(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-504894
(P2025-504894A)
(43)公表日　令和7年2月19日(2025.2.19)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C07K 16/40	*(2006.01)*	C07K	16/40	ZNA　4B065
C07K 14/725	*(2006.01)*	C07K	14/725	4C076
C07K 19/00	*(2006.01)*	C07K	19/00	4C084
C12N 5/10	*(2006.01)*	C12N	5/10	4C085
C07K 16/46	*(2006.01)*	C07K	16/46	4C087

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全28頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-543843(P2024-543843)
(86)(22)出願日　令和5年1月24日(2023.1.24)
(85)翻訳文提出日　令和6年9月19日(2024.9.19)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/061136
(87)国際公開番号　WO2023/147292
(87)国際公開日　令和5年8月3日(2023.8.3)
(31)優先権主張番号　63/302,639
(32)優先日　令和4年1月25日(2022.1.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　301040958
ザ・チルドレンズ・ホスピタル・オブ・フィラデルフィア
THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA
アメリカ合衆国 １９１０４ ペンシルバニア州 フィラデルフィア シビック センター ブールバード ３４０１
(71)出願人　504279968
ユニバーシティ オブ ピッツバーグ － オブ ザ コモンウェルス システム オブ ハイヤー エデュケイション
アメリカ合衆国 １５２６０ ペンシルバニア州，ピッツバーグ，サッカレイ アヴェニュー １３０，ガードナー スティ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　未分化リンパ腫キナーゼ抗体およびその使用方法

(57)【要約】
抗ＡＬＫ抗体およびその抗原結合断片が、その使用方法とともに提供される。

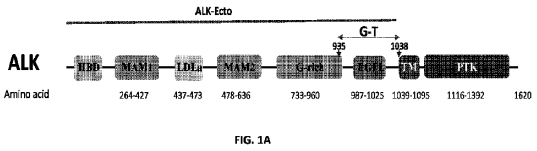


FIG. 1A

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
未分化リンパ腫キナーゼ（ＡＬＫ）に免疫学的に特異的な単離抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体またはその断片がＡＬＫのアミノ酸７３３－９６０またはアミノ酸９３５－１０３８に特異的に結合する、単離抗体またはその抗原結合断片。
【請求項２】
前記抗体またはその抗原結合断片が、ＶＨ２０またはＶＨ７８からの少なくとも１つの相補性決定領域を含む、請求項１に記載の抗体またはその抗原結合断片。
【請求項３】
前記抗体またはその抗原結合断片が、ＶＨ２０またはＶＨ７８からの３つ全ての相補性決定領域すべてを含む、請求項１に記載の抗体またはその抗原結合断片。
【請求項４】
前記抗体またはその抗原結合断片が、ＧＦＴＦＳＳＹＡ（配列番号３）、ＩＷＹＤＧＳＮＱ（配列番号４）およびＡＫＳＳＹＹＤＳＳＧＹＹＦＰＹＧＹ（配列番号５）を含む重鎖を含む、請求項１に記載の抗体またはその抗原結合断片。
【請求項５】
前記抗体またはその抗原結合断片が、ＧＦＴＦＳＳＹＡ（配列番号３）、ＩＹＰＧＤＳＤＴ（配列番号７）およびＡＲＥＲＧＷＱＤＡＦＤＩ（配列番号８）を含む重鎖を含む、請求項１に記載の抗体またはその抗原結合断片。
【請求項６】
前記抗体またはその抗原結合断片が、ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＶＶＱＰＧＲＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳＳＹＡＭＨＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＭＧＩＩＹＰＧＤＳＤＴＲＹＳＰＳＦＱＧＨＶＴＩＳＲＤＤＳＴＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＴＹＹＣＡＲＥＲＧＷＱＤＡＦＤＩＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号２）を含む重鎖を含む、請求項１に記載の抗体またはその抗原結合断片。
【請求項７】
前記抗体またはその抗原結合断片が、ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＶＶＱＰＧＲＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳＳＹＡＭＨＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＭＧＩＩＹＰＧＤＳＤＴＲＹＳＰＳＦＱＧＨＶＴＩＳＲＤＤＳＴＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＴＹＹＣＡＲＥＲＧＷＱＤＡＦＤＩＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号６）を含む重鎖を含む、請求項１に記載の抗体またはその抗原結合断片。
【請求項８】
請求項１～７の何れか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を含むイムノコンジュゲート。
【請求項９】
請求項１～７の何れか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を含む抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）。
【請求項１０】
請求項１～７の何れか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を含むキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）。
【請求項１１】
請求項１０に記載のＣＡＲを含むＣＡＲ　Ｔ細胞。
【請求項１２】
請求項１～７の何れか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を含む二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー。
【請求項１３】
請求項１～１２の何れか一項に記載の化合物を含む抗ＡＬＫ抗体またはその抗原結合断片と、少なくとも１種の薬学的に許容される担体とを含む組成物を投与することを含む、対象におけるがんの治療、阻害、および／または予防方法。
【請求項１４】

前記がんがその表面にＡＬＫを発現する、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記がんが神経芽細胞腫である、請求項１３に記載の方法。
【請求項１６】
ＡＬＫ阻害剤および／または化学療法剤を投与することをさらに含む、請求項１３に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０２２年１月２５日に出願された米国仮特許出願第６３／３０２，６３９号の３５　Ｕ．Ｓ．Ｃ．　§１１９（ｅ）に基づく優先権を主張する。前記の出願は、参照により本明細書に援用される。
【０００２】
本発明は、米国国立衛生研究所から授与された助成金番号ＣＡ１４０１９８による政府支援を受けて行われた。米国政府は、本発明においてある種の権利を有する。
【０００３】
本発明は腫瘍学の分野に関する。より具体的には、本発明は、神経芽細胞腫のようながんの治療のための未分化リンパ腫キナーゼ（ＡＬＫ）抗体を含む組成物および方法を提供する。
【背景技術】
【０００４】
本発明が関係する技術水準を説明するために、本明細書全体を通していくつかの刊行物および特許文献が引用されている。なお、これらの引用文献はすべて記載が、本明細書においては参照により援用される。
【０００５】
神経芽細胞腫（ＮＢ）は、依然として小児がんの罹患率および死亡率の主要な原因である。遺伝性の活性化突然変異は未分化リンパ腫キナーゼ（ＡＬＫ）がん遺伝子に存在し、これらの同じ突然変異は高リスクのＮＢ腫瘍形成の間に頻繁に体細胞性に獲得される。ＡＬＫはＮＢにおいて扱いやすい分子標的として確立されており、ＡＬＫ阻害療法の臨床開発の根拠となっている。実際、ＡＬＫは大多数のＮＢや他の小児悪性腫瘍の細胞表面に豊富に発現しているが、正常組織には有意に発現していない。注目すべきことに、活性化ＡＬＫ変異の大部分はクリゾチニブなどの第一世代薬剤に感受性がない。しかし、化学療法はＡＬＫ変異ＮＢをクリゾチニブに感作することがある。さらに、ロルラチニブはすべての活性化変異に有効な唯一のＡＬＫ阻害剤である。分子標的薬の併用（例えば、ＡＬＫ駆動性ＮＢ患者に対するセリチニブとリボシクリブ）は相乗効果を示している。しかし、ＡＬＫ発現がんの治療のための新しい治療薬はまだ必要とされている。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００６】
本発明によれば、未分化リンパ腫キナーゼ（ＡＬＫ）抗体およびその断片（例えば、抗原結合断片）が提供される。特定の実施形態において、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、ＡＬＫのアミノ酸７３３－９６０またはアミノ酸９３５－１０３８に結合する。特定の実施形態では、抗体またはその断片は、ＶＨ２０またはＶＨ７８からの少なくとも１つの相補性決定領域を含む。特定の実施形態では、抗体またはその断片は、ＶＨ２０またはＶＨ７８からの３つ全ての相補性決定領域を含む。特定の実施形態では、抗体またはその断片はＶＨ２０またはＶＨ７８を含む。
【０００７】
本発明の別の態様によれば、抗ＡＬＫ抗体またはその断片（例えば、抗原結合断片）を含むイムノコンジュゲートが提供される。特定の実施形態において、イムノコンジュゲートは、抗ＡＬＫ抗体またはその断片を含む抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）である。抗

ＡＬＫ抗体またはその断片（抗原結合断片など）を含む二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ）が提供される。抗ＡＬＫ抗体またはその断片（抗原結合断片など）を含むキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）およびＣＡＲ－Ｔ細胞も提供される。

【０００８】

本発明の別の態様によれば、対象または患者におけるがんの治療、阻害、および／または予防（例えば、発症の阻害）のための方法が提供される。特定の実施形態において、本方法は、抗ＡＬＫ抗体もしくはその断片（例えば、抗原結合断片）、または抗ＡＬＫ抗体もしくはその断片（例えば、抗原結合断片）を含む化合物もしくは細胞を、対象または患者に投与することを含む。特定の実施形態では、がんは特にその表面でＡＬＫを発現する。特定の実施形態では、がんは神経芽細胞腫である。特定の実施形態において、本方法は、対象に化学療法剤、放射線治療、および／またはＡＬＫ阻害剤を投与することをさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【０００９】

【図１Ａ】未分化リンパ腫キナーゼ（ＡＬＫ）タンパク質の模式図である。

【図１Ｂ】２９３Ｔ細胞またはＧリッチドメインを発現する２９３Ｔ細胞（２９３Ｔ－ＡＬＫ）に対するＶＨ２０またはＶＨ９の結合のグラフである。

【図１Ｃ】２９３Ｔ細胞またはＧ－Ｔドメインを発現する２９３Ｔ細胞（２９３Ｔ－ＡＬＫ）に対するＶＨ７８またはＶＨ５の結合のグラフである。

【図２】動的光散乱（ＤＬＳ）によって決定された、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中のＶＨ２０（図２Ａ）、ＶＨ９（図２Ｂ）、ＶＨ５（図２Ｃ）、およびＶＨ７８（図２Ｄ）の凝集を示すグラフである。図２Ａは０日目、１日目、４日目、７日目、１４日目のサンプルのグラフ（上から下へ）、図２Ｂは０日目と１日目のサンプルのグラフ（上から下へ）、図２Ｃは０日目、１日目、４日目、７日目のサンプルのグラフ（上から下へ）、図２Ｄは０日目、１日目、４日目のサンプルのグラフ（上から下へ）である。

【図３】図３Ａ～３ＤにＶＨの特徴を示す。図３Ａは、示したＶＨ（●）とＡＬＫ細胞外ドメイン融合物とヒトＩｇＧ１　Ｆｃの融合物であるＡＬＫ－Ｆｃを用いたＥＬＩＳＡアッセイのグラフである。抗体なしの対照（▲）も示した。図３Ｂは、ＶＨ２０のサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）アッセイのグラフである。図３ＣはＡＬＫ、ＶＨ２０、ＫＴＮ０２３９－ＩｇＧの結合のグラフである。図３Ｄは、ＳＫ－Ｎ－ＡＳ、ＩＭＲ３２、またはＳＹ５Ｙ－Ｄ３細胞へのＶＨ２０または対照抗体の結合のフローサイトメトリー結果のグラフである。

【図４】ＶＨ９（左）、ＶＨ２０（左）、ＶＨ５（右）、またはＶＨ７８（右）を用いたＣＡＲ－Ｔ細胞と、ＡＬＫを発現している２９３Ｔ細胞または２９３Ｔ細胞との細胞傷害性のグラフである。

【図５】図５Ａは、ＶＨ２０二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＶＨ２０－ＯＫＴ３－Ｆｃ　ＢｉＴＥ）の概略図と、β－メルカプトエタノールの存在下または非存在下におけるＶＨ２０－ＯＫＴ３－Ｆｃ　ＢｉＴＥのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の画像を提供する。図５Ｂは、ＶＨ２０－ＯＫＴ３－Ｆｃ　ＢｉＴＥのサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）アッセイのグラフである。図５Ｃは、示した細胞に対するＶＨ２０－ＯＫＴ３－Ｆｃ　ＢｉＴＥまたは対照（Ｉｓｏ）のｉｎ　ｖｉｔｒｏ細胞傷害性アッセイのグラフである。

【図６】図６Ａは、２９３Ｔ細胞または２９３Ｔ－ＡＬＫ細胞で培養したときの、さまざまな濃度の標識ＶＨ２０の内部移行を示すグラフである。図６Ｂは、モノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）または抗体－薬物コンジュゲートＶＨ２０－Ｆｃ－ＭＭＡＥを２９３Ｔ細胞または２９３Ｔ－ＡＬＫ細胞と培養した場合の細胞傷害性のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００１０】

発明の詳細な説明

ヒトＡＬＫタンパク質は、インスリン受容体スーパーファミリーの２２０ｋＤａの細胞表面受容体チロシンキナーゼである。図１ＡはＡＬＫのドメインの概略図である。ＡＬＫは

、アミノ酸２６４－４２７と４７８－６３６の２つのＭＡＭドメイン（メプリン／Ａ５－プロテイン／ＰＴＰｍｕ）、アミノ酸４３７－４７３の低密度リポタンパク質クラスＡ（ＬＤＬａ）モチーフ、アミノ酸７３３－９６０のグリシンリッチ領域（Ｇ－リッチ）、アミノ酸１０３９－１０５９の膜貫通ドメイン（ＴＭ）、アミノ酸１１１６－１３９２のＰＴＫ（プロテインチロシンキナーゼ）ドメインを含む。ＡＬＫはまた、Ｎ末端付近（例えば、シグナルペプチド後のアミノ酸１９から始まる）のヘパリン結合ドメイン（ＨＢＤ）と、アミノ酸９８７－１０２５のＥＧＦＬドメインを含む。ＡＬＫはＴＮＦＬモジュールも含んでおり、これはＧリッチ領域と結合して球状のＴＮＦＬ－ＧＲスーパードメインを形成する。ＡＬＫの細胞外ドメインは、ＡＬＫのＮ末端からＴＭドメインまでの領域（例えば、アミノ酸１－１０３８またはアミノ酸１９－１０３８）である。ＡＬＫのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列は、例えばＧｅｎＢａｎｋ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：　２３８；およびＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏｓ．ＮＭ＿００４３０４．５およびＮＰ＿００４２９５．２に記載されている。特定の実施形態において、ＡＬＫのアミノ酸配列は（配列番号１）：

```
MGAIGLLWLLPLLLSTAAVGSGMGTGQRAGSPAAGPPLQPREPLSYSRLQ   50
RKSLAVDFVVPSLFRVYARDLLLPPSSSELKAGRPEARGSLALDCAPLLR  100
LLGPAPGVSWTAGSPAPAEARTLSRVLKGGSVRKLRRAKQLVLELGEEAI  150
LEGCVGPPGEAAVGLLQFNLSELFSWWIRQGEGRLRIRLMPEKKASEVGR  200
EGRLSAAIRASQPRLLFQIFGTGHSSLESPTNMPSPSPDYFTWNLTWIMK  250
DSFPFLSHRSRYGLECSFDFPCELEYSPPLHDLRNQSWSWRRIPSEEASQ  300
MDLLDGPGAERSKEMPRGSFLLLNTSADSKHTILSPWMRSSSEHCTLAVS  350
VHRHLQPSGRYIAQLLPHNEAAREILLMPTPGKHGWTVLQGRIGRPDNPF  400
RVALEYISSGNRSLSAVDFFALKNCSEGTSPGSKMALQSSFTCWNGTVLQ  450
LGQACDFHQDCAQGEDESQMCRKLPVGFYCNFEDGFCGWTQGTLSPHTPQ  500
WQVRTLKDARFQDHQDHALLLSTTDVPASESATVTSATFPAPIKSSPCEL  550
RMSWLIRGVLRGNVSLVLVENKTGKEQGRMVWHVAAYEGLSLWQWMVLPL  600
LDVSDRFWLQMVAWWGQGSRAIVAFDNISISLDCYLTISGEDKILQNTAP  650
KSRNLFERNPNKELKPGENSPRQTPIFDPTVHWLFTTCGASGPHGPTQAQ  700
CNNAYQNSNLSVEVGSEGPLKGIQIWKVPATDTYSISGYGAAGGKGGKNT  750
MMRSHGVSVLGIFNLEKDDMLYILVGQQGEDACPSTNQLIQKVCIGENNV  800
IEEEIRVNRSVHEWAGGGGGGGGATYVFKMKDGVPVPLIIAAGGGGRAYG  850
AKTDTFHPERLENNSSVLGLNGNSGAAGGGGGWNDNTSLLWAGKSLQEGA  900
TGGHSCPQAMKKWGWETRGGFGGGGGGCSSGGGGGGYIGGNAASNNDPEM  950
DGEDGVSFISPLGILYTPALKVMEGHGEVNIKHYLNCSHCEVDECHMDPE 1000
SHKVICFCDHGTVLAEDGVSCIVSPTPEPHLPLSLILSVVTSALVAALVL 1050
AFSGIMIVYRRKHQELQAMQMELQSPEYKLSKLRTSTIMTDYNPNYCFAG 1100
KTSSISDLKEVPRKNITLIRGLGHGAFGEVYEGQVSGMPNDPSPLQVAVK 1150
TLPEVCSEQDELDFLMEALIISKFNHQNIVRCIGVSLQSLPRFILLELMA 1200
GGDLKSFLRETRPRPSQPSSLAMLDLLHVARDIACGCQYLEENHFIHRDI 1250
AARNCLLTCPGPGRVAKIGDFGMARDIYRASYYRKGGCAMLPVKWMPPEA 1300
FMEGIFTSKTDTWSFGVLLWEIFSLGYMPYPSKSNQEVLEFVTSGGRMDP 1350
PKNCPGPVYRIMTQCWQHQPEDRPNFAIILERIEYCTQDPDVINTALPIE 1400
YGPLVEEEEKVPVRPKDPEGVPPLLVSQQAKREEERSPAAPPPLPTTSSG 1450
KAAKKPTAAEISVRVPRGPAVEGGHVNMAFSQSNPPSELHKVHGSRNKPT 1500
SLWNPTYGSWFTEKPTKKNNPIAKKEPHDRGNLGLEGSCTVPPNVATGRL 1550
PGASLLLEPSSLTANMKEVPLFRLRHFPCGNVNYGYQQQGLPLEAATAPG 1600
AGHYEDTILKSKNSMNQPGP                                1620
```

を含む

【００１１】

本発明の一態様によれば、抗ＡＬＫ抗体およびその断片（例えば、抗原結合断片）が提供される。抗ＡＬＫ抗体はモノクローナルでもポリクローナルでもよい。抗ＡＬＫ抗体は二重特異性であってもよい。特定の実施形態において、抗体またはその断片は、ヒトＡＬＫに対して免疫学的に特異的である。抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、線形エピトープまたは立体配置エピトープを認識することができる。特定の実施形態において、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、ＡＬＫのＧリッチドメイン（例えば、アミノ酸７３３－９６０）と結合する。特定の実施形態において、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、ＡＬＫのＧ－Ｔドメ

インン（例えば、アミノ酸９３５－１０３８）と結合する。特定の実施形態において、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、ＡＬＫのアミノ酸７３３－９６０を含むポリペプチド（例えば、配列番号１）に対して免疫学的に特異的である。特定の実施形態において、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、ＡＬＫのアミノ酸９３５－１０３８を含むポリペプチド（例えば、配列番号１）に対して免疫学的に特異的である。上記エピトープは、配列のＮ末端および／またはＣ末端において、上記同定された配列よりも０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上のアミノ酸、特に１、２、３、４、または５アミノ酸だけ長くても短くてもよい。特定の実施形態において、上記エピトープは、配列番号１と少なくとも９０％、９５％、９７％、９９％、または１００％の相同性または同一性を有する。本明細書で提供される抗体と同じエピトープに結合する抗体も本発明に包含される。

【００１２】

特定の実施形態において、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、ＡＬＫのアミノ酸７３３－９６０に対して免疫学的に特異的である。特定の実施形態では、抗ＡＬＫ抗体はＶＨ２０またはその断片を含む。特定の実施形態では、抗ＡＬＫ抗体は、以下を含む重鎖（例えば、ＶＨドメイン）を含み：

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAA

IWYDGSNQYYADSVKGRFTISRDDSTNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKSS

YYDSSGYYFPYGYWGQGTLVTVSS (配列番号 2)

ここで、下線を引いた配列は相補性決定領域（ＣＤＲ）である。特定の実施形態において、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、ＶＨ２０（例えば、ＩＭＧＴ、Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｋａｂａｔ、Ｍａｒｔｉｎ（例えば、ｅｎｈａｎｃｅｄ　Ｃｈｏｔｈｉａ）またはＡＨｏ番号付けスキームによって決定される）の１つ、２つ、または３つ全てのＣＤＲを含む。特定の実施形態において、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、配列番号２の１つ、２つ、または３つ全てのＣＤＲを含む。特定の実施形態では、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、配列番号２の１つ、２つ、または３つ全てのＣＤＲを含む重鎖（例えば、ＶＨドメイン）を含む。特定の実施形態において、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、ＧＦＴＦＳＳＹＡ（配列番号３）、ＩＷＹＤＧＳＮＱ（配列番号４）、およびＡＫＳＳＹＹＤＳＳＧＹＹＦＰＹＧＹ（配列番号５）の１つ、２つ、または３つ全てを含む。別の実施形態では、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、上記で提供された配列のいずれか（例えば、配列番号２～５のいずれか）と少なくとも９０％、９５％、９７％、９９％、または１００％の相同性または同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００１３】

特定の実施形態において、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、ＡＬＫのアミノ酸９３５－１０３８に対して免疫学的に特異的である。特定の実施形態では、抗ＡＬＫ抗体はＶＨ７８またはその断片を含む。特定の実施形態では、抗ＡＬＫ抗体は、以下を含む重鎖（例えば、ＶＨドメイン）を含み：

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWMGI

IYPGDSDTRYSPSFQGHVTISRDDSTNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARER

GWQDAFDIWGQGTLVTVSS (配列番号 6)

ここで、下線を引いた配列は相補性決定領域（ＣＤＲ）である。特定の実施形態において、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、ＶＨ７８の１つ、２つ、または３つ全てのＣＤＲを含む（例えば、ＩＭＧＴ、Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｋａｂａｔ、Ｍａｒｔｉｎ（例えば、ｅｎｈａ

ｎｃｅｄ　Ｃｈｏｔｈｉａ）またはＡＨｏ番号付けスキームによって決定される）。特定の実施形態において、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、配列番号６の１つ、２つ、または３つ全てのＣＤＲを含む。特定の実施形態では、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、配列番号６の１つ、２つ、または３つ全てのＣＤＲを含む重鎖（例えば、ＶＨドメイン）を含む。特定の実施形態において、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、ＧＦＴＦＳＳＹＡ（配列番号３）、ＩＹＰＧＤＳＤＴ（配列番号７）、およびＡＲＥＲＧＷＱＤＡＦＤＩ（配列番号８）の１つ、２つ、または３つ全てを含む。別の実施形態では、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、上記で提供された配列のいずれか（例えば、配列番号３、６～８のいずれか）と少なくとも９０％、９５％、９７％、９９％、または１００％の相同性または同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００１４】

本発明の抗ＡＬＫ抗体またはその断片と、薬学的に許容される担体などの担体とを含む組成物も本明細書に包含される。特定の実施形態において、組成物は、少なくとも１つの抗ＡＬＫ抗体または抗体断片と、少なくとも１つの担体（例えば、薬学的に許容される担体）とを含む。

【００１５】

本発明の抗ＡＬＫ抗体またはその断片をコードする核酸分子も本明細書に包含される。特定の実施形態において、抗ＡＬＫ抗体またはその断片をコードする核酸分子は、上記で提供されたいずれかのアミノ配列をコードするヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態では、本発明の核酸分子はベクター、特に発現ベクター内に含まれる。本発明はまた、本発明の核酸分子を含み、任意に発現する細胞（例えば、抗ＡＬＫ抗体を分泌する細胞）も包含する。

【００１６】

抗体は合成抗体でも改変抗体でもよい（例えば、組換え作製抗体；キメラ抗体；二重特異性抗体；ヒト化抗体；ラクダ科抗体など）。本発明の特定の実施形態では、抗体は二重特異性抗体である。

【００１７】

本発明の抗体は抗体断片であってもよい。特定の実施形態では、抗体断片は抗体の抗原結合断片である。抗体断片には、限定されるものではないが、単一ドメイン（Ｄａｂ；例えば、単一可変軽鎖または重鎖ドメイン）、Ｆａｂ、Ｆａｂ´、Ｆ（ａｂ´）$_2$、およびＦ（ｖ）を含む免疫グロブリン断片；ならびに限定されるものではないが、ｓｃＦｖ、ｓｃＦｖ$_2$、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、およびテトラボディを含むこれらの免疫グロブリン断片の融合体（例えば、リンカーを介して）が含まれる。抗体はまた、少なくとも１つの抗体または抗体断片を含むタンパク質（例えば、融合タンパク質）であってもよい。特定の実施形態では、抗体断片は単一ドメイン抗体（例えば、ＶＨドメイン）である。

【００１８】

本発明の抗体はさらに修飾することができる。例えば、抗体をヒト化することができる。特定の実施形態では、抗体（またはその一部）は、抗体または抗体断片構築物（例えば、抗体フレームワーク）、特にヒト構築物／フレームワークのバックボーンに挿入される。例えば、本発明の抗体の可変軽鎖ドメインおよび／または可変重鎖ドメイン、あるいはそこに含まれるＣＤＲは、別の抗体構築物またはフレームワーク、特にヒトに挿入することができる。抗体を組換え生産する方法は当技術分野でよく知られている。抗体および抗体断片構築物用の市販ベクターが利用可能です。

【００１９】

本発明の抗体はまた、他の成分とコンジュゲート／連結させることもできる。本発明の抗ＡＬＫ抗体またはその断片を含むイムノコンジュゲートは、本明細書に包含される。例えば、抗体またはその断片は、少なくとも１つの検出可能な薬剤（例えば、放射性原子（例えば、放射性コンジュゲート））、撮像剤、造影剤、または治療薬もしくは薬物（例えば、抗体－薬物コンジュゲート）に作動可能に連結（例えば、共有結合、任意選択で、リン

カーを介して）され得る。特定の実施形態では、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、限定されるものではないが、陽電子放出同位体、α－、β－、γ－、オージェ（ Ａｕｇｅｒ－）電子放出核種、低エネルギー電子放出核種などの放射性核種（ラジオアイソトープ）とコンジュゲートしている。本発明の抗体はまた、少なくとも１つの精製タグ（例えば、Ｈｉｓタグ）を含んでいてもよい。

【００２０】

本発明によれば、抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）が提供される。ＡＤＣは当技術分野でよく知られている（例えば、Ｐｏｌａｋｉｓ（２０１６）Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｒｅｖ．， ６８：３－１９）。ＡＤＣは抗体の標的化能力により標的細胞に正確に輸送することができ、それにより標的細胞における局所的な薬物濃度を効果的に高める一方で、他の組織や臓器における薬物濃度を大幅に低下させ、毒性を低減することができる。ここで、ＡＤＣは、本発明の抗ＡＬＫ抗体またはその断片と、薬物または治療剤、特に細胞傷害剤を含む。薬物と抗体またはその断片は、直接コンジュゲートされていても、リンカーを介してコンジュゲートされていてもよい。

【００２１】

一般に、薬物または細胞傷害剤は低分子である。本明細書で使用される「細胞傷害剤」とは、細胞の機能を阻害もしくは阻止し、および／または細胞の破壊もしくは死を引き起こす物質である。細胞傷害剤の例としては、限定されないが、代謝拮抗剤、アルキル化剤、ＤＮＡ小溝結合剤、ＤＮＡインターカレーター、ＤＮＡ架橋剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、核輸出阻害剤、プロテアソーム阻害剤、ヒートショックタンパク質阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、抗有糸分裂剤、アントラサイクリン系薬剤、細胞骨格破壊剤、タキサン系薬剤、エポチロン系薬剤、毒素（例えば、ジフテリア、エキソトキシン、リシン（例、リシンＡ）、アブリン、シュードモナス外毒素、サポリンなど）、トポイソメラーゼＩ阻害剤、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオチドアナログ、ヌクレオチド前駆体アナログ、抗生物質（ペプチド抗生物質など）、白金系薬剤、メイタンシノイド（例、マイタンシン）、アウリスタチン（例えば、モノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ））、ドキソルビシン、デュオカルマイシン（例えば、チエノインドール）、イリノテカン、およびピロロベンゾジアゼピン（ＰＤＢ）またはピロロベンゾジアゼピン二量体（例えば、Ｃａｒｌｓｏｎ（２０１２）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｈｅａｌｔｈｃ．， ９（４）：２８－３１； ｗｏ ２００５／０４０１７０を参照）を含む。

【００２２】

特定の実施形態では、細胞傷害剤はチエノインドールである。チエノインドール（例えば、ＮＭＳ－Ｐ５２８）は強力な可溶性デュオカルマイシンアナログであり、抗体ペイロードとして非常に適しているＤＮＡ小溝アルキル化剤である（Ｖａｌｓａｓｉｎａ， ｅｔａｌ． ２０１４ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．， ７４：８２２； Ｃａｒｕｓｏ， ｅｔａｌ． ２０１８ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ． ７８（１３ Ｓｕｐｐｌ）：Ａｂｓｔｒａｃｔ ｎｒ ７３４）。

【００２３】

特定の実施形態において、細胞傷害剤はピロロベンゾジアゼピン（ＰＢＤ）二量体である。特定の実施形態では、ＰＢＤ二量体はＣＨ２ドメイン上のグリカンを介して抗体またはその断片にコンジュゲートされる。ＰＢＤ二量体は強力な細胞傷害性ＤＮＡ小溝鎖間架橋剤であり、小児がんモデルで効力と有効性が実証されている（Ｂｏｓｓｅ， ｅｔ ａｌ．（２０１２） Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．， ７２（８）：２０６８－７８； Ｗｏｏｄ， ｅｔ ａｌ．（２０１３） Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｂｌｏｏｄ Ｃａｎｃｅｒ ６０（１１）：１８６０－７）。

【００２４】

ＡＤＣのリンカーは、好ましくは抗体またはその断片の活性（例えば、標的結合）と薬物の活性（例えば、細胞の殺傷）が著しく悪影響を受けないように、化学的に実行可能な任意の位置で抗体またはその断片をコンジュゲートさせることができる。例えば、薬物は、リジン残基またはシステイン残基（例えば、抗体のヒンジ領域、定常領域またはＣＤＲ以

外の領域）を介して抗体またはその断片にコンジュゲートすることができる。グリカンを介した部位特異的コンジュゲーションもまた、抗体の結合およびその他の特性に影響を与えない（Ｚｈｕ，　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）　ＭＡｂｓ　６（５）：１１９０－２００；　Ｂｏｓｓｅ，　ｅｔ　ａｌ．（２０１７）　Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｌｌ　３２（３）：２９５－３０９；　Ｓｅａｍａｎ，　ｅｔ　ａｌ．（２０１７）　Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｌｌ　３１（４）：５０１－１５）。Ｃ２－アジド－ガラクトースは、Ｆｃ－グリカン修飾の基質として使用することができる。ＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－ＶＡ－薬剤（例えば、ＰＤＢ）は、クリックケミストリーベースのアプローチに従ってコンジュゲーションのペイロードとして使用することができる（Ｂａｓｋｉｎ，　ｅｔ　ａｌ．（２００７）　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，　１０４（４３）：１６７９３－７）。

【００２５】

ＡＤＣのリンカーは、切断可能なリンカーであってもよい（例えば、細胞内でコンジュゲートされた薬物を放出するように）（Ｋｅｌｌｏｇｇ，　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）　Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ．Ｃｈｅｍ．，　２２（４）：７１７－２７；　Ｐｏｌｓｏｎ，　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）　Ｅｘｐｅｒｔ　Ｏｐｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔｉｇ．Ｄｒｕｇｓ　２０（１）：７５－８５）。例えば、酸可溶性リンカー（例えば、ヒドラゾンリンカー）、リソソームまたはペプチダーゼ感受性リンカー（例えば、典型的には、Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｌｙｓ－Ｌｙｓ、またはＡｌａ－Ｖａｌのようなジペプチドを含む短いペプチジルリンカー）、またはジスルフィド含有リンカーが使用され得る。特定の実施形態では、抗体はペプチド性の切断可能な薬物リンカーと自己崩壊性スペーサーで薬物に結合され、システイン残基の部分的な還元によって、活性化前に２つの化学結合の切断を必要とする保護部分を可能にし、望ましい薬物抗体比（ＤＡＲ）（例えば、～２．７）をもたらす。ペプチドリンカーの利点の一つは、細胞傷害性ペイロードを放出するためにリソソームプロテアーゼによる細胞内酵素切断が必要なことである。

【００２６】

二官能性カップリング剤または架橋剤は、薬物を抗体またはその断片にコンジュゲートさせるために使用することができる。架橋剤は、限定されないが、１つ以上のカルボキシル－アミン反応性基（例えば、カルボジイミド）、アミン反応性基（例えば、ＮＨＳエステル、イミドエステル）、スルフヒドリル反応性基（例えば、マレイミド、ハロアセチル、ピリジルジスルフィド）、アルデヒド反応性基（例えば、ヒドラジド、アルコキシアミン）、およびヒドロキシル反応性基（例えば、イソシアネート）を含み得る。

【００２７】

本発明に従って、二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ）が提供される。図５Ａは、ＢｉＴＥの一例の概略図である。一般に、ＢｉＴＥは２つの抗原結合ドメインを有し、一方はＴ細胞抗原に結合し、もう一方は標的表面に存在する抗原に結合する（例えば、ＷＯ　０５／０６１５４７；　Ｂａｅｕｅｒｌｅ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）　Ｄｒｕｇｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｆｕｔｕｒｅ　３３：１３７－１４７；　Ｂａｒｇｏｕ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）　Ｓｃｉｅｎｃｅ　３２１：９７４－９７７）。本発明のＢｉＴＥは、２つの結合部位を含んでいてもよく、第１の結合部位は、本明細書に記載の抗ＡＬＫ抗体またはその断片を含み、第２の結合部位は、Ｔ細胞（例えば、ＣＤ３のような細胞表面標的）に特異的に結合する抗体またはその断片を含む。特定の実施形態では、ＢｉＴＥは単一のポリペプチド鎖分子である。特定の実施形態では、ＢｉＴＥはＦｃ領域を含む。特定の実施形態では、Ｔ細胞に特異的に結合する抗体またはその断片は、抗ＣＤ３抗体またはその断片である。特定の実施形態では、抗ＣＤ３抗体またはその断片はｓｃＦｖである。特定の実施形態では、抗ＣＤ３抗体またはその断片はＯＫＴ３である。

【００２８】

本発明はまた、ＣＡＲ－Ｔ技術で使用され得るキメラ抗原レセプターの調製における、本明細書に記載の抗ＡＬＫ抗体またはその断片の配列（例えば、ＣＤＲまたはＶＨ配列）の使用も包含する。本明細書において、「キメラ抗原受容体」または「ＣＡＲ」とは、細胞シグナル伝達および／または細胞活性化ドメインに連結された抗原結合ドメイン（例えば

、抗体の抗原結合部分）を含むハイブリッドポリペプチドを指す。特定の実施形態において、本発明のキメラ抗原受容体は、エクトドメイン（細胞外ドメイン）、膜貫通ドメイン、およびエンドドメイン（細胞質または細胞内ドメイン）を含む。本発明のキメラ抗原受容体のエクトドメインは、抗ＡＬＫ抗体またはその断片を含む。特定の実施形態では、抗体またはその断片はＦａｂまたはｓｃＦｖを含む。抗体またはエクトドメインの抗原結合断片は、アミノ酸リンカー／スペーサー（例えば、約１～約１００アミノ酸）を介して膜貫通ドメインに連結されていてもよい。エクトドメインはまた、シグナルペプチド（例えば、小胞体シグナルペプチド）を含んでいてもよい。

【００２９】

本発明のキメラ抗原受容体の膜貫通ドメインは、いかなる膜貫通ドメインであってもよい。特定の実施形態では、膜貫通ドメインは細胞膜をまたぐ疎水性のαヘリックスである。通常、膜貫通ドメインはエンドドメインと同じタンパク質のものである。膜貫通ドメインの例としては、特に限定されないが、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、ＣＤ２８、ＣＤ３、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、またはＣＤ１５４由来の膜貫通ドメインが挙げられる。特定の実施形態では、膜貫通ドメインはＣＤ３－ζまたはＣＤ２８由来である。

【００３０】

本発明のキメラ抗原受容体のエンドドメインは、少なくとも１つのシグナル伝達ドメインまたは活性化ドメイン（例えば、１つ以上の免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）を含むシグナル伝達ドメイン）を含む。シグナル伝達または活性化ドメインは、抗原がエクトドメインに結合することで活性化され、Ｔ細胞の活性化につながる。シグナル伝達または活性化ドメインには、限定されないが、ＣＤ３、ＬＩＧＨＴ、リンパ球機能関連抗原１（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ２８、ＩＣＯＳ、ＣＤ３０、ＣＤ７、ＮＫＧ２Ｃ、ＣＤ４０、ＰＤ－１、ＯＸ４０、ＣＤ１８、ＣＤ２７、Ｂ７－Ｈ３、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＯＸ４０、ＣＤ４０、およびＮＫＧ２Ｃ由来のシグナル伝達または活性化ドメイン（例えば、エンドドメイン／細胞質ドメインまたはその断片）が含まれる。特定の実施形態において、エンドドメインは、ＣＤ３－ε、ＣＤ３－γ、またはＣＤ３－ζ鎖のエンドドメインまたはその断片を含む。特定の実施形態において、エンドドメインは、ＣＤ３－ζ、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、および／またはＯＸ４０のシグナル伝達ドメインを含む。特定の実施形態において、エンドドメインは、ＣＤ３－ζ、ＣＤ２８、およびＯＸ４０のシグナル伝達ドメインを含む。特定の実施形態において、エンドドメインは、ＣＤ３－ζ、ＣＤ２８、および４－１ＢＢのシグナル伝達ドメインを含む。特定の実施形態において、エンドドメインは４－１ＢＢシグナル伝達ドメインを含む。

【００３１】

本発明のＣＡＲをコードする核酸分子（例えば、ベクター）は、物理的、化学的、生物学的な手段によって、所望の標的細胞（例えば、Ｔ細胞）に導入することができる。

【００３２】

本発明の方法は、ＣＡＲをコードする核酸（ＤＮＡまたはＲＮＡ）を対象に投与することを包含する。特定の実施形態において、本方法は、ＣＡＲをコードする核酸を含むＴ細胞（例えば、Ｔ細胞、細胞傷害性Ｔ細胞、および／またはナチュラルキラー）を対象に投与することを含む。Ｔ細胞は自己由来であり得る。例えば、この方法は、本発明のキメラ抗原受容体をコードする核酸（例えば、キメラ抗原受容体の発現のための統合ベクターまたは非統合ベクター）を用いてＴ細胞をｅｘ ｖｉｖｏで形質導入することを含む。本発明の方法は、対象からＴ細胞を得ることをさらに含んでもよい。

【００３３】

本発明の抗体分子は、当技術分野で知られている様々な方法を用いて調製することができる。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ａｕｓｕｂｅｌら編に記載されているように調製することができる。抗体は、化学的架橋、ハイブリッドハイブリドーマ技

術、および細菌や酵母細胞などの宿主細胞で発現される組換え抗体断片の発現によって調製することができる。本発明の一実施形態では、抗体分子は宿主細胞における組換え抗体または抗体断片の発現によって産生される。抗体をコードする核酸分子は、発現ベクターに挿入して宿主細胞に導入することができる。得られた抗体分子は、発現系から単離され精製される。抗体は任意に、抗体を精製するための精製タグを含む。

【００３４】

本発明の抗体分子の純度は、ＥＬＩＳＡ、免疫組織化学、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（ＩＭＡＣ）、サイズ排除クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）、ウェスタンブロッティング、表面プラズモン共鳴および質量分析を含むがこれらに限定されない、当業者に公知の標準的方法を用いて評価することができる。

【００３５】

本発明の別の態様によれば、がんの抑制、治療、および／または予防のための方法が提供される。特定の実施形態では、がんはＡＬＫ発現がんである。特定の実施形態では、がんは横紋筋肉腫、髄芽腫、神経膠腫、ユーイング肉腫、または神経芽細胞腫である。特定の実施形態では、がんは神経芽細胞腫である。本方法は、それを必要とする対象に本発明の抗ＡＬＫ抗体またはその断片を投与することを含む。抗ＡＬＫ抗体は、薬学的に許容される担体をさらに含む組成物中に投与することができる。抗ＡＬＫ抗体またはその断片はイムノコンジュゲートとして投与することができる。抗ＡＬＫ抗体またはその断片はＡＤＣとして投与することができる。抗ＡＬＫ抗体またはその断片はＢｉＴＥとして投与することができる。抗ＡＬＫ抗体またはその断片はＣＡＲとして投与することができる。抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、ＣＡＲ－Ｔ細胞として投与することができる。

【００３６】

特定の実施形態において、がんは、ＡＬＫにおける少なくとも１つの変異、特に正常ヒト細胞と比較してＡＬＫの活性の増加（例えば、キナーゼ活性の増加）および／またはＡＬＫコピー数の増加をもたらす変異によって特徴付けられる。特定の実施形態において、ＡＬＫは、位置Ｐ３６、Ｐ１５７、Ｖ１９８、Ｇ６４０、Ｌ６８４、Ｇ７１８、Ｄ９９３、Ｌ１２０４、Ｉ１１７０、Ａ１２００、Ｌ１２０４、Ｆ１２４５、Ｇ１１２８、Ｒ１１９２、Ｒ１２７５、Ｄ１０９１、Ｍ１１６６、Ｉ１１７１、Ｆ１１７４、Ｆ１２４５、またはＩ１２５０に少なくとも１つの変異を含む。特定の実施形態において、ＡＬＫは、位置Ｇ１１２８、Ｒ１１９２、Ｒ１２７５、Ｄ１０９１、Ｍ１１６６、Ｉ１１７１、Ｆ１１７４、Ｆ１２４５、またはＩ１２５０に少なくとも１つの変異を含む。特定の実施形態において、ＡＬＫは、位置Ｇ１１２８、Ｒ１１９２、およびＲ１２７５に少なくとも１つの変異を含む。特定の実施形態において、ＡＬＫは、Ｐ３６Ｓ、Ｐ１５７Ｓ、Ｖ１９８Ｍ、Ｇ６４０Ｒ、Ｌ６８４Ｍ、Ｇ７１８Ｆ、Ｇ７１８Ｓ、Ｄ９９３Ｇ、Ｌ１２０４Ｆ、Ｉ１１７０Ｓ、Ａ１２００Ｖ、Ｌ１２０４Ｆ、Ｆ１２４５Ｉ、Ｇ１１２８Ａ、Ｒ１１９２Ｐ、Ｒ１２７５Ｑ、Ｄ１０９１Ｎ、Ｍ１１６６Ｒ、Ｉ１１７１Ｎ、Ｆ１１７４Ｉ、Ｆ１１７４Ｌ、Ｆ１２４５Ｃ、Ｆ１２４５Ｖ、Ｉ１２５０Ｔ、Ｔ１１５１Ｍ、Ｉ１１７０Ｓ、Ｆ１１７４Ｃ、Ｌ１１９６Ｍ、Ｆ１２４５Ｉ、Ｒ２５９Ｈ、Ｍ７７０Ｉ、Ｅ１４０７Ｋ、Ｅ１４３３ｄｅｌ、Ｒ１４６４Ｇ、Ｇ１４９４Ｒ、およびＡ１５５３Ｐからなる群から選択される少なくとも１つの変異を含む。特定の実施形態において、ＡＬＫは、Ｇ１１２８Ａ、Ｒ１１９２Ｐ、Ｒ１２７５Ｑ、Ｄ１０９１Ｎ、Ｍ１１６６Ｒ、Ｉ１１７１Ｎ、Ｆ１１７４Ｉ、Ｆ１１７４Ｌ、Ｆ１２４５Ｃ、Ｆ１２４５Ｖ、およびＩ１２５０Ｔからなる群から選択される少なくとも１つの変異を含む。特定の実施形態において、ＡＬＫは、アミノ酸Ｒ１２７５および／またはＦ１１７４、特にＲ１２７５Ｑ、Ｆ１１７４Ｉ、およびＦ１１７４Ｌのうちの少なくとも１つに対する少なくとも１つの変異を含む。特定の実施形態において、がんはＡＬＫ阻害剤（例えば、クリゾチニブ）に対して耐性であり得る。

【００３７】

組成物は、がんに対する少なくとも１つの他の治療薬をさらに含んでもよい。特定の実施形態において、他の治療剤は、化学療法剤および／またはＡＬＫ阻害剤（例えば、ＡＬＫ

ｓｉＲＮＡおよび／またはアンチセンス分子、クリゾチニブ、ＴＡＥ６８４（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ＣＥＰ－１４０８３（Ｃｅｐｈａｌｏｎ）、ロルラチニブ、セリチニブ、またはリボシクリブ）である。あるいは、他の治療剤は、少なくとも１つの薬学的に許容される担体とともに、別個の組成物（複数可）内に含有させることもできる。別個の組成物は、抗ＡＬＫ抗体またはその断片を含む組成物と同時（例えば、同時）および／または異なる時期（例えば、順次）に投与することができる。例えば、他の治療薬は別々に（抗ＡＬＫ抗体またはその断片の前、後、または同時に）投与してもよいし、同じ組成物で投与してもよい。特定の実施形態において、抗ＡＬＫ抗体またはその断片は、放射線治療と同時に（例えば、同時に）、および／または異なる時期に（例えば、順次）投与される。少なくとも１つの抗ＡＬＫ抗体を含む組成物および／または少なくとも１つの他の治療剤を含む組成物は、キット内に含まれ得る。

【００３８】

本発明の組成物は、任意の適切な経路、例えば、注射（例えば、局所投与用または全身投与用）、非経口投与、皮下投与、経口投与（例えば、液体または錠剤／カプセル／錠剤の形態）、局所投与、肺投与、静脈内投与、腹腔内投与、髄腔内投与、硬膜外投与、筋肉内投与、皮内投与、鼻腔内投与、または他の投与様式によって投与することができる。特定の実施形態において、組成物は、注射（例えば、非経口、皮下、または血流中（例えば、静脈内））によって投与される。組成物は、がんの部位に直接投与することができる。組成物は静脈内または経口投与することができる。本発明の抗体を含む組成物は、水、緩衝生理食塩水、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、液状ポリエチレングリコールなど）、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、油、洗浄剤、懸濁化剤、またはそれらの適切な混合物などの許容可能な媒体とともに投与するために都合よく製剤化することができる。適切な医薬製剤の選択は、選択される投与方法に依存する。選択された媒体中の薬剤の濃度は変化させることができ、媒体は、医薬製剤の所望の投与経路に基づいて選択することができる。ただし、任意の従来の媒体または薬剤が投与される薬剤と不適合である限り、医薬製剤中でのその使用が企図される。本発明の医薬組成物は、例えば、液体形態で調製することができ、または乾燥粉末形態（例えば、凍結乾燥）とすることができる。

【００３９】

活性成分として本発明の化合物を薬学的担体と密接に混合して含有する医薬組成物は、従来の医薬配合技術に従って調製することができる。担体は、投与に望まれる製剤の形態、例えば、注射剤などに応じて、多種多様な形態をとることができる。経口投与用抗体の調製に際しては、通常の医薬媒体のいずれを用いてもよく、例えば、経口液剤（例えば、懸濁剤、エリキシル剤、溶液剤など）の場合には、水、グリコール類、油類、アルコール類、香料、保存剤、着色剤など；経口固形製剤（例えば、粉剤、カプセル剤、錠剤など）の場合は、デンプン、糖類、希釈剤、造粒剤、潤滑剤、結合剤、崩壊剤などの担体が挙げられる。

【００４０】

本発明の医薬製剤は、投与を容易にし、投与量を均一にするために、投与単位形態で製剤化することができる。用量単位形態は、本明細書中で使用される場合、処置を受ける患者に適切な医薬製剤の物理的に別個の単位をいう。各々の用量は、選択された薬学的担体と関連して所望効果を生じるように計算された量の活性成分を含有すべきである。適切な用量単位を決定するための手順は、当業者に周知である。用量単位は、患者の体重に基づいて比例的に増減してもよい。特定の病理学的状態の緩和のための適切な濃度は当該分野で公知のように、用量濃度曲線計算によって決定され得る。

【００４１】

特定の患者への投与に適した本発明による抗体の用量および投与レジメンは、患者の年齢、性別、体重、一般的な病状、および薬剤が投与される特定の状態およびその重症度を考慮して医師が決定することができる。医師はまた、抗体の投与経路、抗体を組み合わせる医薬担体、抗体の生物学的活性を考慮することができる。本発明の薬剤の投与に適切な投

与単位は、動物モデルにおける薬剤の毒性を評価することによって決定することができる。適切な投与量単位は、他の標準的な薬剤との併用における薬剤の有効性を評価することによっても決定できる。

【００４２】

本発明の薬剤を含む組成物は、病的症状が軽減または緩和されるまで、適切な間隔、例えば、少なくとも１日１回以上投与することができ、その後、投与量を維持レベルまで減少させることができる。特定の症例における適切な間隔は、通常、患者の状態によって異なる。

【００４３】

定義

以下の定義は、本発明の理解を容易にするために提供される：

単数形の「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、文脈上明らかにそうでない場合を除き、複数形の参照語を含む。

【００４４】

「薬学的に許容される」とは、動物、より詳細にはヒトにおける使用のための、連邦もしくは州政府の規制当局による承認、または米国薬局方もしくは他の一般に認められた薬局方に記載された承認を示す。

【００４５】

「担体」とは、例えば、本発明の活性剤が投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、補助剤またはビヒクルを指す。薬学的に許容される担体は、水や、石油、動物、植物、または合成由来のもの、例えばピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油などを含む油などの無菌液体であり得る。担体としては、水または生理食塩水、デキストロースおよびグリセロールの水溶液が好ましく用いられる。適切な医薬用担体は、例えばＥ．Ｗ．Ｍａｒｔｉｎ著「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ´ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」に記載されている。

【００４６】

「抗体」または「抗体分子」とは、特定の抗原に結合する抗体およびその断片を含む免疫グロブリンのことである。本明細書において、抗体または抗体分子は、インタクトな免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分（例えば、抗原結合断片）、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の融合体を包含する。

【００４７】

本明細書において、「免疫学的に特異的」という用語は、目的のタンパク質または化合物の１つ以上のエピトープに結合するが、抗原性の生物学的分子の混合集団を含むサンプル中の他の分子を実質的に認識して結合しないタンパク質／ポリペプチド、特に抗体を指す。

【００４８】

本明細書で使用される「対象」という用語は、動物、特に哺乳動物、特にヒトを指す。

【００４９】

化合物または医薬組成物の「治療的有効量」は、特定の障害または疾患を予防、阻害、または治療するのに効果的な量を指す。本明細書において、疾患または障害の治療とは、疾患または障害、その症状、またはその素因を治癒、緩和、および／または予防することを指す場合がある。

【００５０】

本明細書で使用される場合、用語「治療薬」は、状態、疾患、または障害を治療するため、または状態、疾患、または障害の症状を軽減するために使用することができる、核酸、ペプチド、タンパク質、および抗体を含むがこれらに限定されない化学化合物または生体分子を意味する。

【００５１】

「単離された」という用語は、ある化合物を、その製造過程や自然環境に存在する他の成分から分離することを指す。「単離された」とは他の化合物または材料との人工または合

成混合物、または基本活性を実質的に妨害せず、例えば不完全な精製または安定剤の添加により存在し得る不純物の存在を排除することを意味するものではない。

【００５２】

本明細書において、「低分子」という用語は、比較的低分子量（例えば、２，０００未満）の物質または化合物を指す。典型的には低分子は有機分子であるが、タンパク質、ポリペプチド、アミノ酸、または核酸ではない。

【００５３】

化学療法剤とは、抗がん活性を示す化合物および／または細胞に有害な化合物（例えば毒素）である。適切な化学療法剤には、これらに限定されないが、以下が含まれる： 毒素（例えば、サポリン、リシン、アブリン、臭化エチジウム、ジフテリア毒素、およびシュードモナス外毒素）；タキサン；アルキル化剤（例えば、テモゾロミド、クロラムブシル、シクロホスファミド、イソファミド、メクロレタミン、メルファランおよびウラシルマスタードなどの窒素マスタード）；チオテパなどのアジリジン；ブスルファンなどのメタンスルホン酸エステル；カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシンなどのニトロソ尿素；白金錯体（例えば、シスプラチン、カルボプラチン、テトラプラチン、オルマプラチン、チオプラチン、サトラプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチン、ヘプタプラチン、イプロプラチン、トランスプラチン、ロバプラチン）；マイトマイシン、プロカルバジン、ダカルバジン、アルトレタミンなどの生体還元性アルキル化剤）； ＤＮＡ鎖切断剤（例えば、ブレオマイシン）；トポイソメラーゼＩＩ阻害剤（例えば、アムサクリン、メノガリル、アモナフィド、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、Ｎ，Ｎ－ジベンジル ダウノマイシン、エリプチシン、ダウノマイシン、ピラゾロアクリジン、イダルビシン、ミトキサントロン、ｍ－ＡＭＳＡ、ビサントレン、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、デオキシドキソルビシン、エトポシド（ＶＰ－１６）、リン酸エトポシド、オキサントラゾール、ルビダゾン、エピルビシン、ブレオマイシン、およびテニポシド）；ＤＮＡ小溝結合剤（例えば、プリカミジン）；代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサートやトリメトレキサートなどの葉酸拮抗剤）；フルオロウラシル、フルオロデオキシウリジン、ＣＢ３７１７、アザシチジン、シタラビン、フロクスウリジンなどのピリミジン拮抗剤；メルカプトプリン、６－チオグアニン、フルダラビン、ペントスタチンなどのプリン拮抗薬；アスパルギナーゼ；ヒドロキシ尿素などのリボヌクレオチド還元酵素阻害薬）；アントラサイクリン系薬剤；チューブリン相互作用薬（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、およびパクリタキセル（タキソール（登録商標））。

【００５４】

以下の実施例は、本発明の種々の実施形態を例示するために提供される。これらは本発明を何ら限定するものではない。

【実施例】

【００５５】

最近の包括的なゲノム解析の結果、小児がんでは作用可能な再発性体細胞突然変異は稀であるという悲痛な結論が得られており、精密に開発された治療法を用いて転帰を大幅に改善するためには、変異キナーゼを標的とする低分子化合物だけでは不十分であるとの見通しが示されている。神経芽細胞腫および他のＡＬＫ発現小児腫瘍における治療アプローチとして、ＡＬＫ標的抗体が緊急に必要とされている。重要なことに、ＡＬＫは神経芽細胞腫の細胞表面で発現しているが、正常組織では発現していない（Ｃａｒｐｅｎｔｅｒ，ｅｔ ａｌ．（２０１２） Ｏｎｃｏｇｅｎｅ ３１（４６）：４８５９－６７）。注目すべきことに、ＡＬＫは横紋筋肉腫、髄芽腫、神経膠腫、ユーイング肉腫のサブセットでも高濃度に発現している （Ｍｏｓｓｅ，Ｙ．Ｐ．（２０１６） Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，２２（３）：５４６－５２；Ｃｏｒａｏ （２００９） Ｐｅｄｉａｔｒｉｃ Ｄｅｖ．Ｐａｔｈｏｌ．，１２（４）：２７５－８３；Ｐｉｌｌａｙ，ｅｔ ａｌ．（２００２） Ｈｉｓｔｏｐａｔｈｏｌｏｇｙ ４１（５）：４６１－７；Ｙｏｓｈｉｄａ ｅｔ ａｌ．（２０１３） Ｍｏｄ．Ｐａｔｈｏｌ．，２６（６）：７７２－８１）。このことは、ＡＬＫが免疫療法の標的でもあることを示して

いる。例えば、ＡＬＫ細胞外領域に対する抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）は、ＡＬＫを標的とする免疫療法に用いることができる。ＡＤＣは、腫瘍細胞表面タンパク質に特異的な抗体（モノクローナル抗体など）の標的化特性（Ｓｌｉｗｋｏｗｓｋｉ，　ｅｔ　ａｌ．，（２０１３）　Ｓｃｉｅｎｃｅ　３４１（６１５１）：１１９２－８　）と強力な細胞傷害性薬物の抗腫瘍効果（Ｔｅｉｃｈｅｒ，　ｅｔ　ａｌ．，（２０１１）　Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，　１７（２０）：６３８９－９７）を組み合わせた、急速に成長している抗がん剤の一種である。

【００５６】

図１ＡはＡＬＫの概略図である。ＭＡＭ１、ＬＤＬａ、ＭＡＭ２、Ｇ－ｒｉｃｈ、Ｇ－ＴドメインおよびＡＬＫ細胞外ドメイン（ＡＬＫ－Ｅｃｔｏ）は、ファージパンニングのために別々に発現させた。簡単に説明すると、２９３Ｔおよび２９３Ｔ－ＡＬＫ細胞を、２００ｍＬのＰＢＳ中１μＭの濃度で、氷上で３０分間、異なるＶＨ抗体で染色した。細胞を１ｍＬのＰＢＳで３回洗浄し、抗ＦＬＡＧ－ＰＥ抗体（１：２００、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）と氷上で３０分間インキュベートした。ＦＬＡＧタグは配列：ＤＹＫＤＤＤＤＫ（配列番号９）を含む。その後、染色した細胞を１ｍＬのＰＢＳで３回洗浄した。抗体の結合はＢＤ™　ＬＳＲ　ＩＩ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，　Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）で検出した。蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ）データ解析はＦｌｏｗＪｏ＿Ｖ１０＿ＣＬを用いて行った。

【００５７】

図１Ｂおよび図１Ｃは、２９３Ｔ細胞（２９３Ｔ－ＡＬＫ）の細胞表面に発現したＡＬＫ細胞外ドメインに様々なＶＨを結合させたフローサイトメトリーの結果を示している。ＶＨ９とＶＨ２０はＧ－リッチドメイン抗原で同定され、ＶＨ５とＶＨ７８はＧ－Ｔドメイン抗原で同定された。４つのＶＨはすべて２９３Ｔ－ＡＬＫ細胞と良好な結合を示したが、２９３Ｔ細胞とは有意な非特異的結合を示さなかった。

【００５８】

４つのＶＨを動的光散乱（ＤＬＳ）で調べた。簡単に説明すると、ＶＨ抗体はＰＢＳでバッファー交換し、０．２２μＭフィルターでろ過した。抗体濃度は５ｍｇ／ｍＬに調整した。５００μＬのサンプルを３７℃でインキュベートし、ＤＬＳを行った。サンプルは０日目、１日目、４日目、７日目、１４日目にＺｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ－ＺＳ　ＺＥＮ　３６００（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　Ｌｉｍｉｔｅｄ；　Ｍａｌｖｅｒｎ，　ＵＫ）で測定し、タンパク質粒子のサイズ分布を決定した。図２Ａ－２Ｄに見られるように、ＶＨ２０とＶＨ５はＶＨ９とＶＨ７８よりも低い凝集を示した。

【００５９】

ＶＨはさらに特徴づけられた。まず、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（ＡＬＫ－Ｆｃ）に融合されたＡＬＫ細胞外ドメインを含む融合タンパク質を用いたＥＬＩＳＡアッセイで、ＶＨの結合親和性を調べた。ＥＬＩＳＡプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ　３６９０；　Ｔｅｗｋｓｂｕｒｙ，　ＭＡ）に５０μｌの抗原（１ｘ　ＰＢＳで希釈した５μｇ／ｍｌ）を４℃で一晩コートした。翌日、１５０μＬの５％　ｍｉｌｋ－ＰＢＳ（Ｂｉｏ－ＲＡＤ；　Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，　ＣＡ）を用いて、室温で２時間ブロッキングを行った。その後、プレートを０．０５％ＰＢＳＴで３回洗浄した。３倍に連続希釈したＶＨ抗体（５％ＰＢＳ－牛乳中）を各ウェルに加え、室温で１時間インキュベートした後、ＰＢＳＴで４回洗浄した。次に、５０μＬの抗Ｆｌａｇ－ＨＲＰ（５％ＰＢＳ－Ｍｉｌｋで１：１０００希釈、Ｔｈｅｒｍｏ；　Ｗａｌｔｈａｍ，　ＭＡ）を各ウェルに加え、室温で１時間インキュベートした後、ＰＢＳＴで５回洗浄した。５０μＬの３，３′，５，５′－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）基質（Ｓｉｇｍａ；　Ｓｔ．　Ｌｏｕｉｓ，　ＭＯ）を各ウェルに加え、１～２分間発色させた後、５０μＬのH_2SO_4（１Ｍ，　Ｓｉｇｍａ）で停止させた。プレートは４５０ｎｍの吸光度を読み取った。ＥＬＩＳＡ結果はＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　９．０．２を用いて解析した。図３Ａに見られるように、ＶＨ２０はＡＬＫに対するEC_{50}が約０．４ｎＭ、ＶＨ５はＡＬＫに対するEC_{50}が約０．３２ｎＭ、ＶＨ７８はＡＬＫに対するEC_{50}が約１．３２ｎＭであった。

【００６０】
ＶＨ２０はサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）でも研究された。２００μＬ（１μｇ／ｍＬ）の濾過サンプルを分析に使用した。ＳＥＣにはＳｕｐｅｒｄｅｘ（登録商標）２００　Ｉｎｃｒｅａｓｅ　１０／３００　ＧＬカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｃａｔ．Ｎｏ．２８９９０９４４）を用いた。カラムは、フェリチン（４４０ｋＤａ）、アルドラーゼ（１５８ｋＤａ）、コンアルブミン（７５　ｋＤａ）、オボアルブミン（４４ｋＤａ）、炭酸脱水酵素（２９ｋＤａ）、リボヌクレアーゼＡ（１３．７ｋＤａ）のタンパク質分子量標準物質で校正した。タンパク質はダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ）バッファーで０．５ｍＬ／分の流速で溶出した。図３Ｂに見られるように、ＶＨ２０はＳＥＣによって二量体であると決定された。

【００６１】
ＶＨ２０がＫＴＮ０２３９と競合する能力も調べた。ＫＴＮ０２３９はＫＴＮ０１２５のヒト化変異体（Ｓａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，　７６（１４　Ｓｕｐｐｌ）：Ａｂｓｔｒａｃｔ２６９０）であり、ＡＬＫのＧリッチドメインと結合できる。ＫＴＮ０２３９－ＩｇＧの固定化には、プロテインＡバイオセンサー（１８－５０１０，　ＢＬＩｔｚ（登録商標）　ｓｙｓｔｅｍ，　ＦｏｒｔｅＢｉｏ；　Ｆｒｅｅｍｏｎｔ，　ＣＡ）を用いた。ベースラインと解離の判定にはＤＰＢＳ（ｐＨ＝７．４）を使用した。検出条件は、（Ｉ）ベースライン３０秒、（ＩＩ）ＫＴＮ０２３９－ＩｇＧを１２０秒間ロード、（ＩＩＩ）ベースライン３０秒、（ＩＶ）ＡＬＫと１２０秒間結合、（Ｖ）ＶＨ２０と１２０秒間結合、であった。図３Ｃに見られるように、ＶＨ２０はＫＴＮ０２３９－ＩｇＧと競合していない。

【００６２】
ＶＨ２０のＡＬＫ発現細胞への結合能もＦＡＣＳで調べた。ＳＫ－Ｎ－ＡＳ（陰性細胞株）、ＩＭＲ３２（陽性細胞株）、ＳＹ５Ｙ－Ｄ３（陽性細胞株）細胞を、２００μＬのＰＢＳ中１μＭ濃度のＶＨ２０で、氷上で３０分間染色した。細胞を１ｍＬのＰＢＳで３回洗浄し、抗Ｆｌａｇ－ＰＥ抗体（１：２００、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）と氷上で３０分間インキュベートした。細胞を再び１ｍＬのＰＢＳで３回洗浄した。抗体の結合はＢＤ™ＬＳＲ　ＩＩ（Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，　ＣＡ）で検出した。ＦＡＣＳデータ解析はＦｌｏｗＪｏ＿Ｖ１０＿ＣＬを用いて行った。図３Ｄに見られるように、ＶＨ２０はＩＭＲ３２とＳＹ５Ｙ－Ｄ３細胞の細胞表面ＡＬＫに結合することができたが、陰性対照のＳＫ－Ｎ－ＡＳ細胞には結合しなかった。

【００６３】
抗ＡＬＫ　ＣＡＲ－Ｔ細胞の２９３Ｔ細胞および２９３Ｔ－ＡＬＫ細胞に対する細胞傷害性も調べた。抗ＡＬＫ　ＣＡＲ－Ｔ細胞（エフェクター細胞）を、９６ウェル細胞培養プレート（コーニング社製）で、エフェクター：標的＝１．２５：１、２．５：１、５：１、１０：１、２０：１の比率で、２９３Ｔおよび２９３Ｔ－ＡＬＫ細胞と４８時間インキュベートした。ＣＡＲ－Ｔ細胞と２９３Ｔ細胞の共培養は陰性対照として用いた。細胞傷害性は、標的細胞から培地中に放出された特異的乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）を、細胞毒性ＬＤＨ検出キット（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて、製造者の指示に従って検出することにより決定した。パーセント細胞傷害性は以下の式で計算した：細胞傷害性（％）＝（実験的溶解－エフェクター自然溶解－標的自然溶解）／（標的最大溶解－標的自然溶解）×１００％。陰性対照として抗ＡＬＫ　ＣＡＲ－Ｔ細胞を２９３Ｔ細胞と共培養した。図４に見られるように、ＶＨ５とＶＨ７８でより大きな細胞傷害性が検出された。

【００６４】
ＶＨ２０二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＶＨ２０－ＯＫＴ３－Ｆｃ　ＢｉＴＥ）も合成され、特性評価された。図５ＡはヒトＶＨ２０－ＯＫＴ３－Ｆｃ　ＢｉＴＥの模式図である。ＶＨ２０、ＯＫＴ３－７　ｓｃＦＶおよびＩｇＧ１　Ｆｃを融合してＢｉＴＥを生成した。図５Ａはまた、β－メルカプトエタノールを添加（還元）または無添加のＳＤＳ－ＰＡＧＥでのＢｉＴＥのサイズも示している。タンパク質（Ｃ末端にＨｉｓタグ（６ｘＨｉｓ）を含む）はＥｘｐｉ２９３™発現システム（Ｔｈｅｒｍｏ）で発現させ、Ｎｉ

－ＮＴＡカラム（Ｔｈｅｒｍｏ）で精製した。タンパク質濃度はＮａｎｏＤｒｏｐ™ Ｌｉｔｅ分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ）で測定し、タンパク質の純度はＳＤＳ－ＰＡＧＥで９５％以上と見積もった。

【００６５】

サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）もＶＨ２０－ＯＫＴ３－Ｆｃ ＢｉＴＥの特徴を明らかにするために行われた。簡単に説明すると、２００μＬ（１μｇ／ｍＬ）の濾過サンプルを分析に使用した。Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（登録商標） ２００ Ｉｎｃｒｅａｓｅ １０／３００ ＧＬカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｃａｔ．Ｎｏ．２８９９０９４４）を使用した。カラムは、フェリチン（４４０ｋＤａ）、アルドラーゼ（１５８ｋＤａ）、コンアルブミン（７５ｋＤａ）、オボアルブミン（４４ｋＤａ）、炭酸脱水酵素（２９ｋＤａ）、リボヌクレアーゼＡ（１３．７ｋＤａ）のタンパク質分子量標準物質で校正した。タンパク質はＤＰＢＳ緩衝液で０．５ｍＬ／分の流速で溶出した。図５Ｂに見られるように、ＶＨ２０－ＯＫＴ３－Ｆｃは単量体である。

【００６６】

ＡＬＫ陽性細胞を殺すＶＨ２０－ＯＫＴ３－Ｆｃ ＢｉＴＥの能力もテストされた。ＢｉＴＥを介した細胞傷害性アッセイは、９６ウェル細胞培養プレートの培地にＢｉＴＥを３倍に連続希釈したものを添加することで行った。活性化Ｐａｎ－Ｔ細胞（エフェクター細胞）と標的細胞（２９３Ｔ、２９３Ｔ－ＡＬＫ、ＳＫ－Ｎ－ＡＳ、ＩＭＲ３２、ＳＹ５Ｙ）の混合物を、Ｅ：Ｔ比＝４（標的細胞１０，０００個／ウェル）で各ウェルに添加した。陰性対照としてＩｓｏ型ＢｉＴＥを使用した。２４時間培養後、細胞傷害性ＬＤＨ検出キット（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて、標的細胞から培地中に放出された特異的乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）を検出することにより、細胞傷害性を決定した。パーセント細胞傷害性は以下の式で計算した：細胞傷害性（％）＝（実験的溶解－エフェクター自然溶解－標的自然溶解）／（標的最大溶解－標的自然溶解）×１００％。図５Ｃに見られるように、ＢｉＴＥはＡＬＫ陽性腫瘍細胞（２９３Ｔ－ＡＬＫ、ＳＹ５Ｙ、ＩＭＲ３２）に対する細胞傷害性を媒介する。ＢｉＴＥはＳＫ－Ｎ－ＡＳ細胞（陰性対照）に対して細胞傷害性を示さなかった。このように、ＶＨ２０－ＯＫＴ３－Ｆｃ ＢｉＴＥは異なる腫瘍細胞（２９３Ｔ－ＡＬＫ、ＳＹ５Ｙ、ＩＭＲ３２細胞、Ｅ：Ｔ＝４：１）に対して高い細胞傷害性を示した（２９３Ｔ－ＡＬＫのIC_{50}＝０．０１ｎＭ、ＳＹ５ＹのIC_{50}＝０．１５ｎＭ、ＩＭＲ３２のIC_{50}＝０．１ｎＭ）。

【００６７】

ＶＨ２０の内部移行も特徴づけられた。内部移行研究のために、ＶＨ２０はｐＨｒｏｄｏ™ Ｄｅｅｐ Ｒｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｌａｂｅｌｉｎｇ Ｋｉｔ（サーモ社）を用いてｐＨｒｏｄｏ™ Ｄｅｅｐ Ｒｅｄ色素とコンジュゲートさせた。コンジュゲートしたＶＨ２０を２９３Ｔ細胞および２９３Ｔ－ＡＬＫ細胞と異なる濃度で２４時間インキュベートした。ＶＨ２０の内部移行はフローサイトメーターで測定した。図６Ａに見られるように、ＶＨ２０は２９３Ｔ－ＡＬＫ細胞に効果的に内在化されたが、２９３Ｔ細胞では非特異的内部移行は検出されなかった。

【００６８】

ＶＨ２０を含む抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）の細胞傷害性も研究された。具体的には、ＶＨ２０－Ｆｃ－モノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）コンストラクトを合成した。ＶＨ２０－ＡＤＣを９６ウェルの細胞培養液で３倍連続希釈した。２９３Ｔおよび２９３Ｔ－ＡＬＫ細胞を、培養４日後に各ウェルに加えた（２０００細胞／ウェル）。その後、細胞生存率をＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標） Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ（プロメガ社）で測定した。図６Ｂに見られるように、ＶＨ２０－Ｆｃ－ＭＭＡＥは２９３Ｔ－ＡＬＫ細胞に対して強力な細胞傷害性（IC_{50}＝４．５２８ｎＭ）を示した。

【００６９】

以上、本発明の好ましい実施の特定について説明し、具体的に例示したが、本発明はかかる実施形態に限定されるものではない。以下の特許請求の範囲に記載されているように、

本発明の範囲および精神から逸脱することなく、様々な修正を行うことができる。

【図面】

【図１Ａ】

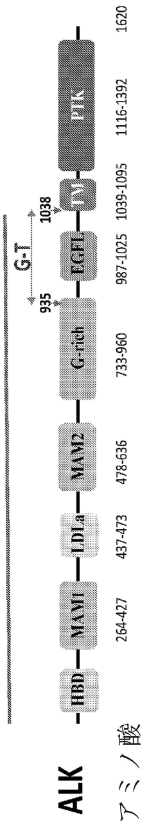


FIG. 1A

【図１Ｂ－１Ｃ】

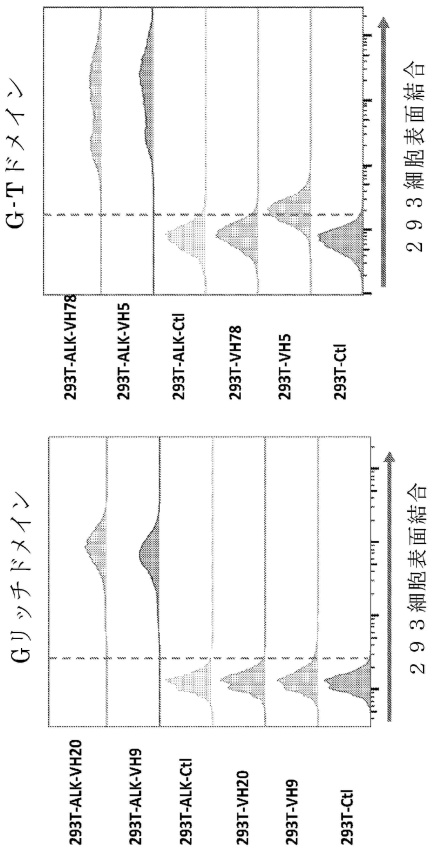


FIG. 1B

FIG. 1C

【図２Ａ】

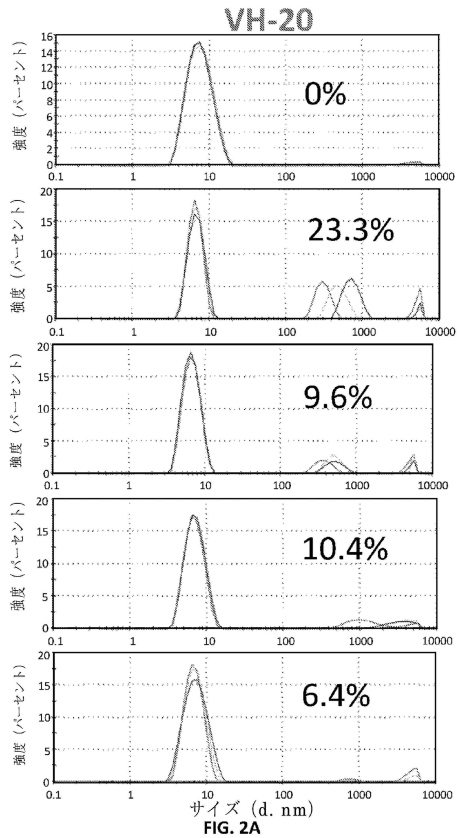


FIG. 2A

【図２Ｂ】

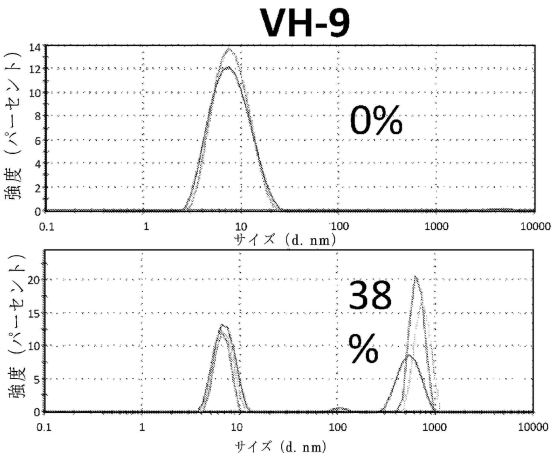


FIG. 2B

【図２Ｃ】

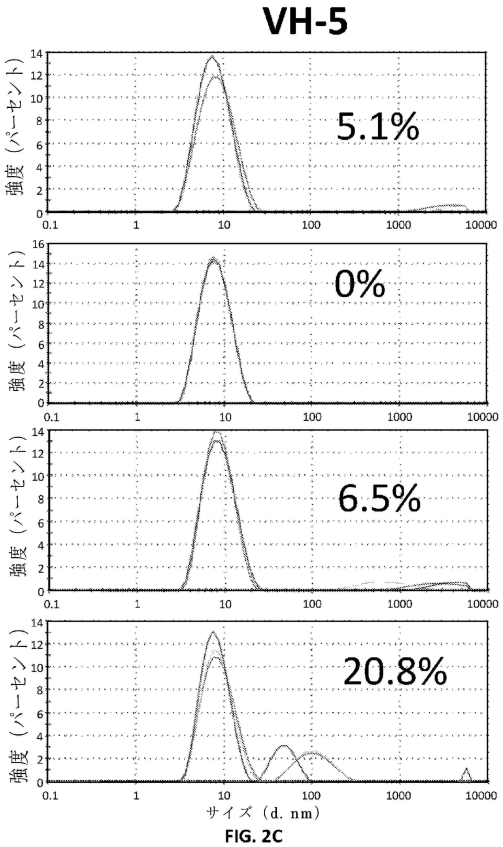


FIG. 2C

【図２Ｄ】

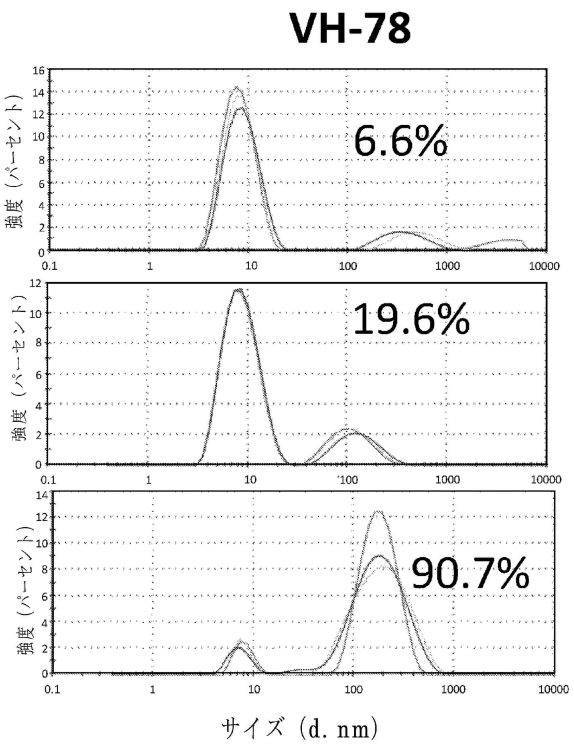


FIG. 2D

【図３Ａ】

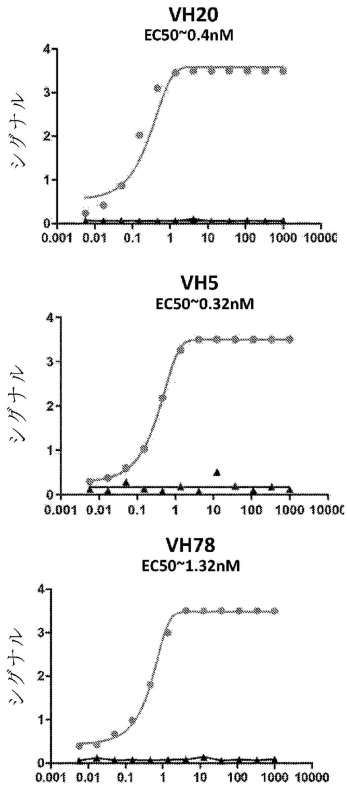


FIG. 3A

【図３Ｂ】

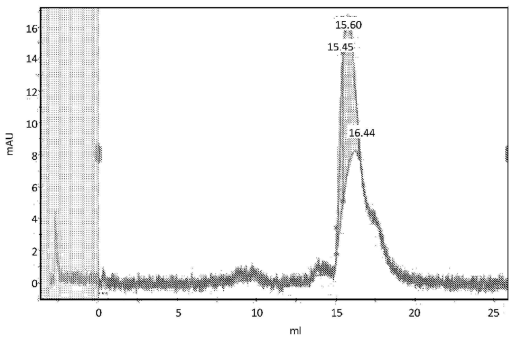


FIG. 3B

【図３Ｃ－３Ｄ】

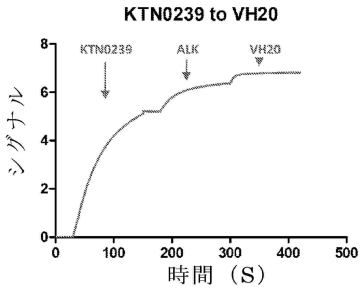


FIG. 3C

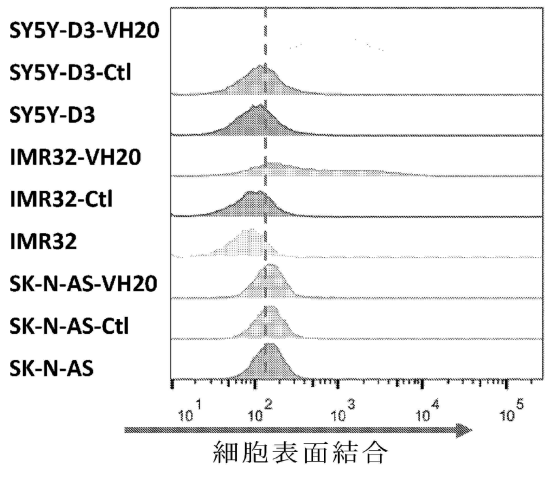


FIG. 3D

【図４】

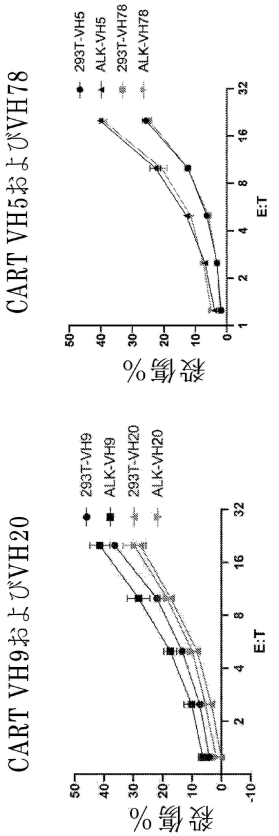


FIG. 4

【図５Ａ－５Ｂ】

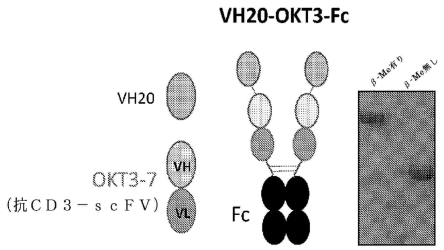


FIG. 5A

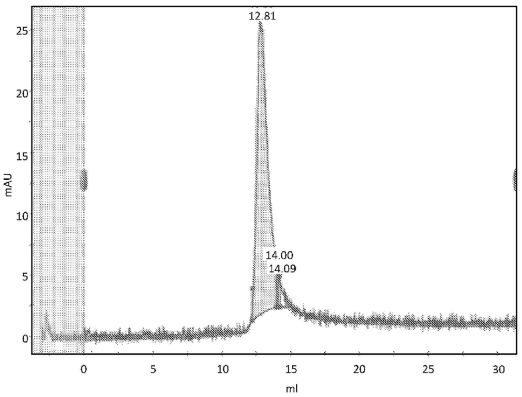


FIG. 5B

【図５Ｃ】

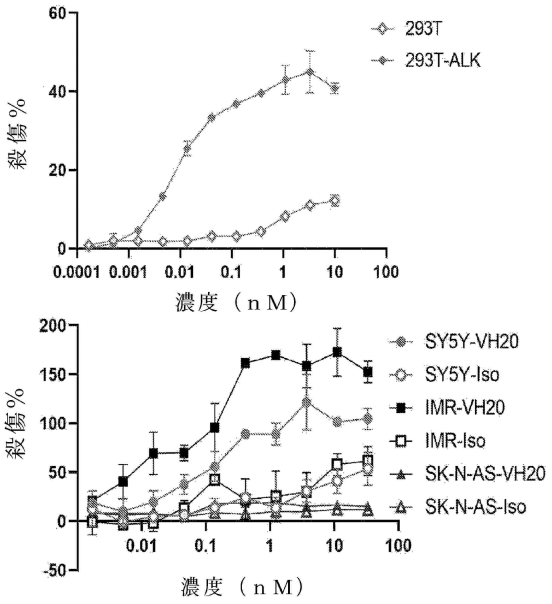


FIG. 5C

【図６Ａ】

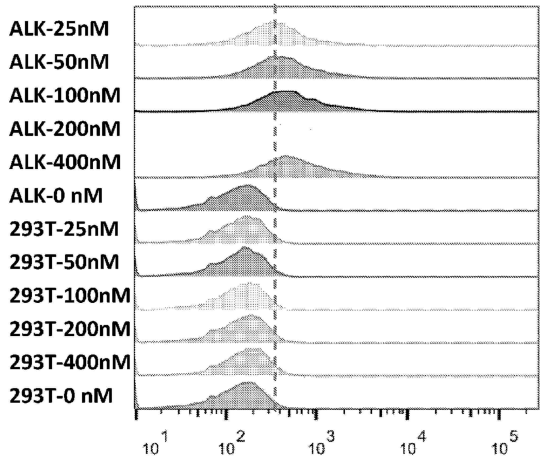


FIG. 6A

【図６Ｂ】

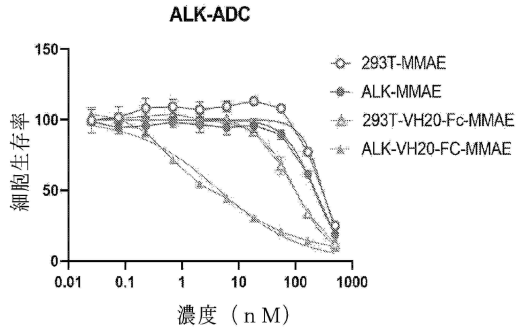


FIG. 6B

【配列表】

<u>２０２５５０４８９４０００００１．ｘｍｌ</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/61136

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☒ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/61136

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

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

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

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

3. ☒ Claims Nos.: 13-16
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***-Please See Supplemental Page-***-

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

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, Claims 1-12, and amino acids 733-960 of ALK (antibody binding region of ALK), VH20 (anti-ALK antibody), SEQ ID NOs: 3, 4, 5 (heavy chain CDR amino acid sequences), SEQ ID NO: 2 (heavy chain amino acid sequence).

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/61136

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. C07K 16/30; A61K 35/17; A61K 39/395 (2023.01)
ADD.
CPC - INV. C07K 16/30; A61K 35/17; A61K 39/39558
ADD. C07K 2317/31; C07K 2317/565; C07K 2317/76

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y --- A	US 2020/0157236 A1 (CELLDEX THERAPEUTICS, INC.) 21 May 2020; paragraphs [0006], [0106], [0126], [0365], [0626]; table 6	1-2, 8/1-2, 9/1-2 --- 10/2, 11/10/2, 12/2 --- 3-4, 6, 8/3-4, 8/6, 9/3-4, 9/6, 10/3-4, 10/6, 11/10/3-4, 11/10/6, 12/3-4, 12/6
X --- Y --- A	US 2016/0280798 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICE) 29 September 2016; paragraphs [0004], [0012], [0015], [0067], [0069], [0291]	1, 10/1, 11/10/1, 12/1 --- 10/2, 11/10/2, 12/2 --- 3-4, 6, 8/3-4, 8/6, 9/3-4, 9/6, 10/3-4, 10/6, 11/10/3-4, 11/10/6, 12/3-4, 12/6
A	WO 2021/155016 A1 (THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 5 August 2021; page 31, lines 1-5	3-4, 8/3-4, 9/3-4, 10/3-4, 11/10/3-4, 12/3-4
A	US 2020/0239550 A1 (ADIMAB LLC) 30 July 2020; table 5	3-4, 6, 8/3-4, 8/6, 9/3-4, 9/6, 10/3-4, 10/6, 11/10/3-4, 11/10/6, 12/3-4, 12/6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 June 2023 (25.06.2023)	AUG 01 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/61136

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	(AUSTIN, JW.et al.) Immunoglobulin heavy chain junction region, partial [Homo sapiens]. Genbank entry (online). National Institute of Biotechnology Information. 17 January 2019 (Retrieved on 25 June 2023). Retrieved from the Internet: [URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/MOO11367.1]; page 1	3-4, 8/3-4, 9/3-4, 10/3-4, 11/10/3-4, 12/3-4
A	(GOODWIN, E et al.) Immunoglobulin heavy chain variable region, partial [Homo sapiens]. Genbank entry (online). National Institute of Biotechnology Information. 11 July 2018 (Retrieved on 25 June 2023). Retrieved from the Internet: [URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AXA12304.1]; pages 1-2	6, 8/6, 9/6, 10/6, 11/10/6, 12/6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/61136

-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-12, and amino acids 733-960 of ALK (antibody binding region of ALK), VH20 (anti-ALK antibody), SEQ ID NOs: 3, 4, 5 (heavy chain CDR amino acid sequences), SEQ ID NO: 2 (heavy chain amino acid sequence) are directed towards anti-ALK antibodies and conjugates, chimeric antigen receptors, CAR-T cells, and bispecific T cell engagers associated therewith.

The anti-ALK antibodies, conjugates, chimeric antigen receptors, CAR-T cells, and bispecific T cell engagers of Claims 1-4 (each in-part), 6, 8/1-4, 8/6, 9/1-4, 9/6, 10/1-4, 10/6, 11/10/1-4, 11/10/6, 12/1-4, 12/6 are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched without fee to the extent that they encompass amino acids 733-960 of ALK (first exemplary antibody binding region of ALK), VH20 (first exemplary anti-ALK antibody), SEQ ID NOs: 3, 4, 5 (first exemplary heavy chain CDR amino acid sequences), SEQ ID NO: 2 (first exemplary heavy chain amino acid sequence). This first named invention of Group I+ has been selected to encompass the first species of each of the genera found in claims 1-4 and 6 based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines.

Applicant is invited to elect additional antibody binding region(s) of ALK, anti-ALK antibody(antibodies), heavy chain CDR and heavy chain amino acid sequences to be searched. Additional antibody binding region(s) of ALK, anti-ALK antibody(antibodies), heavy chain CDR and heavy chain amino acid sequences will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected antibody binding region(s) of ALK, anti-ALK antibody(antibodies), heavy chain CDR and heavy chain amino acid sequences. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. Exemplary elections would be amino acids 935-1038 of ALK (antibody binding region of ALK), VH78 (anti-ALK antibody), SEQ ID NOs: 3, 7, 8 (heavy chain CDR amino acid sequences), SEQ ID NO: 6 (heavy chain amino acid sequence).

Groups I+ share the technical features including: an isolated antibody or antigen binding fragment thereof immunologically specific for anaplastic lymphoma kinase or ALK, wherein said antibody or fragment thereof specifically binds amino acids of ALK; an immunoconjugate comprising the antibody or antigen binding fragment thereof; an antibody-drug conjugate or ADC comprising the antibody or antigen binding fragment thereof; a chimeric antigen receptor or CAR comprising the antibody or antigen binding fragment thereof; a CART-cell comprising the CAR; a bispecific T-cell engager comprising the antibody or antigen binding fragment thereof. These shared technical features are previously disclosed by US 2016/0280798 A1 to The United States of America, as Represented by the Secretary, Department of Health and Human Service, (hereinafter "DHHS").

DHHS discloses an isolated antibody or antigen binding fragment thereof immunologically specific for anaplastic lymphoma kinase or ALK, wherein said antibody or fragment thereof specifically binds amino acids of ALK (isolated human monoclonal neutralizing antibodies and antigen binding fragments thereof that specifically bind to ALK; paragraph [0015]); an immunoconjugate comprising the antibody or antigen binding fragment thereof (isolated human monoclonal neutralizing antibodies and antigen binding fragments thereof that specifically bind to ALK and their conjugates with drugs (immunoconjugate); paragraphs [0015], [0102], [0325]); an antibody-drug conjugate or ADC comprising the antibody or antigen binding fragment thereof (isolated human monoclonal neutralizing antibodies and antigen binding fragments thereof that specifically bind to ALK and their conjugates with drugs (ADC); paragraphs [0015], [0102], [0325]); a chimeric antigen receptor or CAR comprising the antibody or antigen binding fragment thereof (CARs that specifically bind to the extracellular domain of ALK protein comprising an anti-ALK antibody; paragraphs [0004], [0015]); a CART-cell comprising the CAR (CART cells made by transducing a T cell with the vector or nucleic acid molecule encoding a CAR that specifically binds ALK and comprises anti-ALK antibody; paragraphs [0004], [0012], [0015]); a bispecific T-cell engager comprising the antibody or antigen binding fragment thereof (bispecific antibodies may be generated that bind specifically to ALK and another antigen, such as CD3, which is a T cell receptor protein (T cell engager); paragraph [0291]).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions are found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the DHHS reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*39/395(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ	*47/68 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｌ	
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2025.01)*	Ａ６１Ｋ	47/68		
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17		
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		
		Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	

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

ール カンファレンス センター ファースト フロア

(74)代理人 110000109

弁理士法人特許事務所サイクス

(72)発明者 ディミトロフ ディミター

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 １５２２０ ピッツバーグ グリーンローン ドライブ １０４０

(72)発明者 チェン チュアン

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 １５２１３ ピッツバーグ ケネット スクエア ３２６７

(72)発明者 スン ゼーフア

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 １５２３７ ピッツバーグ ポイント ヴュー ドライブ １２３

(72)発明者 モッセ ヤエル

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 １９０７２ ペン バレー コンショホッケン ステイト ロード ７１２

Ｆターム（参考） 4B065 AA90Y AA94X AB01 AC14 AC20 BA01 CA24 CA25 CA44
4C076 AA95 CC27 CC41 EE41 EE59 FF70
4C084 AA19 MA02 NA05 NA14 ZB26 ZC20
4C085 AA14 AA25 BB11 BB31 DD62 EE01
4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 CA12 MA02 NA05 NA14 ZB26 ZC20
4H045 AA11 AA30 BA10 BA40 BA41 BA50 CA40 DA75 EA20 FA74