施形態において、CD133結合剤、免疫複合体および医薬組成物は、細胞のCD133レベルを検出および/または定量するために使用される。別の実施形態において、CD133結合剤、免疫複合体および医薬組成物は、細胞表面のCD133レベルを検出および/または定量するために有用である。

【0193】

本開示のCD133結合剤は、天然/細胞表面発現型CD133、および変性CD133の両方を検出/定量するために使用され得る。CD133の過剰発現は、しばしば癌性表現型と相関する。細胞の総CD133タンパク質レベルの減少は細胞の転移能の低下と相関することが示されているので(例えば、Rappa et al., 2008参照)、例えば、本開示のCD133結合剤を用いた、変性全細胞溶解物中におけるCD133タンパク質レベルのウエスタンブロッティング検出は、CD133発現癌細胞の転移能を低下させる治療能力を特徴付け/確認するために使用できる。

【0194】

一般に、細胞内CD133、全細胞CD133または表面発現型CD133タンパク質のような分析物を検出するための結合剤の使用は当技術分野において周知であり、多くのアプローチの適用を通して達成され得る。これらの方法は一般に、放射性、蛍光性、生物学的および酵素的なタグのような標識またはマーカーの検出に基づいている。方法の例としては、ウエスタンブロッティング、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、免疫蛍光法、免疫組織化学およびフローサイトメトリーが挙げられるが、これらに限定されない。

【0195】

本開示のCD133結合剤、免疫複合体および医薬組成物はまた、細胞におけるCD133タンパク質のレベルまたは量を低減および/または排除するためにも有用である。任意選択で、細胞はCD133陽性癌細胞であり、膵臓癌細胞、結腸直腸癌細胞、乳癌細胞、結腸癌細胞、胃癌細胞、前立腺癌細胞、肝臓癌細胞、膵臓癌細胞、肺癌細胞、黒色腫細胞、脳腫瘍細胞(場合により神経膠芽腫または髄芽腫細胞)および頭頸部扁平上皮癌細胞が含まれるが、これらに限定されない。癌細胞中の全細胞CD133タンパク質レベルの低下は、その転移能を低下させるために使用され得る(例えば、Rappa et al., 2008参照)。そのレベルが低減されるCD133タンパク質は、任意選択で、細胞

10

20

30

40

50



表面発現型および／または細胞内のCD133である。CD133発現細胞におけるCD133タンパク質は、任意選択で、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98もしくは99%、または100%低減される。

【0196】

<免疫細胞に対するCD133発現細胞のターゲティング>

さらに、本開示のCD133結合剤、免疫複合体および医薬組成物は、免疫系の細胞を捕捉、ターゲティングおよび／または結合するために有用である。

【0197】

例えば、上記の一実施形態において、CD133結合剤は二重特異性抗体であり、その一方の結合特異性はCD133に対するものであり、他方の結合特異性はT細胞、マクロファージまたはNK細胞などの免疫細胞上に発現される抗原に対するものである。上記で述べたように、T細胞を標的とする二重特異性抗体の一例は、二重特異性T細胞エンゲージャー(BiTE)である。

10

【0198】

上記の他の実施形態において、CD133結合剤はCD133結合性キメラ抗原受容体(CAR)であり、これはその抗原結合性／ターゲティングドメインとして、CD133結合性scFvのような本開示のCD133結合剤を含む。

【0199】

適切なCARの構築および抗原発現細胞をターゲティングするためのそれらの使用は、当技術分野において一般に「CAR T細胞療法」と呼ばれており、当技術分野において周知である(例えば、Maus and June., 2016、Abate-Daga and Davila, 2016、Resetca et al., 2016、およびWang Riviere., 2016参照)。したがって、本明細書に記載の二重特異性抗体およびキメラ抗原受容体は、免疫エフェクター細胞を、CD133発現細胞(CD133+細胞)にターゲティングするために有用である。

20

【0200】

また、CD133+細胞をターゲティングする方法であって、CD133+細胞を、本開示のCARを発現する免疫エフェクター細胞、または本開示の二重特異性抗体と該二重特異性抗体に特異的に結合される免疫エフェクター細胞との組み合わせに曝露することを含む方法も提供される。

30

【0201】

これらの方法により免疫エフェクター細胞をCD133+細胞にターゲティングすることは、CD133+癌細胞の表現型を、癌性表現型から低癌性または非癌性表現型へとシフトさせるために有用であり得る。さらに、免疫エフェクター細胞をCD133+細胞にターゲティングすることは、CD133が発現されるかまたは癌のように過剰発現される疾患を治療するために有用であり得る。

【0202】

<診断方法>

本明細書に開示されるCD133結合剤は、患者サンプル中または健常人の対照サンプル中におけるCD133の検出／定量に有用であり、したがって有用な診断薬となり得る。例えば、本開示の結合剤を使用して、CD133の全細胞発現および／または細胞表面発現型CD133を検出／定量することができる。本明細書で使用するとき、「診断法」の用語は、スクリーニング、層別化、モニタリングなどを包含する。

40

【0203】

一実施形態において、CD133結合剤は、CD133発現細胞、任意選択で膵臓癌細胞、結腸直腸癌細胞、乳癌細胞、結腸癌細胞、胃癌細胞、前立腺癌細胞、肝臓癌細胞、肺癌細胞、黒色腫細胞、脳腫瘍細胞および頭頸部扁平上皮癌細胞などの癌細胞を検出するために使用される。

【0204】

50

別の実施形態において、CD133結合剤は、CD133の細胞表面発現を検出/定量するために使用される。別の実施形態において、CD133結合剤は、CD133の細胞内発現を検出/定量化するために使用される。別の実施形態において、本明細書に記載のCD133結合剤を使用して、サンプル中のCD133の発現を検出/定量することができる。

#### 【0205】

例えば、本開示のCD133結合剤、例えば本開示の抗体および抗体断片は、サンプル中のCD133レベルを検出/定量するための様々なアッセイ、例えば、免疫蛍光法、フローサイトメトリーまたはELISAのうちの任意の1つを実施するために使用され得る。

#### 【0206】

一実施形態において、サンプル患者サンプル、例えば癌患者由来の癌サンプルである。あるいは、サンプルは健康な個体由来の対照サンプルであり得る。サンプルの例としては、培養細胞、培養細胞上清、細胞溶解物、血清、血漿、体液または生体組織のサンプルが挙げられるが、これらに限定されない。他の実施形態において、サンプルは癌から得られる。特定の実施形態において、サンプルは生検サンプルである。

#### 【0207】

##### <癌の治療>

CD133は、様々な癌において重要な役割を果たすことが示されている。例えば、CD133は脳腫瘍における癌幹細胞(CSC)のマーカーとして同定されており(Singh et al., 2003)、脳腫瘍画分由来のCD133+の100個の細胞は、NOD/SCIDマウスにおいて腫瘍を発生させるのに十分であることが実証されている(Singh et al., 2004)。さらに、CD133+神経膠腫細胞は、CD133陰性(CD133-)細胞と比較して、DNAチェックポイント依存的に放射線耐性が高いことが示されている(Bao et al., 2006)。膵臓CSCが抗CD133抗体を用いて単離されており、この細胞は腫瘍原性であり、また標準的な化学療法に対して非常に耐性であることが実証されている(Hermann et al., 2007)。同様に、膵臓癌細胞におけるCD133発現の増加は、遊走および浸潤の増加、ならびに腫瘍の悪性度の増大を含むより攻撃的な性質と相関することも示されている(Moriyama et al., 2010)。前立腺癌組織由来の幹細胞が同定されており(Collins, 2005)、また前立腺癌組織から、および不死化前立腺癌細胞株において単離されたCD133+細胞が幹細胞の特徴を示すことが実証されているが(Mikiet al., 2007; Wei et al., 2007)、しかしながら、他の研究ではこれを確認できておらず(Missol-Kolka et al., 2010)、また他の研究者がDU145株のような膵臓癌株に帰属させる幹細胞特性は報告されていない(Pfeiffer & Schalken, 2010)。CD133がCSCマーカーとして使用される別の種類の癌は、結腸直腸癌腫である。別のグループが、結腸癌におけるCSCのマーカーとしてCD133を同定した(O'Brien et al., 2006; Ricci-Vitiani et al., 2006)。CD133+細胞がSCIDマウスにおいて腫瘍を容易に再現すること、および未分画腫瘍細胞と比較して、結腸癌始原細胞に精製されたCD133+細胞の濃縮が存在することが実証されている(O'Brien et al., 2006及びRicci-Vitiani et al., 2006)。結腸転移由来のCD133+およびCD133-陰性細胞の両方が結腸球を形成し、NOD/SCIDマウスにおいて腫瘍を再現できることが証明されている(Shmelkov, 2004)。さらに、いくつかのグループが、CD133はより悪い臨床的予後、疾患の進行および転移と関連しており、CD133タンパク質は結腸直腸癌患者のための独立した予後マーカーとして使用できると結論づけている(Horst et al., 2009)。しかしながら、他のグループは、CD133と結腸癌患者における疾患の進行または生存との間の関係を見出すことには失敗したが、その代わりに、当該タンパク質の発現と腫瘍病期との間の関係を見いだした(Lugli et al., 2010)。

#### 【0208】

10

20

30

40

50

転移性黒色腫細胞株 F E M X - I における C D 1 3 3 のダウンレギュレーションは、より遅い細胞増殖、細胞運動性の低下、幹細胞増殖条件において球を形成する能力の低下、および腫瘍異種移植片の転移能の低下をもたらすことが実証されている ( R a p p a e t a l . , 2 0 0 8 ) 。モノメチルオーリスチン F ( m o n o m e t h y l a u r i s t a t i n F ) にコンジュゲートされた抗 C D 1 3 3 抗体 A C 1 3 3 は、インビトロにおいて肝細胞癌細胞および胃癌細胞の増殖を阻害することが示されており ( S m i t h e t a l . , 2 0 0 8 ) 、さらに、A C 1 3 3 の存在下でサポリンにコンジュゲートされた二次抗体 A C 1 3 3 は F E M X - I 細胞に対して毒性であるが、ヒト線維芽細胞を抑制しないことが示された ( R a p p a r a , 2 0 0 8 年 ) 。さらに、サポリンに直接コンジュゲートされた A C 1 3 3 は、C D 1 3 3 発現がノックダウンされている F E M X - I 細胞よりも、F E M X - I 細胞に対してさらに効果的であることが示されている ( R a p p a e t a l . , 2 0 0 8 ) 。C D 1 3 3 がノックダウンされている細胞では、上方制御されるに至った遺伝子が w n t 阻害剤をコードすることが観察された ( M a k e t a l . , 2 0 1 2 b ) 。

【 0 2 0 9 】

さらに、多数の研究が、C D 1 3 3 + 脳腫瘍開始細胞 ( B T I C ) を、神経膠芽腫 ( G B M ) における化学的耐性および放射線耐性の推進因子として示唆している。また、最近では、C D 1 3 3 による遺伝子シグネチャが全生存率の低さを予測し ( V e n u g o p a l e t a l . , 2 0 1 5 ) 、また C D 1 3 3 + 治療抵抗性細胞をターゲッティングすることが G B M 再発を阻止するための有効な戦略となりうることも示された。

【 0 2 1 0 】

したがって、これらの結果は、有効な治療戦略および有効な診断戦略としての、C D 1 3 3 のターゲッティングに対するサポートを提供する。さらに、本発明者らは、C D 1 3 3 + G B M 細胞が特異的にターゲッティングされかつ殺傷される、C A R T 細胞に基づく戦略を記載した。本発明者らはまた、ヒトポリクローナル T 細胞を C D 1 3 3 + G B M 細胞へとリダイレクトする B i T E 抗体が、強力な抗腫瘍応答を誘導することを示した。

【 0 2 1 1 】

したがって、本開示の C D 1 3 3 結合剤および医薬組成物は、癌、例えば転移性黒色腫、脳腫瘍、前立腺癌、膵臓癌、および / または結腸 / 結腸直腸癌を治療または予防するために有用である。一実施形態において、癌は神経膠芽腫である。他の実施形態において、癌は髄芽腫である。

【 0 2 1 2 】

他の実施形態において、癌は C D 1 3 3 陽性癌 ( C D 1 3 3 発現癌とも呼ばれる ) である。一実施形態において、C D 1 3 3 陽性癌は、8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % または 9 9 % を超える C D 1 3 3 陽性細胞 ( すなわち、C D 1 3 3 発現細胞 ) を有する癌として定義される。C D 1 3 3 を発現する細胞の割合は、例えば腫瘍細胞培養物中で決定され得る。したがって、特定の実施形態において、癌は C D 1 3 3 陽性神経膠芽腫または C D 1 3 3 陽性髄芽腫である。別の実施形態において、癌は、C D 1 3 3 を検出可能に発現する神経膠芽腫または C D 1 3 3 を検出可能に発現する髄芽腫である。

【 0 2 1 3 】

一実施形態において、本明細書に記載の C D 1 3 3 結合剤および医薬組成物は、癌を治療または予防する方法において使用され、当該方法は、有効量の本明細書に開示される C D 1 3 3 結合剤または医薬組成物を、それを必要とする動物または細胞に投与することを含み、任意選択で、癌は転移性黒色腫、脳腫瘍、前立腺癌、膵臓癌および / または結腸癌である。一実施形態において、癌は神経膠芽腫または髄芽腫である。

【 0 2 1 4 】

別の実施形態において、本明細書に開示される有効量の C D 1 3 3 結合剤または医薬組成物は、癌を治療または予防するために使用され、任意選択で、癌は転移性黒色腫、脳腫瘍、前立腺癌、膵臓癌および / または結腸癌である。別の実施形態において、本明細書に

10

20

30

40

50

開示されるＣＤ１３３結合剤または医薬組成物は、癌を治療または予防するための医薬の調製に使用され、任意選択で、癌は転移性黒色腫、脳腫瘍、前立腺癌、膵臓癌および／または結腸癌である。一実施形態において、癌は神経膠芽腫または髄芽腫である。

【０２１５】

さらに別の実施形態において、本明細書に開示される有効量のＣＤ１３３結合剤または医薬組成物は、癌の治療または予防に用いられ、任意選択で、癌は転移性黒色腫、脳腫瘍、前立腺癌、膵臓癌および／または結腸癌である。一実施形態において、癌は神経膠芽腫または髄芽腫である。

【０２１６】

上記のように、本開示は、（１）ＣＤ１３３結合剤および（２）エフェクター剤を含む免疫複合体を提供し、エフェクター剤は、任意選択で、毒素または抗新生物剤である。

10

【０２１７】

したがって、本開示は、癌を治療または予防するための、本明細書に開示の免疫複合体の使用方法を提供し、その方法は有効量の本明細書に開示の免疫複合体を、それを必要とする動物または細胞に投与することを含み、任意選択で、癌は転移性黒色腫、脳腫瘍、前立腺癌、膵臓癌および／または結腸癌である。一実施形態において、癌は神経膠芽腫または髄芽腫である。

【０２１８】

一実施形態において、有効量の本明細書に開示の免疫複合体は、癌を治療または予防するために使用され、任意選択で、癌は転移性黒色腫、脳腫瘍、前立腺癌、膵臓癌および／または結腸癌である。別の実施形態において、本明細書に開示の免疫複合体は、癌を治療または予防するための医薬の調製に使用され、任意選択で、癌は転移性黒色腫、脳腫瘍、前立腺癌、膵臓癌および／または結腸癌である。一実施形態において、癌は神経膠芽腫または髄芽腫である。

20

【０２１９】

本開示はまた、ＣＤ１３３発現細胞をターゲティングするＣＡＲ、およびＣＡＲを発現するＴ細胞を提供する。したがって、別の実施形態において、本開示は、癌を治療または予防するための、本明細書に開示のＣＡＲを発現するＴ細胞の使用方法を提供し、該方法は、本明細書に開示のＣＡＲを発現する有効量のＴ細胞を動物または細胞に投与することを含み、任意選択で、癌は転移性黒色腫、脳腫瘍、前立腺癌、膵臓癌および／または結腸癌である。一実施形態において、癌は神経膠芽腫または髄芽腫である。

30

【０２２０】

一実施形態において、本明細書に開示されるＣＡＲを発現する有効量のＴ細胞は、癌の治療または予防に使用され、任意選択で、癌は転移性黒色腫、脳腫瘍、前立腺癌、膵臓癌および／または結腸癌である。別の実施形態において、本明細書に開示されるＣＡＲを発現するＴ細胞は、癌を治療または予防するための医薬の調製において使用され、任意選択で、癌は転移性黒色腫、脳腫瘍、前立腺癌、膵臓癌および／または結腸癌である。一実施形態において、癌は神経膠芽腫または髄芽腫である。

【０２２１】

本明細書で使用するとき、「被験体」および「動物」の用語は、動物界の全てのメンバーを含み、一実施形態において、被験体は哺乳動物である。さらなる実施形態において、被験体はヒトである。一実施形態において、被験体は、癌のようなＣＤ１３３発現細胞に関連する疾患を有する患者である。

40

【０２２２】

「細胞」の用語は、単一の細胞ならびに複数の細胞または細胞集団を含む。

【０２２３】

本開示のＣＤ１３３結合剤、免疫複合体または医薬組成物の有効量は、一般に、治療目的を達成するために必要とされる量に関する。上記のように、これはＣＤ１３３結合剤とＣＤ１３３との間の結合相互作用であり得、場合によっては、これはＣＤ１３３の機能を妨害する。

50

## 【 0 2 2 4 】

投与を必要とされる量はさらに、C D 1 3 3 に対する C D 1 3 3 結合剤の結合親和性に依存し、また投与された C D 1 3 3 結合剤が、それが投与される被験体の自由体積から枯渇する速度にも依存するであろう。本開示の C D 1 3 3 結合剤、免疫複合体または医薬組成物の治療的に有効な投与量の一般的な範囲は、非限定的な例として、約 0 . 1 m g / k g 体重 ~ 約 5 0 m g / k g 体重であり得る。一般的な投与頻度は、例えば 1 日 2 回から週 1 回の範囲であり得る。

## 【 0 2 2 5 】

治療の有効性は、特定の癌を診断または治療するための任意の既知の方法と関連して決定される。癌の 1 以上の症状を軽減することは、抗体が臨床的利益を与えることを示している。

10

## 【 0 2 2 6 】

本明細書で使用するとき、「癌を治療すること」とは、癌の進行または癌に関連する症状もしくは病態を反転、軽減するもしくは阻害することを含むが、これらに限定されない。「癌の予防」は、癌の発症または再発を予防することを含む。「癌を治療すること」はまた、被験体における生存期間を延ばすことを含む。生存期間は、本明細書に記載した C D 1 3 3 結合剤、免疫複合体または医薬組成物での治療なしで予想される生存期間よりも、場合によっては少なくとも 1、2、3、6 もしくは 1 2 ヶ月、または少なくとも 2、3、4、5 もしくは 1 0 年間延長される。「癌を治療すること」はまた、腫瘍量および / または腫瘍負荷（例えば、脳腫瘍量および / または脳腫瘍負荷）を減少させることを含む。場合により、本明細書に記載の C D 1 3 3 結合剤、免疫複合体または医薬組成物での治療後には、腫瘍量および / または腫瘍負荷が少なくとも 5、1 0、2 5、5 0、7 5 または 1 0 0 % 減少する。他の実施形態において、「癌を治療する」とは、腫瘍の攻撃性、悪性度および / または侵襲性を低下させることを含む。場合により、腫瘍は新たに形成された腫瘍または治療時に既に存在している腫瘍である。

20

## 【 0 2 2 7 】

一実施形態において、活性成分は、少なくとも 1 つの追加の治療薬と組み合わせて使用されてよい。したがって、本出願は、本明細書に記載の C D 1 3 3 結合剤、免疫複合体または医薬組成物を、少なくとも 1 つの追加の治療薬と組み合わせて使用して癌を予防または治療する方法を提供する。追加の治療薬は、活性成分の投与の前に、それと同時に、および / またはその後に投与することができる。同時に投与する場合、C D 1 3 3 結合剤、免疫複合体または医薬組成物および追加の治療薬は、単一製剤または別々の製剤で投与することができ、別々に投与する場合は、任意選択で異なる投与様式で投与することができる。1 以上の C D 1 3 3 結合剤、免疫複合体または医薬組成物と 1 以上の他の治療薬との組み合わせは、癌と闘うために相乗的に作用し得る。

30

## 【 0 2 2 8 】

追加の治療薬の実施形態としては、追加の C D 1 3 3 結合剤、追加の C D 1 3 3 結合性免疫複合体、追加の C D 1 3 3 結合性医薬組成物、サイトカイン、成長因子阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症剤、代謝阻害剤、酵素阻害剤、抗炎症剤、抗新生物剤、細胞傷害剤および / または細胞増殖抑制剤が挙げられる。そのような併用療法は、投与された活性成分のより低い投与量を有利に利用でき、したがって、単剤療法に関連して起こり得る毒性または合併症を回避することができる。

40

## 【 0 2 2 9 】

< スクリーニングアッセイ >

本開示はまた、本明細書に開示のタンパク質の C D 1 3 3 との結合を調節、あるいはそれを妨害する調節因子、すなわち試験薬（例えば、ペプチド、ペプチド模倣薬、小分子または他の薬物）を同定するための方法（本明細書では「スクリーニングアッセイ」とも呼ぶ）を提供する。

## 【 0 2 3 0 】

試験薬は、当該技術分野で既知のコンビナトリアルライブラリー法における多数のアブ

50

ローチのいずれかを用いて得ることができ、これは空間的にアドレス可能な平行固相または液相ライブラリー法、デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法、「1 ピーズ1 化合物」ライブラリー法、アフィニティークロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法（例えば Lam, 1997 参照）が含まれる。

【0231】

上記の開示は、本出願を一般的に説明するものである。より完全な理解は、以下の具体的な実施例を参照することによって得ることができる。それらの実施例は単なる例示目的のために記載されるものであり、本開示の範囲を限定することを意図しない。状況が好都合であるか、または好都合であることが示唆され得るときは、形態の変更および均等物での置換が想定される。本明細書では特定の用語が使用されているが、そのような用語は説明的な意味を意図したものであり、限定の目的を意図するものではない。

10

【0232】

以下の非限定的な実施例は本開示を例示するものである。

【0233】

< 実施例 >

実施例 1：細胞選択および配列決定

CD133 に特異的に結合できる新規抗体の発見を試みるために、2 つのファージディスプレイライブラリー、すなわち、ライブラリー F およびライブラリー G を、「Cell elect seq」法を用いて、細胞表面 CD133 結合剤についてスクリーニングした。（Cell elect seq 法、ライブラリー F およびライブラリー G は、例えば米国特許出願第 13 / 629, 520 号に以前に記載されている）。簡単に説明すると、ライブラリー F は、軽鎖相補性決定領域（CDR）3 および 3 つ全ての重鎖 CDR に多様性を有する Fab ライブラリーであり、またライブラリー G は、6 つの全ての CDR に多様性を有する scFv ライブラリーである。選択に使用された細胞は、陽性選択については CD133（GenBank 登録番号 O43490）を過剰発現するように操作された HEK293 細胞であり、また陰性選択については親 HEK293 細胞が使用された。4 ラウンドの陽性選択および陰性選択の後、各ライブラリーについて、ラウンド 4 のアウトプットファージ（10E-1 ~ 10E-3）の連続希釈物を作製し、これを使用して XL1-blue 細胞を感染させた。CD133 特異的結合剤を単離するためのクローン細胞ベースの ELISA で使用される単一コロニーを単離するために、感染細胞をプレートングした。HEK293-CD133 細胞に結合し、かつ HEK293 細胞へのバックグラウンド結合より少なくとも 1.5 倍高い ELISA シグナルを生成したクローンを、CD133 特異的結合剤として分類した。クローン DNA 由来の抗体可変（VL および VH）ドメインを、M13 でタグ付けした配列決定用プライマーを用いて増幅し、この増幅された配列をイルミナ配列決定（Illumina sequencing）により配列決定を行った。HEK293-CD133 細胞において発現された、ヒト CD133 の全長アミノ酸配列を表 1 に示す。CD133 の 3 つの細胞外ドメインにおけるアミノ酸配列座標は以下の通り、すなわち、Gly20 - Gly108、Ala179 - Tyr433、および Gly508 - Asn792 である。3 つの細胞外ドメインの全てに亘るセグメントのアミノ酸配列座標は、Gly20 - Asn792 である。全長配列の Met1 ~ Ser19 に対応するシグナル配列は、細胞表面発現型成熟 CD133 タンパク質には存在しない。

20

30

40

【表 1】

表 1. ヒト CD133 のアミノ酸配列（GenBank アクセッション O43490）.

<u>MALVLGSLLLGLCGNSFSGGQPSSTDAPKAWNYELPATNYETQDSHKAGPIGILFELVHIFLYVVQPRD</u>
<u>FPEDTLRKFLQKAYESKIDYDKPETVILGLKIVVEAGIILCCVLGLLFIILMPLVGYFFCMCRCCNCG</u>
<u>GEMHQRQKENGPFLLRKCFALISLLVICIIISIGIFYGFVANHQVTRIKRSRKLADSNFKDLRTLLNETPE</u>
<u>QIKYILAQYNTTKDKAFTDLNSINSVLGGGILDRLRPNIIPVLDEIKSMATAIKETKEALENMNSTLKS</u>
<u>HQQSTQLSSSLTSVKTSLSRSLNDPLCLVHPSSSETCNSIRLSLSQLNSNPELRQLPPVDAELDNVNVLR</u>
<u>TDLDGLVQQGYQSLNDIPDRVQRQTITTVVAGIKRVLNSIGSDIDNVTQRLPIQDILSAFSVYVNNNTESYI</u>

50

<p> <u>HRNLPTLEEYDSY</u><u>WWLGG</u><u>LVICS</u><u>LLTLIVIFYL</u><u>GLLCGV</u><u>CGYDRHATPTTRGCVSNTGGVFLMVG</u><u>VGLS</u>  <u>FLFCWILMIIVVLTFVFGANVEKLICEPYTSKELFRVLDTPYLLNEDWEYVLSGKLFNKS</u><u>KMLT</u><u>FEQVY</u>  <u>SDCKKNRGTYGTLHLQNSFNISEHLNINEHTGSISSELES</u><u>SKVNLNIFLLGAAGRKNLQDFAACGIDRMN</u>  <u>YDSYLAQTGKSPAGVNLLSFAYDLEAKANSLPPGNLRNSLKRDAQTIKTIHQQRVLP</u><u>IEQSLSTLYQSVK</u>  <u>ILQRTGNGLLERVTRILASLDFAQNFITNNTSSVIEETKKYGR</u><u>TIIGYFEHYLQWIEFSISEKVASCKP</u>  <u>VATALDTAVDVFLCSYIIDPLNLFWFVGIGKATVFLPALIFAVKLAKYYRRMDS</u><u>EDVYDDVETIPMKNME</u>          NGNGYHKDHVYGIHNPVMTSPSQH (配列番号 1)       </p> <p>         C D 1 3 3 の 3 つの細胞外ドメインには下線が付されている。          イタリアック体は、成熟した表面発現ポリペプチドには存在しないシグナル配列を示す。       </p>
--

10

## 【 0 2 3 4 】

実施例 2 : ヒト C D 1 3 3 に特異的に結合できる新規抗体可変領域 R W 0 1 および R W 0 3 の発見および特徴付け

細胞選択および配列決定データ :

実施例 1 に記載の C e l l e c t e q 法を用いて、C D 1 3 3 結合性ファージ F a b またはファージ s c F v の細胞に基づく選択を行った。ライブラリー F のアウトプットから選択され、かつ C D 1 3 3 結合特異性を決定するために E L I S A にかけられた 9 4 個のファージ F a b クローンのうち、7 7 クローンは、対照 H E K 2 9 3 細胞より少なくとも 1 . 5 倍高いレベルで H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 細胞に結合することが分かった ( 図 1 A ) 。対照的に、ライブラリー G のアウトプットから選択されたクローンは、いずれもこの C D 1 3 3 結合特異性を示さなかった。ライブラリー F から選択された 9 4 個のクローンを、M 1 3 でタグ付けした配列決定用プライマーを用いて、F a b 可変領域 ( V L および V H 領域 ) をコードする D N A を増幅することにより配列決定した。陽性選択アウトプットプールで濃縮された結合剤を同定するために、イルミナ配列決定を介して、ライブラリー F およびライブラリー G におけるラウンド 3 および 4 の陽性および陰性のアウトプットを配列決定した。配列決定の結果、9 4 個のクローンのうち 9 1 個が、クローン「ファージ F a b R W 0 3 」、「ファージ F a b C 1 2 」および「ファージ F a b F 5 」で表されるように、それぞれ 3 つの固有の抗体可変領域を有するクローンで構成されていた。具体的には、9 4 個のクローンのうち、8 9 個のクローンが同じ可変領域配列を共有し、2 個のクローンが固有の可変領域配列を有し、3 個のクローンについては配列が得られなかった。

20

30

## 【 0 2 3 5 】

図 1 B は、「抗体可変領域 R W 0 3 」、ファージ F a b C 1 2 およびファージ F a b F 5 を含むファージ F a b R W 0 3 による、H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 および H E K 2 9 3 細胞への結合についての代表的な細胞ベースの E L I S A 結果を示す。ファージ F a b R W 0 3 のみが、H E K 2 9 3 細胞よりも H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 細胞に対して、少なくとも 1 . 5 倍の優先的結合を示した。ファージ F a b R W 0 3 、ファージ F a b C 1 2 およびファージ F a b F 5 の F a b をコードする D N A 配列を、それぞれタンパク質発現のための I P T G 誘導性ベクターの中にクローン化し、発現された F a b ( 「 F a b R W 0 3 」、「F a b C 1 2 」および「F a b F 5 」) を、免疫蛍光 ( I F ) アッセイによる試験のために精製した。その結果を図 2 に示す。I F アッセイは、F a b R W 0 3 が H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 細胞に対して非常に特異的な結合を示し、H E K 2 9 3 細胞に対するバックグラウンド結合はほとんどないのに対して、F a b C 1 2 および F a b F 5 は、H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 細胞および H E K 2 9 3 細胞の両方に非特異的に結合することを示した。H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 細胞への F a b R W 0 3 の特異的結合もまた、細胞ベースの E L I S A によって確認された ( 図 3 A ) 。さらに、F a

40

50

b RW03は、CD133を発現することが知られている結腸直腸癌細胞株のCaco-2細胞に結合することも見出された(図3B)。これらの結果は、ファージFabクローンC12およびファージFabクローンF5の可変領域DNA配列が、陽性および陰性選択アウトプットプールの両方に出現したのに対して、ファージFab RW03の可変領域DNA配列は陽性選択プールのみに出現したというイルミナ配列決定の結果と一致した(データは示さず)。加えて、ファージFab RW03 DNA配列は、ラウンド3および4の両方のアウトプットプールにおいて最も豊富な配列であり、これは、ファージFabの結合剤の94%のDNA配列が、ファージFab RW03のものであった細胞ベースのELISAの結果とも一致する。

#### 【0236】

ライブラリーF由来のCD133結合ファージFabをコードするDNA配列を決定することに加えて、ライブラリーG選択アウトプットプールからのイルミナ配列決定データもまた分析して、濃縮された結合剤を同定した(データは示さず)。12個の選択されたファージ-scFvクローンの可変領域をコードするDNAを、PCR増幅によって救出し、12個の選択されたファージ-scFvクローンのものに対応する可変領域を有する12個のIgG発現のための発現ベクターを生成させるために使用した。これら12個のIgGのうち、ファージ-scFvクローンRW01に由来の「抗体可変領域RW01」を含む「IgG RW01」が、CD133+細胞への特異的結合について、フローサイトメトリー分析により検証された。同様に、Fab RW03に対応した「抗体可変領域RW03」を有する「IgG RW03」を作製し、IgG RW01およびIgG RW03を並列してさらに試験した。

#### 【0237】

IgG RW01およびIgG RW03の軽鎖(hK)および重鎖のアミノ酸配列、ならびに抗体可変領域RW01およびRW03の重鎖および軽鎖の可変ドメインのアミノ酸配列を表2に示し、ならびに相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列およびIgG RW01に含まれる抗体可変領域RW01のおよびIgG RW03に含まれる抗体可変領域RW03の、39位、55位および66位の重鎖可変ドメイン残基を表3に示す。CDRならびにIgG RW01に含まれる抗体可変領域RW01およびIgG RW03に含まれる抗体可変領域RW03の39位、55位および66位の重鎖可変ドメイン残基をコードするヌクレオチド配列を表4に示す。IgG RW01の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、配列番号2のAsp1~Lys106セグメントのアミノ酸配列に対応し、IgG RW01の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、配列番号3のGlu1~Thr120セグメントのアミノ酸配列に対応し、IgG RW03の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、配列番号4のAsp1~Lys109セグメントのアミノ酸配列に対応し、IgG RW03の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、配列番号5のGlu1~Ser118セグメントのアミノ酸配列に対応する。

10

20

30

40

50



## 【表 2】

表 2. I g G R W 0 1 および I g G R W 0 3 の軽鎖 (h K) および重鎖、ならびに抗体可変領域 R W 0 1 および R W 0 3 の重鎖および軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列。

<p>抗体可変領域 RW01 の軽鎖可変ドメイン：</p> <p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGSSYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQGVWSLITFGQGTKVEIK (配列番号 28)</p>	10
<p>抗体可変領域 RW01 の重鎖可変ドメイン：</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIYYGSMHWVRQAPGKGLEWVASISPYYGSTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARHASSGYGHYAVYGIDYWGQGTLVTVSS (配列番号 29)</p>	10
<p>IgG RW01-軽鎖 (hK) アミノ酸配列：</p> <p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGSSYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQGVWSLITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 2)</p>	
<p>IgG RW01-重鎖 (hG1) アミノ酸配列：</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIYYGSMHWVRQAPGKGLEWVASISPYYGSTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARHASSGYGHYAVYGIDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK (配列番号 3)</p>	20
<p>抗体可変領域 RW03 の軽鎖可変ドメイン：</p> <p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQYSHAGHLFTFGQGTKVEIK (配列番号 30)</p>	30

抗体可変領域 RW03 の重鎖可変ドメイン：	
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG <u>FNLS</u> SSSIHWVRQAPGKGLEWVAYIY <u>PPY</u> SYTYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARFGSVAGFDY</u> WGQGTLLTVSS（配列番号 31）	
IgG RW03-軽鎖（hK）アミノ酸配列：	
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYS <u>ASS</u> LYSGVPSRFSGSRSGTDFLTIT SSLQPEDFATYYCQQYSHAGHLFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番 号 4）	
IgG RW03-重鎖（hG1）アミノ酸配列：	
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG <u>FNLS</u> SSSIHWVRQAPGKGLEWVAYIY <u>PPY</u> SYTYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARFGSVAGFDY</u> WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK （配列番号 5）	
下線はCDR配列のアミノ酸残基を特定する。 大きなフォントは、抗体可変領域を特定するために使用される選択ライブラリーにお いて無作為化された39位、55位または66位のFRアミノ酸残基を特定する。 イタリック体は、免疫グロブリン定常領域アミノ酸残基または免疫グロブリン定常領 域アミノ酸残基をコードするヌクレオチド配列を特定する。	

10

20

【表 3】

表 3. 抗体可変領域 RW01 および抗体可変領域 RW03 の CDR のアミノ酸配列、なら  
びに重鎖可変ドメインの 39 位、55 位および 66 位における FR 残基。

30

抗体	抗体セグメント	アミノ酸配列
IgG RW01	CDR-L1	QGSSY（配列番号 6）
	CDR-L2	SAS（配列番号 7）
	CDR-L3	QQGVWSLIT（配列番号 8）
	CDR-H1	GFNIYYYGS（配列番号 9）
	CDR-H2	ISPYYGST（配列番号 10）

40

	CDR-H3	ARHASSGYGHYAVYGIDY (配列番号 11)
	VH ドメイン 39 位 (CDR-H1; FR2 残基のカルボキシ末端残基に隣接)	Met
	VH ドメイン 55 位 (CDR-H2; FR2 残基のアミノ末端残基に隣接)	Ser
	VH ドメイン 66 位 (CDR-H2; FR3 残基のカルボキシ末端残基に隣接)	Tyr
	CDR-H1 (下線部) および VH ドメイン 39 位に亘るセグメント	<u>GSMIYYGS</u> (配列番号 32)
	VH ドメイン 55 位, CDR-H2 (下線部) および VH ドメイン 66 位に亘るセグメント	<u>SISPYYGSTY</u> (配列番号 33)
IgG RW03	CDR-L1	QSVSSA (配列番号 12)
	CDR-L2	SAS (配列番号 13)
	CDR-L3	QQYSHAGHLFT (配列番号 14)
	CDR-H1	GFNLSSSS (配列番号 15)
	CDR-H2	IYPYYSYT (配列番号 16)
	CDR-H3	ARFGSVAGFDY (配列番号 17)
	VH ドメイン 39 位 (CDR-H1; FR2 残基のカルボキシ末端残基に隣接)	Ile
	VH ドメイン 55 位 (CDR-H2; FR2 残基のアミノ末端残基に隣接)	Tyr
	VH ドメイン 66 位 (CDR-H2; FR3 残基のカルボキシ末端残基に隣接)	Tyr
	CDR-H1 (下線部) および VH ドメイン 39 位に亘るセグメント	<u>GFNLSSSSI</u> (配列番号 34)

ト	
VH ドメイン 55 位, CDR-H2 (下線部) および VH ドメイン 66 位に亘るセグメント	<u>YIYPYYSYTY</u> (配列番号 35)

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4. 抗体可変領域 R W 0 1 および抗体可変領域 R W 0 3 の相補性決定領域 (C D R)、ならびに重鎖可変ドメイン 3 9 位、5 5 位および 6 6 位における F R 残基をコードする核酸配列。

抗体	抗体セグメント	ヌクレオチド配列
IgG RW01	CDR-L1	CAGGGTTCTTCTTAC (配列番号 36)
	CDR-L2	TCTGCATCC (配列番号 37)
	CDR-L3	CAGCAAGGTGTTGGTCTCTGATCACG (配列番号 38)
	CDR-H1	GGCTTCAACATCTACTACTACGGTTCT (配列番号 39)
	CDR-H2	ATTCTCCTTACTACGGCTCTACT (配列番号 40)
	CDR-H3	GCTCGCCATGCTTCTTCTGTTACGGTCATTACGCTGTTTACGGTATTGACTAC (配列番号 41)
	VH ドメイン 39 位 (CDR-H1; FR2 残基のカル ボキシ末端 残基に隣接)	ATG
	VH ドメイン 55 位 (CDR-H2; FR2 残基のアミ ノ末端残基 に隣接)	TCT
	VH ドメイン 66 位 (CDR-H2; FR3 残基のカル ボキシ末端	TAC

10

20

30

40

50

IgG RW03	に隣接)	
	CDR-H1 (下線部)および VH ドメイン 39 位に亘るセグメント	GGCTTCAACATCTACTACTACGGTCTATG (配列番号 42)
	VH ドメイン 55 位、CDR-H2 (下線部) および VH ドメイン 66 位に亘るセグメント	TCTATTTCTCCTTACTACGGCTCTACTAC (配列番号 43)
	CDR-L1	CAGTCCGTGTCCAGCGCT (配列番号 44)
	CDR-L2	TCGGCATCC (配列番号 45)
	CDR-L3	CAGCAATACTCTCATGCTGGTCATCTGTTACG (配列番号 46)
	CDR-H1	GGCTTCAACCTCTCTTCTTCT (配列番号 47)
	CDR-H2	ATTATCCTTATTATAGCTATACT (配列番号 48)
	CDR-H3	GCTCGCTTCGGTCTGTTGCTGGTTTTGACTAC (配列番号 49)
	VH ドメイン 39 位 (CDR-H1; FR2 残基のカルボキシ末端残基に隣接)	ATC
	VH ドメイン 55 位 (CDR-H2; FR2 残基のアミノ末端残基に隣接)	TAT
	VH ドメイン 66 位 (CDR-H2; FR3	TAT

10

20

30

40

50

残基のカルボキシ末端に隣接)	
CDR-H1 (下線部)および VH ドメイン 39 位に亘るセグメント	GGCTTCAACCTCTCTTCTTCTCTATC (配列番号 50)
VH ドメイン 55 位、CDR-H2 (下線部) および VH ドメイン 66 位に亘るセグメント	TATATTTATCCTTATTATAGCTATACTTAT (配列番号 51)

10

## 【 0 2 3 8 】

20

I g G R W 0 1 および I g G R W 0 3 の軽鎖 (h K) および重鎖、ならびに抗体可変領域 R W 0 1 および R W 0 3 の重鎖および軽鎖の可変ドメインをコードする DNA のヌクレオチド配列を表 5 に示す。

## 【表 5】

表 5. I g G R W 0 1 および I g G R W 0 3 の軽鎖 (h K) および重鎖、ならびに抗体可変領域 R W 0 1 および R W 0 3 の重鎖および軽鎖の可変ドメインをコードする DNA のヌクレオチド配列

抗体可変領域 R W 0 1 の軽鎖可変ドメイン：
5' -GATATCCAGATGACCCAGTCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATCACC TGCCGTGCCAGT <u>CAGGGTTCTTCTTAC</u> GTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAGCTTC TGATTTACTCTGCATCCTACCTCTACTCTACTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGTAGCCGTTCCGGG ACGGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTATTACTGT <u>CAGCAAGGTG</u> TTTGGTCTCTGATCAGTTCGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAA-3' (配列番号 52)
抗体可変領域 R W 0 1 の重鎖可変ドメイン
5' -GAGGTTCACTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCTGT GCAGCTTCTG <u>GCTTCAACCTCTCTTCTTCTTAT</u> CCACTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAGGGCCTGG AATGGGTTGCATATATTTATCCTTATTATAGCTATACTTATTATGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTAC TATAAGCGCAGACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCC

30

40

50

<p>GTCTATTATTGTGCTCGCTTCGGTTCTGTTGCTGGTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCCTGGTCACCG TCTCCTCG-3' (配列番号 53)</p>	
<p>I g G R W O 1 - 軽鎖 (h K) ヌクレオチド配列 :</p> <p>5' -GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATCACC TGCCGTGCCAGTCAGGGTTCTTCTTACGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAGCTTC TGATTACTCTGCATCCTACCTCTACTCTACTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGTAGCCGTTCCGGG ACGGATTCTACTCTGACCATCAGCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTATTACTGT<u>CAGCAAGGTG</u> <u>TTTGGTCTCTGATCACGTT</u>CGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAA <i>CGTACGGTGGCTGCACCATCTGT</i> <i>CTTCACTTCCCCCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAAC</i> <i>TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGA</i> <i>GTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGA</i> <i>CTACGAGAAACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC</i> <i>TTCAACAGGGGAGAGTGT-3'</i> (配列番号 18)</p>	10
<p>I g G R W O 1 - 重鎖 (h G 1) ヌクレオチド配列 :</p> <p>5' -GAGGTTCACTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCTGT GCAGCTTCTGGCTTCAACATCTACTACTACGGTTCTATGCACTGGGTGCGTCAGGCCCCGGTAAGGGCC TGGAATGGGTGCACTATTCTCCTTACTACGGCTCTACTTACTATGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTT CACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACT GCCGTCTATTATTGTGCTCGCCATGCTTCTTCTGGTTACGGTCATTACGCTGTTTACGGTATTGACTACT GGGGTCAAGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCG <i>GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACC</i> <i>CTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG</i> <i>GTGACGGTGTGCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCT</i> <i>CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG</i> <i>CAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAACT</i> <i>CACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAC</i> <i>CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGGACGTGAGCCACGAAGA</i> <i>CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG</i> <i>GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA</i> <i>AGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAA</i> <i>AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT</i> <i>AGCCTGACCTGCCTGCTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC</i> <i>CGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCT</i> <i>CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC</i> <i>AACCACTACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA-3'</i> (配列番号 19)</p>	40
<p>抗体可変領域 R W O 3 の軽鎖可変ドメイン :</p>	40

10

20

30

40

50

5' -GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATCACC  
TGCCGTGCCAGTCAGTCCGTGTCCAGCGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAGC  
TTCTGATTTACTCGGCATCCAGCCTCTACTCTACTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGTAGCCGTTCC  
GGGACGGATTCTACTCTGACCATCAGCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTCAGCAAT  
ACTCTCATGCTGGTCATCTGTTACGTTCGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAA-3' (配列番号

54)

抗体可変領域R W O 3 の重鎖可変ドメイン :

10

5' -GAGGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCTGT  
GCAGCTTCTGGCTTCAACCTCTCTTCTTCTTCTATCCACTGGGTGCGTCAGGCCCCGGGTAAGGGCCTGG  
AATGGGTTGCATATATTTATCCTTATTATAGCTATACTTATTATGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCAC  
TATAAGCGCAGACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCC  
GTCTATTATTGTGCTCGCTTCGGTTCTGTTGCTGGTTTTGACTACTGGGGTCAAGGAACCTGGTCACCG  
TCTCCTCG-3' (配列番号 55)

I g G R W O 3 - 軽鎖 (h K) ヌクレオチド配列 :

20

5' -GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATCACC  
TGCCGTGCCAGTCAGTCCGTGTCCAGCGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAGC  
TTCTGATTTACTCGGCATCCAGCCTCTACTCTACTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGTAGCCGTTCC  
GGGACGGATTCTACTCTGACCATCAGCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTCAGCAAT  
ACTCTCATGCTGGTCATCTGTTACGTTCGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAA *CGTACGGTGGCTGC*  
*ACCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTG*  
*CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAT*  
*CCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAG*  
*CAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC*  
*ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT-3'* (配列番号 20)

I g G R W O 3 - 重鎖 (h G 1) ヌクレオチド配列 :

30

5' -GAGGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCTGT  
GCAGCTTCTGGCTTCAACCTCTCTTCTTCTTCTATCCACTGGGTGCGTCAGGCCCCGGGTAAGGGCCTGG  
AATGGGTTGCATATATTTATCCTTATTATAGCTATACTTATTATGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCAC  
TATAAGCGCAGACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCC  
GTCTATTATTGTGCTCGCTTCGGTTCTGTTGCTGGTTTTGACTACTGGGGTCAAGGAACCTGGTCACCG  
TCTCCTCG *GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTCCCCCTGGCACCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGG*  
*CACAGCGGCCCTGGGCTGCTGCTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTTGAACTCAGGC*  
*GCCCTGACGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG*

40



TGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA  
 CACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCA  
 CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCC  
 GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA  
 CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGT  
 GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA  
 ACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT  
 GTACACCCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC  
 TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGC  
 CTCCCCTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
 GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC  
 TCCCTGTCTCCGGGTAAA-3' (配列番号 21)

10

下線部はCDRアミノ酸残基をコードするヌクレオチド配列を特定する。  
 大きなフォントは、抗体可変領域を特定するために使用される選択ライブラリ  
 ーにおける無作為化された39位、55位および66位のFRアミノ酸残基を  
 コードするヌクレオチド配列を特定する。  
 イタリック体は、免疫グロブリン定常領域アミノ酸残基をコードするヌクレオ  
 チド配列を特定する。

20

#### 【0239】

実施例3：IgG RW01およびIgG RW03は、それぞれ約1桁のナノモルおよ  
 びナノモル以下の親和性で、細胞表面に発現したCD133に結合する。

IgG RW01およびIgG RW03抗体を、HEK293-CD133細胞に結合  
 するそれらの能力についてフローサイトメトリーにより試験し、その後、細胞に対する各  
 抗体の最大半量の結合濃度を推定した。具体的には、HEK293-CD133細胞を各  
 抗体の段階希釈液と共にインキュベートし、結合を抗ヒトFab'2二次抗体で検出し、そ  
 のデータを、SigmaPlotグラフ作成プログラムを使用して最も適合する線に合わ  
 せた。図4は、2.5nMの計算されたEC50を有するIgG RW01のEC50曲  
 線、および0.5nMの計算されたEC50を有するIgG RW03の曲線を示す。

30

#### 【0240】

実施例4：IgG RW01およびIgG RW03は、フローサイトメトリー分析によ  
 り示されるように、膵臓癌細胞および結腸直腸癌細胞における細胞表面CD133に特異  
 的に結合し、検出するために使用できる。

IgG RW01およびIgG RW03抗体を、フローサイトメトリーによって、以下  
 の癌細胞株、すなわち、Caco-2、CD133を発現することが知られている結腸癌  
 細胞株、膵臓癌細胞株HPAC、PL45、RWP-1およびSU8686、ならびに卵  
 巣癌細胞株Ovcar-8への結合について評価した。HEK293細胞およびHEK2  
 93-CD133細胞を、それぞれ陰性対照および陽性対照として使用した。図5に示す  
 ように、5μg/mLの両抗体は、HEK293-CD133対照細胞の表面、Caco  
 -2結腸直腸癌細胞の表面、ならびにHPAC、PL45およびRWP-1膵臓癌細胞の  
 表面でCD133に結合する。HPAC細胞およびPL45細胞において二峰性染色ピー  
 クが観察され、操作された細胞株HEK293-CD133について観察されるようなよ  
 り広いピークは、より均一に発現する集団を示すRWP-1細胞で観察される狭いピーク  
 とは対照的に、不均一に発現する細胞集団の結果である可能性が最も高い。

40

#### 【0241】

実施例5：免疫蛍光分析により示されるように、IgG RW01およびIgG RW0

50

3 は、細胞 C D 1 3 3 に特異的に結合し、検出し、細胞内の位置を特定するために使用することができる。

I g G R W 0 1 および I g G R W 0 3 抗体を、細胞発現した C D 1 3 3 への結合について免疫蛍光アッセイで試験した ( 図 6 )。このアッセイは、I g G R W 0 1 および I g G R W 0 3 が H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 細胞 ( C D 1 3 3 の細胞内局在を示す ) には結合するが、H E K 2 9 3 細胞には結合しないことを示している。

【 0 2 4 2 】

実施例 6 : ウエスタンブロット分析に示されるように、I g G R W 0 1 および I g G R W 0 3 をそれぞれ使用して、結腸直腸癌細胞の全細胞溶解物中における変性 C D 1 3 3 を検出することができる。

10

C a c o - 2 結腸直腸癌細胞の全細胞溶解物を調製し、溶解物中の変性 C D 1 3 3 を検出する I g G R W 0 1 および I g G R W 0 3 の能力を、ウエスタンブロッティングアッセイによって分析した。H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 細胞および H E K 2 9 3 細胞を、それぞれ陽性対照および陰性対照として使用した。図 7 は、I g G R W 0 1 および I g G R W 0 3 のそれぞれが、両方とも C D 1 3 3 陽性である C a c o - 2 細胞および H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 細胞の溶解物中において変性 C D 1 3 3 を検出するが、H E K 2 9 3 細胞中では検出しないことを示している。

【 0 2 4 3 】

実施例 7 : エピトープ - F a b R W 0 1 および F a b R W 0 3 は、C D 1 3 3 への結合について、それぞれ I g G R W 0 3 および I g G R W 0 1 と競合しない。

20

抗体可変領域 R W 0 1 および抗体可変領域 R W 0 3 が、細胞で発現した C D 1 3 3 への結合について相互に競合するかどうかを決定するための実験を行った。細胞を最初に 2 5 n M 濃度の F a b R W 0 1 または F a b R W 0 3 のいずれかと共にインキュベートし、それぞれ I g G R W 0 3 または I g G R W 0 1 の段階希釈物を添加し、I g G 結合をヒト F c に対する二次抗体を使用して検出した。各抗体についての結果は図 8 ( a ) および ( b ) に見ることができ、I g G R W 0 1 は飽和 R W 0 3 F a b の存在下で細胞に結合し得、また I g G R W 0 3 は R W 0 1 F a b の存在下で結合し得ることを示している。

【 0 2 4 4 】

実施例 8 : I g G R W 0 1 または I g G R W 0 3 を用いた治療は、C a c o - 2 結腸直腸癌細胞における全細胞 C D 1 3 3 タンパク質レベルを有意に低下させるために使用することができる

30

癌細胞における C D 1 3 3 タンパク質レベルに対する I g G R W 0 1 および I g G R W 0 3 の効果を調べるために、C a c o - 2 結腸直腸癌細胞を I g G / R W 0 1 または I g G R W 0 3 のいずれかと共に 3 7 ° C で 2 4 時間インキュベートし、全細胞溶解物を、プローブとして A C 1 3 3 抗 C D 1 3 3 抗体 ( M i l t e n y i B i o t e c ) を用い、陰性抗体対照として抗ヒト I g G ( H + L ) 抗体 ( J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h ) を用いたウエスタンブロットにより分析した。図 9 に示すように、未処理群および抗ヒト I g G 対照処理群と比較して、R W 0 1 I g G または R W 0 3 I g G による処理は C D 1 3 3 タンパク質レベルを有意に減少させた。C D 1 3 3 タンパク質レベルの観察された減少による細胞内の W n t シグナル伝達に対する影響を評価するために、

40

- カテニンレベルも分析したが、対照抗体で処理したサンプルと、I g G R W 0 1 - または I g G R W 0 3 で処理したサンプルとの間で、- カテニンタンパク質の安定性に対する差異は観察されなかった。

【 0 2 4 5 】

実施例 9 : 単鎖 F a b R W 0 3 は、二重特異性 T 細胞エンゲージャー ( B i T E ) を C D 1 3 3 陽性細胞にターゲティングするために使用できる

4 つの新規な抗 C D 1 3 3 x 抗 C D 3 二重特異性 T 細胞エンゲージャー ( B i T E ; 図 1 0 A ) の発現のために、ベクターを構築した。4 つの B i T E はそれぞれ、抗 C D 3 s c F v を組み込んでおり、さらに抗 C D 1 3 3 F a b R W 0 3 ( F a b ベースの B i T E ) または F a b R W 0 3 ( 「 s c F a b R W 0 3 」 ; F a b ベースの B i T E ) の

50

可変領域を組み込んだ抗CD133単鎖Fab（「scFab」、scFabベースのBiTE）のいずれかを組み込んでいる。4つのBiTEのそれぞれにおいて、FabまたはscFabはscFvのVHドメインに結合している。この4つのBiTEは、scFvがFabの軽鎖由来部分（「BiTE#1」）または重鎖由来部分（「BiTE#2」）のいずれかに結合している2つのFabベースの変異体を含む。他の2つのBiTEはscFabベースの変異体であり、ここでのscFvは同様に、scFabの重鎖由来セグメント（「BiTE#3」）または軽鎖由来セグメント（「BiTE#4」）のいずれかに同様に連結されている。

【0246】

BiTE#1、BiTE#2、BiTE#3およびBiTE#4のアミノ酸配列を、表6に示す。

10

【表6】

表6. BiTE#1、BiTE#2、BiTE#3およびBiTE#4ポリペプチドの配置およびアミノ酸配列。

BiTE #1

20

30

40

50

配置:

- ・ VL-CL (RW03)-(G4S)-VH-(G4S)3-VL (CD3)    ・ VH-CH (RW03)

VL-CL (RW03)-(G4S)-VH-(G4S)3-VL のアミノ酸配列:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTIT  
SSLQPEDFATYYCQQYSHAGHLFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW  
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGSDIKL  
QQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTA  
YMQLSSTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQLTQSPAIMASPGKVT  
MTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVYPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPL  
TFGAGTKLELK (配列番号: 22)

10

VH-CH (RW03) のアミノ酸配列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLSSTSIHWVRQAPGKLEWVAYIYPYYSYTYADSVKGRFTISADTS  
KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFGSVAGFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY  
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
T (配列番号: 23)

20

## BiTE #2

配置:

- ・ VH-CH (RW03)-(G4S)-VH-(G4S)3-VL (CD3)
- ・ VL-CL (RW03)

VH-CH (RW03)-(G4S)-VH-(G4S)3-VL (CD3) のアミノ酸配列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLSSTSIHWVRQAPGKLEWVAYIYPYYSYTYADSVKGRFTISADTS  
KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFGSVAGFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY  
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKAT  
LTDDKSSSTAYMQLSSTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQLTQSPA  
IMASPGKVTMTTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVYPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATY  
YCQQWSSNPLTFGAGTKLELK (配列番号: 24)

30

VL-CL (RW03) のアミノ酸配列:

40

<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTIS</p> <p>SSLQPEDFATYYCQQYSHAGHLFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW</p> <p>KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番</p> <p>号: 25)</p> <p><b>BiTE #3</b></p> <p>配置:</p> <p>・ VL-CL-リンカー-VH-CH (RW03)-(G4S)-VH-(G4S)3-VL (CD3)</p> <p>アミノ酸配列:</p> <p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTIS</p> <p>SSLQPEDFATYYCQQYSHAGHLFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW</p> <p>KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGSSGSGSG</p> <p>STGTSSSGTGTSAGTTGTSASTSGSGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLSSTSIHWVRQAPGKGLEW</p> <p>VAYIYPYYSYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFGSVAGFDYWGQGLTVTVSSASTK</p> <p>GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ</p> <p>TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGGGGSDIKLQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQR</p> <p>PGGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYCLDYWGQGTTLT</p> <p>VSSGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGV</p> <p>PYRFGSGSGTYSYLTISMEADAATYYCQWSSNPLTFGAGTKLELK (配列番号: 26)</p> <p><b>BiTE #4</b></p> <p>配置:</p> <p>・ VH-CH-リンカー-VL-CL (RW03)-(G4S)-VH-(G4S)3-VL (CD3)</p> <p>アミノ酸配列:</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLSSTSIHWVRQAPGKGLEWVAYIYPYYSYTYADSVKGRFTISADTS</p> <p>KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFGSVAGFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY</p> <p>FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH</p> <p>TGGSSGSGSGSTGTSSSGTGTSAGTTGTSASTSGSGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWY</p> <p>QQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSHAGHLFTFGQGTKVEIKRT</p> <p>VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKAD</p> <p>YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGSDIKLQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQR</p> <p>PGGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYCLDYWGQGTTL</p> <p>TVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASG</p>	10
<p>VPYRFGSGSGTYSYLTISMEADAATYYCQWSSNPLTFGAGTKLELK (配列番号: 27)</p> <p>下線部はCDR配列を特定する。</p> <p>イタリック体は免疫グロブリン定常領域アミノ酸を表す。リンカーアミノ酸は太字で</p> <p>示されている。</p>	40

B i T E 発現ベクターで一過性にトランスフェクトされた H E K 2 9 3 細胞は、トランスフェクタントの還元型および非還元型の全細胞溶解物ウエスタンブロット分析 ( 図 1 0 B ) に示されるように、発現および精製された形態の B i T E # 1、B i T E # 2、B i T E # 3、および B i T E # 4 を容易に発現できた。

【 0 2 4 8 】

B i T E # 1、B i T E # 2、B i T E # 3 および B i T E # 4 は、細胞表面 C D 1 3 3 および C D 3 に結合する能力を有する。

精製 B i T E が細胞表面 C D 1 3 3 に特異的に結合する能力が、H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 細胞 v s . H E K 2 9 3 細胞の B i T E による染色のフローサイトメトリー分析を用いて決定された。図 1 1 A および図 1 1 B に示されるように、B i T E # 1、B i T E # 2、B i T E # 3 および B i T E # 4 はそれぞれ、0 . 0 7 3 ~ 0 . 1 1 マイクログラム / m L という低い濃度でも、H E K 2 9 3 細胞よりも有意に多く、H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 細胞に結合する。精製された B i T E を E L I S A でさらに試験して、C D 3 イブシロン / ガンマおよび C D 3 イブシロン / デルタの形態の C D 3 に結合するそれらの能力を決定した。図 1 2 に示されるように、精製された B i T E は、陽性対照抗体 ( U C H T 1、O K T 3 ) と同様に C D 3 にも結合する。これらの B i T E は、C D 1 3 3 および C D 3 の両方に結合することができる。

【 0 2 4 9 】

実施例 1 0 : ヒト C D 1 3 3 特異的キメラ抗原受容体 ( C A R ) 修飾 T 細胞は、患者由来の神経膠芽腫脳腫瘍をターゲティングする。

単鎖可変断片 ( s c F v ) を R W 0 3 ( 上記のもの ) から誘導し、第二世代の C A R を生成した。m y c タグを備えた抗 C D 1 3 3 s c F v を、ヒト C D 8 リーダー配列、C D 8 a 膜貫通ドメイン、C D 2 8、および h C D 3 ( ヒト C D 3 ゼータ ) シグナル伝達テールと共に、2 つの異なる方向、すなわち、軽鎖 - リンカー - 重鎖 ( C D 1 3 3 C A R - L H ) および重鎖 - リンカー - 軽鎖 ( C D 1 3 3 C A R - H L ) で、レンチウイルス構築物 p C C L - N G F R ベクター中にインフレームでクローン化した。

【 0 2 5 0 】

レンチウイルスを調製した後、P B M C から単離した T 細胞に、C D 1 3 3 C A R - L H および C D 1 3 3 C A R - V H 構築物を形質導入した。T 細胞操作が成功した後、フローサイトメトリーを用いて N G F R および m y c タグの発現を分析し、それぞれ抗 C D 1 3 3 の形質導入および表面発現の効率を確認した。N G F R の発現は全ての C A R T 細胞 ( 対照を含む ) において観察されたが、C A R の両方のバリエーション、すなわち、C D 1 3 3 C A R - H L および C D 1 3 3 C A R - L H において、c - m y c タグの発現が見られた。さらに、プレストブルーに基づく殺傷アッセイを使用して、C D 1 3 3 C A R が、C D 1 3 3 + G B M 脳腫瘍開始細胞株 ( B T I C ) に選択的に結合して殺傷する能力を試験した。C D 1 3 3 特異的 C A R - T 細胞は、C D 1 3 3 + G B M に対して細胞傷害性であった。C D 1 3 3 C A R - T 細胞を G B M と共培養すると、T 細胞活性化および増殖が引き起こされ、この養子 T 細胞治療戦略が実証された。

【 0 2 5 1 】

C D 1 3 3 特異的 C A R を発現するヒト T 細胞を、抗体可変領域 R W 0 3 ( 上記に開示 ) の重鎖および軽鎖可変ドメイン、c - m y c の短マーカータグ、マウス C D 8 由来のヒンジ領域、ならびにマウス C D 2 8 および C D 3 の膜貫通部分および細胞質部分を含む s c F v をクローニングすることによって操作した ( 図 1 3 )。ヒト C D 1 3 3 - C A R をレンチウイルストランスファベクター p C C L - N G F R にクローニングし、レンチウイルスとしてパッケージングした。細胞外ドメイン中の c - m y c タグを用いて C A R 発現を検証した。N G F R を、形質導入細胞の追跡および選別のための細胞表面マーカーとして使用した。

【 0 2 5 2 】

形質導入された T 細胞は、C D 4 陽性細胞および C D 8 陽性細胞からなり、両方のサブセットが C D 1 3 3 特異的 C A R を発現していた ( 図 1 4 )。形質導入が成功した後、

10

20

30

40

50

NGFR (CD271) の発現は全てのCAR T細胞 (対照を含む) において観察されたが、c-mycタグの発現増加はCD133 CAR-HLおよびCD133 CAR-LH細胞においてのみ見られた (図15)。

#### 【0253】

CD133特異的CAR-T細胞をGBM BT459と共にインキュベートし、染色し、18時間後にT細胞活性化マーカーCD69およびCD25の表面発現について分析した (図16)。CD4+ (Tヘルパー) 細胞およびCD8+ (T細胞傷害性) 細胞の両方が、活性化マーカーの表面発現レベルのアップレギュレーションを示した。上昇した発現は、CD133特異的CARの存在下でのみ検出され、CAR-T対照では検出されなかった。

10

#### 【0254】

CD133特異的CAR T細胞は、CD133<sup>high</sup> GBM細胞と共培養した後に増殖能力の増強を示した (図17A)。CD133特異的CAR T細胞は、CD133<sup>low</sup> GBM細胞には影響を及ぼさず、CD133<sup>high</sup> GBMおよび髄芽腫において腫瘍細胞を特異的に認識し、これを殺傷した (図17B)。CD133<sup>high</sup> およびCD133<sup>low</sup> GBMは、腫瘍細胞培養物中に存在するCD133陽性細胞の割合に基づいて定義された。90%を超えるCD133+細胞を含むGBM培養物をCD133<sup>high</sup> GBMと定義し、5%未満のCD133+細胞を含む培養物をCD133<sup>low</sup> GBMと定義した。

#### 【0255】

腫瘍移植マウスに、CAR-CON (対照) T細胞 (図18A) およびCAR-CD133 T細胞を、エフェクター対標的比 (E:T) = 2:1で注射した (図18B)。CAR-CD133 T細胞で頭蓋内処理したマウスの脳内に形成された腫瘍は、対照と比較して、悪性度および侵襲性が有意に低かった (ヒト細胞についてのCOX-IV染色で評価したとき) (n=4)。CAR-CD133 T細胞処理後に生成されたマウス異種移植片は、有意に少ない腫瘍量を有していた (図18C)。

20

#### 【0256】

GBM腫瘍担持マウスをCD133特異的CAR-T細胞で処置すると、マウスにおいて生存期間が延長され、脳腫瘍負荷が有意に減少した。

#### 【0257】

実施例11. 患者由来の神経膠芽腫細胞をターゲッティングするための新規CD133/CD3二重特異性T細胞エンゲージャー (BiTE) 抗体の前臨床検証

30

BiTEフォーマットは、CD19、CD20、EpCAM、EGFR、MUC-1、CEA、CD133、EphA2およびHER2/neuを含む様々な腫瘍関連抗原に対して評価されてきた (Baessler et al., 2009年に概説されている)。BiTEを調査する臨床試験には、白血病患者のためのブリナツモマブ (NCT00274742)、肺癌/結腸直腸癌/乳癌/卵巣癌患者 (NCT00635596) のためのAMG110/MT110、胃腸腺癌患者のためのAMG211/MEDI565 (NCT01284231) および前立腺癌患者のためのAMG212/BAY2010112 (NCT0173475) が含まれる。2つのGBM腫瘍細胞表面抗原CD133 (Prasad et al., 2015) およびEGFRvIII (Choi et al., 2013) に対して特異性を示すBiTEもまた、異種移植腫瘍モデルにおいて抗腫瘍形成活性を誘導することが示されている。重要なことに、静脈内に送達されたEGFRvIII特異的BiTEの前臨床評価は、よく確立されたEGFRvIII発現GBMを有するマウスにおいて、腫瘍の縮小/縮小を示し、生存を延長した。

40

#### 【0258】

実施例9に記載されているように、2つのアーム (一方のアームは腫瘍抗原 (CD133) を認識し、もう一方のアームはCD3抗原に特異的である) からなるCD133特異的BiTEまたはRW03×CD3を構築した。このBiTEは4つの異なるコンホメーションで構築され、二重結合特異性はフローサイトメトリーを用いて確認された。CD133<sup>high</sup> およびCD133<sup>low</sup> の一次GBM株を用いて、CD133+細胞へのBi

50

T E の結合を検証した。さらなる分析により、B i T E は、健常ドナー末梢血単核細胞の集団内でC D 3を発現することが知られているヒトT細胞に結合することが示された。G B Mを殺傷するようにT細胞をリダイレクトさせるB i T Eの観察では、C D 1 3 3<sup>h i g h</sup> G B Mにおいてより高い効率が観察され、B i T E 標的の特異性が確認された。

#### 【0259】

具体的には、ファージディスプレイ合成抗体ライブラリーの使用およびハイスループットDNA配列決定技術を組み合わせた新規な方法論であるC e l l e c t S e qを使用し、C D 1 3 3 特異的モノクローナル抗体「R W 0 3」を開発した(図19A)。C D 1 3 3 R W 0 3 抗体の検証後、2つのアームを有するC D 1 3 3 特異的B i T E またはR W 0 3 × C D 3 を構築した(一方のアームは腫瘍抗原(C D 1 3 3)を認識するのに対し、第二のアームはC D 3 抗原に特異的である)。このB i T E は4つの異なるコンホメーションで構築された(図19B)。

10

#### 【0260】

フローサイトメトリーを用いて、適切な抗原を発現している細胞に対するC D 1 3 3 × C D 3 B i T E の二重特異性を確認した。C D 1 3 3 × C D 3 B i T E は、市販のC D 1 3 3 (M i l t e n y i)モノクローナル抗体への結合と比較した場合、同様のキャパシティーで、C D 1 3 3 を発現するG B M腫瘍に結合する(図20A)。分析は、健常ドナー末梢血単核細胞(P B M C)の集団内でC D 3を発現することが知られているヒトT細胞への、C D 1 3 3 × C D 3 B i T E の結合を明らかにした(図20B)。

20

#### 【0261】

B i T E およびC D 1 3 3<sup>h i g h</sup> G B M B T 4 5 9 と共にインキュベートしたT細胞を染色し、活性化マーカーC D 6 9 およびC D 2 5 の表面発現について分析した(図21)。C D 4 + (Tヘルパー)細胞とC D 8 + (T細胞傷害性)細胞の両方が、活性化マーカーの表面発現レベルのアップレギュレーションを示した。この上昇した発現は、共培養におけるC D 1 3 3 B i T E の存在下でのみ検出された。

#### 【0262】

G B M細胞は、単独で播種した場合(図22A(a))またはT細胞と共に播種した場合(図22A(b))に単層を形成する；しかしながら、B i T E の添加(図22A、c およびd)はG B M細胞へのT細胞の動員をもたらし、球状クラスターを形成する。T細胞と共培養したG B M細胞へのB i T E の添加は、アラマブルー細胞傷害性アッセイ(図22B)、フローサイトメトリーに基づくL i v e - D e a d 染色(I R色素を用いる)による腫瘍細胞溶解の定量化(図22C)を介して決定されるように、G B M細胞の有意な細胞死を導く。24時間後、C D 1 3 3 B i T E の存在下および非存在下での腫瘍細胞(C F S E 標識)およびT細胞(E:T比、1:2)は、B i T E 媒介性のG B M細胞死を示す。

30

#### 【0263】

N S G (N O D s c i d ガンマ)マウスに、C D 1 3 3<sup>h i g h</sup> G B M細胞をi . c . で移植し、生着に成功したときに、B i T E を用いてまたは用いないで、未刺激のP B M C で治療した(2週間にわたって合計4用量)(図23)。C D 1 3 3 B i T E で頭蓋内治療したマウスの脳内に形成された腫瘍は、対照と比較して、悪性度および侵襲性が有意に低かった(ヒト細胞のC O X I V 染色により評価して)(n = 4)(図23、AおよびB)。B i T E 処置後に生成されたマウス異種移植片は、腫瘍負荷がより少なく(図23C)、また対照マウスに対して有意な生存上の優位性を維持した(n = 7)(図23D)。

40

#### 【0264】

<実施例10および11のための方法>

フローサイトメトリーによる特徴付け：患者由来のG B M株を解離させ、単一細胞をP B S + 2 m M のE D T A 中に再懸濁させた。細胞懸濁液を、抗C D 1 3 3、抗C D 6 9、抗C D 2 5、抗C D 8、抗C D 4 または対応するアイソタイプ対照(M i l t e n y i / B D B i o s c i e n c e s)で染色した。サンプルをM o F l o X D P 細胞ソーター(B e c k m a n C o u l t e r)にかけた。生存色素7 A A D (1:10; B e c k

50



man Coulter)を用いて死細胞を排除した。マウスIgG CompBeads (BD)を用いて補正を行った。表面マーカー発現は、アイソタイプ対照を用いて確立された分析領域に基づいて、陽性または陰性として定義された。

#### 【0265】

細胞増殖アッセイ：96ウェルプレートに、単一種の細胞を1,000細胞/200μL/ウェルの密度で、4連で蒔き、4日間インキュベートした。読み出し時点の約2時間前に、20μLのプレストブルー (Invitrogen)を各ウェルに添加した。FLUOstarオメガ蛍光556マイクロプレートリーダー (BMG LABTECH)を使用して、それぞれ535nmおよび600nmの励起波長および発光波長で蛍光を測定した。読取り値を、オメガ分析ソフトウェアを用いて分析した。

10

#### 【0266】

定量的細胞傷害性アッセイ：異なるエフェクター/標的比 (E:T)を用いたプレストブルー殺傷およびLDH細胞傷害性アッセイを実施して、CD133を発現しているGBM BTICを殺傷するためにT細胞をリダイレクトさせるBiTEの効率を決定した。

#### 【0267】

異種移植片腫瘍のインビボでのGBM頭蓋内注射およびH&E染色：動物を含む全ての実験手順は、マクマスター大学動物研究倫理委員会 (AREB)によって検討および承認された。全ての実験において、NOD-SCIDマウスを使用した。マウスはガス麻酔 (イソフルラン：5%の誘導、2.5%の維持)を用いて麻酔され、低侵襲手術後の耳の刻み目を用いて同定され、回復が監視された。頭蓋内注射は、以前に記載されたようにして実施した (1)。手短に言えば、10μLの細胞懸濁液を8~10週齢のマウスの右前頭葉に注射した。疾患の徴候についてマウスを毎週モニターし、終点に達したら、脳および肺 (ITおよびICA注射用)を採取し、切片化し、ヘマトキシリンおよびエオシン (H&E)についてパラフィン包埋した。画像をアペリオスライドスキャナ (Aperio Slide Scanner)を用いてスキャンし、ImageScope v11.1.2.760ソフトウェア (Aperio)によって分析した。

20

#### 【0268】

本出願は実施例を参照して記載されているが、特許請求の範囲はこれら実施例に記載された実施形態によって限定されるべきではなく、全体として、明細書と一致する最も広い解釈を与えられるべきことが理解されるべきである。

30

#### 【0269】

全ての刊行物、特許および特許出願は、個々の刊行物、特許または特許出願の各々において、その全体を本明細書の一部として援用する旨が具体的かつ個別に示されているのと同じ範囲で、それらの全体を本明細書に援用する。

#### 【0270】

<参考文献>

Abate-Daga and Davila, 2016. Mol Ther Oncolytics. 18:16014  
 Altschul et al., 1990. J. Mol. Biol. 215:403  
 Altschul et al., 1997. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402  
 Baeuerle et al., 2009. Current opinion in molecular therapeutics. 11:22-30  
 Bauer et al., 2008. Organs 188:127  
 Bao et al, 2006. Nature 444:756  
 Boman et al., 2008. J. Clin. Oncol. 26:2795  
 Brown et al., 2016. N Engl J Med. 375:2561  
 Caron et al., 1992. J Exp Med., 176:1191-1195  
 Choi, et al., 2013 Cancer immunology research. 1:163

40

50

- Cole et al., 1985. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96
- Collins, 2005. Cancer research 65:10946
- Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80:2026-2030
- Cruse and Lewis, 1989. Conjugate Vaccines, Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York 10
- Davies et al., 1990. Annual Rev Biochem 59:439-473
- Evangelista et al., 2006. Clin. Cancer Res. 12:5924
- Evans et al., 1987. J. Med. Chem. 30:1229
- Fauchere, 1986. J. Adv. Drug Res. 15:29
- Ferrandina et al., 2009. Expert Opin. Ther. Targets, 13:823
- Green et al., 1994. Nature Genetics 7:13-21
- Green and Sambrook, 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) 20
- Greenfield, 2013. Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)
- Gruber et al., 1994. J. Immunol. 152:5368
- Hermann et al., 2007. Cell Stem Cell, 1:313-323
- Hollinger et al., 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 30
- Horst et al., 2009. The Journal of Pathology 219:427
- Huse, et al., 1989 Science 246:1275-1281
- Kabat et al., 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.
- Karlin and Altschul, 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268 40
- Karlin and Altschul, 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877
- Kohler and Milstein, 1975. Nature 256:495
- Kostelny et al., 1992. J. Immunol 148(5):1547-1553
- Kozbor et al., 1983. Immunol Today 4:72
- Lam, 1997. Anticancer Drug Design 12:145
- Lefranc et al. 2003. Development and Comparative Immunology 27:55-77
- Liu et al., 1987a. Proc. Natl. Acad. Sci. 50

U.S.A. 84:3439  
 Liu et al., 1987b. J. Immunol. 139:3521  
 Lugli et al., 2010. British journal of cancer 103:382  
 Mak et al., 2012a. Cell. Rep. 2:951  
 Mak et al., 2012b. Cancer research 72:1929  
 Malmqvist M, 1993. Nature 361:186-87  
 Maus and June, 2016. Clin Cancer Res. 22:1875-84  
 McEnaney et al., 2014. J Am Chem Soc. 136:18034 10  
 Miki et al., 2007. Cancer research 67:3153  
 Missol-Kolka et al., 2010. The Prostate 71:254  
 Moriyama et al., 2010. Cancer 116:3357  
 Morrison, 1994. Nature 368, 812-13  
 Myers and Miller, 1988. CABIOS 4:11-17  
 O'Brien et al., 2006. Nature 445:106  
 Parashar, 2016. Aptamers in Therapeutics. J Clin Diagn Res. 10:BE01  
 Pfeiffer and Schalken, 2010. European Urology 57:246 20  
 Prasad et al., 2015. Cancer research. 75:2166-76  
 Rappa et al., 2008. Stem Cells 26:3008  
 Resetca et al., 2016. J Immunother. 39:249-59  
 Reverdatto et al., 2015. Curr Top Med Chem. 15:1082  
 Ricci-Vitiani et al., 2006. Nature: 445:111  
 Rizo and Gierasch, 1992. Ann. Rev. Biochem. 61:387 30  
 Schmohl and Vallera, 2016. Toxins (Basel) 8:165  
 Shmelkov, 2004. Blood 103:2055  
 Shopes, 1992. J. Immunol. 148:2918-2922  
 Singh et al., 2003. Cancer Res. 63:5821-8  
 Singh et al., 2004. Nature 432:396-401  
 Smith et al., 2008. British journal of cancer 99:100  
 Stevenson et al., 1989. Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 40  
 Takenobu et al., 2011. Oncogene 30:97  
 Traunecker et al., 1991. EMBO 10:3655  
 Tutt et al., 1991. J. Immunol. 147:60  
 Ulasov et al., 2011. Mol. Med. 17:103  
 Veber and Freidinger, 1985. TINS p.392  
 Venugopal et al., 2015. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. 21:5324-37 50

Vincke C, et al., 2008. J Biol. Chem. 284: 3273.

Wang and Riviere, 2016. Mol Ther Oncolytic s 3:16015

Wei et al., 2007 Cancer biology & therapy 6:763

Wilkinson D, 2000. The Scientist 14:25-28

Winter and Harris, 1993. Immunol Today 14:43

Wright et al., 1992. Crit. Reviews in Immunol. 12:125-168

Zhong et al., 2015. Tumor Biol. 36:7623

【図面】

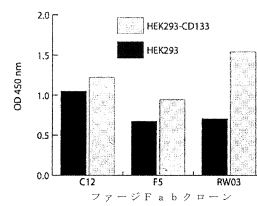
【図1A】

【図1B】

CD133	HEK293	CD133	HEK293	CD133	HEK293	CD133	HEK293	CD133	HEK293	CD133	HEK293
1.797	0.93	1.665	0.955	0.950	0.822	1.639	0.934	1.576	0.948	1.644	0.948
1.704	0.947	1.685	0.875	0.875	0.905	1.64	0.771	1.668	0.845	1.681	0.834
1.738	0.83	1.576	0.808	0.808	0.811	1.611	0.875	1.609	0.714	1.609	0.652
1.788	0.933	1.65	0.838	0.838	0.841	1.572	0.734	1.641	0.744	1.642	0.663
1.778	0.824	1.683	0.838	0.838	0.751	1.498	0.718	1.426	0.715	1.54	0.706
1.759	0.787	1.471	0.84	0.84	1.303	1.805	0.686	0.948	0.674	1.463	0.587
1.744	0.802	1.888	0.831	0.831	0.853	1.528	0.708	1.701	0.77	1.62	0.71
1.621	0.765	1.153	0.465	0.465	0.866	1.662	0.793	1.602	0.729	1.56	0.66

CD133	HEK293	CD133	HEK293	CD133	HEK293	CD133	HEK293	CD133	HEK293	CD133	HEK293
1.642	0.746	1.62	0.803	1.474	0.778	1.584	0.873	1.52	1.011	1.603	0.685
1.551	0.76	1.628	0.787	1.588	0.777	1.588	0.845	1.52	0.858	1.615	0.87
1.513	0.676	1.581	0.734	1.573	0.821	1.62	0.859	1.565	0.927	1.223	1.049
1.545	0.728	1.51	0.732	1.564	0.735	1.566	0.777	1.502	0.735	1.673	0.725
1.485	0.686	1.582	0.639	1.545	0.718	1.551	0.665	1.621	0.73	1.531	0.674
1.586	0.704	1.501	0.682	1.588	0.72	1.563	0.713	1.608	0.812	1.568	0.678
1.634	0.743	1.538	0.814	1.601	0.66	1.507	0.782	1.705	0.757	1.687	0.716
1.592	0.688	1.674	0.658	1.464	0.658	1.505	0.658	1.701	0.667	0.191	0.161



CD133	HEK293	CD133	HEK293	CD133	HEK293	CD133	HEK293	CD133	HEK293	CD133	HEK293
0.6	0.411	0.44	0.355	0.365	0.335	0.389	0.325	0.334	0.259	0.456	0.354
0.406	0.424	0.537	0.518	0.477	0.377	0.405	0.334	0.301	0.248	0.313	0.257
0.36	0.339	0.422	0.331	0.291	0.257	0.317	0.245	0.376	0.268	0.384	0.26
0.304	0.338	0.253	0.236	0.411	0.3	0.235	0.223	0.337	0.258	0.351	0.302
0.236	0.265	0.301	0.319	0.353	0.292	0.331	0.289	0.331	0.267	0.294	0.242
0.226	0.259	0.207	0.236	0.311	0.267	0.443	0.388	0.214	0.2	0.301	0.269
0.248	0.261	0.334	0.354	0.489	0.306	0.311	0.245	0.235	0.223	0.224	0.224
0.246	0.183	0.239	0.203	0.368	0.241	0.232	0.176	0.243	0.163	0.244	0.175

CD133	HEK293	CD133	HEK293	CD133	HEK293	CD133	HEK293	CD133	HEK293	CD133	HEK293
0.378	0.359	0.307	0.265	0.661	0.638	0.341	0.312	0.424	0.477	0.311	0.295
0.321	0.237	0.42	0.338	0.443	0.303	0.435	0.364	0.319	0.328	0.456	0.418
0.288	0.207	0.283	0.234	0.364	0.275	0.562	0.42	0.359	0.273	0.355	0.374
0.268	0.244	0.32	0.354	0.525	0.33	0.335	0.262	0.469	0.345	0.279	0.227
0.342	0.332	0.395	0.277	0.259	0.235	0.288	0.24	0.241	0.223	0.252	0.215
0.258	0.201	0.314	0.303	0.322	0.277	0.262	0.222	0.356	0.313	0.313	0.228
0.369	0.267	0.457	0.51	0.276	0.2	0.55	0.442	0.273	0.211	0.347	0.272
0.254	0.161	0.291	0.196	0.22	0.186	0.512	0.345	0.326	0.238	0.186	0.168

10

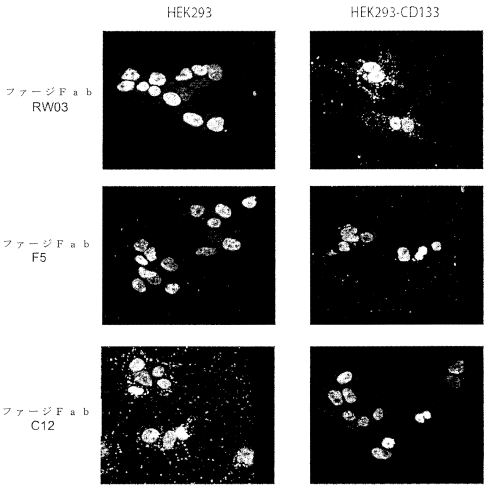
20

30

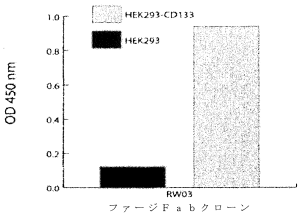
40

50

【図 2】



【図 3 A】

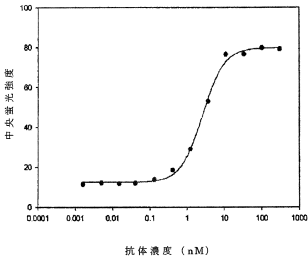


10

【図 3 B】



【図 4 A】



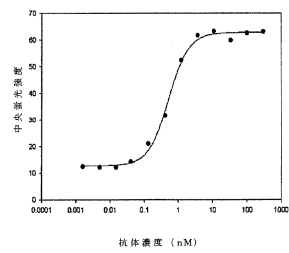
20

30

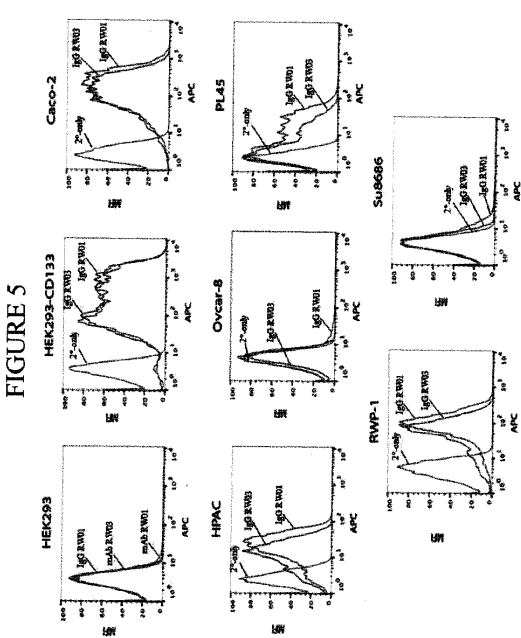
40

50

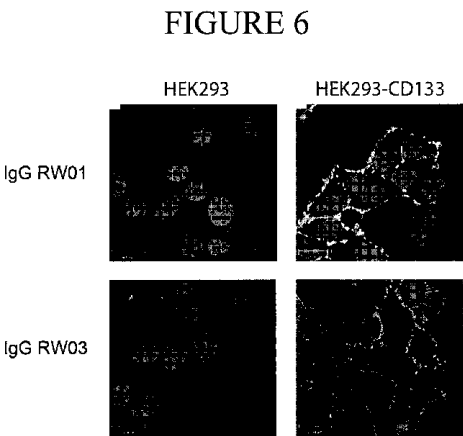
【 図 4 B 】



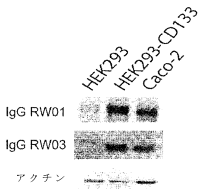
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



10

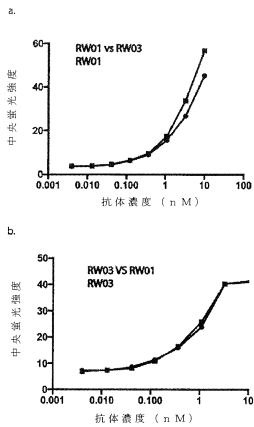
20

30

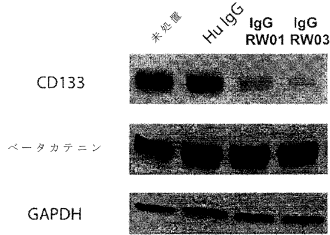
40

50

【 図 8 】

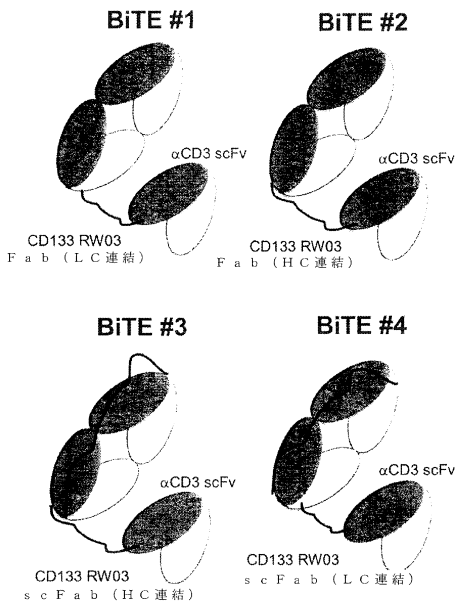


【 図 9 】

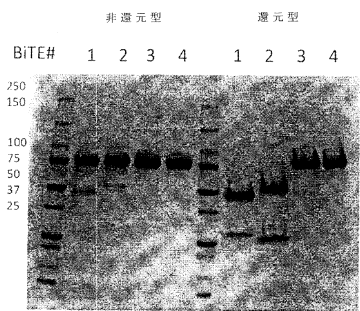


10

【 図 10 A 】



【 図 10 B 】




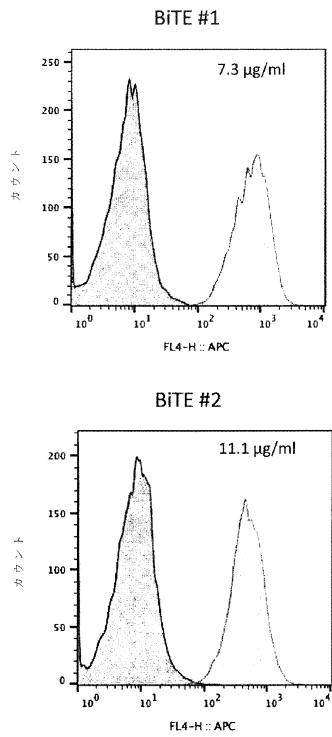
20

30

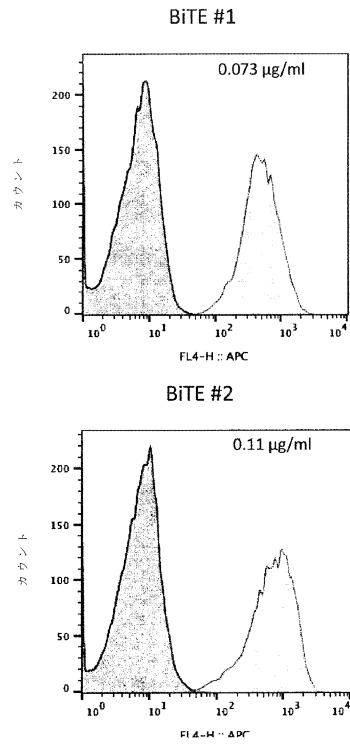
40

50

【 1 1 A】



【 1 1 A 1】



10

20


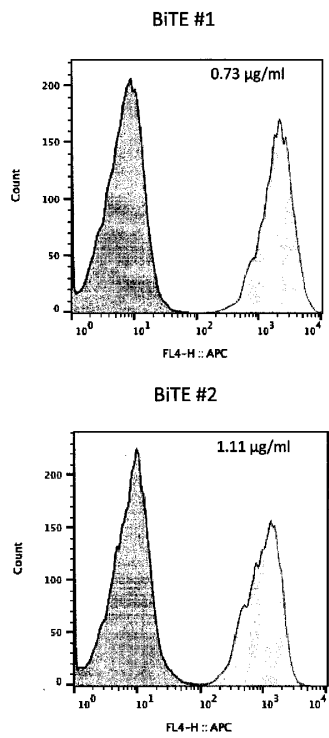
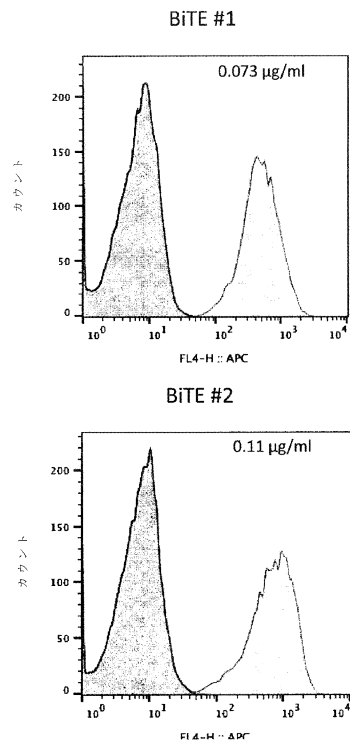
【】

FIGURE 11A con't



【 1 1 A 2】



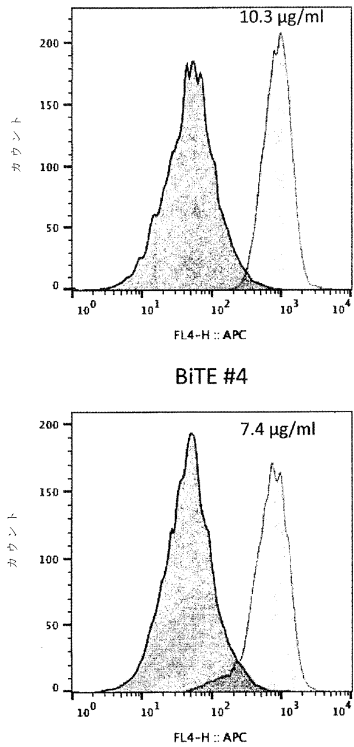
30

40

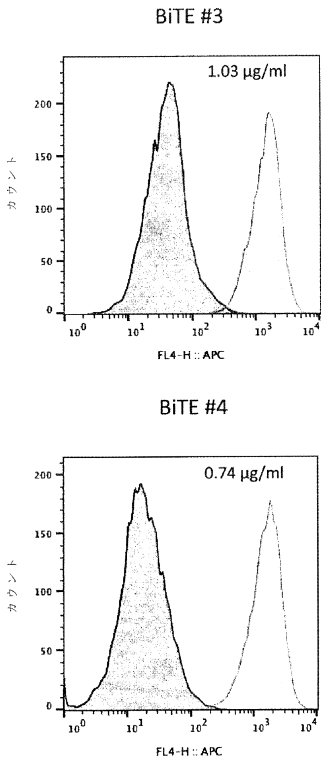
50



【図 1 1 B】



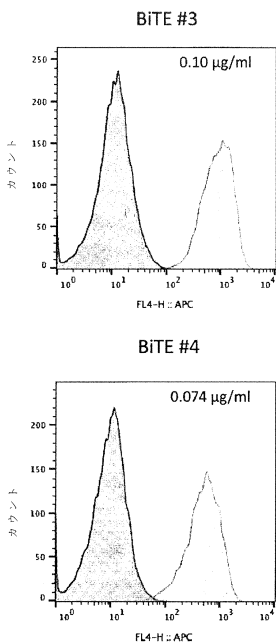
【図 1 1 B 1】



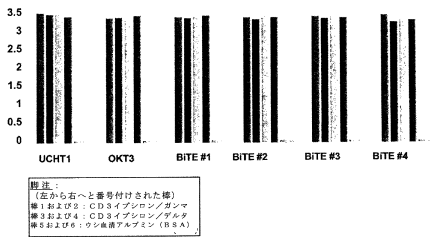
10

20

【図 1 1 B 2】



【図 1 2】

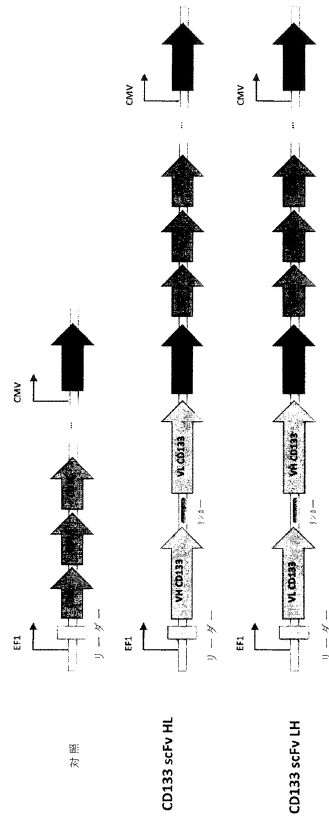


30

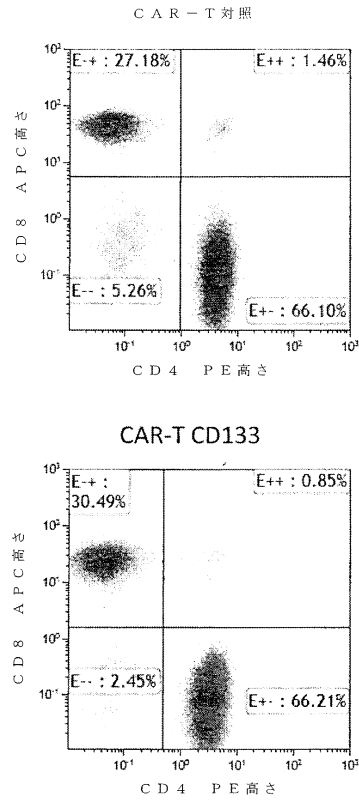
40

50

【図 13】



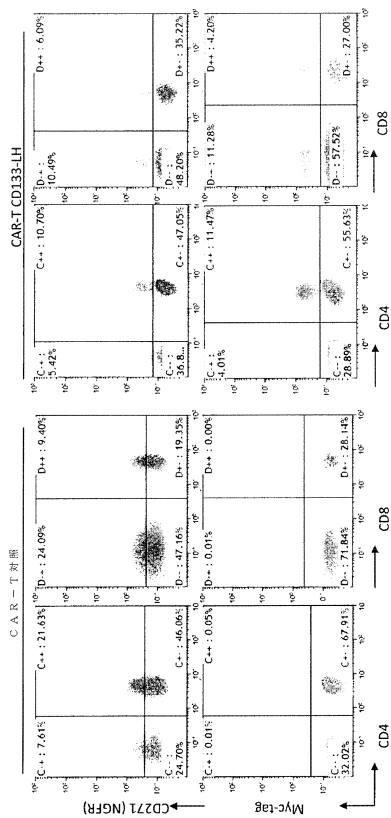
【図 14】



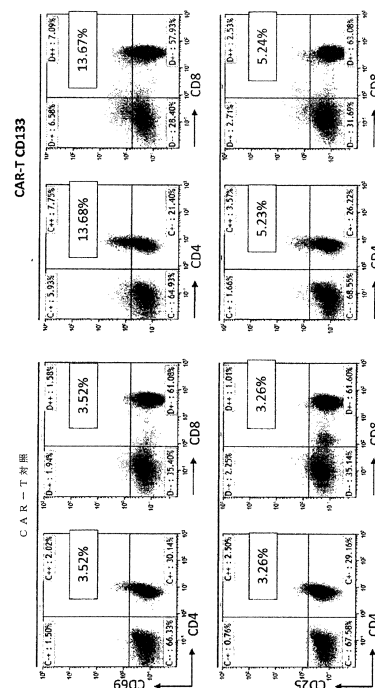
10

20

【図 15】



【図 16】



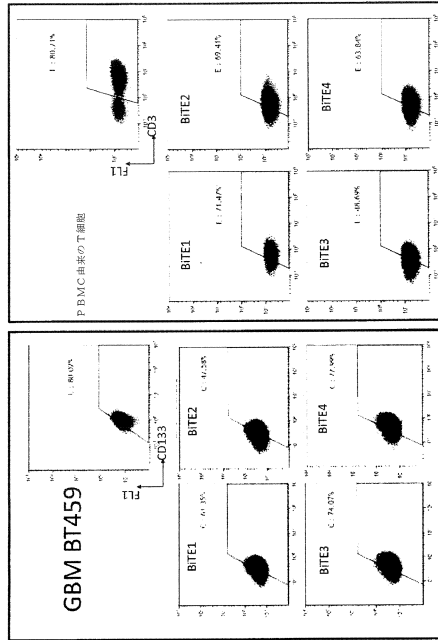
30

40

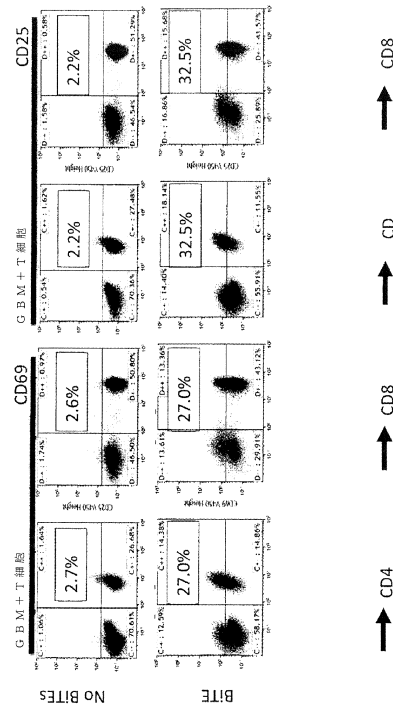
50



【図 20】



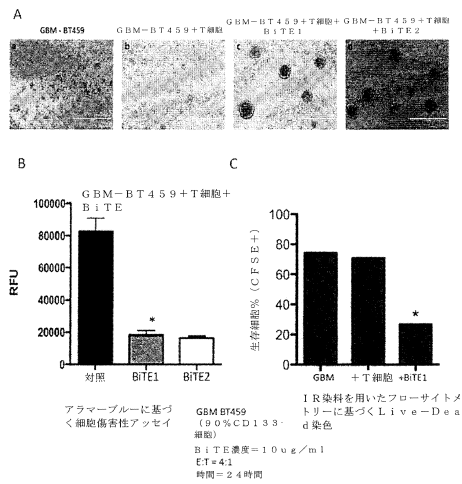
【図 21】



10

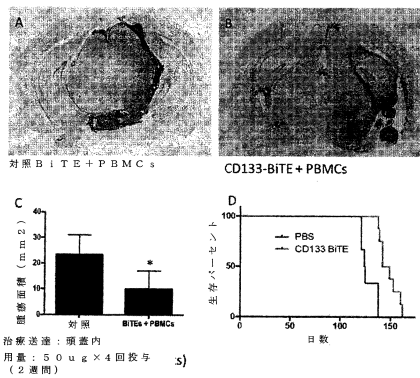
20

【図 22】



30

【図 23】



40

【配列表】

0007231158000001.app

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	39/395	E
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
		A 6 1 K	35/17	Z
		C 1 2 N	15/13	
		G 0 1 N	33/574	A
		G 0 1 N	33/574	D

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

トリー リエゾン オフィス (エムアイエルオー)

(74)代理人 100114775

弁理士 高岡 亮一

(74)代理人 100121511

弁理士 小田 直

(74)代理人 100202751

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 モファット, ジェイソン

カナダ国, オンタリオ州 エム5エム 3ピー4, トロント, 361 グリア ロード

(72)発明者 アダムス, ジャレット

カナダ国, オンタリオ州 エム4エス 1シー3, トロント, 1502-45 バリオル ストリート

(72)発明者 パン, グォーファ

カナダ国, オンタリオ州 エル6ジェイ 4アール2 オークビル, 182 トレラウン エイヴ

(72)発明者 シデュー, サックデヴ

カナダ国, オンタリオ州 エム5エス 2エム3, トロント, 135 ブルンスウィック エイヴ

(72)発明者 ウィリアムス, ラシダ

カナダ国, オンタリオ州 エル5エム 6アール9, ミシサガ, 3276 リッジレイ ヘイツ

(72)発明者 チャン, シャオユウ

カナダ国, オンタリオ州 エム5ジー 2ジー4, アpartment 1423, 633 ベイ ストリート

(72)発明者 シン, シェイラ

カナダ国, オンタリオ州 エル8エス 4ケー1, ハミルトン, 1280 メイン ストリート ダブ  
リュー, マクマスター ユニバーシティ, エムディーシーエル 5027内

(72)発明者 ベニューゴパール, チトラ

カナダ国, オンタリオ州 エル7ティー 4ケー7, バーリントン ユニット 101, 710 スプ  
リング ガーデنز ロード

(72)発明者 ヴォーパ, パーヴェス

カナダ国, オンタリオ州 エル9ピー 2エイチ4, ハミルトン, 1549 アッパー ウェリントン  
ストリート

審査官 進士 千尋

(56)参考文献 国際公開第2016/154623 (WO, A2)

Williams, R., Generation of Anti-CD133 Human Synthetic Antibodies as Tools for Exploring  
CD133 Function., Department of Molecular Genetics University of Toronto, 2013年11月  
12日, [検索日:2022-12-28] URL:https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/433  
33/11/Williams\_Rashida\_201311\_MSc\_thesis.pdf

Vora, P. et al., The efficacy of CD133 BiTEs and CAR-T cells in preclinical model of recur  
rent glioblastoma., CANCER IMMUNOL RES, vol.4, no.11, 2016年09月, Abstract B079, IS  
SN:2326-6074

Vora, P. et al. , Preclinical validation of a novel CD133/CD3 bispecific T-cell engager(BiTE) antibody to target patient-derived glioblastoma cells. , CANCER RES , vol.76, no. 14 , 2016 年04月 , Abstract 1481, ISSN:1538-7445

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K 1 6 / 3 0

C 1 2 N 5 / 0 7 8 3

C 0 7 K 1 6 / 4 6

C 0 7 K 1 9 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 K 3 5 / 1 7

C 1 2 N 1 5 / 1 3

G 0 1 N 3 3 / 5 7 4

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d