

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6983779号
(P6983779)

(45) 発行日 令和3年12月17日 (2021. 12. 17)

(24) 登録日 令和3年11月26日 (2021. 11. 26)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/13 (2006. 01)	C 1 2 N 15/13 Z N A
C O 7 K 16/40 (2006. 01)	C O 7 K 16/40
C O 7 K 16/30 (2006. 01)	C O 7 K 16/30
C O 7 K 19/00 (2006. 01)	C O 7 K 19/00
C O 7 K 16/28 (2006. 01)	C O 7 K 16/28

請求項の数 32 (全 111 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-527874 (P2018-527874)	(73) 特許権者	506115514
(86) (22) 出願日	平成28年11月29日 (2016. 11. 29)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ カリフォルニア
(65) 公表番号	特表2019-505172 (P2019-505172A)		The Regents of the University of Calif ornia
(43) 公表日	平成31年2月28日 (2019. 2. 28)		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94 607-5200, オークランド, フラン クリン ストリート 1111, 12番 フロア
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/064033		
(87) 国際公開番号	W02017/095823	(74) 代理人	100108453
(87) 国際公開日	平成29年6月8日 (2017. 6. 8)		弁理士 村山 靖彦
審査請求日	令和1年11月29日 (2019. 11. 29)	(74) 代理人	100110364
(31) 優先権主張番号	62/261, 112		弁理士 実広 信哉
(32) 優先日	平成27年11月30日 (2015. 11. 30)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非常に特異的な腫瘍細胞表面抗原を標的とするヒト抗体を用いた腫瘍特異的パイロード送達及び免疫活性化

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトの胎盤に発現するALPPL2に特異的に結合する、単離された抗体又はその断片であって、少なくとも1つの重鎖可変領域(VH)及び少なくとも1つの軽鎖可変領域(VL)を含み、前記重鎖可変領域及び前記軽鎖可変領域が、アミノ酸配列GFTFSSYAからなるVH CDR1、アミノ酸配列ISYDGSNKからなるVH CDR2、及びアミノ酸配列AKEGDSSRWSYDLからなるVH CDR3、並びにアミノ酸配列SSDVGGYNYからなるVL CDR1、アミノ酸配列DVTからなるVL CDR2、及びアミノ酸配列SSYTIASLTVVからなるVL CDR3を含む、抗体又はその断片。

【請求項 2】

アミノ酸配列QVQLQQSGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMDSLRAEDTAVYYCAKEGDSSRWSYDLWGRGTLVTVSSからなる重鎖可変領域(VH)、及び

アミノ酸配列QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKVMIDVTNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCSSYTIASLTVVFGGGTKLTVLからなる軽鎖可変領域(VL)を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項 3】

実質的にインタクトな免疫グロブリンである、請求項1又は2に記載の抗体。

【請求項 4】

IgA、IgE又はIgGを含む、請求項3に記載の抗体。

【請求項 5】

10

20

IgGを含む、請求項3に記載の抗体。

【請求項6】

IgG1を含む、請求項3に記載の抗体。

【請求項7】

Fv、Fab、(Fab')₂、(Fab')₃、IgGΔCH2、及びミニボディからなる群から選択される、請求項1又は2に記載の抗体。

【請求項8】

一本鎖抗体である、請求項1又は2に記載の抗体。

【請求項9】

ヒトscFvである、請求項8に記載の抗体。

10

【請求項10】

前記重鎖可変領域が、アミノ酸配列(Gly₄Ser)₃(配列番号82)を含むか又はそれからなるリンカーによって前記軽鎖可変領域に接続されている、請求項9に記載の抗体。

【請求項11】

第2の抗体、検出可能な標識、細胞毒性剤又は細胞増殖抑制剤、薬物を含有するリポソーム、放射性核種、薬物、プロドラッグ、免疫調節剤、ウイルス粒子、サイトカイン、及びキレートからなる群から選択されるエフェクターに結合している、請求項1～10のいずれか一項に記載の抗体を含むイムノコンジュゲート。

【請求項12】

前記抗体が、細胞毒性剤及び/又は細胞増殖抑制剤に結合している、請求項11に記載のイムノコンジュゲート。

20

【請求項13】

前記抗体が、直接的に又はリンカーを介して、以下：

前記薬物；

前記薬物を含有する脂質又はリポソーム；

前記薬物を含む高分子薬物担体；及び

前記薬物を含むナノ粒子薬物担体

の1つ以上に結合している、請求項11に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項14】

前記薬物が抗癌剤である、請求項12又は13に記載のイムノコンジュゲート。

30

【請求項15】

前記薬物が、オーリスタチン、ドラスタチン-10、天然物であるドラスタチン-10の合成誘導体、及びメイタンシン又はメイタンシン誘導体からなる群から選択される薬物を含むか；又は

前記薬物が、モノメチルオーリスタチンF(MMAF)、オーリスタチンE(AE)、モノメチルオーリスタチンE(MMAE)、vcMMAE、及びvcMMAFからなる群から選択される薬物を含むか；又は

前記薬物が、メルタンシン(DM1)、DM3、及びDM4からなる群から選択されるメイタンシンを含むか；又は

前記薬物が、カリケアマイシン、デュオカルマイシン、及びピロロベンゾジアゼピンからなる群から選択されるか；又は

40

前記薬物が、カリケアマイシン又はカリケアマイシン類似体を含むか；又は

前記薬物がデュオカルマイシンを含むか；又は

前記薬物が、デュオカルマイシンA、デュオカルマイシンB1、デュオカルマイシンB2、デュオカルマイシンC1、デュオカルマイシンC2、デュオカルマイシンD、デュオカルマイシンSA、シクロプロピルベンゾインドールデュオカルマイシン(CC-1065)、センタナマイシン、ラケルマイシン、アドゼレシン、ビゼレシン、及びカルゼレシンからなる群から選択されるデュオカルマイシンを含むか；又は

前記薬物が、ピロロベンゾジアゼピンを含むか；又は

前記薬物が、アントラマイシン、マゼトラマイシン、トマイマイシン、プロトラカルシン、チカマイシン、ネオトラマイシンA、ネオトラマイシンB、DC-81、シビロマイシン、

50

ポロトラマイシンA、ポロトラマイシンB、シバノマイシン、アブベイマイシン、SG2000、及びSG2285からなる群から選択される薬物を含むか；又は

前記薬物が、オーリスタチン、ドラスタチン、コルヒチン、コンブレタスタチン、及びmTOR/PI3K阻害剤からなる群から選択されるか；又は

前記薬物が、フルオロウラシル(5-FU)、カベシタビン、5-トリフルオロメチル-2'-デオキシウリジン、メトトレキセートナトリウム、ラルチトレキセド、ペメトレキセド、シトシンアラビノシド、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、6-チオグアニン(6-TG)、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、クラドリビン、フロクスウリジン(5-フルオロ-2)、リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤(RNR)、シクロホスファミド、ネオサル、イフォスファミド、チオテパ、1,3-ビス(2-クロロエチル)-1-ニトロソウレア(BCNU)、1-(2-クロロエチル)-3-シクロヘキシル-1ニトロソウレア、メチル(CCNU)、ヘキサメチルメラミン、ブスルファン、プロカルバジンHCL、ダカルバジン(DTIC)、クロラムブシル、メルファラン、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ベンダムスチン、カルムスチン、クロロメチン、ダカルバジン(DTIC)、フォテムスチン、ロムスチン、マンノスルファン、ネダプラチン、ニムスチン、プレドニムスチン、ラニムスチン、サトラプラチン、セムスチン、ストレプトゾシン、テモゾロミド、トレオスルファン、トリアジクオン、トリエチレンメラミン、チオTEPA、四硝酸トリプラチン、トロフォスファミド、ウラムスチン、ドキソルピシン、クエン酸ダウノルビシン、ミトキサントロン、アクチノマイシンD、エトポシド、トポテカンHCL、テニポシド(VM-26)、イリノテカンHCL(CPT-11)、カンプトテシン、ベロテカン、ルビテカン、ビンクリスチン、硫酸ビンブラスチン、酒石酸ビノレルビン、硫酸ビンデシン、パクリタキセル、ドセタキセル、ナノ粒子パクリタキセル、アブラキサン、イクサベピロン、ラロタキセル、オルタタキセル、テセタキセル、ビンフルニン、レチノイン酸、レチノイン酸誘導体、ドキシルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、イフォスファミド、シスプラチン、5-フルオロウラシル、カンプトテシン誘導体、インターフェロン、タモキシフェン、及びタキソールからなる群、又はパミドロネートナトリウム、アナストロゾール、エキセメスタン、エピルビシン、トレミフェン、レトロゾール、トラスツズマブ、メゲストロールタモキシフェン、酢酸ゴセレリン、及びゾレドロン酸からなる抗癌化合物の群から選択される、

請求項14に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項16】

前記抗体が細胞毒素に結合しているか；又は

前記抗体が、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素、リシン、アブリン、サポリン、及びチミジンキナーゼからなる群から選択される細胞毒素に結合しているか；又は

前記抗体が、免疫調節剤に結合しているか；又は

前記抗体が、抗CD3抗体を含む免疫調節剤に結合しているか；又は

前記抗体が、免疫チェックポイントを阻止する免疫調節剤に結合しているか；又は

前記抗体が、抗CTLA4抗体、抗PDL1抗体、抗PDL2抗体、抗ICOS抗体、及び抗BTLA抗体からなる群から選択される抗体を含む免疫調節剤に結合しているか；又は

前記抗体が、イピリマブ、ニボルマブ、及びペンブロリズマブからなる群から選択される抗体のVH及びVLドメインを含む抗体である免疫調節剤に結合している、

請求項11に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項17】

前記抗体が、 ^{99}Tc 、 ^{97}Ru 、 ^{95}Ru 、 ^{94}Tc 、 ^{90}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{86}Y 、 ^{77}Br 、 ^{77}As 、 ^{76}Br 、 ^{75}Se 、 ^{72}As 、 ^{68}Ga 、 ^{67}Ga 、 ^{67}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{59}Fe 、 ^{58}Co 、 ^{57}Co 、 ^{52}Mn 、 ^{52}Fe 、 ^{51}Cr 、 ^{47}Sc 、 ^3H 、 ^{35}S 、 ^{33}P 、 ^{32}P 、 ^{225}Ac 、 ^{224}Ac 、 ^{223}Ra 、 ^{213}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{211}At 、 ^{203}Pb 、 ^{203}Hg 、 ^{201}Tl 、 ^{199}Au 、 ^{198}Au 、 ^{197}Pt 、 ^{18}F 、 ^{189}Re 、 ^{188}Re 、 ^{186}Re 、 ^{177}Lu 、 ^{175}Yb 、 ^{172}Tm 、 ^{169}Yb 、 ^{169}Er 、 ^{168}Tm 、 ^{167}Tm 、 ^{166}Ho 、 ^{166}Dy 、 ^{165}Tm 、 ^{165}Dy 、 ^{161}Tb 、 ^{15}O 、 ^{15}N 、 ^{159}Gd 、 ^{157}Gd 、 ^{153}Sm 、 ^{153}Pb 、 ^{151}Pm 、 ^{14}C 、 ^{149}Pm 、 ^{143}Pr 、 ^{142}Pr 、 ^{13}N 、 ^{133}I 、 ^{131}In 、 ^{131}I 、 ^{127}Te 、 ^{126}I 、 ^{125}Te 、 ^{125}I 、 ^{124}I 、 ^{123}I 、 ^{122}Te 、 ^{121}Te 、 ^{121}Sn 、 ^{11}C 、 ^{113}In 、 ^{111}In 、 ^{111}Ag 、 ^{109}Pd 、 ^{107}Hg 、 ^{105}Ru 、 ^{105}Rh 、及び ^{103}Ru からなる群から選択される同位体を含むキレートに

10

20

30

40

50

結合している、請求項11に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項18】

前記抗体が検出可能な標識に結合している、請求項11に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項19】

薬学的に許容される担体及び請求項1～10のいずれか一項に記載の抗体;及び/又は

薬学的に許容される担体及び請求項11～18のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲートを含む医薬製剤。

【請求項20】

経口投与、経鼻投与、直腸投与、腹腔内注射、血管内注射、皮下注射、経皮投与、及び筋肉内注射からなる群から選択される経路を介した投与用に製剤化される、請求項19に記載の医薬製剤。

10

【請求項21】

請求項11～17のいずれか一項に記載の抗ALPPL2イムノコンジュゲートを含む、細胞集団における腫瘍開始細胞を減少する、並びに/又はALPPL2を発現する細胞の成長及び/若しくは増殖を阻害するための組成物であって、前記イムノコンジュゲートを含むエフェクターが、細胞増殖抑制活性及び/又は細胞毒性活性及び/又は免疫調節活性を有する、組成物。

【請求項22】

前記細胞が、中皮腫、精巣癌、子宮内膜癌、並びに卵巣癌、膵臓癌、及び非小細胞肺癌のサブセットからなる群から選択される癌細胞である、請求項21に記載の組成物。

20

【請求項23】

請求項1～10のいずれか一項に記載の抗体を含むキメラ抗原受容体(CAR)。

【請求項24】

前記抗体;

膜貫通ドメイン;

少なくとも1つの共刺激シグナル伝達領域;及び

CD3ゼータシグナル伝達ドメイン

を含む、請求項23に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項25】

前記共刺激シグナル伝達領域が、CD27、CD2S、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される共刺激分子の細胞内ドメインを含む、請求項24に記載のキメラ抗原受容体。

30

【請求項26】

前記膜貫通ドメインが、CD8ヒンジドメイン又はその断片を含む、請求項24又は25に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項27】

請求項23～26のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列を含む細胞。

【請求項28】

T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、及び調節性T細胞からなる群から選択される;及び/又は

40

抗原結合ドメインがALPPL2を発現する細胞に結合する場合に、前記細胞が抗癌免疫応答を示す、請求項27に記載の細胞。

【請求項29】

請求項27又は28に記載の遺伝子操作された細胞(CAR-T細胞)、及び薬学的に許容される担体を含む、哺乳動物において癌を治療するための医薬組成物。

【請求項30】

請求項23～26のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変された細胞を含む組成物であって、

50

哺乳動物において、ALPPL2、又は抗体M25AD、M25ADX及び/若しくはM25によって結合されるALPPL2の領域を発現する標的細胞集団又は組織に対するT細胞媒介性免疫応答を刺激するための；又は

哺乳動物において、ALPPL2、並びに/又は抗体M25AD、M25ADX及び/若しくはM25によって結合されるALPPL2の領域を発現する腫瘍に対する抗腫瘍免疫を付与するための；又は

ALPPL2、又は抗体M25AD、M25ADX及び/若しくはM25によって結合されるALPPL2の領域を発現する細胞を含む癌を有する哺乳動物を治療するための；又は

癌と診断された哺乳動物において遺伝子操作されたT細胞の持続的集団を生成するための；又は

癌と診断された哺乳動物において、遺伝子操作されたT細胞の集団を増殖させるための；
又は

癌を治療するための、
組成物。

【請求項 3 1】

請求項11～17のいずれか一項に記載の抗ALPPL2イムノコンジュゲートを含む組成物であって、前記イムノコンジュゲートを含むエフェクターが、細胞増殖抑制活性及び/又は細胞毒性活性を有する、組成物の、細胞集団における腫瘍開始細胞を減少する、並びに/又はALPPL2を発現する細胞の成長及び/若しくは増殖を阻害するための医薬の製造における使用。

【請求項 3 2】

請求項23～26のいずれか一項に記載のキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変された細胞を含む組成物の、

哺乳動物において、ALPPL2、又は抗体M25AD、M25ADX及び/若しくはM25によって結合されるALPPL2の領域を発現する標的細胞集団又は組織に対するT細胞媒介性免疫応答を刺激するための；又は

哺乳動物において、ALPPL2、並びに/又は抗体M25AD、M25ADX及び/若しくはM25によって結合されるALPPL2の領域を発現する腫瘍に対する抗腫瘍免疫を付与するための；又は

ALPPL2、又は抗体M25AD、M25ADX及び/若しくはM25によって結合されるALPPL2の領域を発現する細胞を含む癌を有する哺乳動物を治療するための；又は

癌と診断された哺乳動物において遺伝子操作されたT細胞の持続的集団を生成するための；又は

癌と診断された哺乳動物において、遺伝子操作されたT細胞の集団を増殖させるための；
又は

癌を治療するための、
医薬の製造における使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、全ての目的で全体が参照により本明細書に組み込まれる、2015年11月30日に
出願された米国仮特許出願第62/261,112号の利益及び優先権を主張する。

【0002】

政府支援の陳述

本発明は、国立衛生研究所から付与された助成金R01 CA129491、R01 CA118919、及びR01 CA171315の下での政府支援によってなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

抗体薬物コンジュゲート(ADC)及び免疫療法を含むいくつかの有望なプラットフォームに沿って、癌療法は進んでいる。ADC分野では、持続的応答を達成することが課題である。免疫療法では、応答が持続可能である一方で、処置された患者のほんの一部が応答し、

10

20

30

40

50

このアプローチは少数のタイプの癌にのみ作用する(Rizviら、(2015年) Lancet Oncol., 16巻: 257~265頁; Topalianら、(2012年) N. E. J. M. 366巻: 2443~2454頁)。応答者対非応答者を予測するためのバイオマーカーを開発することに加えて、免疫療法分野の主な課題は、応答率を高め、より広範な適応症への適用性を拡大することである。

【0004】

ADCで持続的応答を達成するために、この分野は、分裂腫瘍細胞と休止腫瘍細胞の両方を死滅させる超毒性薬物(例えば、PBD及び他のDNAキレート剤)を伴う武装抗体に向かう傾向にあり、オーリスタチン誘導体等の微小管阻害剤よりも桁違いに強力である(Jeffreyら、(2013年) Bioconjug. Chem., 24巻: 1256~1263頁; Kungら、(2013年) Blood 122巻: 1455~1463頁; Saundersら、(2015年) Sci. Transl. Med. 7巻: 302ra136)。このアプローチは、特に固形腫瘍において、抗体へのコンジュゲーションによる薬物送達の相対的な非効率を補うために必要であり得る。血液悪性腫瘍(AMLにおけるCD33-PBD)(Steinら、(2014年) Interim Analysis of a Phase 1 Trial of SGN-CD33A in Patients with CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia (AML). 56th ASH annual meeting Session 616)と固形腫瘍(神経内分泌小細胞肺癌におけるDLL3-PBD)(Pietanzaら、(2015年) Eur. J. Canc. 51巻(3号): S712)の両方において、これらの超毒素で武装されたADCを用いた、持続的応答を有する有望な臨床試験結果が報告されている。このアプローチを他の腫瘍にうまく適応させるための前提条件は、高度に特異的であり、高度に発現された腫瘍抗原の同定であり、そのため、標的となる毒性は最小レベルに保たれる。

【0005】

応答者対非応答者のより良い理解、応答及び毒性との関連でのT細胞レパートリー多様化又はクローン性発生の分析、及びチェックポイント阻害剤コンボ(CTLA-4+PD1)、チェックポイント阻害剤+ケモ、及びワクチン+チェックポイント阻害剤等の併用療法を含む現在の免疫療法を改善する多くの方法がある。癌に対する宿主免疫系の能力を利用する更に別のアプローチは、T細胞の部位特異的な動員及び活性化に基づく。例えば、二重特異性抗体は、BiTE(二重特異性T細胞エンゲージャー)(Harringtonら、(2015年) PloS One 10: e0135945; Klingerら、(2012年) Blood, 119巻: 6226~6233頁; Molhojら、(2007年) Mol. Immunol. 44巻: 1935~1943頁)又はDART(二重親和性再標的化)プラットフォーム(Chichiliriら、(2015年) Sci. Transl. Med. 7巻: 289ra282; Mooreら、(2011年) Blood, 117巻: 4542~4551頁)のいずれかを用いて、抗腫瘍及び抗T細胞(例えば、CD3)抗体断片を組み合わせることによって構築することができる。有望であるが、このアプローチを適用するには、標的となる毒性を最小限にし、治療域を拡大するために、非常に特異的な腫瘍細胞表面抗原の同定が必要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】 W099/55720

【特許文献2】 米国特許第6,670,188号

【特許文献3】 米国特許第6,642,051号

【特許文献4】 米国特許第6,669,936号

【特許文献5】 W01994/011026(PCT/US1993/010953)

【特許文献6】 欧州特許出願第188,256号

【特許文献7】 米国特許第4,671,958号

【特許文献8】 米国特許第4,659,839号

【特許文献9】 米国特許第4,414,148号

【特許文献10】 米国特許第4,699,784号

【特許文献11】 米国特許第4,680,338号

【特許文献12】 米国特許第4,569,789号

【特許文献13】 米国特許第4,589,071号

【特許文献14】 米国特許第4,545,985号

【特許文献 1 5】	米国特許第4,894,443号	
【特許文献 1 6】	米国特許第4,618,492号	
【特許文献 1 7】	米国特許第4,542,225号	
【特許文献 1 8】	米国特許第4,625,014号	
【特許文献 1 9】	米国特許第5,773,001号	
【特許文献 2 0】	米国特許第4,957,735号	
【特許文献 2 1】	米国特許第6,190,923号	
【特許文献 2 2】	米国特許第6,187,285号	
【特許文献 2 3】	米国特許第6,183,721号	
【特許文献 2 4】	米国特許第6,177,562号	10
【特許文献 2 5】	米国特許第6,159,445号	
【特許文献 2 6】	米国特許第6,153,775号	
【特許文献 2 7】	米国特許第6,149,890号	
【特許文献 2 8】	米国特許第6,143,276号	
【特許文献 2 9】	米国特許第6,143,274号	
【特許文献 3 0】	米国特許第6,139,819号	
【特許文献 3 1】	米国特許第6,132,764号	
【特許文献 3 2】	米国特許第6,123,923号	
【特許文献 3 3】	米国特許第6,123,921号	
【特許文献 3 4】	米国特許第6,120,768号	20
【特許文献 3 5】	米国特許第6,120,751号	
【特許文献 3 6】	米国特許第6,117,412号	
【特許文献 3 7】	米国特許第6,106,866号	
【特許文献 3 8】	米国特許第6,096,290号	
【特許文献 3 9】	米国特許第6,093,382号	
【特許文献 4 0】	米国特許第6,090,800号	
【特許文献 4 1】	米国特許第6,090,408号	
【特許文献 4 2】	米国特許第6,088,613号	
【特許文献 4 3】	米国特許第6,077,499号	
【特許文献 4 4】	米国特許第6,075,010号	30
【特許文献 4 5】	米国特許第6,071,494号	
【特許文献 4 6】	米国特許第6,071,490号	
【特許文献 4 7】	米国特許第6,060,040号	
【特許文献 4 8】	米国特許第6,056,939号	
【特許文献 4 9】	米国特許第6,051,207号	
【特許文献 5 0】	米国特許第6,048,979号	
【特許文献 5 1】	米国特許第6,045,821号	
【特許文献 5 2】	米国特許第6,045,775号	
【特許文献 5 3】	米国特許第6,030,840号	
【特許文献 5 4】	米国特許第6,028,066号	40
【特許文献 5 5】	米国特許第6,022,966号	
【特許文献 5 6】	米国特許第6,022,523号	
【特許文献 5 7】	米国特許第6,022,522号	
【特許文献 5 8】	米国特許第6,017,522号	
【特許文献 5 9】	米国特許第6,015,897号	
【特許文献 6 0】	米国特許第6,010,682号	
【特許文献 6 1】	米国特許第6,010,681号	
【特許文献 6 2】	米国特許第6,004,533号	
【特許文献 6 3】	米国特許第6,001,329号	
【特許文献 6 4】	米国特許第6,024,938号	50

【特許文献 6 5】	米国特許第4,458,066号	
【特許文献 6 6】	米国特許第5,399,163号	
【特許文献 6 7】	米国特許第5,383,851号	
【特許文献 6 8】	米国特許第5,312,335号	
【特許文献 6 9】	米国特許第5,064,413号	
【特許文献 7 0】	米国特許第4,941,880号	
【特許文献 7 1】	米国特許第4,790,824号	
【特許文献 7 2】	米国特許第4,596,556号	
【特許文献 7 3】	米国特許第4,487,603号	
【特許文献 7 4】	米国特許第4,486,194号	10
【特許文献 7 5】	米国特許第4,447,233号	
【特許文献 7 6】	米国特許第4,447,224号	
【特許文献 7 7】	米国特許第4,439,196号	
【特許文献 7 8】	米国特許第4,475,196号	
【特許文献 7 9】	米国特許第4,522,811号	
【特許文献 8 0】	米国特許第5,374,548号	
【特許文献 8 1】	米国特許第5,399,331号	
【特許文献 8 2】	米国特許第5,416,016号	
【特許文献 8 3】	米国特許第5,399,346号	
【特許文献 8 4】	米国特許第5,580,859号	20
【特許文献 8 5】	米国特許第5,589,466号	
【特許文献 8 6】	W001/96584	
【特許文献 8 7】	W001/29058	
【特許文献 8 8】	米国特許第6,326,193号	
【特許文献 8 9】	米国特許第5,350,674号	
【特許文献 9 0】	米国特許第5,585,362号	
【特許文献 9 1】	米国特許第6,352,694号	
【特許文献 9 2】	米国特許第6,534,055号	
【特許文献 9 3】	米国特許第6,905,680号	
【特許文献 9 4】	米国特許第6,692,964号	30
【特許文献 9 5】	米国特許第5,858,358号	
【特許文献 9 6】	米国特許第6,887,466号	
【特許文献 9 7】	米国特許第6,905,681号	
【特許文献 9 8】	米国特許第7,144,575号	
【特許文献 9 9】	米国特許第7,067,318号	
【特許文献 1 0 0】	米国特許第7,172,869号	
【特許文献 1 0 1】	米国特許第7,232,566号	
【特許文献 1 0 2】	米国特許第7,175,843号	
【特許文献 1 0 3】	米国特許第5,883,223号	
【特許文献 1 0 4】	米国特許第6,905,874号	40
【特許文献 1 0 5】	米国特許第6,797,514号	
【特許文献 1 0 6】	米国特許第6,867,041号	
【特許文献 1 0 7】	米国特許公開公報第2006/0121005号	
【特許文献 1 0 8】	米国特許公開公報第2004/0101519号	
【特許文献 1 0 9】	米国特許公開公報第2006/0034810号	
【特許文献 1 1 0】	米国特許第5,199,942号	
【非特許文献】		
【0 0 0 7】		
【非特許文献 1】	Rizviら、(2015年) Lancet Oncol., 16巻: 257~265頁	
【非特許文献 2】	Topalianら、(2012年) N. E. J. M. 366巻: 2443~2454頁	50

- 【非特許文献3】Jeffreyら、(2013年) *Bioconjug. Chem.*, 24巻: 1256~1263頁
- 【非特許文献4】Kungら、(2013年) *Blood* 122巻: 1455~1463頁
- 【非特許文献5】Saundersら、(2015年) *Sci. Transl. Med.* 7巻: 302ra136
- 【非特許文献6】Steinら、(2014年) Interim Analysis of a Phase 1 Trial of SGN-CD3 3A in Patients with CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia (AML). 56th ASH annual meeting Session 616
- 【非特許文献7】Pietanzaら、(2015年) *Eur. J. Canc.* 51巻(3号): S712
- 【非特許文献8】Harringtonら、(2015年) *PloS One* 10: e0135945
- 【非特許文献9】Klingerら、(2012年) *Blood*, 119巻: 6226~6233頁
- 【非特許文献10】Molhojら、(2007年) *Mol. Immunol.* 44巻: 1935~1943頁 10
- 【非特許文献11】Chichiliら、(2015年) *Sci. Transl. Med.* 7巻: 289ra282
- 【非特許文献12】Mooreら、(2011年) *Blood*, 117巻: 4542~4551頁
- 【非特許文献13】Vitettaら(1987年)、*Science* 238、1098頁
- 【非特許文献14】Junutulaら(2008年)、*J. Immunol. Meth.* 332、41~52頁
- 【非特許文献15】Boswellら(2011年)、*Bioconjug. Chem.* 22、1994~2004頁
- 【非特許文献16】Boswellら(2012年)、*Soc. Nuclear Med.* 53、1454~1461頁
- 【非特許文献17】Shenら(2012年)、*Nat. Biotechnol.* 30、184~189頁
- 【非特許文献18】Kryukovら(2003)、*Science*, 300、1439~1443頁
- 【非特許文献19】Caban及びCopeland(2006年)、*Cell Mol. Life Sci.* 63、73~81頁
- 【非特許文献20】Hoferら(2009年)、*Biochem.* 48、12047~12057頁 20
- 【非特許文献21】Liuら(2007)、*Nat. Meth.* 4、239~244頁
- 【非特許文献22】Wangら(2003年)、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100、56~61頁
- 【非特許文献23】Axup(2012年)、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109、16101~16116頁
- 【非特許文献24】Young(2002年)、*J. Mol. Biol.* 395、361~374頁
- 【非特許文献25】Kiickら(2002年)、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99、19~24頁
- 【非特許文献26】Qasbaら(2005年)、*Trends Biochem. Sci.* 30、53~62頁
- 【非特許文献27】Ramakrishnanら(2002年)、*J. Biol. Chem.* 277、20833~20839頁
- 【非特許文献28】Boeggemanら(2009年)、*Bioconjug. Chem.* 20、1228~1236頁
- 【非特許文献29】Yokoyamaら(2004年)、*ALPP. Microbiol. Biotechnol.* 64、447~454頁 30
- 【非特許文献30】Jegerら(2010年)、*Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 49、9995~9997頁
- 【非特許文献31】Stropら(2013年)、*Chem. Biol.* 20、161~167頁
- 【非特許文献32】Sunbul及びYin(2009年)、*Org. Biomol. Chem.* 7、3361~3371頁
- 【非特許文献33】Borlinghausら(1987年)、*Cancer Res.* 47、4071~4075頁
- 【非特許文献34】「Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet」、Thorpeら、*Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*、Academic Press社、168~190頁(1982年)
- 【非特許文献35】Waldmann(1991年)、*Science*, 252、1657頁
- 【非特許文献36】Connorら(1985年)、*Pharm. Ther.*, 28、341~365頁
- 【非特許文献37】Bakkerら(1990年)、*J. Nucl. Med.* 31、1501~1509頁 40
- 【非特許文献38】Chattopadhyayら(2001年)、*Nucl. Med. Biol.* 28、741~744頁
- 【非特許文献39】Dewanjeeら(1994年)、*J. Nucl. Med.* 35、1054~63頁
- 【非特許文献40】Krenningら(1989年)、*Lancet* 1、242~244頁
- 【非特許文献41】Sagiuchiら(2001年)、*Ann. Nucl. Med.* 15、267~270頁
- 【非特許文献42】Yooら(1997年)、*J. Nucl. Med.* 38、294~300頁
- 【非特許文献43】*The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology.*、2巻、*Special Methods in Peptide Synthesis*、Part A中のBarany及びMerrifield、*Solid-Phase Peptide Synthesis*、3~284頁
- 【非特許文献44】Merrifieldら、*J. Am. Chem. Soc.*, 85、2149~2156頁(1963年)
- 【非特許文献45】Stewartら、*Solid Phase Peptide Synthesis*、第2版、Pierce Chem. 50

Co. 社、Rockford, Ill.(1984年)

【非特許文献 4 6】Narangら(1979年)、Meth. Enzymol. 68、90～99頁

【非特許文献 4 7】Brownら(1979年)、Meth. Enzymol. 68、109～151頁

【非特許文献 4 8】Beaucageら(1981年)、Tetra. Lett., 22、1859～1862頁

【非特許文献 4 9】R. Scopes(1982年)、Protein Purification、Springer-Verlag社、N. Y.

【非特許文献 5 0】Deutscher(1990年)、Methods in Enzymology、182巻、Guide to Protein Purification.、Academic Press, Inc. 社、N.Y.

【非特許文献 5 1】Debinskiら(1993年)、J. Biol. Chem., 268、14065～14070頁

【非特許文献 5 2】Kreitman及びPastan(1993年)、Bioconjug. Chem., 4、581～585頁

【非特許文献 5 3】Buchnerら(1992年)、Anal. Biochem., 205、263～270頁

【非特許文献 5 4】March(1992年)、Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanisms and Structure、第4版、N.Y. Wiley-Interscience社

【非特許文献 5 5】Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems、J. R. Robinson編、Marcel Dekker, Inc. 社、New York、1978年

【非特許文献 5 6】Strejanら(1984年)、J. Neuroimmunol, 7、27頁

【非特許文献 5 7】Ranadeら(1989年)、J. Clin. Pharmacol. 29、685頁

【非特許文献 5 8】Umezawaら(1988年)、Biochem. Biophys. Res. Commun. 153、1038頁

【非特許文献 5 9】Bloemanら(1995年)、FEBS Lett. 357、140頁

【非特許文献 6 0】Owaisら(1995年)、Antimicrob. Agents Chemother. 39、180頁

【非特許文献 6 1】Briscoeら(1995年)、Am. J. Physiol. 1233、134頁

【非特許文献 6 2】Nakazawaら(2013年)、Shinshu Med. J. 61(4)、197～203頁

【非特許文献 6 3】Sambrookら(2001年)、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory社、New York

【非特許文献 6 4】Ui-Teiら(2000年)、FEBS Letts. 479、79～82頁

【非特許文献 6 5】Ghoshら(1991年)、Glycobiology 5、505～510頁

【非特許文献 6 6】Bergら(1998年)、Transplant Proc. 30(8)、3975～3977頁、1998年

【非特許文献 6 7】Haanenら(1999年)、J. Exp. Med. 190(9)、1319～1328頁

【非特許文献 6 8】Garlandら(1999年)、J. Immunol Meth. 227(1-2)、53～63頁

【非特許文献 6 9】Rosenbergら(1988年)、New Eng. J. Med. 319、1676頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本明細書において企図される様々な実施形態は、限定されないが、以下のうちの1つ以上を含むことができる。

【0009】

実施形態1:胎盤外で発現するALPL及びALPIではなく、ヒトの胎盤に発現するALPP及び/又はALPL2に特異的に結合する単離された抗体又はその断片。

【0010】

実施形態2:上記抗体が、ALPL2及び/又はALPPを発現している細胞に特異的に結合する抗体であって、上記抗体が、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPL2rd3_1、ALPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFからなる群から選択される1つ以上の抗体によって結合されるエピトープに特異的に結合する、実施形態1の抗体。

【0011】

実施形態3:上記抗体が、ALPL2の放出/溶液形態と比較して、ALPL2の細胞表面形態に優先的に結合する、実施形態1～2のいずれか1つに記載の抗体。

10

20

30

40

50

【0012】

実施形態4: 上記抗体が、ALPPL2を発現している細胞に、約5nMより良好な親和性、又は約3nMより良好な親和性、又は約2nM又はそれより良好な親和性で結合する、実施形態1～3のいずれか1つに記載の抗体。

【0013】

実施形態5: 上記抗体が、そのIgG1形態で、ALPPL2を発現している細胞に、約50pMより良好な親和性で、又は約40pMより良好な親和性で、又は約30pMより良好な親和性で、又は約28pMの見かけの親和性で結合する、実施形態1～3のいずれか1つに記載の抗体。

【0014】

実施形態6: ALPP及び/又はALPPL2を発現している上記細胞が癌細胞である、実施形態2～5のいずれか1つに記載の抗体。

10

【0015】

実施形態7: 発現する又は過剰発現する上記細胞が、中皮腫、精巣癌、子宮内膜癌、並びに卵巣、膵臓、及び非小細胞肺癌のサブセットからなる群から選択される癌の細胞である、実施形態2～6のいずれか1つに記載の抗体。

【0016】

実施形態8: 上記抗体が、M28、VAMT-1、CAPAN-1、及びH1651細胞からなる群から選択される細胞株の細胞に結合する、実施形態7に記載の抗体。

【0017】

実施形態9: 上記抗体が、少なくとも1つの重鎖可変領域(VH)及び少なくとも1つの軽鎖可変領域(VL)を含み、上記重鎖可変領域が、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFからなる群から選択される抗体のVH CDR1、及び/又はVH CDR2、及び/又はVH CDR3を含有する、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

20

【0018】

実施形態10: 上記抗体が、少なくとも1つの重鎖可変領域(VH)及び少なくとも1つの軽鎖可変領域(VL)を含み、上記軽鎖可変領域が、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFからなる群から選択される抗体のVL CDR1、及び/又はVL CDR2、及び/又はVL CDR3を含有する、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

30

【0019】

実施形態11: 上記抗体が、少なくとも1つの重鎖可変領域(VH)及び少なくとも1つの軽鎖可変領域(VL)を含み、上記重鎖可変領域が、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFからなる群から選択される抗体の重鎖可変領域である、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

40

【0020】

実施形態12: 上記抗体が、M25ADLF抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

50

【0021】

実施形態13:上記抗体が、M25ADLFEG抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0022】

実施形態14:上記抗体が、M25ADLFDS抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0023】

実施形態15:上記抗体が、M25FYIA抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0024】

実施形態16:上記抗体が、M25FYIAEG抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0025】

実施形態17:上記抗体が、M25FYIADS抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0026】

実施形態18:上記抗体が、M25抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0027】

実施形態19:上記抗体が、M25EG抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0028】

実施形態20:上記抗体が、M25DS抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0029】

実施形態21:上記抗体が、M25AELF抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0030】

実施形態22:上記抗体が、M25AELFEG抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0031】

実施形態23:上記抗体が、M25AELFDS抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0032】

実施形態24:上記抗体が、M25ADL99P抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0033】

実施形態25:上記抗体が、M25ADL99G抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0034】

実施形態26:上記抗体が、M25ADS95R抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0035】

実施形態27:上記抗体が、M25ADD28G抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0036】

実施形態28:上記抗体が、M25ADS91G抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0037】

実施形態29:上記抗体が、M25ADY93H抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、

10

20

30

40

50

実施形態11に記載の抗体。

【0038】

実施形態30:上記抗体が、M25ADYHSRLF抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0039】

実施形態31:上記抗体が、M25GRITSGFYGDwtLC抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0040】

実施形態32:上記抗体が、M25FSITSGFYGDwtLC抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

10

【0041】

実施形態33:上記抗体が、M253018IA抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0042】

実施形態34:上記抗体が、M253018LF抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0043】

実施形態35:上記抗体が、M25AD抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0044】

20

実施形態36:上記抗体が、M25ADX抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0045】

実施形態37:上記抗体が、ALPPL2rd3_1抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0046】

実施形態38:上記抗体が、ALPPL2rd3_2抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0047】

実施形態39:上記抗体が、M25AGIA抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

30

【0048】

実施形態40:上記抗体が、M25AGLF抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0049】

実施形態41:上記抗体が、M25ASIA抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0050】

実施形態42:上記抗体が、M25ASLF抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

40

【0051】

実施形態43:上記抗体が、M25ASwt抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0052】

実施形態44:上記抗体が、M25AVIA抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0053】

実施形態45:上記抗体が、M25AVLF抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0054】

50

実施形態46:上記抗体が、M25ALIA抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0055】

実施形態47:上記抗体が、M25ALLF抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0056】

実施形態48:上記抗体が、M25wtIA抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0057】

実施形態49:上記抗体が、M25wtLF抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含有する、実施形態11に記載の抗体。

【0058】

実施形態50:上記抗体が、少なくとも1つの重鎖可変領域(VH)及び少なくとも1つの軽鎖可変領域(VL)を含み、上記軽鎖可変領域が、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFからなる群から選択される抗体の軽鎖可変領域である、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0059】

実施形態51:上記抗体が、M25ADLF抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0060】

実施形態52:上記抗体が、M25ADLFEG抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0061】

実施形態53:上記抗体が、M25ADLFDS抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0062】

実施形態54:上記抗体が、M25FYIA抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0063】

実施形態55:上記抗体が、M25FYIAEG抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0064】

実施形態56:上記抗体が、M25FYIADS抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0065】

実施形態57:上記抗体が、M25抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0066】

実施形態58:上記抗体が、M25EG抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0067】

実施形態59:上記抗体が、M25DS抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0068】

実施形態60:上記抗体が、M25AELF抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

10

20

30

40

50

【0069】

実施形態61:上記抗体が、M25AELFEG抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0070】

実施形態62:上記抗体が、M25AELFDS抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0071】

実施形態63:上記抗体が、M25ADL99P抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0072】

実施形態64:上記抗体が、M25ADL99G抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0073】

実施形態65:上記抗体が、M25ADS95R抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0074】

実施形態66:上記抗体が、M25ADD28G抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0075】

実施形態67:上記抗体が、M25ADS91G抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0076】

実施形態68:上記抗体が、M25ADY93H抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0077】

実施形態69:上記抗体が、M25ADYHSRLF抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0078】

実施形態70:上記抗体が、M25GRITSGFYGDwtLC抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0079】

実施形態71:上記抗体が、M25FSITSGFYGDwtLC抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0080】

実施形態72:上記抗体が、M253018IA抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0081】

実施形態73:上記抗体が、M253018LF抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0082】

実施形態74:上記抗体が、M25AD抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0083】

実施形態75:上記抗体が、M25ADX抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0084】

実施形態76:上記抗体が、ALPPL2rd3_1抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0085】

実施形態77:上記抗体が、ALPPL2rd3_2抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する

10

20

30

40

50

、実施形態50に記載の抗体。

【0086】

実施形態78:上記抗体が、M25AGIA抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0087】

実施形態79:上記抗体が、M25AGLF抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0088】

実施形態80:上記抗体が、M25ASIA抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

10

【0089】

実施形態81:上記抗体が、M25ASLF抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0090】

実施形態82:上記抗体が、M25ASwt抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0091】

実施形態83:上記抗体が、M25AVIA抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0092】

20

実施形態84:上記抗体が、M25AVLF抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0093】

実施形態85:上記抗体が、M25ALIA抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0094】

実施形態86:上記抗体が、M25ALLF抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0095】

実施形態87:上記抗体が、M25wtIA抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

30

【0096】

実施形態88:上記抗体が、M25wtLF抗体の少なくとも1つの軽鎖可変領域を含有する、実施形態50に記載の抗体。

【0097】

実施形態89:上記抗体が、M25ADLF抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25ADLF抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0098】

実施形態90:上記抗体が、M25ADLFEG抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25ADLFEG抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

40

【0099】

実施形態91:上記抗体が、M25ADLFDS抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25ADLFDS抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0100】

実施形態92:上記抗体が、M25FYIA抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25FYIA抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0101】

実施形態93:上記抗体が、M25FYIAEG抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25FYIAEG抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0102】

50

実施形態94:上記抗体が、M25FYIADS抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25FYIADS抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0103】

実施形態95:上記抗体が、M25抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0104】

実施形態96:上記抗体が、M25EG抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25EG抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0105】

実施形態97:上記抗体が、M25DS抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25DS抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。 10

【0106】

実施形態98:上記抗体が、M25AELF抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25AELF抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0107】

実施形態99:上記抗体が、M25AELFEG抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25AELFEG抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0108】

実施形態100:上記抗体が、M25AELFDS抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25AELFDS抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。 20

【0109】

実施形態101:上記抗体が、M25ADL99P抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25ADL99P抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0110】

実施形態102:上記抗体が、M25ADL99G抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25ADL99G抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0111】

実施形態103:上記抗体が、M25ADS95R抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25ADS95R抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0112】

実施形態104:上記抗体が、M25ADD28G抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25ADD28G抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。 30

【0113】

実施形態105:上記抗体が、M25ADS91G抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25ADS91G抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0114】

実施形態106:上記抗体が、M25ADY93H抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25ADY93H抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0115】

実施形態107:上記抗体が、M25ADYHSRLF抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25ADYHSRLF抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。 40

【0116】

実施形態108:上記抗体が、M25GRITSGFYGDwtLC抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25GRITSGFYGDwtLC抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0117】

実施形態109:上記抗体が、M25FSITSGFYGDwtLC抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25FSITSGFYGDwtLC抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0118】

実施形態110:上記抗体が、M253018IA抗体の重鎖可変領域(VH)及びM253018IA抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。 50

【0119】

実施形態111:上記抗体が、M253018LF抗体の重鎖可変領域(VH)及びM253018LF抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0120】

実施形態112:上記抗体が、M25AD抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25AD抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0121】

実施形態113:上記抗体が、M25ADX抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25ADX抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0122】

実施形態114:上記抗体が、ALPPL2rd3_1抗体の重鎖可変領域(VH)及びALPPL2rd3_1抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0123】

実施形態115:上記抗体が、ALPPL2rd3_2抗体の重鎖可変領域(VH)及びALPPL2rd3_2抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0124】

実施形態116:上記抗体が、M25AGIA抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25AGIA抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0125】

実施形態117:上記抗体が、M25AGLF抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25AGLF抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0126】

実施形態118:上記抗体が、M25ASIA抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25ASIA抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0127】

実施形態119:上記抗体が、M25ASLF抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25ASLF抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0128】

実施形態120:上記抗体が、M25ASwt抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25ASwt抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0129】

実施形態121:上記抗体が、M25AVIA抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25AVIA抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0130】

実施形態122:上記抗体が、M25AVLF抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25AVLF抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0131】

実施形態123:上記抗体が、M25ALIA抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25ALIA抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0132】

実施形態124:上記抗体が、M25ALLF抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25ALLF抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0133】

実施形態125:上記抗体が、M25wtIA抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25wtIA抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0134】

実施形態126:上記抗体が、M25wtLF抗体の重鎖可変領域(VH)及びM25wtLF抗体の軽鎖可変領域(VL)を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の抗体。

【0135】

実施形態127:上記抗体が、実施的にインタクトな免疫グロブリンである、実施形態1～1

10

20

30

40

50

26のいずれか1つに記載の抗体。

【0136】

実施形態128:上記抗体が、IgA、IgE、又はIgGを含む、実施形態127に記載の抗体。

【0137】

実施形態129:上記抗体がIgGを含む、実施形態127に記載の抗体。

【0138】

実施形態130:上記抗体がIgG1を含む、実施形態127に記載の抗体。

【0139】

実施形態131:上記抗体が、ALPP及び/又はALPPL2を発現している細胞に特異的に結合する抗体断片である、実施形態1～126のいずれか1つに記載の抗体。

10

【0140】

実施形態132:上記抗体が、Fv、Fab、(Fab')₂、(Fab')₃、IgGΔCH2、及びミニボディからなる群から選択される抗体断片である、実施形態131に記載の抗体。

【0141】

実施形態133:上記抗体が一本鎖抗体である、実施形態1～126のいずれか1つに記載の抗体。

【0142】

実施形態134:上記抗体がヒトscFvである、実施形態133に記載の抗体。

【0143】

実施形態135:上記重鎖可変領域が、アミノ酸配列(Gly₄Ser)₃(配列番号82)を含む又はそれからなるリンカーによって上記軽鎖可変領域に接続される、実施形態134に記載の抗体。

20

【0144】

実施形態136:エフェクターに結合された実施形態1～135のいずれか1つに記載の抗体を含むイムノコンジュゲートであって、上記エフェクターが、第2の抗体、検出可能な標識、細胞毒性剤又は細胞増殖抑制剤、薬物を含有するリポソーム、放射性核種、薬物、プロドラッグ、免疫調節剤、ウイルス粒子、サイトカイン、第2の抗体、及びキレートからなる群から選択される、イムノコンジュゲート。

【0145】

実施形態137:上記抗体が、細胞毒性剤及び/又は細胞増殖抑制剤に結合している、実施形態136に記載のイムノコンジュゲート。

30

【0146】

実施形態138:上記抗体が、直接的又はリンカーを介して、以下:上記薬物;上記薬物を含有する脂質又はリポソーム;上記薬物を含有する高分子薬物担体;及び上記薬物を含有するナノ粒子薬物担体の1つ以上に結合している、実施形態136に記載のイムノコンジュゲート。

【0147】

実施形態139:上記薬物が抗癌剤である、実施形態137～138のいずれか1つに記載のイムノコンジュゲート。

【0148】

実施形態140:上記薬物が、微小管障害剤、DNA損傷剤、及びポリメラーゼ障害剤からなる群から選択される、実施形態137～138のいずれか1つに記載のイムノコンジュゲート。

40

【0149】

実施形態141:薬物がチューブリン障害剤を含む、実施形態140に記載のイムノコンジュゲート。

【0150】

実施形態142:薬物が、オーリスタチン、ドルスタチン-10、天然産物ドルスタチン-10の合成誘導体、及びメイタンシン又はメイタンシン誘導体からなる群から選択される薬物を含む、実施形態141に記載のイムノコンジュゲート。

【0151】

50

実施形態143:薬物が、モノメチルオーリスタチンF(MMAF)、オーリスタチンE(AE)、モノメチルオーリスタチンE(MMAE)、vcMMAE、及びvcMMAFからなる群から選択される薬物を含む、実施形態141に記載のイムノコンジュゲート。

【0152】

実施形態144:薬物が、メルタンシン(DM1)、DM3、及びDM4からなる群から選択されるメイトンシンを含む、実施形態141に記載のイムノコンジュゲート。

【0153】

実施形態145:薬物がDNA損傷剤を含む、実施形態140に記載のイムノコンジュゲート。

【0154】

実施形態146:薬物が、カリケアマイシン、デュオカルマイシン、及びピロロベンゾジアゼピンからなる群から選択される薬物を含む、実施形態145に記載のイムノコンジュゲート。

10

【0155】

実施形態147:薬物が、カリケアマイシン又はカリケアマイシン類似体を含む、実施形態146に記載のイムノコンジュゲート。

【0156】

実施形態148:薬物がデュオカルマイシンを含む、実施形態146に記載のイムノコンジュゲート。

【0157】

実施形態149:薬物が、デュオカルマイシンA、デュオカルマイシンB1、デュオカルマイシンB2、デュオカルマイシンC1、デュオカルマイシンC2、デュオカルマイシンD、デュオカルマイシンSA、シクロプロピルベンゾインドールデュオカルマイシン(CC-1065)、及びセンタナマイシン、ラケルマイシン、アドゼレシン、ビゼレシン、及びカルゼレシンからなる群から選択されるデュオカルマイシンを含む、実施形態148に記載のイムノコンジュゲート。

20

【0158】

実施形態150:薬物が、ピロロベンゾジアゼピン又はピロロベンゾジアゼピン二量体を含む、実施形態146のイムノコンジュゲート。

【0159】

実施形態151:薬物が、アントラマイシン(及びその二量体)、マゼトラマイシン(及びその二量体)、トマイマイシン(及びその二量体)、プロトラカルシン(及びその二量体)、チカマイシン(及びそれらの二量体)、ネオトラマイシンA(及びその二量体)、ネオトラマイシンB(及びその二量体)、DC-81(及びその二量体)、シビロマイシン(及びその二量体)、ポロトラマイシンA(及びその二量体)、ポロトラマイシンB(及びその二量体)、シバノマイシン(及びその二量体)、アブベイマイシン(及びその二量体)、SG2000、及びSG2285からなる群から選択される薬物を含む、実施形態150のイムノコンジュゲート。

30

【0160】

実施形態152:薬物が、オーリスタチン、ドラスタチン、コルヒチン、コンブレタスタチン、及びmTOR/PI3K阻害剤からなる群から選択される、実施形態137~138のいずれか1つに記載のイムノコンジュゲート。

40

【0161】

実施形態153:上記薬物が、フルオロウラシル(5-FU)、カペシタビン、5-トリフルオロメチル-2'-デオキシウリジン、メトトレキセートナトリウム、ラルチトレキセド、ペメトレキセド、シトシンアラビノシド、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、6-チオグアニン(6-TG)、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、クラドリビン、フロクスウリジン(5-フルオロ-2)、リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤(RNR)、シクロホスファミド、ネオサル、イフォスファミド、チオテパ、1,3-ビス(2-クロロエチル)-1-ニトロソウレア(BCNU)、1-(2-クロロエチル)-3-シクロヘキシル-1ニトロソウレア、メチル(CCNU)、ヘキサメチルメラミン、ブスルファン、プロカルバジンHCL、ダカルバジン(DTIC)、クロラムブシル、メルファラン、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ペンダムスチン、カル

50

ムスチン、クロロメチン、フォテムスチン、ロムスチン、マンノスルファン、ネダプラチン、ニムスチン、プレドニムスチン、ラニムスチン、サトラプラチン、セムスチン、ストレプトゾシン、テモゾロミド、トレオスルファン、トリアジクオン、トリエチレンメラミン、チオTEPA、四硝酸トリプラチン、トロフォスファミド、ウラムスチン、ドキソルビシン、クエン酸ダウノルビシン、ミトキサントロン、アクチノマイシンD、エトポシド、トポテカンHCL、テニポシド(VM-26)、イリノテカンHCL(CPT-11)、カンプトテシン、ペロテカン、ルビテカン、ビンクリスチン、硫酸ビンブラスチン、酒石酸ビノレルビン、硫酸ビンデシン、パクリタキセル、ドセタキセル、ナノ粒子パクリタキセル、アブラキサン、イクサベピロン、ラロタキセル、オルタタキセル、テセタキセル、ビンフルニン、レチノイン酸、レチノイン酸誘導体、ドキシルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、シクロホスファミド、イフォスファミド、シスプラチン、5-フルオロウラシル、カンプトテシン誘導体、インターフェロン、タモキシフェン、及びタキソールからなる群から選択される、実施形態137~138のいずれか1つに記載のイムノコンジュゲート。特定の実施形態において、抗癌化合物は、アブラキサン、ドキソルビシン、パミドロネート二ナトリウム、アナストロゾール、エキセメスタン、シクロホスファミド、エピルビシン、トレミフェン、レトロゾール、トラスツズマブ、メゲストロールタモキシフェン、パクリタキセル、ドセタキセル、カペシタビン、酢酸ゴセレリン、及びゾレドロン酸からなる群から選択される。

10

【0162】

実施形態154:上記抗体が細胞毒素に結合している、実施形態136に記載のイムノコンジュゲート。

20

【0163】

実施形態155:上記抗体が、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素、リシン、アブリン、サポリン、及びチミジンキナーゼからなる群から選択される細胞毒素に結合している、実施形態154に記載のイムノコンジュゲート。

【0164】

実施形態156:上記抗体が免疫調節剤に結合している、実施形態136に記載のイムノコンジュゲート。

【0165】

実施形態157:上記免疫調節剤が第2の抗体を含む、実施形態156に記載のイムノコンジュゲート。

30

【0166】

実施形態158:上記第2の抗体が抗CD3抗体を含む、実施形態157に記載のイムノコンジュゲート。

【0167】

実施形態159:上記免疫調節剤が、免疫チェックポイントを阻止するものである、実施形態156に記載のイムノコンジュゲート。

【0168】

実施形態160:上記免疫調節剤エフェクターが、抗CTLA4抗体、抗PDL1抗体、抗PDL2抗体、抗ICOS抗体、及び抗BTLA抗体からなる群から選択される抗体である、実施形態159に記載のイムノコンジュゲート。

40

【0169】

実施形態161:上記抗体が、イピリムマブ、ニボルマブ、及びペンブロリズマブからなる群から選択される抗体のVH及びVLドメインを含む抗体である、実施形態160に記載のイムノコンジュゲート。

【0170】

実施形態162:上記抗体が、イピリムマブ、ニボルマブ、及びペンブロリズマブからなる群から選択される抗体である、実施形態160に記載のイムノコンジュゲート。

【0171】

実施形態163:上記抗体が、 ^{99}Tc 、 ^{99}Tc 、 ^{97}Ru 、 ^{95}Ru 、 ^{94}Tc 、 ^{90}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{86}Y 、 ^{77}B

50

r、⁷⁷As、⁷⁶Br、⁷⁵Se、⁷²As、⁶⁸Ga、⁶⁸Ga、⁶⁷Ga、⁶⁷Ga、⁶⁷Cu、⁶⁷Cu、⁶⁴Cu、⁶²Cu、⁶²Cu、⁵⁹Fe、⁵⁸Co、⁵⁷Co、⁵²Mn、⁵²Fe、⁵¹Cr、⁴⁷Sc、³H、³⁵S、³³P、³²P、²²⁵Ac、²²⁴Ac、²²³Ra、²¹³Bi、²¹²Pb、²¹²Bi、²¹¹At、²⁰³Pb、²⁰³Hg、²⁰¹Tl、¹⁹⁹Au、¹⁹⁸Au、¹⁹⁸Au、¹⁹⁷Pt、¹⁸F、¹⁸⁹Re、¹⁸⁸Re、¹⁸⁸Re、¹⁸⁶Re、¹⁸⁶Re、¹⁷⁷Lu、¹⁷⁷Lu、¹⁷⁵Yb、¹⁷²Tm、¹⁶⁹Yb、¹⁶⁹Yb、¹⁶⁹Er、¹⁶⁸Tm、¹⁶⁷Tm、¹⁶⁶Ho、¹⁶⁶Dy、¹⁶⁵Tm、¹⁶⁵Dy、¹⁶¹Tb、¹⁵O、¹⁵N、¹⁵⁹Gd、¹⁵⁷Gd、¹⁵³Sm、¹⁵³Pb、¹⁵¹Pm、¹⁴C、¹⁴⁹Pm、¹⁴³Pr、¹⁴²Pr、¹³N、¹³³I、¹³¹In、¹³¹I、¹²⁷Te、¹²⁶I、¹²⁵Te、¹²⁵I、¹²⁴I、¹²³I、¹²²Te、¹²¹Te、¹²¹Sn、¹¹C、¹¹³In、¹¹¹In、¹¹¹In、¹¹¹Ag、¹¹¹Ag、¹⁰⁹Pd、¹⁰⁹Pd、¹⁰⁷Hg、¹⁰⁵Ru、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁵Rh、及び¹⁰³Ruからなる群から選択される同位体を含むキレートに結合している、実施形態136に記載のイムノコンジュゲート。

10

【0172】

実施形態164:上記抗体が、抗癌剤と複合体を形成している又は抗癌剤を含有する脂質若しくはリポソームに結合している、実施形態136に記載のイムノコンジュゲート。

【0173】

実施形態165:上記抗体が検出可能な標識に結合している、実施形態136に記載のイムノコンジュゲート。

【0174】

実施形態166:薬学的に許容される担体及び実施形態1～135のいずれか1つに記載の抗体;及び/又は薬学的に許容される担体及び実施形態136～165のいずれか1つに記載のイムノコンジュゲートを含む医薬製剤。

20

【0175】

実施形態167:上記製剤が単位投薬製剤である、実施形態166に記載の医薬製剤。

【0176】

実施形態168:上記製剤が、経口投与、経鼻投与、直腸投与、腹腔内注射、血管内注射、皮下注射、経皮投与、及び筋肉内注射からなる群から選択される経路を介した投与用に配合される、実施形態166～167のいずれか1つに記載の製剤。

【0177】

実施形態169:細胞集団における腫瘍開始細胞を減少させる方法であって、ALPPL2を発現している腫瘍開始細胞及び腫瘍開始細胞以外の細胞を含む細胞集団を、実施形態136～164のいずれか1つに記載の抗ALPPL2イムノコンジュゲートと接触させる工程を含み、上記イムノコンジュゲートを含むエフェクターが、細胞増殖抑制活性及び/又は細胞毒性活性及び/又は免疫調節活性を有し、それによって腫瘍細胞集団における腫瘍開始細胞の頻度が減少する、方法。

30

【0178】

実施形態170:接触させる工程がインビボで行われる、実施形態169に記載の方法。

【0179】

実施形態171:接触させる工程がインビトロで行われる、実施形態169に記載の方法。

【0180】

実施形態172:ALPPL2を発現している細胞の成長及び/又は増殖を阻害する方法であって、上記細胞を、実施形態1～135のいずれか1つに記載の抗体と接触させる工程;及び/又は上記細胞を、実施形態136～164のいずれか1つに記載の抗ALPPL2イムノコンジュゲートと接触させる工程を含み、上記イムノコンジュゲートを含むエフェクターが細胞増殖抑制活性及び/又は細胞毒性活性及び/又は免疫調節活性を有する、方法。

40

【0181】

実施形態173:上記細胞が癌細胞である、請求項172に記載の方法。

【0182】

実施形態174:上記癌細胞が、中皮腫、精巣癌、子宮内膜癌、並びに卵巣癌、膵臓癌及び非小細胞肺癌のサブセットからなる群から選択される、実施形態173に記載の方法。

【0183】

実施形態175:上記細胞が転移性細胞である、実施形態173～174のいずれか1つに記載の

50

方法。

【0184】

実施形態176:上記細胞が固形腫瘍細胞である、実施形態173～175のいずれか1つに記載の方法。

【0185】

実施形態177:上記エフェクターが、放射性核種及び/又は細胞増殖抑制剤を含む、請求項172～176のいずれか1つに記載の方法。

【0186】

実施形態178:上記エフェクターが、以下:細胞毒性剤及び/又は細胞増殖抑制剤;細胞毒性剤及び/若しくは細胞増殖抑制剤を含有する脂質又はリポソーム;細胞毒性剤及び/又は細胞増殖抑制剤を含む高分子薬物担体;並びに細胞毒性剤及び/又は細胞増殖抑制剤を含むナノ粒子薬物担体の1つ以上を含む、実施形態177に記載の方法。

10

【0187】

実施形態179:上記薬物が抗癌剤である、実施形態178に記載の方法。

【0188】

実施形態180:上記薬物が、オーリスタチン、ドラスタチン、コルヒチン、コンプレタスタチン、及びmTOR/PI3K阻害剤からなる群から選択される、実施形態179に記載の方法。

【0189】

実施形態181:上記薬物がモノメチルオーリスタチンFである、実施形態179に記載の方法。

20

【0190】

実施形態182:上記薬物が、フルオロウラシル(5-FU)、カペシタビン、5-トリフルオロメチル-2'-デオキシウリジン、メトトレキセートナトリウム、ラルチトレキセド、ペメトレキセド、シトシンアラビノシド、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、6-チオグアニン(6-TG)、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、クラドリビン、フロクスウリジン(5-フルオロ-2)、リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤(RNR)、シクロホスファミド、ネオサル、イフォスファミド、チオテパ、1,3-ビス(2-クロロエチル)-1-ニトロソウレア(BCNU)、1-(2-クロロエチル)-3-シクロヘキシル-1ニトロソウレア、メチル(CCNU)、ヘキサメチルメラミン、ブスルファン、プロカルバジンHCL、ダカルバジン(DTIC)、クロラムブシル、メルファラン、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ベンダムスチン、カルムスチン、クロロメチン、フォテムスチン、ロムスチン、マンノスルファン、ネダプラチン、ニムスチン、プレドニムスチン、ラニムスチン、サトラプラチン、セムスチン、ストレプトゾシン、テモゾロミド、トレオスルファン、トリアジクオン、トリエチレンメラミン、チオTEPA、四硝酸トリプラチン、トロフォスファミド、ウラムスチン、ドキソルビシン、クエン酸ダウノルビシン、ミトキサントロン、アクチノマイシンD、エトポシド、トポテカンHCL、テニポシド(VM-26)、イリノテカンHCL(CPT-11)、カンプトテシン、ペロテカン、ルビテカン、ピンクリスチン、硫酸ビンブラスチン、酒石酸ビノレルビン、硫酸ビンデシン、パクリタキセル、ドセタキセル、ナノ粒子パクリタキセル、アブラキサン、イクサベピロン、ラロタキセル、オルタタキセル、テセタキセル、ビンフルニン、レチノイン酸、レチノイン酸誘導体、ドキシルビシン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、シクロホスファミド、イフォスファミド、シスプラチン、5-フルオロウラシル、カンプトテシン誘導体、インターフェロン、タモキシフェン、及びタキソールからなる群から選択される、実施形態179に記載の方法。特定の実施形態において、抗癌化合物は、アブラキサン、ドキソルビシン、パミドロネート二ナトリウム、アナストロゾール、エキセメスタン、シクロホスファミド、エピルビシン、トレミフェン、レトロゾール、トラスツズマブ、メゲストロールタモキシフェン、パクリタキセル、ドセタキセル、カペシタビン、酢酸ゴセレリン、及びゾレドロン酸からなる群から選択される。

30

40

【0191】

実施形態183:上記薬物が、上記抗体に直接コンジュゲートされ;又は上記薬物が、上記抗体に結合した脂質若しくはリポソームに含有され;又は上記薬物が、上記抗体に結合し

50

た高分子担体及び/又はナノ粒子担体に含有される、実施形態178～182のいずれか1つに記載の方法。

【0192】

実施形態184:上記エフェクターが細胞毒素を含む、実施形態172～176のいずれか1つに記載の方法。

【0193】

実施形態185:上記エフェクターが放射性核種を含む、実施形態172に記載の方法。

【0194】

実施形態186:上記イムノコンジュゲート又は抗体が、薬学的に許容される担体を含む医薬組成物として投与される、実施形態172～185のいずれか1つに記載の方法。

10

【0195】

実施形態187:上記投与が、ヒト又は非ヒト哺乳動物に投与する工程を含む、実施形態172～186のいずれか1つに記載の方法。

【0196】

実施形態188:上記投与が、非経口的に投与する工程;及び/又は腫瘍若しくは手術部位に投与する工程を含む、実施形態172～187のいずれか1つに記載の方法。

【0197】

実施形態189:上記抗体及び/又はイムノコンジュゲートが、外科手術及び/又は放射線療法に対する補助療法として投与される、実施形態172～188のいずれか1つに記載の方法。

20

【0198】

実施形態190:上記抗体及び/又はイムノコンジュゲートが、別の抗癌剤及び/又はホルモンと併用して投与される、実施形態172～189のいずれか1つに記載の方法。

【0199】

実施形態191:ALPPL2を発現している癌の癌細胞を検出する方法であって、上記癌細胞を、検出可能な標識に結合した実施形態1～135のいずれか一項に記載の抗体を含むイムノコンジュゲートと接触させる工程;並びに上記検出可能な標識の存在及び/又は位置を検出する工程であって、存在及び/又は位置が癌細胞の位置及び/又は存在の指標である工程を含む、方法。

【0200】

実施形態192:上記標識が、放射性標識、放射線不透過性標識、MRI標識、PET標識、及びSPECT標識からなる群から選択される標識を含む、実施形態191に記載の方法。

30

【0201】

実施形態193:上記癌細胞が、中皮腫、精巣癌、子宮内膜癌、並びに卵巣癌、膵臓癌及び非小細胞肺癌のサブセットからなる群から選択される、実施形態191～192のいずれか1つに記載の方法。

【0202】

実施形態194:上記接触させる工程が、上記イムノコンジュゲートを非ヒト哺乳動物又はヒトに投与する工程を含む、実施形態191～193のいずれか1つに記載の方法。

【0203】

実施形態195:上記検出する工程がインビボで上記標識を検出する工程を含む、実施形態191～194のいずれか1つに記載の方法。

40

【0204】

実施形態196:上記検出する工程が、X線、PET、SPECT、MRI、及びCATからなる群から選択される検出方法を使用する工程を含む、実施形態195に記載の方法。

【0205】

実施形態197:上記検出する工程が、生検又は生検由来の試料においてエクスビボで上記標識を検出する工程を含む、実施形態191～194のいずれか一項に記載の方法。

【0206】

実施形態198:実施形態1～135のいずれかに記載の抗体又は抗体の断片をコードする核酸。

50

【0207】

実施形態199:実施形態198に記載の核酸を含む発現ベクター。

【0208】

実施形態200:実施形態199に記載の発現ベクターを含む細胞。

【0209】

実施形態201:実施形態1～135のいずれか1つに記載の抗体を含むキメラ抗原受容体(CAR)。

【0210】

実施形態202:上記受容体が、上記抗体;膜貫通ドメイン;少なくとも1つの共刺激シグナル伝達領域;及びCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む、実施形態201に記載のキメラ抗原受容体。

10

【0211】

実施形態203:上記共刺激シグナル伝達領域が、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される共刺激分子の細胞内ドメインを含む、実施形態202に記載のキメラ抗原受容体。

【0212】

実施形態204:上記共刺激シグナル伝達領域が4-1BBを含む、実施形態202に記載のキメラ抗原受容体。

【0213】

20

実施形態205:上記膜貫通ドメインが、CD8ヒンジドメイン又はその断片を含む、実施形態202～204のいずれか1つに記載のキメラ抗原受容体。

【0214】

実施形態206:実施形態201～205のいずれか1つに記載のキメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離された核酸配列。

【0215】

実施形態207:実施形態201～205のいずれか1つに記載のキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列を含む細胞。

【0216】

実施形態208:上記細胞が、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、細胞傷害性Tリンパ球(C_{TL})、及び調節性T細胞からなる群から選択される、実施形態207に記載の細胞。

30

【0217】

実施形態209:上記抗原結合ドメインがALPP及び/又はALPPL2を発現している細胞に結合する場合、上記細胞が抗癌免疫応答を示す、実施形態207～208のいずれか1つに記載の細胞。

【0218】

実施形態210:上記製剤が、実施形態207～209のいずれか1つに記載の遺伝子操作された細胞(CAR-T細胞)、及び薬学的に許容される担体を含む、哺乳動物において癌を治療するための医薬組成物。

【0219】

40

実施形態211:上記製剤が抗腫瘍有効量の細胞を含み、抗腫瘍有効量の細胞が、このような細胞を必要とする哺乳動物の体重1kg当たり約 10^4 ～最大約 10^7 細胞の範囲である、実施形態210に記載の組成物。

【0220】

実施形態212:実施形態201～205のいずれか1つに記載のキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列を含むベクター。

【0221】

実施形態213:上記標的細胞集団及び/又は組織が、ALPP及び/若しくはALPPL2、又は抗体M25AD、M25ADX及び/若しくはM25によって結合されるALPP及び/若しくはALPPL2の領域を発現する、哺乳動物における標的細胞集団又は組織に対するT細胞媒介性免疫応答を刺激す

50

る方法であって、哺乳動物に、実施形態201～205のいずれか1つに記載のキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変された有効量の細胞を投与する工程を含む、方法。

【0222】

実施形態214:哺乳動物においてALPP及び/若しくはALPPL2、並びに/又は抗体M25AD、M25ADX及び/若しくはM25によって結合されるALPP及び/若しくはALPPL2の領域を発現している腫瘍に対して抗腫瘍免疫を付与する方法であって、実施形態201～205のいずれか1つに記載のキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変された有効量を哺乳動物に投与し、それにより哺乳動物において抗腫瘍免疫を付与する、方法。

【0223】

実施形態215:ALPP及び/若しくはALPPL2、又は抗体M25AD、M25ADX及び/若しくはM25によって結合されるALPP及び/若しくはALPPL2の領域を発現している細胞を含む、癌を有する哺乳動物を治療する方法であって、哺乳動物に、実施形態201～205のいずれか1つに記載のキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変された有効量の細胞を投与する工程を含む、方法。

10

【0224】

実施形態216:癌と診断された哺乳動物において遺伝子操作されたT細胞の持続的集団を生成する方法であって、上記哺乳動物に、実施形態201～205のいずれか1つに記載のキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変されたT細胞を投与する工程を含み、遺伝子操作されたT細胞の持続的集団は、投与後、少なくとも1ヶ月間、ヒトにおいて存続する、方法。

20

【0225】

実施形態217:遺伝子操作されたT細胞の持続的集団が記憶T細胞を含む、実施形態216に記載の方法。

【0226】

実施形態218:遺伝子操作されたT細胞の持続的集団が、投与後の少なくとも3ヶ月間、又は少なくとも4ヶ月間、又は少なくとも5ヶ月間、又は少なくとも6ヶ月間、又は少なくとも7ヶ月間、又は少なくとも8ヶ月間、又は少なくとも9ヶ月間、又は少なくとも10ヶ月間、又は少なくとも11ヶ月間、又は少なくとも12ヶ月間、又は少なくとも2年間、又は少なくとも3年間、ヒトにおいて存続する、実施形態216～217のいずれか1つに記載の方法。

【0227】

実施形態219:上記細胞がT細胞である、実施形態213～215のいずれか1つに記載の方法。

30

【0228】

実施形態220:上記細胞が自己T細胞である、実施形態213～215のいずれか1つに記載の方法。

【0229】

実施形態221:上記細胞が同種異系T細胞である、実施形態213～215のいずれか1つに記載の方法。

【0230】

実施形態222:癌と診断された哺乳動物において、遺伝子操作されたT細胞の集団を増殖(expand)させる方法であって、上記哺乳動物に遺伝子改変されたT細胞を投与して、実施形態201～215のいずれか1つに記載のキメラ抗原受容体(CAR)を発現させる工程を含み、投与された遺伝子操作されたT細胞がヒトにおいて子孫T細胞の集団を産生する、方法。

40

【0231】

実施形態223:上記哺乳動物がヒトである、実施形態213～222のいずれか1つに記載の方法。

【0232】

実施形態224:上記哺乳動物が非ヒト哺乳動物である、実施形態213～222のいずれか1つに記載の方法。

【0233】

実施形態225:上記癌が、ALPP及び/又はALPPL2を発現している中皮腫、精巣癌、子宮内

50

膜癌、並びに卵巣癌、膵臓癌、及び非小細胞肺癌からなる群から選択される癌の細胞を含む、実施形態213～224のいずれか1つに記載の方法。

【0234】

実施形態226:上記投与された細胞がT細胞である、実施形態213～225のいずれか1つに記載の方法。

【0235】

実施形態227:上記投与された細胞が自己T細胞である、実施形態213～226のいずれか1つに記載の方法。

【0236】

実施形態228:実施形態201～205のいずれか1つに記載の遺伝子操作されたT細胞(CAR-T細胞)を、哺乳動物の癌細胞と接触させて、癌細胞のアポトーシスを誘導する工程を含む、癌を治療する方法。

【0237】

定義

用語「患者」には、予防的処置又は治療的処置のいずれかを受けるヒト及び他の哺乳動物対象が含まれる。

【0238】

本明細書で使用する時、用語「対象」は、任意のヒト又は非ヒト動物を含む。例えば、本発明の方法及び組成物を用いて、癌を有する対象を治療することができる。例示的な一実施形態において、対象はヒトである。用語「非ヒト動物」には、全ての脊椎動物が含まれ、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類等の哺乳動物及び非哺乳動物が挙げられる。

【0239】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は、本明細書において互換的に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指す。この用語は、1つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工的な化学的類似体であるアミノ酸ポリマー、並びに天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用される。この用語はまた、ポリペプチドを構成するアミノ酸を接続する伝統的なペプチド連結上の変異体を含む。

【0240】

用語「核酸」又は「オリゴヌクレオチド」又は本明細書における文法的同等物は、互いに共有結合的に連結された少なくとも2つのヌクレオチドを指す。本発明の核酸は、好ましくは、一本鎖又は二本鎖であり、一般的には、ホスホジエステル結合を含有するが、いくつかの場合において、以下に概説されるように代替の骨格を有し得る核酸類似体が含まれ、例えば、ホスホルアミド連結(Beaucageら (1993) Tetrahedron 49(10):1925) 及び文中の参照事項; Letsinger (1970) J. Org. Chem. 35:3800; Sprinzlら (1977) Eur. J. Biochem. 81: 579; Letsingerら (1986) Nucl. Acids Res. 14: 3487; Sawaiら (1984) Chem. Lett. 805, Letsingerら (1988) J. Am. Chem. Soc. 110: 4470; Pauwelsら (1986) Chimica Scripta 26: 1419)、ホスホロチオエート連結(Magら (1991) Nucleic Acids Res. 19:1437; 米国特許第5,644,048号)、ホスホロジチオエート連結(Briuら (1989) J. Am. Chem. Soc. 111 :2321)、O-メチルホスホロアミダイト連結(Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press参照)並びにペプチド核酸骨格及び連結(Egholm (1992) J. Am. Chem. Soc. 114:1895; Meierら (1992) Chem. Int. Ed. Engl. 31: 1008; Nielsen (1993) Nature, 365: 566; Carlssonら (1996) Nature 380: 207参照)が挙げられる。他の類似した核酸には、正の骨格(Denpcyら、(1995年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92巻: 6097頁); 非イオン性骨格(米国特許第5,386,023号, 第5,637,684号, 第5,602,24

0号, 第5,216,141号及び第4,469,863号; Angew. (1991年) Chem. Intl. Ed. English 30巻: 423頁; Letsingerら、(1988年) J. Am. Chem. Soc. 110巻:4470頁; Letsingerら、(1994年) Nucleoside & Nucleotide 13巻:1597頁; 2章及び3章, ASC Symposium Series 580, 「Carbohydrate Modifications in Antisense Research」, Ed. Y.S. Sanghui and P. Da

10

20

30

40

50

n Cook; Mesmaekerら(1994年), Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4巻: 395頁; Jeffsら、(1994年) J. Biomolecular NMR 34巻:17頁; Tetrahedron Lett. 37巻:743頁(1996年))及び非リボース骨格を有するものが含まれ、米国特許第5,235,033号及び第5,034,506号、6章及び7章、ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cookに記載されているものが挙げられる。また、1つ以上の炭素環糖を含有する核酸は、核酸の定義内に含まれる(Jenkinsら、(1995年), Chem. Soc. Rev. 169-176頁参照)。いくつかの核酸類似体は、Rawls, C & E News, 1997年6月2日、35頁に記載されている。リボース-リン酸骨格のこれらの改変は、標識等の付加的な部分の付加を容易にするため、又は生理学的環境におけるこのような分子の安定性及び半減期を増大させるためになされ得る。

10

【0241】

用語「残基」とは、本明細書で使用する時、天然アミノ酸、合成アミノ酸、又は修飾アミノ酸を指す。

【0242】

本明細書で使用する時、「抗体」とは、免疫グロブリン遺伝子又は免疫グロブリン遺伝子の断片によって実質的にコードされる1つ以上のポリペプチドからなるタンパク質を指す。認識される免疫グロブリン遺伝子には、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン及びミュー定常領域遺伝子、並びに多数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。軽鎖は、カッパ又はラムダのいずれかとして分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、又はイプシロンとして分類され、これらは順に、それぞれ免疫グロブリンクラスのIgG、IgM、IgA、IgD及びIgEを規定する。

20

【0243】

典型的な免疫グロブリン(抗体)の構造単位は、四量体を含むことが知られている。各四量体は、2つの同一対のポリペプチド鎖で構成され、各対は1つの「軽」鎖(約25kD)及び1つの「重」鎖(約50~70kD)を有する。各鎖のN末端は、抗原認識に主に関与する約100~110個以上のアミノ酸の可変領域を規定する。可変軽鎖(V_L)及び可変重鎖(V_H)という用語は、それぞれこれらの軽鎖及び重鎖を指す。

【0244】

抗体は、インタクトな免疫グロブリンとして、又は種々のペプチダーゼによる消化によって生成された多数の十分に特徴付けられた断片として存在する。したがって、例えば、ペプシンは、ヒンジ領域のジスルフィド連結下で抗体を消化して、それ自体がジスルフィド結合によって V_H-C_H1 に接続された軽鎖であるFabの二量体である $F(ab)'_2$ を生成する。穏やかな条件下で $F(ab)'_2$ を還元して、ヒンジ領域のジスルフィド連結を破壊し、それにより $(Fab')_2$ 二量体を Fab' モノマーに変換することができる。 Fab' モノマーは、本質的に、ヒンジ領域の一部を有するFabである(他の抗体断片のより詳細な説明についてはFundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993年)を参照されたい)。様々な抗体断片がインタクトな抗体の消化に関して定義されているが、当業者は、このような Fab' 断片が化学的に又は組換えDNA方法論を使用してデノボで合成され得ることを理解する。したがって、抗体という用語はまた、本明細書で使用する時、全抗体の改変によって生成される、又は組換えDNA方法論を用いてデノボで合成される抗体断片を含む。特定の好ましい抗体には、可変重鎖及び可変軽鎖が(直接的に又はペプチドリンカーを介して)接続されて、連続的なポリペプチドを形成する一本鎖抗体(単一ポリペプチド鎖として存在する抗体)、より好ましくは一本鎖Fv抗体(sFv又はscFv)が含まれる。一本鎖Fv抗体は、直接的に接続される、又はペプチドをコードするリンカーによって接続される V_H 及び V_L をコードする配列を含む核酸から発現され得る共有結合的に連結された V_H-V_L ヘテロ二量体である。Hustonら、(1988年) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85巻: 5879-5883頁。 V_H 及び V_L はそれぞれ単一のポリペプチド鎖として連結されるが、 V_H 及び V_L ドメインは非共有結合的に結合する。繊維状ファージの表面上に発現される第1の機能性抗体分子は一本鎖Fv(scFv)であったが、別の発現戦略もまた成功していた。例えば、鎖(重鎖又は軽鎖)の1つがg3キャプシドタンパク質に融合され、相補鎖がベリプラズムに可溶性分子として放出される

30

40

50

場合、ファージ上にFab分子を提示することができる。2つの鎖は、同一又は異なるレプリコン上にコードされ得る;重要な点は、各Fab分子中の2つの抗体鎖が翻訳後にアセンブリし、二量体が鎖の1つが、例えばg3pへの連結を介してファージ粒子に組み込まれることである(例えば、米国特許第5,733,743号参照)。scFv抗体及び天然に凝集したが化学的に分離された軽鎖及び重鎖ポリペプチド鎖を抗体V領域から、抗原結合部位の構造に実質的に類似する三次元構造に折り畳まれる分子に変換する多数の他の構造は、当業者に公知である(例えば、米国特許第5,091,513号、第5,132,405号及び第4,956,778号を参照されたい)。特に好ましい抗体は、ファージ上に提示された全て(例えば、scFv、Fv、Fab及びジスルフィド連結されたFv(例えば、Reiterら、(1995年) Protein Eng. 8巻: 1323~1331頁を参照されたい)を含むべきである。

10

【0245】

用語「特異的に結合する」とは、本明細書で使用するとき、生体分子(例えば、タンパク質、核酸、抗体等)を指す場合、分子の異種集団における生体分子(例えば、タンパク質及び他の生物製剤)の存在を決定付ける結合反応を指す。したがって、指定された条件下(例えば、抗体の場合のイムノアッセイ条件又は核酸の場合のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件)では、特定のリガンド又は抗体は、その特定の「標的」分子に結合し、有意な量で試料中に存在する他の分子に結合しない。

【0246】

語句「ALPP及び/又はALPPL2を発現している細胞の増殖の阻害」とは、本明細書で使用するとき、本明細書に記載されている抗ALPP/ALPPL2抗体又はイムノコンジュゲートの能力であって、抗体又はイムノコンジュゲートの非存在下での増殖と比較して、ALPP及び/若しくはALPPL2又はその断片を発現している細胞の増殖を減少させる、好ましくは統計学的に有意に減少させる能力を指す。一実施形態において、ALPP/ALPPL2又はその断片を発現している細胞(例えば、癌細胞)の増殖は、抗体若しくはその抗原結合部分又はイムノコンジュゲートの非存在下で測定した増殖(対照)と比較して、細胞を本明細書に記載されている抗体若しくはその抗原結合部分又はイムノコンジュゲートと接触させた場合、少なくとも10%、又は少なくとも20%、又は少なくとも30%、又は少なくとも40%、又は少なくとも50%、又は少なくとも60%、又は少なくとも70%、又は少なくとも80%、又は少なくとも90%、又は100%減少させることができる。細胞増殖は、細胞分裂の割合、細胞分裂を受けている細胞集団内の細胞分画、及び/又は最終分化若しくは細胞死に起因する細胞集団からの細胞喪失の割合を測定する当該技術分野において認識されている技術を用いて(例えば、細胞力価グロー(glow)アッセイ又はチミジン取り込みを用いて)細胞増殖をアッセイすることができる。

20

30

【0247】

語句「ALPP/ALPPL2を発現している細胞の移動の阻害」とは、本明細書で使用するとき、本明細書に記載されている抗ALPP/ALPPL2抗体若しくはその抗原結合部分又はイムノコンジュゲートの能力であって、抗体の非存在下での細胞の移動と比較して、ALPP及び/若しくはALPPL2又はその断片(例えば、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFが結合する断片)を発現している細胞の移動を減少させる、好ましくは統計学的に有意に減少させる能力を指す。一実施形態において、ALPP/ALPPL2(例えば、癌細胞)を発現している細胞の移動は、抗体若しくはその抗原結合部分又はそのイムノコンジュゲートの非存在下で測定した細胞移動(対照)と比較して、細胞が、抗体若しくはその抗原結合部分又はそのイムノコンジュゲートと接触した場合、少なくとも10%、又は少なくとも20%、又は少なくとも30%、又は少なくとも40%、又は少なくとも50%、又は少なくとも60%、又は少なくとも70%、又は少なくとも80%、又は少なくとも90%、又は100%減少し得る。細胞移動は、従来認識されている技術を用いてアッセイすることができる

40

50

。様々な実施形態において、本明細書に記載されている抗体及び/又はイムノコンジュゲートは、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFが結合するALPP及び/若しくはALPPL2、並びにALPP及び/若しくはALPPL2のドメインを発現或いは過剰発現する細胞(例えば、本明細書に記載されている癌細胞)の移動を阻害することができることが意図される。

【0248】

抗体の「抗原結合部分」(又は単に「抗体部分」)という用語は、本明細書で使用するときに、抗原(例えば、ALPP及び/又はALPPL2)に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長の抗体の断片によって実行され得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例としては、(i) V_L 、 V_H 、CL及びCH1ドメインからなる一価断片であるFab断片；(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片である $F(ab')_2$ 断片；(iii) V_H 及びCH1ドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の単一の腕の V_L 及び V_H ドメインからなるFv断片；(v) V_H 及び V_L ドメインを含むdAb；(vi) V_H ドメインから成るdAb断片(例えば、Wardら、(1989年) Nature 341巻：544～546頁を参照)；(vii) V_H 又は V_L ドメインからなるdAb；及び(viii) 単離された相補性決定領域(CDR)、又は(ix) 合成リンカーにより場合により接続され得る2つ以上の単離されたCDRの組み合わせが挙げられる。更に、Fv断片、 V_L 及び V_H の2つのドメインは、別個の遺伝子によりコードされ得るが、組み換え法を用いて、一価分子を形成するためにそれらを V_L 及びV領域が対となる単一タンパク質鎖(一本鎖Fv(scFv))として知られている；例えば、Birdら、(1988年) Science 242巻：423～426頁；Hustonら、(1988年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85巻：5879～5883頁を参照)として作製することができる合成リンカーにより接続され得る。このような一本鎖抗体はまた、抗体の「抗原結合部分」なる用語に包含されることが意図される。これら抗体断片は、当業者に公知である従来技術を使用して得られ、断片は、インタクトな抗体であるのと同じ方法で、有用性のためにスクリーニングされる。抗原結合部分は、組換えDNA技術、又はインタクトな免疫グロブリンの酵素若しくは化学的切断により生成され得る。

【0249】

用語「モノクローナル抗体」とは、本明細書で使用するときに、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、個々の抗体は、少量で存在し得る可能な天然に存在する突然変異体を除いては、同一である集団を含む。モノクローナル抗体は非常に特異的であり、単一の抗原部位に指向される。更に、異なる決定因子(エピトープ)に指向される異なる抗体を典型的に含む、従来の(ポリクローナル)抗体の調製物とは対照的に、モノクローナル抗体は各々、抗原上にある単一の決定因子に指向される。モノクローナル抗体は、例えば、Kohlerら、(1975年) Nature, 256巻：495頁に記載されているハイブリドーマ方法、例えば(Lonbergら、(1994年) Nature 368巻(6474号)：856～859頁参照)に記載されているトランスジェニック動物、組換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号を参照)、又は、例えば(Clacksonら、(1991年) Nature, 352巻：624～628頁、Marksら、(1991年) J. Mol. Biol., 222巻：581～597頁に記載されている技術を用いたファージ抗体ライブラリーの使用等の当該技術分野において認識された任意の技術、及び本明細書に記載されている技術を用いて調製することができる。モノクローナル抗体は、キメラ抗体、ヒト抗体及びヒト化抗体を含み、天然に存在する又は組換えにより生成され得る。

【0250】

用語「組換え抗体」とは、(a)免疫グロブリン遺伝子(例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子)又はそこから調製されるハイブリドーマに関してトランスジェニックである又は染色体導入(transchromosomal)である動物(例えば、マウス)から単離された抗体、(b)例えばトランスフェクターマから抗体を発現させるために形質転換された宿主細胞から単離され

10

20

30

40

50

た抗体、(c)ファージディスプレイを用いて、組換えであり組み合わせの抗体ライブラリー(例えば、ヒト抗体配列を含有する)から単離された抗体、及び(d)他のDNA配列への免疫グロブリン遺伝子配列(例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子)のスプライシングに關与する任意の他の手段により調製、発現、作製又は単離された抗体等の、組換え手段により調製、発現、作製又は単離された抗体を指す。このような組換え抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する、可変領域及び定常領域を有し得る。しかしながら、特定の実施形態において、このような組換えヒト抗体は、インビトロでの突然変異誘発にさらすことができ、したがって、組換え抗体の V_H 及び V_L 領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列 V -及び V_L 配列に由来並びに関連する一方で、インビボでのヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然には存在し得ない配列である。

10

【0251】

用語「キメラ免疫グロブリン」又は抗体とは、その可変領域が第1の種に由来し、その定常領域が第2の種に由来する、免疫グロブリン又は抗体を指す。キメラ免疫グロブリン又は抗体は、異なる種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから、例えば遺伝子操作により構築され得る。

【0252】

用語「ヒト抗体」は、本明細書で使用するとき、フレームワークとCDR領域の両方が、例えば、Kabatら(Kabatら、(1991年) Sequences of proteins of Immunological Interest, 5版 U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242参照)により記載されるようなヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を含むことが意図される。更に、抗体が定常領域を含有する場合、定常領域はまた、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する。ヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列(例えば、インビトロでのランダム突然変異若しくは部位特異的突然変異誘発、又はインビボでの体細胞突然変異により導入された突然変異)によってコードされないアミノ酸残基を含み得る。しかしながら、用語「ヒト抗体」とは、本明細書で使用するとき、マウス等の別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列に移植された抗体を含むことは意図されない。

20

【0253】

ヒト抗体は、アミノ酸残基、例えば、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされない、活性を増強するアミノ酸残基で置換された、少なくとも1つ以上のアミノ酸を有し得る。典型的には、ヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列の一部ではないアミノ酸残基で置換された、20までの位置を有し得る。特定の実施形態において、このような置換は、以下に詳しく説明されるCDR領域内にある。

30

【0254】

用語「ヒト化免疫グロブリン」又は「ヒト化抗体」とは、少なくとも1つのヒト化免疫グロブリン鎖又は抗体鎖(すなわち、少なくとも1つのヒト化軽鎖又は重鎖)を含む、免疫グロブリン又は抗体を指す。用語「ヒト化免疫グロブリン鎖」又は「ヒト化抗体鎖」(すなわち、「ヒト化免疫グロブリン軽鎖」又は「ヒト化免疫グロブリン重鎖」)とは、ヒト免疫グロブリン又は抗体から実質的に可変フレームワーク領域、及び非ヒト免疫グロブリン又は抗体から実質的に相補性決定領域(CDR)(例えば、少なくとも1つのCDR、好ましくは2つのCDR、より好ましくは3つのCDR)を含むとともに、更に定常領域(例えば、軽鎖の場合には少なくとも1つの定常領域又はその一部、及び好ましくは重鎖の場合には3つの定常領域)を含む、可変領域を有している、免疫グロブリン又は抗体の鎖(すなわち、それぞれ軽鎖又は重鎖)を指す。用語「ヒト化可変領域」(例えば、「ヒト化軽鎖可変領域」又は「ヒト化重鎖可変領域」)は、非ヒト免疫グロブリン又は抗体から実質的に、ヒト免疫グロブリン又は抗体、及び相補性決定領域(CDR)から可変フレームワーク領域を実質的に含む、可変領域を指す。

40

【0255】

本明細書で使用するとき、「異種抗体」は、このような抗体を生成するトランスジェニック非ヒト生物又は植物に関連して定義される。

50

【0256】

「単離された抗体」は、本明細書で使用するときに、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指すことが意図される(例えば、ALPP及び/又はALPL2に特異的に結合する単離された抗体は、ALPP及び/又はALPL2以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない)。加えて、単離された抗体は、典型的には、他の細胞材料及び/又は化学物質を実質的に含まない。一実施形態において、異なるALPP/ALPL2結合特異性を有する「単離された」モノクローナル抗体の組み合わせは、十分に定義された組成物において組み合わせられる。

【0257】

本明細書で使用するときに、「アイソタイプ」とは、重鎖定常域遺伝子によりコードされる抗体クラス(例えば、IgM又はIgG1)を指す。一実施形態において、抗体又はその抗原結合部分は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD、又はIgEの抗体アイソタイプから選択されるアイソタイプのものである。いくつかの実施形態において、本発明のモノクローナル抗体はIgG1アイソタイプである。他の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体はIgG2アイソタイプである。

【0258】

「抗原」は、抗体又はその抗原結合部分が結合する実体(例えば、タンパク様の実体又はペプチド)である。本発明の様々な実施形態において、抗原は、例えば細胞(例えば、ALPPL2陽性癌細胞)上に提示されるALPP及び/若しくはALPPL2、並びに/又はM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFによって結合されるALPP及び/若しくはALPPL2のドメインである。

【0259】

用語「エピトープ」又は「抗原決定基」は、免疫グロブリン又は抗体が特異的に結合する、抗原上の部位を指す。エピトープは、タンパク質のターシャリフォールディング(tertiary folding)によって並置される、接触アミノ酸又は非接触アミノ酸の両方から形成され得る。接触アミノ酸から形成されるエピトープは、典型的には、変性溶媒に曝露された後に保持され、一方、ターシャリフォールディングによって形成されるエピトープは、典型的には、変性溶媒による処置後に消失する。エピトープは、典型的には、固有の空間構造において少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15個のアミノ酸を含む。エピトープの空間構造を決定する方法は、例えば、X線結晶構造解析及び2次元核磁気共鳴法といった、当該技術分野における技術及び本明細書に記載されている技術を含む(例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 66巻, G. E. Morris, Ed. (1996年)を参照されたい)。

【0260】

また、本明細書には、本明細書に記載されている、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF抗体として、同じ又は重複するエピトープに結合する抗体である。同じエピトープを認識する抗体は、例えば、標的抗原への別の抗体の結合を防ぐ1つの抗体の能力を示すことにより、イムノアッセイ等の日常的な技術、すなわち競合結合アッセイを用いて確認され得る。競合的結合は、試験下の免疫グロブリンがALPP及び/又はALPPL2等の共通抗原への参照抗体の特異的結合を阻害するアッセイにおいて決定される。例えば、多数のタイプの競合結合測定法が公知であり、例えば：固相直接的又は間接的放射免疫アッセイ(RIA)、固相直接的又は間接的酵素免疫アッセイ(

EIA)、サンドイッチ競合アッセイ(例えば、Stahliら、(1983年) Meth. Enzymol., 9巻: 242頁参照);固相直接的ビオチン-アビジンEIA(Kirklandら、(1986年) J. Immunol. 137巻: 3614頁参照);固相直接的標識化アッセイ、固相直接的標識化サンドイッチアッセイ(例えば、Harlow及びLane (1988年) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press参照);例えば ^{125}I 標識を用いた固相直接的標識RIA(例えば、Morelら、(1988年) Mol. Immunol. 25巻(1号): 7頁参照);固相直接的ビオチン-アビジンEIA(Cheungら、(1990年) Virology 176巻: 546頁);及び直接的標識化RIA(Moldenhauerら、(1990年) Scand J. Immunol. 32巻: 77頁)が知られている。典型的には、このようなアッセイは、これら標識化されていない試験免疫グロブリン及び標識化された参照免疫グロブリンのいずれかを有する、固体表面又は細胞に結合された精製抗原(例えば、APPL及び/又はAPPL2)の使用を伴う。競合的阻害は、試験免疫グロブリンの存在下で固体表面又は細胞に結合される標識の量を決定することによって測定され得る。通常、試験免疫グロブリンは過剰に存在している。通常、競合する抗体は、過剰に存在している場合、少なくとも50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%又はそれらを超えて、共通抗原への参照抗体の特異的結合を阻害する。

【0261】

本明細書で使用する時、用語「特異的結合」、「特異的に結合する」、「選択的結合」、及び「選択的に結合する」とは、抗体又はその抗原結合部分が、特定の抗原又はエピトープについて明らかな親和性を示すが、通常は他の抗原及びエピトープとの著しい交差反応性を示さないことを意味する。「明らかな」又は好ましい結合は、少なくとも(KDに等しい又はそれ未満の) 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、又は 10^{-11}M の親和性による結合を含む。 10^{-9}M より大きな、好ましくは 10^{-10}M より大きな親和性がより好ましい。本明細書に明記されているものの値の中間もまた、本発明の範囲内にあることが意図され、好ましい結合親和性は、例えば 10^{-6}M から 10^{-11}M 、好ましくは 10^{-7}M 又は 10^{-8}M から 10^{-10}M といった範囲の親和性として示され得る。「著しい交差反応性を示さない」抗体は、望ましくない実体(例えば、望ましくないタンパク質の実体)に明らかに結合しない抗体である。例えば、一実施形態において、抗体又はその抗原結合部分は、ALPP及び/又はALPPL2に特異的に結合するが、他の分子及びALPP/ALPPL2タンパク質又はペプチドには著しく反応しない。特異的又は選択的結合は、例えば、スクチャード解析及び/又は競合結合アッセイを含む、このような結合を決定するための当該技術分野において認識された任意の手段に従って決定され得る。

【0262】

用語「 K_D 」は、本明細書で使用する時、特定の抗体-抗原の相互作用、又は抗原に対する抗体の親和性の解離平衡定数を指すことが意図される。一実施形態において、本発明に係る抗体又はその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴アッセイ又は細胞結合アッセイを用いて測定した場合、抗原(例えば、ALPP及び/又はALPPL2)、又は5nM又はそれより優れた(すなわち、それ未満)の親和性(K_D)(例えば、40nM、30nM、20nM若しくは10nM又はそれ未満)を有する抗原を発現する細胞に結合する。特定の実施形態において、本発明に係る抗体又はその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴アッセイ又は細胞結合アッセイを用いて測定した場合、5nM又はそれより優れた親和性(K_D)(例えば、4nM、2nM、1.5nM、1.4nM、1.3nM、1nM又はそれ未満)により、ALPP及び/若しくはALPPL2、並びに/又はM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLによって結合されるALPP及び/若しくはALPPL2のドメインに結合する。他の実施形態において、抗体又はその抗原結合部分は、FACSにより生きた前立腺腫瘍細胞を用いて、約 10^{-10}M 、又は $100 \times 10^{-11}\text{M}$ 、若しくは $10 \times 10^{-11}\text{M}$ 又はそれ未満の親和性(K_D)により抗原(例えば、ALPP及び/又はALPPL2)に結合する。

【0263】

用語「 K_{off} 」は、本明細書で使用するときに、抗体/抗原複合体からの抗体の解離のためのオフレート定数を指すことが意図される。

【0264】

用語「EC50」は、本明細書で使用するときに、本明細書に記載されている抗体若しくはその抗原結合部分、又はイムノコンジュゲートの濃度を指し、これは、最大反応の50%、すなわち最大反応とベースラインの間の中間である、インビトロ又はインビボのアッセイにおいて反応を誘導する。

【0265】

対象物に適用される用語「天然に存在する」とは、本明細書で使用するときに、対象物が天然に見出され得るという事実を指す。例えば、天然の供給源から単離され得、研究所においてヒトにより意図的に修飾されていない、(ウイルスを含む)生体に存在するポリペプチド又はポリヌクレオチドの配列は、天然に存在する。

【0266】

用語「修飾すること」又は「修飾」とは、本明細書で使用するときに、抗体又はその抗原結合部分において1つ以上のアミノ酸を変化させることを指すことが意図される。変化は、1つ以上の位置にてアミノ酸を付加する、置換する、又は欠失することにより生成され得る。変化は、PCR突然変異誘発等の公知の技術を使用して生成され得る。例えば、いくつかの実施形態において、本発明の方法を用いて同定された抗体又はその抗原結合部分は、修飾され、それによりALPP/ALPPL2に対する抗体又はその抗原結合部分の結合親和性を修飾することができる。

【0267】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている抗ALPP/ALPPL2抗体の配列における「保存的なアミノ酸置換」、すなわち、ヌクレオチド配列によりコード化される又はアミノ酸配列を含有している抗体の、抗原、例えばALPP/ALPPL2への結合を抑止しない、ヌクレオチド及びアミノ酸の配列の修飾が意図される。保存的なアミノ酸置換は、同じクラスのアミノ酸による1つのクラスにおけるアミノ酸の置換を含み、ここで、クラスは、例えば、標準のDayhoff頻度交換マトリックス又はBLOSUMマトリックスによって決定されるように、天然に見出される相同タンパク質における、一般的な物理化学的なアミノ酸側鎖特性及び高い置換頻度により定義される。アミノ酸側鎖は一般的に6つのクラスに分類され、以下を含む:クラスI(Cys);クラスII(Ser、Thr、Pro、Ala、Gly);クラスIII(Asn、Asp、Gln、Glu);クラスIV(His、Arg、Lys);クラスV(Ile、Leu、Val、Met);及びクラスVI(Phe、Tyr、Trp)。例えば、Asn、Gln、又はGlu等の別のクラスIIIの残基に関するAspの置換は、保存的置換である。したがって、抗ALPP/ALPPL2抗体において予測された非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同じクラスからの別のアミノ酸残基で置換される。抗原結合を排除しない、ヌクレオチドとアミノ酸の保存的置換を同定する方法は、当該技術分野において周知である(例えば、Brummellら、(1993年) Biochem. 32巻: 1180~1187頁; Kobayashiら、(1999年) Protein Eng. 12巻(10号): 879~884頁; Burksら、(1997年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94巻: 412~417頁を参照されたい)。

【0268】

用語「非保存的なアミノ酸置換」とは、別のクラスからのアミノ酸による1つのクラスにおけるアミノ酸の置換を指し;例えば、Asp、Asn、Glu、又はGln等のクラスIIIの残基による、クラスIIの残基であるAlaの置換である。

【0269】

別の実施形態において、突然変異(保存的又は非保存的)が、飽和突然変異誘発等により抗ALPP/ALPPL2抗体コード配列の全て又は一部に沿って無作為に導入され得、結果として生じる修飾抗体は結合活性についてスクリーニングされ得る。

【0270】

「共通配列」は、関連配列のファミリーにおいて最も頻繁に生じるアミノ酸(又はヌクレオチド)から形成される配列である(例えば、Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987年を参照されたい)。タンパク質のファミリーに

10

20

30

40

50

において、共通配列における各位置は、ファミリーにおいてその位置で最も頻繁に生じるアミノ酸により占領される。2つのアミノ酸が等しく頻繁に生じる場合、何れかが共通配列に含まれ得る。免疫グロブリンの「共通フレームワーク」は、共通免疫グロブリン配列におけるフレームワーク領域を指す。

【0271】

同様に、CDRのための共通配列は、本明細書に記載されている抗ALPP/ALPPL2抗体のCDRアミノ酸配列の最適なアラインメントにより導き出すことができる。

【0272】

核酸について、用語「実質的な相同性」とは、2つの核酸、又はその指定された配列が、最適に整列され、比較された場合に、ヌクレオチドの少なくとも約80%、通常は少なくとも約90%から95%、より好ましくはヌクレオチドの少なくとも約98%から99.5%で、適切なヌクレオチドの挿入又は欠失と、同一であるということを指す。或いは、セグメントが選択的なハイブリダイゼーション条件下で鎖の補体にハイブリダイズする場合、実質的な相同性が存在する。

10

【0273】

2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適なアラインメントのために導入が必要である、ギャップの数、及び各ギャップの長さを考慮して、配列により共有される同一の位置の数の関数である(すなわち、相同性%=同一位置の数/位置×100の総数)。配列の比較、及び2つの配列間の同一性パーセントの決定は、限定されない以下の例に記載されているように、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。

20

【0274】

2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、NWSgapdna.CMPマトリックス、40、50、60、70、又は80のギャップ重量、及び1、2、3、4、5、又は6の長さ重量を用いた、GCGソフトウェアにおけるGAPプログラムを使用して決定することができる。2つのヌクレオチド配列間又はアミノ酸配列間の同一性パーセントはまた、Meyers及びMiller (1989年) CA BIOS, 4巻: 11~17頁のアルゴリズムを使用して決定することができ、それは、PAM120重量残基表、12のギャップ長のペナルティ、及び4のギャップペナルティを用いた、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれている。加えて、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Needleman and Wunsch (1970年) J. Mol. Biol. 48巻: 444~453頁のアルゴリズムを用いて決定することができ、それは、Blossum 62マトリックス又はPAM250マトリックスのいずれか、16、14、12、10、8、6、又は4のギャップ重量、及び1、2、3、4、5、又は6の長さ重量を用いた、GCGソフトウェアパッケージにおけるプログラムに組み込まれている。

30

【0275】

本明細書において意図される核酸配列及びタンパク質配列は、更に、例えば、関連する配列を同定するために公のデータベースに対して検索を行なうための、「クエリ配列」として使用され得る。このような検索は、Altschulら、(1990年) J. Mol. Biol. 215巻:403~10頁のNBLASTとXBLASTのプログラム(バージョン2.0)を使用して行なわれ得る。BLASTヌクレオチド検索は、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得るために、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12を用いて行なわれ得る。BLASTタンパク質検索は、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得るために、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いて行なわれ得る。比較目的のために間隔を空けたアラインメントを得るために、Altschulら、(1997年) Nucleic Acids Res. 25巻(17号):3389~3402頁に記載されているようにGapped BLASTを利用することができる。BLASTプログラム及びGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム(例えば、XBLAST及びNBLAST)のデフォルトパラメーターを使用することができる。

40

【0276】

天然の配列(修飾された制限部位等を除く)に頻繁に存在する一方で、cDNA、ゲノム、又はそれらの混合物の何れかに由来する、本明細書に記載されている核酸組成物(例えば、抗ALPP/ALPPL2抗体若しくはイムノコンジュゲートの全て又は一部をコードする核酸)は、

50

異なる配列をもたらすように、標準技術に従って突然変異させられ得る。コード配列について、このような突然変異は、所望されるようにアミノ酸配列に影響を及ぼし得る。特に、天然のV、D、J、定数、スイッチ、及び本明細書に記載されている他のこのような配列に実質的に相同する又はそれらに由来するDNA配列が意図される(「由来する」は、配列が別の配列と同一である又はそこから修飾されることを示す)。

【0277】

用語「作動可能に連結される」とは、別の核酸配列と機能的な関係に置かれる核酸配列を指す。例えば、プレ配列又は分泌リーダーに関するDNAは、ポリペプチドの分泌に参与するプレタンパク質として発現される場合に、ポリペプチドのためにDNAに作動可能に連結され;プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼす場合に、コード配列に作動可能に連結され;又は、リボソーム結合部位は、翻訳を促進するように配置される場合、コード配列に作動可能に連結される。一般的に、「作動可能に連結される」とは、連結されるDNA配列が隣接し、分泌リーダーの場合には、隣接するとともに読み取りフェーズに存在していることを意味する。しかしながら、エンハンサーは隣接していなくてもよい。好都合な制限部位でのライゲーションにより連結が達成される。このような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドのアダプター又はリンカーが、従来の実施に従って使用される。核酸は、別の核酸配列と機能的な関係に置かれる場合に「作動可能に連結される」。例えば、プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼす場合に、コード配列に作動可能に連結される。転写制御配列に関して、作動可能に連結されることは、連結されるDNA配列が隣接し、2つのタンパク質コード領域を接続する必要がある場合には、リーディングフレームにおいて隣接していることを意味する。スイッチ配列について、作動可能に連結されることは、配列がスイッチによる組換えを達成することができることを示す。

【0278】

用語「ベクター」は、本明細書で使用するときに、連結されている別の核酸を運搬することができる核酸分子を指すことが意図される。1つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、それは、付加的なDNAセグメントがライゲートされ得る、環状の二本鎖DNAのループを指す。別のタイプのベクターはウイルスベクターであり、ここで、付加的なDNAセグメントはウイルスゲノムへライゲートされ得る。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞中で自律増殖が可能である(例えば、複製及びエピゾームの哺乳動物ベクターの細菌起源を有する細菌ベクター)。他のベクター(例えば、非エピゾームの哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入に際して宿主細胞のゲノムへ組み込むことができ、それにより宿主ゲノムとともに複製される。更に、特定のベクターは、それらが作動可能に連結される遺伝子の発現を導くことができる。このようなベクターは、「組換え発現ベクター」(又は単に「発現ベクター」)として本明細書で称されている。一般的に、組換えDNA技術における有用性の発現ベクターは、多くの場合、プラスミドの形態である。用語「プラスミド」及び「ベクター」は、互換的に使用され得る。しかしながら、本発明は、同等の機能を果たす、ウイルスベクター(例えば、複製欠損性レトロウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス)等の発現ベクターの、このような他の形態を含むことが意図される。

【0279】

用語「組換え宿主細胞」(又は単に「宿主細胞」)とは、本明細書で使用するときに、発現ベクターが導入されている細胞を指すことが意図される。このような用語は、特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の子孫も指すことが意図されることを理解する必要がある。特定の修飾が、突然変異又は環境的な影響の何れかにより後世に生じ得るため、このような子孫は、実際に、親細胞と同一ではないが、本明細書において使用される用語「宿主細胞」の範囲内にはなおも含まれる。

【0280】

用語は「処置する(treat)」、「処置すること(treating)」、及び「処置(treatment)」とは、本明細書で使用するときに、本明細書に記載されている治療手段又は予防手段を指す

10

20

30

40

50

。「処置」の方法は、対象(例えば、それを必要とする対象)への、抗ALPP/ALPPL2抗体若しくは抗原結合部分、又は本明細書に記載されている抗体若しくは抗原結合部分を含むイムノコンジュゲートの投与を用いる。特定の実施形態において、対象は、疾患若しくは障害を予防し、治癒し、遅延させ、疾患若しくは障害の重症度を低減し、又は疾患若しくは障害の1つ以上の症状又は疾患若しくは障害の再発を改善するために、或いは、このような処置が無い状態で予測される対象の生存をかなり延ばすために、ALPPL2陽性癌(例えば、中皮腫)と診断され及び/又はその処置を受けている対象である。

【0281】

用語「癌」及び「癌性」とは、典型的には、制御されていない細胞増殖により特徴付けられる、哺乳動物における生理学的疾病を指し、又はそれを説明するものである。ALPP又はALPPL2陽性の癌とは、本明細書に記載されているM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF抗体によって結合されるALPP及び/若しくはALPPL2又はその断片を発現又は過剰発現する細胞によって特徴付けられる癌を指す。例示的なALPPL2陽性癌には、限定されないが、中皮腫、精巣癌、子宮内膜癌、並びに膵臓癌、卵巣癌及び非小細胞肺癌のサブセットが挙げられる。

【0282】

用語「有効量」とは、本明細書で使用する時、対象への投与時に、本明細書に記載されているように、ALPP/ALPPL2陽性細胞の成長及び/又は増殖に関連した疾患(例えば、ALPP/ALPPL2陽性の癌)の処置、予後、又は診断を達成するのに十分である、抗ALPP/ALPPL2抗体若しくはその抗原結合部分及び/又はそれらのイムノコンジュゲートの量を指す。治療上有効量は、対象、及び処置される疾患状態、対象の体重及び年齢、疾患状態の重症度、投与方法等に依存して変動し、それは当業者により容易に決定され得る。投与のための投薬量は、例えば、本明細書に記載されている抗ALPP/ALPPL2抗体及び/若しくはその抗原結合部分、並びに/又は本明細書に記載されているそれらのイムノコンジュゲートの、約1ngから約10,000mg、約5ngから約9,500mg、約10ngから約9,000mg、約20ngから約8,500mg、約30ngから約7,500mg、約40ngから約7,000mg、約50ngから約6,500mg、約100ngから約6,000mg、約200ngから約5,500mg、約300ngから約5,000mg、約400ngから約4,500mg、約500ngから約4,000mg、約1µgから約3,500mg、約5µgから約3,000mg、約10µgから約2,600mg、約20µgから約2,575mg、約30µgから約2,550mg、約40µgから約2,500mg、約50µgから約2,475mg、約100µgから約2,450mg、約200µgから約2,425mg、約300µgから約2,000mg、約400µgから約1,175mg、約500µgから約1,150mg、約0.5mgから約1,125mg、約1mgから約1,100mg、約1.25mgから約1,075mg、約1.5mgから約1,050mg、約2.0mgから約1,025mg、約2.5mgから約1,000mg、約3.0mgから約975mg、約3.5mgから約950mg、約4.0mgから約925mg、約4.5mgから約900mg、約5mgから約875mg、約10mgから約850mg、約20mgから約825mg、約30mgから約800mg、約40mgから約775mg、約50mgから約750mg、約100mgから約725mg、約200mgから約700mg、約300mgから約675mg、約400mgから約650mg、約500mg、又は約525mgから約625mgの範囲であり得る。投薬量レジメンは、最適な治療応答をもたらすために調整され得る。有効量はまた、抗体又はその抗原結合部分の任意の毒性又は不利益な影響(すなわち、副作用)が、有益な効果により最小化され及び/又はそれらを上回るものである。

【0283】

「エフェクター」とは、その活性が細胞への送達及び/又は細胞での局在化に所望される、任意の分子又は分子の組み合わせを指す。エフェクターとしては、限定されないが、標識、細胞毒素、酵素、増殖因子、転写因子、抗体、薬物等が含まれる。

【0284】

例えば、癌細胞の「成長(growth)及び/又は増殖(proliferation)を阻害する」という語句は、とりわけ、細胞のアポトーシス又は他の細胞死滅機構を誘導すること、細胞の侵入

10

20

30

40

50

を減少させること、細胞周期における特定の時点で細胞を止めること等を含む。

【0285】

用語「イムノコンジュゲート」とは、1つ以上のエフェクターに結合される1つの抗体、又は1つ以上のエフェクターに結合される複数の抗体を指す。用語「イムノコンジュゲート」は、抗体に化学的にコンジュゲートされるエフェクターを含むことが意図され、同様に、抗体は、抗体(又はその一部)が、ペプチドエフェクター若しくはペプチドを含むエフェクターに直接又はリンカーを介して結合される、融合タンパク質として発現する。

【0286】

用語「抗腫瘍効果」とは、本明細書で使用する時、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞数の減少、転移数の減少、平均余命の延長、又は癌状態に関連する様々な生理学的症状の改善により明らかにされ得る生物学的効果を指す。「抗腫瘍効果」はまた、まず第1に、腫瘍発生の予防において、本明細書に記載されている抗体、イムノコンジュゲート、CAR-細胞の能力によって明らかにされ得る。

10

【0287】

用語「自己」とは、後に個体に再導入される、同じ個体に由来する任意の物質を指すことを意味する。

【0288】

用語「同種異系」とは、同種の異なる動物に由来する細胞又は移植片を指す。

【0289】

用語「異種性」とは、異なる種の動物に由来する細胞又は移植片を指す。

20

【0290】

用語「共刺激リガンド」には、該用語を本明細書で使用する時、T細胞上の同族共刺激分子に特異的に結合し、それにより、例えば、TCR/CD3複合体とペプチドが負荷されたMHC分子との結合によって提供される一次シグナルに加えて、限定されないが、増殖、活性化、分化等を含むT細胞応答を媒介する、抗原提示細胞(例えば、APC、樹状細胞、B細胞等)上の分子が含まれる。共刺激リガンドとしては、限定されないが、CD7、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性共刺激リガンド(ICOS-L)、細胞間接着分子(ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、リンホトキシンベータ受容体、TR6、IL T3、IL T4、Tollリガンド受容体に結合するアゴニスト又は抗体、及びB7-H3と特異的に結合するリガンドを挙げることができる。共刺激リガンドはまた、とりわけ、T細胞上に存在する共刺激分子、例えば、限定されないが、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NK G2C、B7-H3、及びCD83と特異的に結合するリガンド、と特異的に結合する抗体を包含する。

30

【0291】

「共刺激分子」とは、共刺激リガンドと特異的に結合して、それにより、限定されないが、増殖等のT細胞による共刺激応答を媒介するT細胞上の同族結合パートナーを指す。共刺激分子には、限定されないが、MHCクラスI分子、BTLA及びToll様受容体が含まれる。

【0292】

「共刺激シグナル」とは、本明細書で使用时、TCR/CD3ライゲーション等の一次シグナルと組み合わせて、T細胞増殖及び/又は主要分子の上方制御若しくは下方制御へと導くシグナルを指す。

40

【0293】

用語「刺激」とは、刺激分子(例えば、TCR/CD3複合体)がその同族リガンドに結合し、それにより、限定されないが、TCR/CD3複合体を介したシグナル伝達等のシグナル伝達事象を媒介することによって誘導される一次応答を意味する。刺激は、TGF- β の下方制御及び/又は細胞骨格構造の再編成等の特定の分子の発現変化を媒介することができる。

【0294】

「刺激分子」は、該用語を本明細書で使用する時、抗原提示細胞に存在する同族刺激リガンドと特異的に結合するT細胞上の分子を意味する。

50

【0295】

「刺激リガンド」とは、本明細書で使用する時、抗原提示細胞(例えば、APC、樹状細胞、B細胞等)に存在する場合、T細胞の同族結合パートナー(本明細書において「刺激分子」とも称される)と特異的に結合し得るリガンドを意味し、それにより、限定されないが、活性化、免疫応答の開始、増殖等を含むT細胞による一次応答を媒介することができる。刺激リガンドは、当該技術分野において周知であり、とりわけ、ペプチドが負荷されたMHCクラスI分子、抗CD3抗体、スーパーアゴニスト抗CD28抗体、及びスーパーアゴニスト抗CD2抗体を包含する。

【図面の簡単な説明】

【0296】

【図1】図1は、ALPP(配列番号1)及びALPPL2(配列番号2)のアミノ酸配列を例示する。

【図2】図2は、インビトロでの強く、かつ特異的な殺腫瘍細胞を例示する。MMAFを、mc-vc-pabリンカーを介してM25 IgG1にコンジュゲートし、精製し、中皮腫細胞株M28及び対照細胞(初代ヒト肝臓細胞株であるHS775Li及び包皮線維芽細胞株であるHS27)とインキュベートした。腫瘍細胞と対照非腫瘍原性細胞との間ではEC50において1,000倍を超える差があり(0.54nM対 $>1\mu\text{M}$)、本願発明者らの新しいADCによる強く、かつ選択的な殺腫瘍を示す。

【図3】図3A及び3Bは、抗ALLP/ALLPL2 ADCがインビボで腫瘍異種移植片増殖を強く阻害することを示す。図3Aは、腫瘍体積の幾何平均のプロットを示す。注射を7日目に開始し、5日毎に、マウス1匹当たり5mg/kgを5用量与えた。M25mcvc-pab-MMAF:試験ADC(M25 IgG1にコンジュゲートしたMMAF)。IgG:ネイキッドM25 IgG1対照。図3B:動物体重をモニターし、プロットした。毒性の明白な徴候は見られなかった。注:A及びBで示される実験には、対照ADC(ctr IgG1-mcvc-pab-MMAF)は含まれていないが、本願発明者らは他の実験で対照ADCを試験し、それは媒体又はネイキッドIgG対照と同様にふるまう。

【図4】図4は、中皮腫異種移植片モデルにおけるMMAEベースのADCの評価を示す。M25AD-mcvc-pab-MMAEを、3〜4日毎に3mg/kgで5回注射した。非結合IgG1-mcvc-pab-MMAEを対照として使用した。

【図5】図5は、中皮腫株、膵臓株及び非小細胞肺癌株に対する本願発明者らの抗ALPPL2抗体M25のFACSを示す。

【図6】図6は、膵臓(Capan-1、パネルA及びパネルB)及び非小細胞肺癌(H1651、パネルC及びパネルD)株に対するM25AD-MMAF及びM25AD-MMAEの殺作用曲線を示す。全てのコンジュゲートは、IgG1-mcvc-pab-MMAF(パネルA及びパネルC)又はIgG1-mcvc-pab-MMAE(パネルB及びパネルD)である。

【図7】図7は、緑色蛍光タンパク質(GFP:green fluorescence protein)を発現するプラスミドと共に、ALPPL2発現プラスミドでトランスフェクトした生存HEK293細胞へのM25ADL IgG1結合のFACS分析を示す。細胞を、PBS/0.2%ウシ胎児血清中で抗体と室温で1時間インキュベートし、3回洗浄し、更にALEXAFLOU(登録商標)-647標識抗ヒト二次抗体とインキュベートした。GFP+細胞をゲートに通し、蛍光強度平均値(MFI:mean fluorescence intensity)について分析した。正規化MFIを、Prism(GraphPad社)を使用して曲線当嵌めに使用して、 $17.04\pm 6.18\text{pM}$ の見かけのKD値を得た。同様の結合結果をALPPでトランスフェクトした細胞について得た。ALPLでトランスフェクトした細胞への結合はない。APLIでトランスフェクトした細胞への結合は、 $5\mu\text{M}$ を超える見かけのKD値を有する。

【図8】図8は、緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するプラスミドと共に、ALPPL2発現プラスミドでトランスフェクトした生存HEK293細胞へのM25FYIA IgG1結合のFACS分析を示す。細胞を、PBS/0.2%ウシ胎児血清中で抗体と室温で1時間インキュベートし、3回洗浄し、更にALEXAFLOU(登録商標)-647標識抗ヒト二次抗体とインキュベートした。GFP+細胞をゲートに通し、蛍光強度平均値(MFI)について分析した。正規化MFIを、Prism(GraphPad社)を使用して曲線当嵌めに使用して、 $20.36\pm 7.85\text{pM}$ の見かけのKD値を得た。同様の結合結果をALPPでトランスフェクトした細胞について得た。ALPLでトランスフェクトした細胞への結合はない。ALPIでトランスフェクトした細胞への結合は、 $3.3\mu\text{M}$ を超える見かけのKD値

10

20

30

40

50

を有する。

【図9】図9は、緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するプラスミドと共に、ALPPL2発現プラスミドでトランスフェクトした生存HEK293細胞へのM25 IgG1結合のFACS分析を示す。細胞を、PBS/0.2%ウシ胎児血清中で抗体と室温で1時間インキュベートし、3回洗浄し、更にAL EXAFLOU(登録商標)-647標識抗ヒト二次抗体とインキュベートした。GFP+細胞をゲートに通し、蛍光強度平均値(MFI)について分析した。正規化MFIを、Prism(GraphPad社)を使用して曲線当嵌めに使用して、506.1+/-55.95pMの見かけのKD値を得た。同様の結合結果をALPPでトランスフェクトした細胞について得た。ALPL又はALPIでトランスフェクトした細胞のいずれかへの結合はない。

【発明を実施するための形態】

10

【0297】

様々な実施形態において、正常ヒト組織上に発現がない又は最小である腫瘍細胞によって過剰発現される細胞表面抗原に結合する抗体が提供される。抗体は、癌の治療において単独で使用する事ができ、又は様々な実施形態において、抗体の使用は、限定されないが、以下を含む。

1)腫瘍細胞へのペイロード送達(例えば、薬物、siRNA、mRNA、サイトカイン、放射性核種)のための使用;

2)腫瘍の部位で免疫系を選択的に活性化する二重特異性又はオリゴ特異性抗体の成分としての使用;

3)細胞ベースの療法のためのキメラ抗原レセプター(CAR-T)の構築における使用;

20

4)二重特異性抗体の構築における使用;及び

5)腫瘍検出/定量並びに患者層別化及び結果分析のための診断/病期分類ツールとしての使用。

【0298】

生存腫瘍細胞及び癌標本についてのファージ抗体ディスプレイライブラリーの選択により、本発明者らは新規な抗ALPPL2抗体を同定した。ALPPL2は、いくつかのタイプの不治の癌によって特異的に発現されるが、胎盤栄養膜を除いて正常なヒト組織では発現されない。ALPPL2の絶妙な組織特異性は、この抗原を過剰発現する癌に対する高度に特異的な標的療法及び免疫療法の調製を容易にする必要がある。そのような癌には、限定されないが、中皮腫、精巣癌、子宮内膜癌、並びに膵臓癌、卵巣癌及び非小細胞肺癌のサブセットが含まれる。本明細書の実施例に示されるように、抗原の標的可能性は、オーリスタチン誘導体を用いた抗体-薬物コンジュゲート(ADC)を用いて、インビトロ及びインビボで実証されている。

30

【0299】

したがって、様々な実施形態において、単離された抗ALPP/ALPPL2、並びにエフェクターに接続された抗ALPP/ALPPL2抗体を含むキメラ部分が提供される。特定の実施形態において、細胞毒性剤/細胞増殖抑制剤に結合した抗ALPP/ALPPL2抗体、例えば、DNAキレート化剤等の分裂腫瘍細胞と休止腫瘍細胞の両方に対して活性を有する薬物を含む抗体-薬物コンジュゲート(ADC)が提供される。

【0300】

40

更に、例えば、免疫系成分を動員し、活性化することができる二次抗体に結合され、又はチェックポイント阻害剤(例えば、抗CTLA4(例えば、イピリムマブ可変領域を含む)、及び/又はPD-L1に指向される抗体(例えば、ニボルマブ、又はペムブロリズマブ可変領域を含む)、及び/又はPD-L2に指向される抗体)である部分に結合される抗ALPP/ALPPL2抗体を含む二重特異性抗体を提供することを組み込むことによって、標的化された化学療法を超えて免疫療法に拡大するキメラ構築物が提供される。特定の実施形態において、抗ALPP/ALPPL2抗体は、限定されないが、キメラ抗原受容体操作されたT細胞(CAR-T)及び免疫サイトカイン等のプラットフォームを含む他のプラットフォームで使用される。

【0301】

ALPP/ALPPL2に結合する抗体

50

抗体は、例えば、ALPPL2を発現している癌細胞が組織微小環境に存在する場合、インビトロ及びインサイチュでALPP及び/又はALPPL2に特異的に結合することを発見された。上記に示されるように、このような抗体は、単独での使用した場合、又は「標的化されたエフェクター」を形成するためにエフェクターに結合された場合、癌を標的とするのに有用である。

【0302】

したがって、特定の実施形態において、ALPP及び/又はALPPL2に特異的に結合し、ALPPL/ALPPL2を発現又は過剰発現する細胞(例えば、中皮腫細胞、精巣癌細胞、子宮内膜癌細胞、並びに特定の膵臓癌、卵巣癌及び非小細胞肺癌の細胞)に特異的に結合する単離された抗体が提供される。

10

【0303】

M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF(例えばTable 1(表1)を参照)として本明細書において指定される抗体は、例示的な原型の抗体である。特定の実施形態において、これらの抗体の1つ以上のVL CDR1及び/又はVL CDR2、及び/又はVL CDR3、及び/又はVH CDR1及び/又はVH CDR2、及び/又はVH CDR3を含む抗体が意図される。特定の実施形態において、これらの抗体の1つ以上のVHドメイン及び/又はVLドメインを含む抗体が意図される。また、特に細胞表面で発現及び提示される場合、ALPPL及び/又はALPPL2での結合がM25AD、MD25ADX及び/又はM25の1つ以上と競合する抗体が意図される。

20

【0304】

M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及びM25wtLF抗体のVH及びVLドメインのアミノ酸配列を、Table 1(表1)に示す。

30

【0305】

【表 1 A】

Table 1.新規ヒト抗ALPP/ALPPL2抗体のVH及びVLドメインのアミノ酸配列。下線が付された領域は、それぞれCDR1、CDR2及びCDR3を表す。M25及びALPPL2rd3_1は、同一の重鎖であるが、異なる軽鎖を有する。M25AD及びALPPrd3_2は同一の重鎖であるが、異なる軽鎖を有する。配列番号は、示されたリンカーによってVLに接続されたVHについて与えられる(すなわち、VH-リンカー-VL)。

名称	VH	リンカー	VL	配列番号
25ADLF	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYD</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGGS GGGGS GGGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTFV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVLG	3
25ADLFEG	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYD</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYEGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGGS GGGGS GGGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTFV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVLG	4
25ADLFDS	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYD</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDSSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGGS GGGGS GGGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTFV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVLG	5
M25FYIA	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYA</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYYC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGGS GGGGS GGGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTIASLTV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	6
M25FYIAEG	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYA</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYEGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYYC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGGS GGGGS GGGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTIASLTV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	7
M25FYIADS	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYA</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDSSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYYC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGGS GGGGS GGGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTIASLTV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	8

10

20

30

40

【表 1 B】

M25	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYA</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTLV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	9
M25EG	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYA</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYEGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTLV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	10
M25DS	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYA</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDSSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTLV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	11
M25AE LF	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYE</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTFV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVLG	12
M25AE LFEG	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYE</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYEGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTFV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVLG	13
M25AE LFDS	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYE</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDSSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTFV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVLG	14
25ADL 99P	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYD</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTPV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	15

【表 1 C】

M25AD L99G	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYD</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTGV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	16
M25AD S95R	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYD</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTRTSTLV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	17
M25AD D28G	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYD</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSGVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTLV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	18
M25AD S91G	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYD</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>GSYTSTSTLV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	19
M25AD Y93H	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYD</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSHTSTSTLV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	20
M25AD YHSRL F	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYD</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGS GGGS GGGS	SALTQPASVSGSPGQSITIS CTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQH PGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV NRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYC <u>SSHTRTSTFVV</u> FGGGTKLTVLG	21
M25GR ITSGF YGDwt LC	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>RFTFSSYA</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDGLRAEDTAVYYC <u>AKED</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTLV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	22

10

20

30

40

【表 1 D】

M25FS ITSGF YGDwt LC	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS GFTFSSYA MHWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTTSRDNSKNTLY LQMDGLRAEDTAVYYC AKED DSSRWSYDL WGRGTLTVTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT SSDVGGYNY VSWYQQ HPGKAPKVMY DVT NRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSTSTLV V FGGGTKLTVL	23
M2530 18IA	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAAS GFTFSSYD MHWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYC AREG DSSRWSYDL WGRGTLTVTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT SSDVGGYNY VSWYQQ HPGKAPKVMY DVT NRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTIASSTLV V FGGGTKLTVL	24
M2530 18LF	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAAS GFTFSSYD MHWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYC AREG DSSRWSYDL WGRGTLTVTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT SSDVGGYNY VSWYQQ HPGKAPKVMY DVT NRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSTSTFV V FGGGTKLTVLG	25
M25AD	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS GFTFSSYD MHWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC AKEG DSSRWSYDL WGRGTLTVTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT SSDVGGYNY VSWYQQ HPGKAPKVMY DVT NRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSTSTLV V FGGGTKLTVL	26
M25AD X	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS GFTFSSYD MHWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMSSLRAEDTALYYC VKEG DSSRWSYDP WGRGTLTVTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT SSDVGGYNY VSWYQQ HPGKAPKVMY DVT NRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSTSTLV V FGGGTKLTVLG	27
ALPPL 2rd3_ 1	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS GFTFSSYA MHWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC AKEG DSSRWSYDL WGRGTLTVTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT SSDVGGYKY VSWYQQ HPGKAPKLMY EVS NRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEAAYFC SAYSPPGIMM FGGGTKLTVLG	28
LPPL2 rd3_2	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS GFTFSSYD MHWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC AKEG DSSRWSYDL WGRGTLTVTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT SSDVGGYKY VSWYQQ HPGKAPKLMY EVS NRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEAAYFC SAYSPPGIMM FGGGTKLTVLG	29

10

20

30

40

【表 1 E】

25AGI A	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTTFSSYG</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTIASLT</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	30
25AGL F	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTTFSSYG</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTFV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVLG	31
25ASI A	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTTFSSYS</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTIASLT</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	32
25ASL F	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTTFSSYS</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTFV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVLG	33
25ASw t	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTTFSSYS</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTLV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	34
25AVI A	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTTFSSYV</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTIASLT</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	35
25AVL F	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTTFSSYV</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTFV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVLG	36

10

20

30

40

【表 1 F】

25ALI A	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYL</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTIASLT</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	37
25ALL F	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYL</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTFV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVLG	38
M25wt IA	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYAM</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTIASLT</u> <u>V</u> FGGGTKLTVL	39
M25wt LF	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSYAM</u> MHWVRQA PGKGLEWVAV <u>ISYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFC <u>AKEG</u> <u>DSSRWSYDL</u> WGRGTLTVSS	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGT <u>SSDVGGYNY</u> VSWYQQ HPGKAPKVMY <u>DVT</u> NRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTFV</u> <u>V</u> FGGGTKLTVLG	40

10

20

【0311】

M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及びM25wtLF抗体について提供されるアミノ酸配列を用いて、多数の抗体形態が、例えば以下に記載されるように調製され得る。このような形態は、限定されないが、実質的にインタクトな(例えば、完全長の)免疫グロブリン(例えば、IgA、IgE、IgG等)、抗体断片(例えば、Fv、Fab、(Fab')₂、(Fab')₃、IgGΔCH₂、ミニボディ等)、一本鎖抗体(例えば、scFv)、ダイアボディ、ユニボディ、アフィボディ等を含む。

30

【0312】

特定の実施形態において、例えば、抗体が一本鎖抗体である場合、このような抗体を含むVH及びVLドメインは、直接一緒に接続され又はペプチドリンカーにより接続され得ることが認識される。例示的なペプチドリンカーは、限定されないが、GGGS GGGGS GGGGS(配列番号41)、GGGS GGGGS(配列番号42)、GGGS(配列番号43)、GS GGGGS GGGGS GGS GGGGS(配列番号44)、SGGGGS(配列番号45)、GGGS(配列番号46)、VPGV(配列番号47)、VPGVG(配列番号48)、GVPGVG(配列番号49)、GVG VP GVG(配列番号50)、VP GVG VP GVG(配列番号51)、GGSSRSS(配列番号52)、及びGGSSRSSSGGGSGGGG(配列番号53)等を含む。

40

【0313】

上記に示されるように、様々な実施形態において、抗体は結合する(例えば、ALPP及び/又はALPPL2に特異的に結合する)(例えば、ALPP及びALPPL2配列について図1を参照されたい)。典型的には、本明細書において意図される抗体は、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFD

50

S、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF抗体によって結合される、ALPPL2又はそのドメインを発現している癌細胞に特異的に結合する。特定の実施形態において、抗体は、FACSにより生きている細胞上で測定した場合、約5nM(未満の K_D)より大きい親和性で、又は約4nM未満の、又は約3nM未満の、又は約2nM以下の K_D で、ALPPL2を発現している細胞に結合する。特定の実施形態において、抗体は、FACSにより生きている細胞上で測定した場合、約50pM(未満の K_D)より大きい親和性で、又は約40pM未満の、又は約30pM未満の K_D で、ALPPL2を発現している細胞に結合する。

10

【0314】

本明細書において提供される配列情報を用いて、1つ以上のCDRを含む抗体、例えば、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/若しくはM25wtLF、又はこれらの抗体のVH及び/若しくはVLドメインを含む抗体は、例えば、以下に記載されるように、当業者に周知である標準的な方法(例えば、化学合成法及び/又は組み換え発現法)を用いて容易に調製され得る。

20

【0315】

加えて、他の「関連する」抗ALPP/ALPPL2抗体は、同じエピトープ(例えば、ALPP及び/若しくはALPPL2、並びにALPP及び/若しくはALPPL2を発現又は過剰発現する細胞に結合するために、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF抗体の1つ以上と競合する)に結合する抗体についてスクリーニングすることによって、及び/又は、本明細書において同定されているM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF抗体を修飾して、修飾された抗体のライブラリーを生成し、次に、ALPP及び/若しくはALPPL2又はそのドメインを発現又は過剰発現する細胞への結合を改善するためにライブラリーにおける抗体を再スクリーニングすることによって同定することができる。

30

【0316】

M25AD、M25ADX及び/又はM25と同じALPP及び/又はALPPL2エピトープに結合する他の抗体の同定

40

有用な抗体標的(単数又は複数)としてALPP及び/又はALPPL2、及び有用な原型の抗体として、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF抗体を同定すると、ALPP及び/又はALPPL2に結合する他の「関連する」抗体は、ALPP/ALPPL2に結合し、例えば、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25A

50

DS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFによって結合されるエピトープで、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFの1つ以上と交差反応する抗体について、及び/又は中皮腫細胞(例えば、M28細胞株)に結合させるために、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFの1つ以上と交差反応する抗体についてスクリーニングすることにより容易に同定することができる。

10

【0317】**モノクローナル抗体**

ALPP及び/又はALPPL2に結合し、好ましくはM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFの1つ以上に結合されるエピトープに結合するモノクローナル抗体は、Kohler and Milstein (1975) Nature 256: 495によって報告されている標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術、Bリンパ球のウイルス若しくは腫瘍化形質転換、又はヒト抗体遺伝子のライブラリーを用いるファージディスプレイ技術等の様々な公知の技術を用いて生成され得る。特定の実施形態において、抗体は完全なヒトモノクローナル抗体である。

20

【0318】

したがって、一実施形態において、ハイブリドーマ法が、ALPP及び/又はALPPL2に結合する抗体を生成させるために使用される。この方法において、マウス又は他の適切な宿主動物は、免疫化に使用される抗原に特異的に結合する抗体を生成し又は生成することができるリンパ球を誘発させるために、適切な抗原を用いて免疫化され得る。代替的に、リンパ球はインビトロで免疫化され得る。次に、リンパ球は、ハイブリドーマ細胞を形成させるために、ポリエチレングリコール等の適切な融合剤を用いて骨髓腫細胞と融合され得る(Goding (1986年) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59~103頁(Academic Press))。ハイブリドーマ細胞が増殖している培養培地は、抗原に指向されたモノクローナル抗体の生成のために分析される。所望の特異性、親和性、及び/又は活性を有する抗体を生成するハイブリドーマ細胞を同定した後、クローンは、限界希釈手順によりサブクローン化され、標準的な方法により増殖されてもよい(同文献)。この目的に適切な培養培地は、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地を含む。加えて、ハイブリドーマ細胞は、動物の腹水腫瘍のようにインビボで増殖し得る。サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えば、プロテインAセファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又は親和クロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製法によって、培養培地、腹水、又は血清から分離され得る。

30

40

【0319】

別の実施形態において、ALPP及び/又はALPPL2に結合する抗体及び抗体部分は、例えば、McCaffertyら、(1990年) Nature, 348巻: 552~554頁、Clacksonら、(1991年) Nature, 352巻: 624~628頁、Marksら、(1991年) J. Mol. Biol., 222巻: 581~597頁; Hoetら、(

50

2005年) Nature Biotechnol., 23巻: 344~348頁; Ladnerらによる米国特許第5,223,409号;第5,403,484号;及び第5,571,698号; Dowerらによる米国特許第5,427,908号及び第5,580,717号; McCaffertyらによる米国特許第5,969,108号及び第6,172,197号; Griffithsらによる米国特許第5,885,793号;第6,521,404号;第6,544,731号;第6,555,313号;第6,582,915号及び第6,593,081号に記載されている技術を用いて生成される抗体ファージライブラリーから分離することができる。加えて、チェーンシャッフリング(Marksら、(1992年) Bio/Technology, 10巻:779~783頁)、並びに非常に大きなファージライブラリーを構築するための戦略としての組み合わせの感染及びインビボでの組換え(Waterhouseら、(1993年) Nucl. Acids. Res., 21巻: 2265~2266頁)による、高親和性(nM範囲)ヒト化抗体の生成はまた使用され得る。

10

【0320】

特定の実施形態において、ALPP及び/又はALPPL2に結合し、好ましくはM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFの1つ以上により結合されるエピトープに結合する、モノクローナル抗体又はその抗原結合部分は、上述のHofmannらによって報告されているファージディスプレイ技術を用いて生成される。この技術は、ヒトドナーから単離された免疫グロブリン配列の固有の組み合わせを有し、重鎖CDRに合成多様性を有しているヒトFabライブラリーの生成に参与する。次に、ライブラリーは、ALPP及び/又はALPPL2に結合する、好ましくはM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFの1つ以上による結合に競合する、Fabについてスクリーニングされる。

20

【0321】

更に別の実施形態において、ALPP及び/又はALPPL2に指向され、好ましくはM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFの1つ以上により結合されるエピトープを含むヒトモノクローナル抗体は、マウスの免疫系よりもヒトの免疫系の部分を保有するトランスジェニック又は染色体導入(transchromosomal)マウスを用いて生成することができる(例えば、Lonbergら (1994) Nature 368(6474): 856-859; Lonberg and Huszar, (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, Harding and Lonberg (1995) Ann. NY. Acad. Sci. 764: 536-546,全てがLonberg and Kayによる米国特許第5,545,806号;第5,569,825号;第5,625,126号;第5,633,425号;第5,789,650号;第5,877,397号;第5,661,016号;第5,814,318号;第5,874,299号;及び第5,770,429号;Suraniらによる米国第5,545,807号;全てがLonberg and KayによるPCT国際公開第92/03918号,第93/12227号,第94/25585号,第97/13852号,第98/24884号及び第99/45962号; KormanらによるPCT国際公開第01/14424号を参照されたい)。

30

40

【0322】

別の実施形態において、ALPP及び/又はALPPL2に指向され、好ましくはM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25A

50

D、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFの1つ以上により結合されるエピトープに結合するヒト抗体は、ヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入染色体(transchromosome)を保有するマウス等の、導入遺伝子及び導入染色体上にヒト免疫グロブリン配列を保有するマウスを用いて生じさせることができる(例えば、IshidaらによるPCT国際公開第02/43478号を参照されたい)。

【0323】

ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替的なトランスジェニック動物系は、当該技術分野において利用可能であり、本発明の抗ALPP/ALPPL2抗体を生じさせるために使用され得る。例えば、Xenomouse(Abgenix, Inc.)と称される代替的なトランスジェニック系が使用され得;このようなマウスは、例えば、Kucherlapatiらによる米国特許第5,939,598号;第6,075,181号;第6,114,598号;第6,150,584号、及び第6,162,963号に記載されている。

10

【0324】

ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替的な染色体導入動物系は、当該技術分野において利用可能であり、本明細書において意図される抗ALPP/ALPPL2抗体を生じさせるために使用され得る。例えば、ヒト重鎖導入染色体とヒト軽鎖導入染色体の両方を保有するマウスは、Tomizukaら、(2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727に記載されるように使用され得る。更に、ヒト重鎖及び軽鎖の導入染色体を保有するウシは、当該技術分野において報告されており(例えば、Kuroiwaら、(2002年) Nature Biotechnology 20巻: 889~894頁)、抗ALPP/ALPPL2抗体を生じさせるために使用され得る。

20

【0325】

更に別の実施形態において、ALPP及び/又はALPPL2に特異的に結合し、好ましくはM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFの1つ以上により結合されるエピトープに結合する抗体は、このような抗体を生成するトランスジェニック植物及び/又は培養植物細胞(例えばタバコ、トウモロコシ、及びウキクサ等)を用いて調製され得る。例えば、抗体又はその抗原結合部分を発現するトランスジェニックタバコの葉は、例えば、誘導プロモーターを用いることによりこのような抗体を生成するために使用され得る(例えば、Cramerら、(1999年) Curr. Top. Microbol. Immunol. 240巻: 95~118頁を参照されたい)。また、トランスジェニックトウモロコシは、このような抗体及びその抗原結合部分を発現するために使用され得る(例えば、Hoodら、(1999年) Adv. Exp. Med. Biol. 464巻: 127~147頁を参照されたい)。抗体はまた、例えば、タバコの種子及びジャガイモの塊茎を用いて、一本鎖抗体(scFv's)等の抗体部分を含むトランスジェニック植物種子から大量に生成され得る(例えば、Conradら、(1998年) Plant Mol. Biol. 38巻: 101~109頁を参照されたい)。植物中に抗体又は抗原結合部分を生成する方法はまた、例えば、Fischerら、(1999年) Biotechnol. ALPP. Biochem. 30巻: 99~108頁、Maら、(1995年) Trends Biotechnol. 13巻: 522~527頁、Maら、(1995年) Plant Physiol. 109巻: 341~346頁; Whitelamら、(1994年) Biochem. Soc. Trans. 22巻: 940~944頁、米国特許第6,040,498号及び米国特許第6,815,184号に見出すことができる。

30

40

【0326】

ALPP及び/又はALPPL2に結合する、好ましくは本明細書に開示されているもの等を含む任意の技術を用いて調製され得るM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFの1つ以上により結合されるエピトープに結合する、モ

50

ノクローナル抗体又はその一部の結合特異性は、免疫沈降により、又は放射免疫測定法(RIA)若しくは酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)等のインビトロの結合分析により決定され得る。モノクローナル抗体又はその一部の結合親和性は、Munsonら、(1980年) Anal. Biochem., 107巻:220頁のスキチャード分析によって決定することができる。

【0327】

M25AD、MD25ADX、M25、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AG、M25AS、M25AV、及び/又はM25ALとの交差反応性

別のアプローチにおいて、ALPP及び/又はALPPL2に結合する抗体は、本明細書に記載されている「原型の」抗体(例えば、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF)と同じエピトープに結合するという事実によって同定され得る。このような抗体を同定するために、対象のエピトープを単離する必要はない。特定の実施形態において、例えば、ALPP/ALPP2を発現している細胞(例えば、M28等の中皮腫細胞等)による結合、及び/又はALPP/ALPPL2への結合について、本発明の原型の抗体と競合する抗体に関する抗体ライブラリーをスクリーニングすることができる。

【0328】

エピトープ結合及び/又は細胞結合及び/又は内在化についてライブラリーをスクリーニングする方法は、当業者に周知である。特定の実施形態において、交差反応性のALPP及び/又はALPPL2抗体は、本明細書に記載されているM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF抗体の1つ以上と少なくとも60%、好ましくは80%、より好ましくは90%、最も好ましくは少なくとも95%又は少なくとも99%の交差反応性を示す。

【0329】

他の「関連する」抗ALPP/ALPPL2抗体を選択するためのファージディスプレイ方法

M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFの抗体について公知の配列を用いて、様々なファージディスプレイ(又は酵母ディスプレイ)法が、ALPP/ALPPL2に特異的に結合する、好ましくは同じ又はより大きな親和性でM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFにより結合されるエピトープに結合する、他の抗体を生成するために使用され得る。

【0330】

チェーンシャッフリング法

抗体変異体を作製する1つのアプローチは、ファージディスプレイ又は酵母ディスプレイのライブラリーにおいて新たなパートナー(チェーンシャッフリング)(Clacksonら、(1991年) Nature. 352巻: 624~628頁)を作製するために、本来のV_H又はV_L遺伝子をV遺伝子のレパートリーに置換することであった。チェーンシャッフリング及びファージディス

10

20

30

40

50

レイを用いて、ハプテンフェニルオキサゾロン(ph0x)に結合するヒトscFv抗体断片の親和性は、300nMから1nM(300倍)に増大した(Marksら、(1992年) Bio/Technology 10巻: 779～783頁)。

【0331】

したがって、例えば、本明細書に記載されている抗ALPP/ALPPL2抗体の親和性を変えるために、突然変異体scFv遺伝子レパートリーは、原型のM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF抗体及びヒトV_L遺伝子レパートリー(軽鎖シャッフリング)のV_H遺伝子を含む状態で作製され得る。scFv遺伝子レパートリーは、ファージディスプレイベクター、例えば、pHEN-1(Hoogenboomら、(1991年) Nucleic Acids Res., 19巻: 4133～4137頁)又は他のベクターにクローニングされ得、形質転換後、形質転換体のライブラリーが得られる。

10

【0332】

同様に、重鎖シャッフリングについて、突然変異体scFv遺伝子レパートリーは、原型のM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFの抗体及びヒトV_H遺伝子レパートリー(重鎖シャッフリング)のV_L遺伝子を含む状態で、作製され得る。scFv遺伝子レパートリーは、ファージディスプレイベクター、例えば、pHEN-1(Hoogenboomら、(1991年) Nucleic Acids Res., 19巻: 4133～4137頁)、又は他のベクターにクローニングされ得、形質転換後、形質転換体のライブラリーが得られる。

20

【0333】

結果として生じるライブラリーは、関連する標的(例えば、ALPP/ALPPL2、ALPP/ALPPL2を発現する細胞)に対して、及び/又はM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFとの交差反応性についてスクリーニングされ得る。

30

【0334】

結合親和性を改善する部位特異的突然変異誘発

アミノ酸側鎖に接触する多数の抗原は、典型的には、相補性決定領域(CDR)に位置され、V_Hに3つ(CDR1、CDR2、及びCDR3)及びV_Lに3つ(CDR1、CDR2、及びCDR3)に位置する(Chothiaら、(1987年) J. Mol. Biol., 196巻: 901～917頁; Chothiaら、(1986年) Science, 233巻: 755～8; Nhanら、(1991年) J. Mol. Biol., 217巻: 133～151頁)。これら残基は、抗原のための抗体親和性の原因となる、多数の結合エネルギーに寄与する。他の分子において、リガンドに接触するアミノ酸の突然変異は、その結合パートナーのために1つのタンパク質分子の親和性を増大させるのに有効な手段であることが示されている(Lowmanら、(1993年) J. Mol. Biol., 234巻: 564～578頁; Wells (1990年) Biochemistry, 29巻: 8509～8516頁)。例えば、本明細書に記載されているように、CDRの部位特異的突然変異誘発、及びALPP/ALPPL2を発現している細胞/細胞株に対するスクリーニングは、結合親和性が改善された抗体を生成することができる。

40

【0335】

より高い親和性のヒトscFvを生成するためのCDR無作為化

単純な部位特異的突然変異誘発の拡張において、突然変異体抗体ライブラリーが作製さ

50

れ得、この場合、部分的又は全体のCDRは無作為化される(V_L CDR1、CDR2及び/若しくはCDR3並びに/又は V_H CDR1、CDR2及び/若しくはCDR3)。一実施形態において、各CDRは、鑄型として公知の抗体(例えば、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFGYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF)を用いて、別個のライブラリーにおいて無作為化される。各CDRライブラリーからの最も高い親和性突然変異体のCDR配列は、親和性の付加的な増加を得るために組み合わせられる。同様の方法が、 3.4×10^{-10} から 9.0×10^{-13} Mまで1500倍を超えて、増殖ホルモン受容体のためにヒト増殖ホルモン(hGH)の親和性を増大させるために使用されている(Lowmanら、(1993年) J. Mol. Biol., 234巻: 564~578頁)。

10

【0336】

V_H CDR3は、多くの場合、結合ポケットの中心を占領し、したがって、この領域における突然変異は、親和性の増大をもたらす可能性がある(Clacksonら、(1995年) Science, 267巻: 383~386頁)。一実施形態において、 V_H CDR3残基は無作為化される(例えば、Schierら、(1996年) Gene, 169巻: 147~155頁; Schier及びMarks (1996年) Human Antibodies and Hybridomas. 7巻: 97~105頁, 1996年; Schierら、(1996年) J. Mol. Biol. 263巻: 551~567頁を参照されたい)。

【0337】

20

他の抗体修飾

一実施形態において、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFGYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF抗体に由来する部分的な抗体配列は、構造的及び機能的に関連する抗体を生成するために使用され得る。例えば、抗体は、優位に、6つの重鎖及び軽鎖の相補性決定領域(CDR)に位置するアミノ酸残基を介して、標的抗原と相互に作用する。この理由により、CDR内のアミノ酸配列は、CDRの外側の配列よりも、個々の抗体間において多様である。CDR配列が大部分の抗体-抗原相互作用に起因するため、異なる特性を有する異なる抗体からフレームワーク配列上に移植された特定の天然に存在する抗体からのCDR配列を含む、発現ベクターを構築することにより、特定の天然に存在する抗体の特性を模倣する組換え抗体を発現することが可能である(例えば、Riechmannら、(1998年) Nature 332巻: 323~327頁; Jonesら、(1986年) Nature 321巻: 522~525頁; Queenら、(1989年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86巻: 10029~10033頁を参照されたい)。このようなフレームワーク配列は、生殖系列抗体遺伝子配列を含む公的なDNAデータベースから得ることができる。

30

【0338】

したがって、CDR等の、抗ALPP/ALPPL2抗体の1つ以上の構造上の特徴は、例えば、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF抗体の少なくとも1つの機能特性、例えば、ALPPL2を発現している腫瘍細胞への結合、を保持する、構造上関連する抗ALPP/ALPPL2抗体を作製するために使用され得る。

40

【0339】

特定の実施形態において、1つ以上のM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M2

50

5ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFのCDR領域(例えば、VH CDR1、及び/若しくはCDR2、及び/若しくはCDR3、並びに/又はVL CDR1、及び/若しくはCDR2、及び/若しくはCDR3)は、付加的な、組換えにより操作された抗ALPP/ALPPL2抗体を作製するために、公知のヒトフレームワーク領域及びCDRと組換えにより組み合わせられる。重鎖及び軽鎖の可変フレームワーク領域は、同じ又は異なる抗体配列に由来し得る。

【0340】

抗原のための抗体の結合特異性/親和性において、抗体の重鎖及び軽鎖のCDR3ドメインが特に重要な役割を果たすことは、当該技術分野において周知である(例えば、Hallら、(1992年) J. Immunol., 149巻: 1605~1612頁; Polymenisら、(1994年) J. Immunol., 152巻: 5318~5329頁; Jahnら、(1995年) Immunobiol., 193巻: 400~419頁; Klimkaら、(2000年) Brit. J. Cancer, 83巻: 252~260頁; Beiboerら、(2000年) J. Mol. Biol., 296巻: 833~849頁; Raderら、(1998年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95巻: 8910~8915頁; Barbasら、(1994年) J. Am. Chem. Soc., 116巻: 2161~2162頁; Ditzelら、(1996年) J. Immunol., 157巻: 739~749頁を参照されたい)。したがって、特定の実施形態において、本明細書に記載されている特定の抗体(例えば、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF)の重鎖及び/又は軽鎖のCDR3を含む抗体が生成される。したがって、特定の実施形態において、本明細書に記載されている特定の抗体(例えば、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF)の重鎖及び/又は軽鎖のCDR1を含む抗体が生成される。更に、抗体は、本発明の抗体(例えば、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF)の他の重鎖及び/又は軽鎖CDRを含み得る。

【0341】

特定の実施形態において、上述の操作された抗体のCDR1、2、及び/又は3の領域は、本明細書において開示されているもの(例えば、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFのCDR)のような正確なアミノ酸配列(単数又は複数)を含み得る。しかしながら、当業者は、正確なCDR配列からのいくつかの偏向が可能である一方、ALPP及び/又はALPPL2に効果的に結合する抗体の能力(例えば、保存的なアミノ酸置換)をなおも保持していることを認識する。したがって、別の実施形態において、操作された抗体は、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF)の他の重鎖及び/又は軽鎖CDRを含み得る。

YGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF抗体のCDRの1つ以上に対して、例えば、90%、95%、98%、99%、又は99.5%同一である1つ以上のCDRで構成され得る。

【0342】

別の実施形態において、CDRの1つ以上の残基は、より好ましいオンレートの結合を達成するために結合を修飾するように変更され得る。この戦略を用いて、例えば 10^{10}M^{-1} 以上の極めて高い結合親和性を有する抗体が達成され得る。当該技術分野において周知であり、本明細書に記載されている親和性成熟技術は、CDR領域(単数又は複数)を変更し、その後、結合における所望の変化について結果として生じる結合分子をスクリーニングするために使用され得る。したがって、CDR(単数又は複数)が変更されると、結合親和性及び免疫原性の変化がモニタリングされ、最良の組み合わせ結合及び低い免疫原性のために最適化された抗体を達成するように採点され得る。

10

【0343】

CDR内の修飾に加えて又はそれに代えて、修飾はまた、これらの修飾が抗体の結合親和性を排除しない限り、抗体の重鎖及び/又は軽鎖の可変領域のフレームワーク領域であるFR1、FR2、FR3、及びFR4の1つ以上の中で行われ得る。

【0344】

別の実施形態において、抗体は、例えば、癌の処置において抗体の効果を増強させるように、エフェクター機能に関して更に修飾される。例えば、システイン残基(単数又は複数)は、Fc領域に導入され、それにより、この領域における鎖間のジスルフィド結合形成が可能となる。このように生成されたホモ二量体抗体は、補体媒介性の細胞死滅及び抗体依存性の細胞毒性(ADCC)を増大させ得る(例えば、Caronら、(1992年) J. Exp Med. 176巻: 1191~1195頁; Shopes (1992年) J. Immunol. 148巻: 2918~2922頁を参照されたい)。また、抗腫瘍活性が増強されたホモ二量体抗体は、ヘテロ二官能性クロスリンカーを用いて調製され得る(例えば、Wolffら、(1993年) Cancer Res. 53巻: 2560~2565頁を参照されたい)。或いは、二重のFc領域を有しており、それにより補体溶解及びADCC能力が増強され得る抗体は操作され得る(例えば、Stevensonら、(1989年) Anti-Cancer Drug Design 3巻: 219~230頁を参照されたい)。

20

30

【0345】

いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。特定の実施形態において、抗体は、ヒトフレームワークでも非ヒトフレームワークでも見出されないが、抗体性能を更に改良し、最適化するために含まれる残基を含むことができる。特定の実施形態において、抗体は、PCT国際公開第99/58572号に記載されているように修飾されたFc領域を有することができる。

【0346】

抗体の生成

様々な実施形態において、本明細書に記載されている抗体は、化学合成により生成され得、又は組換え的に発現され得る。

40

【0347】

化学合成

本明細書に提供されている配列情報を用いて、本明細書に記載される抗ALPPL2特異抗体(例えば、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF)、又はその変異体が、ペプチド合成の周知の方法を用いて化学的に合成され得る。配列のC末端アミノ酸が不溶性支持体に結合され、その後、配列中の残りのアミノ酸が

50

連続的に付加される固相合成は、一本鎖抗体の化学合成のための好ましい1つの方法である。固相合成のための技術は、Barany and Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis; 3~284頁 in The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. 2巻: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifieldら、(1963年) J. Am. Chem. Soc., 85巻: 2149~2156頁, Stewartら、(1984年) Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed. Pierce Chemical Co., Rockford, Illに記載されている。

【0348】

抗ALPPL2/ALPPL抗体の組換え発現

特定の実施形態において、本明細書に記載されている抗ALPPL2/ALPPL特異抗体(例えばM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF)、又はその変異体が、当業者に周知の方法を用いて組換え発現される。例えば、本明細書に提供されているM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFの配列情報を用いて、所望の抗体をコード化する核酸が、当業者に公知である多数の標準的方法に従って調製され得る。核酸は、次に所望の抗体又は鎖を発現する宿主細胞にトランスフェクトされる。

【0349】

これらの目的を達成するための分子クローニング技術は、当該技術分野において公知である。種々様々なクローニング及びインビトロでの増幅法は、組換え核酸の構築に適している。多数のクローニング活動を介して当業者に指向させるのに十分なこれらの技術及び指示の例は、Berger及びKimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology 152巻 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrookら、(1989年) Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2版) 1~3巻, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, (Sambrook); and Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubelら、eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1994年 Supplement) (Ausubel)に見出される。また、組換え免疫グロブリンを生成する方法は、当該技術分野において公知である。Cabilly, 米国特許第4,816,567号; Queenら、(1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA 86: 10029~10033を参照されたい。更に、抗体を発現させるための詳細なプロトコールはまた、Liuら、(2004年) Cancer Res. 64巻: 704~710頁, Poulら、(2000年) J. Mol. Biol. 301巻: 1149~1161頁等に提供されている。

【0350】

他の抗体形態の作製

本明細書において提供される一本鎖抗体の公知の及び/又は同定された配列(例えば、V_H及び/又はV_L配列)を用いて、他の抗体形態を容易に作製することができる。このような形態は、限定されないが、多価抗体、完全抗体、scFv、(scFv')₂、Fab、(Fab')₂、キメラ抗体等を含む。

【0351】

ホモ二量体の作製

例えば、(scFv')₂抗体を作製するために、2つの抗ALPP/ALPPL2抗体は、リンカー(例えば、炭素リンカー、ペプチド等)を介して、又は、例えば、2つのシステイン間のジスルフィド結合を介して接続される。したがって、例えば、ジスルフィドが連結したscFvを作製するために、システイン残基は、本明細書に記載されている抗体のカルボキシ末端での部

位特異的突然変異誘発により導入され得る。

【0352】

scFvはこの構築物から発現され、IMACにより精製され、ゲル濾過により分析され得る。(scFv')₂二量体を生成するために、システインは、1mMの3-メルカプトエタノールとのインキュベーションによって還元され、scFvの半分はDTNBの付加により遮断される。遮断されたscFv及び遮断されないscFvと一緒にインキュベートされて、(scFv')₂を形成し、結果として生じる物質はゲル濾過により分析され得る。結果として生じる二量体の親和性は、例えば、BIAcoreによる標準的な方法を使用して決定することができる。

【0353】

1つの例示的な実施形態において、(scFv')₂二量体は、リンカー、例えば、ペプチドリ
ンカーを介してscFv'断片を接続させることによって作製される。これは、当業者に周知
である種々様々な手段により達成され得る。例えば、1つのアプローチが、Holligerら、(
1993年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90巻: 6444~6448頁(国際公開第94/13804号もま
た参照されたい)に記載されている。

【0354】

本明細書において提供されるV_H及び/又はV_L配列を用いることにより、Fab及び(Fab')₂
二量体もまた容易に調製できることに留意されたい。Fabは、ジスルフィド結合によってV
_H-C_H1に接続された軽鎖であり、当業者に公知である標準的な方法を用いて容易に作製す
ることができる。F(ab')₂は、例えば、(scFv')₂二量体に関して上述したように、Fabを二
量体化することにより生成することができる。

【0355】

キメラ抗体

本明細書において意図される抗体はまた、「キメラ」抗体を含み、そこでは、重鎖及び
/又は軽鎖の一部が、特定の種に由来し、又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属
している抗体における、対応する配列と同一である又はそれに相同であり、一方、鎖(単
数又は複数)の残りは、別の種に由来し、又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属し
ている抗体、並びにこのような抗体の断片における、対応する配列と同一である又はそれ
に相同であるが、それらが所望の生物活性を示す場合に限る(例えば、米国特許第4,816,5
67号;Morrisonら、(1984年) Proc. Natl. Acad. Sci. 81巻: 6851~6855頁等を参照され
たい)。

【0356】

本明細書において提供される原型の抗体(例えば、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M2
5FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M
25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M2
5GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2r
d3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF
、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF)が完全なヒト抗体である一方で、キメ
ラ抗体は、特に、このような抗体がヒト以外の種に使用される場合に(例えば、獣医学的
適用において)意図される。キメラ抗体は、2つの異なる種からの部分(例えば、ヒト及び
非ヒトの部分)を含む抗体である。典型的には、キメラ抗体の抗原を組み合わせた領域(又
は可変領域)は、1つの種の供給源に由来し、(免疫グロブリンに生物学的エフェクター機
能を付与する)キメラ抗体の定常領域は別の供給源に由来する。キメラ抗体を生成する多
くの方法は、当業者に周知である(例えば、米国特許第5,502,167号、第5,500,362号、第5
,491,088号、第5,482,856号、第5,472,693号、第5,354,847号、第5,292,867号、第5,231,
026号、第5,204,244号、第5,202,238号、第5,169,939号、第5,081,235号、第5,075,431号
、第4,975,369号、及びPCT出願国際公開第91/0996号を参照されたい)。

【0357】

一般的に、キメラ抗体を生成するために使用される手順は、以下の工程からなる(いく
つかの工程の順序が交替されてもよい):(a)抗体分子の抗原結合部分をコードする正確な
遺伝子セグメントを同定及びクローニングする工程;この遺伝子セグメント(重鎖について

10

20

30

40

50

VDJ、可変、多様性、及び連結領域、又は軽鎖についてVJ、可変、連結領域、又は簡単には、V若しくはは可変領域、或いは V_H 及び V_L 領域として知られている)は、cDNA又はゲノム形態のいずれかであり得る；(b)ヒト定常領域又はその所望の部分をコードする遺伝子セグメントをクローニングする工程；(c)完全なキメラ抗体が転写可能であり、翻訳可能な形態でコードされるように、定常領域へ可変領域をライゲートする工程；(d)プロモーター、エンハンサー、及びポリ(A)付加シグナル等の、選択可能なマーカー及び遺伝子調節領域を含有するベクターへこの構築物をライゲートする工程；(e)宿主細胞(例えば、細菌)においてこの構築物を増幅する工程；(f)真核細胞、最も頻繁には哺乳動物リンパ球にDNAを導入する工程(トランスフェクション)；及び、キメラ抗体の発現に適している条件下で宿主細胞を培養する工程。

10

【0358】

様々な別個の抗原結合特異性を有する抗体は、キメラタンパク質(例えば、抗TNP:Boulianneら、(1984年) Nature, 312巻: 643頁)及び抗腫瘍抗原を生成するために、これらのプロトコルによって取り扱われている(例えば、Sahaganら、(1986年) J. Immunol., 137巻: 1066頁を参照されたい)。同様に、いくつかの異なるエフェクター機能は、新たな配列を、抗原結合領域をコードする配列に連結することによって達成されている。これらのいくつかは、酵素(Neubergerら、(1984) Nature 312: 604)、別の種由来の免疫グロブリン定常領域、及び別の免疫グロブリン鎖の定常領域を含む(Sharonら、(1984年) Nature 309巻: 364頁；Tanら、(1985年) J. Immunol. 135巻: 3565~3567頁)。

【0359】

20

特定の実施形態において、組換えDNAベクターは、抗ALPP/ALPPL2(例えば、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF)抗体を生成する細胞株をトランスフェクトするために使用される。新規な組換えDNAベクターは、細胞株において免疫グロブリン定常領域をコードする遺伝子の全て又は一部を置換するための「置換遺伝子」(例えば、置換遺伝子は、薬物、毒素、又は他の分子等へのコンジュゲーションを促進するために、ヒト免疫グロブリン、特異的免疫グロブリンクラス、又は酵素、毒素、生物学的に活性なペプチド、増殖因子、阻害剤、又はリンカーペプチドの定常領域の全て又は一部をコードし得る)、及び抗体を生成する細胞内の免疫グロブリン配列に相同な、標的化された組換えを可能にする「標的配列」を含有する。

30

【0360】

別の実施形態において、組換えDNAベクターは、所望のエフェクター機能を有する抗体(例えば、ヒト免疫グロブリンの定常領域)を生成する細胞株をトランスフェクトするために使用され、その場合、組換えベクターに含有される置換遺伝子は、ALPPL2/ALPP特異抗体の領域の全て又は一部をコードし得、組換えベクターに含有される標的配列は、抗体を生成する細胞内での相同組換え及び標的遺伝子修飾を可能にする。いずれかの実施形態において、可変領域又は定常領域の一部のみが置換されると、結果として生じるキメラ抗体は、同じ抗原を画定することができ、及び/又は、変更され若しくは改善されてはいるが、同じエフェクター機能を有しており、それにより、キメラ抗体は、より大きな抗原特異性、より大きな親和結合定数、エフェクター機能の増大、又はトランスフェクトされた抗体を生成する細胞株による分泌及び生成の増大等を実証し得る。

40

【0361】

実施された実施形態にかかわらず、(選択可能なマーカーを介して)統合されたDNAのための選択のプロセス、キメラ抗体生成についてのスクリーニング、及び細胞のクローニングは、キメラ抗体を生成する細胞のクローンを得るために使用され得る。

【0362】

したがって、モノクローナル抗体のための修飾をコードする一片のDNAは、B細胞又はハ

50

イブリドーマ細胞株内に発現された免疫グロブリン遺伝子の部位に直接標的化とされ得る。任意の特定の修飾のためのDNA構築物は、任意のモノクローナル細胞株又はハイブリドーマのタンパク質生成を変更するために作製され得る。遺伝子がランダムな位置ではなくその天然の染色体位置に存在する場合、キメラ抗体の発現レベルはより高くなくてはならない。キメラ(ヒト化)抗体を調製するための詳細な方法は、米国特許第5,482,856号に見出すことができる。

【0363】

インタクトなヒト抗体

別の実施形態において、本発明は、インタクトな完全なヒト抗ALPP/ALPPL2抗体を提供する。このような抗体は、キメラなヒト化抗体の作製と同様の方法で容易に生成することができる。この例において、本明細書に記載されているVH及びVLドメインは、完全にヒトであり、実質的に完全な抗体(例えば、IgG、IgA、IgM等)に容易に操作され得る。

10

【0364】

例えば、scFvを完全なヒトの実質的に完全長の免疫グロブリンに変換する方法は、とりわけBrarenら、(2007年) Clin. Chem., 53巻(5号): 837~844頁によって報告されている。Brarenら(同文献)によって報告されている1つのアプローチにおいて、ヒト免疫グロブリン定常領域は、標準的な反応条件を用いて、ヒト末梢血単核細胞由来のcDNAから合成される。ヒトIgG1及びIgG4重鎖定常領域(IGHG1及びIGHG4)の遺伝子は、AscI及びKpnI部位($\gamma 1$: GAT CGG TAC CGA TCG GCG CGC CCA AAT CTT GTG ACA AAA CT CAC (配列番号54)、 $\gamma 4$: GAT CGG CGC GCC TTC CAC CAA GGG CCC ATC CGT CTT CCC CCT (配列番号55))及びSfiI部位($\gamma 1$: GAT CGG CCC AGC CGG CCT CAT TTA CCC GGA GAC AGG GAG AGG CTC TTC (配列番号56)、 $\gamma 4$: GAT CGG CCC AGC CGG CCT CAT TTA CCC AGA GAC AGG GA(配列番号57))を含有するPCRプライマーを用いて増幅され、 $\gamma 1$ C_H2-3及び $\gamma 4$ C_H2-3ドメインは、AscI及びKpnI部位($\gamma 1$: GAT CTC TAG ATC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA GGC TCT TC (配列番号58)、 $\gamma 1$: GAT CGG CGC GCC CAG CAA CAC CAA GGT GGA CA (配列番号59))及びXbaI部位($\gamma 1$: GAT CGG CGC GCC AGC CTC CAC CAA GGG CCC AT (配列番号60)、 $\gamma 1$: GAT CTC TAG ATC ATT TAC CCA GAG ACA GGG A γ)を含有するプライマーを用いて増幅される。

20

【0365】

ヒトIgE重鎖定常領域(IGH E)の遺伝子の増幅については、AscI部位(GAT CGG CGC GCC CAT CCG TCT TCC CCT TGA (配列番号61))、SfiI部位、4×hisタグ(GAT CGG CCC AGC CGG CCT CAT TTA CCG GGA TTT ACA GAC AC (配列番号62))を含有するプライマーを使用することができ、 ϵ C_H2-4ドメインについては、AscI部位(GAT CGG CGC GCC CAC CGT GAA GAT CTT AC (配列番号63))、XbaI部位、及び4×hisタグ(GAT CTC TAG ATC AAT GGT GGT GAT GTT TAC CGG GAT TTA CAG ACA CCG (配列番号64))を含有するプライマーを使用することができる。ラット κ 軽鎖に関する遺伝子のシグナル配列は、NheI部位(GTA CGC TAG CAA GAT GGA ATC ACA GAC CCA GGT CCT CAT GTC CCT GCT GCT CTG GAT TTC (配列番号65))及びKpnI部位(CAT GTC CCT GCT GCT CTG GAT TTC TGG TAC CTG TGG GGT GAG TCC TTA CAA CGC GTG TAC (配列番号66))を含有するPCRプライマーによって合成される。リーダー配列を哺乳動物発現ベクター、例えばpcDNA3.1-zeo(Invitrogen Life Technologies)に導入した後、個々のIgドメイン、Fcドメイン、並びに重鎖全体の $\gamma 1$ 、 $\gamma 4$ 及び ϵ をXbaI及びAscI部位を介して挿入することができる。特定のscFvのscFv-C_H2-3又はscFv-C_H2-4フォーマットへの移入は、N末端のBsiWI部位及びC末端のAscI部位のPCRによる導入によって行うことができる。続いて、DNAをシグナル配列及び特定の定常領域を含有するベクターにライゲートすることができる。

30

40

【0366】

ヘテロ四量体IgG及びIgEフォーマットの発現のために、哺乳動物発現ベクターpBudCE4.1(Invitrogen Life Technologies)を使用することができる。ヒト軽鎖定常ドメイン(IGKC)は、XbaI部位を含む1つのPCRプライマー、及びSgfI部位を含む別のプライマー(GAT CTC TAG ACT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC(配列番号67)及びGAT CGC GAT CGC ACG AAC TGT GGC TGC ACC ATC TGT C(配列番号68))を用いて増幅することができる。2つのヒトシグナル

50

配列VH3-64及びVκIは、NotI及び内部SwaI又はSalI、及び可変領域の挿入のための内部SbfI部位を有するプライマー(AGA ATG CGG CCG CTA TGG AAT TGG GGC TGA GCT GGG TTT TCC TTG TTG C TAT ATT TAAA TGT GTC CAG TGT(配列番号69)及びGAT CGT CGA CAT GGA CAT GAG GGT CCC CGC TCA GCT CCT GGG GCT CCT GCT ACT CTG CCT GCA GGG TGC CAG ATG T(配列番号70))を用いるPCRによって合成され得る。リーダー配列及び定常領域をアセンブリした後、次に、可変領域は、それぞれ、SgfI及びSbfI部位、又はAscI及びSwaI部位を介して導入することができる。最後に、発現ベクター、例えばpBudCE4.1に、リーダー配列を含む軽鎖配列全体はXbaI及びSalIを介して導入することができ、リーダー配列を含む重鎖配列全体はNotI部位及びSfiI部位を介して導入することができる。

【0367】

10

これらのアプローチは例示であり、限定的ではない。scFv及び他の抗体断片を全長免疫グロブリンに変換する多数の他の方法は、当業者に公知である。

【0368】

ダイアボディ

特定の実施形態において、本明細書に記載されているV_H及びV_Lドメインの1以上を含有するダイアボディが意図される。用語「ダイアボディ」とは、典型的には、2つの抗原結合部位を有する抗体断片を指す。断片は、典型的には、同じポリペプチド鎖(V_H-V_L)において軽鎖可変ドメイン(V_L)に連結される重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。同じ鎖上の2つのドメイン間で対にすることを可能にするには短すぎるリンカーの使用によって、ドメインは、別の鎖の相補的なドメインと対になり、2つの抗原結合部位を作製することを強いられる。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404,097号;国際公開第93/11161号、及びHolligerら、(1993年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90巻: 6444~6448頁においてより詳細に記載される。

20

【0369】

ユニボディ

特定の実施形態において、本明細書において提供される配列情報を用いて、抗ALPP/ALPPL2抗体はユニボディとして構築され得る。ユニボディは、特定の小さな抗体のフォーマットよりも長い治療濃度域が予測される、安定した、より小さな抗体のフォーマットを生成する抗体技術である。特定の実施形態において、ユニボディは、抗体のヒンジ領域の排除によりIgG4抗体から生成される。完全な大きさのIgG4抗体とは異なり、分子断片の半分は、非常に安定しており、ユニボディと称される。IgG4分子を半分にする事で、ユニボディ上に、標的に結合することができる領域が1つだけ残る。ユニボディを生成する方法は、PCT国際公開第2007/059782号において詳細に記載され、これはその全体において参照により本明細書に組み込まれる(例えば、Kolfshotenら、(2007年) Science 317巻: 1554~1557頁もまた参照されたい)。

30

【0370】

アフィボディ

特定の実施形態において、本明細書において提供される配列情報は、ALPP/ALPPL2に結合するアフィボディ分子を構築するために使用される。アフィボディ分子は、ブドウ球菌タンパク質AのIgG結合ドメインの1つに由来する、58-アミノ酸残基タンパク質ドメインに基づく、親和性タンパク質のクラスである。この3つのヘリックス束のドメインは、組み合わせのファージミドライブラリーの構築のための足場として使用され、これらのライブラリーからは、所望の分子を標的化するアフィボディ変異体が、ファージディスプレイ技術を用いて選択され得る(例えば、Nordら、(1997年) Nat. Biotechnol. 15巻: 772~777頁; Ronmarkら、(2002年) Eur. J. Biochem., 269巻: 2647~2655頁を参照されたい)。アフィボディの詳細及び製造方法は、当業者に公知である(例えば、全体において参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,831,012号を参照されたい)。

40

【0371】

上述の抗体は、当業者に周知の方法を用いて、全体のインタクトな抗体(例えば、IgG)、抗体断片、又は一本鎖抗体として提供されることが認識される。加えて、抗体は、免

50

疫原性を減少させるために根本的に任意の哺乳動物種由来であり得るが、抗体及び/又はイムノコンジュゲートが使用される種に由来する抗体を使用することが望ましい。言い換えれば、ヒトに使用するために、ヒト抗体、ヒト化抗体、又はキメラヒト抗体を使用することが望ましい。

【0372】

抗体/ポリペプチドの結合親和性の測定

上記で説明したように、結合活性の増大のための選択は、標的抗原のための抗体(例えば、ALPPL2、特に、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLFの1つ以上に結合されるエピトープ)の親和性の測定を伴うことができる。このような測定を行う方法は、当業者に周知である。簡潔には、例えば、抗体の K_d は、例えばBIAcore、表面プラズモン共鳴に基づくバイオセンサーにおいて標的細胞に結合する動力学から決定される。この技術のために、抗原又は細胞(例えば、ALPPL2を発現している細胞)は、質量変化を検出することができる、誘導体化されたセンサチップに繋がれる。抗体がセンサチップ上を通過すると、抗体は、定量化可能な質量の増加を結果としてもたらす抗原に結合する。抗体の濃度に応じた結合速度の測定を用いて、結合速度定数(k_{on})を計算することができる。結合フェーズ後、緩衝液がチップの上を通過し、抗体の解離の速度(K_{off})が決定される。 K_{on} は典型的に 1.0×10^2 から 5.0×10^6 の範囲で、 K_{off} は 1.0×10^{-1} から 1.0×10^{-6} の範囲で測定される。平衡定数 K_d は頻繁に、 K_{off}/k_{on} として計算され、したがって、典型的には、 10^{-5} から 10^{-12} の範囲で測定される。この方法で測定される親和性は、蛍光消光滴定により溶液中で測定される親和性と十分に相関する。

【0373】

ALPP/ALPPL2に特異的に結合する抗体を含むイムノコンジュゲート

本明細書に記載されている原型の抗ALPP/ALPPL2抗体(例えば、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF)は、ALPPL2を発現している癌細胞(例えば、限定されないが、中皮腫、精巣癌、子宮内膜癌、卵巣癌、膵臓癌、及び非小細胞肺癌等の癌の細胞)に特異的に結合する。抗体は、(例えば、ALPPL2を発現している癌細胞の成長及び/又は増殖を阻害するために)治療として単独で 사용할ことができ、又は、ALPPL2を発現する様々な癌細胞(例えば、単離細胞、癌幹細胞、転移細胞、固形腫瘍細胞等)へのエフェクター(例えば、細胞毒素、標識、放射性核種、リガンド、抗体、薬物、リボソーム、ナノ粒子、ウイルス粒子、サイトカイン、免疫調節分子等)の効果的及び特異的な送達をもたらす、エフェクター形成イムノコンジュゲートに結合され得る。

【0374】

抗ALPP/ALPPL2イムノコンジュゲートは、本明細書に記載されている抗体又はその抗原結合部分をエフェクター(例えば、検出可能な標識、別の治療剤等)にコンジュゲートすることによって形成され得る。例示的な治療剤には、限定されないが、例えば、細胞毒性剤又は細胞増殖抑制剤(例えば、化学療法剤)、毒素(例えば、細菌、真菌、植物若しくは動物の器官に酵素的に活性な毒素、又はそれらの断片)、及び/又は放射性同位体(即ち、放射コンジュゲート)、第二の抗体が挙げられる。

【0375】

例示的なエフェクター

検出可能な標識-撮像組成物

特定の実施形態において、抗ALPP/ALPPL2イムノコンジュゲートは、腫瘍部位に検出可

能な標識を指向するために使用され得る。これにより、腫瘍の検出及び/又は局在化を促進することができる。それは、原発腫瘍、又は特定の実施形態において、ALPPL2を発現している癌によって生成される二次腫瘍(例えば、限定されないが、中皮腫、精巣癌、子宮内膜癌、卵巣癌、膵臓癌、及び非小細胞肺癌等の癌の細胞)を検出するために効果的であり得る。

【0376】

したがって、特定の実施形態において、エフェクターは検出可能な標識を含む。適切な検出可能な標識は、限定されないが、放射線不透過性標識、ナノ粒子、PET標識、MRI標識、放射性標識等を含む。放射性核種の中で、及び本発明の様々な実施形態において有用な、ガンマエミッタ、陽電子エミッタ、X線エミッタ、及び蛍光エミッタは、局在化、診断、及び/又は段階分け、及び/又は治療に適しているが、一方、ベータ及びアルファエミッタ、電子、並びに、ホウ素及びウラニウム等の中性子捕捉剤もまた治療に使用され得る。

10

【0377】

様々な実施形態において、検出可能な標識は、外部検出器及び/又は内部検出器とともに使用することができ、ALPPL2を発現している癌細胞を効果的に局在化及び/又は視覚化する手段を提供する。このような検出/視覚化は、限定されないが、手術前及び手術時の設定を含む様々な状況に有用であり得る。したがって、特定の実施形態において、本発明は、哺乳動物の身体におけるALPPL2を発現する癌を手術中に検出する方法に関連する。これら方法は、典型的には、検出器(例えば、ガンマ検出プローブ)による検出に十分な量で、本明細書において記載される検出可能な標識で標識化された抗ALPPL2抗体を含む組成物を哺乳動物に投与し、その後、標的組織により活性物質が摂取されるのを可能にし、好ましくは標識の血液クリアランスの後に、例えばガンマ検出プローブを用いて、身体の関連領域において放射免疫検出法技術に哺乳動物をさらすことを伴う。

20

【0378】

特定の実施形態において、標識に結合された抗体は、放射ガイドされた(radioguided)手術の技術に使用され得、ここで、対象の身体における関連する組織は、検出器、例えばガンマ検出プローブにより手術時に検出され、位置付けられ得る。外科医は、放射性同位体、つまり、例えば低エネルギー γ 光子放射体で標識化された化合物の取り込みが行われる組織を見出すために、このプローブを手術時に使用することができる。特定の実施形態において、このような方法は、原発腫瘍から転移細胞により生成された二次癌を局在化し、取り除くのに特に有用である。

30

【0379】

本明細書に記載されている抗ALPP/ALPPL2抗体は、放射線不透過性部分(例えば、利用可能なシステイン)に直接結合され得、又は、例えば以下に記載されているように、放射線不透過性物質を運搬する、含有する、若しくは含む「パッケージ」(例えば、キレート、リポソーム、ポリマーマイクロビーズ、ナノ粒子等)に結合され得る。

【0380】

放射線不透過性標識に加えて、他の標識もまた使用に適している。イムノコンジュゲートに使用するのに適した検出可能な標識は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、又は化学的な手段により検出可能な任意の組成物を含む。有用な標識は、磁気ビーズ(例えばDYNABEADS(商標))、蛍光色素(例えばイソチオシアン酸フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質等)、放射性同位体(例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、又は ^{32}P)、酵素(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、及びその他共通してELISAに使用されるもの)、及びコロイド金若しくは着色ガラス又はプラスチック(例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス等)ビーズ等の比色定量標識、ナノ粒子、量子ドット等を含む。

40

【0381】

特定の実施形態において、適切な放射標識には、限定されないが、 ^{99}Tc 、 ^{99}Tc 、 ^{97}Ru 、 ^{95}Ru 、 ^{94}Tc 、 ^{90}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{86}Y 、 ^{77}Br 、 ^{77}As 、 ^{76}Br 、 ^{75}Se 、 ^{72}As 、 ^{68}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{67}Ga 、 ^{67}Ga 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{59}Fe 、 ^{58}Co 、 ^{57}Co 、 ^{52}Mn 、 ^{52}Fe 、 ^{51}Cr 、 ^{47}Sc 、

50

^3H 、 ^{35}S 、 ^{33}P 、 ^{32}P 、 ^{225}Ac 、 ^{224}Ac 、 ^{223}Ra 、 ^{213}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{211}At 、 ^{203}Pb 、 ^{203}Hg 、 ^{201}Tl 、 ^{199}Au 、 ^{198}Au 、 ^{198}Au 、 ^{197}Pt 、 ^{18}F 、 ^{189}Re 、 ^{188}Re 、 ^{188}Re 、 ^{186}Re 、 ^{186}Re 、 ^{177}Lu 、 ^{177}Lu 、 ^{175}Yb 、 ^{172}Tm 、 ^{169}Yb 、 ^{169}Yb 、 ^{169}Er 、 ^{168}Tm 、 ^{167}Tm 、 ^{166}Ho 、 ^{166}Dy 、 ^{165}Tm 、 ^{165}Dy 、 ^{161}Tb 、 ^{15}O 、 ^{15}N 、 ^{159}Gd 、 ^{157}Gd 、 ^{153}Sm 、 ^{153}Pb 、 ^{151}Pm 、 ^{14}C 、 ^{149}Pm 、 ^{143}Pr 、 ^{142}Pr 、 ^{13}N 、 ^{133}I 、 ^{131}In 、 ^{131}I 、 ^{127}Te 、 ^{126}I 、 ^{125}Te 、 ^{125}I 、 ^{124}I 、 ^{123}I 、 ^{122}Te 、 ^{121}Te 、 ^{121}Sn 、 ^{11}C 、 ^{113}In 、 ^{111}In 、 ^{111}In 、 ^{111}In 、 ^{111}Ag 、 ^{111}Ag 、 ^{109}Pd 、 ^{109}Pd 、 ^{107}Hg 、 ^{105}Ru 、 ^{105}Rh 、 ^{105}Rh 、及び ^{103}Ru が含まれる。

【0382】

このような標識を検出する手段は、当業者に周知である。したがって、例えば、特定の放射標識は、写真フィルム、シンチレーション検出器、PET撮像、MRI等を使用して検出され得る。蛍光マーカーは、放射された照明を検出するための光検出器を使用して検出され得る。酵素標識は、典型的には、酵素に基質をもたらし、基質上の酵素の作用により生成された反応生成物の検出により検出され、比色定量標識は、単に着色標識を視覚化することにより検出される。

【0383】

放射線増感剤

別の実施形態において、エフェクターは、細胞上でイオン化放射線の細胞毒性効果を増強する放射線増感剤を含み得る(例えば、 ^{60}Co 又はX線供給源により生成され得るもの等)。多数の放射線増感剤が公知であり、限定されないが、ベンゾボルフィリン誘導体化合物(例えば米国特許第5,945,439号を参照)、1,2,4-ベンゾトリアジンオキシド(例えば米国特許第5,849,738号を参照)、特定のジアミンを含有する化合物(例えば米国特許第5,700,825号を参照)、BCNT(例えば米国特許第5,872,107号を参照)、放射線増感性ニトロ安息香酸アミド誘導体(例えば米国特許第4,474,814号を参照)、様々な複素環誘導体(例えば米国特許第5,064,849号を参照)、白金錯体(例えば米国特許第4,921,963号を参照)等を含む。

【0384】

α エミッタ

特定の実施形態において、エフェクターは、 α エミッタ、即ち、アルファ粒子を放出する放射性同位体を含み得る。アルファエミッタは、癌の治療に有効であることが、近年において示されている(例えば、McDevittら、(2001年) Science 294巻:1537~1540頁; Ballantrudら(2001年) Cancer Res. 61巻: 2008~2014頁; Borchardtら、(2003年) Cancer Res. 63巻: 5084~50頁を参照されたい)。適切なアルファエミッタには、限定されないが、 Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 等が含まれる。

【0385】

キレート

本明細書に記載されている医薬及び/又は放射標識の多くは、キレートとして提供され得る。キレート分子は、典型的には、本明細書に記載されている抗ALPP/ALPPL2抗体(例えば、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF)に結合されるエピトープタグに特異的に結合する、分子(例えば、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン等)に結合される。

【0386】

キレート基は、当業者に周知である。特定の実施形態において、キレート基は、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)、シクロヘキシル1,2-ジアミンテトラ酢酸(CDTA)、エチレングリコール-0,0'-ビス(2-アミノエチル)-N,N,N',N'-テトラ酢酸(EGTA)、N,N'-ビス(ヒドロキシベンジル)エチレンジアミン-N,N'-二酢酸(HBED)、トリエチレンテトラミンヘキサ酢酸(TTHA)、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-テトラ酢酸(DOTA)、ヒドロキシエチルジアミン三酢酸(HEDTA)、1,4,8,11-テ

10

20

30

40

50

トラアザシクロテトラデカン-N,N',N'',N'''-テトラ-酢酸(TETA)、置換DTPA、置換EDTA等に由来する。

【0387】

特定の好ましいキレート化剤の例には、非置換又は置換の2-イミノチオラン、及び2-イミノチアシクロヘキサン、特に2-イミノ-4-メルカプトメチルチオランが含まれる。

【0388】

1つのキレート化剤、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N,N',N'''-四酢酸(DOTA)は、放射性核種及び放射標識等の、多くの診断上及び治療上重要な金属をキレート化する能力のため、特に関心を持たれるものである。

【0389】

DOTA、及び抗体等のタンパク質のコンジュゲートは報告されている。例えば、米国特許第5,428,156号は、抗体及び抗体断片にDOTAをコンジュゲートする方法を教示している。このようなコンジュゲートを作製するために、DOTAの1つのカルボン酸基は、抗体又は抗体断片上でアミン又はスルフヒドリル基に反応することができる活性エステルに変換される。Lewisら、(1994年) Bioconjugate Chem. 5巻: 565~576頁には同様の方法が記載されており、DOTAの1つのカルボキシル基が活性エステルに変換され、活性化されたDOTAは抗体と混合され、抗体のリジン残基のイプシロン-アミノ基を介して抗体をDOTAに結合させ、それによりDOTAの1つのカルボキシル基をアミド部分に変換する。

【0390】

特定の実施形態において、キレート化剤は、エピトープタグ、又はエピトープタグに結合する部分に直接的又はリンカーを介して結合され得る。DOTA及びビオチンのコンジュゲートが記載されている(例えば、Su (1995年) J. Nucl. Med., 36巻(5 Suppl):154頁を参照されたい。これは、DOTA-LC-ビオチン又はDOTA-ベンジル-4-(6-アミノ-カプロアミド)-ビオチン等の利用可能なアミノ側鎖ビオチン誘導体を介した、DOTAのビオチンへの連結を開示している)。Yauらの国際公開第95/15335号は、ビオチンにコンジュゲートされ得るニトロ-ベンジル-DOTA化合物を生成する方法を開示している。この方法は、ヒドロキシ基の一時的な投影を介した環化反応;アミンのトシル化;一時的に保護されたヒドロキシ基の脱保護;脱保護されたヒドロキシ基のトシル化;及び分子内のトシラート環化を含む。Wuら、(1992年) Nucl. Med. Biol., 19巻(2号): 239~244頁は、タンパク質を¹¹¹In及び⁹⁰Yで放射標識するための大環状キレート化剤の合成を開示している。Wuらは、アビジン、研究のためのモデルタンパク質とのコンジュゲートの安定性及び生体内分布を研究するために、標識されたDOTA-ビオチンコンジュゲートを作製した。このコンジュゲートは、インサイチュで生成された活性化DOTA誘導体と反応させるために、遊離アミノ基を含有するビオチンヒドラジドを使用して作製された。

【0391】

細胞毒性剤/細胞増殖抑制剤

本明細に記載されている抗ALPP/ALPPL2(例えば、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA、及び/又はM25wtLF)は、治療剤、放射線を放出する化合物、植物、真菌又は細菌起源の細胞毒性分子、生物学的タンパク質、及びそれらの混合物を含む様々な細胞毒性剤及び/又は細胞増殖抑制剤を送達するために使用することができる。特定の実施形態において、細胞毒性剤は、例えば、小有機分子、細胞毒性タンパク質又はペプチド、放射線エミッタ、例えば、上記される短距離高エネルギーαエミッタ等である細胞内活性型細胞毒性剤を含み得る。さらなる代表的な治療剤には、放射性同位体、化学療法剤、免疫調節剤、抗血管新生剤、抗増殖剤、アポトーシス促進剤及び細胞溶解酵素(例えば、RNase)が含まれる。薬剤はまた、免疫調節剤、抗血管新生剤、抗増殖剤、又はアポトーシス促進剤をコードする遺伝子等の治療用核酸を含むことができる。これらの薬

物に関する記載は相互排他的ではなく、したがって、治療剤は、上記用語の1つ以上を用いて記載することができる。例えば、選択された放射性同位元素はまた細胞毒素である。種々の実施形態において、治療剤は、上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸又は誘導体として調製され得る。

【0392】

特定の実施形態において、抗ALPP/ALPPL2抗体は、治療的な細胞毒性剤/細胞増殖抑制剤に結合される。種々の実施形態において、ADCを構築するために使用される薬物には、限定されないが、微小管障害剤及びDNA損傷剤、ポリメラーゼ阻害剤(例えば、ポリメラーゼII阻害剤、 α -アマニチン)等が含まれる。特定の実施形態において、抗体は、薬物に直接的又はリンカーを介してコンジュゲートされる一方で、他の実施形態において、抗体は、薬物担体(例えば、薬物、高分子薬物担体、ナノ粒子薬物担体、脂質薬物担体、 dendrimer薬物担体等を含むリポソーム)にコンジュゲートされる。

10

【0393】

特定の実施形態において、薬物は、チューブリン阻害剤を含み、例えば、限定されないが、オーリスタチン、ドラスタチン-10、天然物の合成物であるドラスタチン-10の合成誘導体、及びメイタンシン又はメイタンシン誘導体が挙げられる。

【0394】

特定の実施形態において、薬物はオーリスタチンを含む。特定の実施形態において、オーリスタチンは、オーリスタチンE(AE)、オーリスタチンEB(AEB)、オーリスタチンEFP(AEFP)、モノメチルオーリスタチンD(MMAD)又はモノメチルドラスタチン10、モノメチルオーリスタチンF(MMAF)又はN-メチルバリリン-バリリン-ドライソロイイン-ドラプロイイン-フェニルアラニン、モノメチルオーリスタチンE(MMAE)又はN-メチルバリリン-バリリン-ドルイソロイイン-ドラプロイイン-ノルエフェドリン、5-ベンゾイルパレリアン酸-AEエステル(AEVB)、vcMMAE、及びvcMMAFからなる群から選択される。

20

【0395】

特定の実施形態において、薬物はエンジンを含む。エンジンは、9及び10員環又はコンジュゲートした三重-二重-三重結合の環系の存在のいずれかにより特徴付けられる抗腫瘍細菌生成物の類である。典型的なエンジンには、限定されないが、カリケアマイシン、エスペラミシン、及びダイネミシンが含まれる。カリケアマイシンは、土壤生物であるミクロモノスポラ・エキノスポラ亜種カリケンシス(*Micromonospora echinospora* ssp. *calichensis*)からの天然生成物として最初に単離されたエンジン系抗生物質である(Zeinら、*Science* 27; 240(4856):1198~1201頁, 1988年)。それは標的細胞において二本鎖DNA破壊を生成し、続いてアポトーシスを誘導する(Zeinら、*Science* 27;240(4856):1198~1201頁, 1988頁; Nicolaouら、*Chem. Biol. Sep*; 1巻(1号):57~66頁, 1994年; Prokopら、*Oncogene* 22巻:9107~9120頁, 2003年)。特定の実施形態において、薬物は、カリケアマイシン又はカリケアマイシン類似体を含む。抗ALPPL2イムノコンジュゲートの使用に適したカリケアマイシン及びその類似体の例としては、例えば、全体として参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,671,958号、第4,970,198号、第5,053,394号、第5,037,651号、第5,079,233号、第5,264,586号及び第5,108,912号において開示されている。特定の実施形態において、これらの化合物は、適切なチオールと反応させてジスルフィドを形成し、同時に官能基、例えば、ヒドラジド又はカリケアマイシンを抗ALPPL2抗体にコンジュゲートさせるのに有用である他の官能基を導入することができるメチルトリスルフィドを含有する。カリケアマイシンのジスルフィド類似体、全体が参照により本明細書に組み込まれる、例えば、米国特許第5,606,040号及び第5,770,710号において記載されている類似体を用いることもできる。特定の実施形態において、ジスルフィド類似体は、N-アセチル-ガンマ-カリケアマイシンジメチルヒドラジドである。

30

40

【0396】

特定の実施形態において、薬物はゲルダナマイシンである。ゲルダナマイシンは、Hsp90(熱ショックタンパク質90)に結合するベンゾキノナンサマイシン系抗生物質であり、抗腫瘍薬として用いられている。例示的なゲルダナマイシンには、限定されないが、17-A

50

AG(17-N-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン)及び17-DMAG(17-ジメチルアミノエチルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン)が含まれる。

【0397】

特定の実施形態において、薬物はメイタンシンを含む。メイタンシン又はその誘導体メイタンシノイドは、チューブリン重合の阻害を介して有糸分裂中の微小管形成を阻害することによって細胞増殖を阻害する(例えば、Remillardら、(1975年) Science 189巻:1002～1005頁を参照されたい)。例示的なメイタンシンには、限定されないが、Mertansine(DM1);及びDM3又はDM4等メイタンシンの類似体及びアンサマイトシンが含まれる。

【0398】

特定の実施形態において、薬物はタキサンを含む。タキサンは、抗チューブリン剤又は有糸分裂阻害剤として作用するジテルペンである。例示的なタキサンには、限定されないが、パクリタキセル及びドセタキセルを含む。

10

【0399】

特定の実施形態において、薬物はDNA相互作用性薬剤を含む。特定の実施形態において、DNA相互作用性薬剤には、限定されないが、カリケアマイシン、デュオカルマイシン、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)等が含まれる。

【0400】

別の例示的であるが限定されない実施形態において、薬物はデュオカルマイシンを含む。デュオカルマイシンは、細胞の周期における任意の段階で、それら自体の作用様式を発揮することができるDNA損傷剤である。この類のデュオカルマイシンの一部である薬剤は、典型的には、低ピコモル範囲で効力を有する。本明細書において意図されるキメラ構築物においてエフェクターとして使用され得る、例示的なデュオカルマイシン(例えば、デュオカルマイシン類似体)には、限定されないが、デュオカルマイシンA、デュオカルマイシンB1、デュオカルマイシンB2、デュオカルマイシンC1、デュオカルマイシンC2、デュオカルマイシンD、デュオカルマイシンSA、シクロプロピルベンゾインドールデュオカルマイシン(CC-1065)、センタナマイシン、ラケルマイシン、アドゼレシン、ビゼレシン、カルゼレシン等が含まれる。

20

【0401】

別の例示的であるが限定されない実施形態において、薬物はピロロベンゾジアゼピンを含む。特定の実施形態において、薬物は、柔軟なポリメチレンテザーにより結合される2つのピロロベンゾジアゼピンの合成誘導体を含む。ピロロベンゾジアゼピン(PBD)及びPBD二量体は、米国特許第7,528,126B2号に記載されており、これは、その中に記載されているピロロベンゾジアゼピン及びPBD二量体について参照により本明細書に組み込まれる。特定の実施形態において、ピロロベンゾジアゼピンは、アントラマイシン(及びその二量体)、マゼトラマイシン(及びその二量体)、トマイマイシン(及びその二量体)、プロトラカルシン(及びその二量体)、チカマイシン(及びその二量体)、ネオトラマイシンA(及びその二量体)、ネオトラマイシンB(及びその二量体)、DC-81(及びその二量体)、シビロマイシン(及びその二量体)、ポロトラマイシンA(及びその二量体)、ポロトラマイシンB(及びその二量体)、シバノマイシン(及びその二量体)、アブベイマイシン(及びその二量体)、SG2000、及びSG2285からなる群から選択される。

30

40

【0402】

特定の実施形態において、薬物は、限定されないが、 α -アマニチン、及びポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)阻害剤等のポリメラーゼII阻害剤を含むポリメラーゼ阻害剤を含む。例示的なPARP阻害剤には、限定されないが、イニパリブ(BSI 201)、タラゾパリブ(BMN-673)、オラパリブ(AZD-2281)、オラパリブ、ルカパリブ(AG014699、PF-01367338)、ベリパリブ(ABT-888)、CEP 9722、MK 4827、BGB-290、3-アミノベンズアミド等が含まれる。

【0403】

特定の実施形態において、薬物はピンカアルキロイドを含む。ピンカアルキロイドはまた、抗チューブリン剤でもある。例示的なピンカアルキロイドには、限定されないが、ビ

50

ンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、及びビンノレルビンが含まれる。

【0404】

上記の薬物は例示的であり、限定されない。様々な実施形態において、他の抗癌剤を利用することができ、限定されないが、抗癌抗体(例えば、HERCEPTIN(登録商標))、代謝拮抗物質、アルキル化剤、トポイソメラーゼ阻害剤、微小管標的化剤、キナーゼ阻害剤、タンパク合成阻害薬、ソマトスタチン類似体、グルココルチコイド、アロマトース(aromato se)阻害剤、mTOR阻害剤、タンパク質キナーゼB(PKB)阻害剤、ホスファチジルイノシトール、3-キナーゼ(PI3K)阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、抗TRAIL分子、MEK阻害剤等を含む。特定の実施形態において、抗癌化合物は、限定されないが、フルオロウラシル(5-FU)、カペシタビン/XELODA、5-トリフルオロメチル-2'-デオキシウリジン、メトトレキセートナトリウム、ラルチトレキセド/トムデックス、ペメトレキセド/アリムタ(Alimta)(登録商標)、サイトシンアラビノサイド(シタラビン、Ara-C)/チオグアニン、6-メルカプトプリン(メルカプトプリン、6-MP)、アザチオプリン/アザサン(Azasan)、6-チオグアニン(6-TG)/プリンツール(Purinethol)(TEVA)、ペントスタチン/ニペント(Nipent)、リン酸フルダラビン/フルダラ(Fludara)(登録商標)、クラドリビン(2-CdA、2-クロロデオキシアデノシン)/ロイスタチン(Leustatin)、フロクスウリジン(5-フルオロ-2)/FUDR(Hospira, Inc.)、リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤(RNR)、シクロホスファミド/シトキサン(BMS)、ネオサル、イフォスファミド/ミトキサナ(Mitoxana)、チオテパ、BCNU--1,3-ビス(2-クロロエチル)-1-ニトロソウレア、1, -(2-クロロエチル)-3-シクロヘキシル-1ニトロソウレア、メチルCCNU、ヘキサメチルメラミン、ブスルファン/マイレラン、プロカルバジンHCL/マツラン、ダカルバジン(DTIC)、クロラムブシル/ロイカラン(Leukaran)(登録商標)、メルファラン/アルケラン、シスプラチン(シスプラチナム、CDDP)/プラチノール、カルボプラチン/パラプラチン、オキサリプラチン/エロキシタン、ベンダムスチン、カルムスチン、クロロメチン、ダカルバジン(DTIC)、フォテムスチン、ロムスチン、マンノスルファン、ネダプラチン、ニムスチン、プレドニマスチン、ラニムスチン、サトラプラチン、セムスチン、ストレプトゾシン、テモゾロミド、トレオスルファン、トリアジクオン、トリエチレンメラミン、チオTEPA、四硝酸トリプラチン、トロフォスファミド、ウラムスチン、ドキシソルビシンHCL/ドキシル、クエン酸ダウノルビシン/DaunoXome(登録商標)、ミトキサントロンHCL/ノバントロン、アクチノマイシンD、エトポシド/ベプシド、トポテカンHCL/ハイカムチン、テニポシド(VM-26)、イリノテカンHCL(CPT-11)/、カンプトサル(camptosar)(登録商標)、カンプトテシン、ベロテカン、ルビテカン、ピンクリスチン、硫酸ビンブラスチン、酒石酸ビンノレルビン、硫酸ビンデシン、パクリタキセル/タキソール、ドセタキセル/タキソテレ、ナノ粒子パクリタキセル、アブラキサン、イクサベピロン、ラロタキセル、オルタタキセル、テセタキセル、ビンフルニン等を含む。特定の実施形態において、抗癌剤(単数又は複数)は、カルボプラチン(例えば、パラプラチン(PARA PLATIN)(登録商標))、シスプラチン(例えば、プラチノール(PLATINOL)(登録商標)、プラチノール-AQ(登録商標))、シクロホスファミド(例えば、シトキサン(CYTOXAN)(登録商標)、ネオサル(NEOSAR)(登録商標))、ドセタキセル(例えば、タキソテレ(TAXOTERE)(登録商標))、ドキシソルビシン(例えば、アドリアマイシン(ADRIAMYCIN)(登録商標))、エルロチニブ(例えば、タルセバ(TARCEVA)(登録商標))、エトポシド(例えば、ベプシド(VEPESID)(登録商標))、フルオロウラシル(例えば、5-FU(登録商標))、ゲムシタビン(例えば、ゲムザル(GEMZAR)(登録商標))、メシル酸イマチニブ(例えば、グリーベク(GLEEVEC)(登録商標))、イリノテカン(例えば、カンプトサル(CAMPTOSAR)(登録商標))、メトトレキセート(例えば、フォレックス(FOLEX)(登録商標))、メキセート(MEXATE)(登録商標)、アメトプテリン(AMETHOPTERIN)(登録商標))、パクリタキセル(例えば、タキソール(TAXOL)(登録商標)、アブラキサン(ABRAXANE)(登録商標))、ソラフィニブ(例えば、ネキサバル(NEXAVAR)(登録商標))、スニチニブ(例えば、ステント(SUTENT)(登録商標))、トポテカン(例えば、ハイカムチン(HYCANTIN)(登録商標))、ビンブラスチン(例えば、ベルバン(VELBAN)(登録商標))、ピンクリスチン(例えば、オンコビン(ONCOVIN)(登録商標))、ピンカサル(VINCASAR)PFS(登録商標))からなる群から選択される1つ以上の薬物を含む。特定の実施形態において、

10

20

30

40

50

抗癌剤は、レチノイン酸、レチノイン酸誘導体、ドキシルビシン(doxirubicin)、ビンブラスチン、ピンクリスチン、シクロホスファミド、イフォスファミド、シスプラチン、5-フルオロウラシル、カンプトテシン誘導体、インターフェロン、タモキシフェン、及びタキソールからなる群から選択される1つ以上の薬物を含む。特定の実施形態において、抗癌化合物は、アブラキサン、ドキソルビシン、パミドロン酸二ナトリウム、アナストロゾール、エキセメスタン、シクロホスファミド、エピルビシン、トレミフェン、レトロゾール、トラスツズマブ、メゲストロールタモキシフェン、パクリタキセル、ドセタキセル、カペシタビン、酢酸ゴセレリン、ゾレドロン酸、ビンブラスチン、アンチセンス分子、Si RNA等からなる群から選択される。

【0405】

10

特定の実施形態において、細胞毒性剤/細胞分裂阻害剤は、タンパク質若しくはペプチド毒素又はそれらの断片を含む。酵素的に活性な毒素又はその断片は、例えば、ジフテリア毒素A断片、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A(シュードモナス・エルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*)由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、特定のシナアブラギリ(*Aleurites fordii*)タンパク質、特定のダイアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ(*Phytolaca americana*)タンパク質(PAP、PAPII、及びPAP-S)、ニガウリ(*Momordica charantia*)阻害剤、クルシン、クロチン、サポナリアコン(*Saponaria officinalis*)阻害剤、ゲロニン、ミトギリシ、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、及びトリコテセンにより例示される。

【0406】

20

特定の実施形態において、細胞毒素は、限定されないが、緑膿菌(*Pseudomonas*)外毒素、ジフテリア(*Diphtheria*)毒素、リシン、アブリン、及びそれらの誘導体が含まれ得る。緑膿菌外毒素A(PE)は、シュードモナス・エルギノーサにより分泌される、非常に活性なモノマータンパク質(分子量66kD)であり、これは、そのADP-リボシル化を触媒(EF-2上の酸化されたNADのADPリボシル部分の移動を触媒)することにより、伸長因子2(EF-2)の不活性化を介して、真核細胞におけるタンパク質合成を阻害する。

【0407】

毒素は、細胞毒性を引き起こすように共同して作用する3つの構造ドメインを含有する。ドメインIa(アミノ酸1-252)は細胞結合を媒介する。ドメインII(アミノ酸253-364)は、サイトゾルへの転位に関与し、ドメインIII(アミノ酸400-613)は、タンパク質を不活性化し、細胞死を引き起こす、伸長因子2のADPリボシル化を媒介する。ドメインIb(アミノ酸365-399)の機能は不確定のままであるが、その大部分であるアミノ酸365-380は、細胞毒性を損失することなく欠失され得る。Siegallら、(1989年) J. Biol. Chem. 264巻: 14256~14261頁を参照されたい。

30

【0408】

特定の実施形態において、抗体は、ドメインIa(アミノ酸1から252)が欠失され、アミノ酸365から380がドメインIbから欠失されている、好ましい分子に結合される。特定の実施形態において、ドメインIbの全て、及びドメインII(アミノ酸350から394)の一部は、特に、欠失された配列が連結ペプチドで置換される場合に、欠失され得る。

【0409】

40

加えて、PE及び他の細胞毒性タンパク質は、部位特異的突然変異誘発、又は当該技術分野において公知である他の技術を用いて更に修飾され、特定の所望用途のために分子を変更し得る。例えば、本明細書に記載されているPE分子により提供される機能的な利点に実質的に影響を及ぼさない方法でPE分子を変更する手段はまた使用することができ、このような結果として生じる分子は、本明細書内に包含されることが意図される。

【0410】

様々なリガンドに融合されるPEをコード化する遺伝子をクローニングする方法は、当業者に周知である(例えば、Siegallら、(1989年) FASEB J., 3巻: 2647~2652頁; Chaudharyら、(1987年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84巻: 4538~4542頁を参照されたい)。

【0411】

50

PEのように、ジフテリア毒素(DT)は、ADP-リボシル化伸長因子2により細胞を死滅させ、それによりタンパク質合成を阻害する。しかしながら、ジフテリア毒素はジスルフィド架橋により結合された2つの鎖であるA及びBに分けられる。PEとは対照的に、カルボキシル末端上に位置するDTの鎖Bは、受容体結合に関与し、アミノ末端上に位置する鎖Aは酵素活性を含有する(Uchidaら、(1972年) Science, 175巻: 901~903頁; Uchidaら、(1973年) J. Biol. Chem., 248巻: 3838~3844頁)。

【0412】

特定の実施形態において、抗体-ジフテリア毒素イムノコンジュゲートは、ジフテリア毒素B鎖の切断によって除去された天然の受容体-結合ドメインを有する。1つの例示的な修飾されたジフテリア毒素はDT388であり、DTでは、残基389で始まるカルボキシル末端配列が除去される(例えば、Chaudharyら、(1991年) Bioch. Biophys. Res. Comm., 180巻: 545~551頁を参照されたい)。PEキメラ細胞毒素のように、DT分子は、抗ALPP抗体に化学的にコンジュゲートされ得るが、特定の好ましい実施形態において、抗体は、組換え手段によりジフテリア毒素に融合される(例えば、Williamsら、(1990年) J. Biol. Chem. 265巻: 11885~11889頁を参照されたい)。

【0413】

免疫調節剤

ある特定の実施形態では、抗ALPP/ALPPL2抗体を免疫調節性に結合し、癌細胞/腫瘍部位で免疫調節性を局在化するように機能させる。免疫応答を活性化し得る多くの免疫調節剤が当業者に公知である。例示的であるが、非限定的な一実施形態では、免疫調節性は、抗CD3抗体を含む。抗CD3モノクローナル抗体は、インビトロでヒトT細胞の細胞増殖を誘発し、ヒトT細胞クローン及びヒト末梢血リンパ球による特異的及び非特異的細胞溶解を活性化する。抗CD3のインビボ投与は、UV誘発マウス線維肉腫の腫瘍増殖を防ぐ。

【0414】

ある特定の実施形態では、免疫調節剤は、免疫チェックポイントを遮断する薬剤を含む。免疫チェックポイントは、自己免疫寛容を維持し、末梢組織での生理学的免疫応答の持続期間及び増幅を調節して、二次的な組織損傷を最小限にするために重要な、免疫系へ回路接続された大量の阻害経路を指す。腫瘍は、特に腫瘍抗原に特異的なT細胞に対する免疫抵抗性の主要な機構としてのある特定の免疫チェックポイント経路を接收することが現在明らかである。免疫チェックポイントの多くは、リガンド-受容体相互作用により開始されるので、それらは容易に、抗体により阻止するか、又はリガンド若しくは受容体の組換え形により調節することができる。

【0415】

細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4(CTLA4:cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4)抗体は、米国食品医薬品局(FDA:US Food and Drug Administration)の承認を達成したこのクラスの免疫療法剤の最初のものであった。進行期の黒色腫の治療のための、承認を得るための最初のそのような薬物である、イピリムマブ(Yervoy(登録商標))は、細胞傷害性Tリンパ球と呼ばれる活性化免疫細胞の表面上で発現されるCTLA4として公知のチェックポイントタンパク質の活性を阻止する。CTLA4は、これらのT細胞を不活性化するための「スイッチ」として働き、これにより免疫応答の強度を低減する。イピリムマブはCTLA4に結合し、CTLA4がその阻害シグナルを送ることを防ぐ。2つの他のFDAで承認されたチェックポイント阻害剤、ニボルマブ(Opdivo(登録商標))及びペンブロリズマブ(Keytruda(登録商標))は、同様の経路で働くが、それらはPD-1として公知の活性化T細胞上の異なるチェックポイントタンパク質を標的にする。ニボルマブは、進行期の黒色腫又は進行期の肺癌を有する一部の患者を治療するために承認されており、ペンブロリズマブは、進行期の黒色腫を有する一部の患者を治療するために承認されている。

【0416】

したがって、ある特定の実施形態では、免疫調節剤は、CTLA4を対象とする抗体(例えばイピリムマブ)及び/又はPD-L1を対象とする抗体(例えばニボルマブ、ペンブロリズマブ)及び/又はPD-L2を対象とする抗体を含む。

【0417】

抗ALPP/ALPPL2抗体に結合され得る免疫調節剤の他の例として、ガンシクロビル、エタネルセプト、タクロリムス、シロリムス、ボクロスポリン、シクロスポリン、ラパマイシン、シクロホスファミド、アザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチル、メトトレキセート、グルココルチコイド及びそのアナログ、サイトカイン、キサンチン、幹細胞増殖因子、リンホトキシン、腫瘍壊死因子(TNF:tumor necrosis factor)、造血因子、インターロイキン(例えばインターロイキン-1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18及びIL-21)、コロニー刺激因子(例えば顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF:granulocyte-colony stimulating factor)及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF:granulocyte macrophage-colony stimulating factor))、インターフェロン(例えばインターフェロン-10

【0418】

また、有用な免疫調節剤は、腫瘍に対するホルモン作用を阻止する抗ホルモン、及びサイトカイン生成を抑制するか、自己抗原発現をダウンレギュレートするか、又はMHC抗原をマスクする免疫抑制剤を含む。代表的な抗ホルモンは、例えばタモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害4(5)-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY 117018、オナプンストン(onapnstone)及びトレミフェンを含む抗エストロゲン;並びにフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド及びゴセレリン等の抗アンドロゲン;並びに抗副腎剤を含む。例示的な免疫抑制剤として、2-アミノ-6-アリール-5-置換ピリミジン、アザチオプリン、シクロホスファミド、プロモクリプチン、ダナゾール、ダプソン、グルタルアルデヒド、MHC抗原及びMHC断片の抗イディオタイプ抗体、シクロスポリンA、グルココルチコステロイド等のステロイド、サイトカイン又はサイトカイン受容体アンタゴニスト(例えば抗インターフェロン抗体、抗IL-10抗体、抗TNF α 抗体、抗IL-2抗体)、ストレプトキナーゼ、TGF β 、ラパマイシン、T細胞受容体、T細胞受容体断片並びにT細胞受容体抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0419】

ウイルス粒子

ある特定の実施形態では、エフェクターは、ウイルス粒子(例えば繊維状ファージ、アデノ関連ウイルス(AAV:adeno-associated virus)、レンチウイルス等)を含む。抗体は、ウイルス粒子にコンジュゲートしてもよく、及び/又はウイルス粒子(例えば繊維状ファージ)の表面上に発現させてもよい。ウイルス粒子は加えて、標的細胞(例えばALPPL2を発現する癌細胞)に送達される核酸を含んでもよい。細胞に核酸を送達するためのウイルス粒子の使用は、W099/55720、米国特許第6,670,188号、同第6,642,051号及び同第6,669,936号で詳細に記載されている。

【0420】

抗体

ある特定の実施形態では、エフェクターは、別の抗体(例えば第2の抗体)を含む。本明細書に記載する抗ALPPL2抗体への抗体エフェクターの結合は、二重特異性抗体を提供し得る。ある特定の実施形態では、抗体エフェクターは、(抗ALPPL2抗体により結合されるエピトープとは)異なるALPPL2のエピトープ、又はALPPL2を発現する細胞上の異なる標的に結合する抗体を含む。したがって、ある特定の実施形態では、エフェクターは、中皮腫細胞、精巣癌細胞、子宮内膜癌細胞並びにある特定の膵臓癌細胞、卵巣癌細胞及び非小細胞肺癌細胞等の癌細胞の表面上に発現するマーカーに結合する抗体を含む。

【0421】

ある特定の実施形態では、エフェクター抗体は、癌細胞上のマーカー以外の部分に結合する。例えば、ある特定の実施形態では、エフェクターは、CD3に結合する抗体(例えば抗CD3抗体)であってもよい。抗CD3モノクローナル抗体は、インビトロでヒトT細胞の細胞増

殖を誘発し、ヒトT細胞クローン及びヒト末梢血リンパ球による特異的及び非特異的細胞溶解を活性化する。抗CD3のインビボ投与は、UV誘発マウス線維肉腫の腫瘍増殖を防ぐ。したがって、抗CD3抗体エフェクターは、抗ALPL2の標的細胞に対する免疫応答を向上させるために使用することができる。

【0422】

他の例示的であるが、非限定的なエフェクター抗体は、単球及びマクロファージ上で顕著に発現し、好中球上で活性化に際してアップレギュレートされるFcγRIを対象とする抗体(CD64)、EpCAMを対象とする抗体(CD326)等を含む。

【0423】

上記二重特異性抗体は、例示的、かつ非限定的であり、本質的にいかなる抗体も所望の適用によって、本明細書に記載する抗ALPP/ALPPL2抗体に結合され得ることが認識される。

【0424】

B)エフェクターへの抗体の結合

当業者は、本明細書に記載する抗ALPP/ALPPL2抗体(例えばM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA及び/又はM25wtLF)及びエフェクター分子が、任意の順序で共に接続され得ることを理解する。したがって、抗体が単鎖ポリペプチドである場合、エフェクター分子は、標的化分子のアミノ末端又はカルボキシ末端のいずれかに接続してもよい。抗体が1つを超えるアミノ酸鎖を含む場合、エフェクター分子は、抗体を構成する任意のペプチドのアミノ末端又はカルボキシル末端のいずれかに接続してもよい。また、結合が分子の各々の活性を妨害しない限り、抗体は、エフェクター分子の内部領域に接続してもよく、又は反対にエフェクター分子は、抗体の内部位置に接続してもよい。

【0425】

抗体及びエフェクターは、当業者に周知のいくつかの手段のいずれかにより結合することができる。典型的には、エフェクターは、直接的に、又はリンカー(スパーサー)を通して抗体にコンジュゲートされる。しかしながら、ある特定の実施形態では、エフェクターがポリペプチドであるか、又はポリペプチドを含む場合、単鎖抗体へのエフェクターの単鎖融合として、又は1つを超える鎖を含む抗体の1つの鎖へのエフェクターの融合としてキメラ分子を組換え発現することが可能である。

【0426】

抗体へのエフェクター分子のコンジュゲーション

ある特定の実施形態では、本明細書に記載する抗ALPP/ALPPL2抗体(例えばM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA及び/又はM25wtLF)は、エフェクター分子(例えば細胞毒、標識、リガンド、薬物、リボソーム等)に化学的にコンジュゲートすることができる。分子を化学的にコンジュゲートする手段は、当業者に周知である。

【0427】

抗体にエフェクターを結合する手技は、エフェクター及び/又は抗体の化学構造によって変化する。ポリペプチドは典型的に、ポリペプチドにエフェクターを結合するためにエフェクター分子上の好適な官能基との反応に使用可能な、様々な官能基、例えばカルボン酸(COOH)又は遊離アミン(-NH₂)基を含有する。

【0428】

或いは、抗体及び/又はエフェクターは、追加の反応性官能基を曝露又は結合するために誘導体化することができる。誘導体化は、Pierce Chemical Company社(Rockford Illinois)から入手可能なもの等のいくつかのリンカー分子のいずれかの結合を含み得る。

【0429】

本明細書で使用されるとき「リンカー」は、エフェクター分子に標的化分子を接続するために使用される分子である。リンカーは、標的化分子への共有結合及びエフェクター分子への共有結合の両方を形成することができる。好適なリンカーは、当業者に周知であり、直鎖若しくは分岐鎖炭素リンカー、複素環炭素リンカー又はペプチドリンカーが挙げられるが、これらに限定されない。標的化分子及びエフェクター分子がポリペプチドである場合、リンカーは、それらの側鎖基を通して(例えばシステインへのジスルフィド結合を通して)構成要素アミノ酸に接続され得る。しかしながら、好ましい実施形態では、リンカーは、末端アミノ酸のアルファ炭素アミノ基又はカルボキシル基に接続される。

10

【0430】

イムノコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質結合剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP:N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)propionate)、イミノチオラン(IT:iminothiolane)、イミドエステルの二官能性誘導体(例えばアジブイミド酸ジメチルHCL)、活性エステル(例えばスベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド(例えばグルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えばビス(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(例えばビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えばトリレン2,6-ジイソシアネート)及びビス活性フッ素化合物(例えば1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して製造することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら(1987年)、Science 238、1098頁に記載されるように調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアネートベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(MX-DTPA:1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid)は、抗体への、例えば放射性ヌクレオチドのコンジュゲーションのための例示的であるが、非限定的なキレート剤である(例えばW01994/011026(PCT/US1993/010953)を参照のこと)。

20

【0431】

ある特定の実施形態では、抗体へのエフェクター(例えば薬物、リポソーム等)又はエフェクターに結合したリンカーのコンジュゲーションは、抗体中の鎖間ジスルフィド結合の還元由来し得るリジン又はシステイン等の溶媒露出反応性アミノ酸で起こる。ある特定の実施形態では、システインコンジュゲーションは、4つの鎖間ジスルフィド結合の還元後に起こり得る。

30

【0432】

ある特定の実施形態では、公知の数のリンカー-薬物が抗体中の定められた部位に一貫してコンジュゲートされる、部位特異的コンジュゲーションを行い、高度に均質な構築物を生成することができる。薬物対抗体比(DAR:drug-to-antibody ratio)は、正確に制御することができ、様々なリンカー-薬物に適合させ、例えば2-又は4-DAR部位特異的ADCのいずれかを生成することができる。

【0433】

部位特異的コンジュゲーションを達成するためのいくつかの方法は公知である。例えば、アミノ酸システインは、多くのタンパク質の構造及び機能で重要な役割を果たす反応性チオール基を含有する。システイン残基を通じたタンパク質へのチオ反応性プローブのコンジュゲーションは長い間、タンパク質標識化のための方法であり、また、抗体薬物コンジュゲート(ADC)の発生に適用されてきた。ある特定の例示的であるが、非限定的な実施形態では、この方法は、存在するジスルフィド結合(例えば鎖間ジスルフィド結合)の部分還元を含む。

40

【0434】

ジスルフィド結合を維持するためのある特定の実施形態では、システイン残基を、タンパク質に人工的に組み込むことができる。部位特異的コンジュゲーションのために導入し

50

たシステイン残基の使用が成功するかどうかは、システイン置換がタンパク質構造又は機能を変えないような適切な部位を選択する能力に依存する。これを達成するために、様々な部位で抗体-Fab(トラスツズマブ-Fab 4D5)に反応性システイン残基を導入し、ファージ上でFabをディスプレイし、抗原結合を妨害しない反応性システインを特定するためにスクリーニングすることによる、反応性チオールを選択のためのファージElisa(PHESELECTOR: Phage Elisa for Selection of Reactive Thiols)が開発された(例えばJunutulaら(2008年)、J. Immunol. Meth. 332、41~52頁を参照のこと)。

【0435】

PHESELECTORアプローチは、とりわけ従来型システインコンジュゲーションと比較して、効率的、かつ特異的であることが示されている。例えば抗体断片(例えばFab)及びPHESELECTOR法を使用して発見したシステインの最適部位は、全長抗体にも適用することができることが示されており、データは、これらの部位が他のmAbへの部位特異的コンジュゲーションについてもうまくいくことを示す(例えばBoswellら(2011年)、Bioconjug. Chem. 22、1994~2004頁;Boswellら(2012年)、Soc. Nuclear Med. 53、1454~1461頁;Shenら(2012年)、Nat. Biotechnol. 30、184~189頁を参照のこと)。

【0436】

部位特異的コンジュゲーションのための別の例示的であるが、非限定的な策は、アミノ酸セレノシステイン及び非天然アミノ酸アセチルフェニルアラニン(pAcPhe:acetylphenylalanine)等の生体直交型反応性ハンドルを有するアミノ酸の挿入に中心を置く。これらのアミノ酸を使用する2つの方法が開発されており、両方とも終止コドンを利用する。しかしながら、1つの方法は、オパール終止コドンUGAをセレノシステイン(Sec:selenocysteine)挿入配列と対にすることによりSecを組み込み、他の方法は、tRNA/アミノアシルtRNA合成酵素ペアを使用して、アンバー終止コドンUAGでアセチルフェニルアラニンを組み込む。第1の方法により使用されるセレノシステインは、アミノ酸システインと非常に類似しているが、硫黄原子の代わりにセレンウム原子を含有する。セレノレート基は、チオレート対応物より反応性の求核試薬であり、そのためそれはセレノシステインが選択的に活性化される条件下で求電子性化合物とのコンジュゲーションに適している。哺乳動物で約25個の公知のセレンウム含有タンパク質があり、グルタチオンペルオキシダーゼ及びチオレダクターゼ等のタンパク質が含まれる(Kryukovら92003)、Science, 300、1439~1443頁)。正常条件下では、UGAは転写終止をコードするが、しかしながら、Sec含有タンパク質の3'UTRに位置するSec挿入配列(SECIS:Sec insertion sequence)の存在下では、終止はmRNA二次構造の形成により防がれ、SecはUGAコドンで挿入される(Caban及びCopeland(2006年)、Cell Mol. Life Sci. 63、73~81頁)。Sec挿入は、遺伝子の3'末端でのUGAコドン及びSECISの挿入により、非Secコード遺伝子に人工的に組み込むことができる。この技術は、特に、mAbのSec標識化及び続く部位特異的コンジュゲーションで使用されてきた(例えばHofnerら(2009年)、Biochem. 48、12047~12057頁を参照のこと)。

【0437】

部位特異的コンジュゲーションのまた別の例示的な方法は、非天然アミノ酸p-アセチルフェニルアラニン(pAcPhe:p-acetylphenylalanine)を利用する。pAcPheは、オキシムライゲーションを通してアルコキシ-アミンを含有する薬物に選択的にコンジュゲートすることができるケト基を含有する。抗体にpAcPheを組み込むために、アンバー終止コドンを所望の位置で抗体に置換する。その後、抗体cDNAを、アンバーサプレッサーtRNA及び適切な対の変異tRNA合成酵素と共に共発現させる。tRNA合成酵素は、pAcPheをアンバーtRNAにロードし、したがって、pAcPheは、アンバー部位UAGで抗体に組み込まれる(例えばLiuら92007)、Nat. Meth. 4、239~244頁;Wangら(2003年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100、56~61頁;Axup(2012年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109、16101~16116頁を参照のこと)。

【0438】

pAcPheに加えて、他の非天然アミノ酸は、tRNA/アミノアシル-tRNA合成酵素ペアを適合させることを含む同様の方法を使用する部位特異的コンジュゲーションにおける使用のた

めに利用することができる(例えばYoung(2002年)、J. Mol. Biol. 395、361～374頁;Kiickら(2002年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99、19～24頁を参照のこと)。

【0439】

様々な実施形態では、結合形成を触媒する酵素の使用は、部位特異的コンジュゲーションにおける使用のために利用され得る。例えば、糖転移酵素プラットフォームは、抗体上の糖鎖付加部位に、化学的に活性な糖部分を結合するために変異糖転移酵素を使用する。選択した分子を、その後、糖部分上の化学ハンドルにコンジュゲートすることができる。別の例示的であるが、非限定的なアプローチでは、グルタミン転移酵素は、リンカー/薬物上のアミン基と抗体上の人工的に組み込まれたグルタミン残基との間に結合を形成するために使用される。

10

【0440】

糖転移酵素は、オリゴ糖の合成に関連するタンパク質の大きなファミリーであり、活性化糖ヌクレオチドからの糖残基の、糖アクセプター又は糖タンパク質/脂質への転移を担う。いくつかの糖転移酵素の構造は公知であり、糖ドナー特異性は触媒ポケット内の数個のアミノ酸により決定されることを明らかにする(Qasbaら(2005年)、Trends Biochem. Sci. 30、53～62頁)。この知識を使用して、糖転移酵素のポケット内の残基は変異されており、例えばB4Gal-T1は、ドナー特異性を広くし、化学的に反応性の糖残基2-ケト-Galの転移を可能にする(例えばRamakrishnanら(2002年)、J. Biol. Chem. 277、20833～20839頁を参照のこと)。この技術は、化学的に反応性の糖を、糖鎖付加部位を含有する任意の脂質又はタンパク質に転移する能力を可能にする。ヒトIgG抗体は、Fc断片の保存されたAsn-297にN-糖鎖付加部位を含有する。この部位に結合したグリカンは一般的に複雑であるが、G0まで脱ガラクトシル化することができ、これに変異糖転移酵素は、高効率でC2-ケト-Galを転移することができる(例えばBoeggemanら(2009年)、Bioconjug. Chem. 20、1228～1236頁を参照のこと)。C2-ケトGalの活性化学ハンドルは、その後、直交型反応基を有する生体分子に連結することができる。このアプローチは、抗Her2抗体、トラストズマブの、Alexa Fluor 488アミノオキシアセトアミドとの部位特異的コンジュゲーションにうまく使用されており、部位特異的ADC発生の実行可能な技術である(同上)。

20

【0441】

第2のプラットフォームは、遊離アミン基とグルタミン側鎖との間の共有結合の形成を触媒するためにグルタミン転移酵素を利用する。ストレプトベルチシリウム・モバラエンス(*Streptoverticillium mobaraense*)からのグルタミン転移酵素(mTG:transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*)は市販されており、タンパク質架橋剤として広範囲に使用されている(例えばYokoyamaら(2004年)、ALPP. Microbiol. Biotechnol. 64、447～454頁を参照のこと)。mTGは、グリコシル化抗体のFc領域において天然グルタミン残基のいずれも認識しないが、抗体に人工的に組み込まれ得る「グルタミンタグ」を認識する(例えばJegerら(2010年)、Angew Chem. Int. Ed. Engl. 49、9995～9997頁を参照のこと)。例示として、グルタミンタグLLQGは、上皮増殖因子受容体を標的にする抗体の定常ドメインの様々な部位に人工的に組み込まれている。mTGは、それから、これらの部位を発蛍光団又はモノメチルドラスタチン10(MMAD:monomethyl dolastatin)とコンジュゲートするために使用され、いくつかの部位は、優れた生物物理学的特性及び高度なコンジュゲーションを有することが分かった。また、mTGは、グルタミンタグを抗Her2及び抗M1S1抗体にコンジュゲートすることができた。抗M1S1-vc-MMADコンジュゲートは、強いインビトロ及びインビボ活性を示し、この方法を使用するコンジュゲーションが抗体結合又は親和性を変えないことを示唆し、ADCの部位特異的コンジュゲーションにおけるこのアプローチの利用性を示す(例えばStropら(2013年)、Chem. Biol. 20、161～167頁を参照のこと)。

30

40

【0442】

糖転移酵素及びグルタミン転移酵素に加えて、他の酵素は、タンパク質標識化における使用のために調査されてきた(Sunbul及びYin(2009年)、Org. Biomol. Chem. 7、3361～3371頁)。1つのかかる酵素であるホルミルグリシン発生酵素は、配列CxPxRを認識し、システイン残基を酸化してホルミルグリシンを形成し、したがって、アルデヒドタグを有する

50

タンパク質を発生させる。アルデヒド基は、その後、例えばヒドロジノ-ピクテ・スペン
グラー化学を通して選択した分子にコンジュゲートすることができる。

【0443】

抗体等のタンパク質への放射性核種金属キレート、毒素及び薬物を含む様々な化合物の
結合のための多くの他の手技及びリンカー分子は公知である(例えば欧州特許出願第188,2
56号、米国特許第4,671,958号、同第4,659,839号、同第4,414,148号、同第4,699,784号、
同第4,680,338号、同第4,569,789号及び同第4,589,071号並びにBorlinghausら(1987年)、
Cancer Res. 47、4071~4075頁を参照のこと)。特に、様々な免疫毒素の生成は本分野で
周知であり、例えば「Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bulle
t」、Thorpeら、Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine、Academic Press社、168
~190頁(1982年);Waldmann(1991年)、Science, 252、1657頁;米国特許第4,545,985号及び
同第4,894,443号で見ることができる。

10

【0444】

一部の状況では、イムノコンジュゲートがその標的部位に達したときに抗体からエフェ
クターを遊離させることが望ましい。それゆえ、エフェクターが標的部位で放出されるべ
きである場合、標的部位の付近で切断可能な結合を含むイムノコンジュゲートを使用し
てもよい。抗体から薬剤を放出させるための結合の切断は、酵素活性又はイムノコンジュ
ゲートが標的細胞内、若しくは標的部位の付近で供される条件により誘発され得る。標的
部位が腫瘍である場合、腫瘍部位に存在する条件下で(例えば腫瘍関連酵素又は酸性pHに曝
露されたとき)切断可能なリンカーが使用され得る。

20

【0445】

いくつかの異なる切断可能なリンカーは、当業者に公知である。米国特許第4,618,492
号、同第4,542,225号及び同第4,625,014号を参照のこと。例示的で切断可能なリンカーと
して、酸不安定性リンカー、プロテアーゼ切断可能リンカー、ジスルフィドリンカー等が
挙げられるが、これらに限定されない。酸不安定性リンカーは、血中で遭遇するpHレベル
で安定であるが、リソソーム中の低pH環境に遭遇したとき不安定になり、分解するよう
に設計されている。また、プロテアーゼ切断可能なリンカーは、血液/血漿中で安定である
が、リソソーム酵素による切断に際して癌細胞におけるリソソーム内で遊離薬物を迅速に
放出するように設計されている。それらは、例えばカテプシンにより迅速に加水分解され
るジペプチドVal-Cit結合で起こるように、リソソーム内の高レベルのプロテアーゼ活性
を利用し、典型的にこれらのプロテアーゼにより認識及び切断されるペプチド配列を含む
。ジスルフィドリンカーは、細胞内で遊離薬物を放出するために高レベルの細胞内還元グ
ルタチオンを利用する。

30

【0446】

したがって、様々な実施形態では、リンカーは、安定(切断不可能)であっても、又は加
水分解可能(切断可能)であってもよく、それによって細胞に入った後に放出される。薬物
が抗体から切断される主要な機構は、リソソームの酸性pH内での加水分解(ヒドラゾン、
アセタール及びシス-アコニット酸様アミド)、リソソーム酵素によるペプチド切断(カテ
プシン及び他のリソソーム酵素)及びジスルフィドの還元を含む。切断のためのこれらの
様々な機構の結果として、また、抗体への薬物の結合機構は広く様々であり、任意の好適
なリンカーを使用することができる。

40

【0447】

好適なコンジュゲーション手技の例は、抗体上で天然に起こる炭水化物の酸化により発
生するアルデヒドへのヒドラジド及び他の求核試薬のコンジュゲーションに依存する。ヒ
ドラゾン含有コンジュゲートは、所望の薬物放出特性を提供する導入されたカルボニル基
で製造することができる。また、コンジュゲートは、一端にジスルフィド、中間にアルキ
ル鎖及び他の末端にヒドラジン誘導体を有するリンカーで製造することができる。アント
ラサイクリンは、この技術を使用して抗体にコンジュゲートすることができる細胞毒の一
例である。

【0448】

50

ヒドラゾン以外の官能基を含有するリンカーは、リソソームの酸性環境で切断される可能性を有する。例えば、コンジュゲートは、細胞内で切断可能なヒドラゾン以外の部位、例えばエステル、アミド及びアセタール/ケタールを含有するチオール反応性リンカーから製造することができる。カンプトテシンは、これらのリンカーを使用してコンジュゲートすることができる1つの細胞毒性剤である。また、5〜7員環ケトンから製造され、かつ細胞毒性剤に結合した酸素の1つ及び抗体結合のためのリンカーへの他方を有するケタールを使用することができる。また、アントラサイクリンは、これらのリンカーでの使用のために好適な細胞毒の一例である。

【0449】

pH感受性リンカーのクラスの別の例は、アミド結合に並置したカルボン酸を有する、シス-アコニット酸である。カルボン酸は、酸性リソソームにおいてアミド加水分解を加速する。また、いくつかの他の種類の構造を有する、同様の種類の加水分解速度加速を達成するリンカーを使用してもよい。マイタンシノイドは、C-9で結合されるリンカーとコンジュゲートされ得る細胞毒の一例である。

【0450】

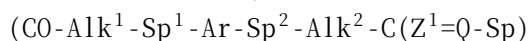
薬物コンジュゲートの可能性のある別の放出方法は、リソソームの酵素によるペプチドの酵素加水分解である。一例では、ペプチドをパラアミノベンジルアルコールにアミド結合を介して結合し、その後、カルバメート又はカーボネートをベンジルアルコールと細胞毒性剤との間で製造する。ペプチドの切断は、アミノベンジルカルバメート又はカーボネートの崩壊又は自己犠牲を引き起こす。この策で例示される細胞毒性剤は、アントラサイクリン、タキサン、マイトマイシンC及びオーリスタチンを含む。一例では、また、フェノールが、カルバメートの代わりにリンカーの崩壊により放出され得る。別の変形では、ジスルフィド還元が、パラメルカプトベンジルカルバメート又はカーボネートの崩壊を開始させるために使用される。

【0451】

ある特定の実施形態では、抗体にコンジュゲートされる細胞毒性剤は、水溶性を、たとえばあるとしても、ほとんど有さず、このことはコンジュゲートの凝集のためにコンジュゲートへの薬物ローディングを制限し得る。このことを克服するための1つのアプローチは、リンカーに可溶化基を付加することである。抗体に結合したPEG二酸、チオール酸又はマレイミド酸;ジペプチドスペーサー;及びアントラサイクリン又はデュオカルマイシニアナログのアミンへのアミド結合を有するものを含む、PEG及びジペプチドからなるリンカーで製造したコンジュゲートを使用してもよい。別の例は、細胞毒性剤にジスルフィド結合され、かつ抗体にアミド結合されたPEG含有リンカーで調製されたコンジュゲートである。PEG基を組み込むアプローチは、凝集及び薬物ローディングの制限を克服することにおいて有益であり得る。

【0452】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載する抗体-薬物コンジュゲートの調製のためのリンカーとして、式:



を有するリンカーが挙げられるが、これに限定されず、式中、 Alk^1 及び Alk^2 は独立して、結合又は分岐若しくは非分岐($C_1 \sim C_{10}$)アルキレン鎖であり; Sp^1 は、結合、--S--、--O--、--CONH--、--NHCO--、--NR'--、--N(CH₂CH₂)₂N--又は--X--Ar--Y--(CH₂)_n--Zであり、ここで、X、Y及びZは独立して、結合、--NR'--、--S--又は--O--であり、ただし $n=0$ である場合、Y及びZの少なくとも1つは、結合でなければならず、 Ar' は、任意選択で($C_1 \sim C_5$)アルキル、($C_1 \sim C_4$)アルコキシ、($C_1 \sim C_4$)チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、--COOR'、--CONHR'、--(CH₂)_nCOOR'、--S(CH₂)_nCOOR'、--O(CH₂)_nCONHR'又は--S(CH₂)_nCONHR'のうちの1つ、2つ又は3つの基で置換される1,2-、1,3-又は1,4-フェニレンであり、ただし、 Alk^1 が結合である場合、 Sp^1 は結合であり; n は、0〜5の整数であり; R' は、任意選択で--OH、($C_1 \sim C_4$)アルコキシ、($C_1 \sim C_4$)チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、($C_1 \sim C_3$)ジアルキルアミノ又は($C_1 \sim C_3$)トリアルキルアンモニウム-A⁻のうちの1つ又は2つの基により置

10

20

30

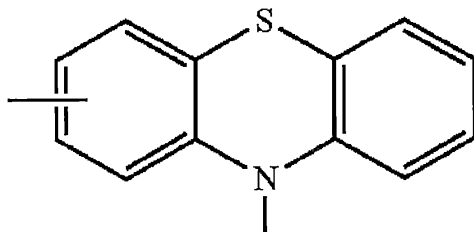
40

50

換される分岐又は非分岐($C_1 \sim C_5$)鎖であり、ここで、 A^- は、塩を完成する薬学的に許容されるアニオンであり;Arは、任意選択で、 n 及び R' が本明細書中上記に定義される通りである($C_1 \sim C_6$)アルキル、($C_1 \sim C_5$)アルコキシ、($C_1 \sim C_4$)チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、 $--COOR'$ 、 $--CONHR'$ 、 $--O(CH_2)_nCOOR'$ 、 $--S(CH_2)_nCOOR'$ 、 $--O(CH_2)_nCONHR'$ 若しくは $--S(CH_2)_nCONHR'$ 又は1,2-、1,3-、1,4-、1,5-、1,6-、1,7-、1,8-、2,3-、2,6-若しくは2,7-ナフチリデン若しくは

【0453】

【化1】



10

【0454】

であって、各ナフチリデン若しくはフェノチアジンが任意選択で($C_1 \sim C_6$)アルキル、($C_1 \sim C_5$)アルコキシ、($C_1 \sim C_4$)チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、 $--COOR'$ 、 $--CONHR'$ 、 $--O(CH_2)_nCOOR'$ 、 $--S(CH_2)_nCOOR'$ 若しくは $--S(CH_2)_nCONHR'$ のうちの1つ、2つ、3つ若しくは4つの基で置換され、 n 及び R' が上記に定義される通りであるもののうちの1つ、2つ又は3つの基で置換される1,2-、1,3-又は1,4-フェニレンであり、ただし、Arがフェノチアジンである場合、 Sp^1 は窒素にのみ接続した結合であり; Sp^2 は結合、 $--S--$ 又は $--O--$ であり、ただし、 Alk^2 が結合である場合、 Sp^2 は結合であり; Z^1 は、任意選択で、 n 及び R' が上記に定義される通りである($C_1 \sim C_5$)アルキル、($C_1 \sim C_5$)アルコキシ、($C_1 \sim C_4$)チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、 $--COOR'$ 、 $--ONHR'$ 、 $--O(CH_2)_nCOOR'$ 、 $--S(CH_2)_nCOOR'$ 、 $--O(CH_2)_nCONHR'$ 又は $--S(CH_2)_nCONHR'$ のうちの1つ、2つ又は3つの基で置換されるH、($C_1 \sim C_5$)アルキル又はフェニルであり; Sp は、直鎖若しくは分岐鎖二価若しくは三価($C_1 \sim C_{18}$)基、二価若しくは三価アリール若しくはヘテロアリール基、二価若しくは三価($C_3 \sim C_{18}$)シクロアルキル若しくはヘテロシクロアルキル基、二価若しくは三価アリール-若しくはヘテロアリール-アリール($C_1 \sim C_{18}$)基、二価若しくは三価シクロアルキル-若しくはヘテロシクロアルキル-アルキル($C_1 \sim C_{18}$)基又は二価若しくは三価($C_2 \sim C_{18}$)不飽和アルキル基であり、ここで、ヘテロアリールは好ましくは、フリル、チエニル、N-メチルピロリル、ピリジニル、N-メチルイミダゾリル、オキサゾリル、ピリミジニル、キノリル、イソキノリル、N-メチルカルバゾイル、アミノクルマリニル又はフェナジニルであり、 Sp が三価基である場合、 Sp は更に低級($C_1 \sim C_5$)ジアルキルアミノ、低級($C_1 \sim C_5$)アルコキシ、ヒドロキシ又は低級($C_1 \sim C_5$)アルキルチオ基により置換されてもよく; Q は、 $=NHNCO--$ 、 $=NHNCS--$ 、 $=NHNCO-NH--$ 、 $=NHNCS-NH--$ 又は $=NHO--$ である。

20

30

【0455】

ある特定の実施形態では、 Alk^1 は、分岐又は非分岐($C_1 \sim C_{10}$)アルキレン鎖であり; Sp' は、 R' が本明細書中上記に定義される通りである結合、 $--S--$ 、 $--O--$ 、 $--CONH--$ 、 $--NHCO--$ 又は $--NR'$ であり、ただし、 Alk' が結合である場合、 Sp^1 は結合であり;

40

Arは、任意選択で、 n 及び R' が本明細書中上記に定義される通りである($C_1 \sim C_6$)アルキル、($C_1 \sim C_5$)アルコキシ、($C_1 \sim C_4$)チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、 $--COOR'$ 、 $--CONHR'$ 、 $--O(CH_2)_nCOOR'$ 、 $--S(CH_2)_nCOOR'$ 、 $--O(CH_2)_nCONHR'$ 若しくは $--S(CH_2)_nCONHR'$ のうちの1つ、2つ若しくは3つの基で置換される1,2-、1,3-若しくは1,4-フェニレンであるか、又はArは、各々任意選択で($C_1 \sim C_6$)アルキル、($C_1 \sim C_5$)アルコキシ、($C_1 \sim C_4$)チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、 $--COOR'$ 、 $--CONHR'$ 、 $--O(CH_2)_nCOOR'$ 、 $--S(CH_2)_nCOOR'$ 、 $--O(CH_2)_nCONHR'$ 若しくは $--S(CH_2)_nCONHR'$ のうちの1つ、2つ、3つ若しくは4つの基で置換される1,2-、1,3-、1,4-、1,5-、1,6-、1,7-、1,8-、2,3-、2,6-若しくは2,7-ナフチリデン

50

であり;

Z¹は、任意選択で(C₁~C₅)アルキル、(C₁~C₄)アルコキシ、(C₁~C₄)チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、--COOR'、--CONHR'、--O(CH₂)_nCOOR'、--S(CH₂)_nCOOR'、--O(CH₂)_nCONHR'又は--S(CH₂)_nCONHR'のうちの1つ、2つ又は3つの基で置換される(C₁~C₅)アルキル又はフェニルであり;Alk²及びSp²は共に結合であり;Sp及びQは上記に定義される通りである。

【0456】

本明細書で説明するリンカー及び連結方法についての参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,773,001号は、求核試薬、特にカリケアマイシンから調製されるヒドラジド及び関連する求核試薬で使用され得るリンカーを開示する。これらのリンカーはとりわけ、薬物とリンカーとの間に形成された連結が加水分解可能であるときに、より優れた活性が得られる場合において有用である。これらのリンカーは、(1)抗体との反応のための基(例えばカルボン酸)及び(2)薬物との反応のためのカルボニル基(例えばアルデヒド又はケトン)を含む2つの官能基を含有する。カルボニル基は、薬物上のヒドラジド基と反応して、ヒドラゾン連結を形成し得る。この連結は、切断可能で加水分解可能であり、標的細胞への結合後にコンジュゲートからの療法剤の放出を可能にする。

【0457】

ある特定の実施形態では、N-ヒドロキシスクシンイミド(OSu:N-hydroxysuccinimide)エステル又は他の比較的活性化されたエステルは、活性化加水分解可能リンカー-薬物部分を発生させるために使用することができる。他の好適な活性化エステルの例として、NHS(N-ヒドロキシスクシンイミド)、スルホ-NHS(スルホン化NHS)、PFP(ペンタフルオロフェニル)、TFP(テトラフルオロフェニル)及びDNP(ジニトロフェニル)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0458】

ある特定の実施形態では、リンカーは、加水分解可能リンカー、例えばマレイミドカプロイル-バリン-シトルリン-p-アミノベンジルオキシカルボニル(MC-vc-PAB-MMAE: maleimidocaproyl-valine-citrulline-p-aminobenzoyloxycarbonyl)又は4-(4-アセチルフェノキシ)ブタン酸(AcBut:4-(4-acetylphenoxy)butanoic acid)である。ある特定の実施形態では、リンカーは、加水分解不可能リンカー、例えばマレイミドカプロイル(MC-MMAF)である。ある特定の例示的であるが、非限定的な実施形態では、抗体-薬物コンジュゲートは、例えばリンカー分子として(3-アセチルフェニル)酢酸(AcPac:(3-acetylphenyl)acetic acid)又は4-メルカプト-4-メチル-ペンタン酸(Amide:4-mercapto-4-methyl-pentanoic acid)を使用して調製することができる。

【0459】

ある特定の実施形態では、リンカーは、ジペプチドリンカー、例えばバリン-シトルリン(val-cit)、フェニルアラニン-リジン(phe-lys)リンカー又はマレイミドカプロン-バリン-シトルリン-p-アミノベンジルオキシカルボニル(vc)リンカー;トリペプチドリンカー、例えばGGG等;テトラペプチドリンカー、例えばGGGG(配列番号71);ペンタペプチドリンカー、例えばGGGGS(配列番号72)等であってもよい。ある特定の実施形態では、リンカーは、スルホスクシンイミジル-4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート(smcc:sulfosuccinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate)である。スルホ-smccコンジュゲーションは、スルフヒドリル(チオール、--SH)と反応するマレイミド基を介して起こり、一方でそのスルホ-NHSエステルは、(リジン及びタンパク質又はペプチドN末端で見られるように)一級アミンに対して反応性である。更に、ある特定の実施形態では、リンカーは、マレイミドカプロイル(mc:maleimidocaproyl)であってもよい。

【0460】

上記リンカーは、例示であり、非限定的である。抗体に、様々な放射線診断化合物、放射線療法化合物、薬物、毒素及び他の薬剤を結合するために報告されてきた多くの方法に照らして、当業者は、抗体又は他のポリペプチドに所与の薬剤を結合するために好適な方

10

20

30

40

50

法を決定することができる。

【0461】

コンジュゲートされた被包システム。

様々な実施形態で、療法剤は、例えば上記に記載するように、抗体に化学的にコンジュゲートされるが、他の実施形態では、エフェクターは、療法組成物、例えば薬物、核酸(例えばアンチセンス核酸及びRNAi又は細胞に送達されるべき別の核酸)又は好ましくは循環系への直接的な曝露から遮蔽される別の療法部分を含有する被包システム、例えばウイルスキャプシド、リポソーム又はミセルを含み得る。抗体に結合したリポソームを調製する手段は、当業者に周知である(例えば米国特許第4,957,735号;Connorら(1985年)、Pharm. Ther., 28、341~365頁等を参照のこと)。

10

【0462】

キレートのコンジュゲーション。

ある特定の実施形態では、エフェクターは、抗体に、又はエピトープタグに結合されるキレートを含む。抗ALPP/ALPPL2抗体は、対応するエピトープタグ又は抗体を有するため、キレートへの抗体の単純な接触は抗体とエフェクターとの結合をもたらす。部分が使用される前に組み合わせ工程を行ってもよく(標的化策)、又はキレートが送達される前に標的組織を抗体に結合してもよい。様々な標的化部分にカップリングするために好適なキレートを生成する方法は、当業者に周知である(例えば米国特許第6,190,923号、同第6,187,285号、同第6,183,721号、同第6,177,562号、同第6,159,445号、同第6,153,775号、同第6,149,890号、同第6,143,276号、同第6,143,274号、同第6,139,819号、同第6,132,764号、同第6,123,923号、同第6,123,921号、同第6,120,768号、同第6,120,751号、同第6,117,412号、同第6,106,866号、同第6,096,290号、同第6,093,382号、同第6,090,800号、同第6,090,408号、同第6,088,613号、同第6,077,499号、同第6,075,010号、同第6,071,494号、同第6,071,490号、同第6,060,040号、同第6,056,939号、同第6,051,207号、同第6,048,979号、同第6,045,821号、同第6,045,775号、同第6,030,840号、同第6,028,066号、同第6,022,966号、同第6,022,523号、同第6,022,522号、同第6,017,522号、同第6,015,897号、同第6,010,682号、同第6,010,681号、同第6,004,533号及び同第6,001,329号を参照のこと)。

20

【0463】

放射性同位体のコンジュゲーションに有用な代表的なリンカーとして、ジエチレントリアミン五酢酸塩(DTPA:diethylenetriamine pentaacetate)-イソチオシアネート、スクシンイミジル6-ヒドラジニウムニコチネート塩酸塩(SHNH:succinimidyl 6-hydrazinium nicotinate hydrochloride)及びヘキサメチルプロピレンアミンオキシム(HMPAO:hexamethylpropylene amine oxime)が挙げられるが、これらに限定されない(例えばBakkerら(1990年)、J. Nucl. Med. 31、1501~1509頁;Chattopadhyayら(2001年)、Nucl. Med. Biol. 28、741~744頁;Dewanjeeら(1994年)、J. Nucl. Med. 35、1054~63頁;Krenningら(1989年)、Lancet 1、242~244頁;Sagiuchiら(2001年)、Ann. Nucl. Med. 15、267~270頁;米国特許第6,024,938号を参照のこと)。或いは、ある特定の実施形態では、抗体は、放射性同位体がそれに直接的に結合され得るように、誘導体化され得る(例えばYooら(1997年)、J. Nucl. Med. 38、294~300頁を参照のこと)。また、ヨウ素化法は、本分野で公知であり、代表的なプロトコルは、例えばKrenningら(1989年)、Lancet 1、242~244頁で、及びBakkerら(1990年)、J. Nucl. Med. 31、1501~1509頁で見ることができる。

30

40

【0464】

融合タンパク質の生成。

抗体及び/又はエフェクターが比較的短い場合(例えば約50個未満のアミノ酸)、それらは標準の化学ペプチド合成技術を使用して合成することができる。両方の分子が比較的短い場合、キメラ分子は、単一の隣接したポリペプチドとして合成することができる。或いは、標的化分子及びエフェクター分子を、別々に合成し、その後、1つの分子のアミノ末端と他の分子のカルボキシル末端との縮合により融合させ、これによりペプチド結合を形成してもよい。或いは、標的化分子及びエフェクター分子を、各々、ペプチドスパーサー

50

分子の一端と縮合させ、これにより隣接した融合タンパク質を形成してもよい。

【0465】

配列のC末端アミノ酸が不溶性支持体に結合され、続いて配列中の残りのアミノ酸が連続的に付加される固体相合成は、本発明のポリペプチドの化学合成に好ましい方法である。固体相合成の技術は、The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology., 2巻、Special Methods in Peptide Synthesis, Part A中のBarany及びMerrifield、Solid-Phase Peptide Synthesis、3～284頁;Merrifieldら、J. Am. Chem. Soc., 85、2149～2156頁(1963年);及びStewartら、Solid Phase Peptide Synthesis、第2版、Pierce Chem. Co.社、Rockford, Ill.(1984年)により説明されている。

【0466】

ある特定の実施形態では、本発明のキメラ融合タンパク質は、組換えDNA法を使用して合成される。一般的に、これは、融合タンパク質をコードするDNA配列を創出すること、特定のプロモーターの制御下の発現カセットにDNAを入れること、宿主内でタンパク質を発現させること、発現したタンパク質を単離すること及び必要に応じてタンパク質を再生することを含む。

【0467】

本発明の融合タンパク質をコードするDNAは、例えば適切な配列のクローニング及び制限を含む任意の好適な方法、又はNarangら(1979年)、Meth. Enzymol. 68、90～99頁のホスホトリエステル法;Brownら(1979年)、Meth. Enzymol. 68、109～151頁のホスホジエステル法;Beaucageら(1981年)、Tetra. Lett., 22、1859～1862頁のジエチルホスホロアミ
20

【0468】

化学合成は、単鎖オリゴヌクレオチドを生成する。これは、相補的配列とのハイブリダイゼーションにより、又はテンプレートとして一本鎖を使用するDNAポリメラーゼでの重合により二本鎖DNAに変換することができる。当業者は、DNAの化学合成は約100塩基の配列に限定されるが、より短い配列のライゲーションにより、より長い配列を得ることができることを認識し得る。

【0469】

或いは、ある特定の実施形態では、配列をクローニングし、適切な配列を適切な制限酵素を使用して切断することができる。断片を、その後、ライゲートして、所望のDNA配列を生成することができる。

【0470】

ある特定の実施形態では、本発明の融合タンパク質をコードするDNAは、PCRクローニング法を使用してクローニングすることができる。

【0471】

抗体及びエフェクターは、ある特定の実施形態では、本質的に共に直接的に接続されるが、当業者は、分子がスペーサー、例えば1つ又は複数のアミノ酸からなるペプチドスペーサー(例えば(Gly₄Ser)₃、配列番号73)により分離され得ることを理解する。一般的に、スペーサーは、タンパク質を接続するか、又はそれらの間でいくらかの最小限の距離若しくは他の空間的關係を保存する以外に特異的な生物学的活性を有しない。しかしながら、スペーサーの構成要素アミノ酸は、分子の一部の特性、例えば折畳み、正味荷電又は疎水性に影響するように選択され得る。

【0472】

融合タンパク質をコードする核酸配列は、大腸菌、他の細菌宿主、酵母並びに様々な高度真核細胞、例えばCOS、CHO及びHeLa細胞株及び骨髓腫細胞株を含む様々な宿主細胞で発現することができる。組換えタンパク質遺伝子は、各宿主に適切な発現制御配列に作動可能に連結される。

【0473】

本発明のプラスミドは、周知の方法、例えば大腸菌の塩化カルシウム形質転換及び哺乳
50

動物細胞のリン酸カルシウム処理又はエレクトロポレーションにより選択された宿主細胞に移行することができる。プラスミドで形質転換された細胞は、プラスミド上に含有される遺伝子、例えばamp、gpt、neo及びhyg遺伝子により与えられる抗生物質への抵抗性により選択することができる。

【0474】

組換え融合タンパク質は、発現すると、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等を含む本分野の標準の手技に従って精製することができる(一般的にR. Scopes(1982年)、Protein Purification、Springer-Verlag社、N.Y.;Deutscher(1990年)、Methods in Enzymology、182巻、Guide to Protein Purification、Academic Press、Inc.社、N.Y.を参照のこと)。少なくとも約90～95%の均質性の実質的に純粋な組成物が好ましく、98～99%又はそれを超える均質性は医薬使用に最も好ましい。ポリペプチドを、所望のように部分的に、又は均質になるまで精製すると、その後、療法として使用することができる。

10

【0475】

当業者は、化学合成、生物学的発現又は精製後、融合タンパク質は、構成要素ポリペプチドの固有のコンフォメーションとは実質的に異なるコンフォメーションを有する場合であることを認識し得る。この場合、ポリペプチドを変性及び還元し、その後、ポリペプチドが再び折り畳んで好ましいコンフォメーションになるようにする必要がある。タンパク質を還元及び変性し、再折畳みを誘発する方法は、当業者に周知である(例えばDebinskiら(1993年)、J. Biol. Chem., 268、14065～14070頁;Kreitman及びPastan(1993年)、Bioconjug. Chem., 4、581～585頁;及びBuchnerら(1992年)、Anal. Biochem., 205、263～270頁を参照のこと)。

20

【0476】

当業者は、融合タンパク質の生物学的活性を減少させることなく、融合タンパク質に改変を行うことができることを認識し得る。一部の改変は、融合タンパク質への標的化分子のクローニング、発現又は組込みを促進するために行われ得る。かかる改変は当業者に周知であり、例えば開始部位を提供するためにアミノ末端に付加されるメチオニン、又は便利に位置する制限酵素部位若しくは終止コドンを出発点とするためにいずれかの末端に置かれる追加のアミノ酸を含む。

【0477】

医薬組成物

30

本明細書に記載する抗ALPP/ALPPL2抗体(例えばM25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA及び/又はM25wtLF)及び/又はそれらのイムノコンジュゲートは、予防処置のための、しかし主には療法処置のための非経口、局所、経口若しくは局部投与(例えば腫瘍部位に注射される)、エアロゾル投与又は経皮投与に有用である。医薬組成物は、投与方法によって様々な単位投与形態で投与することができる。例えば、経口投与に好適な単位投与形態は、粉末、錠剤、丸薬、カプセル及びトロチ剤を含む。本明細書に記載する抗体及び/又はそのイムノコンジュゲート並びに本明細書に記載する抗体及び/又はそのイムノコンジュゲートを含む医薬組成物は、経口投与される場合、好ましくは消化から保護されることが認識される。これは当業者に公知のいくつかの手段により、例えばタンパク質を酸性加水分解及び酵素加水分解に抵抗性にするためにタンパク質を組成物と複合体化することにより、又はリポソーム等の適切な抵抗性担体中にタンパク質を包装することにより、達成することができる。タンパク質を消化から保護する手段は、本分野で周知である。

40

【0478】

様々な実施形態では、薬学的に許容される担体と共に配合された、抗ALPP/ALPPL2抗体

50

若しくはその抗原結合性部分又はそれらのイムノコンジュゲートのうちの1つ又は組合せを含有する組成物、例えば医薬組成物が提供される。

【0479】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、生理学的に適合性の任意の及び全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤等を含む。好ましくは、担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄又は上皮投与(例えば注射又は点滴による)に好適である。投与経路によって、活性化合物、すなわち抗体、イムノコンジュゲートは、酸の作用及び化合物を不活性化し得る他の自然条件から化合物を保護する材料でコーティングすることができる。

【0480】

ある特定の実施形態では、抗体及び/又はイムノコンジュゲートは、「固有の」形態で、又は所望の場合、塩、エステル、アミド、プロドラッグ、誘導体等の形態で投与することができる、ただし、塩、エステル、アミド、プロドラッグ又は誘導体は、薬理学的に好適である、すなわち本方法において有効である。活性剤の塩、エステル、アミド、プロドラッグ及び他の誘導体は、合成有機化学の分野の当業者に公知であり、かつ例えばMarch(1992年)、Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanisms and Structure、第4版、N.Y. Wiley-Interscience社により説明される標準の手技を使用して、及び上記に記載するように調製することができる。

【0481】

例示として、薬学的に許容される塩は、塩を形成することができる官能性を有する本明細書に記載する抗体及び/又はイムノコンジュゲートのいずれについても調製することができる。薬学的に許容される塩は、親化合物の活性を保持し、それが投与される対象に、及びそれが投与されることに関連して任意の有害な、又は不都合な効果を与えない任意の塩である。

【0482】

様々な実施形態では、薬学的に許容される塩は、有機又は無機塩基に由来し得る。塩は一価又は多価イオンであってもよい。無機イオン、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム及びマグネシウムは特に興味深い。有機塩は、アミン、特にアンモニウム塩、例えばモノ、ジ及びトリアルキルアミン又はエタノールアミンで製造することができる。また、塩は、カフェイン、トロメタミン及び同様の分子と形成することができる。

【0483】

薬学的に活性な薬剤を塩、エステル、アミド、プロドラッグ等として配合する方法は、当業者に周知である。例えば、塩は、典型的に好適な酸との反応を含む従来法を使用して遊離塩基から調製することができる。一般的に、薬物の塩基形態を、極性有機溶媒、例えばメタノール又はエタノール中に溶解し、酸をこれに添加する。得られた塩は沈殿するか、又はより極性の低い溶媒の添加により溶液から引き出すことができる。酸添加塩を調製するために好適な酸として、有機酸、例えば酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸等、及び無機酸、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の両方が挙げられるが、これらに限定されない。酸添加塩は、好適な塩基での処理により遊離塩基に再変換することができる。本明細書の活性剤のある特定の特に好ましい酸添加塩は、塩酸又は臭化水素酸を使用して調製され得るようなハロゲン塩を含む。逆に、本発明の活性剤の塩基性塩の調製は、薬学的に許容される塩基、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、トリメチルアミン等を使用して同様の様式で調製される。特に好ましい塩基性塩は、アルカリ金属塩、例えばナトリウム塩及び銅塩を含む。

【0484】

塩基性薬物の塩形態の調製のために、対イオンのpKaは好ましくは、薬物のpKaより少なくとも約2pH単位低い。同様に、酸性薬物の塩形態の調製のために、対イオンのpKaは好ま

10

20

30

40

50

しくは、薬物のpKaより少なくとも約2pH単位高い。このことは、塩の溶解性が遊離酸又は塩基の溶解性に優る塩定常に達するように、対イオンが溶液のpHを pH_{max} より低いレベルにすることを可能にする。有効活性成分(API:active pharmaceutical ingredient)中、及び酸又は塩基中のイオン化可能基のpKa単位における差の一般規則は、プロトン移行をエネルギー的に有利にすることを意味する。API及び対イオンのpKaが顕著に異なる場合、水性環境において固体複合体が形成し得るが、迅速に不均衡になり(すなわち、薬物及び対イオンの個々の実体に崩壊し)得る。

【0485】

好ましくは、対イオンは、薬学的に許容される対イオンである。好適なアニオン塩形態として、酢酸塩、安息香酸塩、ベンジル酸塩、酒石酸水素塩、臭化物、炭酸塩、塩化物、クエン酸塩、エデト酸塩、エジシル酸塩、エストレート、フマル酸塩、グルセプト酸塩、グルコン酸塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化物、乳酸塩、ラクトビオン酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、臭化メチル、硫酸メチル、ムチン酸塩、ナプシル酸塩、硝酸塩、パモ酸塩(エンボネート)、リン酸塩及び二リン酸塩、サリチル酸塩及びジサリチル酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、トシル酸塩、トリエチオジド、吉草酸塩等が挙げられるが、これらに限定されず、好適なカチオン塩形態として、アルミニウム、ベンザチン、カルシウム、エチレンジアミン、リジン、マグネシウム、メグルミン、カリウム、プロカイン、ナトリウム、トロメタミン、亜鉛等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0486】

エステルの調製は典型的に、抗体及び/又はイムノコンジュゲートの分子構造内に存在するヒドロキシル及び/又はカルボキシル基の官能化を含む。ある特定の実施形態では、エステルは典型的に、遊離アルコール基、すなわち、Rがアルキルであり、好ましくは低級アルキルである式 $RCOOH$ のカルボン酸に由来する部分のアシル置換誘導体である。エステルは、所望の場合、従来の水素化分解又は加水分解手技を使用することにより、遊離酸に再変換することができる。

【0487】

また、アミドは、当業者に公知の、又は関連文献で説明される技術を使用して調製することができる。例えば、アミドは、好適なアミン反応体を使用してエステルから調製してもよく、又はそれらはアンモニア若しくは低級アルキルアミンとの反応により無水物若しくは酸塩化物から調製してもよい。

【0488】

本明細書で説明する抗体及び/又はイムノコンジュゲートを含む医薬組成物は、単独で、又は組合せ療法で、すなわち他の薬剤と組み合わせて投与することができる。例えば、組合せ療法は、少なくとも1つ又は複数の追加の療法剤、例えば以下に説明する抗癌剤を伴う抗体又はイムノコンジュゲートを含み得る。また、医薬組成物は、放射線療法及び/又は手術と共に投与することができる。

【0489】

本明細書に記載する抗体及び/又はイムノコンジュゲートを含む組成物は、本分野で公知の様々な方法により投与することができる。当業者が理解するように、投与経路及び/又は投与様式は、所望の結果によって変動する。活性化合物は、迅速な放出から化合物を保護する担体、例えばインプラント、経皮パッチ及びマイクロカプセル化送達システムを含む制御放出製剤で調製することができる。生分解性、生体適合性ポリマー、例えば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及びポリ乳酸を使用することができる。かかる製剤の調製のための多くの方法は、特許を取得しているか、又は一般的に当業者に公知である(例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems、J. R. Robinson編、Marcel Dekker, Inc.社、New York、1978年を参照のこと)。

【0490】

ある特定の実施形態では、抗ALPP/ALPPL2抗体又はイムノコンジュゲートの投与は、抗

体若しくはイムノコンジュゲート組成物をコーティングすること又は抗体若しくはイムノコンジュゲートをその不活性化を防ぐ材料と共投与することにより促進することができる。例えば、化合物は、適切な担体、例えばリポソーム又は希釈剤中で対象に投与することができる。薬学的に許容される希釈剤として、生理食塩水及び水性緩衝液が挙げられるが、これらに限定されない。リポソームとして、水中油中水型CGFエマルジョン及び従来型リポソームが挙げられるが、これらに限定されない(Strejanら(1984年)、J. Neuroimmuno 1, 7, 27頁)。

【0491】

薬学的に許容される担体は、滅菌水溶液又は分散体及び滅菌注射用溶液若しくは分散体の即座の調製のための滅菌粉末を含む。薬学的に活性な物質のためのかかる媒体及び薬剤の使用は、本分野で公知である。任意の従来型媒体又は薬剤が活性化合物と不適合である場合を除いて、医薬組成物中でのその使用が企図される。また、補助的活性化合物を組成物に組み込んでもよい。

10

【0492】

様々な実施形態では、療法組成物は典型的に、無菌であり、製造及び保存条件下で安定である。組成物は、溶液、マイクロエマルジョンとして、脂質若しくはリポソーム又は高い薬物濃度を含有するのに好適な他の規定の構造中に配合することができる。ある特定の実施形態では、担体は、例えば水、エタノール、ポリオール(例えばグリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコール等)及びこれらの好適な混合物を含有する溶媒又は分散媒体であってもよい。適切な流動性は、例えばレシチン等のコーティングの使用により、分散体の場合必要とされる粒径の維持により、及び界面活性剤の使用により維持することができる。多くの場合、組成物中に等張剤、例えば糖、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトール又は塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射用組成物の延長吸収は、組成物中に吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸塩及びゼラチンを含めることによりもたらすことができる。

20

【0493】

滅菌注射用溶液は、必要に応じて上記に列挙される成分の1つ又は組合せと共に、適切な溶媒中に必要な量の活性化合物(例えば本明細書に記載する抗体及び/又はイムノコンジュゲート)を組み込み、続いて滅菌精密濾過することにより調製することができる。一般的に、分散体は、活性化合物を、基本の分散媒体及び上記に列挙されるものからの必要とされる他の成分を含有する滅菌媒体に組み込むことにより調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、例示的な調製方法は、活性成分及び任意の追加の所望の成分の以前に滅菌濾過した溶液から、これらの成分の粉末を産生する真空乾燥及び冷凍乾燥(凍結乾燥)を含む。

30

【0494】

投与量レジメンは、最適な所望の応答(例えば療法応答)を提供するように調節される。例えば、単一のボラスを投与してもよく、いくつかに分けた用量を経時的に投与してもよく、又は用量を療法的状況の緊急により指示されるように比例して低減若しくは増大してもよい。例えば、ある特定の実施形態では、本明細書に記載する抗体及び/又はイムノコンジュゲートは、皮下注射により1日1回若しくは2回、又は1週間に1回若しくは2回、又は1ヶ月に1回若しくは2回投与することができる。

40

【0495】

投与の容易さ及び投与量の均一性のために非経口組成物を単位投与形態に配合することはとりわけ有利である。本明細書で使用する単位投与形態は、治療される対象のための単位投与量として適合された物理的に別々の単位を指す。各単位は、必要とされる医薬担体を伴って所望の療法効果を生成するように計算された所定の量の活性化合物を含有する。単位投与形態の仕様は、(a)活性化合物の独特の特徴及び達成されるべき特定の療法効果並びに(b)個人の治療のためにかかる活性化合物を化合することの本分野に固有の制限により規定され、かつこれらに直接的に依存する。

【0496】

50

ある特定の実施形態では、製剤は、薬学的抗酸化剤を含む。薬学的に許容される抗酸化剤の例として、(1)水溶性抗酸化剤、例えばアスコルビン酸、システイン塩酸塩、硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム等；(2)油溶性抗酸化剤、例えばアスコルビルパルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA:butylated hydroxyanisole)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT:butylated hydroxytoluene)、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ-トコフェロール等；及び(3)金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA:ethylenediamine tetraacetic acid)、ソルビトール、酒石酸、リン酸等が挙げられる。

【0497】

療法組成物について、本明細書に記載する抗体及び/又はイムノコンジュゲートの製剤は、経口、経鼻、局所(口腔内及び舌下を含む)、直腸、膣及び/又は非経口投与のために好適な製剤を含む。製剤は、単位投与形態中に簡便に提示することができ、薬学の分野で公知の任意の方法により調製することができる。単一の投与形態を生成するために担体材料と混合され得る活性成分の量は、治療される対象及び特定の投与様式によって変化する。単一の投与形態を生成するために担体材料と混合され得る活性成分の量は一般的に、療法効果を生成する組成物の量である。一般的に、100パーセントのうち、この量は、約0.01パーセント～約90パーセントの活性成分、好ましくは約0.005パーセント～約70パーセント、最も好ましくは約0.01パーセント～約30パーセントに及ぶ。

【0498】

また、膣投与のために好適な本明細書に記載する抗体及び/又はイムノコンジュゲートの製剤は、適切であることが本分野で公知の担体を含有する膣坐剤、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム又はスプレー製剤を含む。本明細書に記載する抗体及び/又はイムノコンジュゲートの局所又は経皮投与のための投与形態は、粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチ及び吸入剤を含む。ある特定の実施形態では、活性化合物は、薬学的に許容される担体と、及び必要とされ得る任意の保存剤、緩衝液又は噴射剤と滅菌条件下で混合され得る。

【0499】

本明細書で使用される句「非経口投与」及び「非経口投与される」は、通常注射による、経腸及び局所投与以外の投与様式を意味し、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外及び胸骨内注射及び点滴が挙げられるが、これらに限定されない。

【0500】

本明細書に記載する抗体及び/又はイムノコンジュゲートを含む医薬組成物中で使用され得る好適な水性及び非水性担体の例として、水、エタノール、ポリオール(例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等)及びこれらの好適な混合物、植物油、例えばオリーブ油並びに注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチル等が挙げられるが、これらに限定されない。適切な流動性は、例えばコーティング材料、例えばレシチンの使用により、分散体の場合必要とされる粒径の維持により、及び界面活性剤の使用により維持することができる。

【0501】

様々な実施形態では、また、これらの組成物は、補助剤、例えば保存剤、湿潤剤、乳化剤及び分散剤を含有し得る。本分野で周知の補助剤の特定の例は、例えば無機補助剤(例えばアルミニウム塩、例えばリン酸アルミニウム及び水酸化アルミニウム)、有機補助剤(例えばスクアレン)、油ベースの補助剤、ビロソーム(例えばインフルエンザウイルス由来の膜結合赤血球凝集素及びノイラミニダーゼを含有するビロソーム)を含む。

【0502】

製剤中の微生物の存在の予防は、滅菌手技、並びに/又は様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸等の包含の両方法により確実にすることができる。また、組成物に等張剤、例えば糖、塩化ナトリウム等を含めることが望ましい場合がある。加えて、注射用医薬形態の延長吸収は、吸収を遅延させる薬剤、

10

20

30

40

50

例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンの包含によりもたらされ得る。

【0503】

本明細書に記載する抗体及び/又はイムノコンジュゲートがヒト及び動物に薬学的に投与される場合、それらは、単独で、又は薬学的に許容される担体との組合せで例えば0.001~90%(より好ましくは0.005~70%、例えば0.01~30%)の活性成分を含有する医薬組成物として与えることができる。

【0504】

選択される投与経路にかかわらず、好適な水和形態及び/又は医薬組成物で使用され得る本明細書に記載する抗体及び/又はイムノコンジュゲートは、当業者に公知の従来法により薬学的に許容される投与形態に配合される。

【0505】

本発明の医薬組成物中の活性成分(例えば本明細書に記載する抗体及び/又はイムノコンジュゲート)の実際の投与量レベルは、患者にとって毒性であることなく、特定の患者、組成物及び投与様式について所望の療法応答を達成するために有効な活性成分の量を得るように変化してもよい。選択される投与量レベルは、使用される本発明の特定の組成物又はそのエステル、塩若しくはアミドの活性、投与経路、投与時間、使用される特定の化合物の排出速度、治療持続期間、使用される特定の組成物との組合せで使用される他の薬物、化合物及び/又は材料、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、健康全般及び以前の病歴、並びに医薬分野で周知であるような因子を含む様々な薬物動態因子に依存する。本分野で通常の技能を有する医師又は獣医師は、必要とされる医薬組成物の有効量を容易に決定及び処方することができる。例えば、医師又は獣医師は、所望の療法効果を達成するために必要とされるより低いレベルで、医薬組成物において使用される本発明の化合物の用量を開始し、所望の効果が達成されるまで徐々に投与量を増大させてもよい。一般的に、本明細書に記載する抗体及び/又はイムノコンジュゲートの好適な1日当たりの用量は、療法効果を生成するのに有効な最も低い用量である化合物の量である。かかる有効用量は一般的に、上記に記載する因子に依存する。ある特定の実施形態では、投与は、静脈内、筋肉内、腹腔内又は皮下であり、好ましくは標的部位の近位に投与されることが好ましい。所望の場合、有効な1日当たりの用量の療法組成物は、単一の投与量、又は1日を通して適切な間隔で別々に投与される2、3、4、5、6若しくはそれを超えるサブ用量として、任意選択で単位投与形態にて投与してもよい。本明細書に記載する抗体及び/又はイムノコンジュゲートを単独で投与することは可能であるが、典型的に、化合物を医薬製剤(組成物)として投与することが好ましい。

【0506】

ある特定の実施形態では、療法組成物は、本分野で公知の医療デバイスで投与することができる。例えば、例示的な実施形態では、本明細書に記載する抗体及び/又はイムノコンジュゲートは、針無皮下注射デバイス、例えば米国特許第5,399,163号、同第5,383,851号、同第5,312,335号、同第5,064,413号、同第4,941,880号、同第4,790,824号又は同第4,596,556号で開示されるデバイスで投与することができる。有用な周知のインプラント及びモジュールの例は、例えば、制御された速度で薬物を分散するための埋め込み式微小注入ポンプを開示する米国特許第4,487,603号で、皮膚を通して薬物を投与するための療法デバイスを開示する米国特許第4,486,194号で、正確な注入速度で薬物を送達するための薬物注入ポンプを開示する米国特許第4,447,233号で、連続薬物送達のための可変流量埋め込み式注入装置を開示する米国特許第4,447,224号で、多チャンバー区画を有する浸透圧薬物送達システムを開示する米国特許第4,439,196号で、及び浸透圧薬物送達システムを開示する米国特許第4,475,196号で説明されている。多くの他のかかるインプラント、送達システム及びモジュールは、当業者に公知である。

【0507】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載する抗ALPP/ALPPL2抗体及び/又はイムノコンジュゲートは、インビボでの適切な分布を確実にするように配合することができる。例えば、血液脳関門(BBB:blood-brain barrier)は、多くの高親水性化合物を排除する。本発

明の療法化合物がBBBを横断することを確実にするために(所望の場合)、それらは例えばリポソーム中に配合してもよい。リポソームを製造する方法については、例えば米国特許第4,522,811号、同第5,374,548号及び同第5,399,331号を参照のこと。リポソームは、選択的に特定の細胞又は器官に輸送される1つ又は複数の部分を含み、したがって標的化薬物送達を向上させ得る(例えばRanade(1989年)、J. Clin. Pharmacol. 29、685頁を参照のこと)。例示的な標的化部分として、葉酸塩又はビオチン(例えば米国特許第5,416,016号を参照のこと);マンノシド(Umezawaら(1988年)、Biochem. Biophys. Res. Commun. 153、1038頁);抗体(Bloemanら(1995年)、FEBS Lett. 357、140頁;Owaisら(1995年)、Antimicrob. Agents Chemother. 39、180頁);界面活性タンパク質A受容体(Briscoeら(1995年)、Am. J. Physiol. 1233、134頁)が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0508】

キット。

放射性又は他のエフェクターが診断及び/又は療法剤として使用される場合、放射標識化合物は多くの場合貯蔵寿命が乏しいこと及び/又は使用される放射性核種の短い半減期のために、すぐ使用できる組成物を使用者の自由に使用できる状態にしておくことは多くの場合不可能である。かかる場合、使用者は、病院、医師の執務室又は検査室で放射性核種での標識化反応を行うことができる。次いで、この目的又は他の目的のために、様々な反応成分は、いわゆる「キット」の形態で使用者に提供され得る。キットは好ましくは、使用者が、自分が自由に使用できる施設を使用することによりキットから所望の組成物を調製することができるように、所望の反応を行うために必要な操作は可能な限り単純であるべきであるように設計される。それゆえ、また、本発明は、本発明に従う組成物を調製するためのキットに関連する。

20

【0509】

ある特定の実施形態では、かかるキットは、本明細書に記載する1つ又は複数の抗体又はイムノコンジュゲートを含む。抗体又はイムノコンジュゲートは、所望の場合、不活性な薬学的に許容される担体及び/又は配合剤及び/又は補助剤を添加して、提供することができる。加えて、キットは任意選択で、好適な放射性核種(又は他の活性剤)の塩又はキレーートの溶液並びに(iii)キット中に存在する成分を投与及び/又は反応させるための処方を含む使用のための使用説明書を含む。

【0510】

また、使用者に供給されるキットは、使用のための使用説明書と共に、上記に定義される成分を含み得るが、上記の下位(ii)で定義される、放射性核種の塩又はキレーートの溶液は、その溶液は限定された貯蔵寿命を有し、別々に使用者の自由に使用できる状態にしてもよい。

30

【0511】

キットは任意選択で、加えて、還元剤及び/若しくは所望の場合、キレーター並びに/又は組成物の使用のための使用説明書及び/若しくはキットの成分を反応させて所望の生成物を形成するための処方を含み得る。所望の場合、キットの成分は、それらが適合性である限り、混合してもよい。

【0512】

ある特定の実施形態では、イムノコンジュゲートは、単に、中性媒体中で成分を混合し、それらを反応させることにより生成することができる。その目的のために、エフェクターは、例えばキレーートの形態で抗体に提示され得る。

40

【0513】

キット構成要素が医薬投与のための成分として(例えば注射液として)使用される場合、それらは好ましくは無菌である。構成要素が乾燥状態で提供される場合、使用者は好ましくは滅菌生理食塩水を溶媒として使用するべきである。所望の場合、構成要素は、好適な安定剤、例えばアスコルビン酸、ゲンチジン酸若しくはこれらの酸の塩で従来の様式にて安定化することができるか、又はそれらは他の補助的薬剤、例えば充填剤、例えばグルコース、乳糖、マンニトール等を含み得る。

50

【0514】

使用説明材料は、存在する場合、典型的に文書又は印刷材料を含むが、それらはかかるものに限定されない。かかる使用説明書を格納し、それらをエンドユーザーに伝達することができる任意の媒体は、本発明により企図される。かかる媒体として、電子保存媒体(例えば磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ)、光学媒体(例えばCD ROM)等が挙げられるが、これらに限定されない。かかる媒体は、かかる使用説明材料を提供するインターネットサイトへのアドレスを含み得る。

【0515】

キメラ抗原受容体(CAR:chimeric antigen receptor)構築物及び療法

ある特定の実施形態では、本明細書に記載する抗体は、CAR-T細胞療法のための構築物/細胞の創出で利用することができる。CAR-T細胞療法は、癌を有する哺乳動物(例えば癌患者)への、キメラ抗原受容体(CAR)を発現し、(CARと相互作用する)腫瘍細胞に働き、腫瘍細胞のアポトーシスをもたらす遺伝子操作した細胞(例えばT細胞、ナチュラルキラー(NK:natural killer)細胞、細胞傷害性Tリンパ球(CTL:cytotoxic T lymphocyte)、調節性T細胞等)の投与を含む細胞免疫療法である。

10

【0516】

典型的に、遺伝子操作した細胞は、遺伝子移行技術を使用して、CD3鎖(細胞内ドメイン)と組み合わせた抗体の様々な領域(VL及びVH)を有するCARを細胞(例えばT細胞)上で発現することにより調製される。CARは、腫瘍抗原に特異的なモノクローナル抗体(例えば本明細書に記載する抗ALPP/ALPPL2抗体)の可変領域の軽鎖(VL:light chain)及び重鎖(VH:heavy chain)が直列に連結しており、その後、C末端側でT細胞受容体(TCR:T cell receptor)鎖に連結しているキメラタンパク質についての一般的な用語である。CAR-T細胞療法の更なる詳細は、特にNakazawaら(2013年)、Shinshu Med. J. 61(4)、197~203頁により説明されている。

20

【0517】

ある特定の実施形態では、キメラ抗原受容体(CAR)は、細胞外及び細胞内ドメインを含む。細胞外ドメインは、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFGYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA及び/又はM25wtLF抗体により結合されるALPP及び/若しくはALPPL2又はそれらのドメインに特異的に結合する標的特異的結合エレメント(そうでなければ抗原結合性部分とも呼ばれる)を含む。様々な実施形態では、標的特異的結合エレメントは、抗ALPP/ALPPL2抗体を含む。

30

【0518】

様々な実施形態では、細胞内ドメイン又はそうでなければ細胞質ドメインは、1つ又は複数の共刺激シグナル領域、及び様々な実施形態では、ゼータ鎖部分を含む。共刺激シグナル領域は、共刺激分子の細胞内ドメインを含むCARの一部を指す。様々な実施形態では、共刺激分子は、抗原に対するリンパ球の効率的な応答に必要とされる、抗原受容体又はそれらのリガンド以外の細胞表面分子である。

40

【0519】

CARの細胞外ドメインと膜貫通ドメインとの間、又はCARの細胞質ドメインと膜貫通ドメインとの間に、スペーサドメインが組み込まれ得る。本明細書で使用される場合、「スペーサドメイン」という用語は一般的に、ポリペプチド鎖で膜貫通ドメインを細胞外ドメイン又は細胞質ドメインのいずれかに連結するように機能する任意のオリゴペプチド又はポリペプチドを意味する。様々な実施形態では、スペーサドメインは、最大300個のアミノ酸、又は様々な実施形態では約10~約100個のアミノ酸、及びある特定の実施形態では約25~約50個のアミノ酸を含み得る。

【0520】

50

CAR抗原結合部分

様々な実施形態では、キメラ抗原受容体構築物は、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA及び/又はM25wtLF抗体により結合されるALPPに及び/若しくはALPPL2に並びに/又はALPPのドメインに及び/若しくはALPPL2に特異的に結合する標的的特異的結合エレメント(そうでなければ抗原結合性部分とも呼ばれる)を含む。ある特定の
10 実施形態では、標的的特異的結合エレメントは、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA及び/又はM25wtLF抗体からの結合ドメインを含む。ある特定の
20 実施形態では、標的的特異的結合エレメントは、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA及び/又はM25wtLF抗体を含む。

【0521】

膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインについて、CARは、CARの細胞外ドメインに融合される膜貫通ドメインを含むように設計され得る。一実施形態では、天然でCARのドメインの1つと関連している膜貫通ドメインが使用される。一部の場合、膜貫通ドメインは、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限にするために、かかるドメインの、同じ又は異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインへの結合を避けるようにアミノ酸置換により選択又は改変してもよい。

【0522】

様々な実施形態では、膜貫通ドメインは、天然源に由来してもよく、又は合成源に由来してもよい。供給源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合又は膜貫通タンパク質に由来してもよい。本明細書で企図されるCAR構築物における特定の使用の膜貫通領域の例示的であるが、非限定的な例は、T細胞受容体のアルファ、ベータ又はゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154に由来してもよい。或いは、膜貫通ドメインは、合成であってもよく、この場合、それは主に疎水性残基、例えばロイシン及びバリンを含み得る。ある特定の
30 実施形態では、フェニルアラニン、トリプトファン及びバリンのアミノ酸の三つ組は、合成膜貫通ドメインの各末端で見られる。任意選択で、短い、例えば長さが2〜約10個のアミノ酸のオリゴペプチド又はポリペプチドリンカーは、CARの膜貫通ドメインと細胞質シグナルドメインとの間の連結を形成し得る。ある特定の
40 実施形態では、グリシン-セリンの二つ組は、特に好適なリンカーを提供する。

【0523】

ある特定の実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、CD8膜貫通ドメインを含む。例示的であるが、非限定的な一実施形態では、CD8膜貫通ドメインは、アミノ酸配列Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys(配列番号74)を含むか、又はそれからなる。ある特定の例示的であるが、非限定的な実施形態では、CD8膜貫通ドメインは、核酸配列ATCTACATCT GGGCGCCCTT GGCCGGGACT TGTGGGGTCC TTCTCCTGTC ACTGGTTATC ACCCTTTACT GC(配列番号75)によりコードされ得る。

【0524】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、CD8 α ヒンジドメインを含むか、又はそれからなる場合がある。例示的であるが、非限定的な一実施形態では、CD8 α ヒンジドメインは、アミノ酸配列 Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Glyl Ala Val Hhis Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr(配列番号76)を含むか、又はそれからなる。ある特定の例示的であるが、非限定的な実施形態では、CD8 α ヒンジドメインは、核酸配列 ACCACGACGC CAGCGCCGCG ACCACCAACA CCGGCGCCCA CCATCGCGTC GCAGCCCCTG TCCCTGCGCC CAGAGGCGTG CCGGCCAGCG GCGGGGGGCG CAGTGCACAC GAGGGGGCTG GACTTCGCCT G TGAT(配列番号77)によりコードされ得る。

【0525】

細胞質ドメイン

CARの細胞質ドメイン又はそうでなければ細胞内シグナルドメインは、CARが入れられた免疫細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも1つの活性化の要因である。「エフェクター機能」という用語は、細胞の特殊化機能を指す。例えば、T細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性又はサイトカインの分泌を含むヘルパー活性であり得る。したがって、「細胞内シグナルドメイン」という用語は、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞が特殊化機能を行うことをもたらすタンパク質の部分に指す。通常、細胞内シグナルドメインの全体が使用され得るが、多くの場合、鎖全てを使用する必要はない。細胞内シグナルドメインのトランケートされた部分の使用される点で、かかるトランケートされた部分は、それがエフェクター機能シグナルを伝達する限り、インタクトな鎖の代わりに使用することができる。細胞内シグナルドメインという用語はしたがって、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な細胞内シグナルドメインの任意のトランケートされた部分を含むことを意味する。

【0526】

CARにおける使用のための細胞内シグナルドメインの例示的であるが、非限定的な例は、T細胞受容体(TCR)及び抗原受容体嵌合後にシグナル伝達を開始することと一致して働く共受容体の細胞質配列、並びにこれらの配列の任意の誘導体又は変形及び同じ機能を有する任意の合成配列を含み得る。

【0527】

TCR単独を通して発生するシグナルは多くの場合、T細胞の完全な活性化には不十分であること及び二次シグナル又は共刺激シグナルも必要とされることが公知である。したがって、T細胞活性化は、2つの明確なクラスの細胞質シグナル配列:TCRを通して抗原依存的な一次活性化を開始するもの(一次細胞質シグナル配列)及び抗原非依存的様式で働いて二次シグナル又は共刺激シグナルを提供するもの(二次細胞質シグナル配列)により媒介されることができる。

【0528】

一次細胞質シグナル配列は、刺激様式又は阻害様式のいずれかで、TCR複合体の一次活性化を調節する。刺激様式で働く一次細胞質シグナル配列は、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ又はITAM(immunoreceptor tyrosine-based activation motif)として公知のシグナルモチーフを含有し得る。

【0529】

本明細書の発明で企図されるCARにおける特定の使用のものである一次細胞質シグナル配列を含有するITAMの例示的であるが、非限定的な例は、TCRゼータ、Fc γ ガンマ、Fc ϵ ベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b及びCD66dに由来するものを含む。本発明のCARにおける細胞質シグナル分子がCD3ゼータに由来する細胞質シグナル配列を含むことは特に好ましい。

【0530】

例示的であるが、非限定的な一実施形態では、CARの細胞質ドメインは、それ自体CD3ゼータシグナルドメインを含むように設計してもよく、又はCARとの関連で有用な任意の他の所望の細胞質ドメインと組み合わせてもよい。例えば、CARの細胞質ドメインは、CD3ゼ

10

20

30

40

50

ータ鎖部分及び共刺激シグナル領域を含んでもよい。共刺激シグナル領域は、共刺激分子の細胞内ドメインを含むCARの一部を指す。共刺激分子は、リンパ球の抗原への効率的な応答に必要とされる、抗原受容体又はそれらのリガンド以外の細胞表面分子である。かかる分子の例として、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3及びCD83に特異的に結合するリガンド等が挙げられるが、これらに限定されない。例示的な一実施形態では、共刺激シグナルエレメントは、4-1BBを含む。

【0531】

CARの細胞質シグナル部分内の細胞質シグナル配列は、ランダムな順序又は特定の順序で互いに連結することができる。任意選択で、短い、例えば長さが2～約10個のアミノ酸のオリゴペプチド又はポリペプチドリンカーは、連結を形成することができる。ある特定の

10

【0532】

例示的であるが、非限定的な一実施形態では、細胞質ドメインは、CD3ゼータのシグナルドメイン及びCD28のシグナルドメインを含むように設計される。別の実施形態では、細胞質ドメインは、CD3ゼータのシグナルドメイン及び4-1BBのシグナルドメインを含むように設計される。また別の実施形態では、細胞質ドメインは、CD3ゼータのシグナルドメイン並びにCD28及び4-1BBのシグナルドメインを含むように設計される。

【0533】

一実施形態では、本発明のCARの細胞質ドメインは、4-1BBのシグナルドメイン及びCD3ゼータのシグナルドメインを含むように設計され、4-1BBのシグナルドメインは、アミノ酸配列Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly gly cys Glu Leu(配列番号78)を含むか、若しくはそれからなり、及び/又はCD3ゼータのシグナルドメインは、アミノ酸配列Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg(配列番号79)を含むか、若しくはそれからなる。

20

30

【0534】

例示的であるが、非限定的な一実施形態では、4-1BBのシグナルドメインは、配列AAACGGGGCA GAAAGAACT CCTGTATATA TTCAAACAAC CATTTATGAG ACCAGTACAA ACTACTCAAG AGGAAGATGG CTGTAGCTGC CGATTTCCAG AAGAAGAAGA AGGAGGATGT GAACTG(配列番号80)を含むか、又はそれからなる核酸配列によりコードされる。例示的であるが、非限定的な一実施形態では、CD3ゼータのシグナルドメインは、配列AGAGTGAAGT TCAGCAGGAG CGCAGACGCC CCCGCGTACA AGCAGGGCCA GAACCAGCTC TATAACGAGC TCAATCTAGG ACGAAGAGAG GAGTACGATG TTTTGGACAA GAGACGTGGC CGGGACCCTG AGATGGGGG AAAGCCGAGA AGGAAGAACC CTCAGGAAGG CCTGTACAAT GAACTGCAGA AAGATAAGAT GCGGAGGCC TACAGTGAGA TTGGGATGAA AGGCGAGCGC(配列番号81)を含むか、又はそれからなる核酸によりコードされる。

40

【0535】

上記実施形態は、例示であり、非限定的である。本明細書で提供される教示を使用して、ALPPP及び/又はALPPL2を対象とする多くのCARは、当業者に入手可能である。

【0536】

ベクター

様々な実施形態では、本明細書に記載するCARの配列を含むDNA構築物が提供される。ある特定の実施形態では、CARは、抗体M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtL

50

C、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA及び/又はM25wtLFにより結合されるALPPに、及び/若しくはALPPL2に、並びに/又はALPP及び/若しくはALPPL2のドメインに特異的に結合する抗原結合性部分を含み、抗原結合性部分の核酸配列は、細胞内ドメインの核酸配列に作動可能に連結される。本発明のCARで使用することができる例示的な細胞内ドメインとして、CD3ゼータ、CD28、4-1BB等の細胞内ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。一部の場合、CARは、CD3ゼータ、CD28、4-1BB等の任意の組合せを含み得る。

【0537】

一実施形態では、本発明のCARは、抗ALPP/ALPPL2 scFv(例えばM25AD、M25ADX、M25等)、ヒトCD8ヒンジ及び膜貫通ドメイン並びにヒト4-1BB及びCD3ゼータシグナルドメインを含む。

10

【0538】

所望の分子をコードする核酸配列は、本分野で公知の組換え法を使用して、例えば標準の技術を使用して、遺伝子を発現する細胞からのライブラリーをスクリーニングすることにより、同様のものを含むことが知られるベクターから遺伝子を派生させることにより、又は同様のものを含有する細胞及び組織から直接単離することにより得ることができる。或いは、目的の遺伝子は、クローニングではなく、合成で生成することができる。

【0539】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載するCARをコードする核酸配列が挿入されたベクターが提供される。レトロウイルス、例えばレンチウイルスに由来するベクターは、導入遺伝子の長期安定統合及び娘細胞でのその増殖を可能にするので、長期遺伝子移行を達成するための好適なツールである。レンチウイルスベクターは、それらが非増殖性細胞、例えば肝細胞に形質導入することができる点で、オンコレトロウイルス、例えばマウス白血病ウイルスに由来するベクターに優る追加の利点を有する。また、それらは低免疫原性の追加の利点を有する。

20

【0540】

簡単に要約すると、CARをコードする天然又は合成核酸の発現は、CARポリペプチド又はその部分をコードする核酸をプロモーターに作動可能に連結し、構築物を発現ベクターに組み込むことにより達成することができる。ベクターは、複製及び統合真核生物に好適であり得る。典型的なクローニングベクターは、転写及び翻訳ターミネーター、開始配列並びに所望の核酸配列の発現の調節に有用なプロモーターを含有する。

30

【0541】

また、本明細書に記載する発現構築物は、標準の遺伝子送達プロトコルを使用して、核酸免疫化及び遺伝子療法に使用することができる。遺伝子送達の方法は、本分野で公知である(例えば米国特許第5,399,346号、同第5,580,859号及び同第5,589,466号を参照のこと)。ある特定の実施形態では、遺伝子療法ベクターが提供される。

【0542】

CARをコードする核酸は、いくつかの種類のベクターにクローニングすることができる。例えば、核酸は、非限定的にプラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルス及びコスミドを含むベクターにクローニングすることができる。特定の目的のベクターは、発現ベクター、複製ベクター、プロンプ発生ベクター及びシークエンシングベクターを含む。

40

【0543】

ある特定の実施形態では、発現ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に提供することができる。ウイルスベクター技術は、本分野で周知であり、例えばSambrookら(2001年)、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory社、New Yorkで、並びに他のウイルス学及び分子生物学マニュアルで説明されている。ベクターとして有用なウイルスとして、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス及びレンチウイルス(自己不活性化レンチウイルスベクターを含む)が挙

50

げられるが、これらに限定されない。一般的に、好適なベクターは、少なくとも1つの生物で機能的な複製起源、プロモーター配列、便利な制限エンドスクレアーズ部位及び1つ又は複数の選択可能マーカ含有する(例えばW001/96584、W001/29058及び米国特許第6,326,193号を参照のこと)。

【0544】

いくつかのウイルスベースのシステムが、哺乳動物細胞への遺伝子移行のために開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達システムのための便利なプラットフォームを提供する。選択された遺伝子を、本分野で公知の技術を使用してベクターに挿入し、レトロウイルス粒子内に包装することができる。その後、組換えウイルスを単離し、インビボ又はエクスピボのいずれかで対象の細胞に送達することができる。いくつかのレトロウイルスシステムは、本分野で公知である。一部の実施形態では、アデノウイルスベクターが使用される。いくつかのアデノウイルスベクターは、本分野で公知である。一実施形態では、レンチウイルスベクターが使用される。

10

【0545】

追加のプロモーターエレメント、例えばエンハンサーは、転写開始の頻度を調節する。典型的に、これらは開始部位の30~110bp上流の領域に位置するが、いくつかのプロモーターは最近、開始部位の下流の機能エレメントも含有することが示されている。プロモーターエレメント間の間隔は多くの場合フレキシブルであり、そのため、プロモーター機能は、エレメントを反転させるか、又は互いに対して移動させたとき、保存される。チミジンキナーゼ(tk:thymidine kinase)プロモーターでは、プロモーターエレメント間の間隔は、50bp離れるまで増大してもよく、その後活性は低下し始める。プロモーターによって、個々のエレメントは転写を活性化するために協同して又は独立して機能し得るようである。

20

【0546】

好適なプロモーターの一例は、最初期サイトメガロウイルス(CMV:cytomegalovirus)プロモーター配列である。このプロモーター配列は、これに作動可能に連結された任意のポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を駆動することができる強い構成的プロモーター配列である。好適なプロモーターの別の例は、伸長増殖因子-1アルファ(EF-1 α :Elongation Growth Factor-1 α)である。しかしながら、また、非限定的にシミアンウイルス40(SV40:simian virus 40)初期プロモーター、マウス乳房腫瘍ウイルス(MMTV:mouse mammary tumor virus)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV:human immunodeficiency virus)末端反復配列(LTR:long terminal repeat)プロモーター、MoMuLVプロモーター、鳥類白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン・バーウイルス最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター並びにヒト遺伝子プロモーター、例えば非限定的にアクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター及びクレアチンキナーゼプロモーターを含む他の構成的プロモーター配列を使用してもよい。更に、構築物は、構成的プロモーターの使用に限定されず、誘導性及び/又は組織特異的プロモーターもまた企図される。誘導性プロモーターの使用は、それが作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現を、かかる発現が所望されるときにオンにするか、又は発現が所望されないときに発現をオフにすることができる分子スイッチを提供する。誘導性プロモーターの例として、メタロチオニンプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター及びテトラサイクリンプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0547】

ある特定の実施形態では、また、CARポリペプチド又はその部分の発現を査定するために、細胞に導入される発現ベクターは、ウイルスベクターを通してトランスフェクト又は感染されることが求められる細胞集団からの発現細胞の特定及び選択を促進するために、選択可能マーカ遺伝子若しくはレポーター遺伝子のいずれか又は両方を含有してもよい。他の態様では、選択可能マーカは、DNAの別々の片に入れられ、共トランスフェクション手技で使用してもよい。選択可能マーカ及びレポーター遺伝子の両方は、宿主細胞で発現を可能にする適切な調節配列に隣接してもよい。有用な選択可能マーカは、例え

50

ば抗生物質抵抗性遺伝子、例えばneo等を含む。

【0548】

レポーター遺伝子は、潜在的にトランスフェクトされた細胞を特定するために、及び調節配列の機能性を評価するために使用することができる。一般的に、レポーター遺伝子は、レシピエント生物若しくは組織に存在しないか、又はそれらにより発現されず、その発現がいくつかの容易に検出可能な特性、例えば酵素活性により表されるポリペプチドをコードする遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、DNAがレシピエント細胞に導入された後、好適な時間に査定される。好適なレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼをコードする遺伝子又は緑色蛍光タンパク質遺伝子を含み得る(例えばUi-Teiら(2000年)、FEBS Letts. 479、79~82頁)。好適な発現システムは周知であり、公知の技術を使用して調製するか、又は市販で得ることができる。一般的に、レポーター遺伝子の最も高レベルの発現を示す最小限の5'隣接領域を有する構築物は、プロモーターとして特定される。かかるプロモーター領域を、レポーター遺伝子に連結し、プロモーター駆動転写を調節する能力について薬剤を評価するために使用することができる。

10

【0549】

細胞に遺伝子を導入及び発現する方法は、本分野で公知である。発現ベクターに関して、ベクターは、本分野の任意の方法により容易に宿主細胞、例えば哺乳動物、細菌、酵母又は昆虫細胞に導入することができる。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的又は生物学的手段により宿主細胞に移行することができる。

20

【0550】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための物理的方法は、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、微粒子銃、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション等を含む。ベクター及び/又は外因性核酸を含む細胞を生成するための方法は、本分野で周知である(例えばSambrookら(2001年)、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory社、New Yorkを参照のこと)。ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための例示的であるが、非限定的な1つの方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションである。

【0551】

目的のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための生物学的方法は、DNA及びRNAベクターの使用を含み得る。ウイルスベクター、及びとりわけレトロウイルスベクターは、哺乳動物、例えばヒト細胞に遺伝子を挿入するための最も広く使用されている方法になっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスI型、アデノウイルス及びアデノ関連ウイルス等に由来し得る(例えば米国特許第5,350,674号及び同第5,585,362号等を参照のこと)。

30

【0552】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための化学的手段は、コロイド分散システム、例えば高分子複合体、ナノカプセル、マイクロソフィア、ビーズ並びに水中油エマルション、ミセル、混合ミセル及びリポソームを含む脂質ベースのシステムを含む。インビトロ及びインビボでの送達媒体としての使用のための例示的なコロイドシステムは、リポソーム(例えば人工膜ベシクル)である。

40

【0553】

非ウイルス送達システムが利用される場合、1つの例示的な送達媒体は、脂質及び/又はリポソームである。脂質製剤の使用は、(インビトロ、エクスピボ又はインビボでの)宿主細胞への核酸の導入のために企図される。別の態様では、核酸は脂質を伴い得る。脂質を伴う核酸は、リポソームの水性内部に被包され、リポソームの脂質二重層内に散在し、リポソーム及びオリゴヌクレオチドの両方を伴う連結分子を介してリポソームに結合し、リポソーム中に捕捉され、リポソームと複合体形成し、脂質を含有する溶液中に分散し、脂質と混合され、脂質と組み合わせられ、脂質中に懸濁液として含有され、ミセルに含有されるか、若しくはそれと複合体形成するか、又は別の方法で脂質を伴い得る。脂質、脂質/D

50

NA又は脂質/発現ベクター関連組成物は、溶液中の任意の特定の構造に限定されない。例えば、それらは、二層構造で、ミセルとして、又は「崩壊した」構造で存在し得る。また、それらは、単に溶液中に分散し、おそらくサイズ又は形状が均一でない凝集物を形成し得る。脂質は、天然又は合成脂質であり得る脂肪物質である。例えば、脂質は、細胞質で天然に起こる脂肪液滴並びに長鎖脂肪族炭化水素を含有する化合物のクラス及びそれらの誘導体、例えば脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール及びアルデヒドを含む。

【0554】

様々な実施形態では、使用のために好適な脂質は、市販の供給源から得ることができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン(「DMPC:dimyristyl phosphatidylcholine」)は、Sigma社、St. Louis, Mo.から得ることができ;リン酸ジセチル(「DCP:dicetyl phosphate」)は、K & K Laboratories社(Plainview, N.Y.)から得ることができ;コレステロール(「Choi:cholesterol」)は、Calbiochem-Behring社から得ることができ;ジミリスチルホスファチジルグリセロール(「DMPG:dimyristyl phosphatidylglycerol」)及び他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc.社(Birmingham, Ala.)から得ることができる。クロロホルム又はクロロホルム/メタノール中の脂質のストック溶液は、約-20℃で保存してもよい。クロロホルムは、メタノールより容易に蒸発するので、唯一の溶媒として使用することができる。「リポソーム」は、封入脂質二重層又は凝集物の発生により形成される様々な単層及び多層脂質媒体を包含する総称である。リポソームは、リン脂質二重層膜及び内部水性媒体を有するベシクル構造を有することを特徴とし得る。多層リポソームは、水性媒体により分離される多数の脂質層を有する。それらは、リン脂質が過剰の水溶液中に懸濁されたとき、自発的に形成する。脂質成分は、自己再配置を経て、その後閉鎖構造が形成され、脂質二重層の間に水及び溶解した溶質を捕捉する(Ghoshら(1991年)、Glycobiology 5、505~510頁)。しかしながら、正常なベシクル構造とは異なる溶液中の構造を有する組成物もまた包含される。例えば、脂質は、ミセル構造と推定するか、又は単に脂質分子の不均一凝集物として存在し得る。また、リポフェクトアミン-核酸複合体が企図される。

【0555】

外因性核酸を宿主細胞に導入するか、又は別の方法で細胞を本発明の阻害剤に曝露するために使用される方法にかかわらず、宿主細胞内の組換えDNA配列の存在を確認するために、様々なアッセイを行うことができる。かかるアッセイは、例えば当業者に周知の「分子生物学」アッセイ、例えばサザンブロット法及びノザンブロット法、RT-PCR及びPCR;「生化学」アッセイ、例えば免疫学的手段(ELISA及びウェスタンブロット法)により、又は本発明の範囲内に入る薬剤を特定するための本明細書に記載するアッセイにより例えば特定のペプチドの存在又は非存在を検出することを含む。

【0556】

免疫細胞の供給源

ある特定の実施形態では、本発明の本明細書に記載する免疫細胞(例えばT細胞)の増殖(expansion)及び遺伝子改変の前に、T細胞源を対象から得る。T細胞は、末梢血単核球、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織及び腫瘍を含むいくつかの供給源から得ることができる。本発明のある特定の実施形態では、本分野で入手可能な任意の数のT細胞株を使用してもよい。本発明のある特定の実施形態では、T細胞は、当業者に公知の任意の数の技術、例えばFICOLL(商標)分離を使用して対象から回収される一単位の血液から得ることができる。例示的な一実施形態では、個人の循環血液からの細胞はアフエレーシスにより得られる。アフエレーシス生成物は典型的に、T細胞、単球、顆粒球、B細胞を含むリンパ球、他の有核白血球、赤血球及び血小板を含有する。一実施形態では、アフエレーシスにより回収した細胞は、血漿画分を除去するために、及び細胞を次の加工工程のために適切な緩衝液又は媒体に入れるために洗浄してもよい。本発明の一実施形態では、細胞をリン酸緩衝液(PBS:phosphate buffered saline)で洗浄する。代替の実施形態では、洗浄溶液はカルシウムを欠き、かつマグネシウムを欠く場合があるか、又は全てではないとしても多くの二価カチオンを欠く場合がある。

ここでもまた、驚くべきことに、カルシウムの非存在下での初期活性化工程は、活性化の拡大をもたらし得る。当業者が容易に理解するように、洗浄工程は、当業者に公知の方法により、例えば製造業者の使用説明書に従って半自動化「フロースルー」遠心分離(例えばCobe 2991 cell processor、Baxter CytoMate又はHaemonetics Cell Saver 5)を使用することにより達成することができる。洗浄後、細胞を様々な生体適合性緩衝液、例えばCa²⁺非含有Mg²⁺非含有PBS、PlasmaLyte A又は緩衝液を伴う若しくは伴わない他の生理食塩水中に再懸濁してもよい。或いは、アフエレーシス試料の望ましくない成分を除去し、細胞を培養培地中に直接再懸濁してもよい。

【0557】

別の例示的な実施形態では、T細胞は、赤血球を溶解し、単球を枯渇させることにより、例えばPERCOLL(商標)勾配を通した遠心分離により、又は逆流遠心溶出法により末梢血リンパ球から単離される。T細胞の特定のサブ集団、例えばCD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺及びCD45RO⁺ T細胞は、更に陽性又は陰性選択技術により単離することができる。例えば、一実施形態では、T細胞を、所望のT細胞の陽性選択に十分な期間の抗CD3/抗CD28(すなわち3×28)コンジュゲートビーズ、例えばDYNABEADS(登録商標)M-450 CD3/CD28 Tとのインキュベーションにより単離する。例示的な一実施形態では、期間は約30分間である。ある特定の例示的な実施形態では、期間は、30分間～36時間又はそれよりも長く、かつその間の全ての整数値に及ぶ。ある特定の実施形態では、期間は、少なくとも1、2、3、4、5又は6時間である。また別の実施形態では、期間は10～24時間である。一実施形態では、インキュベーション期間は24時間である。より長いインキュベーション時間は、他の細胞種と比較してT細胞が少ししかない任意の状況で、例えば腫瘍組織から又は免疫無防備状態の個人から腫瘍浸潤リンパ球(TIL:tumor infiltrating lymphocyte)を単離することにおいて、T細胞を単離するために使用することができる。更に、より長いインキュベーション時間の使用は、CD8⁺ T細胞の捕獲の効率を増大することができる。このように、単に時間を短く、若しくは長くすることにより、T細胞をCD3/CD28ビーズに結合することが可能であり、及び/又はビーズのT細胞に対する比を増大若しくは減少させることにより(本明細書で更に記載する)、T細胞サブ集団を培養開始時若しくはプロセス中の他の時点で優先的に成否選択することができる。加えて、ビーズ又は他の表面上の抗CD3及び/又は抗CD28抗体の比を増大又は減少させることにより、T細胞サブ集団を、培養開始時又は他の所望の時点で優先的に成否選択することができる。当業者は、また、多ラウンドの選択を、本発明に関連して使用することができることを認識し得る。ある特定の実施形態では、選択手技を行い、活性化及び増殖プロセスで「非選択」細胞を使用することが望ましい場合がある。また、「非選択」細胞は、更なる選択ラウンドに供することができる。

【0558】

陰性選択によるT細胞集団の富化は、陰性選択される細胞に独特な表面マーカーに対する抗体の組合せで達成することができる。1つの方法は、陰性選択される細胞上に存在する細胞表面マーカーを対象とするモノクローナル抗体のカクテルを使用する陰性磁気免疫付着又はフローサイトメトリーによる細胞ソーティング及び/又は選択である。例えば、陰性選択によりCD4⁺細胞について富化するために、モノクローナル抗体カクテルは典型的に、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR及びCD8に対する抗体を含む。ある特定の実施形態では、典型的にCD4⁺、CD25⁺、CD62L^{hi}、GITR⁺及びFoxP3⁺を発現する調節T細胞について富化するか、又は陽性選択することが望ましい場合がある。或いは、ある特定の実施形態では、T調節細胞は、抗CD25コンジュゲートビーズ又は他の同様の選択方法により枯渇される。

【0559】

陽性又は陰性選択による所望の細胞集団の単離のために、細胞及び表面(例えばビーズ等の粒子)の濃度は変動し得る。ある特定の実施形態では、細胞とビーズとの最大限の接触を確実にするために、ビーズ及び細胞が共に混合される体積を顕著に減少させる(すなわち、細胞濃度を増大させる)ことが望ましい場合がある。例えば、一実施形態では、20億個の細胞/mlの濃度が使用される。一実施形態では、10億個の細胞/mlの濃度が使用され

る。別の実施形態では、1億個を超える細胞/mlが使用される。別の実施形態では、1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万又は5000万個の細胞/mlの細胞濃度が使用される。また別の実施形態では、7500万、8000万、8500万、9000万、9500万又は1億個の細胞/mlの細胞濃度が使用される。更なる実施形態では、1億2500万又は1億5000万個の細胞/mlの濃度を使用することができる。高濃度の使用は、細胞収率、細胞活性化及び細胞増殖の向上をもたらす得る。更に、高い細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞等の目的の標的抗原を弱く発現し得る細胞のより効率的な捕獲、又は多くの腫瘍細胞が存在する試料(すなわち、白血病血液、腫瘍組織等)からのより効率的な捕獲を可能にする。かかる細胞集団は、療法的価値を有する場合があります、得ることが望ましい場合がある。例えば、高濃度の細胞の使用は、通常、より弱いCD28発現を有するCD8⁺ T細胞のより効率的な選択を可能にする。

10

【0560】

別の実施形態では、より低濃度の細胞を使用することが望ましい場合がある。T細胞及び表面(例えばビーズ等の粒子)の混合物を顕著に希釈することにより、粒子と細胞との間の相互作用を最小限にする。これは、粒子に結合する所望の抗原を高い量で発現する細胞を選択する。例えば、CD4⁺ T細胞はより高いレベルのCD28を発現し、希釈濃度においてCD8⁺ T細胞より効率的に捕獲される。一実施形態では、使用される細胞濃度は、 5×10^6 /mlである。別の実施形態では、使用される濃度は、約 1×10^5 /ml～ 1×10^6 /ml及びその間の任意の整数値であり得る。

【0561】

20

ある特定の実施形態では、細胞は、2～10℃又は室温のいずれかで変動スピードにて変動する時間の長さの間、ローテータ上でインキュベートしてもよい。

【0562】

また、刺激のためのT細胞は、洗浄工程後に凍結してもよい。理論に束縛されるものではないが、凍結及び次の融解工程は、細胞集団中の顆粒球及びある程度まで単球を除去することにより、より均一な生成物を提供する。血漿及び血小板を除去する洗浄工程後、細胞を凍結溶液中に懸濁し得る。多くの凍結溶液及びパラメーターが本分野で公知であり、これに関連して有用であるが、1つの方法は、20%DMSO並びに8%ヒト血清アルブミンを含有するPBS、又は10%デキストラン40及び5%デキストロース、20%ヒト血清アルブミン並びに7.5%DMSO若しくは31.25%Plasmalyte-A、31.25%デキストロース5%、0.45%NaCl、10%デキス

30

【0563】

ある特定の実施形態では、凍結保存細胞を融解し、本明細書に記載するように洗浄し、本発明の方法を使用する活性化前に室温に1時間置く。

【0564】

また、本明細書に記載する増殖された細胞が必要とされ得る前の期間に、対象からの血液試料又はアフレーシス生成物の回収が企図される。このようにして、増殖される細胞の供給源は、必要な任意の時点で回収することができ、所望の細胞、例えばT細胞は、本明細書に記載するもの等のT細胞療法から利益を得る任意の数の疾患又は状態のためのT細胞療法における後の使用のために単離及び凍結される。一実施形態では、血液試料又はアフレーシスは、全般的に健康な対象から採取される。ある特定の実施形態では、T細胞は、後の時間に増殖、凍結及び使用することができる。ある特定の実施形態では、試料は、本明細書に記載する特定の疾患(例えば癌)の診断直後であるが、任意の治療前に患者から回収される。更なる実施形態では、細胞は、非限定的に化学療法、手術及び/又は放射線療法を含む任意の数の関連治療様式の前に対象からの血液試料又はアフレーシスから単離される。

40

50

【0565】

ある特定の実施形態では、T細胞は、治療後に直接対象から得られる。この点で、免疫系を損傷する薬物での特定の治療における、ある特定の癌治療後、患者が通常治療から回復し得る期間中の治療直後に、得られるT細胞の質がエキスピボで増殖する能力について最適であるか、又は改善されている場合があることが観察されている。このように、本明細書に記載する方法を使用したエキスピボ操作後、これらの細胞は、向上された生着及びインピボでの増殖について好ましい状態であり得る。したがって、本発明に関連して、この回復相中にT細胞、樹状細胞又は造血系統の他の細胞を含む血液細胞を回収することが企図される。更に、ある特定の実施形態では、動員(例えばGM-CSFでの動員)及び前処置レジメンは、対象において、とりわけ療法後の規定された時間ウィンドウ中に、特定の細胞種の再増殖、再循環、再生及び/又は増殖が好都合である状態を創出するために使用することができる。例示的な細胞種は、T細胞、B細胞、樹状細胞及び免疫系の他の細胞を含む。

10

【0566】

T細胞の活性化及び増殖

望ましいCAR(例えば本明細書に記載するCAR)を発現するためのT細胞の遺伝子改変の前であろうと、又は後であろうと、T細胞は、例えば米国特許第6,352,694号、同第6,534,055号、同第6,905,680号、同第6,692,964号、同第5,858,358号、同第6,887,466号、同第6,905,681号、同第7,144,575号、同第7,067,318号、同第7,172,869号、同第7,232,566号、同第7,175,843号、同第5,883,223号、同第6,905,874号、同第6,797,514号、同第6,867,041号及び米国特許公開公報第2006/0121005号に記載されている方法を一般的に使用して活性化及び増殖させることができる。

20

【0567】

様々な実施形態では、T細胞は、CD3/TCR複合体関連シグナルを刺激する薬剤及びT細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドを結合した表面との接触により増殖される。特に、T細胞集団は、本明細書に記載するように、例えば表面上に固定した抗CD3抗体若しくはその抗原結合性断片若しくは抗CD2抗体との接触により、又はカルシウムイオノフォアと共にタンパク質キナーゼCアクチベーター(例えばブリオスタチン)との接触により刺激することができる。T細胞表面上の補助分子の共刺激のために、補助分子に結合するリガンドを使用することができる。例えば、T細胞集団は、T細胞の増殖を刺激するために適切な条件下で、抗CD3抗体及び抗CD28抗体と接触することができる。CD4⁺ T細胞又はCD8⁺ T細胞のいずれかの増殖を刺激するために、抗CD3抗体及び抗CD28抗体が使用され得る。抗CD28抗体の例は、9.3、B-T3、XR-CD28(Diaclone社、Besancon、France)を含み、本分野で通常公知の他の方法と同様に使用され得る(例えばBergら(1998年)、Transplant Proc. 30(8)、3975~3977頁、1998年;Haanenら(1999年)、J. Exp. Med. 190(9)、1319~1328頁;Garlandら(1999年)、J. Immunol Meth. 227(1-2)、53~63頁等を参照のこと)。

30

【0568】

ある特定の実施形態では、T細胞の一次刺激シグナル及び共刺激シグナルは、様々なプロトコルにより提供され得る。例えば、各シグナルを提供する薬剤は、溶液中にあるか、又は表面に連結され得る。表面に連結される場合、これらの薬剤は、同じ表面に(すなわち、「シス」形成で)又は別々の表面に(すなわち、「トランス」形成で)連結され得る。或いは、1つの薬剤は表面に連結され、他の薬剤は溶液中にある場合がある。一実施形態では、共刺激シグナルを提供する薬剤は、細胞表面に結合され、一次活性化シグナルを提供する薬剤は、溶液中にあるか、又は表面に連結される。ある特定の実施形態では、両方の薬剤は、溶液中にあり得る。別の実施形態では、これらの薬剤は、可溶性形態であり、それから表面、例えばFc受容体若しくは抗体又はそれらの薬剤に結合する他の結合剤を発現する細胞に架橋結合され得る(例えば、本発明においてT細胞の活性化及び増殖における使用に企図される、人工抗原提示細胞(aAPC:artificial antigen presenting cell)について米国特許公開公報第2004/0101519号及び同第2006/0034810号を参照のこと)。

40

【0569】

50

一実施形態では、2つの薬剤は、同じビーズ上、すなわち、「シス」又は別々のビーズに、すなわち、「トランス」のいずれかで、ビーズ上に固定される。例として、一次活性化シグナルを提供する薬剤は、抗CD3抗体又はその抗原結合性断片であり、共刺激シグナルを提供する薬剤は、抗CD28抗体又はその抗原結合性断片であり、両方の薬剤は、同等の分子量で同じビーズに共固定される。一実施形態では、 $CD4^+$ T細胞増殖及びT細胞成長のためにビーズに結合される1:1の比の各抗体が使用される。ある特定の実施形態では、1:1の比を使用して観察される増殖と比較してT細胞増殖の増大が観察されるような、ビーズに結合される抗CD3:CD28抗体の比が使用される。特定の一実施形態では、1:1の比を使用して観察される増殖と比較して約1〜約3倍の増大が観察される。一実施形態では、ビーズに結合されるCD3:CD28抗体の比は、100:1〜1:100及びその間の全ての整数値に及ぶ。一態様では、抗CD3抗体より多い抗CD28抗体が粒子に結合される、すなわち、CD3:CD28の比は1未満である。ある特定の実施形態では、ビーズに結合される抗CD28抗体の抗CD3抗体に対する比は2:1を超える。特定の一実施形態では、ビーズに結合される抗体の1:100のCD3:CD28の比が使用される。別の実施形態では、ビーズに結合される抗体の1:75のCD3:CD28の比が使用される。更なる実施形態では、ビーズに結合される抗体の1:50のCD3:CD28の比が使用される。別の実施形態では、ビーズに結合される抗体の1:30のCD3:CD28の比が使用される。好ましい一実施形態では、ビーズに結合される抗体の1:10のCD3:CD28の比が使用される。別の実施形態では、ビーズに結合される抗体の1:3のCD3:CD28の比が使用される。また別の実施形態では、ビーズに結合される抗体の3:1のCD3:CD28の比が使用される。

【0570】

ある特定の実施形態では、1:500〜500:1及びその間の任意の整数値の、粒子の細胞に対する比が、T細胞又は他の標的細胞を刺激するために使用することができる。当業者が容易に理解し得るように、粒子の細胞に対する比は、標的細胞に対する粒径に依存し得る。例えば、小サイズのビーズは、数個の細胞のみを結合するが、より大きなビーズは、多くを結合し得る。ある特定の実施形態では、細胞の粒子に対する比は1:100〜100:1及びその間の任意の整数値に及び、更なる実施形態では、比は1:9〜9:1及びその間の任意の整数値を含み、また、T細胞を刺激するために使用され得る。T細胞刺激をもたらす、抗CD3及び抗CD28連結粒子のT細胞に対する比は、上記に示すように変動し得るが、しかしながら、ある特定の好ましい値は、1:100、1:50、1:40、1:30、1:20、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1及び15:1を含み、1つの好ましい比はT細胞当たり少なくとも1:1の粒子である。一実施形態では、1:1又はそれ未満の、粒子の細胞に対する比が使用される。特定の一実施形態では、好ましい粒子:細胞の比は1:5である。更なる実施形態では、粒子の細胞に対する比は、刺激の日によって変動し得る。例えば、一実施形態では、粒子の細胞に対する比は、初日に1:1〜10:1であり、その後、追加の粒子が毎日又は1日おきに最大10日間細胞に追加され、最終的な比は1:1〜1:10である(追加の日の細胞カウントに基づいて)。特定の一実施形態では、粒子の細胞に対する比は、刺激の初日に1:1であり、刺激3日目及び5日目に1:5に調節される。別の実施形態では、粒子は、刺激の初日に1:1並びに3日目及び5日目に1:5の最終的な比になるように毎日又は1日おきペースで追加される。別の実施形態では、粒子の細胞に対する比は、刺激の初日に2:1であり、刺激の3日目及び5日目に1:10に調節される。別の実施形態では、粒子は、刺激の初日に1:1並びに3日目及び5日目に1:10の最終的な比になるように毎日又は1日おきペースで追加される。当業者は、様々な他の比が本発明における使用に好適であり得ることを理解する。特に、比は、粒径に、並びに細胞サイズ及び種類によって変化する。

【0571】

ある特定の実施形態では、細胞、例えばT細胞を、薬剤でコーティングしたビーズと混合し、ビーズ及び細胞を続いて分離し、その後細胞を培養する。代替の実施形態では、培養前に、薬剤でコーティングしたビーズ及び細胞を分離しないが、共に培養する。更なる実施形態では、ビーズ及び細胞を、最初に力、例えば磁力の適用により濃縮し、細胞表面マーカーのライゲーシオンの増大をもたらし、これにより細胞刺激を誘発する。

【0572】

例として、細胞表面タンパク質は、抗CD3及び抗CD28が結合した常磁性ビーズ(3×28ビーズ)をT細胞と接触させることによりライゲートされ得る。一実施形態では、細胞(例えば $10^4 \sim 10^9$ 個のT細胞)及びビーズ(例えば1:1の比のDYNABEADS(登録商標)M-450 CD3/CD28 T常磁性ビーズ)を、緩衝液、例えばPBS(二価カチオン、例えばカルシウム及びマグネシウムを含まない)中で混合する。

【0573】

ここでもまた、当業者は、任意の細胞濃度が使用され得ることを容易に理解し得る。例えば、標的細胞は試料中で非常に稀であり、試料の0.01%のみを構成してもよく、又は試料全体(すなわち、100%)が目的の標的細胞を含んでもよい。したがって、任意の細胞数が、本発明に関連する。ある特定の実施形態では、細胞及び粒子の最大限の接触を確実にするために、粒子及び細胞が共に混合される体積を顕著に減少させる(すなわち、細胞濃度を増大させる)ことが望ましい場合がある。例えば、一実施形態では、約20億個の細胞/mlの濃度が使用される。別の実施形態では、1億個を超える細胞/mlが使用される。更なる実施形態では、1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万又は5000万個の細胞/mlの細胞濃度が使用される。また別の実施形態では、7500万、8000万、8500万、9000万、9500万又は1億個の細胞/mlの細胞濃度が使用される。更なる実施形態では、1億2500万又は1億5000万個の細胞/mlの濃度を使用することができる。高濃度の使用は、細胞収率、細胞活性化及び細胞増殖の向上をもたらし得る。更に、高い細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞等の目的の標的抗原を弱く発現し得る細胞のより効率的な捕獲を可能にする。ある特定の実施形態では、かかる細胞集団は、療法的価値を有する場合があり、得ることが望ましい場合がある。例えば、高濃度の細胞の使用は、通常はより弱いCD28発現を有するCD8⁺ T細胞のより効率的な選択を可能にする。

【0574】

例示的な一実施形態では、混合物は、数時間(約3時間)～約14日又はその間の任意の1時間単位の整数値の間、培養され得る。別の実施形態では、混合物は、21日間培養され得る。一実施形態では、ビーズ及びT細胞は、約8日間共に培養される。別の実施形態では、ビーズ及びT細胞は、2～3日間共に培養される。また、T細胞の培養時間が60日又はそれより多くなり得るように、数周期の刺激が所望され得る。T細胞培養に適切な条件は、血清(例えばウシ胎児血清又はヒト血清)、インターロイキン-2(IL-2)、インスリン、IFN-ガンマ、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF- β 及びTNF- α 又は当業者に公知の細胞増殖のための任意の他の添加剤を含む増殖及び生存に必要な因子を含有し得る適切な培地(例えばMinimal Essential Media若しくはRPMI Media 1640又はX-vivo 15(Lonza社))を含む。細胞増殖のための他の添加剤として、界面活性剤、プラスマネート及び還元剤、例えばN-アセチル-システイン及び2-メルカプトエタノールが挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、培地は、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15、X-Vivo 20等を含み得る。アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム及びビタミンを添加した、血清を含有しないか、又は適切な量の血清(又は血漿)若しくは規定された組のホルモン並びに/若しくはT細胞の増殖及び増殖に十分な量のサイトカインで補充されたオプティマイザーが含まれ得る。抗生物質、例えばペニシリン及びストレプトマイシンは、実験培養物中にのみ含まれてもよく、対象に注入される細胞培養物中には含まれない。標的細胞は増殖を支持するのに必要な条件、例えば適切な温度(例えば37°C)及び大気(例えば空気+5%CO₂)下で維持される。

【0575】

様々な刺激時間に曝露されたT細胞は、様々な特徴を示し得る。例えば、典型的な血液又はアフエレーシスした末梢血単核細胞生成物は、細胞傷害性又はサプレッサーT細胞集団(T_C, CD8⁺)より多い、ヘルパーT細胞集団(T_H, CD4⁺)を有する。CD3及びCD28受容体を刺激することによるT細胞のエキスピボ増殖は、約8～9日前には主にT_H細胞からなるT細胞集団を生成するが、約8～9日後に、このT細胞集団はますます多いT_C細胞集団を含む。したがって、治療目的によって、主にT_H細胞を含むT細胞集団を対象に注入することは、有益

であり得る。同様に、抗原特異的なT細胞のサブセットが単離されている場合、このサブセットをより多く増殖させることは有益であり得る。

【0576】

更に、CD4及びCD8マーカーに加えて、他の表現型マーカーは、細胞増殖プロセスの過程に顕著であるが、大部分では再現性よく変動する。したがって、かかる再現性は、特定の目的のために活性化T細胞生成物を適合させる能力を可能にする。

【0577】

CARの治療的応用

様々な実施形態では、本明細書に記載するCARをコードするベクターを形質導入した細胞が提供される。例示的な一実施形態では、レンチウイルスベクター(LV:lentiviral vector)を形質導入したT細胞が提供され、LVは本明細書に記載する抗ALPP/ALPPL2 CARをコードする。それゆえ、一部の場合、形質導入したT細胞は、CAR媒介T細胞応答を誘発し得る。

10

【0578】

ある特定の実施形態では、一次T細胞の特異性を腫瘍抗原に向け直すためのCARの使用が提供される。したがって、哺乳動物に本明細書に記載するCARを発現するT細胞を投与する工程を含む、標的細胞集団又は哺乳動物における組織に対するT細胞媒介免疫応答を刺激するための方法が提供される。

【0579】

ある特定の実施形態では、細胞療法の方法が提供され、この細胞療法は、本明細書に記載するCARを発現するように遺伝子改変した細胞(例えば免疫調節細胞、例えばT細胞)を利用し、CAR発現細胞(例えばCAR T細胞)は、それを必要とするレシピエントに注入される。注入された細胞は、レシピエントにおいて癌細胞、特にALPP及び/又はALPPL2を発現する癌細胞(例えば中皮腫、精巣癌、子宮内膜癌並びに卵巣、膵臓及び非小細胞肺癌のサブセット)を死滅させることができる。抗体療法とは異なり、CAR T細胞は、インビボで複製することができ、維持腫瘍制御をもたらし得る長期持続性をもたらす。

20

【0580】

一実施形態では、本明細書に記載するCAR T細胞は、強固なインビボT細胞増殖を経てもよく、延長された時間持続することができる。別の実施形態では、本明細書に記載するCAR T細胞は、任意の追加の腫瘍形成又は増殖を阻害するために再活性化され得る特異的記憶T細胞に進化する。例えば、ある特定の実施形態では、CAR T細胞は、強固なインビボT細胞増殖を経て、血液及び骨髄中で延長された時間、高レベルで持続し、特異的記憶T細胞を形成し得る。任意の特定の理論に束縛されるものではないが、CAR T細胞はインビボで、代理抗原を発現する標的細胞との遭遇及び続く除去に際して、中央記憶装置様状態に分化することができる。

30

【0581】

任意の特定の理論に束縛されるものではないが、CAR改変T細胞により誘発される抗腫瘍免疫応答は、能動的免疫応答であっても、又は受動的免疫応答であってもよい。加えて、CAR媒介免疫応答は、CAR改変T細胞がCARにおける抗原結合性部分に特異的な免疫応答を誘発する養子免疫療法アプローチの部分であってもよい。例えば、抗ALPP/ALPPL2 CAR細胞は、癌細胞ALPPL2に対して特異的な免疫応答を誘発する。

40

【0582】

治療され得る癌は、M25ADLF、M25ADLFEG、M25ADLFDS、M25FYIA、M25FYIAEG、M25FYIADS、M25、M25EG、M25DS、M25AELF、M25AELFEG、M25AELFDS、M25ADL99P、M25ADL99G、M25ADS95R、M25ADD28G、M25ADS91G、M25ADY93H、M25ADYHSRLF、M25GRITSGFYGDwtLC、M25FSITSGFYGDwtLC、M253018IA、M253018LF、M25AD、M25ADX、ALPPL2rd3_1、ALPPL2rd3_2、M25AGIA、M25AGLF、M25ASIA、M25ASLF、M25ASwt、M25AVIA、M25AVLF、M25ALIA、M25ALLF、M25wtIA及び/又はM25wtLF抗体が特異的に結合するALPP及び/若しくはALPPL2又はこれらの断片を発現又は過剰発現する任意の癌を含む。

【0583】

50

治療され得る癌は、血管新生化されていないか、又はまだ実質的に血管新生化されていない腫瘍及び血管新生化された腫瘍を含む。癌は、非固形腫瘍を含んでもよく、若しくは固形腫瘍を含んでもよく、又は癌細胞(例えば癌幹細胞)を含んでもよい。本発明のCARで治療される癌の種類として、中皮腫、精巣癌、子宮内膜癌並びに卵巣、膵臓及び非小細胞肺癌のサブセットが挙げられるが、これらに限定されない。

【0584】

ある特定の実施形態では、また、本明細書に記載するCAR改変T細胞は、哺乳動物においてエキスピボ免疫化及び/又はインビボ療法のワクチンの種類として働き得る。ある特定の実施形態では、哺乳動物は非ヒト哺乳動物であり、他の実施形態では、哺乳動物はヒトである。

10

【0585】

エキスピボ免疫化について、以下のもの:i)細胞の増殖、ii)CARをコードする核酸を細胞に導入すること及び/又はiii)細胞の凍結保存のうちの少なくとも1つは、哺乳動物に細胞を投与する前にインビトロで起こり得る。

【0586】

エキスピボ手技は本分野で周知であり、以下により完全に説明する。簡単に述べると、細胞を哺乳動物(好ましくはヒト)から単離し、本明細書で開示するCARを発現するベクターで遺伝子改変する(すなわち、インビトロで形質導入又はトランスフェクトする)。CAR改変細胞を、哺乳動物レシピエントに投与して療法利益を提供することができる。ある特定の実施形態では、CAR改変細胞は、レシピエントについて自己由来であり得る。或いは、細胞は、レシピエントについて同種、同系又は異種であり得る。

20

【0587】

造血幹細胞及び前駆細胞のエキスピボ増殖に好適であるが、非限定的な手技は、米国特許第5,199,942号で説明されており、本明細書に記載する細胞に適用することができる。他の好適な方法は本分野で公知であり、方法は、エキスピボ細胞増殖の任意の特定の方法に限定されない。簡単に述べると、ある特定の実施形態では、エキスピボT細胞培養及び増殖は、(1)末梢血回収物又は骨髓外植片から哺乳動物からのCD34+造血幹細胞及び前駆細胞を回収する工程及び(2)かかる細胞をエキスピボで増殖させる工程を含む。米国特許第5,199,942号に記載する細胞増殖因子に加えて、他の因子、例えばflt3-L、IL-1、IL-3及びc-kitリガンドは、細胞培養及び増殖に使用することができる。

30

【0588】

ある特定の実施形態では、エキスピボ免疫化について細胞ベースのワクチンを使用することに加えて、また、対象においてALPP及び/又はALPPL2を提示する細胞を対象とする免疫応答を誘発するためのインビボ免疫化のための組成物及び方法が提供される。

【0589】

様々な実施形態では、本明細書に記載するCAR改変細胞は、単独で、又は希釈剤及び/若しくは他の成分、例えばIL-2若しくは他のサイトカイン若しくは細胞集団との組合せの医薬組成物として投与することができる。簡単に述べると、ある特定の実施形態では、医薬組成物は、1つ又は複数の薬学的又は生理学的に許容される担体、希釈剤又は賦形剤との組合せで、本明細書に記載する標的細胞集団を含み得る。かかる組成物は、緩衝液、例えば中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水等、炭水化物、例えばグルコース、マンノース、ショ糖又はデキストラン、マンニトール、タンパク質、ポリペプチド又はアミノ酸、例えばグリシン、抗酸化剤、キレート剤、例えばEDTA又はグルタチオン、補助剤(例えば水酸化アルミニウム)、及び保存剤を含み得る。ある特定の実施形態では、CAR改変細胞を含む組成物は、静脈内投与のために配合される。

40

【0590】

本発明の医薬組成物は、治療(又は予防)される疾患に適切な様式で投与され得る。投与の量及び頻度は、患者の状態並びに患者の疾患の種類及び重症度等の要因により決定されるが、適切な投与量は臨床試験により決定され得る。

【0591】

50

「免疫学的有効量」、「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」又は「療法量」が示される場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、患者(対象)の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染又は転移の程度及び状態の個々の差を考慮して医師が決定することができる。一般的に、本明細書に記載するT細胞を含む医薬組成物は、 $10^4 \sim 10^9$ 個の細胞/体重kg、好ましくは $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞/体重kg及びそれらの範囲内の全ての整数値を含む投与量で投与することができるということができる。また、T細胞組成物は、これらの投与量で多数回投与してもよい。細胞は、免疫療法で通常公知の注入技術を使用することにより投与することができる(例えばRosenbergら(1988年)、New Eng. J. Med. 319、1676頁を参照のこと)。特定の患者についての最適投与量及び治療レジメンは、疾患の徴候について患者をモニタリングし、それに従って治療を調節することにより医薬分野の当業者により容易に決定することができる。

10

【0592】

ある特定の実施形態では、対象に活性化T細胞を投与し、その後続いて再び採血し(又はアフエレーシスを行い)、本明細書に記載するようにそれからT細胞を活性化し、これらの活性化及び増殖されたT細胞を患者に再注入することが望ましい場合がある。ある特定の実施形態では、このプロセスは、数週間毎に多数回行ってよい。ある特定の実施形態では、T細胞は、10cc~400ccの採血から活性化することができる。ある特定の実施形態では、T細胞は、20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc又は100ccの採血から活性化される。理論に束縛されるものではないが、この多数回採血/多数回再注入プロトコルを使用することは、ある特定のT細胞集団を選択するように働き得る。

20

【0593】

対象組成物の投与は、エアロゾル吸入、注射、摂取、輸注、埋め込み又は移植によるものを含む任意の便利な様式で行うことができる。本明細書に記載する組成物は、皮下で、皮内で、腫瘍内で、結節内で、髄内で、筋肉内で、静脈内(i.v.:intravenous)注射により又は腹腔内で患者に投与することができる。一実施形態では、本発明のT細胞組成物は、皮内又は皮下注射により対象に投与される。別の実施形態では、本発明のT細胞組成物は好ましくは、i.v.注射により投与される。ある特定の実施形態では、T細胞組成物は、腫瘍、リンパ節又は感染部位に直接注射することができる。

【0594】

対象に投与される上記治療の投与量は、治療される状態及び治療のレシピエントの正確な性質により変動する。ヒト投与のための投与量の拡大縮小は、本分野で許容される実施に従って行うことができる。

30

【実施例】

【0595】

以下の実施例は、請求される発明を限定するためではなく、例示するために提供される。

【0596】

(実施例1)

本願発明者らは、現存の腫瘍細胞及び天然組織微小環境に存在している原位置の腫瘍細胞に高い特異性で結合するヒトモノクローナル抗体を特定するためにサブトラクティブファージ抗体ディスプレイライブラリー選択を以前に使用した。不治の奇病である中皮腫についての本願発明者らの研究で、本願発明者らは、中皮腫細胞株及び組織に特異的に結合するが、研究した任意の他の細胞株には結合しない新しい抗体を特定した。

40

【0597】

正常組織上の標的抗原発現を更に特徴付けるために、本願発明者らは、scFvに由来するIgG1をビオチン標識し、療法抗体評価のために30個の器官の90個のコア(三重)を含有する正常ヒト組織のFDA標準パネルを染色した。本願発明者らは、胎盤栄養芽層を除いて全ての正常ヒト組織について染色がなかったことを発見した(Table 2(表2))。

【0598】

【表 2】

Table 2(表2)。正常ヒト組織についての免疫組織化学(IHC:Immunohistochemistry)。N:二次的な唯一の対照と比較して染色なし又は染色の変化なし。++++:強い染色。ビオチン標識M25 IgG1を研究で使用した。

組織名称	染色	組織名称	染色	組織名称	染色
リンパ節	N	卵巣	N	小腸	N
骨格筋	N	脾臓	N	末梢神経	N
前立腺	N	唾液腺	N	子宮	N
腎臓	N	脳下垂体	N	小脳	N
肝臓	N	胎盤	++++	大脳	N
肺	N	皮膚	N	精巣	N
胃	N	脊髄	N	胸腺	N
食道	N	脾臓	N	甲状腺	N
心臓	N	結腸	N	尿管	N
子宮頸部	N	平滑筋	N		

10

【0599】

20

この鋭敏な特異性から、本願発明者らは、免疫沈降及び質量分析により標的抗原を特定した。抗原をALPPL2として特定し、標的陰性細胞株(HEK293a)におけるALPPL2 cDNAの異所性発現により確認した。ALPPL2は、胎盤栄養芽層で発現する2つの密接に関連したイソ型(ALPPL2及びALPP)並びに2つの広範に発現するメンバーALPL(組織非特異的、肝臓/骨/腎臓)及びALPI(腸)からなるアルカリホスファターゼ(AP:alkaline phosphatase)ファミリーのメンバーである。本願発明者らのM25抗体は、胎盤で発現するALPPL2(及びALPP)に特異的に結合するが、胎盤外で発現するALPL及びALPIには特異的に結合しない。

【0600】

興味深いことに、可溶性抗原を使用する競合的FACSからの本願発明者らの予備データは、本願発明者らの抗体が細胞表面形に優先的に結合し、抗原脱落に関係する一部を緩和する可能性があることを示唆する。この現象は調査中であり、特定の理論に束縛されるものではないが、ALPPL2は、細胞表面上で安定なダイマーとして存在する(APファミリーの通常の特性)が、あれば弱いモノマー-モノマー相互作用を安定化する膜関係の欠如のために溶液中ではあまり安定なダイマーとして存在せず、このことは膜ALPPL2への本願発明者らの抗体による結合活性ベースの優先的結合をもたらすと考えられる。本願発明者らの抗体は、組換え可溶性タンパク質とは反対に、現存腫瘍細胞のファージディスプレイライブラリーから選択したことが指摘されるべきであり、したがって、この抗体がこの新しい特性を有することは全く意外なことではない場合がある。

30

【0601】

抗原の特定により、本願発明者らはパラフィン包埋腫瘍組織について免疫組織化学(IHC)試験を行うことが可能になった。本願発明者らは、この抗原が中皮腫、精巣癌、子宮内膜癌並びに卵巣、脾臓及び非小細胞肺癌のサブセットにおいて広範に発現されていることを発見した。また、本願発明者らは、組換え細胞外ドメイン(ECD:extracellular domain)-Fc融合分子を発生させ、それを、新しく創出した細胞表面結合剤富化酵母抗体ディスプレイライブラリーからFACSにより追加の高親和性抗体を選択するために使用した。本願発明者らは、IgG1形態で28pの明らかな親和性にて腫瘍細胞に結合するM25、M25ADのバリエーションを特定した。

40

【0602】

標的抗原及び本願発明者らの抗体の鋭敏な腫瘍特異性により、新しい標的化療法及び免疫療法の開発が可能になると考えられる。本願発明者らは既に、モノメチルオーリスタチ

50

ンF(MMAF:monomethyl auristatin F)をM25AD IgG1にコンジュゲートすることによりADCを開発し、インビトロ(図2)及びインビボ(図3)で抗腫瘍活性を示した。また、本願発明者らは、モノメチルオーリスタチンE(MMAE:monomethyl auristatin E)を使用してM25AD ADCを構築し、3mg/kgの用量でインビボにて中皮腫異種移植片の強い阻害を得た(図4)。

【0603】

中皮腫細胞に加えて、本願発明者らは、膵臓癌株Capan-1及び非小細胞肺癌株H1661を含むいくつかの他の腫瘍細胞株で細胞表面ALPPL2発現を発見し(図5)、卵巢癌株についての研究は進行中である。M25AD-MMAF及びM25AD-MMAEの両方は、インビトロで膵臓及び非小細胞肺癌細胞株の増殖を強力に阻害する(図6)。更なるインビボでの確認は係属中であるが、新しい抗ALPPL2 ADC及び本願発明者らのALPPL2標的化策は全般的に、緊急の臨床要求を有する多数の不治の癌に適用可能であると考えられる。

10

【0604】

ADCに加えて、腫瘍抗原の高い腫瘍特異性は、様々な形態の標的化免疫療法、例えば腫瘍部位でT細胞を補充及び活性化する二重特異性抗体並びに他のプラットフォーム、例えばキメラ抗原受容体を人工的に組み込んだT細胞(CAR-T)及び免疫サイトカインの開発を可能にする。

【0605】

例示的であるが、非限定的な一実施形態では、新しいALPPL2/CD3二重特異性抗体が生成される。標的抗原の非常に限定された発現パターンのために、オンターゲット毒性は、最小限であると予測される。腫瘍細胞表面上での高レベルの抗原発現と組み合わせて、広範な療法ウィンドウが予測される。この二重特異性剤は、純粋に生体性であり、開発及び製造のための比較的単純な形態を示す。

20

【0606】

様々な実施形態では、2つの生体療法薬候補物質が企図される。(1)本願発明者らが予備研究を行い、インビトロ及びインビボ抗腫瘍活性を示したADC。DNAキレート剤及びリンカーを含む追加のペイロードは、療法指数を最適化するために試験してもよく、最も優れた候補物質はIND可能化研究に進むことができる。(2)腫瘍特異性抗原ALPPL2及びT細胞受容体CD3に対する二重特異性ヒト抗体の形態の標的化免疫療法。

【0607】

ALPPL2の鋭敏な腫瘍特異性は、単剤として臨床で持続的な応答を達成する可能性を有する新しいADCを開発する優れた機会を提示する。本願発明者らが既に有望な前臨床結果を得たオーリスタチン誘導体に加えて、より強い弾頭、例えばPBD(又は同様の強度を有する薬物)は、新しいADCを構築するために使用することができる。投薬研究は、中皮腫、膵臓癌、非小細胞肺癌及び卵巢癌の異種移植片を使用してインビボで行うことができる。

30

【0608】

加えて、二重特異性抗ALPPL2/CD3は、腫瘍特異的免疫活性化に企図される。DART又はBiTEプラットフォームを使用する抗ALPPL2/CD3二重特異性を創出することができる。プリナツモマブはFDAで承認されたBiTE療法剤であり、その抗CD3 scFv配列は入手可能であり、現在の標準の参照として使用することができる。追加の選択及びスクリーニングから単離された抗CD3 scFvは、この現在の標準に対する基準であり得る。

40

【0609】

加えて、ある特定の実施形態では、患者層別化のための抗原発現レベルの査定を可能にするIHCベースのバイオマーカーが企図される。例えば、ELISAベースのバイオマーカーアッセイは、血清ベースの試験により腫瘍状態の査定を可能にし得る。

【0610】

本明細書に記載する実施例及び実施形態は、単に例示の目的のためであり、これに照らした様々な改変又は変化が当業者に示唆され、本明細書の趣旨及び範囲並びに付属の特許請求の範囲内に含まれるべきであることが理解される。本明細書で引用する全ての出版物、特許及び特許出願は、全ての目的についてそれらの全体を参照により本明細書に組み込む。

50

【図 1】

UniProtKB - P05187 ALPP

```

10      20      30      40      50
MLGPCMLLLL LLLGLRLQLS LGIIPVEEN PDFWNRRAAE ALGAARKLQP
60      70      80      90     100
AQTAARKLLI FLGDGMVST VIAARIKQK KKKLGEELP LAMDRFPTVA
110     120     130     140     150
LSKTYNVDKH VEDSGATATA YLCGVKGNFQ TIGLSAARF NQCNTTREGNE
160     170     180     190     200
VISVMNRRAK AGKSVGVVTT TRVQHASPAQ TYAHTVNRNW YSDADVPAASA
210     220     230     240     250
RQEGCQDIAT QLISNMDIDV ILGGGRKMYF RMGTDPDETF DDYSQGGTREL
260     270     280     290     300
DGRNLVQEWL AKRQGARYVW NRTELMQASL DPSVTHLMGL FEPGDMKYEI
310     320     330     340     350
HRDSTLDPSL MEMTEAALRL LSRNPRGFEL FVEGGRIDHG HHESRAYRAL
360     370     380     390     400
TETIMFDQAI ERAGQLTSEE DTLSLVITADH SHVFSFGGTF LRSSIFGLA
410     420     430     440     450
PGKARDRKAY TVLLYNGGPG VVLKDGARPD VTESESGSFE YRQQAVALPD
460     470     480     490     500
EETHAGEDVA VFARGPQAHV VHGVEQTFI AHVMAFAACL EPTTACDLAP
510     520     530
PAGTTDAAPR GRSVVFALLP LLAGTILLILE TATAP

```

UniProtKB - P10696 ALPPL2

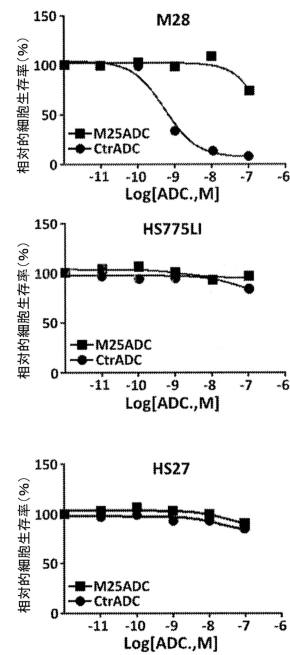
```

10      20      30      40      50
MQGPWVILLL GLRLQLSLGI IPVEEENPFF WNRQAALAG AAKKLQPAQT
60      70      80      90     100
AAKNLIIFLG DGMGVSTVTA ARILKQKKD KLGPETILAM DRFPYVALSK
110     120     130     140     150
TYSVDKHVFD SGATATAYLC GVKGNFQTIG LSAAARFNQC NTTRGNEVIS
160     170     180     190     200
VMNRRAKRAK SVGVVTTTRV QHASPAQAYA HTVNRNWTSD ADVPASARGE
210     220     230     240     250
GCQDIATQLI SNMMDIVILG GGRKYMFFMG TPDPEYDDY SQGGTRLDGK
260     270     280     290     300
NLVQEWLAKH QGARYVNNRT ELIQLASLDPS VTHLMGLFEP GDMKYETHRD
310     320     330     340     350
STLDPSLMEH TEAALLLLSR NFRGFFLFVE GGRIDHGHHE SRAYRALTET
360     370     380     390     400
IMFDDAIERA QQLTSEEDYL SLVTADHSV FSGGYPLRG SSIFGLAPGK
410     420     430     440     450
ARDRKATYVL LYNGGPGYVL KDGARPDVTE SEGSGPEYRQ QSAVLDGET
460     470     480     490     500
HAGEDVAIFA RGPQAHVVG VQEQTIFIAV MAFAACLEFY TACDLAPRAG
510     520     530
TDAAPHPGPS VVPALLPLLA GTILLILGTAT AP

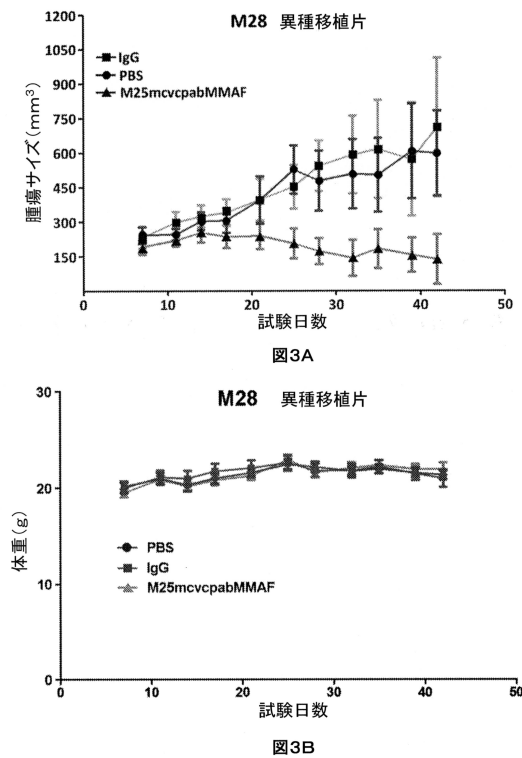
```

Fig. 1

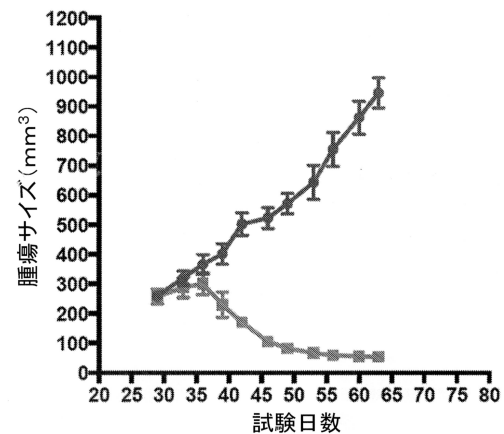
【図 2】



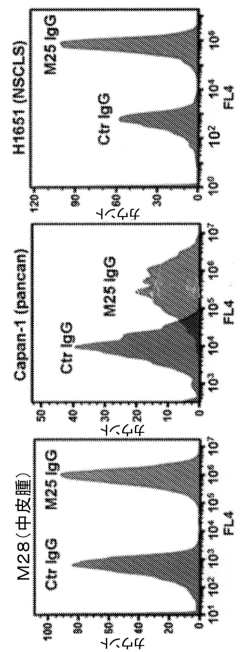
【図 3】



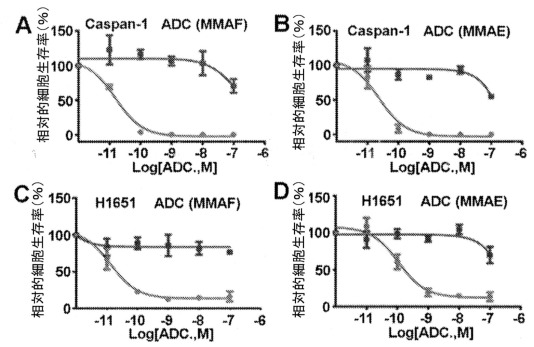
【図 4】



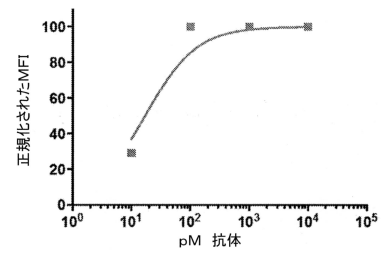
【図 5】



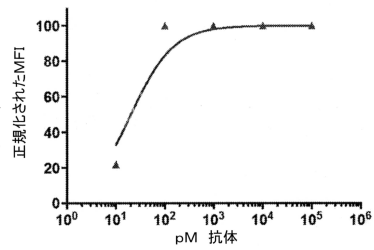
【図 6】



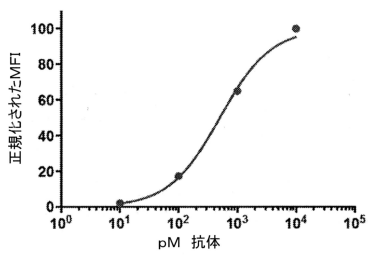
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【配列表】

0006983779000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 0 7 K	17/02	(2006.01)	C 0 7 K	17/02	
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 0 7 K	14/725	(2006.01)	C 0 7 K	14/725	
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/85	(2006.01)	C 1 2 N	15/85	Z
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04	
A 6 1 K	9/127	(2006.01)	A 6 1 K	9/127	
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K	35/17	A
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 K	38/07	(2006.01)	A 6 1 K	38/07	
A 6 1 K	31/537	(2006.01)	A 6 1 K	31/537	
A 6 1 K	31/7034	(2006.01)	A 6 1 K	31/7034	
A 6 1 K	31/407	(2006.01)	A 6 1 K	31/407	
A 6 1 K	31/4745	(2006.01)	A 6 1 K	31/4745	
A 6 1 K	31/165	(2006.01)	A 6 1 K	31/165	
A 6 1 K	31/09	(2006.01)	A 6 1 K	31/09	
A 6 1 K	31/513	(2006.01)	A 6 1 K	31/513	
A 6 1 K	31/519	(2006.01)	A 6 1 K	31/519	
A 6 1 K	31/517	(2006.01)	A 6 1 K	31/517	
A 6 1 K	31/52	(2006.01)	A 6 1 K	31/52	
A 6 1 K	31/7056	(2006.01)	A 6 1 K	31/7056	
A 6 1 K	31/675	(2006.01)	A 6 1 K	31/675	
A 6 1 K	31/255	(2006.01)	A 6 1 K	31/255	
A 6 1 K	31/166	(2006.01)	A 6 1 K	31/166	
A 6 1 K	31/4164	(2006.01)	A 6 1 K	31/4164	
A 6 1 K	33/24	(2019.01)	A 6 1 K	33/24	
A 6 1 K	31/282	(2006.01)	A 6 1 K	31/282	
A 6 1 K	31/4184	(2006.01)	A 6 1 K	31/4184	
A 6 1 K	31/573	(2006.01)	A 6 1 K	31/573	
A 6 1 K	31/704	(2006.01)	A 6 1 K	31/704	
A 6 1 K	31/475	(2006.01)	A 6 1 K	31/475	
A 6 1 K	31/337	(2006.01)	A 6 1 K	31/337	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 ビン・リウ

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94127・サン・フランシスコ・ロックウッド・コート・6

5

- (72)発明者 スコット・ビドリングマイアー
アメリカ合衆国・カリフォルニア・94123・サン・フランシスコ・フィルバート・ストリート
・1600・#33
- (72)発明者 ヤン・ス
アメリカ合衆国・カリフォルニア・94080・サウス・サン・フランシスコ・シャノン・ドライ
ヴ・2285

審査官 佐久 敬

- (56)参考文献 特表平05-501357 (JP, A)
mAbs (2014), Vol.6, No.1, pp.86-94
Am. J. Pathol. (1983), Vol.111, pp.156-165
BMC Biotechnology (2005), Vol.5, No.33, pp.1-13

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N
C07K
A61K
UniProt/GeneSeq
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)