

(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

C 0 7 K	16/30 (2006.01)	F I	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 413
 , 100 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 ピー 0
 エー1, ハミルトン, 175 ロングウ
 ッド ロード サウス, エムアイピー ス
 イート 305, マクマスター インダス
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 CD 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CD 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、CD 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(CDR)1、配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3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CDR1、配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、および配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、を含むか、または

ii) 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(CDR)1、配列番号13のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3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CDR1、配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、および配列番号17のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、を含む、CD 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

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。

20

【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。

【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発現細胞をターゲッティングするため、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。

40

【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。

【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 C D 1 3 3 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 C D 1 3 3 を発現する髄芽腫である、C D 1 3 3 結合剤。

【請求項 15】

前記二重特異性抗体が、

- (a) 配列番号 2 2 および配列番号 2 3、
- (b) 配列番号 2 4 および配列番号 2 5、
- (c) 配列番号 2 6、または
- (d) 配列番号 2 7、

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 1 4 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 C D 1 3 3 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 (C A R) 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 C D 1 3 3 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 C D 1 3 3 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】

【0 0 0 1】

<関連出願の相互参照>

本出願は、2016年10月19日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 4 1 0 , 1 6 2 号および2017年3月16日に出願された米国仮出願第 6 2 / 4 7 2 , 2 0 9 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。 20

【0 0 0 2】

本開示は、一般に C D 1 3 3 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】

【0 0 0 3】

C D 1 3 3 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、肺臓癌、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 (B o m a n e t a l . , 2 0 0 8 、 F e r r a n d i n a e t a l . , 2 0 0 9) 。 C D 1 3 3 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。 C D 1 3 3 の過剰発現、病理組織学的因素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 (Z h o n g e t a l . , 2 0 1 5) 。 C D 1 3 3 は膜結合型ペニタスパ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 (B a u e r e t a l . , 2 0 0 8 、 U l a s o v e t a l . , 2 0 1 1 、 E v a n g e l i s t a e t a l . , 2 0 0 6) 、 W N T 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 (R a p p a e t a l . , 2 0 0 8 、 M a k e t a l . , 2 0 1 2 a 、 T a k e n o b u e t a l . , 2 0 1 1) 。転移性黒色腫細胞株における C D 1 3 3 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 (R a p p a e t a l . , 2 0 0 8) 。 30

【0 0 0 4】

神経膠芽腫 (G B M) 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、G B M 患者の予後は有意に改善し得ていない。多数の研究が、G B M における化学耐性および放射線耐性の推進因子として、C D 3 3 + 脳腫瘍始原細胞 (B T I C) を示唆している。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 40

るための有効な戦略となり得ることも示されている。C D 1 3 3 + である髓芽腫細胞もまた、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 C D 1 3 3 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 Vallera, 2016 に概説されている)。ヒト患者では、抗 I L - 1 3 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 C D 1 3 3 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 C D 1 3 3 および変性ヒト C D 1 3 3 の両方に特異的に結合できる新規な抗体可変領域 R W 0 1 および R W 0 3 を記載しており、またこれら C D 1 3 3 結合性可変領域を含む結合剤（例えば抗体、F a b、s c F v、F a b 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 (B i T E) および / または s c F a b ベースの二重特異性抗体 / (B i T E) ）による特異的 C D 1 3 3 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 C D 1 3 3 に特異的に結合することが示された。そのような C D 1 3 3 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 C D 1 3 3 を特異的に検出し、例えば細胞溶解物中の変性 C D 1 3 3 に特異的に結合して検出し、免疫蛍光分析により、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することができ、また C D 1 3 3 陽性 (C D 1 3 3 +) 癌細胞中の C D 1 3 3 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 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 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 と競合しないことが示された。

【0007】

本発明者らはまた、C D 1 3 3 特異的 C A R - T 細胞が、インビボにおいて C D 1 3 3 陽性神経膠芽腫 (G B M) の細胞死を特異的に誘導し、また G B M 腫瘍の退縮を誘導することを示した。本発明者らはまた、C D 1 3 3 特異的 B i T E が、T 細胞を C D 1 3 3 + 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した。さらに、C D 1 3 3 特異的 B i T E 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 C D 1 3 3 に特異的に結合し、また変性 C D 1 3 3 に特異的に結合する、C D 1 3 3 結合剤を提供する。

【0009】

一実施形態において、C D 1 3 3 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 C D 1 3 3 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、C D 1 3 3 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 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。

【0011】

さらなる実施形態において、C D 1 3 3 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 1 0 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 1 1 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、3 9 位に M e t 残基、5 5 位に S e r 残基、および 6 6 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 1 0 のアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2 、および配列番号 1 1 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、3 9 位に M e t 残基、5 5 位に S e r 残基、および 6 6 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 7 0 % 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 7 0 % 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 7 0 % 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 7 0 % 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 1 2 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 1 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2 、および配列番号 1 4 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 1 5 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1 、配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2 、および配列番号 1 7 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、3 9 位に I l e 残基、5 5 位に T y r 残基、および 6 6 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 1 2 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 1 3 のアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R 2 、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 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 、配列番号 1 6 のアミノ酸配列からなる重鎖 C D R 2 、および配列番号 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、 3 9 位に I l e 残基、 5 5 位に T y r 残基、および 6 6 位に T y r 残基を含む。

【 0 0 2 3 】

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 7 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。 10

【 0 0 2 4 】

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。

【 0 0 2 5 】

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 7 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 6 】

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。

【 0 0 2 7 】

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 7 0 % 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 7 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。 20

【 0 0 2 8 】

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。

【 0 0 2 9 】

別の実施形態において、 C D 1 3 3 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 F a b は C D 1 3 3 に結合する) 、およびファージ - s c F v (ここで s c F v は C D 1 3 3 に結合する) からなる群から選択される。 30

【 0 0 3 0 】

別の実施形態において、 C D 1 3 3 結合剤は、ヒト C D 1 3 3 に結合する抗体を含む。

【 0 0 3 1 】

別の実施形態において、 C D 1 3 3 結合剤は、ヒト C D 1 3 3 に結合する抗体断片を含む。

【 0 0 3 2 】

別の実施形態において、 C D 1 3 3 結合剤は、ヒト C D 1 3 3 に結合する単鎖 F v (s c F v) を含む。

【 0 0 3 3 】

別の実施形態において、 C D 1 3 3 結合剤は、ヒト C D 1 3 3 に結合する二重特異性抗体を含む。 40

【 0 0 3 4 】

別の実施形態において、 C D 1 3 3 結合剤はファージ F a b を含み、 F a b はヒト C D 1 3 3 に結合する。

【 0 0 3 5 】

別の実施形態において、 C D 1 3 3 結合剤は、ヒト C D 1 3 3 と結合するファージ s c F v を含み、 s c F v はヒト C D 1 3 3 に結合する。

【 0 0 3 6 】

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、CD133結合剤は、(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、または(c) CD133結合性およびCD3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、CD133結合剤は、(a) 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(b) 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。

【 0 0 3 9 】

別の実施形態において、CD133結合剤は、(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。

10

【 0 0 4 0 】

一実施形態において、CD133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、CD133結合剤はIgG分子である。

【 0 0 4 2 】

さらなる実施形態において、IgG分子はIgG1分子である。

20

【 0 0 4 3 】

別の実施形態において、CD133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CD133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、CD133発現細胞をターゲッティングするための、上記で述べたCD133結合剤、免疫複合体または医薬組成物の使用を提供する。

30

【 0 0 4 7 】

本開示はまた、CD133発現細胞に結合するための、上記で述べたCD133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、CD133発現細胞を検出し、かつ/または細胞のCD133発現レベルを定量化するための、上記で述べたCD133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、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、本明細書に記載のCD133結合剤または医薬組成物の使用を提供する。

40

【 0 0 5 0 】

一実施形態において、CD133結合剤の使用は、細胞内において、細胞表面発現型CD133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、CD133結合剤の使用は、細胞内において、CD133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、CD133発現細胞の検出および/または細胞性CD133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(ELISA)、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 】

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。

【 0 0 5 3 】

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。

【 0 0 5 4 】

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。

【 0 0 5 5 】

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。

【 0 0 5 6 】

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。

【 0 0 5 7 】

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。

【 0 0 5 8 】

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。

【 0 0 5 9 】

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。

【 0 0 6 0 】

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。

【 0 0 6 1 】

一実施形態において、二重特異性抗体は、
 (a) 配列番号2 2 および配列番号2 3、
 (b) 配列番号2 4 および配列番号2 5、
 (c) 配列番号2 6、
 (d) 配列番号2 7、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。

【 0 0 6 2 】

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

C A R) を発現する T 細胞の使用を提供する。

【 0 0 6 3 】

本開示はさらに、腫瘍細胞、任意選択で C D 1 3 3 発現腫瘍細胞または C D 1 3 3 を検出可能に発現する腫瘍細胞を治療するための、本明細書に記載のキメラ抗原受容体 (C A R) を発現する T 細胞の使用を提供する。

【 0 0 6 4 】

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。

10

【 0 0 6 5 】

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 】

【 0 0 6 6 】

【 図 1 A 】 細胞表面 C D 1 3 3 への結合について、ライプラリー F またはライプラリー G からそれぞれ選択されたファージ F a b クローンおよびファージ s c F v クローンの、 C e l l e c t s e q 法を用いた C D 1 3 3 結合についての細胞ベースでの E L I S A の結果を示す表である。細胞を選択した後、各ライプ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ーティングした。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 E L I S A 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、 O D 4 5 0 n m を検出して記録した。このアッセイにより、 C D 1 3 3 過剰発現 H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 細胞 (「 C D 1 3 3 」 欄見出しの下) v s . 親 H E K 2 9 3 細胞 (「 H E K 2 9 3 」 欄見出しの下) に対するクローンの結合が測定された。

20

【 図 1 B 】 C e l l e c t s e q 法を用いた細胞表面 C D 1 3 3 への結合に関して、ライプラリー F から選択され、かつ D N A 配列決定後に H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 細胞に対して少なくとも 1 . 5 倍優先的に結合することが見出された 7 7 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 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、 C D 1 3 3 結合に関する細胞ベースでの E L I S A を示すヒストグラムである。

【 図 2 】 ファージ F a b クローン R W 0 3 が C D 1 3 3 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。ライプラリー F の細胞ベースの E L I S A 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 F a b クローン C 1 2 および F 5 が H E K 2 9 3 細胞に非特異的に結合するのに対して、 R W 0 3 クローンは H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 細胞に特異的に結合し、 H E K 2 9 3 細胞へのバックグラウンド結合はほとんどない。

30

【 図 3 A - 3 B 】 それぞれ、精製 F a b R W 0 3 が、 H E K 2 9 3 細胞とは対照的に、 H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 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 F a b R W 0 3 が、細胞ベースの E L I S A (図 3 A) および免疫蛍光 (I F) アッセイ (図 3 B) によって結合について試験された。

40

【 図 4 A - 4 B 】 結合親和性 (E C 5 0) を推定するための、 H E K 2 9 3 - C D 1 3 3 細胞に対する I g G R W 0 1 および I g G R W 0 3 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 I g G R W 0 1 または I g G R W 0 3 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。 S i g m a P l o t グラフ作成ソフトウェアを使用して、 I g G R W 0 1 の E C 5 0 は 2 . 5 n M と計算され (図 4 A) 、 I g G R W 0 3 の E C 5 0 は 0 . 5 n M と計算された (図 4 B) 。

【 図 5 】 フローサイトメトリー分析に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、肺臓癌細胞および結腸直腸癌細胞における細胞表面 C D 1 3 3 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。

50

【図6】免疫蛍光分析によって示されるのと同様に、IgG RW01およびIgG RW03を用いて細胞CD133を特異的に結合し、検出し、細胞内の位置を特定ができますことを示す一組の蛍光顕微鏡写真である。HEK293-CD133およびHEK293細胞への結合について、抗体類を試験した。

【図7】ウエスタンプロット分析によって示されるように、IgG RW01およびIgG RW03を用いて、結腸直腸癌細胞中の変性CD133/細胞性CD133を検出できることを示す一組のウエスタンプロット分析の写真である。HEK293、HEK293-CD133およびCaco-2細胞の全細胞溶解物を、IgG RW01およびIgG RW03でプロープし、抗ヒトHRP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RW01を含むFabおよび抗体可変領域RW03を含むFabが、CD133への結合について、それぞれIgG RW03およびIgG RW01と競合しないことを示す。競合フローサイトメトリー実験において、RW01およびRW03を、CD133への結合について試験した。(a)では、Fab RW03(四角)の存在下に、IgG RW01(丸)またはIgG RW01の段階希釈液と共に、細胞をインキュベートした。同様に、(b)では、Fab RW01(四角)の存在下に、IgG RW03(丸)またはIgG RW03の段階的希釈液と共に、細胞をインキュベートした。

【図9】IgG RW01またはIgG RW03による処理が、Caco-2結腸直腸癌細胞におけるCD133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、一組のウエスタンプロット分析の写真である。Caco-2細胞を指示された抗体と共に37で24時間インキュベーションし、全細胞溶解物を調製し、AC133抗CD133抗体でプローピングした。抗ヒトIgG(H+L)抗体を陰性抗体対照として使用し、またGAPDHをローディング対照として使用した。
20

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

【図10B】BiTE#1、BiTE#2、BiTE#3およびBiTE#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HEK293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プロット分析の写真である。

【図11A-11B】BiTE#1(図10A)、BiTE#2(図10A)、BiTE#3(図10B)およびBiTE#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、0.073~0.11マイクログラム/mLという低い濃度でさえも、親HEK293細胞よりも有意に多くHEK293-CD133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BiTE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HEK293-CD133細胞への結合を表し、最も左側のピークは親のHEK293細胞への結合を表す。
30

【図12】BiTE#1、BiTE#2、BiTE#3およびBiTE#4の各々が、CD3イプシロン/ガンマおよびCD3イプシロン/デルタの形態でCD3に結合することを示すELISAの結果のヒストグラムである。抗CD3抗体のUCHT1およびOKT3を陽性抗体対照として使用し、BSAを抗体なしの対照として使用した。

【図13】CD133特異的キメラ抗原受容体(CAR)を生成させるための構築物を示す。
40

【図14】CAR-T細胞の特徴付けを示す。

【図15】CD133特異的CAR-T細胞の検証を示す。

【図16】CD133特異的CAR-T細胞が、CD133+ヒトGBM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CD133特異的CAR-T細胞が増殖能力を増強して、CD133陽性のGBM細胞死およびCD133陽性の髄芽腫細胞死を特異的に誘導することを示す。CAR-T細胞を、CD133^{high}およびCD133^{low}GBM細胞、ならびにCD133^{high}髄芽腫細胞と共に培養した。フローサイトメトリーは、IR染料を用いた生死染色に基づいていた。
50

【図18A - 18C】CD133特異的T細胞が、インビボにおいてGBM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19A - 19B】CD133 × CD3 BiTEの発生を示す。

【図20A - 20B】CD133 × CD3 BiTEが、CD133 + GBM腫瘍細胞およびCD3 + Tリンパ球に結合することを示す。

【図21】CD133特異的BiTEがT細胞を活性化することを示す。

【図22A - 22C】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す。

【図23A - 23D】CD133 × CD3 BiTE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】

【0067】

他に定義しない限り、本開示に関して使用される科学的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）。

10

【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CD133および変性ヒトCD133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CD133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、scFvがCD133結合性抗体可変領域RW01を含むCD133結合性ファージscFvクローンRW01、およびFabがCD133結合性抗体可変領域RW03を含むCD133結合性ファージFabクローンRW03を提供した。最初に酵素結合免疫吸着検定法（ELISA、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、CD133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から選択された。本発明者らはさらに、CD133結合性抗体可変領域RW01が、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を含み、軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3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RW01が配列番号3のGlu1~Thr120セグメントに対応する抗体重鎖可変ドメインを含み、重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3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Met、SerおよびThr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、CD133結合性抗体可変領域RW03が、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を含み、軽鎖CDR1、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、膜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 ）ウエスタンプ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でき（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ッ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 h i g h 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 × 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ニン - 1 とも呼ばれる。

10

20

30

40

50

【0076】

< C D - 1 3 3 結合性抗原 >

したがって、本開示は、細胞表面発現型 / 天然 C D 1 3 3 に特異的に結合し、かつ変性 C D 1 3 3 に特異的に結合する C D 1 3 3 結合剤を提供する。

【0077】

本明細書で使用するとき、「細胞表面発現型 / 天然 C D 1 3 3 に特異的に結合する」 C D 1 3 3 結合剤は、C D 1 3 3 発現細胞に結合する物質である。C D 1 3 3 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 C D 1 3 3 に特異的に結合する」 C D 1 3 3 結合剤は、C D 1 3 3 を発現する C D 1 3 3 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。本明細書で使用するとき、「変性 C D 1 3 3 に特異的に結合する」 C D 1 3 3 結合剤は、(例えば実施例 6 に記載したウエスタンプ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、C D 1 3 3 発現細胞の変性全細胞タンパク質のサンプル中の C D 1 3 3 に対して結合する物質である。「 C D 1 3 3 と免疫反応する」、または「 C D 1 3 3 に対して向けられる」、または「抗 C D 1 3 3 」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用される。

10

【0078】

一実施形態において、C D 1 3 3 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 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 I g G R W 0 3)により結合される C D 1 3 3 エピトープに特異的に結合する。一実施形態において、C D 1 3 3 エピトープはヒト C D 1 3 3 エピトープである。

20

【0079】

本明細書で使用するとき、「エピトープ」の用語は、抗体 I g G R W 0 1 および / または抗体 I g G R W 0 3 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 C D 1 3 3 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 C D 1 3 3 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 C D 1 3 3 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とき、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 倍抗体断片(例えば F (a b ')₂) 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 倍抗体断片を指す。

【0081】

C D 1 3 3 結合剤の実施形態には、制限なしに、任意のタイプの C D 1 3 3 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、C D 1 3 3 結合剤はポリペプチドである。他の実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は、C D 1 3 3 結合性核酸または C D 1 3 3 結合性有機化合物などの非ポリペプチド物質である。C D 1 3 3 結合剤は単量体または多量体であり得る。C D 1 3 3 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、C D 1 3 3 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 】

一実施形態において、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25 kDa)および1本の重(「H」)鎖(約50~70 kDa)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100~110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を指す。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「FR」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、「FR」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「CDR」と呼ばれる。本明細書に開示される全てのCDRおよびフレームワーク領域(FR)、本明細書に開示されるCDRおよびFRのアミノ酸配列、ならびに本明細書に開示されるCDRをコードしたまはFRをコードする核酸配列は、IMGT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(Lefranc et al., 2003)。そのような定義のために当技術分野で代替的に使用されている別のシステムは、Kabatナンバリングである(Kabat et al., 1991)。

【 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示すファージディスプレイライブラリー、例えばファージF ab 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sc 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CDR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 】

一実施形態において、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。

10

20

30

40

50

【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')₂、dsFv、dsFv'、sc(Fv)₂、ds-scFv、(dsFv)₂、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)、單ードメイン抗体(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Fab₂、三重特異性Fab₂、三重特異性トリアボディ、三重特異性Fab₃)、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、Fab₃、2価VHH、5価VHH(ペントボディ)、(scFv-SA)₄、および[sc(Fv)₂]₂をさらに含むが、これらに限定されない。
10
20

【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; 例えは、Lipiet al., 2016参照)、ペプチドアプタマー(例えは、Parashar, 2016参照)、および化学的に合成された薬剤(例えは、合成抗体模倣物; 例えは、McEnaney et al., 2014参照)を含む。
30

【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(例えは、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、同等の生物学的效果を生じ得る。一般に、ペプチドミ模倣薬は、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、-CH₂NH-、-CH₂S-、-CH₂-CH₂-、-CH=CH-(シスおよびトランス)、-COCH₂-、CH(OH)CH₂-、および-CH₂SO-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(例えは、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、例えは、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(例えは、Rizzo and Gierasch, 1940
50

9 2 参照)で生成され得る。

【 0 0 9 5 】

一実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は抗体可変領域R W 0 1 を含み、これは(a)配列番号 2 の A s p 1 ~ L y s 1 0 6 セグメントに対応する抗体軽鎖可変ドメイン(配列番号 2 8)であって、軽鎖 C D R 1 、軽鎖 C D R 2 および軽鎖 C D 3 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 G 1 u 1 ~ T h r 1 2 0 セグメントに対応する抗体重鎖可変ドメイン(配列番号 2 9)であって、重鎖 C D R 1 、重鎖 C D R 2 および重鎖 C D R 3 のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号 9 、配列番号 1 0 、および配列番号 1 1 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)残基が M e t 、 S e r 、および T y r 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

【 0 0 9 6 】

一実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は抗体可変領域R W 0 3 を含み、これは(a)配列番号 4 の A s p 1 ~ L y s 1 0 9 セグメントに対応する抗体軽鎖可変ドメイン(配列番号 3 0)であって、軽鎖 C D R 1 、軽鎖 C D R 2 および軽鎖 C D 3 のアミノ酸配列が、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 G 1 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(配列番号 3 1)であって、重鎖 C D R 1 、重鎖 C D R 2 および重鎖 C D R 3 のアミノ酸配列が、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)残基が I l e 、 T y r 、および T y r 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

【 0 0 9 7 】

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、C D 1 3 3 結合剤 I g G R W 0 1 である(以下の実施例 2 を参照のこと)。

【 0 0 9 8 】

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、C D 1 3 3 結合剤 I g G R W 0 3 である(以下の実施例 2 参照)。
30

【 0 0 9 9 】

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 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖 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 / もしくは配列番号 8 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

(i i) 3 9 位に M e t 残基および配列番号 9 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1 、 5 5 位の S e r 残基、 6 6 位の T y r 残基および配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2 、および / または配列番号 1 1 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が、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。
40

【 0 1 0 0 】

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 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 9 、配列番号 1 0 および配列番号 1 1 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 M e t 残基、 S e r 残基および T y r 残基を含む。

【 0 1 0 1 】

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產生され得る。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產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。

【 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、W i l k i n s o n , 2 0 0 0 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。

【 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ます。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。

【 0 1 1 6 】

本明細書で使用するとき、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 】

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ッティングし、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

10

20

30

40

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Koste1ny 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そのような二重特異性抗体/BiTEは、癌細胞のような細胞へのT細胞のターゲッ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CD133Fabおよび抗CD3scFvを含む。任意選択で、抗CD133Fabの軽鎖または重鎖のいずれかが、抗CD3scFv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CD3scFvを含む。任意選択で、抗CD133Fabまたは抗CD133scFabの軽鎖または重鎖のいずれかが、抗CD3scFvの重鎖に結合する。一実施形態において、抗CD3scFv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 C A R シグナル伝達ドメインに融合されている。C A R は、単量体ポリペプチド（例えば抗 C D 1 3 3 s c F v ベースの）または多量体ポリペプチド（例えば抗 C D 1 3 3 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 C A R の発現は、表面 C D 1 3 3 を発現する細胞への免疫細胞のターゲッティングを可能にし、細胞表面に発現された C D 1 3 3 への C A R 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。

【 0 1 2 7 】

一実施形態において、C A R シグナル伝達ドメインは、T 細胞共受容体 C D 3 のシグナル伝達ドメイン（例えば C D 3 ゼータまたは C D 3 ガンマ）を含む。別の実施形態において、C A R は、1 以上の T 細胞共刺激分子（例えば、C D 2 8、4 - 1 B B、C D 1 3 7、O X 4 0、I C O S および / または C D 2 7）のシグナル伝達ドメインに融合した T 細胞共受容体 C D 3 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、C A R シグナル伝達ドメインは、C D 3 ゼータ、ならびに C D 8 および C D 2 8 の一部を含む。別の実施形態において、C A R シグナル伝達ドメインは、ヒト C D 8 リーダー配列および C D 8 a 膜貫通ドメインを含む。一実施形態において、C A R は、C D 2 8 シグナル伝達ドメインおよび末端 C D 3 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、C A R シグナル伝達ドメインは、C D 3 ゼータシグナル伝達ドメイン、4 - 1 B B シグナル伝達ドメイン、および C D 2 8 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、C A R 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ッティングするための適切な C A R の構築およびそれらの使用は、当該技術分野は一般に「C A R T 細胞療法」と称されるものであり、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 and Riviere, 2016 参照）。

【 0 1 2 8 】

さらなる実施形態において、C D 1 3 3 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 F a b または s c F v は C D 1 3 3 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 C A R を発現する T 細胞を提供する。

【 0 1 2 9 】

C D 1 3 3 発現細胞への結合 / ターゲッ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 C D 1 3 3 発現細胞中の C D 1 3 3 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 F c 領域を含む場合、システイン残基を F c 領域の C O O H 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（A D C C）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 F c 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 A D C C 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 C D 1 3 3 結合剤の機能的変異体も含まれる。本明細書で使用される「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。

【 0 1 3 0 】

本明細書で使用される「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、IgG RW01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RW01のCDR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RW01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IgG RW03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RW03のCDR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RW03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。IgG RW01の軽鎖および重鎖をコードするスクレオチド配列（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RW01の軽鎖および重鎖可変ドメインをコードするスクレオチド配列（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RW01のCDRのアミノ酸配列をコードするスクレオチド配列（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RW01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スクレオチド配列（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、IgG RW03の軽鎖および重鎖をコードするスクレオチド配列（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RW03の軽鎖および重鎖可変ドメインをコードするスクレオチド配列（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RW03のCDRのアミノ酸配列をコードするスクレオチド配列（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RW03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コードするスクレオチド配列（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ス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ス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）ス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

10

20

30

40

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、ストリングエ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グエ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、 $5 \times$ 塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム (SSC) / $5 \times$ 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、 $0.2 \times$ SSC / 0.1 % SDS の 60 での洗浄である。中程度にストリングエントなハイブリダイゼーション条件には、42において $3 \times$ 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グエンサ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。

10

20

30

40

50

【0139】

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、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、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-last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。

【0140】

<核酸およびベクター>

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。

【0141】

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。

【0142】

10

20

30

40

50

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。

10

【 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。

20

【 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（リポソーム、裸の D N A、アジュvant 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。

30

【 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。

40

【 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

50

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产生のために、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。

10

【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。

20

【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。

30

【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、Malinqvist, 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）。

40

【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。

50

本明細書に開示される1価CD133結合剤（すなわち、単一のCD133結合性抗体可変領域、例えばscFvまたはFabのような、単一のCD133結合部位を有するもの）は、2価形態のCD133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、CD133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価物質が单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(ab')₂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、CD133結合剤は、1マイクロモル、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM、90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、20nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM～0.3nM、0.2nM、または100pM～約1pMの解離定数（ K_D ）でCD133に結合する。

10

【0156】

さらなる様々な実施形態において、CD133結合剤は、1マイクロモル～100nM、100nM～10nM、10nM～1nM、1nM～0.1nM、または0.1nM～10pMの解離定数（ K_D ）でCD133に結合する。

20

【0157】

さらなる様々な実施形態において、CD133結合剤は、3nM～2nM、2.6nM～2.4nM、2.5nM、約2.5nM、2nM～1nM、0.6nM～0.4nM、0.5nM、または約0.5nMの解離定数（ K_D ）でCD133に結合する。

【0158】

本明細書に開示されているように、2価CD133結合剤、例えば本開示のCD133結合抗体または2価形態の1価CD133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、HEK293-CD133細胞のようなCD133過剰発現細胞の集団への結合を飽和させるのに必要なCD133結合剤の最大半量の濃度（「EC50」）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、CD133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。CD133結合剤の細胞表面発現CD133への結合についての解離定数（ K_D ）を決定する別の方には、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CD133結合剤に結合されたCD133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（SPR；Biacore）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得る。

30

【0159】

上記のように、本開示は、抗体IgG RW01により結合されたCD133エピトープおよび/または抗体IgG RW03により結合されたCD133エピトープに特異的に結合するCD133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IgG RW01により結合されたCD133エピトープおよび/または抗体IgG RW03により結合されたCD133エピトープに特異的に結合するCD133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IgG RW01により結合されるCD133エピトープおよび/または抗体IgG RW03により結合され

50

る C D 1 3 3 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 I g G R W 0 1 および / または抗体 I g G R W 0 3 のヒト C D 1 3 3 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 I g G R W 0 1 および / または抗体 I g G R W 0 3 によるヒト C D 1 3 3 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 I g G R W 0 1 および / または抗体 I g G R W 0 3 と競合する場合、当該結合剤は抗体 I g G R W 0 1 および / または抗体 I g G R W 0 3 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 (E L I S A) 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。

【 0 1 6 1 】

一実施形態において、抗体 I g G R W 0 1 に結合された 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 結合剤は、C D 1 3 3 発現細胞の表面への結合について、抗体 I g G R W 0 1 および / または抗体 I g G R W 0 3 と競合する C D 1 3 3 結合剤である。一実施形態において、C D 1 3 3 エピトープはヒト C D 1 3 3 エピトープである。例えば、抗体 I g G R W 0 1 に結合される 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 に結合される 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 C D 1 3 3 発現細胞への、抗体 I g G R W 0 1 および / または抗体 I g G R W 0 3 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 I g G R W 0 1 に結合された 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 結合剤は、変性 C D 1 3 3 、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 P V D F) 上にエレクトロプロットされた変性 C D 1 3 3 への、抗体 I g G R W 0 1 および / または抗体 I g G R W 0 3 の結合を部分的または完全に阻害するであろう。

【 0 1 6 2 】

別の実施形態において、抗体 I g G R W 0 1 に結合される 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 に結合される C D 1 3 3 エピトープに特異的に結合する C D 1 3 3 結合剤は、C D 1 3 3 発現細胞の表面への結合について抗体可変領域 R W 0 1 を含む F a b および / または抗体可変領域 R W 0 3 を含む F a b と競合する、1 倍の C D 1 3 3 結合剤 (例えば、F a b または s c F v) である。一実施形態において、C D 1 3 3 エピトープはヒト C D 1 3 3 エピトープである。例えば、抗体 I g G R W 0 1 に結合される 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 に結合される C D 1 3 3 エピトープに特異的に結合する 1 倍 C D 1 3 3 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 C D 1 3 3 発現細胞への、抗体可変領域 R W 0 1 を含む F a b および / または抗体可変領域 R W 0 3 を含む F a b 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 倍物質は、抗体可変領域 R W 0 1 を含む F a b および / または抗体可変領域 R W 0 3 を含む F a b の変性 C D 1 3 3 への結合、例えば、全細胞溶解物を変性タンパク質の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 P V D F) 上にエレクトロプロットされた変性 C D 1 3 3 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、C D 1 3 3 はヒト C D 1 3 3 である。

【 0 1 6 3 】

< 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、H R P 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／ストレプトアビシン）、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 C D 1 3 3 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 , 8 1 6 , 5 6 7 号、およびMorrison, 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 倍抗体を作製することができる。

10

【0165】

F c 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 C D 1 3 3 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Vincze 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、ヒト化または靈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、C H 1、C H 2、C H 3、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 D N A 技術によって操作することができる（例えば、WO 92 10 21 90、ならびに米国特許第 5 , 5 3 0 , 1 0 1 号、5 , 5 8 5 , 0 8 9 号、第 5 , 5 6 9 , 7 6 1 号、第 5 , 6 9 3 , 7 6 2 号、第 5 , 6 9 3 , 7 6 2 号、第 5 , 7 1 4 , 3 5 0、および第 5 , 7 7 7 , 0 8 5 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 I g c D N A の使用が、当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）。m R N A は、ハイブリドーマまたは抗体を產生する他の細胞から単離されて、c D N A を產生するために使用される。目的の c D N A 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 , 6 8 3 , 1 9 5 号および第 4 , 6 8 3 , 2 0 2 号）。あるいは、目的の配列を単離するために、ライプ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 D N A 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ナー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

【0167】

上記のように、C D 1 3 3 結合剤はヒト抗体であり得る。完全ヒト抗体は、C D R 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產生するための E B V 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

40

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エプスタインバー(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持するファージのコンビ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產生され得る。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/またはカッパ軽鎖遺伝子座のいくつかは無能化されており、抗原に応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、投与された抗原に応答して、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細胞を产生する。

【0169】

異種/非ヒト動物を产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3,068,180B2号、第3,068,506B2号および第3,068,507B2号、欧州特許第EP 0463151B1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0546073B1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】

ミクロ細胞融合、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>

10

20

30

40

50

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とき、「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、およびトリコテセンが含まれる。

【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、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y、および¹⁸⁶Rh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、インターラーション、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(SPPD)、イミノチオラン(ITT)、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HC1など)、活性エステル(スペ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、Vittetta 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、抗体に放射性ス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とき、「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、リングル液、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のために、投与単位形態で製剤化される。本明細書で使用される投与単位形態は、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、活性成分の独特的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>

10

20

30

40

50

本開示の C D 1 3 3 結合剤、免疫複合体および医薬組成物は、C D 1 3 3 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、C D 1 3 3 発現細胞をターゲッティングし、結合し、かつ／または検出するための、本明細書に記載の C D 1 3 3 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。

【 0 1 8 9 】

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、免疫複合体、および医薬組成物は、C D 1 3 3 発現細胞の細胞表面発現をターゲッティングし、結合し、かつ／または検出するために有用である。

10

【 0 1 9 0 】

別の実施形態において、本明細書に記載の C D 1 3 3 結合剤、免疫複合体および医薬組成物は、細胞内 C D 1 3 3 をターゲッティングし、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。

【 0 1 9 1 】

別の実施形態において、本明細書に記載の C D 1 3 3 結合剤、免疫複合体および医薬組成物は、細胞溶解物中の C D 1 3 3 をターゲッティングし、結合しおよび／または検出するために有用である。

【 0 1 9 2 】

さらに別の実施形態において、本明細書に記載の C D 1 3 3 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 C D 1 3 3 発現細胞中の C D 1 3 3 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、C D 1 3 3 結合剤、免疫複合体および医薬組成物は、細胞の C D 1 3 3 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、C D 1 3 3 結合剤、免疫複合体および医薬組成物は、細胞表面の C D 1 3 3 レベルを検出および／または定量するために有用である。

20

【 0 1 9 3 】

本開示の C D 1 3 3 結合剤は、天然／細胞表面発現型 C D 1 3 3 、および変性 C D 1 3 3 の両方を検出／定量するために使用され得る。C D 1 3 3 の過剰発現は、しばしば癌性表現型と相關する。細胞の総 C D 1 3 3 タンパク質レベルの減少は細胞の転移能の低下と相關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 C D 1 3 3 結合剤を用いた、変性全細胞溶解物中における C D 1 3 3 タンパク質レベルのウエスタンプロッティング検出は、C D 1 3 3 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。

30

【 0 1 9 4 】

一般に、細胞内 C D 1 3 3 、全細胞 C D 1 3 3 または表面発現型 C D 1 3 3 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、ウエスタンプロッティング、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。

40

【 0 1 9 5 】

本開示の C D 1 3 3 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 C D 1 3 3 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 C D 1 3 3 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髓芽腫細胞）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 C D 1 3 3 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 C D 1 3 3 タンパク質は、任意選択で、細胞

50

表面発現型および／または細胞内の C D 1 3 3 である。C D 1 3 3 発現細胞における C D 1 3 3 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。

【 0 1 9 6 】

<免疫細胞に対する C D 1 3 3 発現細胞のターゲッティング>

さらに、本開示の C D 1 3 3 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、ターゲッティングおよび／または結合するために有用である。

【 0 1 9 7 】

例えば、上記の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、その一方の結合特異性は C D 1 3 3 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 N K 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 (B i T E) である。

10

【 0 1 9 8 】

上記の他の実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は C D 1 3 3 結合性キメラ抗原受容体 (C A R) であり、これはその抗原結合性／ターゲッティングドメインとして、C D 1 3 3 結合性 s c F v のような本開示の C D 1 3 3 結合剤を含む。

20

【 0 1 9 9 】

適切な C A R の構築および抗原発現細胞をターゲッ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「 C A R 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、C D 1 3 3 発現細胞 (C D 1 3 3 + 細胞) にターゲッティングするために有用である。

20

【 0 2 0 0 】

また、C D 1 3 3 + 細胞をターゲッティングする方法であって、C D 1 3 3 + 細胞を、本開示の C A R 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

【 0 2 0 1 】

これらの方法により免疫エフェクター細胞を C D 1 3 3 + 細胞にターゲッティングすることは、C D 1 3 3 + 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 C D 1 3 3 + 細胞にターゲッティングすることは、C D 1 3 3 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。

【 0 2 0 2 】

<診断方法>

本明細書に開示される C D 1 3 3 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 C D 1 3 3 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、C D 1 3 3 の全細胞発現および／または細胞表面発現型 C D 1 3 3 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

【 0 2 0 3 】

一実施形態において、C D 1 3 3 結合剤は、C D 1 3 3 発現細胞、任意選択で脾臓癌細胞、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。

【 0 2 0 4 】

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關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様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(Miki et 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-Kolkka 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 & Schalcken, 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(Shmuelkov, 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 のダウンリギュレーションは、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 (Rappa et al., 2008)。モノメチルオーリスタチン F (monomethyl auris tatin 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 (Smith et al., 2008)、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 (Rappa et al., 2008)。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 (Rappa et al., 2008)。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 (Mak et al., 2012b)。

【0209】

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 (Venugopal et al., 2015)、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。

【0210】

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、ヒトポリクロナル T 細胞を C D 1 3 3 + G B M 細胞へトリダイレクトする 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。

【0211】

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。

【0212】

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、80%、85%、90%、95% または 99% 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。

【0213】

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。

【0214】

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 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。

【 0 2 1 5 】

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 C D 1 3 3 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。

【 0 2 1 6 】

上記のように、本開示は、(1) C D 1 3 3 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

【 0 2 1 7 】

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。

【 0 2 1 8 】

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

【 0 2 1 9 】

本開示はまた、C D 1 3 3 発現細胞をターゲッティングする C A R、および C A R 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 C A R 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 C A R 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

【 0 2 2 0 】

一実施形態において、本明細書に開示される C A R 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 C A R 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。

【 0 2 2 1 】

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 C D 1 3 3 発現細胞に関連する疾患を有する患者である。

40

【 0 2 2 2 】

「細胞」の用語は、单一の細胞ならびに複数の細胞または細胞集団を含む。

【 0 2 2 3 】

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 C D 1 3 3 結合剤と C D 1 3 3 との間の結合相互作用であり得、場合によっては、これは C D 1 3 3 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0.1mg/kg体重～約50mg/kg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12ヶ月、または少なくとも2、3、4、5もしくは10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、10、25、50、75または100%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ビーズ1化合物」ライブラリー法、アフィニティ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、「Celllecteq」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。（Celllecteq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で使用される單一コロニーを単離するために、感染細胞をプレーティングした。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も少なくとも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

【表1】

表1. ヒトCD133のアミノ酸配列 (GenBankアクセスションO43490)。

MALVGSLLLLGLCGNSFSGQPSSTDAPKAWNYELPATNYETQDSHKAGPIGILFELVHIFLYVVQPRD
FPEDTLRKFLQKAYESKIDYDKPETVILGLKIVYYEAGIILCCVLGLLFIILMPLVGYFFCMRCCKNCG
GEMHQRQKENGFLRKCFASIILVICIIISIGIFYGFVANHQVRTRIKRSRKLADSNFKDLRTLLNETPE
QIKYILAQYNTTKDKAFTDLNSINSVLGGGILDRLRPNIIPVLDEIKSMATAIKETKEALENMNSTLKS
HQQSTQLSSSLTSVKTSRSSLNDPLCLVHPSETCNSIRSLSQLNSNPELRQLPPVDAELDNVNVL
TDLDGLVQQGYQSLNDIPDRVQRQTTVVAGIKRVLNSIGSDIDNVTQRLPIQDILSAFSVYVNNTESYI

30

40

50

HRLNPTLEEYDSYWWLGGLVICSLTLIVIFYLGLLCGVCGYDRHATPTTRGCVSNTGGVFLMVGGLS
 FLFCWILMIIVVLTTFVFGANVEKLICEPYTSKELFRVLDPYLLNEDWEYYLSGKLFNKSKMKTLEQVY
 SDCKKNRGTGTYGTLHLQNSFNISEHLLNINEHTGSISSELESKVNLNIFLLGAAGRKNLQDFAACGIDRMN
 YDSYLAQTGKSPAGVNLLSFAYDLEAKANSLPPGNLRNSLKRDAQTIKTIHQQRVLPIEQSLSTLYQSVK
 ILQRTGNGLLERVTRILASLDFAQNFTNNNTSSVIEETKKYGRTIIGYFEHYLQWIEFSISEKVASCKP
 VATALDTAVDVFLCSYIIDPLNLFWPGIGKATVFLLPALIFAVKLAKYYRRMDSEDVYDDVETIPMKNME
 NGNNNGYHKDHVYGIHNPVMTSPSQH (配列番号 1)

C D 1 3 3 の 3 つの中には下線が付されている。

イタリック体は、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。

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。ライプラリー 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 細胞よりも少なくとも 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、ライプラリー 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。ライプラリー 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 を增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、ライプラリー F およびライプラリー 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

【 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

30

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】

10

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增幅によって救出し、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】

20

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ス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。

30

40

50

【表 2】

表 2. IgG RW01 および IgG RW03 の軽鎖 (hK) および重鎖、ならびに抗体可変領域 RW01 および RW03 の重鎖および軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列。

抗体可変領域 RW01 の軽鎖可変ドメイン :	
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS <u>QGSSYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS</u> SLQPEDFATYYC <u>QQGVWSLITFGQGTKVEIK</u> (配列番号 28)	10
抗体可変領域 RW01 の重鎖可変ドメイン :	
EVQLVESGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFnIYYYGSMHWVRQAPGKGLEWVASISPYYGSTYYADSVKGRTFISADT</u> SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>RHASSGYGHYAVYGIDYWGQGTLTVSS</u> (配列番号 29)	
IgG RW01-軽鎖 (hK) アミノ酸配列 :	
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS <u>QGSSYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS</u> SLQPEDFATYYC <u>QQGVWSLITFGQGTKVEIKRTVAAPSVPIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVD</u> <u>NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLT</u> <u>SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (配列番号 2)	
IgG RW01-重鎖 (hG1) アミノ酸配列 :	20
EVQLVESGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFnIYYYGSMHWVRQAPGKGLEWVASISPYYGSTYYADSVKGRTFISADT</u> SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>RHASSGYGHYAVYGIDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAA</u> <u>LGCLVKDYPFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPVLQSSGLYSSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHHPSNTKVDKKVE</u> <u>PKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTP</u> <u>REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLT</u> <u>CLVKVGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSL</u> <u>SLSPGK</u> (配列番号 3)	
抗体可変領域 RW03 の軽鎖可変ドメイン :	
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS <u>QSVSSAVWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTI</u> SSLQPEDFATYYC <u>QQYSHAGHLFTFGQGTKVEIK</u> (配列番号 30)	30

抗体可変領域 RW03 の重鎖可変ドメイン：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLSSSIHWWVRQAPGKGLEWVAYIYPYYSYTYYADSVKGRFTISADTS
KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFGSVAGFDYWGQGTLVTVSS (配列番号 31)

IgG RW03-軽鎖 (hK) アミノ酸配列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQS VSSA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRSGSRSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQYSHAGHLFTFGQGTTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 4)

10

IgG RW03-重鎖 (hG1) アミノ酸配列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLSSSIHWWVRQAPGKGLEWVAYIYPYYSYTYYADSVKGRFTISADTS
KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFGSVAGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNWKPSNTKVDDKVEPKSCDKTH
TCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQVNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
(配列番号 5)

20

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。

【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

50

	CDR-H3	ARHASSGGHYAVYGIDY (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>GSMIYYYGS</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)

10

20

30

40

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>YIYPYYSYT</u> (配列番号 35)

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	ATTCTCCCTTACTACGGCTCTACT (配列番号 40)
	CDR-H3	GCTCGCCATGCTTCTTCTGGTACGGTCATTACGCTGTTACGGTATTGACTAC (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

	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	GGCTTCAACATCTACTACTACGGTTCTATG (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	TCTATTCTCCTTACTACGGCTCTACTTAC (配列番号 43)
IgG RW03	CDR-L1	CAGTCCTGTCCAGCGCT (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	ATTTATCCTTATTATAGCTATACT (配列番号 48)
	CDR-H3	GCTCGCTTCGGTTCTGTTGCTGGTTTGACTAC (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	GGCTTCAACCTCTCTTCTTCTATC (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	TATATTATCCTTATTATAGCTATACTTAT (配列番号 51)

【0238】

10

IgG RW01 および IgG RW03 の軽鎖 (hK) および重鎖、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をコードする DNA のヌクレオチド配列を表 5 に示す。

【表 5】

20

表 5. IgG RW01 および IgG RW03 の軽鎖 (hK) および重鎖、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をコードする DNA のヌクレオチド配列

抗体可変領域 RW01 の軽鎖可変ドメイン：
5' -GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTGTGGCGATAGGGTCACCATCACCTGCCGTGCCAGTCAGGGTTCTTCTACGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAGCTCTGATTTACTCTGCATCCTACCTCTACTCTACTCTGGAGTCCCTCTCGCTCTCTGGTAGCCGTTCCGGGACGGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTATTACTGT CAGCAAGGTGTTGGTCTCTGATCACGTTCGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAA-3' (配列番号 52)
抗体可変領域 RW01 の重鎖可変ドメイン
5' -GAGGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTGTCCGTGCAGCTTCTGGCTAACCTCTCTTCTTCTATCCACTGGGTGCGTCAGGCCCCGGTAAGGGCCTGGAAATGGGTTGCATATTTATCCTTATTATAGCTATACTTATTATGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTCACATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCC

30

40

50

GTCTATTATTGTGCTCGCTCGGTTCTGTTGCTGGTTGACTACTGGGGTCAAGGAACCCGGTCACCG
TCTCCTCG-3' (配列番号 53)

I g G R W O 1 - 軽鎖 (h K) ヌクレオチド配列 :

5' -GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGGGGCGATAGGGTCACCATACC
TCCCGTGCCAGTCAGGGTCTTCTACGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCCAGGAAAAGCTCGAAGCTTC
TGATTTACTCTGCATCCTACCTCTACTCTACTCTGGAGTCCCTCTCGCTCTGGTAGCCGTTCCGGG
ACGGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTCTGCAGCCGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTCAGCAAGGTG
TTGGTCTCTGATCACGTTGAGCAGGGTACCAAGGTGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGT
CTTCATCTTCCCACATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGAAACTGCGCTCTGTTGTGCCCTGCTGAATAAC
TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGA
GTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGA
CTACGAGAAACACAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTGCCCGTCACAAAGAGC
TTCAACAGGGGAGAGTGT-3' (配列番号 18)

10

I g G R W O 1 - 重鎖 (h G 1) ヌクレオチド配列 :

5' -GAGGTTCAAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTGTCCTGT
GCAGCTTCTGGCTTCAACATCTACTACTACGGTTCTATGCACTGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAGGGCC
TGGAAATGGGTTGCATCTATTCTCCTACTACGGCTCTACTATGCGATAGCGTCAAGGGCCGTT
CACTATAAGCGCAGACACATCCAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACT
GCCGTCTATTATTGTGCTGCCATGCTTCTGGTACGGTATTACGCTGTTACGGTATTGACTACT
GGGGTCAAGGAACCCCTGGTCACCGCTCCTCG GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTCCCCCTGGCACC
CTCCTCCAAGAACACCTCTGGGGCACACGGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG
GTGACGGTGTGCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGCGTGCACACCTTCCGGTGTCTACAGTCCT
CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAGCTGGGACCCAGACCTACATCTG
CAACGTGAATACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAACT
CACACATGCCAACCGTGCCTCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTCTCTTCCCCCAAAAC
CCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA
CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGGACGGCGTGGAGGTGCAATGCAAGACAAAGCCGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCCACCGTCTGCCACCCAGGACTGGCTGAATGGCA
AGGAGTACAAGTGAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCACCTCCAAGCCAA
AGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACCCCTGCCCTGCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTC
AGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTCTATCCACCGGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGC
CGGAGAACACTACAAGAACACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCCTCTACAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCCCTGATGCAAGGCTCTGCAC
AACCACTACACGAGAACAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA-3' (配列番号 19)

20

30

抗体可変領域 R W O 3 の軽鎖可変ドメイン :

40

50

5' -GATATCCAGATGACCCAGTCCCGAGCTCCCTGTCCGCCCTGTGGCGATAGGGTACCATCACC
TGCGTGCCAGTCAGTCCGTGTCAGCGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAGC
TTCTGATTTACTCGGCATCCAGCCTTACTCTACTCTGGAGTCCCTCTCGCTCTGGTAGCCGTTCC
GGGACGGATTCACTCTGACCCAGCTGCAGCCGAAGACTTCGCAACTTATTACTGT
CAGCAAT
ACTCTCATGCTGGTCATCTGTCACGTTGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAA-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' -GAGGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGCTCACTCCGTTGTCCGTG
GCAGCCTCTGGCTCAACCTCTCTTCTTCTATCCACTGGGTGCGTCAGGCCCCGGTAAGGGCCTGG
AATGGGTTGCATATATTATCCTTATTATAGCTATACTTATTATGCCGATAGCTCAAGGCCGTT
TATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCC
GTCTATTATTGTGCTCGCTCGGTTCTGTTGCTGGTTGACTACTGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCG
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' -GATATCCAGATGACCCAGTCCCGAGCTCCCTGTCCGCCCTGTGGCGATAGGGTACCATCACC
TGCGTGCCAGTCAGTCCGTGTCAGCGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAGC
TTCTGATTTACTCGGCATCCAGCCTTACTCTACTCTGGAGTCCCTCTCGCTCTGGTAGCCGTTCC
GGGACGGATTCACTCTGACCCAGCTGCAGCCGAAGACTTCGCAACTTATTACTGT
CAGCAAT
ACTCTCATGCTGGTCATCTGTCACGTTGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAACGTACGGTGGCTGC
ACCATCTGTCTTCATCTTCCCACATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGAAACTGCCCTCTGTTGTGCTG
CTGAATAACTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA
ACT
CCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCACCCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAG
CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTC
ACAAAGAGCTCAACAGGGAGAGTGT-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' -GAGGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGCTCACTCCGTTGTCCGTG
GCAGCCTCTGGCTCAACCTCTCTTCTTCTATCCACTGGGTGCGTCAGGCCCCGGTAAGGGCCTGG
AATGGGTTGCATATATTATCCTTATTATAGCTATACTTATTATGCCGATAGCTCAAGGCCGTT
TATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCC
GTCTATTATTGTGCTCGCTCGGTTCTGTTGCTGGTTGACTACTGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCG
TCTCCTCGGCTAGCACCAAGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG
CACAGCGGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGAACTCAGGC
GCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTCCGGCTGTCCTACAGTCCTAGGACTCTACTCCCAGCAGCG

40

50

TGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA
 CACCAAGGTGGACAAGAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCCCAGCA
 CCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCAGTCTCCTCTTCCCCAAACCCAAGGACACCCCATGATCTCCC
 GGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGGAGCTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA
 CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
 GTGGTCAGCGTCCCTACCGTCCGCACCCAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCA
 ACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACACCACAGGT
 GTACACCCCTGCCCTCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCGAGGTCAAGCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGC
 TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGC
 CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTCTTCCCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
 GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAACAGAGCCTC
 TCCCTGTCTCCGGTAAA-3' (配列番号 21)

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リ一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。

10

20

30

【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。

【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Ovarcar-8への結合について評価した。HEK293細胞およびHEK293-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。

【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

40

50

3は、細胞CD133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。

IgG RW01およびIgG RW03抗体を、細胞発現したCD133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、IgG RW01およびIgG RW03がHEK293-CD133細胞(CD133の細胞内局在を示す)には結合するが、HEK293細胞には結合しないことを示している。

【0242】

実施例6：ウエスタンプロット分析に示されるように、IgG RW01およびIgG RW03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CD133を検出することができる。

Caco-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CD133を検出するIgG RW01およびIgG RW03の能力を、ウエスタンプロットティングアッセイによって分析した。HEK293-CD133細胞およびHEK293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、IgG RW01およびIgG RW03のそれぞれが、両方ともCD133陽性であるCaco-2細胞およびHEK293-CD133細胞の溶解物中において変性CD133を検出するが、HEK293細胞中では検出しないことを示している。

【0243】

実施例7：エピトープ-Fab RW01およびFab RW03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。

抗体可変領域RW01および抗体可変領域RW03が、細胞で発現したCD133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25nM濃度のFab RW01またはFab RW03のいずれかと共にインキュベートし、それぞれIgG RW03またはIgG RW01の段階希釈物を添加し、IgG結合をヒトFc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、IgG RW01は飽和RW03Fabの存在下で細胞に結合し得、またIgG RW03はRW01Fabの存在下で結合し得ることを示している。

【0244】

実施例8：IgG RW01またはIgG RW03を用いた治療は、Caco-2結腸直腸癌細胞における全細胞CD133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

癌細胞におけるCD133タンパク質レベルに対するIgG RW01およびIgG RW03の効果を調べるために、Caco-2結腸直腸癌細胞をIgG / RW01またはIgG RW03のいずれかと共に37℃で24時間インキュベートし、全細胞溶解物を、プローブとしてAC133抗CD133抗体(Miltenyi Biotech)を用い、陰性抗体対照として抗ヒトIgG(H+L)抗体(Jackson ImmunoResearch)を用いたウエスタンプ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IgG対照処理群と比較して、RW01 IgGまたはRW03 IgGによる処理はCD133タンパク質レベルを有意に減少させた。CD133タンパク質レベルの観察された減少による細胞内のWntシグナル伝達に対する影響を評価するために、

-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、IgG RW01-またはIgG RW03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。

【0245】

実施例9：単鎖Fab RW03は、二重特異性T細胞エンゲージャー(BiT E)をCD133陽性細胞にターゲッティングするために使用できる

4つの新規な抗CD133 × 抗CD3二重特異性T細胞エンゲージャー(BiT E; 図10A)の発現のために、ベクターを構築した。4つのBiTEはそれぞれ、抗CD3 scFvを組み込んでおり、さらに抗CD133 Fab RW03(FabベースのBiTE)またはFab RW03(「scFab RW03」; FabベースのBiTE)の

10

20

30

40

50

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

【 0 2 4 6 】

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

【 表 6 】

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

<u>B i T E #1</u>

10

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:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSHAGHLFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE¹⁰GGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDKATLTTDKSSSTA YMQLSSLTSEDSA²⁰VYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSGGGGSGGGGGGGSDIQLTQSPA²⁰IMSASPGEKVMTCRASSSVSYM²⁰WYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGV²⁰PYRFS²⁰SGSG²⁰GTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK (配列番号: 22)

VH-CH (RW03) のアミノ酸配列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLSSSIIHWVRQAPGKGLEWVAYIYPYYSYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA²⁰VYYCARFGSVAGFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT²⁰WSNSGALTSGVHTFP²⁰AVLQSSGLYSLSSVTPSSLGTQTYICNVN²⁰H²⁰KPSNTKV²⁰D²⁰K²⁰VEPKSCDKTH²⁰T (配列番号: 23)

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:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLSSSIIHWVRQAPGKGLEWVAYIYPYYSYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA²⁰VYYCARFGSVAGFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT²⁰WSNSGALTSGVHTFP²⁰AVLQSSGLYSLSSVTPSSLGTQTYICNVN²⁰H²⁰KPSNTKV²⁰D²⁰K²⁰VEPKSCDKTH²⁰TGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSA²⁰VYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSGGGGSGGGGS²⁰GGGSDIQLTQSPA²⁰MSASPGEKV²⁰MTCRASSSVSYM²⁰WYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGV²⁰PYRFS²⁰SGSG²⁰GTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK (配列番号: 24)

VL-CL (RW03) のアミノ酸配列:

10

20

30

40

50

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQYSHAGHLFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC (配列番号：25)

BiTE #3

配置：

- VL-*CL*-リンクー-VH-*CH* (RW03)-(G4S)-VH-(G4S) 3-VL (CD3)

10

アミノ酸配列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQYSHAGHLFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGECGGSSGSGSGSTGTSSSGTGTSAAGTTGTSASTSGSGSEGVQLVESGGGLVQPGGLRLSCAASGFNLSSSIIHWVRQAPGKGLEWVAYIYPYYSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFGSVAGFDYWGQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHGGLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDKATLTDKSSSTAYMQLSSLTSEDASVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPAAMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNVYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK (配列番号：26)

BiTE #4

配置：

- VH-*CH*-リンクー-VL-*CL* (RW03)-(G4S)-VH-(G4S) 3-VL (CD3)

20

アミノ酸配列：

30

EVQLVESGGGLVQPGGLRLSCAASGFNLSSSIIHWVRQAPGKGLEWVAYIYPYYSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFGSVAGFDYWGQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHGGSSGSGSGSTGTSSGTGTAGTTGTSASTSGSGSDIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASQSVSSAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSHAGHLFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGECGGGGSDIKLQQSGAELARPAGASVCKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDKATLTDKSSSTAYMQLSSLTSEDASVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPAAMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNVYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGV

40

VPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK (配列番号：27)

下線部は C D R 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を表す。リンクアミノ酸は太字で示されている。

BiT E 発現ベクターで一過性にトランスフェクトされた HEK 293 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プロット分析（図 10 B）に示されるように、発現および精製された形態の BiTE #1、BiTE #2、BiTE #3、および BiTE #4 を容易に発現できた。

【0248】

BiTE #1、BiTE #2、BiTE #3 および BiTE #4 は、細胞表面 CD133 および CD3 に結合する能力を有する。

精製 BiTE が細胞表面 CD133 に特異的に結合する能力が、HEK 293 - CD133 細胞 vs. HEK 293 細胞の BiTE 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 11 A および図 11 B に示されるように、BiTE #1、BiTE #2、BiTE #3 および BiTE #4 はそれぞれ、0.073 ~ 0.11 マイクログラム / mL という低い濃度でも、HEK 293 細胞よりも有意に多く、HEK 293 - CD133 細胞に結合する。精製された BiTE を ELISA でさらに試験して、CD3 イプシロン / ガンマ および CD3 イプシロン / デルタの形態の CD3 に結合するそれらの能力を決定した。図 12 に示されるように、精製された BiTE は、陽性対照抗体 (UCHT1、OKT3) と同様に CD3 にも結合する。これらの BiTE は、CD133 および CD3 の両方に結合することができる。

【0249】

実施例 10：ヒト CD133 特異的キメラ抗原受容体 (CAR) 修飾 T 細胞は、患者由来の神経膠芽腫脳腫瘍をターゲッティングする。

単鎖可変断片 (scFv) を RW03 (上記のもの) から誘導し、第二世代の CAR を生成した。myc タグを備えた抗 CD133 scFv を、ヒト CD8 リーダー配列、CD8a 膜貫通ドメイン、CD28、および hCD3 (ヒト CD3 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 (CD133 CAR - LH) および 重鎖 - リンカー - 軽鎖 (CD133 CAR - HL) で、レンチウイルス構築物 pCCL - NGFR ベクター中にインフレームでクローン化した。

【0250】

レンチウイルスを調製した後、PBMC から単離した T 細胞に、CD133 CAR - LH および CD133 CAR - VH 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 NGFR および myc タグの発現を分析し、それぞれ抗 CD133 の形質導入および表面発現の効率を確認した。NGFR 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、CAR の両方のバリエーション、すなわち、CD133 CAR - HL および CD133 CAR - LH において、c - myc 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、CD133 CAR が、CD133 + GBM 脳腫瘍開始細胞株 (BTIC) に選択的に結合して殺傷する能力を試験した。CD133 特異的 CAR - T 細胞は、CD133 + GBM に対して細胞傷害性であった。CD133 CAR - T 細胞を GBM と共に培養すると、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。

【0251】

CD133 特異的 CAR を発現するヒト T 細胞を、抗体可変領域 RW03 (上記に開示) の重鎖および軽鎖可変ドメイン、c - myc の短マーカーエピトープ、マウス CD8 由来のヒンジ領域、ならびにマウス CD28 および CD3 の膜貫通部分および細胞質部分を含む scFv をクローニングすることによって操作した (図 13)。ヒト CD133 - CAR をレンチウイルストラנסファーべクター pCCL - NGFR 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 - myc タグを用いて CAR 発現を検証した。NGFR 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。

【0252】

形質導入された T 細胞は、CD4 陽性細胞および CD8 陽性細胞からなり、両方のサブセットが CD133 特異的 CAR を発現していた (図 14)。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^{high} GBM細胞と共に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^{low} GBM細胞には影響を及ぼさずに、CD133^{high} GBMおよび腫瘍細胞を特異的に認識し、これを殺傷した（図17B）。CD133^{high}およびCD133^{low} 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^{high} GBMと定義し、5%未満のCD133+細胞を含む培養物をCD133^{low} 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（Baeverle 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つの異なるコンホー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^{high}およびCD133^{low}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 ^{high} G B M においてより高い効率が観察され、B i T E 標的特異性が確認された。

【 0 2 5 9 】

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クープット D N A 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 を使用して、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 1 9 A）。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て、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 1 9 B）。

【 0 2 6 0 】

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 2 0 A）。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 2 0 B）。

【 0 2 6 1 】

B i T E および C D 1 3 3 ^{high} 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 2 1 ）。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。

【 0 2 6 2 】

G B M 細胞は、単独で播種した場合（図 2 2 A (a) ）または T 細胞と共に播種した場合（図 2 2 A (b) ）に単層を形成する；しかしながら、B i T E の添加（図 2 2 A, 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 細胞と共に培養した G B M 細胞への B i T E の添加は、アラマーブルー細胞傷害性アッセイ（図 2 2 B ）、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 2 2 C ）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。2 4 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。

【 0 2 6 3 】

N S G (N O D s c i d ガンマ) マウスに、C D 1 3 3 ^{high} 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 2 3 ）。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 2 3 、 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 2 3 C ）、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 2 3 D ）。

【 0 2 6 4 】

< 実施例 1 0 および 1 1 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（ Beckman Coulter ）にかけた。生存色素 7 A A D (1 : 1 0 ; Beck

10

20

30

40

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 / 200 μL / 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、20 μL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535 nmおよび600 nmの励起波長および発光波長で蛍光を測定した。読み取り値を、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オでの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、10 μL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
 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
 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 Giersch, 1992. Ann. Rev. Biochem. 61:387
 Schmohl and Vallerà, 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
 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. 21:532
- 10
20
30
40
50
- 4 - 37

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

Wang and Riviere, 2016. Mol Ther Oncolytic 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】

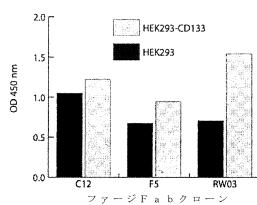
【図1B】

CD133	HEK293										
1.797	0.93	1.665	0.955	0.948	0.822	1.879	0.934	1.576	0.948	1.844	0.848
1.704	0.847	1.655	0.875	0.876	0.95	1.64	0.771	1.668	0.845	1.881	0.834
1.738	0.83	1.576	0.808	0.808	0.811	1.811	0.875	1.859	0.74	1.698	0.851
1.766	0.835	1.65	0.835	0.838	0.841	1.572	0.734	1.841	0.744	1.642	0.863
1.776	0.854	1.693	0.638	0.638	0.751	1.468	0.718	1.426	0.715	1.54	0.706
1.759	0.787	1.471	0.44	0.64	1.302	1.805	0.688	0.949	0.674	1.463	0.581
1.744	0.822	1.808	0.831	0.831	0.853	1.529	0.708	1.701	0.71	1.62	0.711
1.621	0.165	1.153	0.465	0.465	0.866	1.652	0.793	1.802	0.729	1.56	0.66

CD133	HEK293										
1.642	0.746	1.62	0.903	1.747	0.778	1.584	0.873	1.52	1.011	1.603	0.885
1.591	0.76	1.628	0.787	1.598	0.777	1.588	0.845	1.52	0.856	1.615	0.87
1.513	0.676	1.561	0.734	1.573	0.821	1.62	0.859	1.565	0.927	1.223	1.049
1.545	0.729	1.51	0.732	1.564	0.735	1.666	0.777	1.502	0.735	1.673	0.725
1.495	0.686	1.592	0.593	1.545	0.718	1.551	0.665	1.621	0.73	1.531	0.674
1.596	0.704	1.501	0.682	1.598	0.72	1.563	0.713	1.608	0.812	1.568	0.678
1.634	0.743	1.538	0.614	1.601	0.68	1.527	0.762	1.705	0.757	1.697	0.716
1.592	0.699	1.474	0.655	1.464	0.658	1.505	0.639	1.701	0.667	1.591	0.161

CD133	HEK293										
0.6	0.411	0.44	0.386	0.365	0.335	0.362	0.325	0.334	0.259	0.456	0.354
0.405	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	0.287	0.294	0.242
0.226	0.259	0.207	0.228	0.311	0.267	0.413	0.388	0.214	0.2	0.301	0.265
0.248	0.261	0.334	0.334	0.459	0.309	0.311	0.245	0.235	0.223	0.274	0.224
0.248	0.183	0.239	0.203	0.369	0.241	0.232	0.175	0.243	0.163	0.244	0.175

CD133	HEK293										
0.376	0.359	0.307	0.265	0.861	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	0.393	0.234	0.364	0.275	0.562	0.42	0.358	0.273	0.355	0.374
0.268	0.244	0.32	0.336	0.528	0.33	0.335	0.262	0.488	0.36	0.278	0.227
0.342	0.332	0.305	0.277	0.259	0.235	0.286	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
0.569	0.267	0.457	0.51	0.278	0.2	0.55	0.442	0.273	0.211	0.347	0.272
0.254	0.181	0.291	0.196	0.22	0.186	0.512	0.345	0.326	0.238	0.186	0.168



10

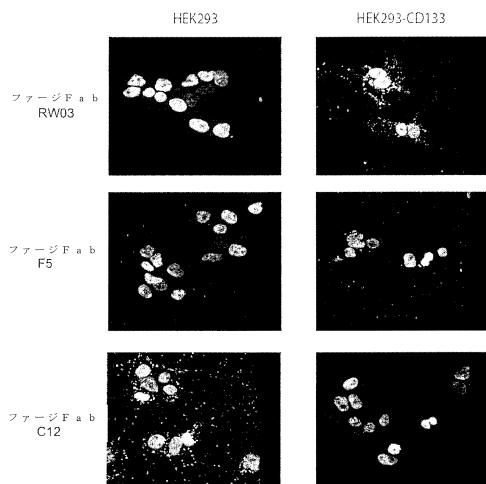
20

30

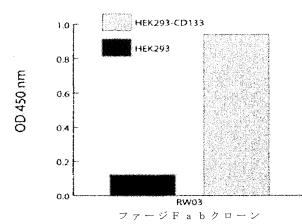
40

50

【図 2】

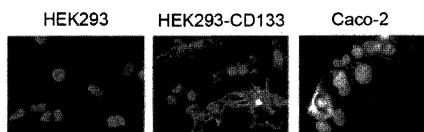


【図 3 A】

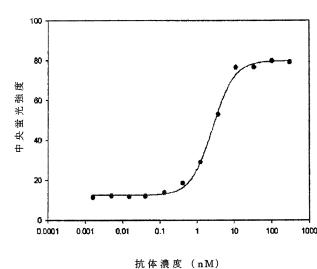


10

【図 3 B】



【図 4 A】



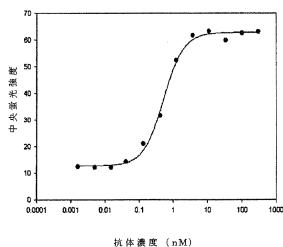
20

30

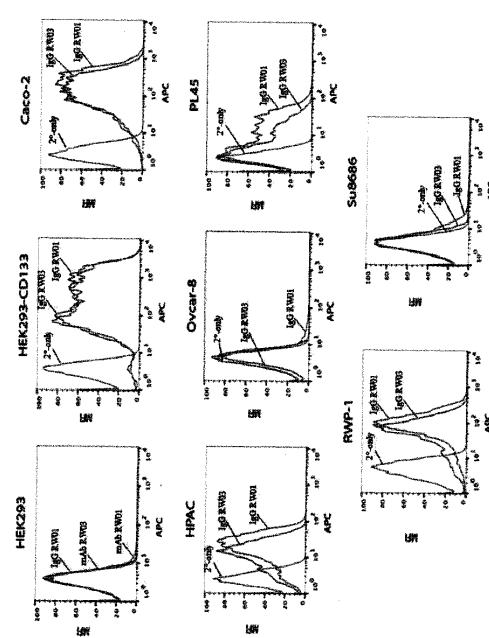
40

50

【図 4 B】



【図 5】

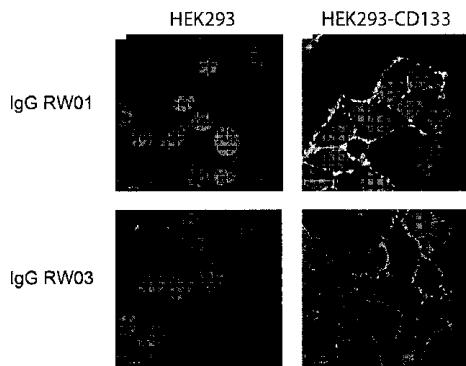


10

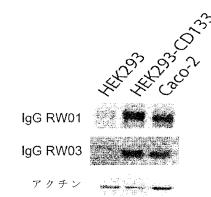
20

【図 6】

FIGURE 6



【図 7】

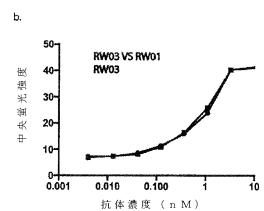
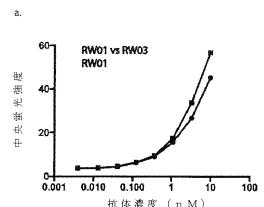


30

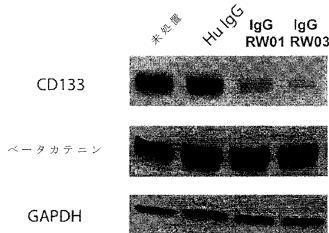
40

50

【図 8】

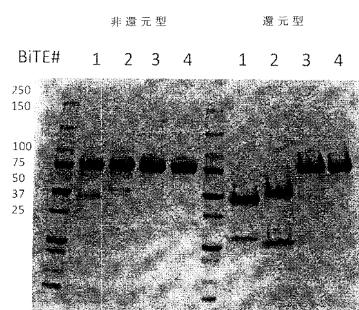
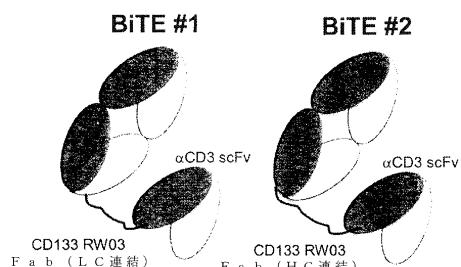


【図 9】

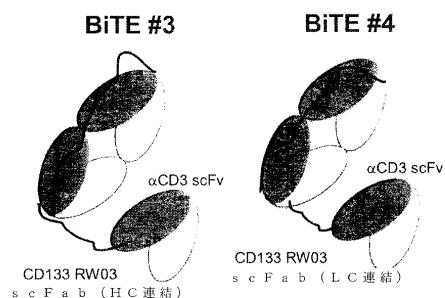


10

【図 10 A】



20

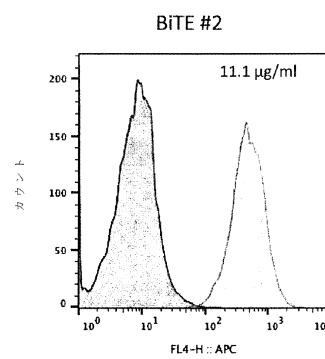
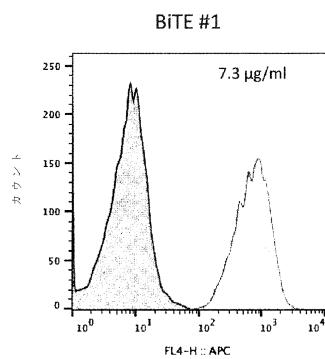


30

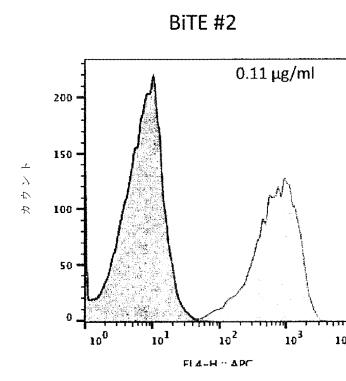
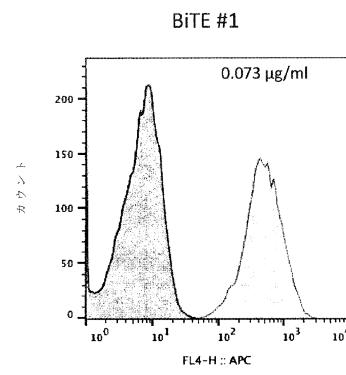
40

50

【図 11A】



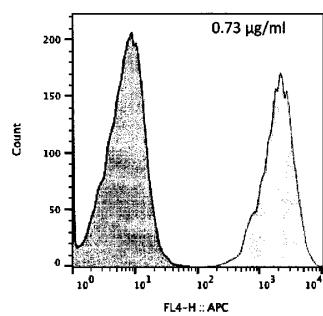
【図 11A 1】



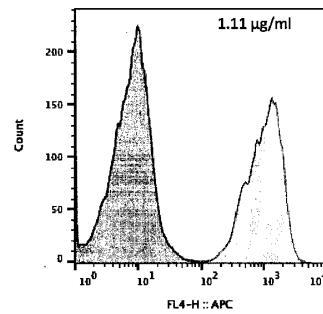
【図 11A 2】

FIGURE 11A con't

BiTE #1

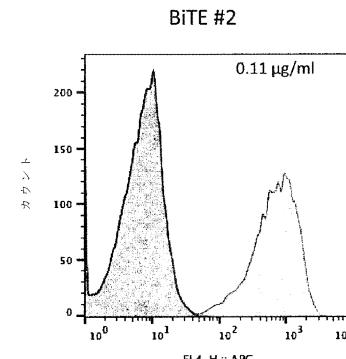
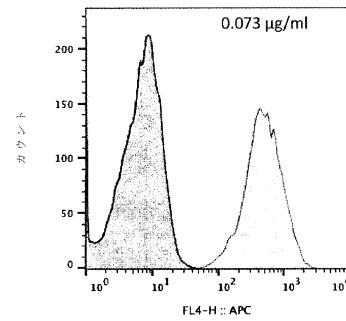


BiTE #2



【図 11A 2】

BiTE #1



10

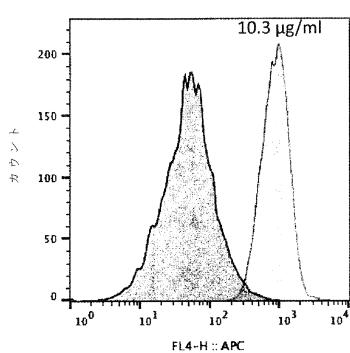
20

30

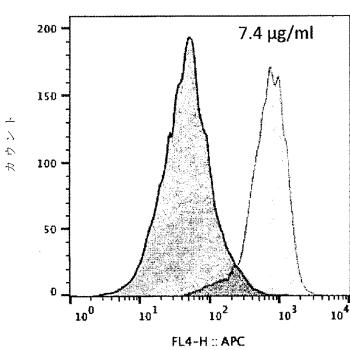
40

50

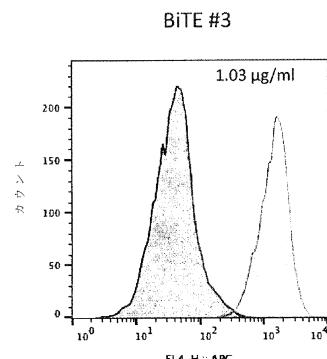
【図 1 1 B】



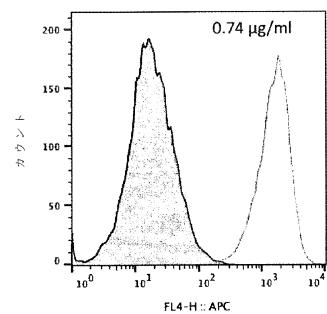
BiTE #4



【図 1 1 B 1】



BiTE #4



10

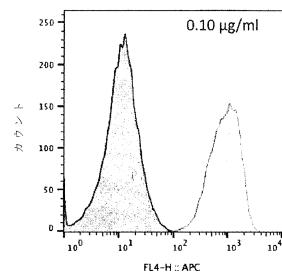
20

30

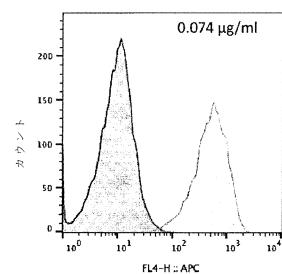
40

【図 1 1 B 2】

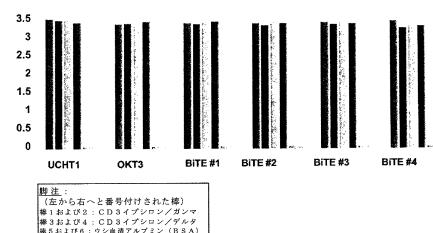
BiTE #3



BiTE #4

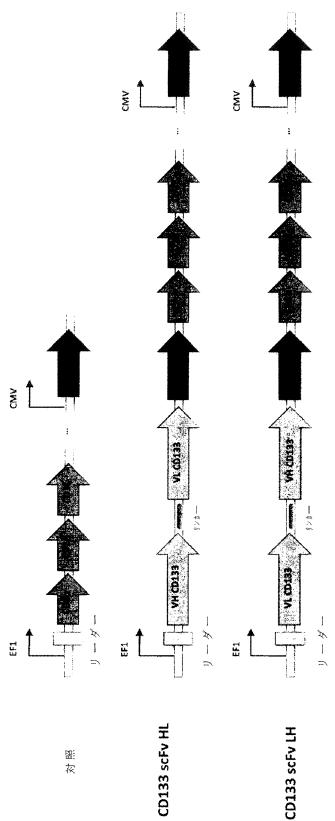


【図 1 2】

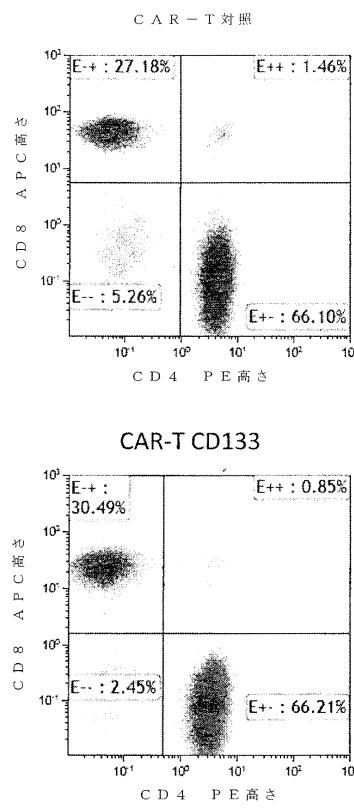


50

【図 1 3】



【図 1 4】



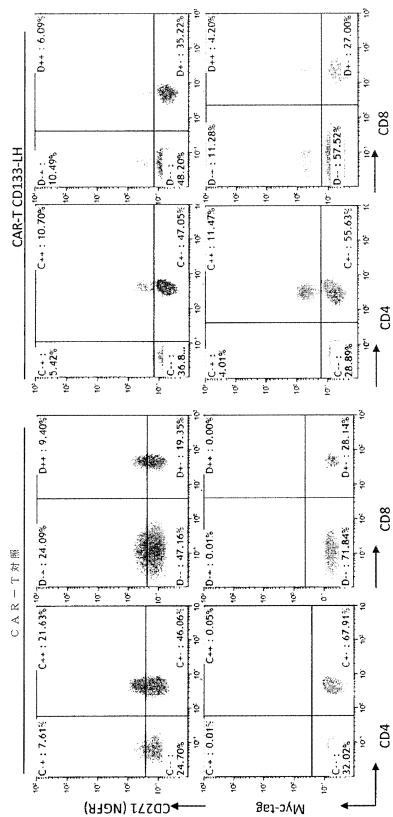
10

20

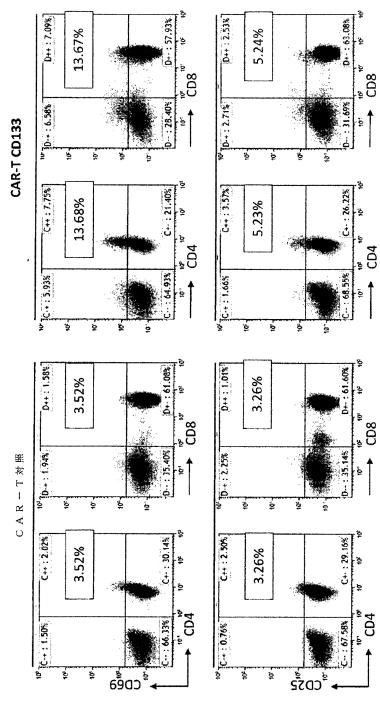
30

40

【図 1 5】

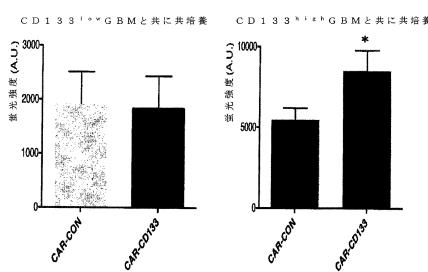


【図 1 6】

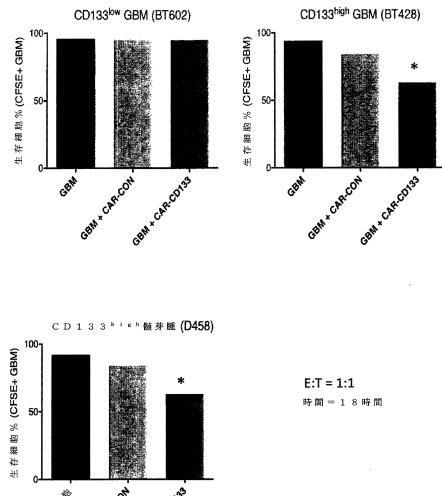


50

【図 17 A】

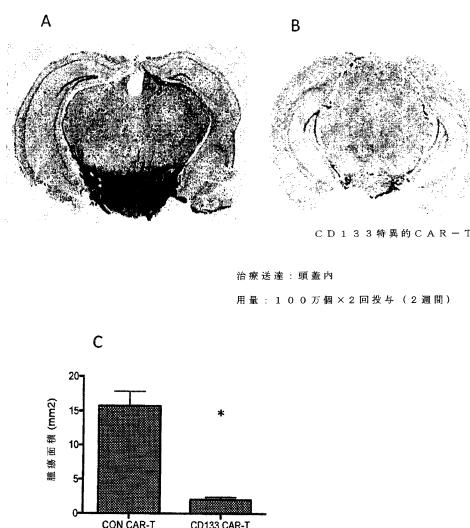


【図 17 B】

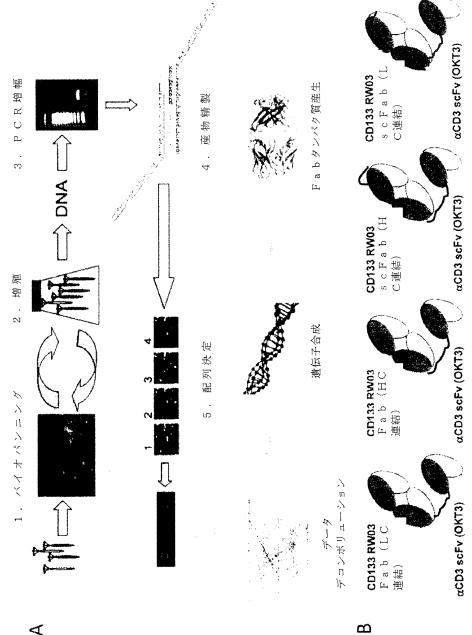


10

【図 18】



【図 19】



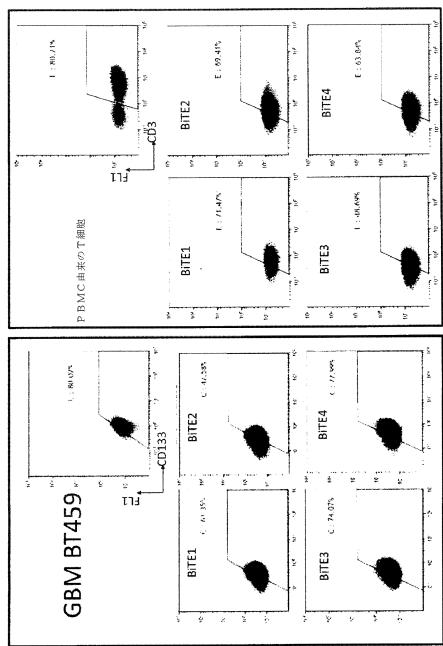
20

30

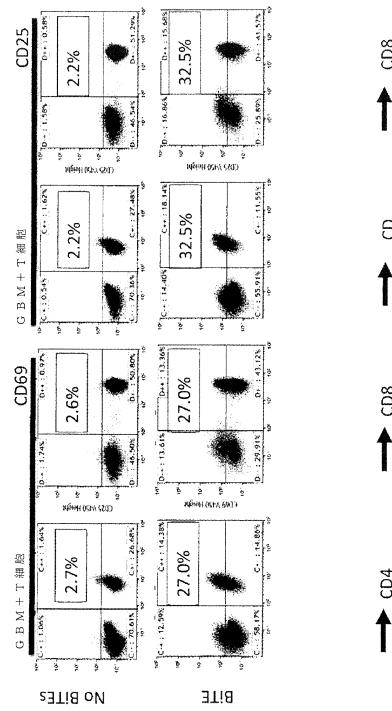
40

50

【図 20】



【図 21】

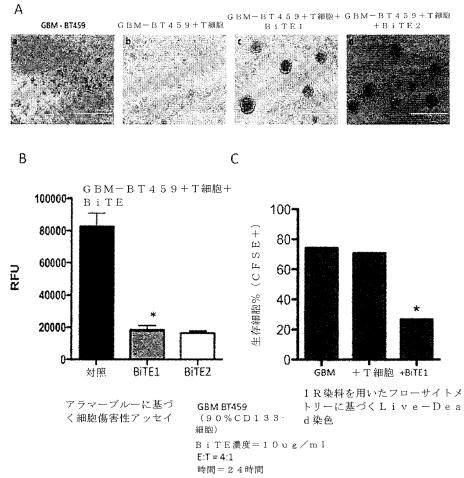


10

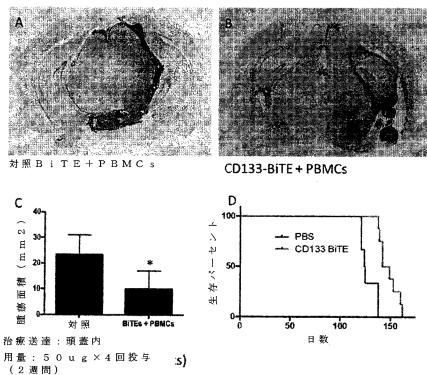
20

30

【図 22】



【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, グオーファ

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 チヤン, シャオユウ

カナダ国, オンタリオ州 エム5ジー 2ジー4, アパートメント 1423, 633 ベイストリート

(72)発明者 シン, シエイラ

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 ガーデンズ 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/1807/43333/11/Williams_Rashida_201311_MSc_thesis.pdf

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