

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-549537

(P2023-549537A)

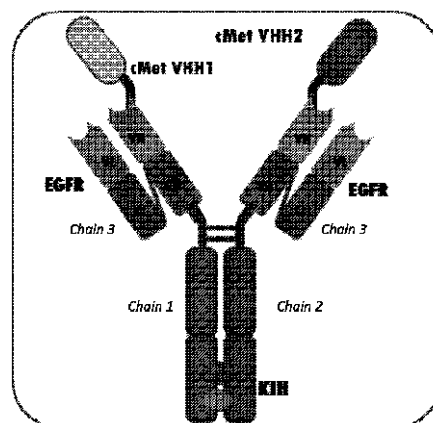
(43)公表日 令和5年11月27日(2023.11.27)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28		4 B 0 6 5
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全119頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-528957(P2023-528957)	(71)出願人	523177850	最終頁に続く	
(86)(22)出願日	令和3年11月16日(2021.11.16)		エイビー セラピューティクス インコーポレイテッド		
(85)翻訳文提出日	令和5年7月4日(2023.7.4)		アメリカ合衆国 9 4 5 4 5 カリフォルニア州 ハイワード インベストメント プールバード 3 5 4 1 スイート 3		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/059444	(74)代理人	100102978		
(87)国際公開番号	WO2022/104236		弁理士 清水 初志		
(87)国際公開日	令和4年5月19日(2022.5.19)	(74)代理人	100205707		
(31)優先権主張番号	63/114,479		弁理士 小寺 秀紀		
(32)優先日	令和2年11月16日(2020.11.16)	(74)代理人	100160923		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 山口 裕孝		
(31)優先権主張番号	63/237,526	(74)代理人	100119507		
(32)優先日	令和3年8月26日(2021.8.26)		弁理士 刑部 俊		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100142929		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA)			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 多重特異性抗体およびその使用方法

(57)【要約】

本開示は、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）またはその抗原結合断片に関する。1つの局面において、多重特異性抗体またはその抗原結合断片は、cMETおよび/もしくはEGFR、またはそれらの組み合わせに結合する。cMET（チロシンタンパク質キナーゼMet）に結合する抗体またはその抗原結合断片は、相補性決定領域（CDR）1、2、および3を含む重鎖抗体可変ドメイン（VHH）を含む。



TriSpecific-V3

FIG. 18B

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

相補性決定領域（CDR）1、2、および3を含む重鎖抗体可変ドメイン（VHH）を含む、cMET（チロシンタンパク質キナーゼMet）に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、

VHH CDR1領域が、選択されたVHH CDR1アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、VHH CDR2領域が、選択されたVHH CDR2アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、およびVHH CDR3領域が、選択されたVHH CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み；

該選択されたVHH CDR1、2、および3のアミノ酸配列が、以下：

（1）該選択されたVHH CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 1、2、および3に示される；

（2）該選択されたVHH CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 4、5、および6に示される；

（3）該選択されたVHH CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 7、8、および9に示される；ならびに

（4）該選択されたVHH CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 10、11、および12に示される

のうちの1つである、

前記抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

前記VHHが、それぞれ、SEQ ID NO: 1、2、および3に示されるアミノ酸配列を有するCDR1、2、3を含む、請求項1記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

前記VHHが、それぞれ、SEQ ID NO: 4、5、および6に示されるアミノ酸配列を有するCDR1、2、3を含む、請求項1記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4】

前記VHHが、それぞれ、SEQ ID NO: 7、8、および9に示されるアミノ酸配列を有するCDR1、2、3を含む、請求項1記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

前記VHHが、それぞれ、SEQ ID NO: 10、11、および12に示されるアミノ酸配列を有するCDR1、2、3を含む、請求項1記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

選択されたVHH配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖抗体可変ドメイン（VHH）を含む、cMETに結合する抗体またはその抗原結合断片であって、該選択されたVHH配列が、SEQ ID NO: 19～22および77～84からなる群より選択される、前記抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 7】

前記VHHが、SEQ ID NO: 19、77、78、79、80、81、または84の配列を含む、請求項6記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 8】

前記VHHが、SEQ ID NO: 20の配列を含む、請求項6記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9】

前記VHHが、SEQ ID NO: 21の配列を含む、請求項6記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 10】

前記VHHが、SEQ ID NO: 22、82、または83の配列を含む、請求項6記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 11】

cMETに特異的に結合する、請求項1～10のいずれか一項記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項12】

ヒト化抗体またはその抗原結合断片である、請求項1～11のいずれか一項記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項13】

請求項1～12のいずれか一項記載の抗体またはその抗原結合断片のVHH CDR1、2、3を含む、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項14】

ヒトIgG Fcを含む、請求項1～13のいずれか一項記載の抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項15】

2つ以上の重鎖抗体可変ドメインを含む、請求項1～14のいずれか一項記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項16】

請求項1～15のいずれか一項記載の抗体またはその抗原結合断片と交差競合する、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項17】

EGFRに特異的に結合する第1の抗原結合部位、およびcMETに特異的に結合する第2の抗原結合部位を含む、多重特異性抗体またはその抗原結合断片。

【請求項18】

20

前記第1の抗原結合部位が、重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含み、該VHおよび該VLが、互いに会合して、EGFRに特異的に結合し、

該重鎖可変領域（VH）が、相補性決定領域（CDR）1、2、および3を含み、VH CDR1領域が、SEQ ID NO: 13と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、VH CDR2領域が、SEQ ID NO: 14と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、およびVH CDR3領域が、SEQ ID NO: 15と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み；ならびに

該軽鎖可変領域（VL）が、CDR1、2、および3を含み、VL CDR1領域が、SEQ ID NO: 16と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、VL CDR2領域が、SEQ ID NO: 17と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、およびVL CDR3領域が、SEQ ID NO: 18と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項17記載の多重特異性抗体またはその抗原結合断片。

30

【請求項19】

前記重鎖可変領域（VH）が、SEQ ID NO: 23と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含み、および軽鎖可変領域（VL）が、SEQ ID NO: 24と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項18記載の多重特異性抗体またはその抗原結合断片。

【請求項20】

前記第2の抗原結合部位が、cMETに特異的に結合し、かつ該第2の抗原結合部位が、相補性決定領域（CDR）1、2、および3を含む第1の重鎖抗体可変ドメイン（VHH1）を含み、VHH1 CDR1領域が、選択されたVHH1 CDR1アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、VHH1 CDR2領域が、選択されたVHH1 CDR2アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、およびVHH1 CDR3領域が、選択されたVHH1 CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み；該選択されたVHH1 CDR1、2、および3のアミノ酸配列が、以下：

40

（1）該選択されたVHH1 CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 1、2、および3に示される；

（2）該選択されたVHH1 CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 4、5、および6に示される；

（3）該選択されたVHH1 CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 7、8、および9に示される；ならびに

50

(4) 該選択されたVHH1 CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 10、11、および12に示される
のうちの1つである、

請求項17～19のいずれか一項記載の多重特異性抗体またはその抗原結合断片。

【請求項21】

前記第1の重鎖抗体可変ドメイン(VHH1)が、選択されたVHH配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、該選択されたVHH配列が、SEQ ID NO: 19～22および77～84からなる群より選択される、請求項20記載の多重特異性抗体またはその抗原結合断片。

【請求項22】

cMETに特異的に結合する第3の抗原結合部位をさらに含む、請求項17～21のいずれか一項記載の多重特異性抗体またはその抗原結合断片。

【請求項23】

前記第3の抗原結合部位が、cMETに特異的に結合し、かつ該第3の抗原結合部位が、相補性決定領域(CDR)1、2、および3を含む第2の重鎖抗体可変ドメイン(VHH2)を含み、VHH2 CDR1領域が、選択されたVHH2 CDR1アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、VHH2 CDR2領域が、選択されたVHH2 CDR2アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、およびVHH2 CDR3領域が、選択されたVHH2 CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み；

該選択されたVHH2 CDR1、2、および3のアミノ酸配列が、以下：

(1) 該選択されたVHH2 CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 1、2、および3に示される；

(2) 該選択されたVHH2 CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 4、5、および6に示される；

(3) 該選択されたVHH2 CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 7、8、および9に示される；ならびに

(4) 該選択されたVHH2 CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 10、11、および12に示される
のうちの1つである、

請求項22記載の多重特異性抗体またはその抗原結合断片。

【請求項24】

前記第2の重鎖抗体可変ドメイン(VHH2)が、選択されたVHH2配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、該選択されたVHH2配列が、SEQ ID NO: 19～22および77～84からなる群より選択される、請求項23記載の多重特異性抗体またはその抗原結合断片。

【請求項25】

前記VHおよび前記VLが、scFvを形成するようにリンカーペプチド配列によって連結されている、請求項17～24のいずれか一項記載の多重特異性抗体またはその抗原結合断片。

【請求項26】

前記リンカーペプチド配列が、SEQ ID NO: 37～42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む、請求項25記載の多重特異性抗体またはその抗原結合断片。

【請求項27】

(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖抗体可変ドメイン(VHH)、第1のヒンジ領域、第1のFc領域を含む、第1のポリペプチド；

(b) N末端からC末端へ、重鎖可変領域(VH)、第2のヒンジ領域、および第2のFc領域を含む、第2のポリペプチド；ならびに

(c) 軽鎖可変領域(VL)を含む、第3のポリペプチド
を含む、ポリペプチド複合体であって、

該第1のVHHが、cMETに特異的に結合し、該VHおよび該VLが、互いに会合して、E

10

20

30

40

50

GFRに特異的に結合する、
前記ポリペプチド複合体。

【請求項 28】

前記第1のヒンジ領域および/または前記第2のヒンジ領域が、SEQ ID NO: 25～29のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む、請求項27記載のポリペプチド複合体。

【請求項 29】

前記第1のFc領域および/または前記第2のFc領域が、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項27または28記載のポリペプチド複合体。

【請求項 30】

前記第1のポリペプチドが、SEQ ID NO: 43もしくは44と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第2のポリペプチドが、SEQ ID NO: 45もしくは46と少なくとも80%同一である配列を含み；および/または前記第3のポリペプチドが、SEQ ID NO: 47と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項27～29のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項 31】

前記第1のポリペプチドが、cMETに特異的に結合する第2のVHHをさらに含み、該第2のVHHが、リンカーペプチド配列を介して第1のVHHのN末端に連結されている、請求項27～30のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項 32】

前記リンカーペプチド配列が、SEQ ID NO: 37～42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む、請求項31記載のポリペプチド複合体。

【請求項 33】

前記第1のポリペプチドが、SEQ ID NO: 48もしくは49と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第2のポリペプチドが、SEQ ID NO: 50もしくは51と少なくとも80%同一である配列を含み；および/または前記第3のポリペプチドが、SEQ ID NO: 52と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項31または32記載のポリペプチド複合体。

【請求項 34】

前記第1のFc領域および/または前記第2のFc領域が、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸 (Asp)、および/またはEUナンバリングに従う332位のグルタミン酸 (Glu) を含む、請求項27～33のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項 35】

(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖抗体可変ドメイン (VHH)、第1のヒンジ領域、第1のFc領域を含む、第1のポリペプチド；ならびに

(b) N末端からC末端へ、一本鎖可変断片 (scFv)、第2のヒンジ領域、および第2のFc領域を含む、第2のポリペプチド
を含む、ポリペプチド複合体であって、

該第1のVHHが、cMETに特異的に結合し；該scFvが、重鎖可変領域 (VH)、第1のリンカーペプチド配列、および軽鎖可変領域 (VL) を含み；該VHおよび該VLが、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する、
前記ポリペプチド複合体。

【請求項 36】

前記第1のリンカーペプチド配列が、SEQ ID NO: 37～42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む、請求項35記載のポリペプチド複合体。

【請求項 37】

前記第1のヒンジ領域および/または前記第2のヒンジ領域が、SEQ ID NO: 25～29のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む、請求項35または36記載のポリペプチド複合体。

【請求項 38】

10

20

30

40

50

前記第1のFc領域および/または前記第2のFc領域が、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項35~37のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項39】

前記第1のポリペプチドが、SEQ ID NO: 53もしくは54と少なくとも80%同一である配列を含み；および/または前記第2のポリペプチドが、SEQ ID NO: 55もしくは56と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項35~38のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項40】

前記第1のポリペプチドが、cMETに特異的に結合する第2のVHHをさらに含み、該第2のVHHが、第2のリンカーペプチド配列を介して第1のVHHのN末端に連結されている、請求項35~39のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

10

【請求項41】

前記第2のリンカーペプチド配列が、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む、請求項40記載のポリペプチド複合体。

【請求項42】

前記第1のポリペプチドが、SEQ ID NO: 57もしくは58と少なくとも80%同一である配列を含み；および/または前記第2のポリペプチドが、SEQ ID NO: 59もしくは60と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項40または41記載のポリペプチド複合体。

20

【請求項43】

前記第1のFc領域および/または前記第2のFc領域が、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸(Asp)、および/またはEUナンバリングに従う332位のグルタミン酸(Glu)を含む、請求項35~42のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項44】

(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖抗体可変ドメイン(VHH1)、第1のリンカーペプチド配列、第1の重鎖可変領域(VH1)、第1のヒンジ領域、および第1のFc領域を含む、第1のポリペプチド；

(b) 第1の軽鎖可変領域(VL1)を含む、第2のポリペプチド；

(c) N末端からC末端へ、第2の重鎖抗体可変ドメイン(VHH2)、第2のリンカーペプチド配列、第2の重鎖可変領域(VH2)、第2のヒンジ領域、および第2のFc領域を含む、第3のポリペプチド；ならびに

30

(d) 第2の軽鎖可変領域(VL2)を含む、第4のポリペプチドを含む、ポリペプチド複合体であって、

該VHH1および該VHH2が、cMETに特異的に結合し；該VH1および該VL1が、互いに会合して、EGFRに特異的に結合し；該VH2および該VL2が、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する、
前記ポリペプチド複合体。

【請求項45】

前記第1のリンカーペプチド配列および/または前記第2のリンカーペプチド配列が、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む、請求項44記載のポリペプチド複合体。

40

【請求項46】

前記第1のヒンジ領域および/または前記第2のヒンジ領域が、SEQ ID NO: 25~29のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む、請求項44または45記載のポリペプチド複合体。

【請求項47】

前記VHH1および前記VHH2の配列が、同一である、請求項44~46のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項48】

50

前記第1のFc領域および/または前記第2のFc領域が、SEQ ID NO: 32と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項47記載のポリペプチド複合体。

【請求項49】

前記第1のポリペプチドが、SEQ ID NO: 61もしくは62と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第2のポリペプチドが、SEQ ID NO: 63と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第3のポリペプチドが、SEQ ID NO: 61もしくは62と少なくとも80%同一である配列を含み；および/または前記第4のポリペプチドが、SEQ ID NO: 63と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項47または48記載のポリペプチド複合体。

【請求項50】

前記VHH1および前記VHH2の配列が、異なる、請求項44～46のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項51】

前記第1のFc領域および/または前記第2のFc領域が、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項50記載のポリペプチド複合体。

【請求項52】

(1) 前記第1のポリペプチドが、SEQ ID NO: 64もしくは65と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第2のポリペプチドが、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第3のポリペプチドが、SEQ ID NO: 66もしくは67と少なくとも80%同一である配列を含み；および/または前記第4のポリペプチドが、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%同一である配列を含む；または

(2) 前記第1のポリペプチドが、SEQ ID NO: 85と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第2のポリペプチドが、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第3のポリペプチドが、SEQ ID NO: 86と少なくとも80%同一である配列を含み；および/または前記第4のポリペプチドが、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項50または51記載のポリペプチド複合体。

【請求項53】

前記第1のFc領域および/または前記第2のFc領域が、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸(Asp)、および/またはEUナンバリングに従う332位のグルタミン酸(Glu)を含む、請求項44～52のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項54】

(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖可変領域(VH1)、第1のヒンジ領域、第1のFc領域、第1のリンカーペプチド配列、および第1の重鎖抗体可変ドメイン(VHH1)を含む、第1のポリペプチド；

(b) 第1の軽鎖可変領域(VL1)を含む、第2のポリペプチド；

(c) N末端からC末端へ、第2の重鎖可変領域(VH2)、第2のヒンジ領域、第2のFc領域、第2のリンカーペプチド配列、および第2の重鎖抗体可変ドメイン(VHH2)を含む、第3のポリペプチド；ならびに

(d) 第2の軽鎖可変領域(VL2)を含む、第4のポリペプチドを含む、ポリペプチド複合体であって、

該VHH1および/または該VHH2が、cMETに特異的に結合し；該VH1および該VL1が、互いに会合して、EGFRに特異的に結合し；該VH2および該VL2が、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する、前記ポリペプチド複合体。

【請求項55】

前記第1のリンカーペプチド配列および/または前記第2のリンカーペプチド配列が、SEQ ID NO: 37～42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む、請求項54記載のポリペプチド複合体。

【請求項56】

10

20

30

40

50

前記第1のヒンジ領域および/または前記第2のヒンジ領域が、SEQ ID NO: 25～29のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む、請求項54または55記載のポリペプチド複合体。

【請求項57】

前記VHH1および前記VHH2の配列が、同一である、請求項54～56のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項58】

前記第1のFc領域および/または前記第2のFc領域が、SEQ ID NO: 32と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項57記載のポリペプチド複合体。

【請求項59】

前記第1のポリペプチドが、SEQ ID NO: 69もしくは70と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第2のポリペプチドが、SEQ ID NO: 71と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第3のポリペプチドが、SEQ ID NO: 69もしくは70と少なくとも80%同一である配列を含み；および/または前記第4のポリペプチドが、SEQ ID NO: 71と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項57または58記載のポリペプチド複合体。

【請求項60】

前記VHH1および前記VHH2の配列が、異なる、請求項54～56のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項61】

前記第1のFc領域および/または前記第2のFc領域が、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項60記載のポリペプチド複合体。

【請求項62】

前記第1のポリペプチドが、SEQ ID NO: 72もしくは73と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第2のポリペプチドが、SEQ ID NO: 76と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第3のポリペプチドが、SEQ ID NO: 74もしくは75と少なくとも80%同一である配列を含み；および/または前記第4のポリペプチドが、SEQ ID NO: 76と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項60または61記載のポリペプチド複合体。

【請求項63】

前記第1のFc領域および/または前記第2のFc領域が、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸(Asp)、および/またはEUナンバリングに従う332位のグルタミン酸(Glu)を含む、請求項54～62のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項64】

(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖抗体可変ドメイン(VHH)、第1のヒンジ領域、第1のFc領域を含む、第1のポリペプチド；

(b) N末端からC末端へ、重鎖可変領域(VH)、第2のヒンジ領域、および第2のFc領域を含む、第2のポリペプチド；ならびに

(c) 軽鎖可変領域(VL)を含む、第3のポリペプチドを含む、ポリペプチド複合体であって、

該第1のVHHが、cMETに特異的に結合し、該VHおよび該VLが、互いに会合して、EGFRに特異的に結合し；該第1のポリペプチドが、cMETに特異的に結合する第2のVHHをさらに含み、該第2のVHHが、リンカーペプチド配列を介して第1のVHHのN末端に連結されている、前記ポリペプチド複合体。

【請求項65】

前記第1のヒンジ領域および/または前記第2のヒンジ領域が、SEQ ID NO: 25～29のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む、請求項64記載のポリペプチド複合体。

【請求項66】

10

20

30

40

50

前記第1のFc領域および/または前記第2のFc領域が、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項64または65記載のポリペプチド複合体。

【請求項67】

前記リンカーペプチド配列が、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む、請求項64~66のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項68】

前記第1のポリペプチドが、SEQ ID NO: 48もしくは49と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第2のポリペプチドが、SEQ ID NO: 50もしくは51と少なくとも80%同一である配列を含み；ならびに/または前記第3のポリペプチドが、SEQ ID NO: 52と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項64~67のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

10

【請求項69】

前記第1のFc領域および/または前記第2のFc領域が、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸(Asp)、および/またはEUナンバリングに従う332位のグルタミン酸(Glu)を含む、請求項64~68のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項70】

(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖抗体可変ドメイン(VHH)、第1のヒンジ領域、第1のFc領域を含む、第1のポリペプチド；ならびに

(b) N末端からC末端へ、一本鎖可変断片(scFv)、第2のヒンジ領域、および第2のFc領域を含む、第2のポリペプチドを含む、ポリペプチド複合体であって、

20

該第1のVHHが、cMETに特異的に結合し；該scFvが、重鎖可変領域(VH)、第1のリンカーペプチド配列、および軽鎖可変領域(VL)を含み；該VHおよび該VLが、互いに会合して、EGFRに特異的に結合し；該第1のポリペプチドが、cMETに特異的に結合する第2のVHHをさらに含み、該第2のVHHが、第2のリンカーペプチド配列を介して第1のVHHのN末端に連結されている、前記ポリペプチド複合体。

【請求項71】

前記第1のリンカーペプチド配列および/または前記第2のリンカーペプチド配列が、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む、請求項70記載のポリペプチド複合体。

30

【請求項72】

前記第1のヒンジ領域および/または前記第2のヒンジ領域が、SEQ ID NO: 25~29のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む、請求項70または71記載のポリペプチド複合体。

【請求項73】

前記第1のFc領域および/または前記第2のFc領域が、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項70~72のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項74】

40

前記第1のポリペプチドが、SEQ ID NO: 57もしくは58と少なくとも80%同一である配列を含み；および/または前記第2のポリペプチドが、SEQ ID NO: 59もしくは60と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項70~73のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項75】

前記第1のFc領域および/または前記第2のFc領域が、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸(Asp)、および/またはEUナンバリングに従う332位のグルタミン酸(Glu)を含む、請求項70~74のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項76】

(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖抗体可変ドメイン(VHH1)、第1のリンカーペ

50

プチド配列、第1の重鎖可変領域（VH1）、第1のヒンジ領域、および第1のFc領域を含む、第1のポリペプチド；

（b）第1の軽鎖可変領域（VL1）を含む、第2のポリペプチド；

（c）N末端からC末端へ、第2の重鎖抗体可変ドメイン（VHH2）、第2のリンカーペプチド配列、第2の重鎖可変領域（VH2）、第2のヒンジ領域、および第2のFc領域を含む、第3のポリペプチド；ならびに

（d）第2の軽鎖可変領域（VL2）を含む、第4のポリペプチドを含む、ポリペプチド複合体であって、

該VHH1および該VHH2が、cMETに特異的に結合し；該VH1および該VL1が、互いに会合して、EGFRに特異的に結合し；該VH2および該VL2が、互いに会合して、EGFRに特異的に結合し；該VHH1および該VHH2の配列が、異なる、前記ポリペプチド複合体。

10

【請求項77】

前記第1のリンカーペプチド配列および/または前記第2のリンカーペプチド配列が、SEQ ID NO: 37～42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む、請求項76記載のポリペプチド複合体。

【請求項78】

前記第1のヒンジ領域および/または前記第2のヒンジ領域が、SEQ ID NO: 25～29のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む、請求項76または77記載のポリペプチド複合体。

20

【請求項79】

前記第1のFc領域および/または前記第2のFc領域が、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項76～78のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項80】

（1）前記第1のポリペプチドが、SEQ ID NO: 64もしくは65と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第2のポリペプチドが、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第3のポリペプチドが、SEQ ID NO: 66もしくは67と少なくとも80%同一である配列を含み；および/または前記第4のポリペプチドが、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%同一である配列を含む；または

30

（2）前記第1のポリペプチドが、SEQ ID NO: 85と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第2のポリペプチドが、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第3のポリペプチドが、SEQ ID NO: 86と少なくとも80%同一である配列を含み；および/または前記第4のポリペプチドが、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%同一である配列を含む、

請求項76～79のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項81】

前記第1のFc領域および/または前記第2のFc領域が、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸（Asp）、および/またはEUナンバリングに従う332位のグルタミン酸（Glu）を含む、請求項76～80のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

40

【請求項82】

（a）N末端からC末端へ、第1の重鎖可変領域（VH1）、第1のヒンジ領域、第1のFc領域、第1のリンカーペプチド配列、および第1の重鎖抗体可変ドメイン（VHH1）を含む、第1のポリペプチド；

（b）第1の軽鎖可変領域（VL1）を含む、第2のポリペプチド；

（c）N末端からC末端へ、第2の重鎖可変領域（VH2）、第2のヒンジ領域、第2のFc領域、第2のリンカーペプチド配列、および第2の重鎖抗体可変ドメイン（VHH2）を含む、第3のポリペプチド；ならびに

（d）第2の軽鎖可変領域（VL2）を含む、第4のポリペプチドを含む、ポリペプチド複合体であって、

50

該VHH1および/または該VHH2が、cMETに特異的に結合し；該VH1および該VL1が、互いに会合して、EGFRに特異的に結合し；該VH2および該VL2が、互いに会合して、EGFRに特異的に結合し；該VHH1および該VHH2の配列が、異なる、前記ポリペプチド複合体。

【請求項 8 3】

前記第1のリンカーペプチド配列および/または前記第2のリンカーペプチド配列が、SEQ ID NO: 37～42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む、請求項82記載のポリペプチド複合体。

【請求項 8 4】

前記第1のヒンジ領域および/または前記第2のヒンジ領域が、SEQ ID NO: 25～29のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む、請求項82または83記載のポリペプチド複合体。

【請求項 8 5】

前記第1のFc領域および/または前記第2のFc領域が、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項82～84のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項 8 6】

前記第1のポリペプチドが、SEQ ID NO: 72もしくは73と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第2のポリペプチドが、SEQ ID NO: 76と少なくとも80%同一である配列を含み；前記第3のポリペプチドが、SEQ ID NO: 74もしくは75と少なくとも80%同一である配列を含み；および/または前記第4のポリペプチドが、SEQ ID NO: 76と少なくとも80%同一である配列を含む、請求項82～85のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項 8 7】

前記第1のFc領域および/または前記第2のFc領域が、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸(Asp)、および/またはEUナンバリングに従う332位のグルタミン酸(Glu)を含む、請求項82～86のいずれか一項記載のポリペプチド複合体。

【請求項 8 8】

請求項1～16のいずれか一項記載の抗体もしくはその抗原結合断片、請求項17～26のいずれか一項記載の多重特異性抗体もしくはその抗原結合断片、または請求項27～87のいずれか一項記載のポリペプチド複合体をコードするポリヌクレオチドを含む、核酸。

【請求項 8 9】

DNA(例えば、cDNA)またはRNA(例えば、mRNA)である、請求項88記載の核酸。

【請求項 9 0】

請求項88または89記載の核酸のうちの1つまたは複数を含む、ベクター。

【請求項 9 1】

請求項90記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 9 2】

CHO細胞である、請求項91記載の細胞。

【請求項 9 3】

請求項88または89記載の核酸のうちの1つまたは複数を含む、細胞。

【請求項 9 4】

抗体またはその抗原結合断片を作製する方法であって、

(a) 請求項91～93のいずれか一項記載の細胞を、該細胞が抗体または抗原結合断片を産生するのに十分な条件下で培養する工程；および

(b) 該細胞によって産生された抗体または抗原結合断片を収集する工程を含む、前記方法。

【請求項 9 5】

治療剤に共有結合で結合した、請求項1～16のいずれか一項記載の抗体もしくはその

10

20

30

40

50

抗原結合断片、請求項17～26のいずれか一項記載の多重特異性抗体もしくはその抗原結合断片、または請求項27～87のいずれか一項記載のポリペプチド複合体を含む、抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項96】

前記治療剤が、細胞傷害剤または細胞増殖抑制剤である、請求項95記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項97】

がんを有する対象を処置する方法であって、請求項1～16のいずれか一項記載の抗体もしくはその抗原結合断片、請求項17～26のいずれか一項記載の多重特異性抗体もしくはその抗原結合断片、請求項27～87のいずれか一項記載のポリペプチド複合体、または請求項95もしくは96記載の抗体-薬物コンジュゲートを含む、治療的有効量の組成物を、該対象に投与する工程を含む、前記方法。

10

【請求項98】

前記対象が、cMETを発現するがんを有する、請求項97記載の方法。

【請求項99】

前記対象が、EGFRを発現するがんを有する、請求項97または98記載の方法。

【請求項100】

前記がんが肺がんである、請求項97～99のいずれか一項記載の方法。

【請求項101】

前記がんが非小細胞肺癌（NSCLC）である、請求項100記載の方法。

20

【請求項102】

腫瘍成長の速度を減少させる方法であって、腫瘍細胞を、請求項1～16のいずれか一項記載の抗体もしくはその抗原結合断片、請求項17～26のいずれか一項記載の多重特異性抗体もしくはその抗原結合断片、請求項27～87のいずれか一項記載のポリペプチド複合体、または請求項95もしくは96記載の抗体-薬物コンジュゲートを含む、有効量の組成物と、接触させる工程を含む、前記方法。

【請求項103】

腫瘍細胞を殺傷する方法であって、腫瘍細胞を、請求項1～16のいずれか一項記載の抗体もしくはその抗原結合断片、請求項17～26のいずれか一項記載の多重特異性抗体もしくはその抗原結合断片、請求項27～87のいずれか一項記載のポリペプチド複合体、または請求項95もしくは96記載の抗体-薬物コンジュゲートを含む、有効量の組成物と、接触させる工程を含む、前記方法。

30

【請求項104】

腫瘍細胞を殺傷する方法であって、腫瘍細胞を、請求項1～16のいずれか一項記載の抗体もしくはその抗原結合断片、請求項17～26のいずれか一項記載の多重特異性抗体もしくはその抗原結合断片、請求項27～87のいずれか一項記載のポリペプチド複合体、または請求項95もしくは96記載の抗体-薬物コンジュゲートを含む、有効量の組成物と、接触させる工程を含む、前記方法。

【請求項105】

請求項1～16のいずれか一項記載の抗体またはその抗原結合断片、請求項17～26のいずれか一項記載の多重特異性抗体またはその抗原結合断片、請求項27～87のいずれか一項記載のポリペプチド複合体、および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

40

【請求項106】

請求項95または96記載の抗体-薬物コンジュゲート、および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権の主張

本出願は、2020年11月16日に提出された米国特許仮出願第63/114,479号および2

50

021年8月26日に出願された米国特許仮出願第63/237,526号の恩典を主張する。前述の出願の全内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

技術分野

本開示は、多重特異性抗体またはその抗原結合断片に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

多重特異性抗体は、2つ以上の異なるエピトープに同時に結合することができる人工タンパク質である。これは、腫瘍細胞に対するT細胞のリダイレクト、2つの異なるシグナル伝達経路の同時の遮断、異なる疾患メディエーターの二重ターゲティング、および標的部位へのペイロードの送達を含む、広範囲の応用を可能にする。カツマキソマブ（抗EpCAMおよび抗CD3）ならびにプリナツモマブ（抗CD19および抗CD3）の承認は、多重特異性抗体の開発における大きなマイルストーンになった。

【0004】

多重特異性抗体は、様々な応用性を有するため、多重特異性抗体に基づく様々な治療薬を開発し続ける必要がある。

【発明の概要】

【0005】

概要

本開示は、cMETおよび/もしくはEGFR、またはそれらの組み合わせに特異的に結合する、抗体または抗原結合断片に関する。いくつかの態様において、本開示は、cMET/EGFRを標的とする二重特異性抗体の開発に関する。いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体は、非小細胞肺癌（NSCLC）を処置することができる。

【0006】

1つの局面において、本開示は、相補性決定領域（CDR）1、2、および3を含む重鎖抗体可変ドメイン（VHH）を含む、cMET（チロシンタンパク質キナーゼMet）に結合する抗体またはその抗原結合断片に関する。

【0007】

いくつかの態様において、VHH CDR1領域は、選択されたVHH CDR1アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、VHH CDR2領域は、選択されたVHH CDR2アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、およびVHH CDR3領域は、選択されたVHH CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、選択されたVHH CDR1、2、および3のアミノ酸配列は、以下：

(1) 選択されたVHH CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 1、2、および3に示される；

(2) 選択されたVHH CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 4、5、および6に示される；

(3) 選択されたVHH CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 7、8、および9に示される；ならびに

(4) 選択されたVHH CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 10、11、および12に示される

のうちの1つである。

【0008】

いくつかの態様において、VHHは、それぞれ、SEQ ID NO: 1、2、および3に示されるアミノ酸配列を有するCDR1、2、3を含む。

【0009】

いくつかの態様において、VHHは、それぞれ、SEQ ID NO: 4、5、および6に示されるアミノ酸配列を有するCDR1、2、3を含む。

【0010】

いくつかの態様において、VHHは、それぞれ、SEQ ID NO: 7、8、および9に示されるアミノ酸配列を有するCDR1、2、3を含む。

【0011】

いくつかの態様において、VHHは、それぞれ、SEQ ID NO: 10、11、および12に示されるアミノ酸配列を有するCDR1、2、3を含む。

【0012】

1つの局面において、本開示は、選択されたVHH配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖抗体可変ドメイン（VHH）を含む、cMETに結合する抗体またはその抗原結合断片に関する。いくつかの態様において、選択されたVHH配列は、SEQ ID NO: 19~22および77~84からなる群より選択される。いくつかの態様において、VHHは、SEQ ID NO: 19、77、78、79、80、81、または84の配列を含む。いくつかの態様において、VHHは、SEQ ID NO: 20の配列を含む。いくつかの態様において、VHHは、SEQ ID NO: 21の配列を含む。いくつかの態様において、VHHは、SEQ ID NO: 22、82、または83の配列を含む。

10

【0013】

いくつかの態様において、抗体または抗原結合断片は、cMETに特異的に結合する。

【0014】

いくつかの態様において、抗体または抗原結合断片は、ヒト化抗体またはその抗原結合断片である。

20

【0015】

1つの局面において、本開示は、本明細書に記載されるような抗体またはその抗原結合断片のVHH CDR1、2、3を含む、抗体またはその抗原結合断片に関する。

【0016】

いくつかの態様において、抗体または抗原結合断片は、ヒトIgG Fcを含む。

【0017】

いくつかの態様において、抗体または抗原結合断片は、2つ以上の重鎖抗体可変ドメインを含む。

【0018】

1つの局面において、本開示は、本明細書に記載されるような抗体またはその抗原結合断片と交差競合する、抗体またはその抗原結合断片に関する。

30

【0019】

1つの局面において、本開示は、EGFRに特異的に結合する第1の抗原結合部位、およびcMETに特異的に結合する第2の抗原結合部位を含む、多重特異性抗体またはその抗原結合断片に関する。

【0020】

いくつかの態様において、第1の抗原結合部位は、重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含む。いくつかの態様において、VHおよびVLは、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。

【0021】

いくつかの態様において、重鎖可変領域（VH）は、相補性決定領域（CDR）1、2、および3を含む。いくつかの態様において、VH CDR1領域は、SEQ ID NO: 13と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、VH CDR2領域は、SEQ ID NO: 14と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、およびVH CDR3領域は、SEQ ID NO: 15と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、軽鎖可変領域（VL）は、CDR1、2、および3を含む。いくつかの態様において、VL CDR1領域は、SEQ ID NO: 16と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、VL CDR2領域は、SEQ ID NO: 17と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、およびVL CDR3領域は、SEQ ID NO: 18と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。

40

【0022】

50

いくつかの態様において、重鎖可変領域（VH）は、SEQ ID NO: 23と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含み、および軽鎖可変領域（VL）は、SEQ ID NO: 24と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0023】

いくつかの態様において、第2の抗原結合部位は、cMETに特異的に結合し、かつ第2の抗原結合部位は、相補性決定領域（CDR）1、2、および3を含む第1の重鎖抗体可変ドメイン（VHH1）を含む。いくつかの態様において、VHH1 CDR1領域は、選択されたVHH1 CDR1アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、VHH1 CDR2領域は、選択されたVHH1 CDR2アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、およびVHH1 CDR3領域は、選択されたVHH1 CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、選択されたVHH1 CDR1、2、および3のアミノ酸配列は、以下：

（1）選択されたVHH1 CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 1、2、および3に示される；

（2）選択されたVHH1 CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 4、5、および6に示される；

（3）選択されたVHH1 CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 7、8、および9に示される；ならびに

（4）選択されたVHH1 CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 10、11、および12に示される

のうちの1つである。

【0024】

いくつかの態様において、第1の重鎖抗体可変ドメイン（VHH1）は、選択されたVHH配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、選択されたVHH配列は、SEQ ID NO: 19～22および77～84からなる群より選択される。いくつかの態様において、本明細書に記載されるような多重特異性抗体またはその抗原結合断片は、cMETに特異的に結合する第3の抗原結合部位をさらに含む。

【0025】

いくつかの態様において、第3の抗原結合部位は、cMETに特異的に結合し、かつ第3の抗原結合部位は、相補性決定領域（CDR）1、2、および3を含む第2の重鎖抗体可変ドメイン（VHH2）を含む。いくつかの態様において、VHH2 CDR1領域は、選択されたVHH2 CDR1アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、VHH2 CDR2領域は、選択されたVHH2 CDR2アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、およびVHH2 CDR3領域は、選択されたVHH2 CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、選択されたVHH2 CDR1、2、および3のアミノ酸配列は、以下：

（1）選択されたVHH2 CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 1、2、および3に示される；

（2）選択されたVHH2 CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 4、5、および6に示される；

（3）選択されたVHH2 CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 7、8、および9に示される；ならびに

（4）選択されたVHH2 CDR1、2、3のアミノ酸配列が、それぞれ、SEQ ID NO: 10、11、および12に示される

のうちの1つである。

【0026】

いくつかの態様において、第2の重鎖抗体可変ドメイン（VHH2）は、選択されたVHH2配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、選択されたVHH2配列は、SEQ ID NO: 19～22および77～84からなる群より選択される。

【0027】

いくつかの態様において、VHおよびVLは、scFvを形成するようにリンカーペプチド配列によって連結される。いくつかの態様において、リンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む。

【0028】

1つの局面において、本開示は、(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖抗体可変ドメイン(VHH)、第1のヒンジ領域、第1のFc領域を含む、第1のポリペプチド；(b) N末端からC末端へ、重鎖可変領域(VH)、第2のヒンジ領域、および第2のFc領域を含む、第2のポリペプチド；ならびに(c) 軽鎖可変領域(VL)を含む、第3のポリペプチド、を含む、ポリペプチド複合体に関する。いくつかの態様において、第1のVHHは、cMETに特異的に結合する。いくつかの態様において、VHおよびVLは、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。

10

【0029】

いくつかの態様において、第1のヒンジ領域および/または第2のヒンジ領域は、SEQ ID NO: 25~29のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む。

【0030】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%同一である配列を含む。

【0031】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 43または44と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 45または46と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 47と少なくとも80%同一である配列を含む。

20

【0032】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、cMETに特異的に結合する第2のVHHをさらに含む。いくつかの態様において、第2のVHHは、リンカーペプチド配列を介して第1のVHHのN末端に連結される。

【0033】

いくつかの態様において、リンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む。

【0034】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 48または49と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 50または51と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 52と少なくとも80%同一である配列を含む。

30

【0035】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸(Asp)、および/またはEUナンバリングに従う332位のグルタミン酸(Glu)を含む。

【0036】

1つの局面において、本開示は、(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖抗体可変ドメイン(VHH)、第1のヒンジ領域、第1のFc領域を含む、第1のポリペプチド；ならびに(b) N末端からC末端へ、一本鎖可変断片(scFv)、第2のヒンジ領域、および第2のFc領域を含む、第2のポリペプチド、を含む、ポリペプチド複合体に関する。いくつかの態様において、第1のVHHは、cMETに特異的に結合する。いくつかの態様において、scFvは、重鎖可変領域(VH)、第1のリンカーペプチド配列、および軽鎖可変領域(VL)を含む。いくつかの態様において、VHおよびVLは、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。

40

【0037】

いくつかの態様において、第1のリンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む。

50

【0038】

いくつかの態様において、第1のヒンジ領域および/または第2のヒンジ領域は、SEQ ID NO: 25~29のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む。

【0039】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%同一である配列を含む。

【0040】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 53または54と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 55または56と少なくとも80%同一である配列を含む。

10

【0041】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、cMETに特異的に結合する第2のVHHをさらに含む。いくつかの態様において、第2のVHHは、第2のリンカーペプチド配列を介して第1のVHHのN末端に連結される。

【0042】

いくつかの態様において、第2のリンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む。

【0043】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 57または58と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 59または60と少なくとも80%同一である配列を含む。

20

【0044】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸(Asp)、および/またはEUナンバリングに従う332位のグルタミン酸(Glu)を含む。

【0045】

1つの局面において、本開示は、(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖抗体可変ドメイン(VHH1)、第1のリンカーペプチド配列、第1の重鎖可変領域(VH1)、第1のヒンジ領域、および第1のFc領域を含む、第1のポリペプチド；(b) 第1の軽鎖可変領域(VL1)を含む、第2のポリペプチド；(c) N末端からC末端へ、第2の重鎖抗体可変ドメイン(VHH2)、第2のリンカーペプチド配列、第2の重鎖可変領域(VH2)、第2のヒンジ領域、および第2のFc領域を含む、第3のポリペプチド；ならびに(d) 第2の軽鎖可変領域(VL2)を含む、第4のポリペプチド、を含む、ポリペプチド複合体に関する。いくつかの態様において、VHH1およびVHH2は、cMETに特異的に結合する。いくつかの態様において、VH1およびVL1は、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。いくつかの態様において、VH2およびVL2は、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。

30

【0046】

いくつかの態様において、第1のリンカーペプチド配列および/または第2のリンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む。

40

【0047】

いくつかの態様において、第1のヒンジ領域および/または第2のヒンジ領域は、SEQ ID NO: 25~29のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む。

【0048】

いくつかの態様において、VHH1およびVHH2の配列は、同一である。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 32と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 61または62と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 63と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 61または62と少なくとも

50

も80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第4のポリペプチドは、SEQ ID NO: 63と少なくとも80%同一である配列を含む。

【0049】

いくつかの態様において、VHH1およびVHH2の配列は、異なる。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 64または65と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 66または67と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第4のポリペプチドは、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 85と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 86と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第4のポリペプチドは、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%同一である配列を含む。

10

【0050】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸(Asp)、および/またはEUナンバリングに従う332位のグルタミン酸(Glu)を含む。

20

【0051】

1つの局面において、本開示は、(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖可変領域(VH1)、第1のヒンジ領域、第1のFc領域、第1のリンカーペプチド配列、および第1の重鎖抗体可変ドメイン(VHH1)を含む、第1のポリペプチド；(b) 第1の軽鎖可変領域(VL1)を含む、第2のポリペプチド；(c) N末端からC末端へ、第2の重鎖可変領域(VH2)、第2のヒンジ領域、第2のFc領域、第2のリンカーペプチド配列、および第2の重鎖抗体可変ドメイン(VHH2)を含む、第3のポリペプチド；ならびに(d) 第2の軽鎖可変領域(VL2)を含む、第4のポリペプチド、を含む、ポリペプチド複合体に関する。いくつかの態様において、VHH1および/またはVHH2は、cMETに特異的に結合する。いくつかの態様において、VH1およびVL1は、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。いくつかの態様において、VH2およびVL2は、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。

30

【0052】

いくつかの態様において、第1のリンカーペプチド配列および/または第2のリンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む。

【0053】

いくつかの態様において、第1のヒンジ領域および/または第2のヒンジ領域は、SEQ ID NO: 25~29のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む。

【0054】

いくつかの態様において、VHH1およびVHH2の配列は、同一である。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 32と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 69または70と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 71と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 69または70と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第4のポリペプチドは、SEQ ID NO: 71と少なくとも80%同一である配列を含む。

40

【0055】

いくつかの態様において、VHH1およびVHH2の配列は、異なる。いくつかの態様に

50

において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 72または73と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 76と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 74または75と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第4のポリペプチドは、SEQ ID NO: 76と少なくとも80%同一である配列を含む。

【0056】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸 (Asp)、および/またはEUナンバリングに従う332位のグルタミン酸 (Glu) を含む。

10

【0057】

1つの局面において、本開示は、(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖抗体可変ドメイン (VHH)、第1のヒンジ領域、第1のFc領域を含む、第1のポリペプチド；(b) N末端からC末端へ、重鎖可変領域 (VH)、第2のヒンジ領域、および第2のFc領域を含む、第2のポリペプチド；ならびに (c) 軽鎖可変領域 (VL) を含む、第3のポリペプチド、を含む、ポリペプチド複合体に関する。いくつかの態様において、第1のVHHは、cMETに特異的に結合する。いくつかの態様において、VHおよびVLは、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、cMETに特異的に結合する第2のVHHをさらに含む。いくつかの態様において、第2のVHHは、リンカーペプチド配列を介して第1のVHHのN末端に連結される。

20

【0058】

いくつかの態様において、第1のヒンジ領域および/または第2のヒンジ領域は、SEQ ID NO: 25~29のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む。

【0059】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%同一である配列を含む。

【0060】

いくつかの態様において、リンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む。

30

【0061】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 48または49と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 50または51と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 52と少なくとも80%同一である配列を含む。

【0062】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸 (Asp)、および/またはEUナンバリングに従う332位のグルタミン酸 (Glu) を含む。

【0063】

40

1つの局面において、本開示は、(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖抗体可変ドメイン (VHH)、第1のヒンジ領域、第1のFc領域を含む、第1のポリペプチド；ならびに (b) N末端からC末端へ、一本鎖可変断片 (scFv)、第2のヒンジ領域、および第2のFc領域を含む、第2のポリペプチド、を含む、ポリペプチド複合体に関する。いくつかの態様において、第1のVHHは、cMETに特異的に結合する。いくつかの態様において、scFvは、重鎖可変領域 (VH)、第1のリンカーペプチド配列、および軽鎖可変領域 (VL) を含む。いくつかの態様において、VHおよびVLは、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、cMETに特異的に結合する第2のVHHをさらに含む。いくつかの態様において、第2のVHHは、第2のリンカーペプチド配列を介して第1のVHHのN末端に連結される。

50

【0064】

いくつかの態様において、第1のリンカーペプチド配列および/または第2のリンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む。

【0065】

いくつかの態様において、第1のヒンジ領域および/または第2のヒンジ領域は、SEQ ID NO: 25~29のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む。

【0066】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%同一である配列を含む。

10

【0067】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 57または58と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 59または60と少なくとも80%同一である配列を含む。

【0068】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸(Asp)、および/またはEUナンバリングに従う332位のグルタミン酸(Glu)を含む。

【0069】

1つの局面において、本開示は、(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖抗体可変ドメイン(VHH1)、第1のリンカーペプチド配列、第1の重鎖可変領域(VH1)、第1のヒンジ領域、および第1のFc領域を含む、第1のポリペプチド；(b) 第1の軽鎖可変領域(VL1)を含む、第2のポリペプチド；(c) N末端からC末端へ、第2の重鎖抗体可変ドメイン(VHH2)、第2のリンカーペプチド配列、第2の重鎖可変領域(VH2)、第2のヒンジ領域、および第2のFc領域を含む、第3のポリペプチド；ならびに(d) 第2の軽鎖可変領域(VL2)を含む、第4のポリペプチド、を含む、ポリペプチド複合体に関する。いくつかの態様において、VHH1およびVHH2は、cMETに特異的に結合する。いくつかの態様において、VH1およびVL1は、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。いくつかの態様において、VH2およびVL2は、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。いくつかの態様において、VHH1およびVHH2の配列は、異なる。

20

30

【0070】

いくつかの態様において、第1のリンカーペプチド配列および/または第2のリンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む。

【0071】

いくつかの態様において、第1のヒンジ領域および/または第2のヒンジ領域は、SEQ ID NO: 25~29のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む。

【0072】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%同一である配列を含む。

40

【0073】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 64または65と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 66または67と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第4のポリペプチドは、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%同一である配列を含む。

【0074】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 85と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO:

50

68と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 86と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第4のポリペプチドは、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%同一である配列を含む。

【0075】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸 (Asp)、および/またはEUナンバリングに従う332位のグルタミン酸 (Glu) を含む。

【0076】

1つの局面において、本開示は、(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖可変領域 (VH1)、第1のヒンジ領域、第1のFc領域、第1のリンカーペプチド配列、および第1の重鎖抗体可変ドメイン (VHH1) を含む、第1のポリペプチド; (b) 第1の軽鎖可変領域 (VL1) を含む、第2のポリペプチド; (c) N末端からC末端へ、第2の重鎖可変領域 (VH2)、第2のヒンジ領域、第2のFc領域、第2のリンカーペプチド配列、および第2の重鎖抗体可変ドメイン (VHH2) を含む、第3のポリペプチド; ならびに (d) 第2の軽鎖可変領域 (VL2) を含む、第4のポリペプチド、を含む、ポリペプチド複合体に関する。いくつかの態様において、VHH1および/またはVHH2は、cMETに特異的に結合する。いくつかの態様において、VH1およびVL1は、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。いくつかの態様において、VH2およびVL2は、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。いくつかの態様において、VHH1およびVHH2の配列は、異なる。

【0077】

いくつかの態様において、第1のリンカーペプチド配列および/または第2のリンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む。

【0078】

いくつかの態様において、第1のヒンジ領域および/または第2のヒンジ領域は、SEQ ID NO: 25~29のいずれか1つと少なくとも80%同一である配列を含む。

【0079】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%同一である配列を含む。

【0080】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 72または73と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 76と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 74または75と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第4のポリペプチドは、SEQ ID NO: 76と少なくとも80%同一である配列を含む。

【0081】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸 (Asp)、および/またはEUナンバリングに従う332位のグルタミン酸 (Glu) を含む。

【0082】

1つの局面において、本開示は、本明細書に記載されるような抗体もしくはその抗原結合断片、本明細書に記載されるような多重特異性抗体もしくはその抗原結合断片、または本明細書に記載されるようなポリペプチド複合体をコードするポリヌクレオチドを含む、核酸に関する。いくつかの態様において、核酸は、DNA (例えば、cDNA) またはRNA (例えば、mRNA) である。

【0083】

1つの局面において、本開示は、本明細書に記載されるような核酸のうちの1つまたは複数を含む、ベクターに関する。

10

20

30

40

50

【0084】

1つの局面において、本開示は、本明細書に記載されるようなベクターを含む、細胞に関する。いくつかの態様において、細胞はCHO細胞である。

【0085】

1つの局面において、本開示は、本明細書に記載されるような核酸のうちの1つまたは複数を含む、細胞に関する。

【0086】

1つの局面において、本開示は、抗体またはその抗原結合断片を作製する方法であって、(a) 本明細書に記載されるような細胞を、該細胞が抗体または抗原結合断片を産生するのに十分な条件下で培養する工程；および(b) 該細胞によって産生された抗体または抗原結合断片を収集する工程、を含む、前記方法に関する。

10

【0087】

1つの局面において、本開示は、治療剤に共有結合で結合した、本明細書に記載されるような抗体もしくはその抗原結合断片、本明細書に記載されるような多重特異性抗体もしくはその抗原結合断片、または本明細書に記載されるようなポリペプチド複合体を含む、抗体-薬物コンジュゲートに関する。いくつかの態様において、治療剤は、細胞傷害剤または細胞増殖抑制剤である。

【0088】

1つの局面において、本開示は、がんを有する対象を処置する方法であって、本明細書に記載されるような抗体もしくはその抗原結合断片、本明細書に記載されるような多重特異性抗体もしくはその抗原結合断片、本明細書に記載されるようなポリペプチド複合体、または本明細書に記載されるような抗体-薬物コンジュゲートを含む、治療的有効量の組成物を、該対象に投与する工程を含む、前記方法、に関する。

20

【0089】

いくつかの態様において、対象は、cMETを発現するがんを有する。いくつかの態様において、対象は、EGFRを発現するがんを有する。

【0090】

いくつかの態様において、がんは肺がんである。いくつかの態様において、がんは非小細胞肺癌(NSCLC)である。

【0091】

1つの局面において、本開示は、腫瘍成長の速度を減少させる方法であって、腫瘍細胞を、本明細書に記載されるような抗体もしくはその抗原結合断片、本明細書に記載されるような多重特異性抗体もしくはその抗原結合断片、本明細書に記載されるようなポリペプチド複合体、または本明細書に記載されるような抗体-薬物コンジュゲートを含む、有効量の組成物と、接触させる工程を含む、前記方法、に関する。

30

【0092】

1つの局面において、本開示は、腫瘍細胞を殺傷する方法であって、腫瘍細胞を、本明細書に記載されるような抗体もしくはその抗原結合断片、本明細書に記載されるような多重特異性抗体もしくはその抗原結合断片、本明細書に記載されるようなポリペプチド複合体、または本明細書に記載されるような抗体-薬物コンジュゲートを含む、有効量の組成物と、接触させる工程を含む、前記方法、に関する。

40

【0093】

1つの局面において、本開示は、腫瘍細胞を殺傷する方法であって、腫瘍細胞を、本明細書に記載されるような抗体もしくはその抗原結合断片、本明細書に記載されるような多重特異性抗体もしくはその抗原結合断片、本明細書に記載されるようなポリペプチド複合体、または本明細書に記載されるような抗体-薬物コンジュゲートを含む、有効量の組成物と、接触させる工程を含む、前記方法、に関する。

【0094】

1つの局面において、本開示は、本明細書に記載されるような抗体またはその抗原結合断片、本明細書に記載されるような多重特異性抗体またはその抗原結合断片、本明細書に

50

記載されるようなポリペプチド複合体、および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物に関する。

【0095】

1つの局面において、本開示は、本明細書に記載されるような抗体-薬物コンジュゲート、および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物に関する。

【0096】

1つの局面において、本開示は、本明細書に記載されるような重鎖抗体可変ドメイン（VHH）、または本明細書に記載されるような重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含む、多重特異性抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【0097】

1つの局面において、本開示は、本明細書に記載されるような重鎖抗体可変ドメイン（VHH）、または本明細書に記載されるような重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含む、二重特異性抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【0098】

1つの局面において、本開示は、cMETに特異的に結合する多重特異性抗体またはその抗原結合断片を提供する。1つの局面において、本開示は、EGFRに特異的に結合する多重特異性抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【0099】

1つの局面において、本開示は、cMETおよびEGFRの両方を標的とする多重特異性抗体を提供する。いくつかの態様において、本明細書に記載される多重特異性抗体は、JNJ372またはJNJ372アナログと比較して、匹敵するかまたはさらに高い、cMETおよび/またはEGFRに対する結合能力を有する。いくつかの態様において、本明細書に記載される多重特異性抗体は、cMETとcMETリガンド（例えば、HGF）との相互作用の遮断において、JNJ372またはJNJ372アナログよりも有効である。いくつかの態様において、本明細書に記載される多重特異性抗体は、EGFRとEGFRリガンド（例えば、EGF）との相互作用の遮断において、JNJ372アナログよりも有効である。いくつかの態様において、本明細書に記載される多重特異性抗体は、cMETおよび/またはEGFRのリン酸化の阻害において、JNJ372またはJNJ372アナログと比較して、匹敵するかまたはさらに有効である。いくつかの態様において、本明細書に記載される多重特異性抗体は、がん細胞の生存および増殖に参与する下流シグナル伝達経路（例えば、ERKおよび/またはAkt経路）のリン酸化の阻害において、JNJ372またはJNJ372アナログと比較して、より有効である。

【0100】

本開示は、EGFRおよびcMETに結合する多重特異性抗体またはその抗原結合断片を提供する。多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体もしくは三重特異性抗体）またはその抗原結合断片は、2つ以上の異なるタイプのエピトープに同時に結合することができる、人工タンパク質である。エピトープは、同じ抗原中に、または異なる抗原中にあることができる。いくつかの態様において、多重特異性抗体またはその抗原結合断片は、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれよりも多い抗原結合部位を有することができる。いくつかの態様において、抗原結合部位は、1つの重鎖可変領域および1つの軽鎖可変領域を有する。いくつかの態様において、抗原結合部位は、1つのVHHを有する。

【0101】

本開示は、EGFRおよびcMETに結合する多重特異性抗体またはその抗原結合断片を提供する。本開示は、さらに、抗cMET VHH、ならびにVHおよびVLを有する抗EGFR抗体、またはその抗原結合断片を提供する。これらのVHH、VH、VLは、本明細書に記載されるような様々な多重特異性抗体または抗原結合断片を作製するために用いることができる。

【0102】

本明細書において用いられる場合、「抗体」という用語は、少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つ）の相補性決定領域（CDR）（例えば、免疫グ

10

20

30

40

50

ロブリン軽鎖由来の3つのCDRのいずれか、または免疫グロブリン重鎖由来の3つのCDRのいずれか)を含有し、抗原中のエピトープに特異的に結合することができる、任意の抗原結合分子を指す。抗体の非限定的な例には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、一本鎖抗体、単一可変ドメイン(VHH)抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、およびヒト化抗体が含まれる。いくつかの態様において、抗体は、ヒト抗体のFc領域を含有することができる。抗体という用語はまた、誘導体、例えば、これらの抗体または抗体断片から形成される多重特異性抗体、二重特異性抗体、一本鎖抗体、ダイアボディ、および直鎖状抗体も含む。

【0103】

本明細書において用いられる場合、「抗原結合断片」という用語は、全長抗体の一部分を指し、該抗体の一部分は、抗原に特異的に結合することができる。いくつかの態様において、抗原結合断片は、少なくとも1つの可変ドメイン(例えば、重鎖の可変ドメイン、軽鎖の可変ドメイン、またはVHH)を含有する。抗体断片の非限定的な例には、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片、ScFv、およびVHHが含まれる。

【0104】

本明細書において用いられる場合、「対象」および「患者」という用語は、本明細書全体を通して互換的に用いられ、本発明の方法による処置が提供される、ヒトまたは非ヒトである動物を説明する。獣医学的および非獣医学的な適用が、本開示において企図される。ヒト患者は、成人のヒトまたは若年のヒト(例えば、18歳未満のヒト)であることができる。ヒトに加えて、患者には、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、フェレット、ネコ、イヌ、および霊長類が含まれるが、それらに限定されない。含まれるのは、例えば、非ヒト霊長類(例えば、サル、チンパンジー、ゴリラなど)、げっ歯類(例えば、ラット、マウス、アレチネズミ、ハムスター、フェレット、ウサギ)、ウサギ目、ブタ(例えば、ブタ、ミニチュアブタ)、ウマ、イヌ、ネコ、ウシ、ならびに他の家庭内、農場、および動物園の動物である。

【0105】

本明細書において用いられる場合、抗体または抗原結合断片に言及する時に、「特異的に結合すること」および「特異的に結合する」という句は、抗体または抗原結合断片が、その標的分子と、他の分子よりも好ましく相互作用することを意味し、これは、その相互作用が、標的分子上の特定の構造(すなわち、抗原決定基またはエピトープ)の存在に依存するためである;換言すると、試薬は、一般的なすべての分子ではなく、特定の構造を含む分子を認識し、それに結合している。標的分子に特異的に結合する抗体は、標的の特異的抗体と称され得る。例えば、EGFRに特異的に結合する抗体は、EGFR特異的抗体または抗EGFR抗体と称され得る。

【0106】

本明細書において用いられる場合、「二重特異性抗体」という用語は、2つの異なるエピトープに結合する抗体を指す。エピトープは、同じ抗原上または異なる抗原上にあることができる。

【0107】

本明細書において用いられる場合、「三重特異性抗体」という用語は、3つの異なるエピトープに結合する抗体を指す。エピトープは、同じ抗原上または異なる抗原上にあることができる。

【0108】

本明細書において用いられる場合、「多重特異性抗体」という用語は、2つ以上の異なるエピトープに結合する抗体を指す。エピトープは、同じ抗原上または異なる抗原上にあることができる。多重特異性抗体は、例えば、二重特異性抗体または三重特異性抗体であることができる。いくつかの態様において、多重特異性抗体は、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つの異なるエピトープに結合する。

【0109】

本明細書において用いられる場合、「VHH」とは、重鎖抗体の可変ドメインを指す。

いくつかの態様において、VHHはヒト化VHHである。

【0110】

本明細書において用いられる場合、「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、少なくとも2個のアミノ酸の、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すように、互換的に用いられる。

【0111】

本明細書において用いられる場合、「ポリヌクレオチド」、「核酸分子」、および「核酸配列」という用語は、少なくとも2個のヌクレオチドの、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、非限定的に、DNA、RNA、DNA/RNAハイブリッド、およびそれらの修飾物を含むように、本明細書において互換的に用いられる。

10

【0112】

別段定義されない限り、本明細書において用いられるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。方法および材料が、本発明における使用のために本明細書に記載される；当技術分野において公知の他の適している方法および材料もまた、用いることができる。材料、方法、および実施例は、例証となるだけであり、限定するようには意図されない。本明細書において言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、配列、データベースエントリ、および他の参考文献は、その全体が参照により組み入れられる。矛盾する場合は、本明細書が、定義を含めて支配することになる。

【0113】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および図面から、ならびに特許請求の範囲から明らかであろう。

20

【図面の簡単な説明】

【0114】

【図1】競合ELISAアッセイの発光シグナルを示す。16個のユニークなクローンの存在下での、cMETとHu-HGFとの間の結合を測定した。RFUは、平均相対蛍光単位である。

【図2】ヒトcMET（抗Hu）およびサルcMET（抗Cyno）に対する16個のユニークなクローンの交差反応性を示す。

【図3】バイオレイヤー干渉法（BLI）によって測定した、1D5、1F3、1H1、および2C7クローンのVHH発現レベルを示す。

30

【図4】cMETに結合するVHHタンパク質のELISAの結果を示す。培地およびPBSは、陰性対照である。

【図5】競合ELISAアッセイの発光シグナルを示す。cMET VHHクローン1D5、1H1、および2C7の存在下での、cMETとHu-HGFとの間の結合を測定した。11F11は、アイソタイプ対照である。

【図6】1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3の概略構造を示す。

【図7】1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3のcMET結合ELISAの結果を示す。JNJ372アナログ（JNJ BsAb）は、陽性対照である。11F11は、アイソタイプ陰性対照である。

【図8】1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3のEGFR結合ELISAの結果を示す。JNJ372アナログ（JNJ BsAb）は、陽性対照である。11F11は、アイソタイプ陰性対照である。

40

【図9】1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V1（1H1 v1）、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3（1H1 v3）、およびJNJ372アナログのcMETに対する結合についての、滴定ELISAの結果を示す。

【図10】1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3（1H1 v3）およびJNJ372アナログのEGFRに対する結合についての、滴定ELISAの結果を示す。

【図11】競合ELISAアッセイの発光シグナルを示す。1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3およびJNJ372アナログのEGFRの存在下での、cMETとHu-HGFとの間の結合を測定した。11F11は、アイソタイプ対照である。Hu-HGF-Bは、いかなる抗体の添加も伴わないビオチン化ヒトHGF対照である。

【図12-1】図12Aは、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3およびJNJ372アナログのE

50

GFRのEGF/EGFR遮断効果を示す。EGF-Bは、ビオチン化EGFである。

【図12-2】図12Bは、PBSのみで処理したNCIH1975細胞の免疫蛍光イメージを示す。図12Cは、11F11とインキュベートし、次いでビオチン化EGFで処理したNCIH1975細胞の免疫蛍光イメージを示す。図12Dは、ビオチン化EGFのみで処理したNCIH1975細胞の免疫蛍光イメージを示す。図12Eは、JNJ372アナログとインキュベートし、次いでビオチン化EGFで処理したNCIH1975細胞の免疫蛍光イメージを示す。図12Fは、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3とインキュベートし、次いでビオチン化EGFで処理したNCIH1975細胞の免疫蛍光イメージを示す。

【図13A】リン酸化cMETを有するNCIH1975細胞のパーセンテージを示す。細胞を、JNJ372アナログまたは1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3で処理し、次いでHGFで処理した。HGFは、いかなる抗体処理も伴わない陽性対照である。NCは、アイソタイプ対照である。

10

【図13B】リン酸化EGFRを有するNCIH1975細胞のパーセンテージを示す。細胞を、JNJ372アナログまたは1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3で処理し、次いでEGFで処理した。「EGF+Abなし」は、いかなる抗体処理も伴わない陽性対照である。NCは、アイソタイプ対照である。

【図14A】Hu-HGFの存在下で増殖させたNCI-H1975細胞におけるリン酸化ERK (pERK) の比を示す。細胞を、JNJ372アナログまたは1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3で処理した。

【図14B】Hu-HGFの存在下で増殖させたNCI-H1975細胞におけるリン酸化Akt (pAkt) の比を示す。細胞を、JNJ372アナログまたは1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3で処理した。

20

【図15A】JNJ372アナログおよび1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3のADCC効果を示す。

【図15B】JNJ372アナログおよび1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3のCDC効果を示す。

【図15C】JNJ372アナログおよび1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3 (1H1 v3) のがん細胞殺傷効果を示す。

【図16】図16Aは、二重特異性-V1形式を有する例示的なcMET/EGFR二重特異性抗体の概略構造を示す。図16Bは、三重特異性-V1形式を有する例示的なcMET/EGFR三重特異性抗体の概略構造を示す。

30

【図17】図17Aは、二重特異性-V2形式を有する例示的なcMET/EGFR二重特異性抗体の概略構造を示す。図17Bは、三重特異性-V2形式を有する例示的なcMET/EGFR三重特異性抗体の概略構造を示す。

【図18】図18Aは、二重特異性-V3形式を有する例示的なcMET/EGFR二重特異性抗体の概略構造を示す。図18Bは、三重特異性-V3形式を有する例示的なcMET/EGFR三重特異性抗体の概略構造を示す。

【図19】図19Aは、二重特異性-V4形式を有する例示的なcMET/EGFR二重特異性抗体の概略構造を示す。図19Bは、三重特異性-V4形式を有する例示的なcMET/EGFR三重特異性抗体の概略構造を示す。

40

【図20A】JNJ372アナログ、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3、または1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3 Triとインキュベートした後に、pHrodo標識二次抗体によって染色された細胞のパーセンテージを示す。

【図20B】JNJ372アナログ、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3、または1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3 Triとインキュベートした後に、pHrodo標識二次抗体によって染色された細胞のイメージを示す。

【図21A】cMET-1H1のヒト化VHH (SEQ ID NO: 19) についての、cMET VHH-Fcエピトープビニングアッセイを示す。

【図21B】cMET-1A12のVHH (SEQ ID NO: 20) についての、cMET VHH-Fcエピトープビニングアッセイを示す。

50

【図 2 2 A】H1975細胞に対する抗体結合曲線および算出したEC50値を示す。抗His IgGを、陰性対照として用いた。

【図 2 2 B】H1975.HGF細胞に対する抗体結合曲線および算出したEC50値を示す。抗His IgGを、陰性対照として用いた。

【図 2 2 C】EGFR変異体C797S-BaF3細胞に対する抗体結合曲線および算出したEC50値を示す。抗His IgGを、陰性対照として用いた。

【図 2 3 A】H1975細胞を用いたEGF/EGFR相互作用に対する抗体遮断曲線および算出したEC50値を示す。抗His IgGを、陰性対照として用いた。

【図 2 3 B】H1975.HGF細胞を用いたEGF/EGFR相互作用に対する抗体遮断曲線および算出したEC50値を示す。抗His IgGを、陰性対照として用いた。

【図 2 3 C】EGFR変異体C797S-BaF3細胞を用いたEGF/EGFR相互作用に対する抗体遮断曲線および算出したEC50値を示す。抗His IgGを、陰性対照として用いた。

【図 2 4 A】H1975細胞を用いたcMET/EGF相互作用に対する抗体遮断曲線および算出したEC50値を示す。抗His IgGを、陰性対照として用いた。

【図 2 4 B】H1975.HGF細胞を用いたcMET/EGF相互作用に対する抗体遮断曲線および算出したEC50値を示す。抗His IgGを、陰性対照として用いた。

【図 2 5 A】HGFで刺激したH1975細胞（HGF-）を用いたウエスタンブロット結果のセットを示す。細胞をまた、1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)（「三重特異性」）、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3（「二重特異性」）、JNJ372アナログ（「JNJ」）、または陰性対照抗体（「Neg」）で処理した。抗体の濃度は、0.16 μg/mlまたは4 μg/mlであった。矢印は、EGFR分解の媒介において、三重特異性のものと比較して、JNJ372アナログが無能であることを強調する。

【図 2 5 B】H1975.HGF細胞（HGF+）を用いたウエスタンブロット結果のセットを示す。細胞をまた、1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)（「TsAb」）、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3（「BsAb」）、JNJ372アナログ（「JNJ」）、または陰性対照抗体（「Neg」）で処理した。抗体の濃度は、0.16 μg/mlまたは4 μg/mlであった。

【図 2 5 C】処置不能のEGFR点変異C797Sを有する細胞株を用いたウエスタンブロット結果のセットを示す。細胞をまた、1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)（「三重特異性Ab」）、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3（「二重特異性Ab」）、JNJ372アナログ（「JNJ」）、抗Hisタグ抗体（「抗His」）、または陰性対照抗体（「Neg」）で処理した。抗体の濃度は、0.16 μg/mlまたは4 μg/mlであった。

【図 2 6 A】抗体で処理した時のH1975細胞の細胞増殖曲線を示す。抗His IgGを、陰性対照として用いた。

【図 2 6 B】抗体で処理した時のH1975.HGF細胞の細胞増殖曲線を示す。抗His IgGを、陰性対照として用いた。

【図 2 6 C】抗体で処理した時のC797S-BaF3細胞の細胞増殖曲線を示す。抗His IgGを、陰性対照として用いた。

【図 2 7 A】H1975細胞における抗体内部移行曲線および算出したIC50値を示す。抗His IgGを、陰性対照として用いた。

【図 2 7 B】C797S-BaF3細胞における抗体内部移行曲線および算出したIC50値を示す。抗His IgGを、陰性対照として用いた。

【図 2 7 C】H1975.HGF細胞における抗体内部移行曲線および算出したIC50値を示す。抗His IgGを、陰性対照として用いた。

【図 2 7 D】D770-BaF3細胞における抗体内部移行曲線および算出したIC50値を示す。抗His IgGを、陰性対照として用いた。

【図 2 8 A】H1975.GFP.Luc細胞およびPBMCを1：10の標的：エフェクター比で用いたADCCアッセイ結果を示す。IC50値をまた、各々の試験した抗体について算出した。抗His IgGを、陰性対照として用いた。

【図 2 8 B】H1975.GFP.Luc.HGF細胞およびPBMCを1：10の標的：エフェクター比で用いたADCCアッセイ結果を示す。IC50値をまた、各々の試験した抗体について算出

10

20

30

40

50

した。抗His IgGを、陰性対照として用いた。

【図29A】効力試験のデザインを示す。腫瘍細胞接種を、-20日目に行った。腹腔内注射（IP）による抗体処置（Tx）を、0日目、4日目、8日目、12日目、15日目、および19日目に行った。腫瘍体積（TV）を、最初の処置の後、週に2回モニターした。実験は26日目に終了した。4アームにおける「アーム」は、試験における処置を意味する。「4アーム」は、対照を含む4つの処置を意味する。

【図29B】群の指定、用量レベル、および投与スケジュールを示す。

【図29C】H1975腫瘍細胞を接種し、次いでJNJ372アナログまたは1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)で処置したBalb/c NU/Nuマウスの腫瘍体積絶対中央値を示す。DPBSを、陰性対照として用いた。

10

【図30A】効力試験のデザインを示す。腫瘍細胞接種を、-20日目に行った。腹腔内注射（IP）による抗体処置（Tx）を、0日目、3日目、7日目、10日目、14日目、17日目、21日目、および24日目に行った。腫瘍体積（TV）を、最初の処置の後、週2回モニターした。実験は28日目に終了した。4アームにおける「アーム」は、試験における処置を意味する。「4アーム」は、対照を含む4つの処置を意味する。

【図30B】群の指定、用量レベル、および投与スケジュールを示す。

【図30C】H1975-Luc-GFP-HGF腫瘍細胞を接種し、次いでJNJ372アナログまたは1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)で処置したBalb/c NU/Nuマウスの腫瘍体積平均値を示す。DPBSを、陰性対照として用いた。

20

【図31A】効力試験のデザインを示す。腫瘍細胞接種を、-20日目に行った。腹腔内注射（IP）による抗体処置（Tx）を、0日目、3日目、7日目、10日目、14日目、および17日目に行った。腫瘍体積（TV）を、最初の処置の後、週に2回モニターした。実験は22日目に終了した。4アームにおける「アーム」は、試験における処置を意味する。「4アーム」は、対照を含む4つの処置を意味する。

【図31B】群の指定、用量レベル、および投与スケジュールを示す。

【図31C】C797S-BaF3細胞を接種し、次いでJNJ372アナログまたは1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)で処置したBalb/c NU/Nuマウスの腫瘍体積平均値を示す。DPBSを、陰性対照として用いた。

【図32】本開示に記載されるcMET抗体由来のVHHのCDR配列を列記する。

【図33】本開示に記載されるEGFR抗体の重鎖可変領域（VH）のCDR配列を列記する。

30

【図34】本開示に記載されるEGFR抗体の軽鎖可変領域（VL）のCDR配列を列記する。

【図35】本開示に記載されるようなcMETに特異的に結合するVHHのアミノ酸配列を列記する。

【図36】本開示に記載されるようなEGFRに特異的に結合するVHおよびVLのアミノ酸配列を列記する。

【図37-1】本開示に記載される配列を列記する。

【図37-2】本開示に記載される配列を列記する。

【図37-3】本開示に記載される配列を列記する。

【図37-4】本開示に記載される配列を列記する。

【図37-5】本開示に記載される配列を列記する。

40

【図37-6】本開示に記載される配列を列記する。

【図37-7】本開示に記載される配列を列記する。

【図37-8】本開示に記載される配列を列記する。

【図37-9】本開示に記載される配列を列記する。

【図37-10】本開示に記載される配列を列記する。

【発明を実施するための形態】

【0115】

詳細な説明

肺がんは、両方の性別について米国におけるがん関連死亡の主な原因である。発生率および死亡率は、先進国において最も高い。世界保健機関（WHO）によると、世界の肺が

50

ん死亡率は、主として、特にアジアにおける世界的なタバコの使用の増大のために、上昇し続けると考えられる。NSCLC（非小細胞肺癌）は、すべての肺癌の約85%を占める。非小細胞肺癌（NSCLC）の5年全生存率は、不良のままであり、ステージIBの疾患を有する患者における68%から、ステージIVA-IVBの疾患を有する患者における0%~10%である。したがって、NSCLCに対する有効な治療剤の開発は、不可欠である。

【0116】

NSCLCに対する治療方法は、免疫チェックポイント遮断薬（ICB）および分子標的療法の2つにカテゴリーに、大きく分類することができる。ICBは、その顕著な臨床的改善にもかかわらず、一次耐性および二次耐性の発生につながる可能性がある。分子標的療法は、がんの発癌性ドライバーを標的とする。EGFR変異は、標的化可能な発癌性ドライバーの中で、最も頻度が高い変異である。他方、異常なc-Metシグナル伝達が、NSCLCを含む多くのヒトがんにおいて検出されている。さらに、c-Metは、EGFRに対する療法を含む標的療法に対して耐性を発生する際に、非常に重要な役割をする。したがって、EGFRおよびc-Metの両方を同時に標的とすることは、有効な戦略である可能性がある。

【0117】

過去20年間で、NSCLCおよび肺癌の処置は、概して、細胞毒性療法から免疫療法の処置へと進歩してきた。早期の疾患は、細胞毒性法および外科的方法で有効に処置することができる。しかし、高いパーセンテージの腫瘍は、再発する可能性があり、低い生存率を結果としてもたらす。

【0118】

長期生存率を改善することを目的とした、より有効な全身療法の開発には、主に免疫療法および分子標的療法の使用が伴う。進行期NSCLCの管理における大きな進歩は、白金ベースの治療の最中またはその後に疾患が進行した患者について米国FDAによりニボルマブ（抗PD-L1、免疫チェックポイント遮断薬（ICB））が承認された2015年に起こった。顕著な臨床的改善にもかかわらず、ほとんどの患者は、一次耐性または二次耐性の発生のために、最終的にICB療法に反応しなくなる。これは、サイトカインシグナル伝達の欠陥、MHC複合体提示、または最適なT細胞機能に必要とされるトリプトファンを異化する酵素のレベルの増大を含む、いくつかの理由のためであり得る。

【0119】

NSCLC患者における分子標的療法は、経口EGFR（上皮成長因子受容体）チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）であるゲフィチニブが使用された1990年代後半に開始された。上皮成長因子受容体（EGFR）の生理学的機能は、上皮組織の発生および恒常性を制御することである。肺癌および乳がん、ならびに神経膠芽腫において、EGFRは腫瘍形成のドライバーである。EGFR変異は、標的化可能な発癌性ドライバーの中で最も頻度が高い変異であり、NSCLCのおよそ25%を占める（Kris, M. G. et al., "Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs." *Jama* 311.19 (2014): 1998-2006）。EGFRにおける活性化変異、例えばエクソン19 delおよびエクソン21上のL858Rは、NSCLC腫瘍細胞の大半を、第1世代のEGFR-TKIであるゲフィチニブおよびエルロチニブ、ならびに第2世代のEGFR-TKIであるアファチニブおよびダコミチニブに感受性にする。これらのうち、これらの腫瘍を有する50%の患者は、EGFR T790M変異のために獲得耐性を発生する。この耐性は、第3世代のEGFR-TKI薬物であるオシメルチニブ（TAGRISSO）およびロシレチニブの開発につながった。オシメルチニブの普及により、EGFR C797S耐性変異が同様に出現した。二次的なEGFR変異に加えて、METまたはERBB2の増幅、Hippo経路の阻害、およびインスリン様成長因子1受容体（IGF1R）の活性化などのバイパス機構もまた、EGFR-TKIに対する耐性に寄与する。

【0120】

異常なcMETシグナル伝達が、多くのヒトがんの発生/進行に関係している。これは、cMETの過剰発現、cMETにおける活性化変異、トランス活性化、オートクラインもしくはパラクラインのシグナル伝達、またはcMET遺伝子の増幅に起因する。EGFRシグナル

伝達とcMETシグナル伝達との間の有意な関連が、がん治療の転帰に関する研究を通して認識された。cMETは、EGFRに対する療法を含む標的療法に対して耐性を発生する際に、非常に重要な役割をする。同様に、EGFRおよびKRASなどの下流遺伝子の変異、組織学的形質転換、ならびにcMETシグナル伝達経路を含む代替経路の活性化は、EGFR標的療法に対する耐性の機構として特定されている。その結果、一方の受容体の遮断は、もう一方を上方制御する傾向があり、単剤処置に対する耐性につながる。cMETの増幅および/または高レベルのHGFリガンド発現が、エルロチニブおよびゲフィチニブを含むEGFRのチロシンキナーゼ阻害剤に対して内在性耐性または獲得耐性を有するNSCLC患者において観察されている。逆に、長期間にわたってcMET阻害剤に曝露されたMET増幅肺がん細胞は、EGFR経路を介して耐性を発生する。

10

【0121】

EGFRとcMetとの間のシグナル伝達クロストークのために、両方の受容体の組み合わせでの阻害が、METおよびEGFRにより駆動されるがんを有する患者の転帰の改善につながり得る。追加的に、同時阻害は、1つの経路のみの遮断と比較して、治療的耐性を克服し得るかまたは遅らせ得る。METおよびEGFRの二重阻害は、進行がんにおいて単剤療法としておよびエルロチニブとの組み合わせで、別々のMETおよびEGFRの阻害剤の組み合わせ（二価MET抗体であるエミベツズマブ（LY2875358 Eli Lilly））を用いて調べられてきた。しかし、EGFRおよびcMETの両方に対する二重特異性抗体（BsAb）の開発は、NSCLCの処置における大きな発展である。2つの主要なBsAbが試験されている（Eli Lilly由来のLY3164530ならびにJanssen labsおよびGenmab由来のJNJ-61186372（アミバンタマブ；JNJ372としても知られる））。LY3164530およびJNJ-61186372の詳細は、例えば、PCT/US2013/071288；Moore, S. L. et al., "A novel bispecific antibody targeting EGFR and cMet is effective against EGFR inhibitor-resistant lung tumors." *Cancer research* 76.13 (2016): 3942-3953；およびPatnaik, A. et al., "A phase I study of LY3164530, a bispecific antibody targeting MET and EGFR, in patients with advanced or metastatic cancer." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 82.3 (2018): 407-418に見出すことができ；これらの各々は、参照により本明細書に組み入れられる。

20

【0122】

LY3164530薬物の第I相臨床試験（ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02221882）は、2014年8月に開始され、2017年3月7日に試験が完了された。この試験の主な目的は、進行している、および/または身体の一部に広がったがんを有する参加者において、LY3164530の安全性を評価することであった。薬物LY3164530は、以下の理由：a) 試験用の予測マーカーの欠如、b) 毒性の増大、c) PKおよびPDの問題、ならびにd) 有害事象による用量調整により、第II相に至らなかった。JNJ-61186372は、GenmabおよびJanssen Biotech, Inc.の間の共同研究の下で、GenmabのDuoBody（登録商標）技術を用いて作り出された（Moore, S. L. et al., "A novel bispecific antibody targeting EGFR and cMet is effective against EGFR inhibitor-resistant lung tumors." *Cancer research* 76.13 (2016): 3942-3953）。JNJ-61186372は、非小細胞肺癌（NSCLC）を処置するための第II相臨床試験において調査されている（ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02609776）。この試験は、2016年5月24日に開始され、2022年7月に終了する進行中の試験スケジュールである。追加的に、この薬物には、米国FDAの非小細胞肺癌の処置のための画期的治療薬指定（Breakthrough Therapy Designation for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer）が与えられている。

30

40

【0123】

腫瘍を標的とする小分子キナーゼ阻害剤であるオシメルテニブ（Osimertinib）、およびJNJ61186372などのBsAbの開発は、多くのNSCLC患者の無増悪生存期間の改善につながっている。しかし、インビボマウスモデルにおける、JNJ61186372の単剤療

50

法および併用療法（オシメルテニブであるTAGRISSOとの組み合わせ）に対する耐性の証拠書類がある。シグナル伝達ベースの耐性の機構を特定するために行われた研究において（Goodman, A. M. et al., "Tumor mutational burden as an independent predictor of response to immunotherapy in diverse cancers." *Molecular Cancer Therapeutics* 16.11 (2017): 2598-2608）、皮下細胞株異種移植片を、オシメルチニブ、JNJ-61186372、または組み合わせのいずれかで、標的阻害を判定するための短時間または耐性腫瘍を確立するための長い期間のいずれかにわたって処置し、続いてこれらの切除した腫瘍の質量分析ベースのホスホプロテオーム解析を行って、バイパスシグナル伝達または標的再活性化を定量した。短時間の研究においては、オシメルテニブが、腫瘍のホスホチロシンプロファイルに対して最も強い効果を有していたため、JNJ-61186372よりも有効であることが見出された。オシメルテニブで処置されたすべての腫瘍は、併用処置に関係なく、より高い相関を示し、群分けされた。対照的に、JNJ-61186372単剤療法を受けた腫瘍は、より大きな腫瘍間の不均一性を示し、オシメルテニブ単剤療法または併用療法のいずれとも相関が不十分であった。追加的に、オシメルテニブ単剤療法で処置された腫瘍は、EGFR、Shc1、およびGab1のリン酸化の明白な減少を示し、これは、JNJ-61186372単剤療法における控えめな減少と比較して、EGFRの強いオンターゲット阻害を示した。

10

【0124】

本開示において、cMETおよびEGFRの両方を標的とする多重特異性抗体（例えば、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3）を作り出した。いくつかの態様において、抗体の構造形式は、cMETに結合する2つのVHHドメインを有し、一方、主要なIgG構造はEGFRに結合するようなものである。実験により、多重特異性抗体は、cMETおよび/またはEGFR受容体に対するその結合能力の点で、参照対照二重特異性抗体（例えば、Janssen labs由来のJNJ372アナログ）よりも有効であったことが示された。さらに、本明細書に記載される多重特異性抗体はまた、これらの受容体とそのそれぞれのリガンドとの間の相互作用を遮断することもできる。機能的アッセイにより、多重特異性抗体は、がん細胞の増殖、生存、およびアポトーシス経路の妨害に関与するERKおよびAktタンパク質のリン酸化を阻害することによって、cMETおよびEGFR受容体だけではなく、下流シグナル伝達経路のリン酸化も成功裡に阻害することにおいて、JNJ372アナログと好都合に匹敵し、かつほとんどの場合にはより良好であることが判明した。多重特異性抗体はまた、細胞依存性細胞傷害（CDC）において、JNJ372アナログと比較してより有効であることが見出された。したがって、これらのデータは、本明細書に記載される多重特異性抗体を、異常なEGFRおよびcMETシグナル伝達に関連する肺がんおよび他の悪性腫瘍を有する患者に対する薬物候補として開発できることを支持する。

20

30

【0125】

また本開示において、cMETおよびEGFRの両方を標的とする三重特異性抗体（例えば、1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)）を作り出した。いくつかの態様において、抗体は、cMETの2つの異なるエピトープに結合する2つの別々のVHHドメインを有し、一方、主要なIgG構造はEGFRに結合する。実験により、三重特異性抗体は、cMETおよびEGFR受容体に対するその結合能力の点で、基準対照二重特異性抗体（例えば、Janssen labs由来のJNJ372アナログ）よりも有効であったことが示された。さらに、三重特異性抗体はまた、これらの受容体とそのそれぞれのリガンドとの間の相互作用を遮断することもできる。機能的アッセイにより、三重特異性抗体は、がん細胞の増殖、生存、およびアポトーシス経路の妨害に関与する、METのリン酸化を阻害することおよびEGFRタンパク質を分解することによって、cMETおよびEGFR受容体だけではなく、下流シグナル伝達経路のリン酸化も成功裡に阻害することにおいて、JNJ372アナログと好都合に匹敵することが判明した。追加的に、三重特異性抗体は、基準と比較して増強された受容体の内部移行を示した。さらに、三重特異性抗体はまた、抗体依存性細胞性細胞傷害において、JNJ372アナログと比較してより有効であることが見出された。さらに、インビボ結果により、三重特異性抗体は、腫瘍低減において、JNJ372アナログよりも有効であることが

40

50

示された。したがって、これらのデータは、本明細書に記載される三重特異性抗体を、異常なEGFRおよびcMETシグナル伝達に関連する肺がんおよび他の悪性腫瘍を有する患者に対する薬物候補として開発できることを支持する。

【0126】

EGFRおよびcMET

上皮成長因子受容体（EGFR、ErbB1、またはHER1）は、c-erbB1癌原遺伝子によってコードされる170 kDaの1型膜貫通糖タンパク質である。上皮成長因子受容体は、4つの密接に関連する受容体チロシンキナーゼ：EGFR（ErbB-1）、HER2/neu（ErbB-2）、Her 3（ErbB-3）、およびHer 4（ErbB-4）のサブファミリーである、受容体のErbBファミリーのメンバーである。多くのがんタイプにおいて、EGFRの発現または活性に影響を及ぼす変異は、結果としてがんをもたらし可能性がある。EGFRシグナル伝達は、リガンド結合によって開始され、コンフォメーション変化、受容体と他のErbBファミリーメンバーとのホモ二量化またはヘテロ二量化、および受容体のトランス自己リン酸化の誘導がそれに続き、これが、最終的に細胞増殖および生存を含む多種多様の細胞機能に影響を及ぼすシグナル伝達カスケードを開始する。EGFRの発現またはキナーゼ活性の増大は、様々なヒトがんに関連しており、EGFRは、治療的介入の魅力的な標的になっている。EGFR遺伝子コピー数およびタンパク質発現の両方の増大は、非小細胞肺がんにおけるEGFRチロシンキナーゼ阻害剤であるIRESSA（商標）（ゲフィチニブ）に対する好都合な反応と関連している。

10

【0127】

c-Metは、チロシンタンパク質キナーゼMetまたは肝細胞増殖因子受容体（HGFR）とも呼ばれ、ヒトではMET遺伝子によってコードされるタンパク質である。タンパク質は、チロシンキナーゼ活性を保有する。一次一本鎖前駆体タンパク質は、翻訳後に切断されて、 α サブユニットおよび β サブユニットを生じ、これらが、ジスルフィド結合して成熟受容体を形成する。c-Metのそのリガンドである肝細胞増殖因子（HGF）による活性化は、増殖、運動性、浸潤、転移、上皮間葉転換、血管新生/創傷治癒、および組織再生を含む、多くの細胞プロセスを刺激する。HGF:c-Metの結合の正確な化学量論は不明であるが、概して、2つのHGF分子が2つのc-Met分子に結合し、受容体の二量化ならびにチロシン1230、1234、および1235での自己リン酸化につながると考えられている。リガンド非依存性のc-Met自己リン酸化はまた、遺伝子増幅、変異、または受容体過剰発現によって起こる可能性がある。

20

30

【0128】

c-Metは、胃がん、肺がん、結腸がん、乳がん、膀胱がん、頭頸部がん、卵巣がん、前立腺がん、甲状腺がん、膵臓がん、およびCNSがんを含む多くのタイプのがんにおいて、頻繁に増幅、変異、または過剰発現されている。典型的にはキナーゼドメインに局在するミスセンス変異は、遺伝性乳頭状腎細胞癌（PRCC）においておよび散発性PRCCの13%において一般的に見出され（Schmidt et al., *Oncogene* 18: 2343-2350, 1999）、c-Metのセマフォリンまたは膜近傍ドメインに局在するc-Met変異は、胃がん、頭頸部がん、肝臓がん、卵巣がん、NSCLC、および甲状腺がんにおいて頻繁に見出される。c-Metの増幅は、脳腫瘍、結腸直腸がん、胃がん、および肺がんにおいて検出されており、多くの場合、疾患の進行と相関している。それぞれ、非小細胞肺がん（NSCLC）および胃がんの最大で4%および20%が、c-Metの増幅を示す。c-Metの過剰発現もまた、肺がんにおいて頻繁に観察される。さらに、臨床試料においては、肺腺癌のほぼ半分が、高レベルのc-MetおよびHGFを示し、それらは両方とも、腫瘍成長速度の増強、転移、および予後不良と相関していた。

40

【0129】

EGFチロシンキナーゼ阻害剤に対して耐性になるすべての腫瘍のほぼ60%は、c-Met発現を増大させるか、c-Metを増幅するか、またはc-Metの唯一の既知のリガンドであるHGFを増大させており、これは、c-Metを通じたEGFRの補償経路の存在を示唆する。c-Metの増幅は、EGFRキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブに対して耐性になり、Her3

50

経路を通して生存率の増強を示した培養細胞において最初に特定された。これは、エルロチニブまたはゲフィチニブのいずれかに対して獲得耐性を有する43人の患者のうち9人がc-Met増幅を示した臨床試料において、さらに検証された。

【0130】

治療のためにEGFRおよび/またはc-Metシグナル伝達経路に拮抗する、現在の小分子および大分子治療アプローチは、小分子阻害剤で遭遇し得る、可能性がある特異性の欠如、潜在的なオフターゲット活性、および用量制限毒性のために、最適ではない場合がある。典型的な単一特異性二価抗体は、膜結合受容体のクラスター化および下流シグナル伝達経路の望まれない活性化を結果としてもたらす場合がある。全長重鎖を有する一価抗体（ハーフアーム）は、製造プロセスに有意な複雑さおよびコストをもたらす。

10

【0131】

EGFなどのリガンドのEGFRに対する結合は、受容体の二量体化、自己リン酸化、受容体の内部細胞質チロシンキナーゼドメインの活性化、ならびにDNA合成（遺伝子活性化）および細胞周期の進行または分裂の制御に参与する複数のシグナル伝達およびトランス活性化経路の開始を刺激する。EGFRシグナル伝達の阻害は、1つまたは複数のEGFRにおける阻害を結果としてもたらし得る。いくつかの態様において、EGFRリガンドには、EGF、TGF α 、ヘパリン結合EGF（HB-EGF）、アンフィレグリン（AR）、およびエピレグulin（epiregulin）（EPI）が含まれる。

【0132】

HGFのcMetに対する結合は、受容体の二量体化、自己リン酸化、受容体の内部細胞質チロシンキナーゼドメインの活性化、ならびにDNA合成（遺伝子活性化）および細胞周期の進行または分裂の制御に参与する複数のシグナル伝達およびトランス活性化経路の開始を刺激し、c-Metシグナル伝達の阻害は、1つまたは複数のc-Met下流シグナル伝達経路の阻害を結果としてもたらし得、したがって、c-Metを中和することは、細胞の増殖および分化、血管新生、細胞運動性、ならびに転移の阻害を含む、様々な効果を有し得る。

20

【0133】

がんにおけるEGFRおよびc-Metの役割は、例えば、全体が参照により本明細書に組み入れられる、WO2014081954A1、WO2008/127710、WO2009/111691、WO2009/126834、WO2010/039248、WO2010/115551、およびUS2009/0042906；Engelman et al. "MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling." science 316.5827 (2007): 1039-1043；Bean et al. "MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib." Proceedings of the National Academy of Sciences 104.52 (2007): 20932-20937に記載されている。

30

【0134】

重鎖抗体可変ドメイン（VHH）

モノクローナル抗体および組換え抗体は、医学およびバイオテクノロジーにおける重要なツールである。すべての哺乳動物と同様に、ラクダ科動物（例えば、ラマ）は、ジスルフィド結合でY字型に互いに結合した2本の重鎖および2本の軽鎖でできている通常の抗体（例えば、IgG1）を産生することができる。しかし、それらはまた、重鎖抗体としても知られる、2つのユニークなサブクラスのIgG：IgG2およびIgG3も産生する。これらの抗体は、2本の重鎖のみでできている、CH1領域が欠如しているが、そのN末端にVHH（またはナノボディ）と呼ばれる抗原結合ドメインを依然として持つ。通常のIgは、高い多様性の抗原-抗体相互作用を可能にするために、重鎖および軽鎖の両方由来の可変領域の会合を必要とする。単離された重鎖および軽鎖は、依然としてこの能力を示すが、ペアになった重鎖および軽鎖と比較すると、非常に低い親和性を示す。重鎖抗体のユニークな特徴は、その単量体抗原結合領域の、別の領域とのペア形成の必要なく、通常の抗体に匹敵する特異性、親和性、および特に多様性で抗原に結合する能力である。この特徴は、

40

50

主に、通常のIgと比較した場合に深いコンフォメーション変化を誘導する、2本の重鎖の可変領域のアミノ酸配列内の数個の大きなバリエーションによるものである。可変領域における主要な置換は、軽鎖が重鎖に結合するのを阻止するが、結合していない重鎖が免疫グロブリン結合タンパク質によってリサイクルされるのも阻止する。

【0135】

これらの抗体（VHH、sdAb、ナノボディ、または重鎖抗体可変ドメインと称される）の単一可変ドメインは、適応免疫系によって生成される最小の抗原結合ドメインである。これらの抗体の可変領域の第3の相補性決定領域（CDR3）は、多くの場合、通常のものよりも2倍長いことが見出されている。これは、抗原との相互作用面の増大および抗原-抗体相互作用の多様性の増大を結果としてもたらし、これが軽鎖の不在を補う。VHHは、長い相補性決定領域3（CDR3）を有し、酵素の活性部位またはウイルス表面上の受容体結合キャニオンなどの機能的に興味深い部位を含む、通常の抗体にアクセスできないタンパク質上の隙間に伸びることができる。さらに、追加のシステイン残基は、構造がより安定であることを可能にし、したがって相互作用の強度を増大させる。

10

【0136】

VHHは、通常の抗体の可変ドメイン（VHおよびVL）を保有する通常の抗体と比較して、より高い安定性、溶解性、発現収率、およびリフォールディング能力、ならびにより良好なインビボ組織浸透性を含む、多数の他の利点を示す。さらに、通常の抗体のVHドメインとは対照的に、VHHは、軽鎖に結合する内因性の傾向を示さない。これにより、機能的な軽鎖遺伝子座の存在下での、重鎖抗体の誘導が容易になる。さらに、VHHは、VLドメインに結合しないため、VHHを多重特異性抗体構築物に再形成することは、通常のVH-VLペアまたはVHドメインに基づく単一ドメインを含有する構築物よりもはるかに容易である。

20

【0137】

本開示は、例えば、抗cMET抗体、その改変抗体、そのキメラ抗体、およびそのヒト化抗体を提供する。本開示はまた、これらの抗体のVHHを提供する。これらのVHHは、本明細書に記載されるような様々な多重特異性抗体構築物において用いることができる。

【0138】

cMET-1H1（または1H1）、およびcMET-1H1由来の抗体（例えば、ヒト化抗体）のCDR配列は、それぞれ、SEQ ID NO: 1、2、および3に示されるようなVHHドメインのCDRを含む。cMET-1H1抗体のVHHドメインのアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 19、77、78、79、80、81、および84に示される。

30

【0139】

cMET-1A12（または1A12）、およびcMET-1A12由来の抗体（例えば、ヒト化抗体）のCDR配列は、それぞれ、SEQ ID NO: 4、5、および6に示されるようなVHHドメインのCDRを含む。cMET-1A12抗体のVHHドメインのアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 20に示される。

【0140】

cMET-1E9（または1E9）、およびcMET-1E9由来の抗体（例えば、ヒト化抗体）のCDR配列は、それぞれ、SEQ ID NO: 7、8、および9に示されるようなVHHドメインのCDRを含む。cMET-1E9抗体のVHHドメインのアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 21に示される。

40

【0141】

cMET-1F3（または1F3）、およびcMET-1F3由来の抗体（例えば、ヒト化抗体）のCDR配列は、それぞれ、SEQ ID NO: 10、11、および12に示されるようなVHHドメインのCDRを含む。cMET-1F3抗体のVHHドメインのアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 22、82、および83に示される。

【0142】

様々な改変VHHまたはヒト化VHHのアミノ酸配列もまた、提供される。ラマ抗体を改変するかまたはヒト化するには様々な方法があるため（例えば、配列を様々なアミノ酸置

50

換で改変することができる）、抗体の重鎖および軽鎖は、1つよりも多いバージョンのヒト化配列を有することができる。いくつかの態様において、ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO: 19～22および77～84のいずれかの配列と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。

【0143】

さらに、いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片はまた、SEQ ID NO: 1～3、SEQ ID NO: 4～6、SEQ ID NO: 7～9、およびSEQ ID NO: 10～12の群から選択される1つ、2つ、または3つのVHHドメインCDRを含有することができる。

【0144】

いくつかの態様において、抗体は、相補性決定領域（CDR）1、2、3を含む重鎖抗体可変ドメイン（VHH）を有することができ、ここで、CDR1領域は、選択されたVHH CDR1アミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、または95%同一であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、CDR2領域は、選択されたVHH CDR2アミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、または95%同一であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、およびCDR3領域は、選択されたVHH CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、または95%同一であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。選択されたVHH CDR1、2、3のアミノ酸配列を、図32に示す。

【0145】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片は、0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するVHH CDR1；0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するVHH CDR2；0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するVHH CDR3のうちの1つ、2つ、または3つを含有する、重鎖抗体可変ドメイン（VHH）を含有することができ、ここで、VHH CDR1、VHH CDR2、およびVHH CDR3は、図32中のCDRから選択される。

【0146】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片は、0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するSEQ ID NO: 1；0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するSEQ ID NO: 2；0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するSEQ ID NO: 3のCDRのうちの1つ、2つ、または3つを含有する、重鎖抗体可変ドメイン（VHH）を含有することができる。

【0147】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片は、0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するSEQ ID NO: 4；0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するSEQ ID NO: 5；0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するSEQ ID NO: 6のCDRのうちの1つ、2つ、または3つを含有する、重鎖抗体可変ドメイン（VHH）を含有することができる。

【0148】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片は、0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するSEQ ID NO: 7；0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するSEQ ID NO: 8；0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するSEQ ID NO: 9のCDRのうちの1つ、2つ、または3つを含有する、重鎖抗体可変ドメイン（VHH）を含有することができる。

【0149】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片は、0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するSEQ ID NO: 10；0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するSEQ ID NO: 11；0個、1

10

20

30

40

50

個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するSEQ ID NO: 12のCDRのうちの1つ、2つ、または3つを含有する、重鎖抗体可変ドメイン（VHH）を含有することができる。

【0150】

挿入、欠失、および置換は、CDR配列内、またはCDR配列の一方もしくは両方の末端にあることができる。いくつかの態様において、CDRは、Kabatナンバリングスキームに基づいて決定される。いくつかの態様において、CDRは、Chothiaナンバリングスキームに基づいて決定される。いくつかの態様において、CDRは、組み合わせナンバリングスキームに基づいて決定される。

【0151】

本開示はまた、cMETに結合する抗体またはその抗原結合断片を提供する。抗体またはその抗原結合断片は、選択されたVHH配列と少なくとも80%、85%、90%、または95%同一であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、重鎖抗体可変ドメイン（VHH）を含有する。いくつかの態様において、選択されたVHH配列はSEQ ID NO: 19である。いくつかの態様において、選択されたVHH配列はSEQ ID NO: 20である。いくつかの態様において、選択されたVHH配列はSEQ ID NO: 21である。いくつかの態様において、選択されたVHH配列はSEQ ID NO: 22である。いくつかの態様において、選択されたVHH配列はSEQ ID NO: 77である。いくつかの態様において、選択されたVHH配列はSEQ ID NO: 78である。いくつかの態様において、選択されたVHH配列はSEQ ID NO: 79である。いくつかの態様において、選択されたVHH配列はSEQ ID NO: 80である。いくつかの態様において、選択されたVHH配列はSEQ ID NO: 81である。いくつかの態様において、選択されたVHH配列はSEQ ID NO: 82である。いくつかの態様において、選択されたVHH配列はSEQ ID NO: 83である。いくつかの態様において、選択されたVHH配列はSEQ ID NO: 84である。

【0152】

2つのアミノ酸配列、または2つの核酸配列の同一性パーセントを決定するために、配列を、最適な比較の目的で整列させる（例えば、最適なアラインメントのために、第1および第2のアミノ酸配列または核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができる、非相同配列を、比較の目的で無視することができる）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列中のある位置が、第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められている場合には、分子は、その位置で同一である。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する必要があるギャップの数、および各ギャップの長さを考慮した、配列によって共有される同一の位置の数の関数である。例証の目的で、配列の比較および2つの配列間の同一性パーセントの決定は、例えば、12のギャップペナルティ、4のギャップエクステンドペナルティ、および5のフレームシフトギャップペナルティを有するBlossum 62スコアリングマトリックスを用いて、達成することができる。

【0153】

本開示はまた、免疫グロブリン重鎖抗体可変ドメイン（VHH）を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、核酸を提供する。VHHは、図32に示されるようなCDRを含むか、または図35に示されるような配列を有する。

【0154】

抗体および抗原結合断片はまた、抗体または抗体断片の抗体バリエーション（誘導体およびコンジュゲートを含む）、および多重特異性（例えば、二重特異性）抗体または抗体断片であることができる。本明細書で提供される追加の抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、多重特異性（多量体、例えば、二重特異性）、ヒト抗体、キメラ抗体（例えば、ヒト-マウスキメラ）、一本鎖抗体、細胞内で作製された抗体（すなわち、細胞内抗体）、およびその抗原結合断片である。

【0155】

いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片は、様々なタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2）、またはサブクラスが起源であることができるFcドメインを含む。いくつかの態様において、Fcドメインは、IgG抗体またはその抗原結合断片が起源である。いくつかの態様において、Fcドメインは、1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれよりも多い重鎖定常領域を含む。

【0156】

本開示はまた、cMETに結合する抗体またはその抗原結合断片を提供する。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片は、SEQ ID NO: 1、4、7、または10から選択される重鎖抗体可変ドメイン（VHH）CDR1を含む。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片は、SEQ ID NO: 2、5、8、または11から選択される重鎖抗体可変ドメイン（VHH）CDR2を含む。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片は、SEQ ID NO: 3、6、9、または12から選択される重鎖抗体可変ドメイン（VHH）CDR3を含む。

10

【0157】

抗EGFR抗体および抗原結合断片

本開示は、EGFRに特異的に結合する抗体およびその抗原結合断片を提供する。本明細書に記載される抗体および抗原結合断片は、EGFRに結合することができる。これらの抗体は、アゴニストまたはアンタゴニストであることができる。いくつかの態様において、これらの抗体は、EGFR関連シグナル伝達経路を阻害することができ（例えば、EGFとEGFRとの間の結合を遮断する）、したがってがん（例えば、NSCLC）を処置することができる。いくつかの態様において、これらの抗体は、CMCまたはADCCを開始することができる。

20

【0158】

本開示は、例えば、抗EGFR抗体、そのキメラ抗体、およびそのヒト化抗体を提供する。いくつかの態様において、抗EGFR抗体およびその誘導抗体（例えば、ヒト化抗体）のCDR配列は、SEQ ID NO: 13、14、および15の、重鎖可変ドメインのCDRを含む。これらのVH CDRを有するVHは、様々な異なるVL CDRを有するVLとペアになることができる。いくつかの態様において、抗EGFR抗体、およびその誘導抗体（例えば、ヒト化抗体）のCDR配列は、SEQ ID NO: 16、17、および18の、軽鎖可変ドメインのCDRを含む。

30

【0159】

ヒト化抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列もまた、提供される。マウス抗体をヒト化する様々な方法がある（例えば、配列を様々なアミノ酸置換で改変することができる）ため、抗体の重鎖および軽鎖は、1つよりも多いバージョンのヒト化配列を有することができる。いくつかの態様において、ヒト化重鎖可変領域（VH）は、SEQ ID NO: 23と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。いくつかの態様において、ヒト化軽鎖可変領域（VL）は、SEQ ID NO: 24と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。

40

【0160】

抗EGFR抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 23に示される。抗EGFR抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 24に示される。

【0161】

さらに、いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片はまた、SEQ ID NO: 13~15の群から選択される1つ、2つ、もしくは3つの重鎖可変領域CDR；および/またはSEQ ID NO: 16~18の群から選択される1つ、2つ、もしくは3つの軽鎖可変領域CDRを含有することができる。

【0162】

いくつかの態様において、抗体は、

50

相補性決定領域（CDR）1、2、3を含む重鎖可変領域（VH）であって、CDR1領域が、選択されたVH CDR1アミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、または95%同一であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、CDR2領域が、選択されたVH CDR2アミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、または95%同一であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、およびCDR3領域が、選択されたVH CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、または95%同一であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、VH；ならびに

CDR1、2、3を含む軽鎖可変領域（VL）であって、CDR1領域が、選択されたVL CDR1アミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、または95%同一であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、CDR2領域が、選択されたVL CDR2アミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、または95%同一であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、およびCDR3領域が、選択されたVL CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、または95%同一であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、VLを有することができる。選択されたVH CDR1、2、3のアミノ酸配列および選択されたVL CDR1、2、3のアミノ酸配列を、図33（VH CDR）および図34（VL CDR）に示す。

10

【0163】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片は、0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するSEQ ID NO: 13；0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するSEQ ID NO: 14；0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するSEQ ID NO: 15のCDRのうちの1つ、2つ、または3つを含有する、重鎖可変ドメインを含有することができる。

20

【0164】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片は、0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するSEQ ID NO: 16；0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するSEQ ID NO: 17；0個、1個、または2個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を有するSEQ ID NO: 18のCDRのうちの1つ、2つ、または3つを含有する、軽鎖可変ドメインを含有することができる。

【0165】

挿入、欠失、および置換は、CDR配列内、またはCDR配列の一方もしくは両方の末端にあることができる。いくつかの態様において、CDRは、Kabatナンバリングスキームに基づいて決定される。いくつかの態様において、CDRは、Chothiaナンバリングスキームに基づいて決定される。いくつかの態様において、CDRは、組み合わせナンバリングスキームに基づいて決定される。

30

【0166】

本開示はまた、EGFRに結合する抗体またはその抗原結合断片を提供する。抗体またはその抗原結合断片は、選択されたVH配列と少なくとも80%、85%、90%、または95%同一であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変領域（VH）、および選択されたVL配列と少なくとも80%、85%、90%、または95%同一であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変領域（VL）を含有する。いくつかの態様において、選択されたVH配列はSEQ ID NO: 23であり、および選択されたVL配列はSEQ ID NO: 24である。

40

【0167】

本開示はまた、免疫グロブリン重鎖または免疫グロブリン軽鎖を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、核酸を提供する。免疫グロブリン重鎖または免疫グロブリン軽鎖は、それぞれ、図33および図34に示されるようなCDRを含むか、または図36に示されるような配列を有する。ポリペプチドが、対応するポリペプチド（例えば、対応する重鎖可変領域または対応する軽鎖可変領域）とペアになると、ペアになったポリペプチドは、EGFR（例えば、ヒトEGFR）に結合する。

【0168】

抗EGFR抗体および抗原結合断片はまた、抗体または抗体断片の抗体バリエーション（誘導

50

体およびコンジュゲートを含む)、および多重特異性(例えば、二重特異性)抗体または抗体断片であることができる。本明細書で提供される追加の抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、多重特異性(多量体、例えば、二重特異性)、ヒト抗体、キメラ抗体(例えば、ヒト-マウスキメラ)、一本鎖抗体、細胞内で作製された抗体(すなわち、細胞内抗体)、およびその抗原結合断片である。抗体またはその抗原結合断片は、任意のタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2)、またはサブクラスのものであることができる。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片は、IgG抗体またはその抗原結合断片である。

【0169】

抗体の断片は、全長抗体の所望の親和性および特異性を保持する限り、提供される方法における使用に適している。したがって、EGFRに結合する抗体の断片は、EGFRに結合する能力を保持することになる。

【0170】

1つの局面において、本開示は、

(1) それぞれ、SEQ ID NO: 13、14、および15に示されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域(CDR)1、2、および3を含む重鎖可変領域(VH)を含む、免疫グロブリン重鎖またはその断片であって、該VHが、SEQ ID NO: 24に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)とペアになるとEGFRに結合する、免疫グロブリン重鎖またはその断片; または

(2) それぞれ、SEQ ID NO: 16、17、および18に示されるアミノ酸配列を含むCDR1、2、および3を含むVLを含む、免疫グロブリン軽鎖またはその断片であって、該VLが、SEQ ID NO: 23に示されるアミノ酸配列を含むVHとペアになるとEGFRに結合する、免疫グロブリン軽鎖またはその断片を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、核酸に関する。

【0171】

いくつかの態様において、核酸は、それぞれ、SEQ ID NO: 13、14、および15に示されるアミノ酸配列を含むCDR1、2、および3を含むVHを含む、免疫グロブリン重鎖またはその断片を含むポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドを含む。

【0172】

いくつかの態様において、核酸は、それぞれ、SEQ ID NO: 16、17、および18に示されるアミノ酸配列を含むCDR1、2、および3を含むVLを含む、免疫グロブリン軽鎖またはその断片を含むポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドを含む。

【0173】

いくつかの態様において、VHは、VLとペアになるとヒトEGFRに特異的に結合し、またはVLは、VHとペアになるとヒトEGFRに特異的に結合する。

【0174】

いくつかの態様において、免疫グロブリン重鎖またはその断片は、ヒト化免疫グロブリン重鎖またはその断片であり、および免疫グロブリン軽鎖またはその断片は、ヒト化免疫グロブリン軽鎖またはその断片である。

【0175】

いくつかの態様において、核酸は、一本鎖可変断片(scFv)をコードする。いくつかの態様において、核酸はcDNAである。

【0176】

1つの局面において、本開示は、本明細書に記載される核酸のうちの1つまたは複数を含む、ベクターに関する。1つの局面において、本開示は、本明細書に記載される核酸のうちの2つを含むベクターに関し、ここで、該ベクターは、一緒にEGFRに結合するVL領域およびVH領域をコードする。1つの局面において、本開示は、ベクターのペアに関し、ここで、各ベクターは、本明細書に記載される核酸のうちの1つを含み、該ベクターのペアは、一緒にEGFRに結合するVL領域およびVH領域を共にコードする。

10

20

30

40

50

【0177】

1つの局面において、本開示は、本明細書に記載されるベクターまたはベクターのペアを含む、細胞に関する。1つの局面において、本開示は、本明細書に記載される核酸のうちの2つに関する。

【0178】

いくつかの態様において、2つの核酸は、一緒にEGFRに結合するVL領域およびVH領域を共にコードする。

【0179】

1つの局面において、本開示は、

相補性決定領域（CDR）1、2、および3を含む重鎖可変領域（VH）であって、VH CDR1領域が、SEQ ID NO: 13と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、VH CDR2領域が、SEQ ID NO: 14と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、およびVH CDR3領域が、SEQ ID NO: 15と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む、VH；ならびに

CDR1、2、および3を含む軽鎖可変領域（VL）であって、VL CDR1領域が、SEQ ID NO: 16と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、VL CDR2領域が、SEQ ID NO: 17と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含み、およびVL CDR3領域が、SEQ ID NO: 18と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む、VLを含む、EGFR（上皮成長因子受容体）に結合する抗体またはその抗原結合断片に関する。

【0180】

いくつかの態様において、VHは、それぞれ、SEQ ID NO: 13、14、および15に示されるアミノ酸配列を有するCDR1、2、3を含み、およびVLは、それぞれ、SEQ ID NO: 16、17、および18に示されるアミノ酸配列を有するCDR1、2、3を含む。

【0181】

1つの局面において、本開示は、SEQ ID NO: 23と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）、およびSEQ ID NO: 24と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む、EGFRに結合する抗体またはその抗原結合断片に関する。

【0182】

いくつかの態様において、VHはSEQ ID NO: 23の配列を含む、およびVLはSEQ ID NO: 24の配列を含む。

【0183】

いくつかの態様において、抗体または抗原結合断片は、ヒトEGFRに特異的に結合する。

【0184】

いくつかの態様において、抗体または抗原結合断片は、一本鎖可変断片（scFV）である。

【0185】

1つの局面において、本開示は、本明細書に記載されるような抗体またはその抗原結合断片のVH CDR1、2、3、およびVL CDR1、2、3を含む、抗体またはその抗原結合断片に関する。

【0186】

1つの局面において、本開示は、本明細書に記載されるような抗体またはその抗原結合断片と交差競合する、抗体またはその抗原結合断片に関する。

【0187】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体は、二重特異性抗体または多重特異性抗体である。

【0188】

cMET/EGFR二重特異性抗体の構造

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、二重特異性抗体は、cMETを標的とするVHHを含むように設計される。二重特異性抗体を、以下に説明する。

【0189】

cMET（チロシン-タンパク質キナーゼMet、または肝細胞増殖因子受容体（HGFR））は、胚発生、器官形成、および創傷治癒に不可欠の1回貫通チロシンキナーゼ受容体である。本開示は、cMETおよびEGFRの両方に結合する二重特異性抗体を提供する。二重特異性抗体を、対象におけるcMETまたはEGFR陽性がん（例えば、非小細胞肺癌）を処置するために使用することができる。

【0190】

特定の構造を有するcMET/EGFR二重特異性抗体を、以下に説明する。

【0191】

二重特異性-V1構造

図16Aに示されるように、cMET/EGFR二重特異性抗体を、二重特異性-V1構造を有するように調製することができる。具体的には、cMET/EGFR二重特異性抗体は、(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖抗体可変ドメイン（VHH）、第1のヒンジ領域、第1のFc領域を含む、第1のポリペプチド；(b) N末端からC末端へ、重鎖可変領域（VH）、第2のヒンジ領域、および第2のFc領域を含む、第2のポリペプチド；ならびに(c) 軽鎖可変領域（VL）を含む、第3のポリペプチド、を含む。いくつかの態様において、第1のVHHは、cMETに特異的に結合する。いくつかの態様において、VHおよびVLは、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。

【0192】

いくつかの態様において、第1のヒンジ領域および/または第2のヒンジ領域は、SEQ ID NO: 25~29のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0193】

いくつかの態様において、cMET/EGFR二重特異性抗体は、ノブ-イントゥ-ホール（knob-into-hole）変異を含む。いくつかの態様において、Fc領域は、IgG1 Fc領域である。いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 43または44と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 45または46と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 47と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0194】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸（Asp）を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う332位のグルタミン酸（Glu）を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 35または36と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0195】

いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 33と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 34と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0196】

二重特異性-V2構造

図17Aに示されるように、cMET/EGFR二重特異性抗体を、二重特異性-V2構造を有

10

20

30

40

50

するように調製することができる。具体的には、cMET/EGFR二重特異性抗体は、(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖抗体可変ドメイン(VHH)、第1のヒンジ領域、第1のFc領域を含む、第1のポリペプチド；ならびに(b) N末端からC末端へ、一本鎖可変断片(scFv)、第2のヒンジ領域、および第2のFc領域を含む、第2のポリペプチド、を含む。

【0197】

いくつかの態様において、第1のVHHは、cMETに特異的に結合する。いくつかの態様において、scFvは、重鎖可変領域(VH)、リンカーペプチド配列、および軽鎖可変領域(VL)を含む。いくつかの態様において、VHおよびVLは、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。

【0198】

いくつかの態様において、リンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、リンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 38または39と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、リンカーペプチド配列は、GGGGS (SEQ ID NO: 37) の1回または複数回(例えば、1、2、3、4、5、6、7、または8回)のリピートと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のヒンジ領域および/または第2のヒンジ領域は、SEQ ID NO: 25~29のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0199】

いくつかの態様において、cMET/EGFR二重特異性抗体は、ノブ-イントゥ-ホール変異を含む。いくつかの態様において、Fc領域は、IgG1 Fc領域である。いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 53または54と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 55または56と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0200】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 57または58と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 59または60と少なくとも80%同一である配列を含む。

【0201】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸(Asp)を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う332位のグルタミン酸(Glu)を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 35または36と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0202】

二重特異性-V3構造

図18Aに示されるように、cMET/EGFR二重特異性抗体を、二重特異性-V3構造を有するように調製することができる。具体的には、cMET/EGFR二重特異性抗体は、(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖抗体可変ドメイン(VHH1)、第1のリンカーペプチド配列、第1の重鎖可変領域(VH1)、第1のヒンジ領域、および第1のFc領域を含む、第1のポリペプチド；(b) 第1の軽鎖可変領域(VL1)を含む、第2のポリペプチド；(c) N末端からC末端へ、第2の重鎖抗体可変ドメイン(VHH2)、第2のリンカーペプチド配列、第2の重鎖可変領域(VH2)、第2のヒンジ領域、および第2のFc領域を含む、第3

10

20

30

40

50

のポリペプチド；ならびに（d）第2の軽鎖可変領域（VL2）を含む、第4のポリペプチド、を含む。いくつかの態様において、VHH1およびVHH2は、cMETに特異的に結合する。いくつかの態様において、VH1およびVL1は、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。いくつかの態様において、VH2およびVL2は、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。

【0203】

いくつかの態様において、第1のリンカーペプチド配列および/または第2のリンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のリンカーペプチド配列および/または第2のリンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 38または39と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1および/または第2のリンカーペプチド配列は、GGGS（SEQ ID NO: 37）の1回または複数回（例えば、1、2、3、4、5、6、7、または8回）のリピートと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0204】

いくつかの態様において、第1のヒンジ領域および/または第2のヒンジ領域は、SEQ ID NO: 25~29のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0205】

いくつかの態様において、VHH1およびVHH2の配列は、同一である。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 32と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 61または62と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 63と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 61または62と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第4のポリペプチドは、SEQ ID NO: 63と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0206】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸（Asp）を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う332位のグルタミン酸（Glu）を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 35または36と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0207】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドおよび/または第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 33と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドおよび/または第4のポリペプチドは、SEQ ID NO: 34と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0208】

二重特異性-V4構造

図19Aに示されるように、cMET/EGFR二重特異性抗体を、二重特異性-V4構造を有するように調製することができる。具体的には、cMET/EGFR二重特異性抗体は、（a）N末端からC末端へ、第1の重鎖可変領域（VH1）、第1のヒンジ領域、第1のFc領域、第1のリンカーペプチド配列、および第1の重鎖抗体可変ドメイン（VHH1）を含む、第1のポリペプチド；（b）第1の軽鎖可変領域（VL1）を含む、第2のポリペプチド；（c）N末端からC末端へ、第2の重鎖可変領域（VH2）、第2のヒンジ領域、第2のFc領域、第

2のリンカーペプチド配列、および第2の重鎖抗体可変ドメイン（VHH2）を含む、第3のポリペプチド；ならびに（d）第2の軽鎖可変領域（VL2）を含む、第4のポリペプチド、を含む。いくつかの態様において、VHH1および/またはVHH2は、cMETに特異的に結合する。いくつかの態様において、VH1およびVL1は、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。いくつかの態様において、VH2およびVL2は、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。

【0209】

いくつかの態様において、第1のリンカーペプチド配列および/または第2のリンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のリンカーペプチド配列および/または第2のリンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 38または39と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1および/または第2のリンカーペプチド配列は、GGGGG（SEQ ID NO: 37）の1回または複数回（例えば、1、2、3、4、5、6、7、または8回）のリピートと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

10

【0210】

いくつかの態様において、第1のヒンジ領域および/または第2のヒンジ領域は、SEQ ID NO: 25~29のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0211】

いくつかの態様において、VHH1およびVHH2の配列は、同一である。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 32と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 69または70と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 71と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 69または70と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第4のポリペプチドは、SEQ ID NO: 71と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

20

【0212】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸（Asp）を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う332位のグルタミン酸（Glu）を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 35または36と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

30

【0213】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドおよび/または第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 33と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドおよび/または第4のポリペプチドは、SEQ ID NO: 34と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

40

【0214】

いくつかの態様において、二重特異性-V1、二重特異性-V2、二重特異性-V3、または二重特異性-V4構造を有するcMET/EGFR二重特異性抗体の、cMETに特異的に結合するVHHは、本開示に記載されるcMETを標的とするVHHのいずれかから選択することができる。

【0215】

いくつかの態様において、二重特異性-V1、二重特異性-V2、二重特異性-V3、または

50

二重特異性-V4構造を有するcMET/EGFR二重特異性抗体の、VLと会合すると、EGFRに特異的に結合するVHは、本開示に記載されるEGFRを標的とするVHのいずれかから選択することができる。

【0216】

いくつかの態様において、二重特異性-V1、二重特異性-V2、二重特異性-V3、または二重特異性-V4構造を有するcMET/EGFR二重特異性抗体の、VHと会合すると、EGFRに特異的に結合するVLは、本開示に記載されるEGFRを標的とするVLのいずれかから選択することができる。

【0217】

cMET/EGFR多重特異性抗体の構造

いくつかの態様において、多重特異性（例えば、三重特異性）抗体は、cMETを標的とするVHHを含むように設計される。いくつかの態様において、cMETを標的とする追加のVHHを含む、多重特異性（例えば、三重特異性）抗体が設計される。多重特異性（例えば、三重特異性）抗体を、以下に説明する。

【0218】

cMET（チロシン-タンパク質キナーゼMet、または肝細胞増殖因子受容体（HGFR））は、胚発生、器官形成、および創傷治癒に不可欠の1回貫通チロシンキナーゼ受容体である。本開示は、cMETおよびEGFRの両方に結合する多重特異性（例えば、三重特異性）抗体を提供する。三重特異性抗体を、対象におけるcMETまたはEGFR陽性がん（例えば、非小細胞肺癌）を処置するために使用することができる。

【0219】

特定の構造を有するcMET/EGFR三重特異性抗体を、以下に説明する。

【0220】

三重特異性-V1構造

図16Bに示されるように、cMET/EGFR三重特異性抗体を、三重特異性-V1構造を有するように調製することができる。具体的には、cMET/EGFR三重特異性抗体は、(a) N末端からC末端へ、第2の重鎖抗体可変ドメイン（VHH）、リンカーペプチド配列、第1のVHH、第1のヒンジ領域、第1のFc領域を含む、第1のポリペプチド；(b) N末端からC末端へ、重鎖可変領域（VH）、第2のヒンジ領域、および第2のFc領域を含む、第2のポリペプチド；ならびに(c) 軽鎖可変領域（VL）を含む、第3のポリペプチド、を含む。いくつかの態様において、第1のVHHおよび第2のVHHは、cMETに特異的に結合する。いくつかの態様において、VHおよびVLは、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。

【0221】

いくつかの態様において、第1のヒンジ領域および/または第2のヒンジ領域は、SEQ ID NO: 25~29のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0222】

いくつかの態様において、リンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、リンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 38または39と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、リンカーペプチド配列は、GGGGS（SEQ ID NO: 37）の1回または複数回（例えば、1、2、3、4、5、6、7、または8回）のリピートと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0223】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 48または49と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様

10

20

30

40

50

において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 50または51と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 52と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0224】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸 (Asp) を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う332位のグルタミン酸 (Glu) を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 35または36と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

10

【0225】

いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 33と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 34と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0226】

三重特異性-V2構造

図17Bに示されるように、cMET/EGFR三重特異性抗体を、三重特異性-V2構造を有するように調製することができる。具体的には、cMET/EGFR三重特異性抗体は、(a) N末端からC末端へ、第2の重鎖抗体可変ドメイン (VHH)、第2のリンカーペプチド配列、第1のVHH、第1のヒンジ領域、第1のFc領域を含む、第1のポリペプチド；ならびに (b) N末端からC末端へ、一本鎖可変断片 (scFv)、第2のヒンジ領域、および第2のFc領域を含む、第2のポリペプチド、を含む。

20

【0227】

いくつかの態様において、第1および第2のVHHは、cMETに特異的に結合する。いくつかの態様において、scFvは、重鎖可変領域 (VH)、第1のリンカーペプチド配列、および軽鎖可変領域 (VL) を含む。いくつかの態様において、VHおよびVLは、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。

【0228】

いくつかの態様において、第1のヒンジ領域および/または第2のヒンジ領域は、SEQ ID NO: 25~29のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

30

【0229】

いくつかの態様において、cMET/EGFR三重特異性抗体は、ノブ-イントゥ-ホール変異を含む。いくつかの態様において、Fc領域は、IgG1 Fc領域である。

【0230】

いくつかの態様において、第1のリンカーペプチド配列および/または第2のリンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のリンカーペプチド配列および/または第2のリンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 38または39と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のリンカーペプチド配列および/または第2のリンカーペプチド配列は、GGGGS (SEQ ID NO: 37) の1回または複数回 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、または8回) のリピートと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

40

【0231】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 57または58と少なく

50

とも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 59または60と少なくとも80%同一である配列を含む。

【0232】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸(Asp)を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う332位のグルタミン酸(Glu)を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 35または36と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

10

【0233】

三重特異性-V3構造

図18Bに示されるように、cMET/EGFR三重特異性抗体を、三重特異性-V3構造を有するように調製することができる。具体的には、cMET/EGFR三重特異性抗体は、(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖抗体可変ドメイン(VHH1)、第1のリンカーペプチド配列、第1の重鎖可変領域(VH1)、第1のヒンジ領域、および第1のFc領域を含む、第1のポリペプチド；(b) 第1の軽鎖可変領域(VL1)を含む、第2のポリペプチド；(c) N末端からC末端へ、第2の重鎖抗体可変ドメイン(VHH2)、第2のリンカーペプチド配列、第2の重鎖可変領域(VH2)、第2のヒンジ領域、および第2のFc領域を含む、第3のポリペプチド；ならびに(d) 第2の軽鎖可変領域(VL2)を含む、第4のポリペプチド、を含む。いくつかの態様において、VHH1およびVHH2は、cMETに特異的に結合する。いくつかの態様において、VH1およびVL1は、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。いくつかの態様において、VH2およびVL2は、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。

20

【0234】

いくつかの態様において、第1のリンカーペプチド配列および/または第2のリンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のリンカーペプチド配列および/または第2のリンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 38または39と少なくとも80%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1および/または第2のリンカーペプチド配列は、GGGGS(SEQ ID NO: 37)の1回または複数回(例えば、1、2、3、4、5、6、7、または8回)のリピートと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

30

【0235】

いくつかの態様において、第1のヒンジ領域および/または第2のヒンジ領域は、SEQ ID NO: 25~29のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0236】

いくつかの態様において、三重特異性-V3構造に記載されるようなVHH1およびVHH2の配列は、異なる。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 64または65と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 66または67と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第4のポリペプチドは、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

40

【0237】

50

いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 85と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 86と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第4のポリペプチドは、SEQ ID NO: 68と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0238】

いくつかの態様において、Fc領域は、IgG1（例えば、ヒトIgG1）Fc領域である。いくつかの態様において、本明細書に記載されるcMET/EGFR三重特異性抗体は、ノブ-イントゥ-ホール変異を含む。

10

【0239】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸（Asp）を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う332位のグルタミン酸（Glu）を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 35または36と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0240】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドおよび/または第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 33と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドおよび/または第4のポリペプチドは、SEQ ID NO: 34と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

20

【0241】

三重特異性-V4構造

図19Bに示されるように、cMET/EGFR三重特異性抗体を、三重特異性-V4構造を有するように調製することができる。具体的には、cMET/EGFR三重特異性抗体は、(a) N末端からC末端へ、第1の重鎖可変領域（VH1）、第1のヒンジ領域、第1のFc領域、第1のリンカーペプチド配列、および第1の重鎖抗体可変ドメイン（VHH1）を含む、第1のポリペプチド；(b) 第1の軽鎖可変領域（VL1）を含む、第2のポリペプチド；(c) N末端からC末端へ、第2の重鎖可変領域（VH2）、第2のヒンジ領域、第2のFc領域、第2のリンカーペプチド配列、および第2の重鎖抗体可変ドメイン（VHH2）を含む、第3のポリペプチド；ならびに(d) 第2の軽鎖可変領域（VL2）を含む、第4のポリペプチド、を含む。いくつかの態様において、VHH1および/またはVHH2は、cMETに特異的に結合する。いくつかの態様において、VH1およびVL1は、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。いくつかの態様において、VH2およびVL2は、互いに会合して、EGFRに特異的に結合する。

30

【0242】

いくつかの態様において、第1のリンカーペプチド配列および/または第2のリンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のリンカーペプチド配列および/または第2のリンカーペプチド配列は、SEQ ID NO: 38または39と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1および/または第2のリンカーペプチド配列は、GGGGS（SEQ ID NO: 37）の1回または複数回（例えば、1、2、3、4、5、6、7、または8回）のリピートと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

40

【0243】

いくつかの態様において、第1のヒンジ領域および/または第2のヒンジ領域は、SEQ ID NO: 25~29のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%

50

同一である配列を含む。

【0244】

いくつかの態様において、三重特異性-V4構造に記載されるようなVHH1およびVHH2の配列は、異なる。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 30または31と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 72または73と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 76と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 74または75と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第4のポリペプチドは、SEQ ID NO: 76と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

10

【0245】

いくつかの態様において、Fc領域は、IgG1（例えば、ヒトIgG1）Fc領域である。いくつかの態様において、本明細書に記載されるcMET/EGFR三重特異性抗体は、ノブ-イントゥ-ホール変異を含む。

【0246】

いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸（Asp）を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、EUナンバリングに従う332位のグルタミン酸（Glu）を含む。いくつかの態様において、第1のFc領域および/または第2のFc領域は、SEQ ID NO: 35または36と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

20

【0247】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドおよび/または第3のポリペプチドは、SEQ ID NO: 33と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドおよび/または第4のポリペプチドは、SEQ ID NO: 34と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

30

【0248】

いくつかの態様において、三重特異性-V1、三重特異性-V2、三重特異性-V3、または三重特異性-V4構造を有するcMET/EGFR三重特異性抗体の、cMETに特異的に結合するVHHは、本開示に記載されるcMETを標的とするVHHのいずれかから選択することができる。

【0249】

いくつかの態様において、三重特異性-V1、三重特異性-V2、三重特異性-V3、または三重特異性-V4構造を有するcMET/EGFR三重特異性抗体の、VLと会合すると、EGFRに特異的に結合するVHは、本開示に記載されるEGFRを標的とするVHのいずれかから選択することができる。

40

【0250】

いくつかの態様において、三重特異性-V1、三重特異性-V2、三重特異性-V3、または三重特異性-V4構造を有するcMET/EGFR三重特異性抗体の、VHと会合すると、EGFRに特異的に結合するVLは、本開示に記載されるEGFRを標的とするVLのいずれかから選択することができる。

【0251】

抗体の特徴

抗cMET、抗EGFR、または抗cMET/EGFR抗原結合タンパク質構築物（例えば、抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体、多重特異性抗体、またはその抗体断片）は、本明細書に記載されるような任意の抗cMET抗体、抗EGFR抗体、または任意のその抗原結合断

50

片に由来する抗原結合部位を含むことができる。

【0252】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、EGFRアンタゴニストである。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片は、EGFRアゴニストである。いくつかの態様において、本明細書に記載されるような抗体またはその抗原結合断片は、cMETアンタゴニストである。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片は、cMETアゴニストである。

【0253】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、cMETおよび/またはEGFRに結合することができ、それによって、これらの受容体とそのそれぞれのリガンドとの相互作用を遮断し；cMETおよび/もしくはEGFRのリン酸化を減少させ；下流シグナル伝達経路（例えば、ERKおよび/もしくはAkt経路）のリン酸化を減少させ；ならびに/またはADCCおよび/もしくはCDCによってがん細胞を直接殺傷する。

10

【0254】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、JNJ-372またはJNJ-372アナログのものと比較して、少なくとも50%または約50%、少なくとも60%または約60%、少なくとも70%または約70%、少なくとも80%または約80%、少なくとも90%または約90%、少なくとも100%または約100%、少なくとも110%または約110%、少なくとも120%または約120%、少なくとも130%または約130%、少なくとも140%または約140%、少なくとも150%または約150%、少なくとも200%または約200%である、cMET結合能力（例えば、ELISAによって測定される）を有する。

20

【0255】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、JNJ-372またはJNJ-372アナログのものと比較して、少なくとも50%または約50%、少なくとも60%または約60%、少なくとも70%または約70%、少なくとも80%または約80%、少なくとも90%または約90%、少なくとも100%または約100%、少なくとも110%または約110%、少なくとも120%または約120%、少なくとも130%または約130%、少なくとも140%または約140%、少なくとも150%または約150%、少なくとも200%または約200%である、EGFR結合能力（例えば、ELISAによって測定される）を有する。

30

【0256】

いくつかの態様において、cMETに結合するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のEC50は、50 ng/ml未満または約50 ng/ml、40 ng/ml未満または約40 ng/ml、30 ng/ml未満または約30 ng/ml、20 ng/ml未満または約20 ng/ml、15 ng/ml未満または約15 ng/ml、10 ng/ml未満または約10 ng/ml、9 ng/ml未満または約9 ng/ml、8 ng/ml未満または約8 ng/ml、7 ng/ml未満または約7 ng/ml、6 ng/ml未満または約6 ng/ml、5 ng/ml未満または約5 ng/ml、4 ng/ml未満または約4 ng/ml、3 ng/ml未満または約3 ng/ml、2 ng/ml未満または約2 ng/ml、1 ng/ml未満または約1 ng/mlである。いくつかの態様において、cMETに結合するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のEC50は、約1 ng/ml～約20 ng/ml、約1 ng/ml～約10 ng/ml、または約5 ng/ml～約10 ng/mlである。

40

【0257】

いくつかの態様において、cMET/HGF相互作用を遮断するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のEC50は、1 nM未満または約1 nM、0.9 nM未満または約0.9 nM、0.8 nM未満または約0.8 nM、0.7 nM未満または約0.7 nM、0.6 nM未満または約0.6 nM、0.5 nM未満または約0.5 nM、0.4 nM未満または約0.4 nM、0.3 nM未満または約0.3 nMである。いくつかの態様において、cMET/HGF相互作用を遮断するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のEC50は、約0.1

50

nM～約1 nM、約0.1 nM～約0.8 nM、または約0.1 nM～約0.6 nMである。いくつかの態様において、cMET/HGF相互作用を遮断するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のEC50は、実質的に同一の測定法を用いたJNJ372またはJNJ372アナログのEC50と比較して、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、または40%未満である。

【0258】

いくつかの態様において、EGFRに結合するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のEC50は、50 ng/ml未満または約50 ng/ml、40 ng/ml未満または約40 ng/ml、30 ng/ml未満または約30 ng/ml、20 ng/ml未満または約20 ng/ml、15 ng/ml未満または約15 ng/ml、10 ng/ml未満または約10 ng/ml、9 ng/ml未満または約9 ng/ml、8 ng/ml未満または約8 ng/ml、7 ng/ml未満または約7 ng/ml、6 ng/ml未満または約6 ng/ml、5 ng/ml未満または約5 ng/ml、4 ng/ml未満または約4 ng/ml、3 ng/ml未満または約3 ng/ml、2 ng/ml未満または約2 ng/ml、1 ng/ml未満または約1 ng/mlである。いくつかの態様において、EGFRに結合するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のEC50は、約1 ng/ml～約20 ng/ml、約1 ng/ml～約15 ng/ml、約1 ng/ml～約10 ng/ml、または約5 ng/ml～約10 ng/mlである。

【0259】

いくつかの態様において、EGFR/EGF相互作用を遮断するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のEC50は、1 nM未満または約1 nM、0.9 nM未満または約0.9 nM、0.8 nM未満または約0.8 nM、0.7 nM未満または約0.7 nM、0.6 nM未満または約0.6 nM、0.5 nM未満または約0.5 nM、0.4 nM未満または約0.4 nM、0.3 nM未満または約0.3 nMである。いくつかの態様において、EGFR/EGF相互作用を遮断するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のEC50は、約0.2 nM～約1 nM、約0.2 nM～約0.8 nM、または約0.2 nM～約0.6 nMである。いくつかの態様において、EGFR/EGF相互作用を遮断するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のEC50は、実質的に同一の測定法を用いたJNJ372またはJNJ372アナログのEC50と比較して、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、または3%未満である。

【0260】

いくつかの態様において、NSCLC細胞（例えば、本明細書に記載されるNSCLC細胞のいずれか1つ）に結合するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のEC50は、1 nM未満または約1 nM、0.9 nM未満または約0.9 nM、0.8 nM未満または約0.8 nM、0.7 nM未満または約0.7 nM、0.6 nM未満または約0.6 nM、0.5 nM未満または約0.5 nM、0.4 nM未満または約0.4 nM、0.3 nM未満または約0.3 nM、0.2 nM未満または約0.2 nM、0.15 nM未満または約0.15 nM、0.14 nM未満または約0.14 nM、0.13 nM未満または約0.13 nM、0.1 nM未満または約0.1 nMである。いくつかの態様において、NSCLC細胞に結合するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のEC50は、約0.1 nM～約1 nM、約0.1 nM～約0.5 nM、約0.1 nM～約0.2 nM、または約0.1 nM～約0.15 nMである。いくつかの態様において、NSCLC細胞に結合するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のEC50は、実質的に同一の測定法を用いたJNJ372またはJNJ372アナログのEC50と比較して、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、または5%未満である。

【0261】

いくつかの態様において、NSCLC細胞（例えば、本明細書に記載されるNSCLC細胞のいずれか1つ）の増殖を阻害するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のEC50は、2 nM未満または約2 nM、1.5 nM未満または約1.5 nM、1 nM未満または約1 nM、0.9 nM未満または約0.9 nM、0.8 nM未満または約0.8 nM、0.7 nM未満または約0.7 nM、0.6 nM未満または約0.6 nM、0.5 nM未満または約0.5 nM、0.4 nM未満または約0.4 nM、0.3 nM未満または約0.3 nM、0.2 nM未満または約0

.2 nM、0.1 nM未満または約0.1 nM、0.05 nM未満または約0.05 nM、0.04 nM未満または約0.04 nM、0.03 nM未満または約0.03 nMである。いくつかの態様において、NSCLC細胞の増殖を阻害するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のEC50は、約0.03 nM～約2 nM、約0.03 nM～約1 nM、または約0.03 nM～約0.3 nMである。いくつかの態様において、NSCLC細胞に結合するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のEC50は、実質的に同一の測定法を用いたJNJ372またはJNJ372アナログのEC50と比較して、20%未満、10%未満、5%未満、3%未満、1%未満、0.5%未満、0.1%未満、0.05%未満、または0.01%未満である。

【0262】

いくつかの態様において、内部移行を誘導するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のIC50は、0.5 nM未満または約0.5 nM、0.4 nM未満または約0.4 nM、0.3 nM未満または約0.3 nM、0.2 nM未満または約0.2 nM、0.15 nM未満または約0.15 nM、0.1 nM未満または約0.1 nM、0.09 nM未満または約0.09 nM、0.08 nM未満または約0.08 nM、0.07 nM未満または約0.07 nM、0.06 nM未満または約0.06 nM、0.05 nM未満または約0.05 nM、0.02 nM未満または約0.02 nM、0.01 nM未満または約0.01 nMである。いくつかの態様において、内部移行を誘導するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のIC50は、約0.01 nM～約0.1 nM、約0.01 nM～約0.05 nM、または約0.05 nM～約0.1 nMである。いくつかの態様において、内部移行を誘導するための本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片のIC50は、実質的に同一の測定法を用いたJNJ372またはJNJ372アナログのIC50と比較して、70%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、または3%未満である。

【0263】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NSCLC細胞（例えば、H1975細胞）においてJNJ372またはJNJ372アナログよりも良好なエフェクター機能（例えば、ADCC効果）を有する。

【0264】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、NSCLC細胞移植動物モデルにおいてJNJ372またはJNJ372アナログよりも良好ながん細胞殺傷効力を有する。

【0265】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、cMETとcMETリガンド（例えば、HGF）との相互作用を遮断することができる。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片は、cMETのcMETリガンド（例えば、HGF）に対する結合を、アイソタイプ対照抗体またはJNJ-372またはJNJ-372アナログのものと比較して、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、または5%未満に減少させる。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片は、JNJ-372またはJNJ-372アナログのものと比較して、少なくとも50%または約50%、少なくとも60%または約60%、少なくとも70%または約70%、少なくとも80%または約80%、少なくとも90%または約90%、少なくとも100%または約100%、少なくとも110%または約110%、少なくとも120%または約120%、少なくとも130%または約130%、少なくとも140%または約140%、少なくとも150%または約150%、少なくとも200%または約200%である、cMET/HGF遮断能力（例えば、ELISAによって測定される）を有する。

【0266】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、EGFRとEGFRリガンド（例えば、EGF）との相互作用を遮断することができる。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片は、EGFRのEGFRリガンド（例えば、EGF）に対する結合を、アイソタイプ対照抗体またはJNJ-372またはJNJ-372アナログのものと比較して、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満

、30%未満、20%未満、10%未満、または5%未満に減少させる。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片は、JNJ-372またはJNJ-372アナログのものと比較して、少なくとも50%または約50%、少なくとも60%または約60%、少なくとも70%または約70%、少なくとも80%または約80%、少なくとも90%または約90%、少なくとも100%または約100%、少なくとも110%または約110%、少なくとも120%または約120%、少なくとも130%または約130%、少なくとも140%または約140%、少なくとも150%または約150%、少なくとも200%または約200%である、EGFR/EGF遮断能力（例えば、本明細書に記載されるような免疫蛍光アッセイによって測定される）を有する。

【0267】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、細胞（例えば、cMET発現細胞）におけるcMETのリン酸化（例えば、HGF誘導性リン酸化）レベルを、非特異的抗体、アイソタイプ対照抗体、JNJ372、またはJNJ372アナログのものと比較して、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、または5%未満よりも低くに減少させる。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片での処理後に、リン酸化cMETを含む細胞の比率（例えば、本明細書に記載されるようなFACSによって測定される）は、JNJ-372またはJNJ-372アナログでの処理後のものと比較して、50%未満または約50%、60%未満または約60%、70%未満または約70%、80%未満または約80%、90%未満または約90%、100%未満または約100%、110%未満または約110%、120%未満または約120%、130%未満または約130%、140%未満または約140%、150%未満または約150%、200%未満または約200%である。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片での処理後に、リン酸化cMETを含む細胞の比率（例えば、本明細書に記載されるようなFACSによって測定される）は、6%未満または約6%、5%未満または約5%、4%未満または約4%、3%未満または約3%、2%未満または約2%、1%未満または約1%である。

【0268】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、細胞（例えば、EGFR発現細胞）におけるEGFRのリン酸化（例えば、EGF誘導性リン酸化）レベルを、非特異的抗体、アイソタイプ対照抗体、JNJ372、またはJNJ-372アナログのものと比較して、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、または5%未満よりも低くに減少させる。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片で処理された細胞（例えば、EGFR発現細胞）は、JNJ-372またはJNJ-372アナログで処理された細胞のものと比較して、90%未満または約90%、80%未満または約80%、70%未満または約70%、60%未満または約60%、50%未満または約50%、40%未満または約40%、30%未満または約30%、20%未満または約20%、10%未満または約10%、5%未満または約5%である、リン酸化EGFRの比率（例えば、本明細書に記載されるようなELISAによって測定される）を有する。

【0269】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、がん細胞の増殖、生存、および/またはアポトーシスに関与する下流シグナル伝達経路のリン酸化レベルを減少させる。いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、細胞（例えば、cMETまたはEGFR発現細胞）におけるERKのリン酸化レベルを、非特異的抗体、アイソタイプ対照抗体、JNJ372、またはJNJ372アナログのものと比較して、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、または5%未満よりも低くに減少させる。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片で処理された細胞（例えば、cMETまたはEGFR発現細胞）は、JNJ-372またはJNJ-372アナログで処理された細胞のものと比較して、90%未満または約90%、80%未満または約80%、70%未満または約70%、

60%未満または約60%、50%未満または約50%、40%未満または約40%、30%未満または約30%、20%未満または約20%、10%未満または約10%、5%未満または約5%の、総ERKにおけるリン酸化ERKの比率（例えば、本明細書に記載されるようなELISAによって測定される）を有する。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片で処理された細胞（例えば、cMETまたはEGFR発現細胞）は、0.95未満または約0.95、0.90未満または約0.90、0.85未満または約0.85、0.80未満または約0.80、0.75未満または約0.75、0.75未満または約0.75、0.70未満または約0.70、0.65未満または約0.65、0.60未満または約0.60、0.55未満または約0.55、0.50未満または約0.50、0.45未満または約0.45、0.40未満または約0.40、0.35未満または約0.35、0.30未満または約0.30、0.25未満または約0.25、0.20未満または約0.20、0.15未満または約0.15、0.10未満または約0.10、0.05未満または約0.05の、総ERKに対するリン酸化ERKの比率（例えば、本明細書に記載されるようなELISAによって測定される）を有する。

【0270】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、細胞（例えば、cMETまたはEGFR発現細胞）におけるAktのリン酸化レベルを、非特異的抗体、アイソタイプ対照抗体、JNJ372、またはJNJ-372アナログのものと比較して、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、または5%未満よりも低く減少させる。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片で処理された細胞（例えば、cMETまたはEGFR発現細胞）は、JNJ-372またはJNJ-372アナログで処理された細胞のものと比較して、90%未満または約90%、80%未満または約80%、70%未満または約70%、60%未満または約60%、50%未満または約50%、40%未満または約40%、30%未満または約30%、20%未満または約20%、10%未満または約10%、5%未満または約5%の、リン酸化Aktの比率（例えば、本明細書に記載されるようなELISAによって測定される）を有する。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片で処理された細胞（例えば、cMETまたはEGFR発現細胞）は、0.95未満または約0.95、0.90未満または約0.90、0.85未満または約0.85、0.80未満または約0.80、0.75未満または約0.75、0.75未満または約0.75、0.70未満または約0.70、0.65未満または約0.65、0.60未満または約0.60、0.55未満または約0.55、0.50未満または約0.50、0.45未満または約0.45、0.40未満または約0.40、0.35未満または約0.35、0.30未満または約0.30、0.25未満または約0.25、0.20未満または約0.20、0.15未満または約0.15、0.12未満または約0.12、0.10未満または約0.10、0.08未満または約0.08、0.06未満または約0.06の、総Aktに対するリン酸化Aktの比率（例えば、本明細書に記載されるようなELISAによって測定される）を有する。

【0271】

いくつかの態様において、抗体（またはその抗原結合断片）は、 0.1 s^{-1} 未満、 0.01 s^{-1} 未満、 0.001 s^{-1} 未満、 0.0001 s^{-1} 未満、または 0.00001 s^{-1} 未満の解離速度（ k_{off} ）で、抗原（例えば、がん抗原）に特異的に結合する。いくつかの態様において、解離速度（ k_{off} ）は、 0.01 s^{-1} よりも大きい、 0.001 s^{-1} よりも大きい、 0.0001 s^{-1} よりも大きい、 0.00001 s^{-1} よりも大きい、または 0.000001 s^{-1} よりも大きい。いくつかの態様において、速度論的結合速度（ k_{on} ）は、 $1 \times 10^2 / \text{Ms}$ よりも大きい、 $1 \times 10^3 / \text{Ms}$ よりも大きい、 $1 \times 10^4 / \text{Ms}$ よりも大きい、 $1 \times 10^5 / \text{Ms}$ よりも大きい、 $2 \times 10^5 / \text{Ms}$ よりも大きい、 $2.2 \times 10^5 / \text{Ms}$ よりも大きい、または $2.4 \times 10^6 / \text{Ms}$ よりも大きい。いくつかの態様において、速度論的結合速度（ k_{on} ）は、 $1 \times 10^5 / \text{Ms}$ 未満、 $1 \times 10^6 / \text{Ms}$ 未満、または $1 \times 10^7 / \text{Ms}$ 未満である。

【0272】

親和性は、速度論的速度定数の商（ $K_d = k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$ ）から推論することができる。いくつかの態様において、 K_d は、 $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ 未満、 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 未満、 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 未満、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 未満、 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 未満、 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 未満、または $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 未満である。

。いくつかの態様において、 K_d は、50 nM、30 nM、20 nM、15 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、または0.1 nM未満である。いくつかの態様において、 K_d は、 1×10^{-4} Mよりも大きい、 1×10^{-5} Mよりも大きい、 1×10^{-6} Mよりも大きい、 1×10^{-7} Mよりも大きい、 1×10^{-8} Mよりも大きい、 1×10^{-9} Mよりも大きい、 1×10^{-10} Mよりも大きい、 1×10^{-11} Mよりも大きい、または 1×10^{-12} Mよりも大きい。さらに、 K_a を、式 $K_a = 1/K_d$ によって、 K_d から推論することができる。

【0273】

いくつかの態様において、cMETまたはEGFRに対する結合親和性は、注意深く調整され、例えば、 K_d は、100 nM～0.1 nMの間、100 nM～1 nMの間、100 nM～10 nMの間、10 nM～0.1 nMの間、10 nM～1 nMの間、または1 nM～0.1 nMの間であることができる。

【0274】

抗原に対する抗体の親和性を測定するための一般的な技術には、例えば、ELISA、RIA、および表面プラズモン共鳴（SPR）が含まれる。

【0275】

いくつかの態様において、抗体は、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、または200%よりも大きい、腫瘍成長阻害パーセンテージ（TGI%）を有する。いくつかの態様において、抗体は、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、または200%未満である、腫瘍成長阻害パーセンテージを有する。TGI%は、例えば、処置が開始した3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、もしくは30日後、または処置が開始した1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12ヶ月後に測定することができる。本明細書において用いられる場合、腫瘍成長阻害パーセンテージ（TGI%）は、以下の式を用いて算出される。

$$TGI(\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$$

T_i は、 i 日目の処置群における平均腫瘍体積である。 T_0 は、0日目の処置群における平均腫瘍体積である。 V_i は、 i 日目の対照群における平均腫瘍体積である。 V_0 は、0日目の対照群における平均腫瘍体積である。

【0276】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、参照抗体（例えば、JNJ372またはJNJ-372アナログ）のものと比較して、少なくとも50%または約50%、少なくとも60%または約60%、少なくとも70%または約70%、少なくとも80%または約80%、少なくとも90%または約90%、少なくとも100%または約100%、少なくとも110%または約110%、少なくとも120%または約120%、少なくとも130%または約130%、少なくとも140%または約140%、少なくとも150%または約150%、少なくとも200%または約200%である、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）を有する。いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）を、非特異的抗体対照またはアイソタイプ抗体対照のものと比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、20倍、または100倍増大させることができる。

【0277】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、参照抗体（例えば、JNJ372またはJNJ372アナログ）のものと比較して、少なくとも50%または約50%、少なくとも60%または約60%、少なくとも70%または約70%、少なくとも80%または約80%、少なくとも90%または約90%、少なくとも100%または約1

10

20

30

40

50

00%、少なくとも110%または約110%、少なくとも120%または約120%、少なくとも130%または約130%、少なくとも140%または約140%、少なくとも150%または約150%、少なくとも200%または約200%である、補体依存性細胞傷害（CDC）を有する。いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、補体依存性細胞傷害（CDC）を、非特異的抗体対照またはアイソタイプ抗体対照のものと比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、20倍、または100倍増大させることができる。

【0278】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、1000 ng/ml未満または約1000 ng/ml、500 ng/ml未満または約500 ng/ml、400 ng/ml未満または約400 ng/ml、300 ng/ml未満または約300 ng/ml、250 ng/ml未満または約250 ng/ml、200 ng/ml未満または約200 ng/ml、100 ng/ml未満または約100 ng/mlの細胞殺傷IC50を有する。いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、参照抗体（例えば、JNJ372またはJNJ372アナログ）のものと比較して、50%未満または約50%、60%未満または約60%、70%未満または約70%、80%未満または約80%、90%未満または約90%、100%未満または約100%、110%未満または約110%、120%未満または約120%、130%未満または約130%、140%未満または約140%、150%未満または約150%、200%未満または約200%である、細胞殺傷IC50値を有する。いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、アイソタイプ対照抗体のものと比較して、20%未満または約20%、10%未満または約10%、8%未満または約8%、5%未満または約5%、3%未満または約3%、1%未満または約1%である、細胞殺傷IC50値を有する。

【0279】

いくつかの態様において、抗体または抗原結合断片は、cMET、EGFR、および/またはcMET/EGFR複合体の内部移行速度を、対照抗体（例えば、JNJ372もしくはJNJ372アナログ）またはアイソタイプ対照抗体のものと比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、または20倍増大させることができる。

【0280】

いくつかの態様において、本明細書に記載される三重特異性抗体（例えば、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3 Tri）は、内部移行したcMET、EGFR、および/またはcMET/EGFR複合体を含む細胞のパーセンテージを、本明細書に記載される二重特異性抗体（例えば、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3）、参照抗体（例えば、JNJ372もしくはJNJ372アナログ）、またはアイソタイプ対照抗体のものと比較して、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%、または約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%増大させることができる。いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片は、少なくとも5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、もしくは10%、または約5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、もしくは10%の細胞において、cMET、EGFR、および/またはcMET/EGFR複合体の内部移行を誘導することができる。

【0281】

いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片によって誘導されるcMET、EGFR、および/またはcMET/EGFR複合体の内部移行は、cMETとcMETリガンド（例えば、HGF）との相互作用、および/またはEGFRとEGFRリガンド（例えば、EGF）との相互作用をさらに低減させることができる。

【0282】

いくつかの態様において、抗体または抗原結合断片は、食作用速度を、参照抗体（例えば、JNJ372もしくはJNJ372アナログ）またはアイソタイプ対照のものと比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2

倍、3倍、5倍、10倍、または20倍増大させることができる。

【0283】

いくつかの態様において、抗体または抗原結合断片は、機能的Fc領域を有する。いくつかの態様において、機能的Fc領域のエフェクター機能は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）である。いくつかの態様において、機能的Fc領域のエフェクター機能は、食作用である。いくつかの態様において、機能的Fc領域のエフェクター機能は、ADC Cおよび食作用である。いくつかの態様において、Fc領域は、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、またはヒトIgG4である。

【0284】

いくつかの態様において、抗体または抗原結合断片は、アポトーシスを誘導することができる。

【0285】

いくつかの態様において、抗体または抗原結合断片は、機能的Fc領域を有しない。例えば、抗体または抗原結合断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片である。

【0286】

いくつかの態様において、抗体または抗原結合断片は、ヒト化抗体である。ヒト化パーセンテージとは、International Immunogenetics Information System (IMGT) データベース中のヒト抗体配列と比較した、重鎖または軽鎖可変領域配列の同一性パーセンテージを意味する。トップヒットとは、重鎖または軽鎖可変領域配列が、他の種よりも特定の種に近いことを意味する。例えば、ヒトに対するトップヒットは、配列が、他の種よりもヒトに近いことを意味する。ヒトおよびカニクイザル (*Macaca fascicularis*) に対するトップヒットは、配列が、ヒト配列およびカニクイザル配列に対して同じ同一性パーセンテージを有し、かつこれらの同一性パーセンテージが、他の種の配列に対してと比較して最も高いことを意味する。いくつかの態様において、ヒト化パーセンテージは、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、または95%よりも大きい。ヒト化パーセンテージを決定する方法およびトップヒットを決定する方法に関する詳細な説明は、当技術分野において公知であり、例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、Jones, et al. "The INNs and outs of antibody nonproprietary names." MAbs, Vol. 8, No. 1, Taylor & Francis, 2016に記載されている。高いヒト化パーセンテージは、多くの場合、様々な利点を有し、例えば、ヒトにおいてより安全かつより有効であり、ヒト対象によって許容される可能性がより高く、および/または副作用を有する可能性がより低い。

【0287】

いくつかの態様において、本明細書に記載される二重特異性抗体（例えば、cMET/EGFR二重特異性抗体）または本明細書に記載される三重特異性抗体（例えば、cMET/EGFR三重特異性抗体）を含む多重特異性抗体は、2、3、4、5、または6個の抗原結合部位を含む、非対称構造を有する。いくつかの態様において、本明細書に記載される多重特異性抗体は、がん抗原（例えば、cMETまたはEGFR）を標的とする2、3、4、5、または6個の抗原結合部位（例えば、抗原結合Fabドメイン、scFV、またはナオンボディ（nanobody）（VHH））を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載される多重特異性抗体（例えば、cMET/EGFR二重特異性抗体、またはcMET/EGFR三重特異性抗体）は、少なくとも2、3、4、5、6、または7本の共通軽鎖を含む。いくつかの態様において、少なくとも2、3、4、5、6、または7本の共通軽鎖は、同じVL配列を有する。いくつかの態様において、少なくとも2、3、4、5、6、または7本の共通軽鎖は、異なるVL配列を有する。いくつかの態様において、がん抗原（例えば、cMETまたはEGFR）結合Fabドメインは、同じVH配列を含む。いくつかの態様において、がん抗原（例えば、cMETまたはEGFR）結合Fabドメインは、異なるVH配列を含む。いくつかの態様において、がん抗原結合FabドメインのC末端は、同じ多重特異性抗体内の近隣のがん抗原結合FabドメインのN末端に接続（例えば、共有結合で接続または化学的に接続）されている

10

20

30

40

50

。

【0288】

本開示はまた、本明細書に記載されるような任意の抗体または抗原結合断片と交差競合する、抗体またはその抗原結合断片を提供する。交差競合アッセイは、当技術分野において公知であり、例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、Moore et al., "Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein." *Journal of virology* 70.3 (1996): 1863-1872に記載されている。1つの局面において、本開示はまた、本明細書に記載されるような任意の抗体または抗原結合断片と同じエピトープまたは領域に結合する、抗体またはその抗原結合断片を提供する。エピトープビニングアッセイは、当技術分野において公知であり、例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、Estep et al. "High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning." *MAbs*, Vol. 5, No. 2, Taylor & Francis, 2013に記載されている。

10

【0289】

抗体および抗原結合断片

本開示は、本明細書に記載される相補性決定領域（CDR）、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、重鎖、または軽鎖を含む、抗体およびその抗原結合断片を提供する。いくつかの態様において、抗体およびその抗原結合断片は、不均衡な二重特異性抗体およびその抗原結合断片である。

20

【0290】

概して、抗体（免疫グロブリンとも呼ばれる）は、軽鎖および重鎖の、2つのクラスのポリペプチド鎖で構成される。本開示の非限定的な抗体は、2本の重鎖および2本の軽鎖を含む、インタクトな4本免疫グロブリン鎖抗体であることができる。抗体の重鎖は、IgM、IgG、IgE、IgA、もしくはIgDを含む任意のアイソタイプ、またはIgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgE1、IgE2などを含むサブアイソタイプのものであることができる。軽鎖は、κ軽鎖またはλ軽鎖であることができる。抗体は、2本の同一コピーの軽鎖および/または2本の同一コピーの重鎖を含むことができる。重鎖は、各々が1つの可変ドメイン（または可変領域、VH）および複数の定常ドメイン（または定常領域）を含有し、その定常ドメイン内のジスルフィド結合を介して互いに結合して、抗体の「ステム」を形成する。軽鎖は、各々が1つの可変ドメイン（または可変領域、VL）および1つの定常ドメイン（または定常領域）を含有し、各々がジスルフィド結合を介して1本の重鎖に結合する。各軽鎖の可変領域は、それが結合している重鎖の可変領域と整列している。軽鎖および重鎖の両方の可変領域は、より保存されたフレームワーク領域（FR）に挟まれた3つの超可変領域を含有する。

30

【0291】

相補性決定領域（CDR）として知られるこれらの超可変領域は、抗体の主要な抗原結合表面を構成するループを形成する。4つのフレームワーク領域は、大部分がβシートコンフォメーションを採り、CDRは、βシート構造を接続する、および場合によってはその一部を形成する、ループを形成する。各鎖におけるCDRは、フレームワーク領域によって近接して保持され、もう一方の鎖由来のCDRと共に、抗原結合領域の形成に寄与する。

40

【0292】

抗体のアミノ酸配列を解析することによって抗体のCDR領域を特定するための方法は、周知であり、多数のCDRの定義が、一般的に用いられる。Kabatの定義は、配列可変性に基づき、Chothiaの定義は、構造的ループ領域の場所に基づく。これらの方法および定義は、例えば、Martin, "Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains," *Antibody engineering*, Springer Berlin Heidelberg, 2001. 422-439; Abhinandan, et al. "Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains,

50

" Molecular immunology 45.14 (2008): 3832-3839 ; Wu, T.T. and Kabat, E.A. (1970) J. Exp. Med. 132: 211-250 ; Martin et al., Methods Enzymol. 203:121-53 (1991) ; Morea et al., Biophys Chem. 68(1-3):9-16 (Oct. 1997) ; Morea et al., J Mol Biol. 275(2):269-94 (Jan .1998) ; Chothia et al ., Nature 342(6252):877-83 (Dec. 1989) ; Ponomarenko and Bourne, BMC Structural Biology 7:64 (2007) ; Kontermann, R., & Dubel, S. (Eds.). (2010). Antibody engineering: Volume 2. Springerに記載されており；これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。いくつかの態様において、CDRは、Kabatの定義に基づく。いくつかの態様において、CDRは、Chothiaの定義に基づく。いくつかの態様において、CDRは、Kabat、Chothia、AbM、IMGT、または接触定義によって決定されるような最長のCDR配列である。

10

【0293】

CDRは、抗原のエピトープを認識するために重要である。本明細書において用いられる場合、「エピトープ」とは、抗体の抗原結合ドメインが特異的に結合することができる標的分子の最小の部分である。エピトープの最小サイズは、約3、4、5、6、または7アミノ酸であり得るが、エピトープは、抗原の二次構造および三次構造に基づく抗原の三元配置に依存し得るため、これらのアミノ酸は、抗原の一次構造の連続した直鎖状配列にある必要はない。

【0294】

いくつかの態様において、抗体は、インタクトな免疫グロブリン分子（例えば、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgD、IgE、IgA）である。IgGサブクラス（IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4）は、高度に保存されており、その定常領域、特に、そのヒンジおよび上部CH2ドメインにおいて異なる。IgGサブクラスの配列および相違は、当技術分野において公知であり、例えば、Vidarsson, et al, "IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions." Frontiers in immunology 5 (2014) ; Irani, et al. "Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases." Molecular immunology 67.2 (2015): 171-182 ; Shakib, Farouk, ed. The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Elsevier, 2016に記載されており；これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

20

30

【0295】

抗体はまた、任意の種（例えば、ヒト、げっ歯類、マウス、ラット、ラクダ科動物）に由来する免疫グロブリン分子であることができる。本明細書に開示される抗体はまた、ポリクローナル、モノクローナル、単一特異性、多特異性抗体、および別のポリペプチドに融合した免疫グロブリン結合ドメインを含むキメラ抗体も含むが、それらに限定されない。「抗原結合ドメイン」または「抗原結合断片」という用語は、インタクトな抗体の特異的結合活性を保持する抗体の一部分、すなわち、インタクトな抗体の標的分子上のエピトープに特異的に結合することができる抗体の任意の部分である。それは、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびこれらの断片のバリエーションを含む。したがって、いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片は、例えば、scFv、Fv、Fd、dAb、二重特異性抗体、二重特異性scFv、ダイアボディ、直鎖状抗体、一本鎖抗体分子、抗体断片から形成される多重特異性抗体、および、抗体結合ドメインであるか、またはそれと相同である結合ドメインを含む任意のポリペプチドであることができる。抗原結合ドメインの非限定的な例には、例えば、インタクトな抗体の重鎖および/もしくは軽鎖CDR、インタクトな抗体の重鎖および/もしくは軽鎖可変領域、インタクトな抗体の全長重鎖もしくは軽鎖、またはインタクトな抗体の重鎖もしくは軽鎖のいずれか由来の個々のCDRが含まれる。

40

【0296】

いくつかの態様において、scFVは、2つの重鎖可変ドメイン、および2つの軽鎖可変ドメインを有する。いくつかの態様において、scFVは、2つの抗原結合領域（抗原結合領

50

域：AおよびB）を有し、2つの抗原結合領域は、異なる親和性でそれぞれの標的抗原に結合することができる。

【0297】

いくつかの態様において、抗原結合断片は、キメラ抗原受容体（CAR）の一部を形成することができる。いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、CD3-ζ膜貫通ドメインおよびエンドドメインに融合した、本明細書に記載されるような一本鎖可変断片（scFv）の融合物である。いくつかの態様において、キメラ抗原受容体はまた、様々な共刺激タンパク質受容体（例えば、CD28、41BB、ICOS）由来の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、効能を増大させるために、複数のシグナル伝達ドメイン、例えば、CD3ζ-CD28-41BBまたはCD3ζ-CD28-OX40を含む。したがって、1つの局面において、本開示は、本明細書に記載されるようなキメラ抗原受容体を発現する細胞（例えば、T細胞）をさらに提供する。

10

【0298】

いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片は、2つの異なる抗原または2つの異なるエピトープに結合することができる。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片は、3つの異なる抗原または3つの異なるエピトープに結合することができる。

【0299】

Fv断片は、完全な抗原認識および結合部位を含有する、抗体断片である。この領域は、密接に会合した1つの重鎖可変ドメインおよび1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなり、これは、例えばscFvにおいて、天然で共有結合性であることができる。各可変ドメインの3つのCDRが、相互作用して、VH-VL二量体の表面上の抗原結合部位を規定するのは、この配置においてである。集合的に、6つのCDRまたはそのサブセットが、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン（または抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分）でさえも、通常、結合部位全体よりも低い親和性ではあるが、抗原を認識して結合する能力を有することができる。

20

【0300】

一本鎖Fvまたは（scFv）抗体断片は、抗体のVHおよびVLドメイン（または領域）を含み、ここで、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に存在する。概して、scFvポリペプチドは、VHドメインとVLドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、これは、scFvが抗原結合に望ましい構造を形成することを可能にする。

30

【0301】

いくつかの態様において、本明細書に記載されるscFvは、N末端からC末端へ、VH；ポリペプチドリンカー；およびVLを含む。いくつかの態様において、本明細書に記載されるscFvは、N末端からC末端へ、VL；ポリペプチドリンカー；およびVHを含む。いくつかの態様において、リンカーペプチドは、SEQ ID NO: 37~42のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、リンカーペプチドは、SEQ ID NO: 38または39と少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは100%、または約80%、85%、90%、95%、もしくは100%同一である配列を含む。いくつかの態様において、リンカーペプチドは、GGGGGS（SEQ ID NO: 37）の1回または複数回（例えば、1、2、3、4、5、6、7、または8回）のリピートと少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは100%、または約80%、85%、90%、95%、もしくは100%同一である配列を含む。

40

【0302】

Fab断片は、軽鎖の可変ドメインおよび定常ドメイン、ならびに重鎖の可変ドメインおよび第1の定常ドメイン（CH1）を含有する。F(ab')₂抗体断片は、Fab断片のペアを含み、それらは、概して、その間のヒンジシステムによってそのカルボキシ末端付近で共有結合している。抗体断片の他の化学的カップリングもまた、当技術分野において公知である。

【0303】

50

ダイアボディは、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片であり、その断片は、同じポリペプチド鎖においてVLに接続されたVH（VHおよびVL）を含む。同じ鎖上の2つのドメイン間のペア形成を可能にするには短すぎるリンカーを用いることによって、ドメインは、別の鎖の相補的ドメインとペアになって、2つの抗原結合部位を作り出すことを強いられる。

【0304】

抗体の多量体化は、抗体の自然な凝集を通して、または当技術分野において公知の化学的連結技術もしくは組換え連結技術を通して達成され得る。例えば、精製された抗体調製物（例えば、精製されたIgG1分子）のいくつかのパーセンテージは、自然発生的に、抗体ホモ二量体および他の高次抗体多量体を含むタンパク質凝集体を形成する。

10

【0305】

直鎖状抗体は、タンデムFdセグメントのペア（VH-CH1-VH-CH1）を含み、これは、相補的な軽鎖ポリペプチドと共に、抗原結合領域のペアを形成する。直鎖状抗体は、二重特異性または単一特異性であることができる。

【0306】

あるいは、抗体ホモ二量体を、当技術分野において公知の化学的連結技術を通して形成させてもよい。例えば、SMCC（スクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート）およびSATA（N-スクシンイミジル5-アセチルチオ-アセタート）を含むがそれらに限定されないヘテロ二官能性架橋剤を用いて、抗体多量体を形成することができる。抗体ホモ二量体の形成のための例示的なプロトコルは、Ghetie et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 7509-7514, 1997)に記載されている。抗体ホモ二量体は、ペプシンでの消化を通してFab'₂ホモ二量体に変換することができる。抗体ホモ二量体を形成する別の方法は、Zhao et al. (J. Immunol. 25:396-404, 2002)に記載されている自己親和性（autophilic）T15ペプチドの使用を通じたものである。

20

【0307】

本開示の抗体および抗体断片は、所望のエフェクター機能または血清半減期を提供するように、Fc領域において改変することができる。いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片のいずれか1つにおけるFc領域は、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸（Asp）を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片のいずれか1つにおけるFc領域は、EUナンバリングに従う332位のグルタミン酸（Glu）を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載されるFc領域は、EUナンバリングに従う239位のアスパラギン酸（Asp）、および/またはEUナンバリングに従う332位のグルタミン酸（Glu）を含む、本明細書に記載されるFc領域のいずれか1つである。いくつかの態様において、本明細書に記載されるAsp₂₃₉および/またはGlu₃₃₂は、抗体またはその抗原結合断片のエフェクター機能（例えば、ADCCまたはCDC）を、野生型抗体またはその抗原結合断片のものと比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、もしくは100倍、または約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、もしくは100倍増大させることができる。詳細は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、Lazar, G. A. et al., "Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function." Proceedings of the National Academy of Sciences 103.11 (2006): 4005-4010に見出すことができる。

30

40

【0308】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片のいずれか1つにおけるFc領域は、野生型ヒトIgG1 CH2ドメイン（例えば、SEQ ID NO: 35）を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片のいずれか1つにおけるFc領域は、変異ヒトIgG1 CH2ドメイン（例えば、SEQ ID NO: 36）を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載されるFc領域は、SEQ ID NO: 35ま

50

たは36と少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%同一である配列を含む。

【0309】

本明細書に記載される抗体または抗原結合断片のいずれかは、安定化分子（例えば、対象または溶液における抗体またはその抗原結合断片の半減期を増大させる分子）にコンジュゲートされ得る。安定化分子の非限定的な例には、ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール）またはタンパク質（例えば、ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン）が含まれる。安定化分子のコンジュゲーションは、インビトロ（例えば、組織培養中もしくは薬学的組成物として保存された時）またはインビボ（例えば、ヒト）において、抗体または抗原結合断片の半減期を増大させるか、またはその生物学的活性を拡張することができる。

10

【0310】

いくつかの態様において、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片（例えば、二重特異性抗体）は、治療剤にコンジュゲートすることができる。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は、治療剤に共有結合または非共有結合で結合することができる。いくつかの態様において、治療剤は、細胞傷害剤または細胞増殖抑制剤（例えば、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシン、メイタンシノイド、例えばDM-1およびDM-4、ジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、エピルビシン、およびシクロホスファミド、ならびにアナログ）である。

20

【0311】

いくつかの態様において、本明細書に記載される多重特異性抗体またはその抗原結合断片（例えば、cMET/EGFR二重特異性抗体またはcMET/EGFR三重特異性抗体）は、多重特異性抗体の同じVHHを含む重鎖抗体（例えば、抗cMET重鎖抗体）のものに対して、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約100%、約110%、約120%、約130%、約140%、約150%、または約200%である結合親和性で、抗原（例えば、cMET）に結合する。

【0312】

いくつかの態様において、本明細書に記載される多重特異性抗体またはその抗原結合断片（例えば、cMET/EGFR二重特異性抗体またはcMET/EGFR三重特異性抗体）は、多重特異性抗体のEGFRを標的とする同じVHおよびVLを含む抗体または抗原結合断片（例えば、抗EGFRモノクローナル抗体）のものに対して、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約100%、約110%、約120%、約130%、約140%、約150%、または約200%である結合親和性で、抗原（例えば、EGFR）に結合する。

30

【0313】

いくつかの態様において、本明細書に記載される二重特異性抗体またはその抗原結合断片（例えば、cMET/EGFR二重特異性抗体またはcMET/EGFR三重特異性抗体）は、補体依存性細胞傷害（CDC）を、アイソタイプ対照抗体によって媒介されるものと比較して、少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、30倍、40倍、もしくは50倍、または約1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、30倍、40倍、もしくは50倍まで媒介する。

40

【0314】

いくつかの態様において、本明細書に記載される多重特異性抗体またはその抗原結合断片（例えば、cMET/EGFR二重特異性抗体またはcMET/EGFR三重特異性抗体）は、モノクローナル抗体（例えば、抗cMET抗体、抗EGFR抗体、またはアイソタイプ抗体対照）のものに対して、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約100%、約110

50

%、約120%、約130%、約140%、約150%、または約200%であるパーセンテージで内部移行される。

【0315】

組換えベクター

本開示はまた、本明細書に開示される単離されたポリヌクレオチド（例えば、本明細書に開示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド）を含む組換えベクター（例えば、発現ベクター）、組換えベクターがその中に導入されている宿主細胞（すなわち、その結果、宿主細胞はポリヌクレオチドおよび/またはポリヌクレオチドを含むベクターを含有する）、および組換え技術による組換え抗体ポリペプチドまたはその断片の作製を提供する。

10

【0316】

本明細書において用いられる場合、「ベクター」とは、ベクターが宿主細胞に導入された場合に、1つまたは複数の関心対象のポリヌクレオチドを宿主細胞に送達することができる任意の構築物である。「発現ベクター」は、発現ベクターがその中に導入された宿主細胞において、1つまたは複数の関心対象のポリヌクレオチドを、コードされたポリペプチドとして送達して発現させることができる。したがって、発現ベクターにおいて、関心対象のポリヌクレオチドは、発現ベクターが導入された宿主細胞において関心対象のポリヌクレオチドが翻訳されるように、ベクター内、または関心対象のポリヌクレオチドの組み込み部位もしくはその付近もしくはそれに隣接する宿主細胞のゲノム中のいずれかで、プロモーター、エンハンサー、および/またはポリAテールなどの制御エレメントと機能的に連結されることによって、ベクターにおいて発現のために位置づけられる。

20

【0317】

ベクターは、当技術分野において公知の方法、例えば、エレクトロポレーション、化学的トランスフェクション（例えば、DEAE-デキストラン）、形質転換、トランスフェクション、ならびに（例えば、組換えウイルスでの）感染および/または形質導入によって、宿主細胞中に導入することができる。したがって、ベクターの非限定的な例には、（組換えウイルスを生成するために用いることができる）ウイルスベクター、裸のDNAまたはRNA、プラスミド、コスミド、ファージベクター、およびカチオン性縮合剤と会合したDNAまたはRNA発現ベクターが含まれる。

【0318】

いくつかの実施において、本明細書に開示されるポリヌクレオチド（例えば、本明細書に開示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド）は、非病原性（欠損）複製可能ウイルスの使用を伴い得るか、または複製欠損ウイルスを使用し得る、ウイルス発現系（例えば、ワクシニアもしくは他のポックスウイルス、レトロウイルス、またはアデノウイルス）を用いて導入される。後者の場合、ウイルスの増殖は、一般に、補完するウイルスパッケージング細胞においてのみ起こることになる。適している系は、例えば、Fisher-Hoch et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:317-321; Flexner et al., 1989, Ann. N.Y. Acad. Sci. 569:86-103; Flexner et al., 1990, Vaccine, 8:17-21; 米国特許第4,603,112号、第4,769,330号、および第5,017,487号; WO 89/01973; 米国特許第4,777,127号; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner-Biotechniques, 6:616-627, 1988; Rosenfeld et al., 1991, Science, 252:431-434; Kolls et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:215-219; Kass-Eisler et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11498-11502; Guzman et al., 1993, Circulation, 88:2838-2848; ならびに Guzman et al., 1993, Cir. Res., 73:1202-1207に開示されている。そのような発現系中にDNAを組み込むための技術は、当業者によく知られている。DNAはまた、例えば、Ulmer et al., 1993, Science, 259:1745-1749およびCohen, 1993, Science, 259:1691-1692に記載されているように、「裸」であってもよい。裸のDNAの取り込みは、細胞中に効率的に輸送される生分解性ビーズ上にDNAをコーティングすることによって、増大され得る。

30

40

50

【0319】

発現のために、本明細書に開示される抗体をコードするかまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むDNAインサートを、適切なプロモーター（例えば、異種プロモーター）、例えば、数例を挙げると、ファージλPLプロモーター、大腸菌（*E. coli*）lac、trp、およびtacプロモーター、SV40初期および後期プロモーター、ならびにレトロウイルスLTRのプロモーターに、機能的に連結することができる。他の適しているプロモーターが、当業者に知られている。発現構築物は、さらに、転写開始、終止のための部位、および転写領域において、翻訳のためのリボソーム結合部位を含有することができる。構築物によって発現される成熟転写物のコード部分は、翻訳されるポリペプチドの初めの翻訳開始コドン、およびその終わりに適切に位置づけられた終止コドン（UAA、UGA、またはUAG）を含み得る。

10

【0320】

示されるように、発現ベクターは、少なくとも1つの選択可能なマーカーを含むことができる。そのようなマーカーには、真核細胞培養のためのジヒドロ葉酸還元酵素またはネオマイシン耐性、ならびに大腸菌および他の細菌における培養のためのテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性遺伝子が含まれる。適切な宿主の代表的な例には、大腸菌、ストレプトマイセス属（*Streptomyces*）、およびサルモネラ・ティフィムリウム（*Salmonella typhimurium*）細胞などの細菌細胞；酵母細胞などの真菌細胞；ショウジョウバエ（*Drosophila*）S2およびスポドプテラ（*Spodoptera*）Sf9細胞などの昆虫細胞；CHO、COS、Bowes黒色腫、およびHK 293細胞などの動物細胞；ならびに植物細胞が含まれるが、それらに限定されない。本明細書に記載される宿主細胞のための適切な培養培地および条件は、当技術分野において公知である。

20

【0321】

細菌における使用のための非限定的なベクターには、Qiagenから入手可能なpQE70、pQE60、およびpQE-9；Stratageneから入手可能なpBSベクター、Phagescriptベクター、Bluescriptベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A；ならびにPharmaciaから入手可能なptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5が含まれる。非限定的な真核生物ベクターには、Stratageneから入手可能なpWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、およびpSG；ならびにPharmaciaから入手可能なpSVK3、pBPV、pMSG、およびpSVLが含まれる。他の適しているベクターは、当業者に容易に明らかであろう。

30

【0322】

使用に適している非限定的な細菌プロモーターには、大腸菌lacIおよびlacZプロモーター、T3およびT7プロモーター、gptプロモーター、λPRおよびPLプロモーター、ならびにtrpプロモーターが含まれる。適している真核生物プロモーターには、CMV最初期プロモーター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、初期および後期SV40プロモーター、レトロウイルスLTRのプロモーター、例えばラウス肉腫ウイルス（RSV）のもの、ならびにメタロチオネインプロモーター、例えばマウスメタロチオネイン-Iプロモーターが含まれる。

【0323】

酵母であるサッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）においては、α因子、アルコールオキシダーゼ、およびPGHなどの構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含有する多数のベクターが用いられ得る。総説については、Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.およびGrant et al., *Methods Enzymol.*, 153: 516-544 (1997)を参照されたい。

40

【0324】

宿主細胞中への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、カチオン性脂質媒介性トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染、または他の方法によって行うことができる。

50

そのような方法は、その全体が参照により本明細書に組み入れられるDavis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986)などの、多くの標準的な実験室マニュアルに記載されている。

【0325】

高等真核生物による本開示の抗体をコードするDNAの転写は、エンハンサー配列をベクター中に挿入することによって増大され得る。エンハンサーとは、所与の宿主細胞型においてプロモーターの転写活性を増大するように作用する、通常は約10~300 bpのDNAのシス作用エレメントである。エンハンサーの例には、複製起点の後期側の塩基対100~270に位置するSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが含まれる。

10

【0326】

翻訳されたタンパク質の小胞体の内腔中へ、ペリプラズム空間中へ、または細胞外環境中への分泌のために、適切な分泌シグナルが、発現されるポリペプチド中に組み込まれてもよい。シグナルは、ポリペプチドにとって内在性であってもよく、または異種シグナルであってもよい。

【0327】

ポリペプチド（例えば、抗体）は、融合タンパク質（例えば、GST-融合）またはヒスチジンタグを伴うなどの、改変された形態で発現させることができ、分泌シグナルだけではなく、追加の異種機能的領域も含み得る。例えば、宿主細胞における、精製中の、またはその後の取り扱いおよび保存中の安定性および持続性を改善するために、追加のアミノ酸、特に荷電アミノ酸の領域が、ポリペプチドのN末端に付加され得る。また、精製を容易にするために、ポリペプチドにペプチド部分を付加することができる。そのような領域は、ポリペプチドの最終的な調製の前に除去することができる。とりわけ、分泌または排出を生じるため、安定性を改善するため、および精製を容易にするためのポリペプチドへのペプチド部分の付加は、当技術分野において見慣れたかつ日常的な技術である。

20

【0328】

本開示はまた、本明細書に記載されるような任意のヌクレオチド配列と少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一である核酸配列、および本明細書に記載されるような任意のアミノ酸配列と少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一であるアミノ酸配列を提供する。

30

【0329】

本開示はまた、本明細書に記載されるような任意のヌクレオチド配列と少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する核酸配列、および本明細書に記載されるような任意のアミノ酸配列と少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の相同性を有するアミノ酸配列を提供する。

40

【0330】

いくつかの態様において、本開示は、本明細書に記載される任意のペプチドをコードするヌクレオチド配列、または本明細書に記載されるような任意のヌクレオチド配列によってコードされる任意のアミノ酸配列に関する。いくつかの態様において、核酸配列は、1

50

0、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、150、200、250、300、350、400、500、または600ヌクレオチド未満である。いくつかの態様において、アミノ酸配列は、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、または400アミノ酸残基未満である。

【0331】

いくつかの態様において、アミノ酸配列は、(i) アミノ酸配列を含む；または(ii) アミノ酸配列からなり、ここで、アミノ酸配列は、本明細書に記載されるような配列のいずれか1つである。

【0332】

いくつかの態様において、核酸配列は、(i) 核酸配列を含む；または(ii) は(ii) 核酸配列からなり、ここで、核酸配列は、本明細書に記載されるような配列のいずれか1つである。

【0333】

配列相同性（例えば、アミノ酸配列相同性または核酸相同性）のパーセンテージもまた、決定することができる。配列相同性のパーセンテージを決定する方法は、当技術分野において公知である。いくつかの態様において、類似した物理化学的特性を有する保存されたアミノ酸残基（相同性パーセント）、例えばロイシンおよびイソロイシンを、配列類似性を測定するために用いることができる。類似した物理化学的特性を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーには、例えば、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。相同性パーセンテージは、多くの場合に、同一性パーセンテージよりも高い。

【0334】

抗体を作製する方法

ヒトタンパク質（例えば、cMET、EGFR、またはがん抗原）の単離された断片を、免疫原として使用し、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の調製のための標準的な技術を用いて、抗体を生成することができる。ポリクローナル抗体は、抗原性ペプチドまたはタンパク質の複数回注射（例えば、皮下注射または腹腔内注射）によって、動物において生じさせることができる。いくつかの態様において、抗原性ペプチドまたはタンパク質は、少なくとも1つのアジュバントと共に注射される。いくつかの態様において、抗原性ペプチドまたはタンパク質は、免疫される種において免疫原性である剤にコンジュゲートさせることができる。動物には、抗原性ペプチドまたはタンパク質を、1回よりも多く（例えば、2回、3回、または4回）注射することができる。

【0335】

免疫原として、全長のポリペプチドまたはタンパク質を用いることができ、または代替的に、その抗原性ペプチド断片を用いることができる。タンパク質の抗原性ペプチドは、ペプチドに対して生じた抗体がタンパク質と特異的な免疫複合体を形成するように、タンパク質のアミノ酸配列の少なくとも8個（例えば、少なくとも10、15、20、または30個）のアミノ酸残基を含み、タンパク質のエピトープを包含する。

【0336】

免疫原は、典型的には、適している対象（例えば、ヒトまたは少なくとも1つのヒト免疫グロブリン遺伝子座を発現するトランスジェニック動物）を免疫することによって抗体を調製するために用いられる。適切な免疫原性調製物は、例えば、組換えで発現されたか

10

20

30

40

50

または化学的に合成されたポリペプチドを含有することができる。調製物は、フロイントの完全アジュバントもしくは不完全アジュバントなどのアジュバント、または類似した免疫刺激剤をさらに含むことができる。

【0337】

ポリクローナル抗体は、適している対象を、免疫原としてポリペプチドまたはその抗原性ペプチド（例えば、タンパク質の一部）で免疫することによって、上記のように調製することができる。免疫された対象における抗体価は、固定化されたポリペプチドまたはペプチドを用いた酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）などでの、標準的な技術によって経時的にモニターすることができる。望ましい場合には、抗体分子を、哺乳動物から（例えば、血液から）単離し、プロテインAまたはプロテインGクロマトグラフィーなどの周知の技術によってさらに精製して、IgG画分を得ることができる。免疫後の適切な時間、例えば、特異的抗体価が最も高い時に、抗体産生細胞を対象から得て、標準的な技術、例えば、Kohler et al. (Nature 256:495-497, 1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbor et al., Immunol. Today 4:72, 1983）、EBV-ハイブリドーマ技術（Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985）、またはトリオーマ技術によって、モノクローナル抗体を調製するために用いることができる。ハイブリドーマを作製するための技術は、周知である（一般に、Current Protocols in Immunology, 1994, Coligan et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc, New York, NYを参照されたい）。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、例えば、標準的なELISAアッセイを用いて、関心対象のポリペプチドまたはエピトープに結合する抗体についてハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることによって、検出される。

10

20

【0338】

VHHはまた、ナイーブなまたは設計された合成ラマVHHライブラリから得ることができる。ラマからPBMCを得ることができ、RNAを単離して、逆転写によってcDNAを生成することができる。次いで、VHH遺伝子を、PCRによって増幅し、ファージ提示ベクターにクローニングして、ナイーブVHHライブラリを構築することができる。合成（例えば、ヒト化）VHHライブラリは、増強された多様性を生成し、かつ低い免疫原性を保つために、オーバーラップPCRによって生成されたシャッフルされたVHH CDR1、2、および3の、改変されたヒトVHスキュフォールドへの組み込みによって、調製することができる。次いで、VHHライブラリを、抗原に対してパンニングして、所望の結合親和性を有するVHHを得ることができる。

30

【0339】

本明細書に記載される抗体または抗原結合断片のバリエーションは、適切なヌクレオチド変化を、本明細書に記載されるヒト、ヒト化、もしくはキメラ抗体、またはその抗原結合断片をコードするDNA中に導入することによって、またはペプチド合成によって、調製することができる。そのようなバリエーションは、例えば、抗体の抗原結合部位または抗原結合ドメインを構成するアミノ酸配列内に残基の欠失、挿入、または置換を含む。そのようなバリエーションの集団において、いくつかの抗体または抗原結合断片は、標的タンパク質に対して増大した親和性を有する。標的に対する結合親和性が増大した抗体またはその抗原結合断片に到達するために、欠失、挿入、および/または組み合わせの任意の組み合わせを行うことができる。抗体または抗原結合断片中に導入されたアミノ酸変化はまた、グリコシル化部位の数を変化させる（例えば、増加または減少させる）、グリコシル化部位のタイプを変化させる（例えば、細胞中に存在する酵素によって異なる糖が付加されるように、アミノ酸配列を変化させる）、または新しいグリコシル化部位を導入するなど、抗体または抗原結合断片中に新しい翻訳後修飾を変更するかまたは導入することができる。

40

【0340】

本明細書に開示される抗体は、哺乳動物を含む、動物の任意の種に由来することができる。天然抗体の非限定的な例には、ヒト、霊長類、例えば、サルおよび類人猿、ウシ、ブ

50

タ、ウマ、ヒツジ、ラクダ科動物（例えば、ラクダおよびラマ）、ニワトリ、ヤギ、ならびに、ヒト抗体を産生するように遺伝子操作されたトランスジェニックげっ歯類（例えば、ラット、マウス、ハムスター、およびウサギ）を含む、げっ歯類が含まれる。

【0341】

ファージ提示（パンニング）を用いて、所望の結合親和性を有する抗体配列を最適化することができる。この技術においては、（VHまたはVLを含む）一本鎖Fvをコードする遺伝子を、ファージコートタンパク質遺伝子中に挿入して、ファージに、その内側にタンパク質の遺伝子を含有しながら、その外側にscFvを「提示」させ、遺伝子型と表現型との間の接続を結果としてもたらしることができる。次いで、提示された抗原結合部位と標的抗原との間の相互作用を検出するために、これらの提示するファージを、標的抗原に対してスクリーニングすることができる。したがって、タンパク質の大きなライブラリを、インビトロ選択と呼ばれるプロセスにおいてスクリーニングして増幅することができ、所望の結合親和性を有する抗体配列を得ることができる。

【0342】

ヒト抗体およびヒト化抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する（または由来するものと同じアミノ酸配列を有する）可変領域および定常領域を有する抗体を含む。ヒト抗体は、例えばCDR中に、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アミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダム変異誘発もしくは部位特異的変異誘発によって、またはインビボでの体細胞変異によって導入された変異）を含んでもよい。

【0343】

ヒト化抗体は、典型的には、非ヒトCDRが移植されたヒトフレームワーク（FR）を有する。したがって、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からそれに導入された1つまたは複数のアミノ酸配列を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「インポート」残基と称され、典型的には、「インポート」可変ドメインから取得される。ヒト化は、例えば、げっ歯類のCDRまたはCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することによって、本質的に行うことができる。これらの方法は、例えば、Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)に記載されており；これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。したがって、「ヒト化」抗体は、インタクトなヒトVDメインよりも実質的に少ないものが、非ヒトの種由来の対応する配列によって置換されているキメラ抗体である。実際に、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかのCDR残基およびいくつかのFR残基が、ヒト抗体における類似の部位由来の残基によって置換されている、マウス抗体である。

【0344】

抗体が、抗原に対する高い特異性および親和性、ならびに他の好都合な生物学的特性の保持を伴ってヒト化されることが、さらに重要である。この目標を達成するために、ヒト化抗体は、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを用いた、親配列および様々な概念的なヒト化生成物の解析のプロセスによって、調製することができる。三次元免疫グロブリンモデルは、一般的に利用可能であり、当業者には見慣れたものである。選択された候補免疫グロブリン配列の有望な三次元コンフォメーション構造を例示および表示するコンピュータプログラムが、利用可能である。これらの表示を調べることにより、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性が高い役割の解析、すなわち、候補免疫グロブリンのその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の解析が可能になる。このようにして、標的抗原に対する増大した親和性などの、所望の抗体の特徴が達成されるように、レシピエント配列およびインポート配列からFR残基を選択して、組み合わせることができる。

【0345】

元の配列に対する同一性または相同性は、通常、配列を整列させ、必要な場合にはギャップを導入して、最大の配列同一性パーセントを達成した後、いかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮せずに、ヒト、ヒト化、もしくはキメラ抗体または断片内に存在する配列と同一である、候補配列内に存在するアミノ酸残基のパーセンテージである。

【0346】

いくつかの態様において、共有結合性改変を、抗体またはその抗原結合断片に対して行うことができる。これらの共有結合性改変は、化学的もしくは酵素的合成によって、または酵素的もしくは化学的切断によって行うことができる。抗体または抗体断片の他のタイプの共有結合性改変は、抗体または断片の標的アミノ酸残基を、選択された側鎖またはN末端残基もしくはC末端残基と反応することができる有機誘導体化剤と反応させることによって、分子中に導入される。

【0347】

いくつかの態様において、Fc領域に（直接的または間接的に）付加されるフコースが欠如した炭水化物構造を有する抗体バリエーションが、提供される。例えば、そのような抗体中のフコースの量は、1%～80%、1%～65%、5%～65%、または20%～40%であり得る。フコースの量は、例えば、WO 2008/077546に記載されているように、MALDI-TOF質量分析によって測定されるようなAsn297に付加されたすべての糖構造（例えば、複合、ハイブリッド、および高マンノース構造）の合計に対する、Asn297の糖鎖内のフコースの平均量を算出することによって決定される。Asn297は、Fc領域中の約297位（Fc領域残基のEUナンバリング；またはKabatナンバリングにおける314位）に位置するアスパラギン残基を指す；しかし、抗体における軽微な配列バリエーションにより、Asn297はまた、297位の約±3アミノ酸上流または下流に、すなわち、294位～300位の間に位置する場合もある。そのようなフコシル化バリエーションは、改善されたADC機能を有し得る。いくつかの態様において、グリカンの不均一性を低減させるために、抗体のFc領域を、297位のアスパラギンをアラニンで置き換えるように（N297A）、さらに操作することができる。

【0348】

いくつかの態様において、Fabアーム交換を回避することによって作製効率を促進するために、抗体のFc領域を、IgG4の228位（EUナンバリング）のセリンをプロリンで置き換えるように（S228P）、さらに操作した。S228変異に関する詳細な説明は、例えば、その全体が参照により組み入れられる、Silva et al. "The S228P mutation prevents in vivo and in vitro IgG4 Fab-arm exchange as demonstrated using a combination of novel quantitative immunoassays and physiological matrix preparation." *Journal of Biological Chemistry* 290.9 (2015): 5462-5469に記載されている。

【0349】

いくつかの態様において、本明細書に記載される方法は、二重特異性抗体を作製するように設計される。二重特異性抗体は、抗体分子のペアの間の境界面を操作して、組換え細胞培養から回収されるヘテロ二量体のパーセンテージを最大化することによって、作製することができる。例えば、境界面は、抗体定常ドメインのCH3ドメインの少なくとも一部を含有することができる。この方法においては、第1の抗体分子の境界面由来の1つまたは複数の小さなアミノ酸側鎖を、より大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）で置き換える。大きなアミノ酸側鎖をより小さなアミノ酸側鎖（例えば、アラニンまたはスレオニン）で置き換えることによって、大きな側鎖と同一のまたは類似したサイズの補償的な「空洞」が、第2の抗体分子の境界面上に作り出される。これにより、ホモ二量体などの他の望まれない最終生成物を上回ってヘテロ二量体の収率を増大させるための機構が提供される。この方法は、例えば、その全体が参照により組み入れられる、WO 96/27011に記載されている。

【0350】

いくつかの態様において、IgGのCH3部分中の1つまたは複数のアミノ酸残基が置換される。いくつかの態様において、一方の重鎖は、以下の置換Y349CおよびT366Wのうちの1つまたは複数を有する。もう一方の重鎖は、1つまたは複数の以下の置換E356C、T366S、L368A、およびY407Vを有することができる。さらに、置換（-ppcpScp-->-ppcpPcp-）もまた、両方の置換されたIgGのヒンジ領域に導入することができる。

いくつかの態様において、一方の重鎖は、T366Y（ノブ）置換を有し、もう一方の重鎖は、Y407T（ホール）置換を有する（EUナンバリング）。

【0351】

本出願の1つの局面は、第1の重鎖定常ドメイン3（CH3）ドメインを含む第1のポリペプチド、および第2のCH3ドメインを含む第2のポリペプチドを含む、ヘテロ多量体（例えば、ヘテロ二量体）タンパク質であって、該第1のCH3ドメインが、アミノ酸354位にかさ高い疎水性アミノ酸での野生型CH3ドメインに対する置換を含み、および/または該第2のCH3ドメインが、アミノ酸347位に負に荷電したアミノ酸での野生型CH3ドメインに対する置換を含み、およびアミノ酸残基のナンバリングが、EUナンバリングに基づく、前記タンパク質を提供する。いくつかの態様において、アミノ酸354位のかさ高い疎水性アミノ酸は、第2のCH3ドメイン中のアミノ酸残基と疎水性相互作用を形成する。いくつかの態様において、第2のCH3ドメインは、アミノ酸349位のかさ高い疎水性残基（例えば、Y349）を含む。いくつかの態様において、アミノ酸347位の負に荷電したアミノ酸は、第1のCH3ドメイン中のアミノ酸残基とイオン結合を形成する。いくつかの態様において、第1のCH3ドメインは、アミノ酸360位の正に荷電した残基（例えば、K360）を含む。いくつかの態様において、第1のCH3ドメインおよび第2のCH3ドメインは、ヒトCH3ドメインである。いくつかの態様において、第1のCH3ドメインは、S354Y、S354F、およびS354Wからなる群より選択される置換を含む。いくつかの態様において、第1のCH3ドメインは、S354Yを含む。いくつかの態様において、第2のCH3ドメインは、第1のCH3ドメイン中のS354の置換に対する補償的な置換（例えば、Y349での置換）を含まない。いくつかの態様において、第2のCH3ドメインは、Q347EおよびQ347Dからなる群から選択される置換を含む。いくつかの態様において、第2のCH3ドメインは、Q347Eを含む。上記のヘテロ多量体タンパク質のいずれか1つによるいくつかの態様において、第1のCH3ドメインおよび第2のCH3ドメインは、ノブ・イントゥ・ホール（KIH）残基をさらに含む。いくつかの態様において、ノブ・イントゥ・ホール残基は、T366YおよびY407Tである。いくつかの態様において、第1のCH3ドメインは、T366YおよびS354Yを含み、ならびに第2のCH3ドメインは、Y407TおよびQ347Eを含む。いくつかの態様において、第1のCH3ドメインは、Y407TおよびS354Yを含み、ならびに第2のCH3ドメインは、T366YおよびQ347Eを含む。詳細は、例えば、参照により本明細書に組み入れられる、PCT/US2020/025469に見出すことができる。

【0352】

さらに、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて、二重特異性抗体を精製することができる。陰イオン交換クロマトグラフィーとは、ジエチルアミノエチル基（DEAE）などの正に荷電した基を含有するイオン交換樹脂を用いて、物質をその電荷に基づいて分離するプロセスである。溶液において、樹脂は、正に荷電した対イオン（陽イオン）でコーティングされている。陰イオン交換樹脂は、負に荷電した分子に結合し、対イオンに取って代わる。陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて、タンパク質をその等電点（pI）に基づいて精製することができる。等電点とは、タンパク質がいかなる正味の電荷も有しないpHとして定義される。pH>pIの場合、タンパク質は正味の負の電荷を有し、pH<pIの場合、タンパク質は正味の正の電荷を有する。したがって、いくつかの態様において、2つのアームAを含むホモ二量体のpIおよび2つのアームBを含むホモ二量体のpIが異なるように、異なるアミノ酸置換を、2本の重鎖中に導入することができる。アームAおよびアームBを有する二重特異性抗体のpIは、ホモ二量体の2つのpIの間のどこかにあることになる。したがって、2つのホモ二量体および二重特異性抗体は、異なるpH条件で放出されることができる。本開示は、pIを調整するために、少数のアミノ酸残基置換を重鎖に導入できることを示す。

【0353】

したがって、いくつかの態様において、Kabatナンバリング83位のアミノ酸残基は、リジン、アルギニン、またはヒスチジンである。いくつかの態様において、1、6、43、81、および105位（Kabatナンバリング）のうちの1つまたは複数のアミノ酸残基は、

アスパラギン酸またはグルタミン酸である。

【0354】

いくつかの態様において、13位および105位（Kabatナンバリング）のうちの1つまたは複数のアミノ酸残基は、アスパラギン酸またはグルタミン酸である。いくつかの態様において、13位および42位（Kabatナンバリング）のうちの1つまたは複数のアミノ酸残基は、リジン、アルギニン、ヒスチジン、またはグリシンである。

【0355】

二重特異性抗体はまた、例えば、架橋抗体、または「ヘテロコンジュゲート」抗体を含むことができる。例えば、ヘテロコンジュゲート中の抗体の一方をアビジンに、もう一方をビオチンにカップリングさせることができる。ヘテロコンジュゲート抗体はまた、任意の便利な架橋方法を用いて作製することができる。適している架橋剤および架橋技術は、当技術分野において周知であり、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,676,980号に開示されている。

【0356】

抗体断片から二重特異性抗体を生成するための方法もまた、当技術分野において公知である。例えば、二重特異性抗体は、化学的連結を用いて調製することができる。Brennan et al. (Science 229:81, 1985)は、インタクトな抗体をタンパク質分解的に切断して、F(ab')₂断片を生成する手順を記載している。これらの断片を、ジチオール錯化剤である亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して、近接するジチオールを安定化し、分子間のジスルフィド形成を阻止する。次いで、生成されたFab'断片を、チオニトロベンゾアート（TNB）誘導体に変換する。次いで、Fab' TNB誘導体の1つを、メルカプトエチルアミンでの還元によってFab'チオールに再変換し、等モル量の別のFab' TNB誘導体と混合して、二重特異性抗体を形成する。

【0357】

処置の方法

本明細書に記載される方法は、がんに関連する障害の処置のための方法を含む。概して、方法は、治療的有効量の、本明細書に記載されるようなその抗原結合断片の操作された二重特異性抗体（例えば、不均衡な二重特異性抗体）を、そのような処置を必要とする、または必要とすると判定された対象に投与する工程を含む。

【0358】

この文脈において用いられる場合、「処置する」ことは、がんに関連する障害の少なくとも1つの症状を改善することを意味する。多くの場合、がんは死をもたらす；したがって、処置は、平均余命の増大（例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12ヶ月分、または少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年分）をもたらすことができる。がんに関連する状態の処置のための、治療的有効量の本明細書に記載される剤（例えば、不均衡な二重特異性抗体）の投与は、がん細胞の数の減少および/または症状の軽減を結果としてもたらすであろう。

【0359】

本明細書において用いられる場合、「がん」という用語は、自律増殖の能力を有する細胞、すなわち、急速に増殖する細胞増殖によって特徴付けられる異常な状態または条件を指す。この用語は、組織病理学的タイプまたは浸潤のステージに関係なく、すべてのタイプのがん性増殖または発癌性プロセス、転移組織または悪性に形質転換された細胞、組織、もしくは器官を含むように意図される。本明細書において用いられる「腫瘍」という用語は、がん性細胞、例えば、がん性細胞の塊を指す。本明細書に記載される方法を用いて処置または診断することができるがんには、肺、乳房、甲状腺、リンパ系、胃腸、および尿生殖路に影響を及ぼすような様々な器官系の悪性腫瘍、ならびに、ほとんどの結腸がん、腎細胞癌、前立腺がんおよび/または精巣腫瘍、肺の非小細胞癌、小腸のがん、および食道のがんなどの悪性腫瘍を含む腺癌が含まれる。いくつかの態様において、本明細書に記載される剤は、対象における癌腫を処置または診断するために設計される。「癌腫」という用語は、当技術分野で認識されており、呼吸器系癌、胃腸系癌、尿生殖器系癌、精巣

10

20

30

40

50

癌、乳癌、前立腺癌、内分泌系癌、および黒色腫を含む、上皮組織または内分泌組織の悪性腫瘍を指す。いくつかの態様において、がんは、腎癌または黒色腫である。例示的な癌腫には、子宮頸部、肺、前立腺、乳房、頭頸部、結腸、および卵巣の組織から形成するものが含まれる。この用語にはまた、例えば、癌性組織および肉腫性組織から構成される悪性腫瘍を含む、癌肉腫が含まれる。「腺癌」は、腺組織に由来するか、または腫瘍細胞が認識可能な腺構造を形成する癌腫を指す。「肉腫」という用語は、当技術分野で認識されており、間葉由来の悪性腫瘍を指す。

【0360】

1つの局面において、本開示はまた、対象におけるがんを処置するための方法、対象における腫瘍の体積の経時的な増大の速度を低減させる方法、転移を発症するリスクを低減させる方法、または対象におけるさらなる転移を発症するリスクを低減させる方法を提供する。いくつかの態様において、処置は、がんの進行を停止させるか、遅くするか、遅延させるか、または阻害することができる。いくつかの態様において、処置は、対象におけるがんの1つまたは複数の症状の数、重症度、および/または持続期間の低減を結果としてもたらすことができる。

【0361】

1つの局面において、本開示は、治療的有效量の、本明細書に開示される抗体もしくはその抗原結合断片、または抗体薬物コンジュゲートを、それを必要とする対象、例えば、がん、例えば、乳がん（例えば、トリプルネガティブ乳がん）、カルチノイドがん、子宮頸がん、子宮内膜がん、神経膠腫、頭頸部がん、肝臓がん、肺がん、小細胞肺がん、リンパ腫、黒色腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、腎がん、結腸直腸がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、膀胱がん、尿道がん、または血液悪性腫瘍を有するか、または有すると特定もしくは診断された対象に投与する工程を含む方法の特徴とする。

【0362】

いくつかの態様において、本開示は、以下を含む方法の特徴とする：EGFR中に少なくとも1つの耐性変異（例えば、C797S、T790M、および/またはL858R）を有する対象を特定する工程；ならびに治療的有效量の、本明細書に開示される抗体もしくはその抗原結合断片、または抗体薬物コンジュゲートを、それを必要とする対象、例えば、がんを有するか、または有すると特定もしくは診断された対象に投与する工程。

【0363】

本明細書において用いられる場合、「対象」および「患者」という用語は、本明細書全体を通して互換的に用いられ、本発明の方法による処置が提供される、ヒトまたは非ヒトである動物を説明する。獣医学的および非獣医学的な適用が、本発明によって企図される。ヒト患者は、成人のヒトまたは若年のヒト（例えば、18歳未満のヒト）であることができる。ヒトに加えて、患者には、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、フェレット、ネコ、イヌ、および霊長類が含まれるが、それらに限定されない。含まれるのは、例えば、非ヒト霊長類（例えば、サル、チンパンジー、ゴリラなど）、げっ歯類（例えば、ラット、マウス、アレチネズミ、ハムスター、フェレット、ウサギ）、ウサギ目、ブタ（例えば、ブタ、ミニチュアブタ）、ウマ、イヌ、ネコ、ウシ、ならびに他の家庭内、農場、および動物園の動物である。

【0364】

いくつかの態様において、がんは、cMETを発現するがんである。いくつかの態様において、がんは、EGFRを発現するがんである。いくつかの態様において、がんは、cMETおよびEGFRの両方を発現するがんである。

【0365】

いくつかの態様において、がんは、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）である。

【0366】

いくつかの態様において、がんは、切除不能な黒色腫もしくは転移性黒色腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺がん（SCLC）、膀胱がん、または転移性ホルモン不応性前立腺がんである。いくつかの態様において、対象は、固形腫瘍を有する。いくつかの態様

において、がんは、頭頸部扁平上皮癌（SCCHN）、腎細胞癌（RCC）、トリプルネガティブ乳がん（TNBC）、または結腸直腸癌である。いくつかの態様において、対象は、ホジキンリンパ腫を有する。いくつかの態様において、対象は、トリプルネガティブ乳がん（TNBC）、胃がん、尿路上皮がん、メルケル細胞癌、または頭頸部がんを有する。いくつかの態様において、がんは、黒色腫、膵臓癌、中皮腫、血液悪性腫瘍、特に非ホジキンリンパ腫、リンパ腫、慢性リンパ性白血病、または進行性固形腫瘍である。いくつかの態様において、がんは、遺伝性乳頭状腎細胞癌である。いくつかの態様において、がんは、胃がん、頭頸部がん、肝臓がん、卵巣がん、NSCLC、または甲状腺がんである。

【0367】

いくつかの態様において、がんは、第1世代のEGFR-TKI（例えば、ゲフィチニブまたはエルロチニブ）に対して耐性である。いくつかの態様において、がんは、第2世代のEGFR-TKI（例えば、アファチニブまたはダコミチニブ）に対して耐性である。いくつかの態様において、がんは、第3世代のEGFR-TKI（例えば、オシメルチニブ（TAGRISSO）またはロシレチニブ）に対して耐性である。

【0368】

いくつかの態様において、本明細書に記載される対象（例えば、ヒト）は、1つまたは複数の細胞においてEGFR遺伝子中に1つまたは複数の変異を有する。いくつかの態様において、変異は、エクソン19欠失変異、および/またはL858Rを結果としてもたらすエクソン21における一点置換変異を含む。

【0369】

いくつかの態様において、本明細書に記載される対象（例えば、ヒト）は、1つまたは複数の細胞においてEGFRタンパク質中に1つまたは複数の耐性変異を有する。いくつかの態様において、1つまたは複数の耐性変異は、C797S、T790M、および/またはL858Rを含む。

【0370】

いくつかの態様において、本明細書に記載されるがん細胞は、細胞株、例えば、NCI-H1975細胞である。いくつかの態様において、がん細胞は、EGFRの一次活性化変異および/または二次活性化変異を含む。いくつかの態様において、がん細胞は、例えば、非がん性細胞よりも少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%高い、上昇したcMETレベルを有する。

【0371】

いくつかの態様において、本明細書に開示される組成物および方法は、がんのリスクがある患者の処置のために使用することができる。がんを有する患者は、当技術分野において公知の様々な方法で特定することができる。

【0372】

本明細書において用いられる場合、「有効量」とは、疾患、例えば、がんの進行を停止すること、遅くすること、遅延させること、または阻害することを含む、有益なまたは所望の結果をもたらすのに十分な量または投与量を意味する。有効量は、例えば、抗体、抗原結合断片、抗体-薬物コンジュゲート、抗体をコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含むベクター、および/またはそれらの組成物が投与されるべき対象の年齢および体重、症状の重症度、ならびに投与の経路に依存して変動し、したがって、投与は、個別に決定することができる。

【0373】

有効量は、1回または複数回の投与において投与することができる。例として、抗体、抗原結合断片、または抗体-薬物コンジュゲートの有効量は、患者における自己免疫疾患もしくはがんの進行を改善する、止める、安定化する、逆転する、阻害する、遅くする、および/もしくは遅らせるのに十分な量であるか、またはインビトロで細胞（例えば、生検された細胞、本明細書に記載されるがん細胞のいずれか、もしくは細胞株（例えば、がん細胞株））の増殖を改善する、止める、安定化する、逆転する、遅くする、および/もしくは遅らせるのに十分な量である。当技術分野において理解されているように、抗体、

10

20

30

40

50

抗原結合断片、または抗体-薬物コンジュゲートの有効量は、とりわけ、患者の病歴、ならびに使用される抗体のタイプ（および/または投与量）などの他の要因に依存して変動し得る。

【0374】

本明細書に開示される抗体、抗体をコードするポリヌクレオチド、抗体-薬物コンジュゲート、および/または組成物を投与するための有効量およびスケジュールは、経験的に決定されてもよく、そのような決定を行うことは、当技術分野の技能内である。当業者は、投与されなければならない投与量が、例えば、本明細書に開示される抗体、抗体をコードするポリヌクレオチド、抗体-薬物コンジュゲート、および/または組成物を受けることになる哺乳動物、投与の経路、使用される本明細書に開示される抗体、抗体をコードするポリヌクレオチド、抗原結合断片、抗体-薬物コンジュゲート、および/または組成物の特定のタイプ、ならびに哺乳動物に投与されている他の薬物に依存して変動することを理解するであろう。抗体または抗原結合断片の適切な用量を選択する際の手引きは、抗体および抗原結合断片の治療的使用に関する文献、例えば、Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone et al., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N.J., 1985, ch. 22およびpp. 303-357; Smith et al., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al., eds., Raven Press, New York, 1977, pp. 365-389に見出すことができる。

【0375】

有効量の抗体の典型的な1日の投与量は、0.01 mg/kg~100 mg/kgである。いくつかの態様において、投与量は、100 mg/kg、10 mg/kg、9 mg/kg、8 mg/kg、7 mg/kg、6 mg/kg、5 mg/kg、4 mg/kg、3 mg/kg、2 mg/kg、1 mg/kg、0.5 mg/kg、または0.1 mg/kg未満であることができる。いくつかの態様において、投与量は、10 mg/kg、9 mg/kg、8 mg/kg、7 mg/kg、6 mg/kg、5 mg/kg、4 mg/kg、3 mg/kg、2 mg/kg、1 mg/kg、0.5 mg/kg、0.1 mg/kg、0.05 mg/kg、または0.01 mg/kgよりも多いことができる。いくつかの態様において、投与量は、約10 mg/kg、9 mg/kg、8 mg/kg、7 mg/kg、6 mg/kg、5 mg/kg、4 mg/kg、3 mg/kg、2 mg/kg、1 mg/kg、0.9 mg/kg、0.8 mg/kg、0.7 mg/kg、0.6 mg/kg、0.5 mg/kg、0.4 mg/kg、0.3 mg/kg、0.2 mg/kg、または0.1 mg/kgである。

【0376】

本明細書に記載される方法のいずれかにおいて、少なくとも1つの抗体、その抗原結合断片、抗体-薬物コンジュゲート、または薬学的組成物（例えば、本明細書に記載される抗体、抗原結合断片、抗体-薬物コンジュゲート、または薬学的組成物のいずれか）および任意で、少なくとも1つの追加の治療剤を、少なくとも週に1回（例えば、週に1回、週に2回、週に3回、週に4回、1日に1回、1日に2回、または1日に3回）、対象に投与することができる。いくつかの態様において、少なくとも2つの異なる抗体および/または抗原結合断片は、同じ組成物（例えば、液体組成物）において投与される。いくつかの態様において、少なくとも1つの抗体、抗原結合断片、抗体-薬物コンジュゲート、および少なくとも1つの追加の治療剤は、同じ組成物（例えば、液体組成物）において投与される。いくつかの態様において、少なくとも1つの抗体または抗原結合断片、および少なくとも1つの追加の治療剤は、2つの異なる組成物（例えば、少なくとも1つの抗体または抗原結合断片を含有する液体組成物、および少なくとも1つの追加の治療剤を含有する固体経口組成物）において投与される。いくつかの態様において、少なくとも1つの追加の治療剤は、丸剤、錠剤、またはカプセルとして投与される。いくつかの態様において、少なくとも1つの追加の治療剤は、徐放性経口製剤において投与される。

【0377】

いくつかの態様において、1つまたは複数の追加の治療剤は、少なくとも1つの抗体、抗原結合抗体断片、抗体-薬物コンジュゲート、または薬学的組成物（例えば、本明細書に記載される抗体、抗原結合抗体断片、または薬学的組成物のいずれか）を投与する前に、または投与した後に、対象に投与することができる。いくつかの態様において、1つま

たは複数の追加の治療剤、および少なくとも1つの抗体、抗原結合抗体断片、抗体-薬物コンジュゲート、または薬学的組成物（例えば、本明細書に記載される抗体、抗原結合抗体断片、または薬学的組成物のいずれか）は、対象における1つまたは複数の追加の治療剤および少なくとも1つの抗体または抗原結合断片（例えば、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片のいずれか）の生物活性期間に重複があるように、対象に投与される。

【0378】

いくつかの態様において、対象に、少なくとも1つの抗体、抗原結合抗体断片、抗体-薬物コンジュゲート、または薬学的組成物（例えば、本明細書に記載される抗体、抗原結合抗体断片、または薬学的組成物のいずれか）を、長い期間にわたって（例えば、少なくとも1週間、2週間、3週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月、1年、2年、3年、4年、または5年の期間にわたって）投与することができる。熟練した医療専門家は、処置の有効性を診断または追跡するための本明細書に記載される方法のいずれか（例えば、がんの少なくとも1つの症状の観察）を用いて、処置期間の長さを決定し得る。本明細書に記載されるように、熟練した医療専門家はまた、対象に投与される抗体または抗原結合抗体断片、抗体-薬物コンジュゲート（および/または1つもしくは複数の追加の治療剤）の同一性および数を変化させる（例えば、増加または減少させる）ことができ、かつまた、（例えば、本明細書に記載される、および当技術分野において公知の方法のいずれかを用いた）処置の有効性の評価に基づいて、対象に対する少なくとも1つの抗体または抗原結合抗体断片（および/または1つもしくは複数の追加の治療剤）の投与の投与量または頻度を調整する（例えば、増加または減少させる）ことができる。

【0379】

いくつかの態様において、1つまたは複数の追加の治療剤を、対象に投与することができる。追加の治療剤は、B-Rafの阻害剤、EGFR阻害剤、MEKの阻害剤、ERKの阻害剤、K-Rasの阻害剤、c-Metの阻害剤、未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）の阻害剤、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ（PI3K）の阻害剤、Aktの阻害剤、mTORの阻害剤、PI3K/mTOR二重阻害剤、ブルトン型チロシンキナーゼ（BTK）の阻害剤、ならびにイソクエン酸デヒドロゲナーゼ1（IDH1）および/またはイソクエン酸デヒドロゲナーゼ2（IDH2）の阻害剤からなる群より選択される1つまたは複数の阻害剤を含むことができる。いくつかの態様において、追加の治療剤は、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ-1（IDO1）の阻害剤（例えば、エパカドスタット）である。

【0380】

いくつかの態様において、追加の治療剤は、HER3の阻害剤、LSD1の阻害剤、MDM2の阻害剤、BCL2の阻害剤、CHK1の阻害剤、活性化ヘッジホッグシグナル伝達経路の阻害剤、およびエストロゲン受容体を選択的に分解する剤からなる群より選択される1つまたは複数の阻害剤を含むことができる。

【0381】

いくつかの態様において、追加の治療剤は、トラベクテジン、nab-パクリタキセル、トレバナニブ、パゾパニブ、セディラニブ、パルボシクリブ、エベロリムス、フルオロピリミジン、IFL、レゴラフェニブ、Reolysin、Alimta、Zykadia、Sutent、テムシロリムス、アキシチニブ、エベロリムス、ソラフェニブ、Votrient、パゾパニブ、IMA-901、AGS-003、カボザンチニブ、ピンフルニン、Hsp90阻害剤、Ad-GM-CSF、テマゾロミド（Temazolomide）、IL-2、IFNa、ビンブラスチン、Thalomid、ダカルバジン、シクロホスファミド、レナリドミド、アザシチジン、レナリドミド、ボルテゾミド（bortezomid）、アムルピシン、カルフィルゾミブ、プララトレキサート、およびエンザスタウリンからなる群より選択される1つまたは複数の治療剤を含むことができる。

【0382】

いくつかの態様において、追加の治療剤は、アジュバント、TLRアゴニスト、腫瘍壊死因子（TNF） α 、IL-1、HMGB1、IL-10アンタゴニスト、IL-4アンタゴニスト、IL-

10

20

30

40

50

13アンタゴニスト、IL-17アンタゴニスト、HVEMアンタゴニスト、ICOSアゴニスト、CX3CL1を標的とする処置、CXCL9を標的とする処置、CXCL10を標的とする処置、CCL5を標的とする処置、LFA-1アゴニスト、ICAM1アゴニスト、およびセレクチンアゴニストからなる群より選択される1つまたは複数の治療剤を含むことができる。

【0383】

いくつかの態様において、カルボプラチン、nab-パクリタキセル、パクリタキセル、シスプラチン、ペメトレキセド、ゲムシタビン、FOLFOX、またはFOLFIRIが、対象に投与される。

【0384】

いくつかの態様において、追加の治療剤は、抗OX40抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗LAG-3抗体、抗TIGIT抗体、抗BTLA抗体、抗CTLA-4抗体、または抗GITR抗体である。

【0385】

薬学的組成物および投与の経路

また、本明細書に記載される抗体、抗原結合断片、または抗体-薬物コンジュゲートの少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、3つ、または4つ）を含有する薬学的組成物も、本明細書において提供される。本明細書に記載される抗体、抗原結合断片、または抗体-薬物コンジュゲートのいずれかの2つ以上（例えば、2つ、3つ、または4つ）が、任意の組み合わせで薬学的組成物中に存在することができる。薬学的組成物は、当技術分野において公知の任意の方法で製剤化され得る。

【0386】

薬学的組成物は、その意図される投与の経路（例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、皮内、皮下、または腹腔内）に適合するように製剤化される。組成物は、滅菌希釈剤（例えば、滅菌水もしくは生理食塩水）、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールもしくは他の合成溶媒、抗細菌剤もしくは抗真菌剤、例えばベンジルアルコールもしくはメチルパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど、抗酸化剤、例えばアスコルビン酸もしくは重亜硫酸ナトリウム、キレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸、緩衝剤、例えば酢酸塩、クエン酸塩、もしくはリン酸塩、および等張剤、例えば糖（例えば、デキストロース）、多価アルコール（例えば、マンニトールもしくはソルビトール）、もしくは塩（例えば、塩化ナトリウム）、またはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。リポソーム懸濁液もまた、薬学的に許容される担体として用いることができる（例えば、米国特許第4,522,811号を参照されたい）。組成物の調製物は、アンプル、使い捨て注射器、または複数用量バイアルにおいて製剤化および封入することができる。必要とされる場合（例えば、注射用製剤におけるように）、妥当な流動性を、例えば、レシチンなどのコーティング、または界面活性剤の使用によって、維持することができる。抗体またはその抗原結合断片の吸収は、吸収を遅らせる剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）を含むことによって、延長することができる。あるいは、制御放出を、生分解性、生体適合性ポリマー（例えば、エチレンビニルアセタート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸；Alza CorporationおよびNova Pharmaceutical, Inc.）を含むことができるインプラントおよびマイクロカプセル化送達系によって、達成することができる。

【0387】

本明細書に記載される抗体、抗原結合断片、抗体-薬物コンジュゲートのいずれかの1つまたは複数を含む組成物は、非経口（例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、皮内、皮下、または腹腔内）投与のために、単位剤形（すなわち、投与の容易さおよび投与量の均一性のために所定の量の活性化化合物を含有する物理的に別個の単位）において製剤化することができる。

【0388】

組成物の毒性および治療効力は、細胞培養物または実験動物（例えば、サル）における

10

20

30

40

50

標準的な薬学的手順によって決定することができる。LD50（集団の50%が致死の用量）およびED50（集団の50%において治療的に有効な用量）を決定することができる：治療指数は、LD50：ED50の比である。高い治療指数を示す剤が好ましい。剤が望ましくない副作用を示す場合は、潜在的な損害を最小限に抑える（すなわち、望まれない副作用を低減させる）ように気をつけるべきである。毒性および治療効力は、他の標準的な薬学的手順によって決定することができる。

【0389】

細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータを、対象（例えば、ヒト）における使用のために任意の所与の剤の適切な投与量を製剤化する際に用いることができる。1つまたは複数（例えば、1つ、2つ、3つ、または4つ）の抗体またはその抗原結合断片（例えば、本明細書に記載される抗体または抗体断片のいずれか）の治療の有効量とは、対象（例えば、がんを有すると特定されたヒト対象）、または疾患を発症するリスクがあると特定された対象（例えば、以前にがんを発症したが現在は治療している対象）において、対象における疾患を処置する（例えば、がん細胞を殺傷する）、対象（例えば、ヒト）における疾患の1つまたは複数の症状の重症度、頻度、および/または持続期間を減少させる、量である。本明細書に記載される抗体または抗原結合断片のいずれかの有効性および投与は、当技術分野において公知の方法を用いて、医療専門家または獣医学専門家によって、および対象（例えば、ヒト）における疾患の1つまたは複数の症状の観察によって、決定することができる。ある特定の要因（例えば、疾患または障害の重症度、以前の処置、対象の全身の健康および/または年齢、ならびに他の疾患の存在）が、対象を有効に処置するために必要とされる投与量およびタイミングに影響し得る。

【0390】

例示的な用量は、1キログラムの対象の体重あたり、ミリグラムまたはマイクログラムの量の、本明細書に記載される抗体もしくは抗原結合断片、または抗体-薬物コンジュゲートのいずれか（例えば、約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約500 mg/kg ；約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約500 mg/kg ；約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約50 mg/kg ；約10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約5 mg/kg ；約10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約0.5 mg/kg ；または約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）を含む。これらの用量は、広い範囲に及ぶが、当業者は、抗体およびその抗原結合断片を含む治療剤は、その効能が異なり、有効量を、当技術分野において公知の方法によって決定できることを理解するであろう。典型的には、比較的低い用量が最初に投与され、主治医の医療専門家もしくは獣医学専門家（治療適用の場合）または研究者（まだ開発段階で作業する場合）が、その後および徐々に、適切な反応が得られるまで用量を増加させることができる。加えて、任意の特定の対象についての特定の用量レベルは、使用される特定の化合物の活性、対象の年齢、体重、全身の健康、性別、および食事、投与の時間、投与の経路、排出の速度、ならびに抗体または抗体断片のインビボでの半減期を含む、様々な要因に依存するであろう。

【0391】

薬学的組成物は、投与のための説明書と共に、容器、パック、またはディスペンサーに含めることができる。本開示はまた、本明細書に記載されるような様々な使用のために、抗体もしくはその抗原結合断片、または抗体-薬物コンジュゲートを製造する方法を提供する。

【実施例】

【0392】

本発明を、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定しない、以下の実施例においてさらに説明する。

【0393】

実施例1. cMET結合物 (binder) についてのABS VHHライブラリのパンニング

cMETおよびEGFRの両方を標的とする二重特異性抗体を、EGFR結合配列を、本明細書に記載されるcMET結合配列（例えば、VHH）と組み合わせることによって開発した。開発プロセスは、以下のステップに分けることができる：1) cMET結合物についてのファージVHHライブラリのパンニング；2) リードcMET結合物クローンのスクリーニン

グおよび特徴決定；3）細胞活性化アッセイによる受容体結合および受容体/リガンド遮断の検証；4）cMET/EGFR BsAb（二重特異性抗体）の構築および特徴決定（例えば、受容体結合、受容体/リガンド遮断；受容体リン酸化、シグナル伝達抑制、および/またはがん殺傷）；5）リード配列の最適化および作製（例えば、構造的最適化およびリードの特徴決定）；6）細胞ベースのアッセイ（例えば、受容体結合、受容体/リガンド遮断；受容体リン酸化、シグナル伝達抑制、および/もしくはがん死滅）、ならびに/または動物試験（例えば、以下のCDXモデル：H1975およびH1975-HGFについての動物試験）を用いた、BsAb機能の検証。

【0394】

重鎖抗体可変ドメイン（VHH）ファージライブラリを、パンニングプロセスにおいて用いた。抗原は、ヒトcMET-His-タグタンパク質、およびヒトcMETを発現する一過性トランスフェクトCHO細胞を含んでいた。パンニング戦略は、以下のように設計した：2ラウンドの固相ファージパンニング、それに続く1ラウンドの細胞ベースのファージパンニング。パンニングプロセスの詳細は、以下の表に見出すことができる。

【0395】

（表1）

	ラウンド 1	ラウンド 2	ラウンド 3
抗原	cMET-His タグ	cMET-His タグ	細胞
インプット	6×10^{11}	2.16×10^{12}	3.4×10^{12}
アウトプット	2.3×10^7	2.8×10^7	6.5×10^5
濃縮	2.6×10^4	7.7×10^4	5.2×10^6

【0396】

パンニングプロセスの後に、ELISAを行って、リードcMET結合物をスクリーニングし、特徴決定した。一次スクリーニングは、2枚の96ウェルプレートを用いて実施した。ELISAの読み取り値を記録した。それぞれのELISAシグナルが陰性対照ウェルの5倍よりも大きい、合計39個のELISA結合物を特定した。これらの39個のELISA結合物のうち、16個のクローンが、ユニークなクローンであると確認された。

【0397】

実施例2．二次スクリーニング - 競合リガンド結合を通した特徴決定

競合結合アッセイ（遮断ELISA）を行って、16個のユニークなクローンの存在下で、ヒトHGF（Hu-HGF）に対するcMETの結合を測定した。高結合酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）プレートを、200 ng/ウェルのcMET-FLAGタグタンパク質（50 μ l 体積；4 ng/ μ l）で一晩コーティングし、4℃で保持した。翌朝、ウェルを、1%ウシ血清アルブミン（BSA）で2時間、室温（RT）でブロッキングした。ブロッキング後に、ウェルを、PBST（0.05% Tween 20を補充したリン酸緩衝生理食塩水（PBS））で4回洗浄した。次に、試験する抗体試料（16個のユニークなクローンの上清）またはIgGアイソタイプ対照を、それぞれのウェルに25 μ lの体積で添加し、RTで30分間保持した。次いで、25 μ lのビオチン化Hu-HGFタンパク質を、対応するウェルに添加した。プレートを、RTで60分間保持した。その後、ウェルを、PBSTで4回洗浄した。続いて、ストレプトアビジン-HRPコンジュゲート二次抗体（1：1000で希釈）を添加して、RTで30分間インキュベートした。次いで、プレートを、PBSTで4回洗浄した。洗浄後に、Amplex試薬基質を添加することによってプレートを発色させ、次いで、発光シグナルを、SpectraMaxプレートリーダーにおいて530 nmおよび590 nmで測定した。

【0398】

図1に示されるように、4個のクローン1D5、1F3、1H1、および2C7は、高い競合リガンド結合能力を有すると特定された。したがって、それらを、VHH哺乳動物発現系の

調製のために選択した。

【0399】

実施例3. カニクイザル抗原に対する交差反応性

ヒトおよびサル（カニクイザルの種（*Cynomolgus* sp.））の抗原に対する16個の抗体の間の結合類似性を判定するために、結合ELISAを行った。高結合ELISAプレートを、 $1\mu\text{g/mL}$ （ $1\times\text{PBS}$ において希釈）のヒト抗原またはサル抗原でコーティングし、 4°C で一晩保持した。翌日、プレートを、ブロッキング緩衝液（ $1\times\text{PBS}$ 中の4%脱脂乳）で1時間、 37°C でブロッキングした。ブロッキング後に、プレートを、PBSTで3回洗浄した。試験する抗体試料を、PBSにおいて希釈し、次いで、対応するウェルに添加した（ $10\mu\text{g/mL}$ ）。プレートを、 37°C 、RTで1時間インキュベートした。インキュベーション後に、プレートを、PBSTで3回洗浄した。次に、二次抗体（ビオチン化抗c-Myc抗体9E-10、 $1:500$ で希釈）をウェルに添加し、プレートを、 37°C 、RTで1時間インキュベートした。次いで、プレートを、PBSTで3回洗浄した。その後、 $1:1000$ で希釈したストレプトアビジン-HRPを各ウェルに添加し、次いで、プレートを、 37°C 、RTで1時間インキュベートした。インキュベーション後に、プレートを、PBSTで4回洗浄した。洗浄後に、Amplex試薬基質を添加することによってプレートを発色させ、次いで、発光シグナルを、SpectraMaxプレートリーダーにおいて 530 nm および 590 nm で測定した。

10

【0400】

図2に示されるように、4個のクローン1D5、1F3、1H1、および2C7は、ヒト抗原およびサル抗原の両方に対して交差反応性を有すると特定された。したがって、それらを、VHH哺乳動物発現系の調製のために選択した。

20

【0401】

実施例4. cMET VHHの発現解析

cMET VHH-Fcの発現を、バイオレイヤー干渉法（BLI）（Probelife, Palo Alto, CA）を用いて測定した。測定は、製造業者の説明書に従って行った。図3に示されるように、2C7は、cMETに対して最大の結合能力を有することが見出された。しかし、2C7は、混合クローンであることが見出された。1H1は、純粋なクローンであると特定された。1D5もまた、混合クローン（すなわち、少なくとも2個のクローンを含む）として特定された。

【0402】

30

実施例5. ELISAによるcMET VHHのcMETに対する結合の試験

4つの特定されたcMET VHHのcMETタンパク質に対する結合を試験するために、結合ELISAを行った。実験は、本明細書に記載されるのと実質的に同じように実施した。結果を、図4に示す。2C7は、混合クローンとして特定されたため、1H1が、cMETに対して最も高い結合能力を示すクローンとして特定された。

【0403】

実施例6. cMET VHH（上清）のHu-HGFに対する結合についての競合ELISA

cMET VHHクローンをさらに特徴決定するために、競合ELISAを行った。高結合ELISAプレートを、 $4\mu\text{g/mL}$ のc-MET-Fcタグタンパク質でコーティングし、 4°C で一晩保持した。翌朝、ウェルを、1% BSAで2時間、室温（RT）でブロッキングした。ウェルを、PBST（0.05% Tween 20を補充したPBS）で4回洗浄した。試験する抗体試料（1D5、1H1、および2C7クローンの上清）またはIgGアイソタイプ対照（11F11）を、対応するウェルに $25\mu\text{l}$ の体積（ $25\mu\text{g/mL}$ の最終濃度）で添加し、室温で30分間保持した。次いで、 $25\mu\text{l}$ のビオチン化Hu-HGFタンパク質を、対応するウェルに（ 5 nM の最終濃度で）添加し、プレートを、室温で60分間保持した。ウェルを、PBSTで4回洗浄した。続いて、ストレプトアビジン-HRPコンジュゲート二次抗体（ $1:1000$ で希釈）を添加して、室温で30分間インキュベートした。次いで、プレートを、PBSTで4回洗浄した。洗浄後に、Amplex試薬基質を添加することによってプレートを発色させ、次いで、発光シグナルを、SpectraMaxプレートリーダーにおいて 530 nm および 590 nm （カットオフ 570 nm ）で測定した。

40

50

【0404】

図5に示されるように、1H1 VHHは、3個のクローン内で、cMETに対して最も高い結合能力を示した。換言すると、1H1 VHHは、ビオチン化Hu-HGFのcMETに対する結合に対して、最も高い競合を示した。したがって、1H1 VHHを、以下の実験のために選択した。

【0405】

実施例7．二重特異性Abの構築

図6に示されるように、二重特異性抗体を、抗EGFR IgGをバックボーンとして用いて調製した。抗cMET VHHを、抗EGFR IgGの各アームへのリンカーペプチドを介して、重鎖可変領域（VH）に連結した。1H1 VHH（SEQ ID NO: 19）を、野生型Fc領域を有する抗EGFR IgG（VH: SEQ ID NO: 23; VL: SEQ ID NO: 24）の両アームに連結した場合に、二重特異性抗体を1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3と命名する。1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3の別の概略構造を、図18Aに示す。

【0406】

実施例8．JNJ372アナログまたは1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3 BsAbとのcMET-Hisタグの結合の試験

cMETに対する二重特異性抗体1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3のcMET結合能力を評価するために、結合ELISAを行い、JNJ372アナログを陽性対照として用いた。具体的には、高結合ELISAプレートを、4 µg/mlのc-MET-Hisタグタンパク質でコーティングし、4℃で一晩保持した。結合ELISAを、2つのBsAbを（25 µg/mlの最終濃度で）用いて行った。翌朝、ウェルを、1% BSAで2時間、室温でブロッキングした。ウェルを、PBSTで4回洗浄した。BsAbまたはIgGアイソタイプ陰性対照（11F11）を、対応するウェルに50 µlの体積で添加して、インキュベートした。インキュベーション後に、ウェルを、PBSTで4回洗浄した。その後、HRPコンジュゲートヤギ抗ヒトFc抗体を、二次抗体として用いて、対応するウェルに添加し、続いてインキュベートした。次いで、プレートを、PBSTで4回洗浄した。洗浄後に、Amplex試薬基質を添加することによって、プレートを発色させた。発光シグナルを、SpectraMaxプレートリーダーにおいて530 nmおよび590 nm（カットオフ570 nm）で測定した。

【0407】

図7に示されるように、1H1cMET/EGFR-Fc(WT)BsAbは、cMET-Hisタグタンパク質に対して高い結合能力を示した。1H1cMET/EGFR-Fc(WT)は、JNJ372アナログのものと比較して、cMETに対して類似した結合能力を示した。

【0408】

実施例9．JNJ372アナログまたは1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3 BsAbとのEGFR-Hisタグの結合の試験

EGFRに対する二重特異性抗体1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3の結合能力を評価するために、結合ELISAを行い、JNJ372アナログを陽性対照として用いた。具体的には、高結合ELISAプレートを、4 µg/mlのEGFR-Hisタグタンパク質でコーティングし、4℃で一晩保持した。結合ELISAを、2つのBsAbを（25 µg/mlの最終濃度で）用いて行った。翌朝、ウェルを、1% BSAで2時間、室温でブロッキングした。ウェルを、PBSTで4回洗浄した。BsAbまたはIgGアイソタイプ陰性対照（11F11）を、対応するウェルに50 µlの体積で添加し、次いでインキュベートした。インキュベーション後に、ウェルを、PBSTで4回洗浄した。その後、HRPコンジュゲートヤギ抗ヒトFc抗体を、二次抗体として用いて、対応するウェルに添加し、続いてインキュベートした。次いで、プレートを、PBSTで4回洗浄した。洗浄後に、Amplex試薬基質を添加することによって、プレートを発色させた。発光シグナルを、SpectraMaxプレートリーダーにおいて530 nmおよび590 nm（カットオフ570 nm）で測定した。

【0409】

図8に示されるように、1H1cMET/EGFR-Fc(WT)BsAbは、EGFR-Hisタグタンパク質に対して高い結合能力を示した。1H1cMET/EGFR-Fc(WT)は、JNJ372アナログの

ものと比較して、EGFRに対して類似した結合能力を示した。

【0410】

実施例10. 滴定ELISAによるcMETおよびEGFRに対する結合についてのEC50の決定

二重特異性抗体1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3のEC50を決定するために、結合滴定ELISAを、試験抗体の50 µg/mlから始まって50,000 ng/mlまでの5倍連続希釈液で行った。JNJ372アナログを、陽性対照として用いた。希釈濃度は、50 µg/ml、10 µg/ml、2 µg/ml、0.4 µg/ml、0.08 µg/ml、および0.016 µg/mlであった。

【0411】

具体的には、高結合ELISAプレートを、4 µg/mlのc-MET-HisタグまたはEGFR-Hisタグタンパク質でコーティングし、4℃で一晩保持した。翌朝、ウェルを、1% BSAで2時間、室温でブロッキングした。ブロッキング後に、ウェルを、PBSTで4回洗浄した。希釈した抗体試料を、対応するウェルに50 µlの体積で添加して、インキュベートした。インキュベーション後に、ウェルを、PBSTで4回洗浄した。その後、HRPコンジュゲートヤギ抗ヒトFc抗体を、二次抗体として用いて、対応するウェルに添加し、続いてインキュベートした。次いで、プレートを、PBSTで4回洗浄した。洗浄後に、Amplex試薬基質を添加することによって、プレートを発色させた。発光シグナルを、SpectraMaxプレートリーダーにおいて530 nmおよび590 nm（カットオフ570 nm）で測定した。

【0412】

図9に示されるように、cMET結合についてのEC50値は、それぞれ、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3およびJNJ372アナログについて8.6077 ng/mlおよび4.8871 ng/mlと決定された。1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V1の概略構造を、図16Aに示す。図10に示されるように、EGFR結合についてのEC50値は、それぞれ、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3およびJNJ372アナログについて9.27 ng/mlおよび355.95 ng/mlと決定された。

【0413】

実施例11. JNJ372アナログおよび1H1cMET/EGFR(WT)に対するcMET結合についてのKD、Kon、およびKoffの決定

cMETに結合するKD、Kon、およびKoffの値を、バイオレイヤー干渉法（BLI）技術（Probelife, Palo Alto CA）を用いて、製造業者の説明書に従って算出した。結果を、以下の表に示す。

【0414】

（表2）cMET / 1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3

BsAb 濃度 (nM)	koff(1/s)	kon(1/Ms)	KD(M)
114	7.85×10^{-4}	2.48×10^6	3.17×10^{-10}
38.1	7.85×10^{-4}	2.48×10^6	3.17×10^{-10}
12.7	7.85×10^{-4}	2.48×10^6	3.17×10^{-10}
4.23	7.85×10^{-4}	2.48×10^6	3.17×10^{-10}
1.41	7.85×10^{-4}	2.48×10^6	3.17×10^{-10}

【0415】

（表3）cMET / JNJ372アナログ

BsAb 濃度 (nM)	koff(1/s)	kon(1/Ms)	KD(M)
133	9.13×10^{-4}	2.25×10^6	4.05×10^{-10}
44.4	9.13×10^{-4}	2.25×10^6	4.05×10^{-10}
14.8	9.13×10^{-4}	2.25×10^6	4.05×10^{-10}
4.94	9.13×10^{-4}	2.25×10^6	4.05×10^{-10}
1.65	9.13×10^{-4}	2.25×10^6	4.05×10^{-10}

10

20

30

40

50

【0416】

別々の実験において、cMETまたはEGFRに結合する K_D 値を、JNJ372アナログ、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V2、または1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3を用いて決定した。1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V2および1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3の概略構造を、それぞれ、図17Aおよび図18Aに示す。結果を、以下の表に示す。

【0417】

(表4)

BsAb	K_D (M) (cMET 結合)	K_D (M) (EGFR 結合)
JNJ372 アナログ	4.32×10^{-10}	6.89×10^{-10}
1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V2	1.88×10^{-10}	3.25×10^{-10}
1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3	2.39×10^{-10}	2.57×10^{-10}

10

【0418】

実施例12. 競合ELISAによるJNJ372アナログおよび1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3を用いたcMET/HGF遮断の試験

cMETとそのリガンドHGFとの相互作用を遮断するJNJ372アナログおよび1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3の効果を評価するために、競合ELISAを行った。高結合ELISAプレートに、 $4 \mu\text{g/ml}$ のc-MET-Hisタグタンパク質でコーティングし、 4°C で一晩保持した。抗体試料 ($25 \mu\text{g/ml}$ の最終濃度) およびアイソタイプ対照 (11F11) を用いて、実施例6に記載されるように競合ELISAを行った。ビオチン化ヒトHGFと競合する抗体試料の効果を決定した。ストレプトアビジン-HRPコンジュゲート二次抗体を用いた。

20

【0419】

図11に示されるように、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3は、cMET/HGF相互作用の遮断において、JNJ372アナログのものと比較してより有効であった。

【0420】

実施例13. 競合結合アッセイによるJNJ372アナログおよび1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3を用いたEGFR/EGF遮断の判定

1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3が、EGFとEGFRとの間の相互作用を遮断することができるかどうかを判定するために、顕微鏡検査およびフローサイトメトリーアッセイを用いた。NCIH1975細胞 (ATCC (登録商標) CRL-5908) を、10%FBSを補充したRPMI1640培地において、48ウェルプレートに一晩プレーティングした (2×10^5 細胞/ウェル)。翌朝、細胞を、 $1 \times \text{PBS}$ で3回洗浄した。その後、細胞を、PBS中の4%パラホルムアルデヒドで15分間、RTで固定した。次いで、細胞を、 $1 \times \text{PBS}$ で3回洗浄し、続いて10%正常ヤギ血清 (NGS) において30分間、RTでブロッキングした。ブロッキング後に、NGSを除去した。JNJ372アナログ、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3、およびアイソタイプ対照 (11F11) を、 $20 \mu\text{g/ml}$ の濃度でNGSに溶解して、対応するウェルに添加し、RTで2時間保持した。その後、ビオチン化EGFを、 $2 \mu\text{g/ml}$ の最終濃度で添加し、プレートを、RTで1時間保持した。

30

40

【0421】

次に、細胞を、 $1 \times \text{PBS}$ で5回洗浄した。二次抗体 (ストレプトアビジンPEコンジュゲート) を、1:50の最終希釈比でNGSに溶解し、次いでウェルに添加し、続いてRTで1時間インキュベートした。続いて、細胞を、 $1 \times \text{PBS}$ で6回洗浄し、蛍光顕微鏡下でイメージングした。イメージングステップ後に、細胞を、FACS (蛍光活性化細胞選別) 緩衝液において3回洗浄し、フローサイトメトリーを行って、試験した抗体のEGF/EGFR遮断効果を定量した。

【0422】

図12A~12Fに示されるように、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3は、EGFとEGFRとの間の相互作用の遮断において、JNJ372アナログよりも有効であった。

50

【0423】

実施例14. JNJ372アナログまたは1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3で処理したNCI-H1975細胞におけるcMETおよびEGFRの受容体リン酸化の判定

NCI-H1975細胞は、MET遺伝子の増幅に加えて、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)に対する耐性を付与する、EGFRの一次活性化変異および二次活性化変異を有するヒトがん細胞株である。これらの細胞株において、EGFRおよびcMETのリガンドである、それぞれEGFおよびHGFは、EGFRおよびcMET受容体のリン酸化を誘導することができ、これは、ERKおよびAktタンパク質のリン酸化を通して下流シグナル伝達を刺激する。1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3が、リガンドにより誘導されるEGFRおよびcMETのリン酸化を阻害することができるかどうかを判定するために、NCI-H1975細胞を、それぞれEGFおよびHGFの存在下で、JNJ372アナログまたは1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3と培養した。

10

【0424】

ホスホ-cMETを、フローサイトメトリーアッセイを用いて検出した。具体的には、NCI-H1975細胞を、細胞飢餓培地(glutamax(100×溶液から希釈)を補充したRPMI培地)中で、24ウェルプレートにおいて50000細胞/ウェルで一晩増殖させた。翌朝、培地を捨て、細胞を、250μl/ウェルの飢餓培地に溶解した試験抗体(1.5μg/ml)で、37℃および5% CO₂で1時間処理した。続いて、細胞を、250μl/ウェルの飢餓培地に溶解した200 ng/mlのHGFで、37℃および5% CO₂で15分間処理した。最終HGF濃度は、100 ng/mlであった。15分の処理後に、培地を捨て、細胞を、氷冷1×PBSで1回洗浄した。次いで、細胞を、4%パラホルムアルデヒド(PFA)で15分間、RTで固定した。固定後に、細胞を、1×PBSで3回洗浄し、PBSにおいて4℃で一晩保存した。翌朝、細胞を、PBS中の0.1% Triton X-100で4~5分間、氷上で透過処理し、PBSで3回洗浄し、次いで10% NGS(正常ヤギ血清)において30分間ブロッキングした。ブロッキング後に、一次抗体(ヒト/マウスホスホ-HGFR/c-MET(Y1349)(AF3950); Novusbio, Biotechnne, MN)(10% NGSに溶解した15μg/ml)を、対応するウェルに2時間、RTで添加した。続いて、細胞を、PBSで3回洗浄し、次いで、FACS緩衝液(PBS中2% FBS)において1:25の比で希釈した二次抗体(ヤギ抗ウサギIgG(H+L) DyLight 594; Invitrogen, Thermo Fisher, MA)を細胞に添加した。次いで、細胞を、PBSで3回洗浄し、次いで、FACS緩衝液においてウェルから掻き取った。その後、細胞を、FACS緩衝液で3回洗浄し、次いでフローサイトメーター(BD FACS Calibur, NJ)によって解析した。

20

30

【0425】

ホスホ-EGFRを、ELISAキットであるPathScan(登録商標) Phospho-EGF Receptor(Tyr1173) Sandwich ELISA Kit #7187(Cell Signaling Tech)を用いて検出した。本明細書に記載されるようなホスホ-cMET(phosphor-cMET)の検出と同様に、NCI-H1975細胞を、細胞飢餓培地(glutamax(100×溶液から希釈)を補充したRPMI培地)中で、24ウェルプレートにおいて50000細胞/ウェルで一晩増殖させた。翌朝、培地を捨て、細胞を、250μl/ウェルの飢餓培地に溶解した試験抗体(1.5μg/ml)で、37℃および5% CO₂で1時間処理した。続いて、細胞を、250μl/ウェルの飢餓培地に溶解した100 ng/mlのEGFで、37℃および5% CO₂で15分間処理した。最終EGF濃度は、50 ng/mlであった。15分の処理後に、培地を捨て、細胞を、氷冷1×PBSで1回洗浄した。次いで、1 mMフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)を補充した1×溶解緩衝液300 ulを、ウェルに添加し、プレートを、4℃で5分間保持した。細胞を、プレートから掻き取り、次いで1.5 mlチューブに収集した。細胞溶解物を、小口径の針に数回通過させて、細胞を壊した。その後、細胞溶解物を、13200 rpmで10分間、室温で遠心分離した。遠心分離後に収集された上清を、ELISA用の細胞溶解物として用いた。ホスホ-EGFR(phosphor-EGFR)を検出するためのELISAは、製造業者の説明書に従って行った。

40

【0426】

50

図13A～13Bに示されるように、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3は、EGFRのリン酸化の減少においてJNJ372アナログよりも有効であることが見出され（図13B）、一方、JNJ372アナログは、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3のものよりもcMETリン酸化を減少させた（図13A）。

【0427】

実施例15. JNJ372アナログまたは1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3で処理したNCI-H1975細胞におけるpERKおよびpAktの検出

二重特異性抗体1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3をさらに試験するために、機能的アッセイを行った。具体的には、ERKおよびAktタンパク質のリン酸化状態を判定した。ERKおよびAktタンパク質は、がん細胞の増殖、生存、およびアポトーシス経路の妨害に関係する下流シグナル伝達に参与する。NCIH1975細胞（ATCC（登録商標）CRL-5908）を、10% FBSおよび8 ng/ml Hu-HGFを補充したRPMI1640培地中で、24ウェルプレート（ 2×10^5 細胞/ウェル）において一晚増殖させた。pERKを検出するために、Abcam（Cambridge, UK）由来のERK1/2（pT202/Y204 + Total）ELISA Kit（ab176660）を用いた。pAktを検出するために、Cell Signalling Technology（Danvers, MA, US）由来のPathScan（登録商標）Phospho-Akt1（Ser473）Sandwich ELISA Kit #7160を用いた。ELISAは、それぞれの製造業者の説明書に従って行った。タンパク質濃度は、Pierce（商標）Coomassie Plus（Bradford）Assay Kit（96ウェルプレートにおいて1ウェルあたり150 μ lの試薬（5 μ lの溶解物を伴う））を用いて決定した。

【0428】

ホスホロ-ERK（phosphor-ERK）（pERK）の検出のために、細胞を、二重特異性抗体（1.5 μ g/ml）で30分間処理した。続いて、培地を捨て、細胞を、氷冷PBSで2回リンスした。次いで、350 μ lの1×溶解緩衝液（プロテアーゼ阻害剤として1 mM PMSFを補充）をウェルに添加し、溶解された細胞を、1.5 mlチューブに収集した。細胞溶解物を、ELISAプロトコルに従って用いた。

【0429】

同様にホスホロ-Akt（phosphor-Akt）（pAkt）の検出のために、細胞を、二重特異性抗体（1.5 μ g/ml）で60分間処理した。次いで、培地を捨て、細胞を、氷冷PBSで2回リンスした。次いで、350 μ lの1×溶解緩衝液（プロテアーゼ阻害剤として1 mM PMSFを補充）をウェルに添加し、プレートを氷上で5分間保持した。その後、細胞を掻き取り、1.5 mlチューブに収集した。次いで、溶解された細胞を、小口径の針に数回通過させて、細胞を壊した。続いて、細胞溶解物を、13200rpmで10分間、室温で遠心分離した。遠心分離後に収集された上清を、pAkt ELISAを行うための細胞溶解物として用いた。

【0430】

図14A～14Bに示されるように、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3は、Hu-HGFの存在下で増殖させたNCI-H1975細胞において、（総ERKに対する）pERKの比および（総Aktに対する）pAktの比を減少させる上で、JNJ372アナログよりも有効であることが見出された。

【0431】

実施例16. JNJ372アナログと比較した1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3のエフェクター機能の判定

腫瘍細胞の表面上のEGFRおよびcMETのいっそう高いレベルにより、Fc依存性エフェクター機構、例えば、抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC）および補体依存性細胞傷害（CDC）を通した、免疫エフェクター細胞（例えば、NK細胞）によるこれらの細胞の特異的ターゲティングおよび殺傷が可能になる。1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3のエフェクター機能をJNJ372アナログと比較して判定するために、ADCCアッセイおよびCDCアッセイを、下記のように行った。

【0432】

10

20

30

40

50

両方のアッセイの開始前に、NCI-H1975細胞を、カルセインAM細胞透過性色素で標識した。その後、細胞を、PBSで短時間洗浄し、次いで、0.5 Mエチレンジアミン四酢酸(EDTA)で20分間処理した。続いて、処理した細胞を、1200 rpmで5分間遠心分離し、計数し、次いで、4 mlの無血清培地に再懸濁した(約370万個の細胞を標識に用いた)。次いで、8 μ lの1 mMカルセインAM(ストック溶液)を、細胞に添加した(2 μ Mカルセインの最終濃度)。次いで、細胞を、暗所、RTで30分間インキュベートした。その後、細胞を、再び1200 rpmで5分間遠心分離して、培地を除去した。培地除去後に、細胞を、無血清培地で2回洗浄し、次いで、2つの別々の15 mlチューブに、4.6 ml培地において均等に分注した。培地を、下記のCDC判定アッセイには直接用い、下記のADCC判定アッセイには10% FBSを補充した。

10

【0433】

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)

カルセイン標識細胞を、U底96ウェルプレートに1ウェルあたり100 μ lで添加した。試験抗体を、20 μ g/mlの最終濃度になるように、50 μ lの培地において80 μ g/mlの希釈で添加した。次いで、50 μ lの培地において360,000個のNK92-CD16細胞/ウェルを、標識H1975細胞に添加した。エフェクター細胞対標的細胞の比は、9:1であった。細胞混合物を、37°Cで2時間45分インキュベートした。次いで、30 μ lの10 $\times$ 溶解緩衝液を最大放出ウェルに添加し、30 μ lのRPMI培地を最大放出対照ウェルに添加した。プレートを、さらに15分間インキュベートした。インキュベーション後に、プレートを、1200 rpmで5分間遠心分離し、得られた上清の50 μ lを、透明ウェル黒色平底96ウェルプレート(Greiner)に移した。次いで、50 μ lのPBSを、上清に添加した。その後、プレートの発光シグナルを、Spectramax蛍光プレートリーダーにおいて485 nmおよび538 nm(カットオフ530 nm)で測定した。

20

【0434】

図15Aに示されるように、JNJ372アナログは、ADCC誘導性細胞殺傷において、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3と比較してより有効であった。1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3が、野生型Fc領域を有するのに対し、JNJ372アナログは、ADCC機能のためにFc領域に組み込まれた変異を有する可能性がある。したがって、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3を、Fc領域において変異させて、そのADCC効果を増大させることができる。

30

【0435】

補体依存性細胞傷害(CDC)

カルセイン標識細胞を、U底96ウェルプレートに1ウェルあたり100 μ lで添加した。試験抗体を、20 μ g/mlの最終濃度になるように、50 μ lの培地において80 μ g/mlの希釈で添加した。補体血清を、5%の最終濃度になるように、50 μ lの培地において20%の希釈で添加した。細胞を、37°Cで2時間45分インキュベートした。次いで、30 μ lの10 $\times$ 溶解緩衝液を最大放出ウェルに添加し、30 μ lのRPMI培地を最大放出対照ウェルに添加した。プレートを、さらに15分間インキュベートした。インキュベーション後に、プレートを、1200 rpmで5分間遠心分離し、得られた上清の50 μ lを、透明ウェル黒色平底96ウェルプレート(Greiner)に移した。次いで、50 μ lのPBSを、上清に添加した。その後、プレートの発光シグナルを、Spectramax蛍光プレートリーダーにおいて485 nmおよび538 nm(カットオフ530 nm)で測定した。

40

【0436】

図15Bに示されるように、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3は、CDCにおいて、JNJ372アナログと比較して有効であることが見出された。

【0437】

様々な濃度での1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3およびJNJ372アナログのがん細胞殺傷能力もまた、評価した。IC50の結果を、以下の表に示す。

【0438】

(表5)

50

抗体	細胞殺傷 IC50 (ng/ml)
JNJ372 アナログ	195.2186
1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3	214.6154
陰性対照 (アイソタイプ)	2594.843

【 0 4 3 9 】

図 15 C に示されるように、1 H 1 - c M E T / E G F R - F c (W T) - V 3 は、J N J 3 7 2 アナログのものと比較して類似した細胞殺傷能力を示した。

10

【 0 4 4 0 】

実施例 17 . 結 論

本明細書に記載されるような実験結果に従って、以下の表は、本明細書に記載される二重特異性抗体の受容体結合、受容体 / リガンド遮断、シグナル伝達、およびがん細胞殺傷効果の概要を提供する。

【 0 4 4 1 】

(表 6)

20

30

40

50

BsAb	受容体結合	受容体/リガンド遮断	シグナル伝達	がん細胞殺傷
1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V1	cMET 結合 ++ EGFR 結合 ++	cMet/HGF ++ EGFR/EGF ++	cMET 受容体 リン酸化 ++ EGFR 受容体 リン酸化 +++ pERK/総ERK + pAkt/総タンパク質 +	++
1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V2	cMET 結合 +++ EGFR 結合 +++	cMET/HGF +++ EGFR/EGF ++	cMET 受容体 リン酸化 N/A EGFR 受容体 リン酸化 N/A pERK/総ERK ++ pAkt/総タンパク質 +	N/A
1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3	cMET 結合 +++ EGFR 結合 +++	cMET/HGF +++ EGFR/EGF ++++	cMET 受容体 リン酸化 +++ EGFR 受容体 リン酸化 +++ pERK/総ERK ++ pAkt/総タンパク質 +++	+++
JNJ372 アナログ	cMET 結合 +++ EGFR 結合 +++	cMET/HGF ++ EGFR/EGF +++	cMET 受容体 リン酸化 ++ EGFR 受容体 リン酸化 ++ pERK/総ERK +++ pAkt/総タンパク質 ++	+++

10

20

30

40

【0442】

1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V1、1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V2、および1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3の概略構造を、それぞれ、図16A、図17A、および図18Aに示す。

【0443】

実施例18. EGFR/cMET多重特異性抗体によって誘導される内部移行

EGFR/cMET二重特異性抗体および三重特異性抗体によって誘導される内部移行を評価するために、実験を行った。具体的には、JNJ372アナログ、EGFR/cMET二重特異性抗体である1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3、およびEGFR/cMET三重特異性抗体で

50

ある1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT) (図18Bに示されるような三重特異性-V3構造を有する)を用いて、内部移行アッセイを行った。MDA231細胞を、20 µg/mlの抗体と混合し、37℃で30分間インキュベートした。次いで、pHrodo標識二次抗体を添加し、37℃で24時間、細胞とインキュベートした。次いで、細胞を採取して、FACSによって解析した。

【0444】

図20A～20Bに示されるように、1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)は、JNJ372アナログまたは1H1-cMET/EGFR-Fc(WT)-V3と比較して、増強されたcMET/EGFR複合体の内部移行を示した。

【0445】

実施例19. cMET VHHエピトープビニング解析

cMET 1H1およびcMET 1A12についてのcMET VHH-Fcエピトープビニング解析を、バイオレイヤー干渉法 (Probelife, Palo Alto, CA) を用いて、製造業者の説明書に従って行った (図21A～図21B)。簡潔に述べると、定量 (Q) 緩衝液 (非特異的およびバックグラウンドシグナルを減少させるためにウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水) 中のHISプローブを用いて、ベースラインを確立した。HISプローブに対する抗原 (cMET-HISタグ付加) を、Q緩衝液中の5 µg/ml cMET溶液において添加した。Q緩衝液中のHISプローブを、ベースラインに戻るために用いた。続いて、第1の抗体の会合を、Q緩衝液中に希釈した15 µg/mlの抗体においてHISプローブを通して行った。最後に、二次抗体を、Q緩衝液中に希釈した5 µg/mlの抗体においてHISプローブを通して会合させた。結果により、1H1 VHHおよび1A12 VHHは、cMETの異なるエピトープに結合し得ることが示された。さらに、そのcMETエピトープでの1H1 VHHの結合は、1A12エピトープをさらに露出させ、それによって、1A12 VHHのcMetに対する結合親和性を増大させることができる (図21A)。

【0446】

実施例20. 三重特異性Abの構築

図18Bに示されるように、三重特異性抗体を、抗EGFR IgGをバックボーンとして用いて調製した。cMETの2つの異なるエピトープに結合する2つの別々のVHHドメインを、抗EGFR IgGの2つのアームへのリンカーペプチドを介して、重鎖可変領域 (VH) に連結した。1H1 VHH (SEQ ID NO: 84) を、抗EGFR IgG (VH: SEQ ID NO: 23; VL: SEQ ID NO: 24) の一方のアームに連結し、1A12 VHH (SEQ ID NO: 20) を、抗EGFR IgGのもう一方のアームに連結した場合に、三重特異性抗体を1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)と命名する。上記で議論されたように、1H1 VHHおよび1A12 VHHは、cMETの異なるエピトープに結合する。1H1 VHHのそのcMETエピトープでの結合は、1A12エピトープをさらに露出させ、それによって、1A12 VHHのcMetに対する結合親和性を増大させることができる。cMETの発現は、EGFRと比較して相対的に小さいため、三重特異性抗体1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)は、細胞上のEGFRに最初に結合する。三重特異性抗体のEGFRに対する結合は、1H1 VHHを細胞上のcMETにより近づける。1H1 VHHのそのcMETエピトープでの結合は、1A12エピトープの露出をさらに増大させ、それによって、三重特異性抗体の腫瘍細胞に対する結合親和性を増大させることができる。

【0447】

実施例21. 様々なNSCLC細胞に対する1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)およびJNJ372アナログの結合能力の比較

様々な細胞モデルに対する1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)およびJNJ372アナログの結合能力を判定するため。細胞は、H1975、H1975.HGF (HGFを過剰発現するH1975トランスフェクト細胞)、およびEGFR変異体C797S-BaF3細胞を含んでいた。簡潔に述べると、細胞を、FACS緩衝液において希釈して、96ウェルV底無処理プレートに添加した (5×10⁴細胞/100 µl/ウェル)。1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)、JNJ372アナログ、および対照抗体の、100 µl体積の培地における2.04×10⁻⁴ nM～

10

20

30

40

50

400 nMの連続希釈液を、それぞれ、異なるウェルに添加して、室温（RT）で60分間インキュベートした。次いで、ウェルを、PBSで4回洗浄した。FACS緩衝液（1：200希釈）中の二次Ab（ヤギ抗ヒトFc-FITC）を、ウェルに添加して、RTで30分間インキュベートした。ウェルを、FACS緩衝液で3回洗浄した。細胞を、Accutase（商標）細胞剥離液で剥離して、FACSを用いて解析した。

【0448】

図22A～22Cに示されるように、三重特異性抗体1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)のNSCLC細胞に対する結合は、JNJ372アナログのものよりも良好であった。

【0449】

実施例22. JNJ372アナログおよび1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)を用いてEGFR/EGF遮断を判定するための競合結合アッセイ

三重特異性抗体1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)が、EGFとEGFRとの間の相互作用を遮断することができるかどうかを判定するために、フローサイトメトリーアッセイを用いた。EGFのビオチン化形態を、このアッセイのために調達した。NSCLC細胞（例えば、H1975、H1975.HGF、またはEGFR変異体C797S-BaF3細胞）を、10%FBSを補充したRPMI1640培地において、96ウェルプレートにプレーティングして（ 3×10^5 細胞/ウェル）、一晩培養した。細胞を、翌朝、1×PBSで3回洗浄した。洗浄後に、50 μ l体積における所望の濃度の抗体（2×）を添加した（ 2.04×10^{-4} nM～400 nM）。その後（洗浄せずに）、50 μ lのビオチン化EGF（有効濃度2 μ g/ml；作業濃度4 μ g/ml）を、各ウェルに添加し、続いて45分間インキュベートした。続いて、細胞を、FACS緩衝液で2回、およびダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）で1回洗浄した。50 μ lのAccutase（商標）細胞剥離液を、各ウェルに添加し、プレートを、37℃で5～7分間インキュベートした。50 μ lの培地またはFACS緩衝液を添加することによって、Accutase（商標）細胞剥離液を中和した。ウェルの内容物を、V底96ウェルプレート中に注意深く移した。細胞を、FACS緩衝液で3回洗浄した。二次抗体（ストレプトアビジンコンジュゲート-PE；1：500希釈）を、プレートの各ウェルに添加し、次いで、プレートを、30～45分間インキュベートした。インキュベーション後に、プレートを、FACS緩衝液で3回洗浄した。細胞を、最後にFACS緩衝液に再懸濁し、フローサイトメーターにおいて解析して、試験試料によるEGF/EGFR遮断を定量した。

【0450】

図23A～23Cに示されるように、1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)は、様々な細胞モデルにおいて、JNJ372アナログよりも有意に良好なEGF/EGFR遮断能力を示した。

【0451】

実施例23. JNJ372アナログおよび1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)を用いてcMET/HGF遮断を判定するための競合結合アッセイ

三重特異性抗体1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)が、HGF（肝細胞増殖因子）とcMETとの間の相互作用を遮断することができるかどうかを判定するために、フローサイトメトリーアッセイを用いた。HGFを、標準的なビオチン化キット（Pierce、Invitrogen）を用いてビオチン化した。NSCLC細胞（H1975またはH1975.HGF）を、10%FBSを補充したRPMI1640培地において、96ウェルプレートにプレーティングして（ 3×10^5 細胞/ウェル）、一晩培養した。細胞を、翌朝、1×PBSで3回洗浄した。洗浄後に、50 μ l体積における所望の濃度の抗体（2×）を添加した（ 2.04×10^{-4} nM～400 nM）。その後（洗浄せずに）、50 μ lのビオチン化HGF（有効濃度5 nM）を、各ウェルに添加し、続いて45分間インキュベートした。続いて、細胞を、FACS緩衝液で2回、およびDPBS（ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水）で1回洗浄した。50 μ lのAccutase（商標）細胞剥離液を、各ウェルに添加し、プレートを、37℃で5～7分間インキュベートした。50 μ lの培地またはFACS緩衝液を添加することによって、Accutase（商標）細胞剥離液を中和した。ウェルの内容物を、V底96ウェルプレート中に注意深く移した。細胞を、FACS緩衝液で3回洗浄した。二次抗体（ストレプトアビジンコンジュゲート-PE；1：500希釈）を、プレートの各ウェルに添加し、プレートを、30～45分間インキ

ュベートした。インキュベーション後に、プレートを、FACS緩衝液で3回洗浄した。細胞を、最後にFACS緩衝液に再懸濁し、フローサイトメーターにおいて解析して、試験試料によるEGF/EGFR遮断を定量した。

【0452】

図24A~24Bに示されるように、1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)は、H1975において、JNJ372アナログよりも良好なHGF/cMET遮断能力を示した。

【0453】

実施例24. 1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)は、pMETを低減させることおよびEGFRを分解することによって、cMETおよびEGFRの下流シグナル伝達を調節する

H1975、H1975.HGF、およびC797S-BaF3細胞を用いて、cMETおよびEGFRの下流シグナル伝達に対する効果を研究した。NCI-H1975細胞は、MET遺伝子の増幅に加えて、EGFR TKIに対する耐性を付与する、EGFRの一次活性化変異および二次活性化変異を有するヒトがん細胞株に相当する。これらの細胞株において、EGFRおよびcMetのリガンドである、それぞれEGFおよびHGFは、EGFRおよびcMet受容体のリン酸化を誘導し、これは、ERKおよびAktタンパク質のリン酸化を通して下流シグナル伝達を刺激する。C797Sは、処置不能のEGFR点変異C797Sを有する細胞株に相当する。

【0454】

三重特異性抗体1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)が、c-MetおよびEGFRの活性化、ならびにAktおよびErkのリン酸化を阻害することができるかどうかを判定するために、NCI-H1975細胞を、6ウェルプレート上にプレーティングした(3×10⁵細胞/ウェル)。次の朝に、H1975細胞を、完全培地において66時間、抗体で処理し、0.5% FBSを含む培地において6時間、血清飢餓状態にし、次いで、HGFで15分間刺激した。H1975-HGF細胞は、完全培地において48時間、抗体で処理し、次いで、さらに24時間、新鮮な抗体で処理した。C797S-BaF3細胞は、完全培地において24時間、抗体で処理した。

【0455】

細胞を、氷冷PBSで2回洗浄し、次いで、プロテアーゼ阻害剤(MedChemExpress、カタログ番号HY-K0010)およびホスファターゼ阻害剤カクテル(Research Products International、カタログ番号P52100)を含有する、0.25 mlの1×細胞溶解緩衝液(Cell Signaling Tech、カタログ番号9803)において溶解させた。細胞溶解物を、収集して、15000 g、4℃で15分間遠心分離した。澄んだ溶解物を、等体積の2×SDS試料緩衝液と混合して、100℃で15分間煮沸した。試料を、SDS-PAGEで分離し、PVDF膜に転写し、5%脱脂乾燥乳でブロッキングした。EGFR、c-Met、Akt、およびErkのリン酸化を、それぞれ、抗ホスホ-EGFR(Y1173)(R&D Systems、カタログ番号AF1095)、抗ホスホ-c-Met(Cell Signaling Tech、カタログ番号AF2480)、抗ホスホ-Akt(Cell Signaling Tech、カタログ番号4060S)、および抗ホスホ-Erk(Cell Signaling Tech; カタログ番号4377S)抗体で検出した。総EGFR、c-Met、Akt、およびErkは、それぞれ、抗EGFR(BioLegend、カタログ番号617502)、抗c-Met(Cell Signaling Tech、カタログ番号3148S)、抗Akt(Cell Signaling Tech、カタログ番号2920S)、および抗Erk(Cell Signaling Tech、カタログ番号9107S)抗体で検出した。

【0456】

図25Aに示されるように、1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)は、HGF処理したH1975細胞におけるEGFRの分解において、JNJ372アナログよりも有効であった。同様に、HGF発現H1975細胞において、三重特異性抗体は、EGFR分解の媒介およびp-METの阻害において、JNJ372アナログよりも有効であった(図25B)。加えて、それは、EGFRならびにその下流分子(AktおよびErk)の劇的な分解を誘導した(図25C)。これらの結果により、1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)が、cMet/EGFRシグナル伝達経路の阻害において、JNJ372アナログよりも有効であることが示唆される。

【0457】

10

20

30

40

50

実施例25. 1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)はNSCLC細胞株の細胞増殖を阻害するcMETおよびEGFRのそれぞれのリガンドに対する結合は、細胞の増殖および生存につながる。これは、cMETおよびEGFRのリガンド結合からの下流経路の活性化にตอบสนองして惹起される。これを評価するために、様々ながん細胞（H1975、H1975.HGF、およびC797S-BaF3）を、10% FBSを補充したRPMI1640培地において、96ウェルプレートにプレーティングし（ 3×10^5 細胞/ウェル）、37℃で培養した。続いて、細胞を、一連の濃度の1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)およびJNJ372アナログ（ 2.04×10^{-4} nM～400 nM）で処理し、37℃のインキュベーターにおいて72時間保持した。Cell-Titer Glo（Promega, Madison WI）キットを用いて、発光の検出を通して、製造業者の説明書に従って、増殖に対する効果を評価した。

10

【0458】

図26A～26Cに示されるように、1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)は、NSCLCがん細胞増殖の阻害において、JNJ372アナログよりも有効であった。

【0459】

実施例26. JNJ372アナログおよび1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)抗体の内部移行の検討

JNJ372アナログおよび1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)抗体の内部移行を検討するために、様々な細胞株を用いた（H1975、H1975.HGF、C797S-BaF3、およびEGFR挿入変異体D770-BaF3）。細胞を、100 μ LのRPMI 1640培地（10% FBSを補充）において、96ウェルプレートにプレーティングし（ 3×10^4 細胞/ウェル）、37℃および5% CO₂でインキュベートした。付着細胞は、一晚インキュベートし、一方、浮遊細胞（C797S-BaF3およびD770-BaF3）は、処理の日にプレーティングした。続いて、細胞を、50 μ LのRPMI 1640培地（10% FBSを補充）における一連の濃度の1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)およびJNJ372アナログ（ 2.04×10^{-4} nM～400 nM）で処理し、37℃、5% CO₂で20～30分間インキュベートした。その後、pHrodo（商標）標識二次Ab（AffiniPureヤギ抗ヒトIgG, Fc γ ；カタログ番号109005008）（50 μ l、10 μ g/ml）を、細胞に添加して、37℃、5% CO₂で20時間インキュベートした。受容体の内部移行を定量するために、付着細胞は、Accutase（商標）細胞剥離液を用いて剥離し、一方、浮遊細胞は、直接用いた。細胞を、FACS緩衝液で4回洗浄し、最後に同じ緩衝液に再懸濁し、PEチャンネルを用いてFACSによって解析した。

20

30

【0460】

図27A～27Dに示されるように、1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)は、ほとんどのNSCLC細胞における抗体内部移行において、JNJ372アナログよりも有効であった。

【0461】

実施例27. JNJ372アナログと比較した1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)についてのエフェクター機能の判定

1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)のエフェクター機能をJNJ372アナログと比較して判定するために、ADCC（抗体依存性細胞性細胞傷害）アッセイを、下記のように行った。具体的には、H1975.GFP.LucおよびHGFを安定に発現するH1975.GFP.Luc（H1975.GFP.Luc.HGF）を用いた。標的（がん細胞）対エフェクター（PBMC）の比は、1：10であり、すなわち、9000細胞の標的細胞を、90,000細胞のエフェクター細胞と混合した。がん細胞を、96ウェル平底プレートにおいて100 μ lの総体積で、PBMCおよび抗体と共にプレーティングした。プレートを、37℃で24時間インキュベートした。24時間後に、上清を収集して、96ウェルV底プレートに移した。平底プレート中の細胞を、PBSで洗浄した。Accutase（商標）細胞剥離液を用いて細胞を解離し、FBS含有RPMI培地を用いて、Accutase（商標）の効果を中和した。続いて、細胞を、平底プレートからV底プレートに移した。上清を伴う細胞を、遠心分離し、FACS緩衝液で3回洗浄した。最終洗浄後に、7AAD（Invitrogen）を、1：50の最終希釈になるように添加した。細胞を、暗所で20分間インキュベートし、次いで、プレートを、蛍光の検出に用いられるPerCPチャンネルでフローサイトメーターにかけた。

40

50

【0462】

図28A～28Bに示されるように、1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)は、H1975 GFP.Luc細胞におけるADCCにおいて、JNJ372アナログに匹敵しており、一方、H1975 GFP.Luc.HGF細胞においては、JNJ372アナログがより良好であった。

【0463】

実施例28．H1975+Balb/c NU/NUインビボモデルにおける4アーム効力試験

JNJ372アナログを参照して三重特異性抗体1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)の腫瘍阻害についての効果を評価するために、Balb/c NU/NUマウスに対する試験を、以下のように行った。各マウスに、腫瘍の発生のために、0.1 mLの1：1無血清培地：マトリゲルミックス中のH1975腫瘍細胞 (5.0×10^6) を、右側腹部に皮下注射した。平均腫瘍サイズが、およそ100 mm³ (例えば、75～125 mm³) に達した時に、腫瘍を有する動物を、試験群に無作為に登録した。各群は、3～4匹のマウスで構成された。処置を開始した日を、0日目として表し、各群における動物を、図29A～29Cに記載されるように処置した。

【0464】

結果により、1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)は、H1975移植Balb/cマウスモデルにおいて、JNJ372アナログのものと比較して、より良好ながん細胞殺傷効力を有することが示される。

【0465】

実施例29．H1975-Luc-GFP-HGF+BALB/c NU/NUインビボモデルにおける4アーム効力試験

HGF過剰発現細胞株において、JNJ372アナログを参照して三重特異性抗体1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)の腫瘍阻害についての効果を評価するために、Balb/c NU/NUマウスに対する試験を、以下のように行った。各マウスに、腫瘍の発生のために、0.1 mLの1：1無血清培地：マトリゲルミックス中のH1975-Luc-GFP-HGF腫瘍細胞 (5.0×10^6) を、右側腹部に皮下注射した。平均腫瘍サイズが、およそ100 mm³ (例えば、75～125 mm³) に達した時に、腫瘍を有する動物を、試験群に無作為に登録した。各群は、6匹のマウスで構成された。処置を開始した日を、0日目として表し、各群における動物を、図30A～30Cに記載されるように処置した。

【0466】

結果により、1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)は、H1975-Luc-GFP-HGF移植Balb/cマウスモデルにおいて、JNJ372アナログのものと比較して、類似したがん細胞殺傷効力を有することが示される。

【0467】

実施例30．細胞株C797S-BaF3の皮下異種移植片を有する雌NOGマウスにおける1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)の効力評価

エクソン20点変異細胞株C797S-BaF3において、JNJ372アナログを参照して三重特異性抗体1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)の腫瘍阻害についての効果を評価するために、NOGマウスのマウスに対する試験を、以下のように行った。各マウスに、腫瘍の発生のために、0.1 mLの1：1無血清培地：マトリゲルミックス中のC797S-BaF3腫瘍細胞 (10.0×10^6) を、右側腹部に皮下注射した。平均腫瘍サイズが、およそ100 mm³ (例えば、75～125 mm³) に達した時に、腫瘍を有する動物を、試験群に無作為に登録した。各群は、6匹のマウスで構成された。処置を開始した日を、0日目として表し、各群における動物を、図31A～31Cに記載されるように処置した。

【0468】

結果により、1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)は、C797S-BaF3移植NOGマウスモデルにおいて、JNJ372アナログのものと比較して、匹敵するがん細胞殺傷効力を有することが示される。

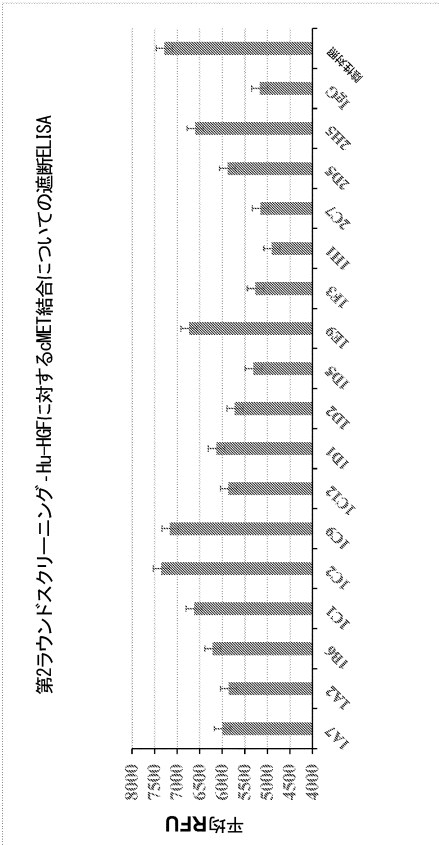
【0469】

他の態様

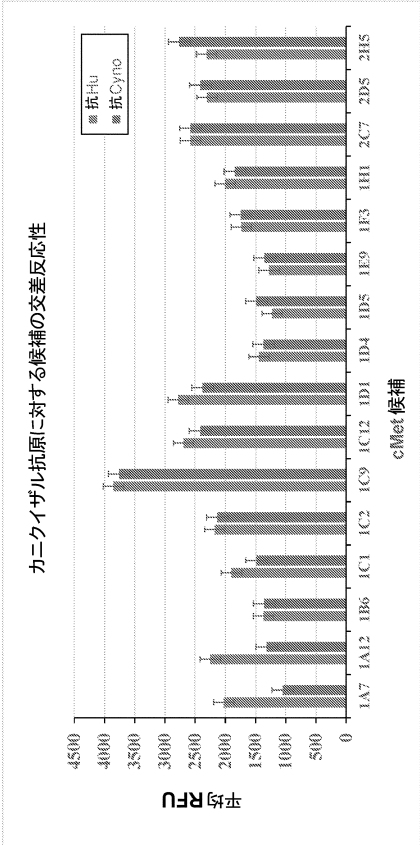
本発明を、その詳細な説明と併せて説明してきたが、前述の説明は、添付の特許請求の範囲の範囲によって定義される本発明の範囲を例示し、それを限定しないように意図されることが、理解されるべきである。他の局面、利点、および改変が、添付の特許請求の範囲の範囲内にある。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

20

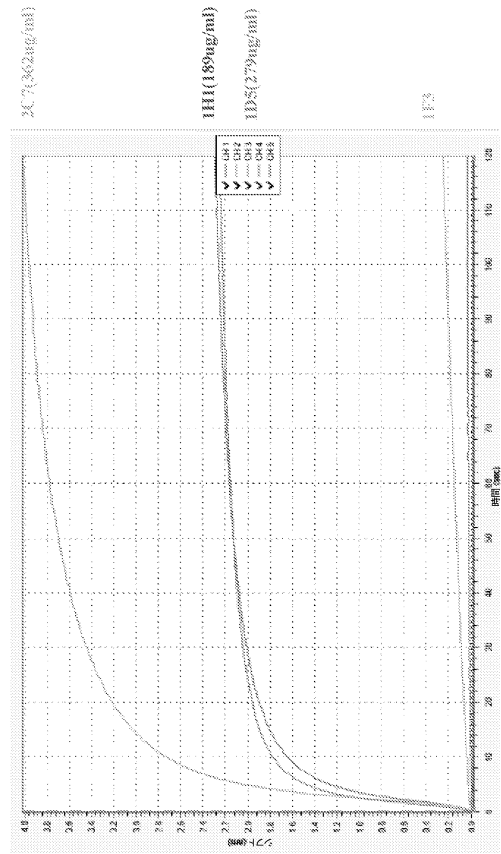
30

40

50

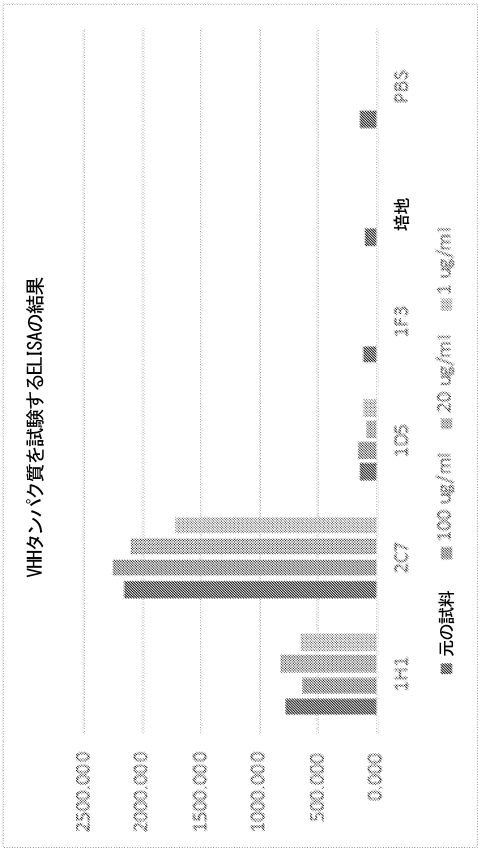
【図 3】

バイオレイヤー干渉法による cMET VHH-Fc 発現



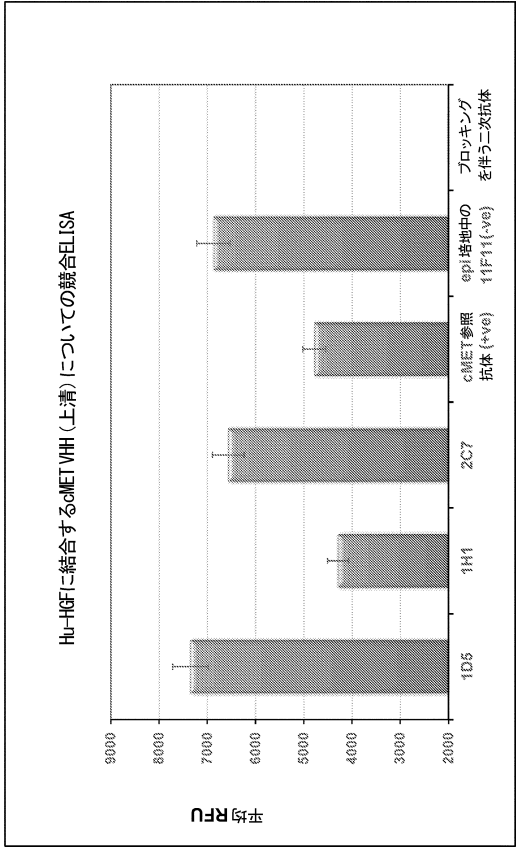
【図 4】

VHHタンパク質を試験するELISAの結果

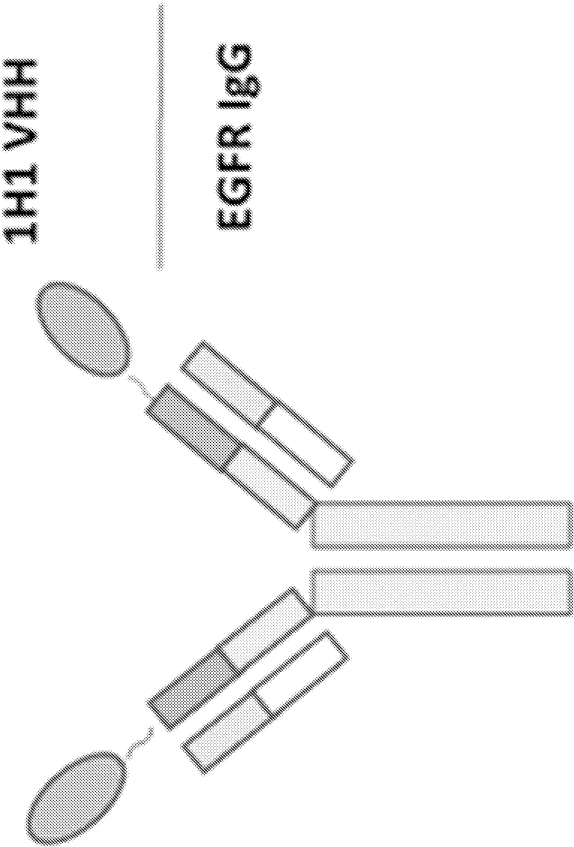


【図 5】

Hu-HGF に結合する cMET VHH (上清) についての競合 ELISA



【図 6】



10

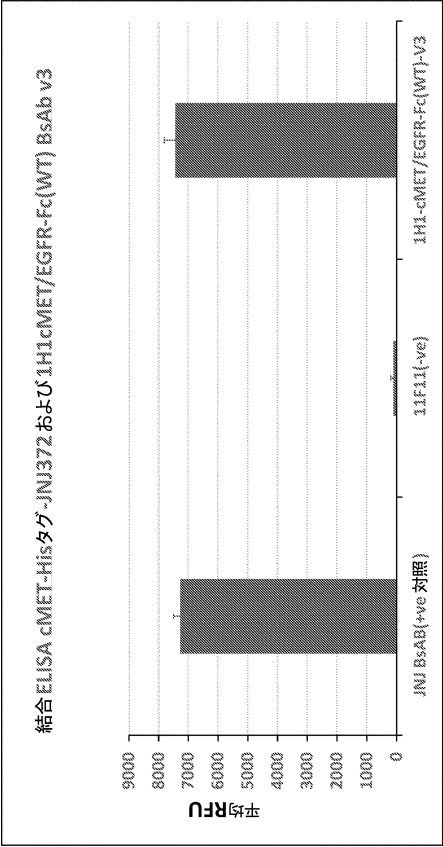
20

30

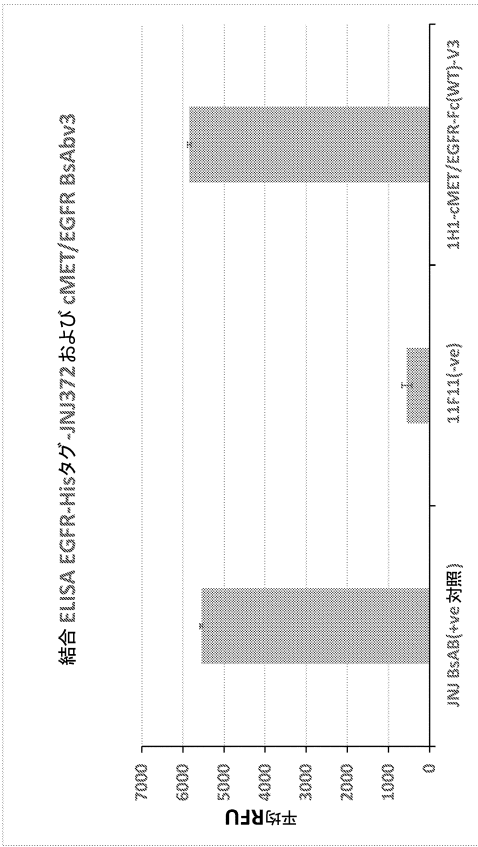
40

50

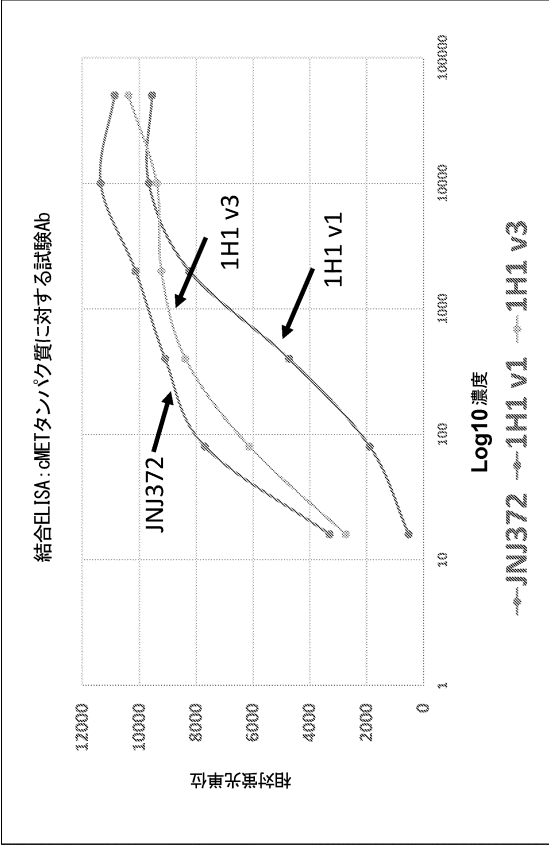
【 図 7 】



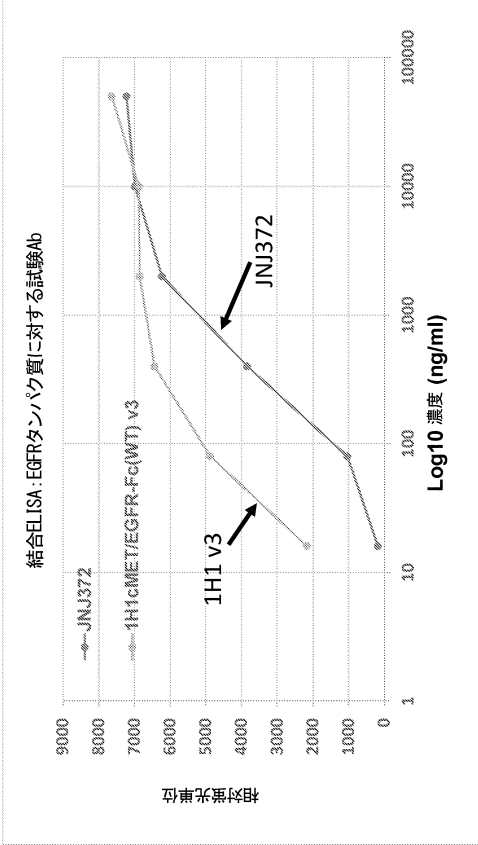
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



10

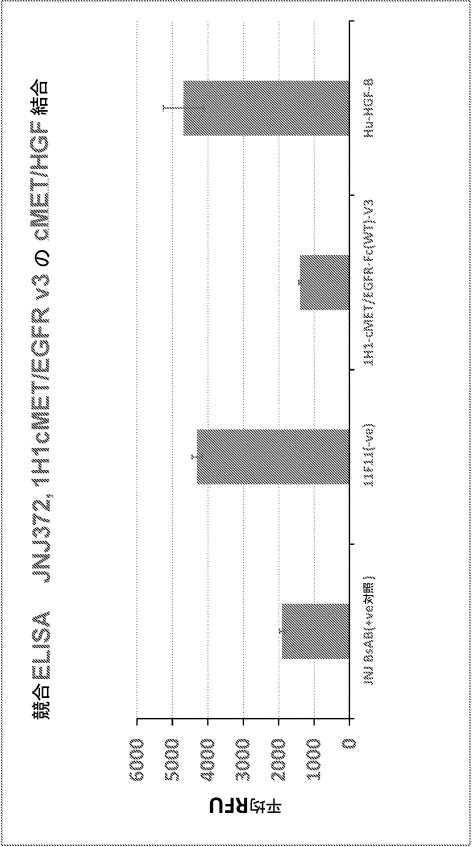
20

30

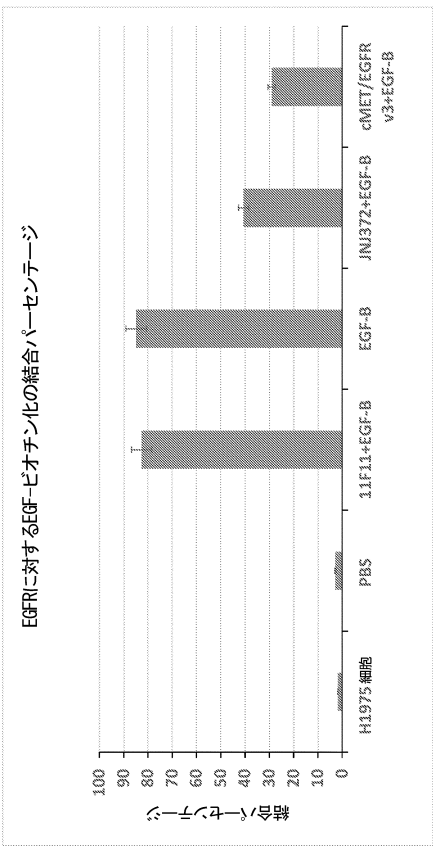
40

50

【図 1 1】

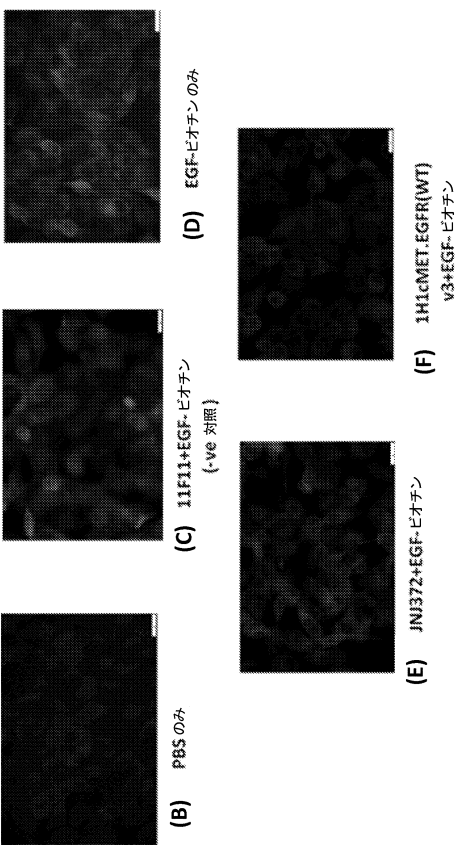


【図 1 2 - 1】

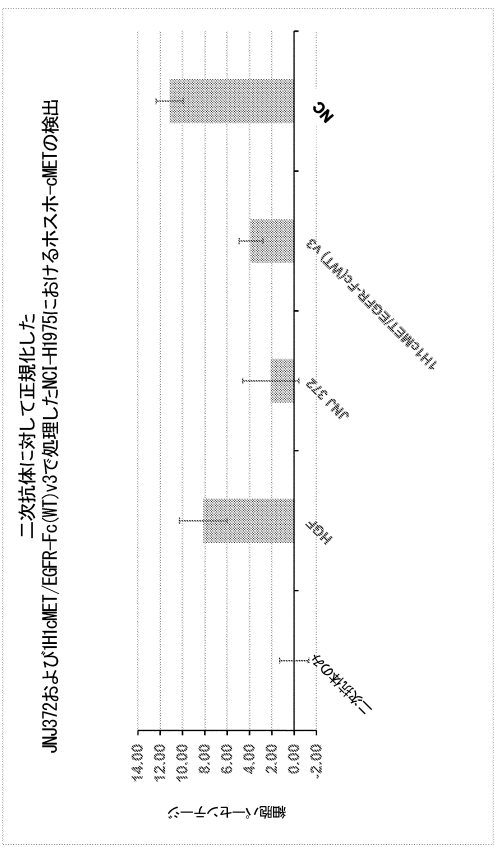


A

【図 1 2 - 2】



【図 1 3 A】



10

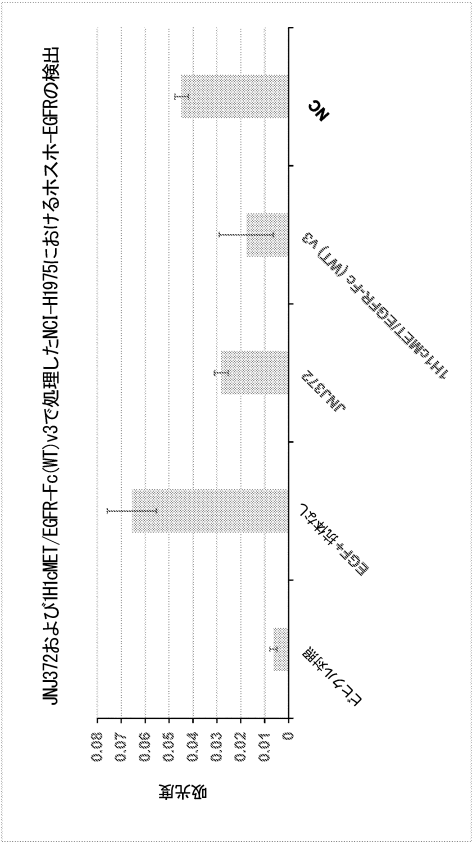
20

30

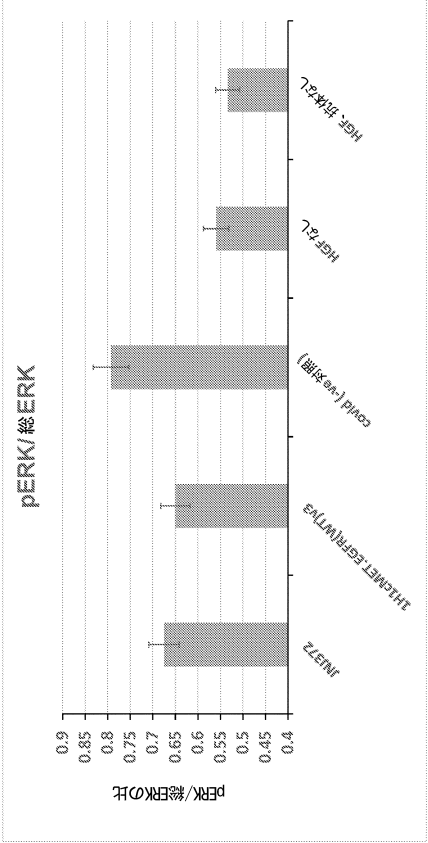
40

50

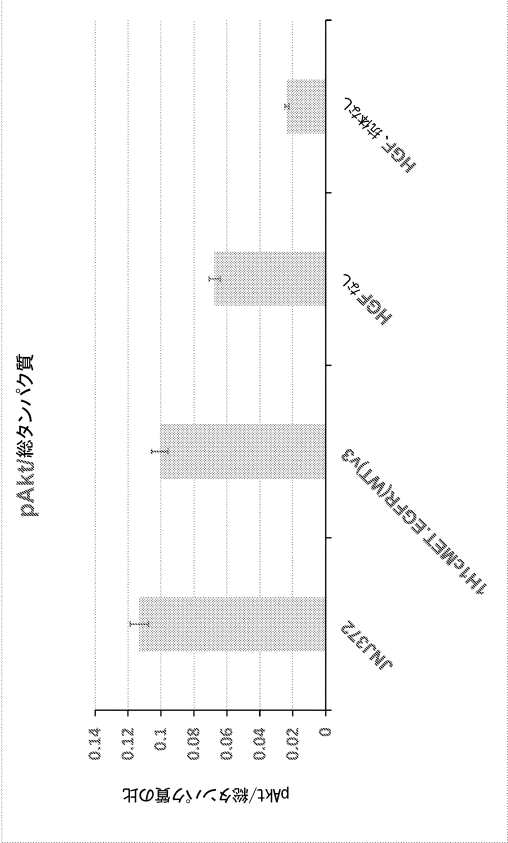
【図 1 3 B】



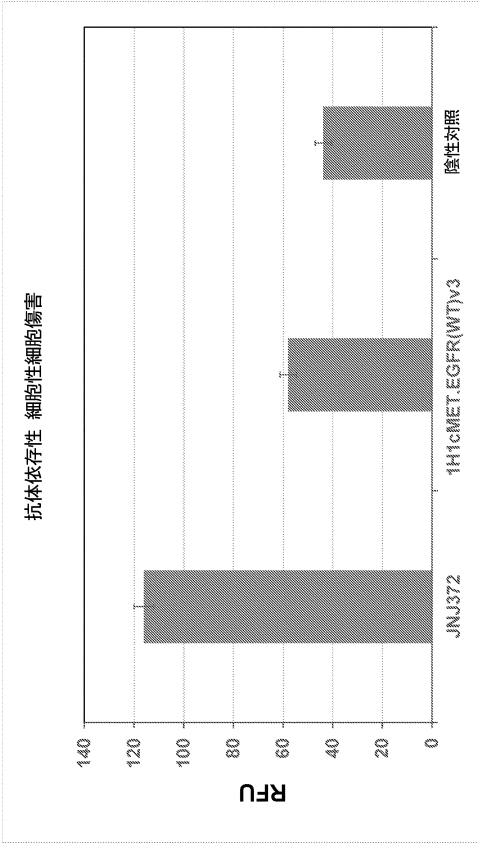
【図 1 4 A】



【図 1 4 B】



【図 1 5 A】



10

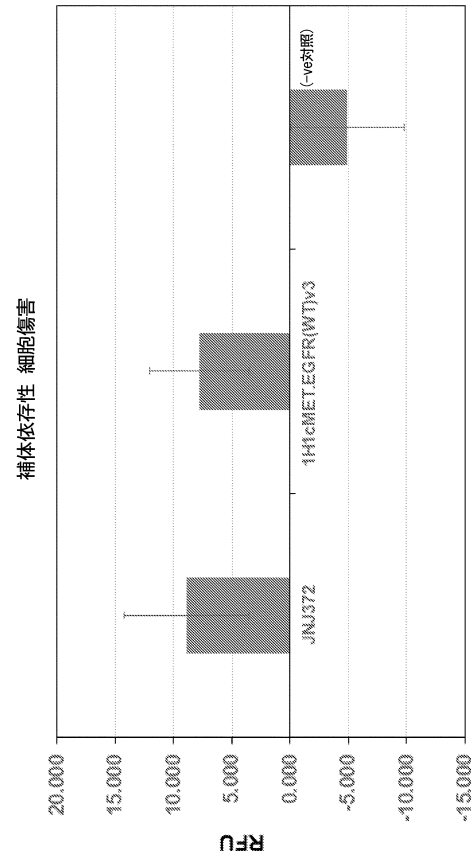
20

30

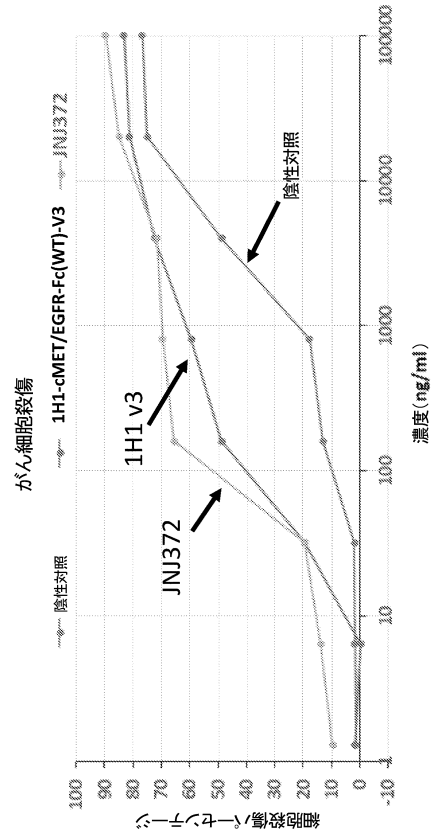
40

50

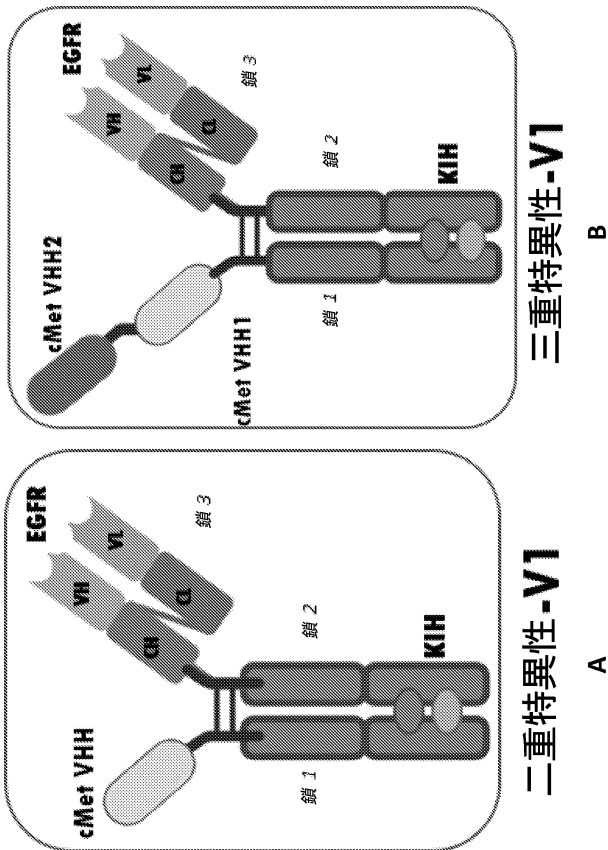
【図 1 5 B】



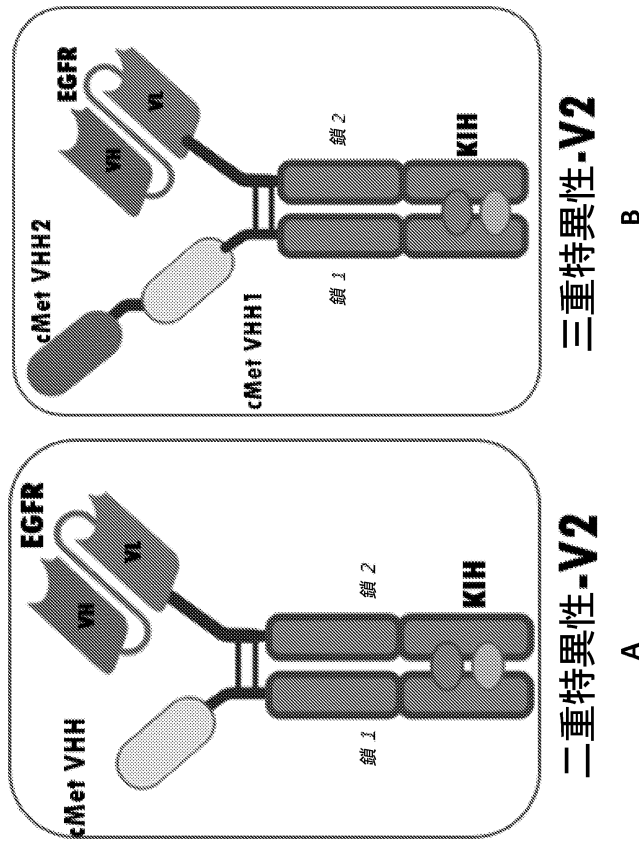
【図 1 5 C】



【図 1 6】



【図 1 7】



10

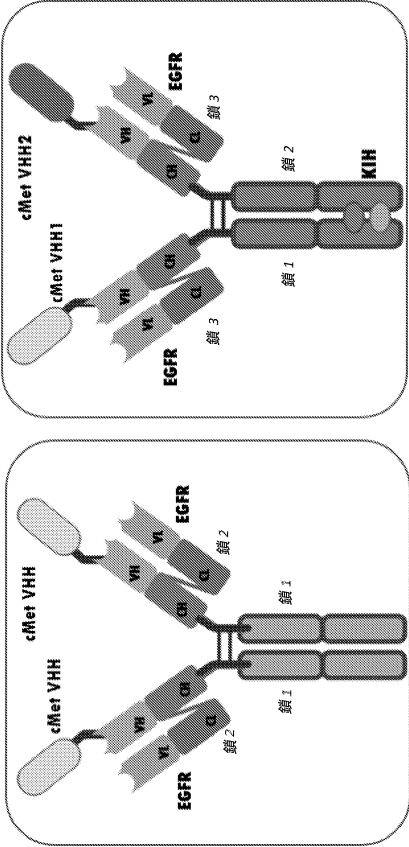
20

30

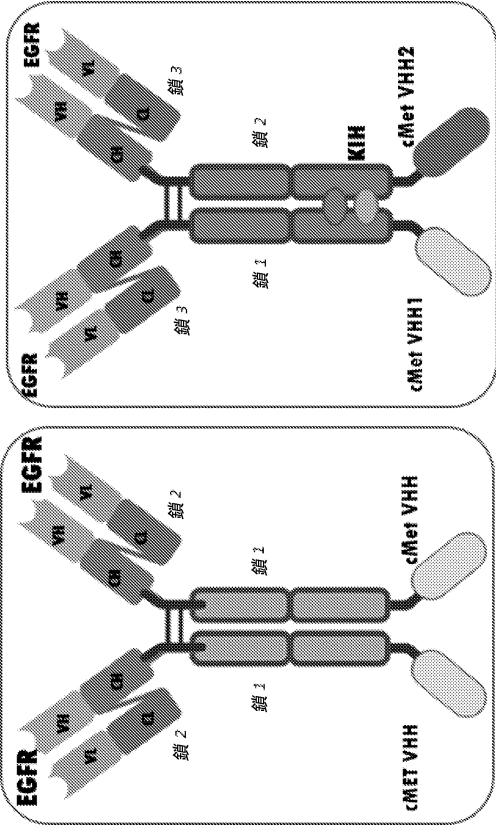
40

50

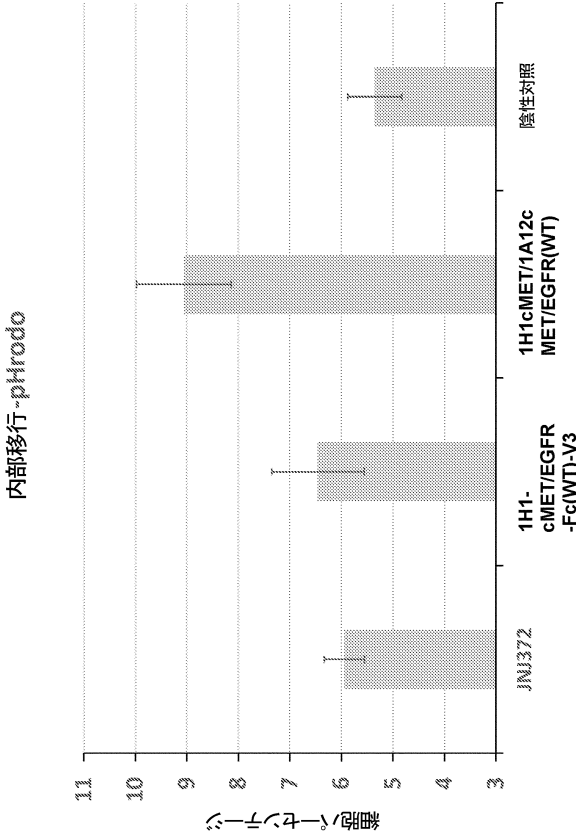
【図 18】



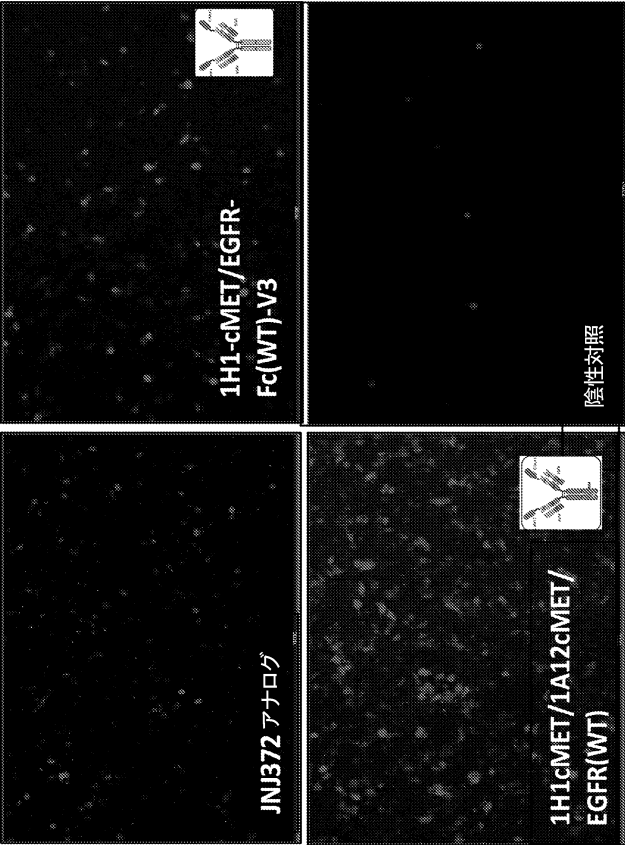
【図 19】



【図 20 A】



【図 20 B】



10

20

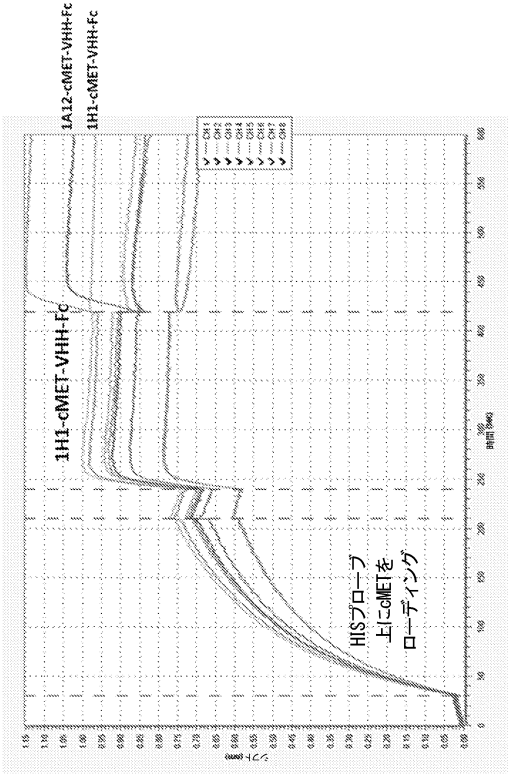
30

40

50

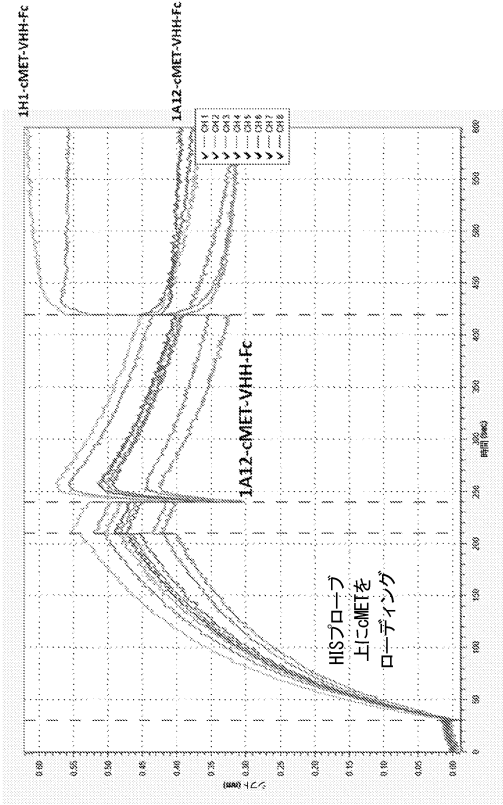
【図 2 1 A】

エピトープビンディングアッセイ：Probelife gator を用いた 1H1 および 1A12



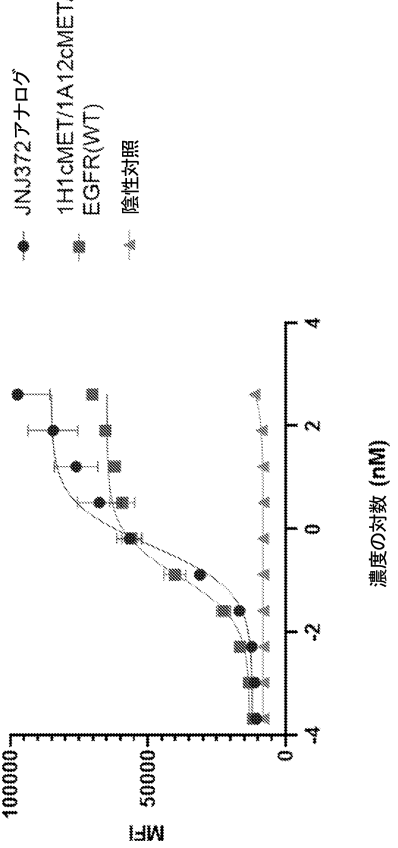
【図 2 1 B】

エピトープビンディングアッセイ：Probelife gator を用いた 1H1 および 1A12



【図 2 2 A】

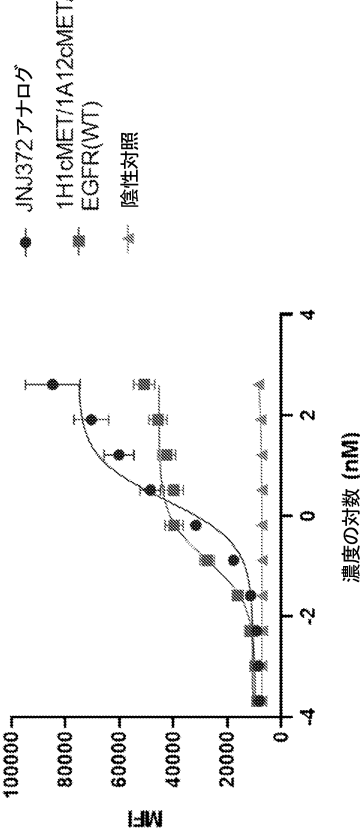
H1975 に対する結合



	JNJ372 アナログ	1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)	陰性対照
EC50 (nM)	0.4604	0.1204	11077

【図 2 2 B】

H1975.HGF に対する結合



	JNJ372 アナログ	1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)	陰性対照
EC50 (nM)	7.314	1.007	26.42

10

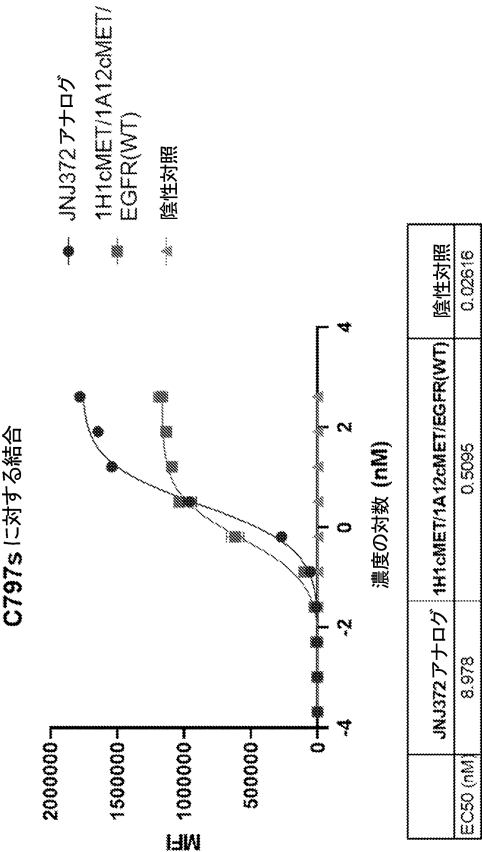
20

30

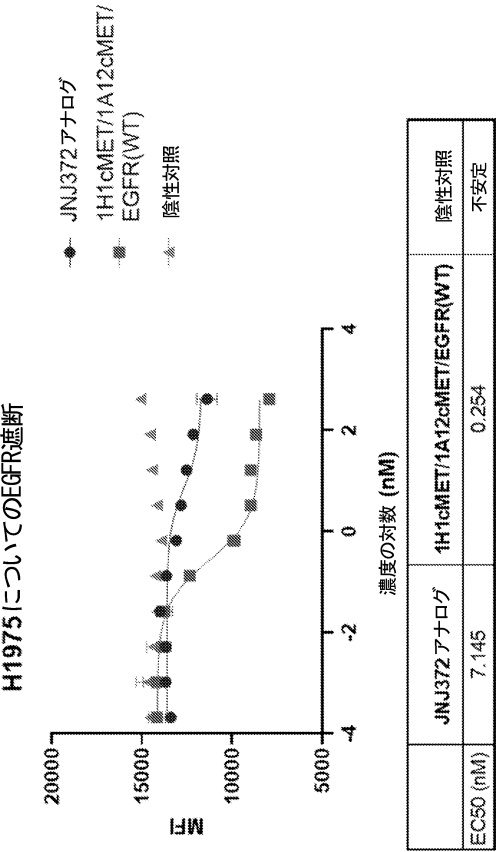
40

50

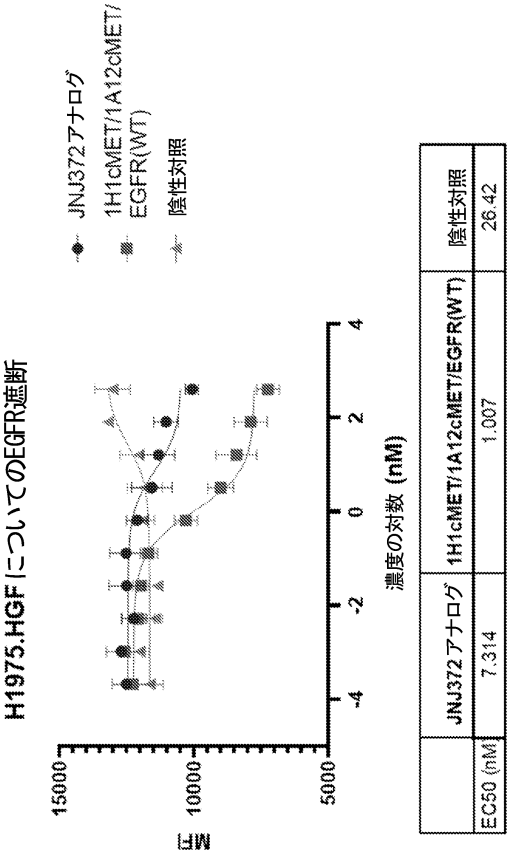
【図 2 2 C】



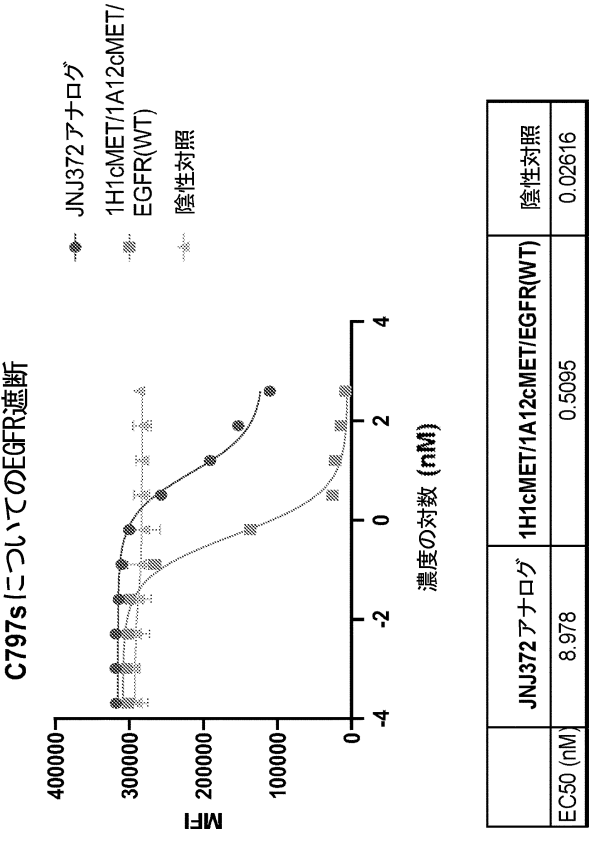
【図 2 3 A】



【図 2 3 B】



【図 2 3 C】



10

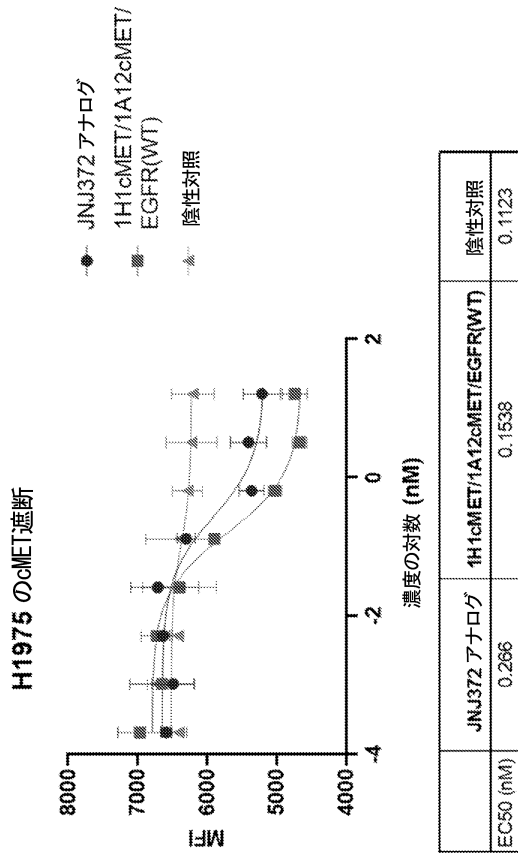
20

30

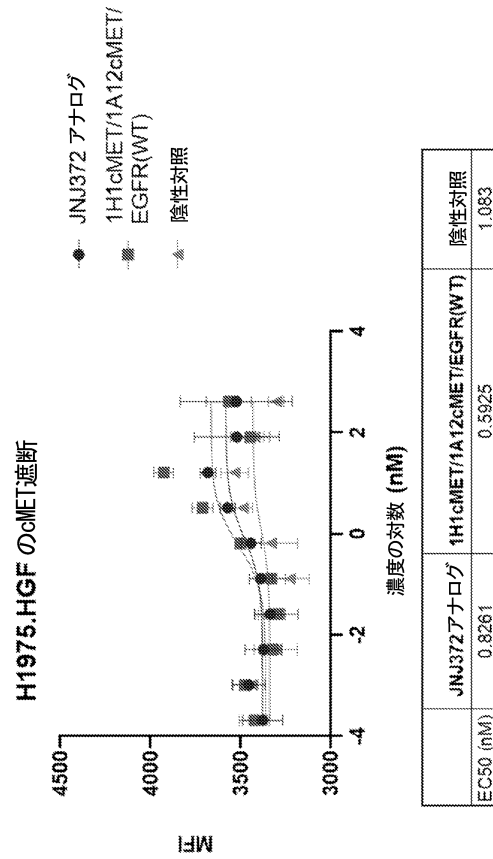
40

50

【図 2 4 A】

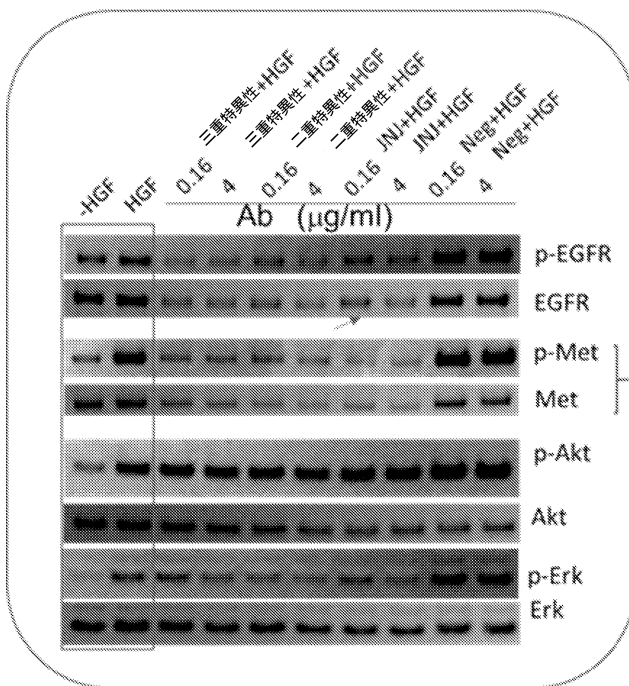


【図 2 4 B】



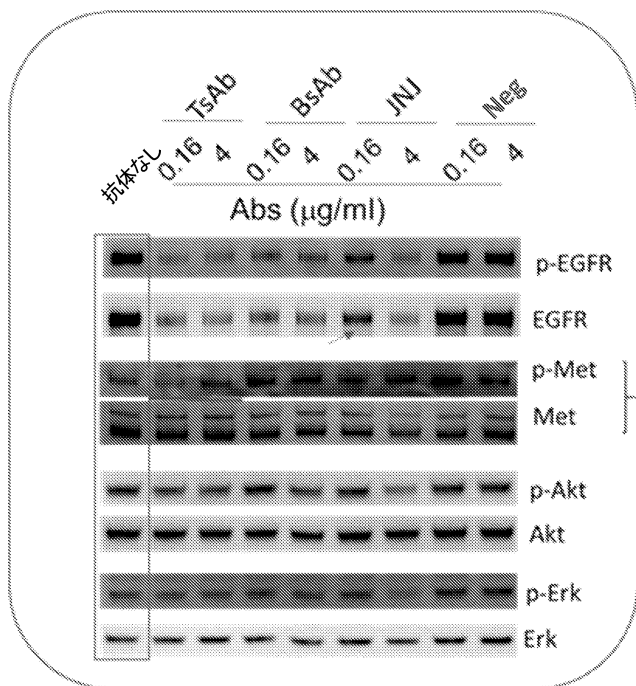
【図 2 5 A】

HGF-; HGF 添加



【図 2 5 B】

HGF+



10

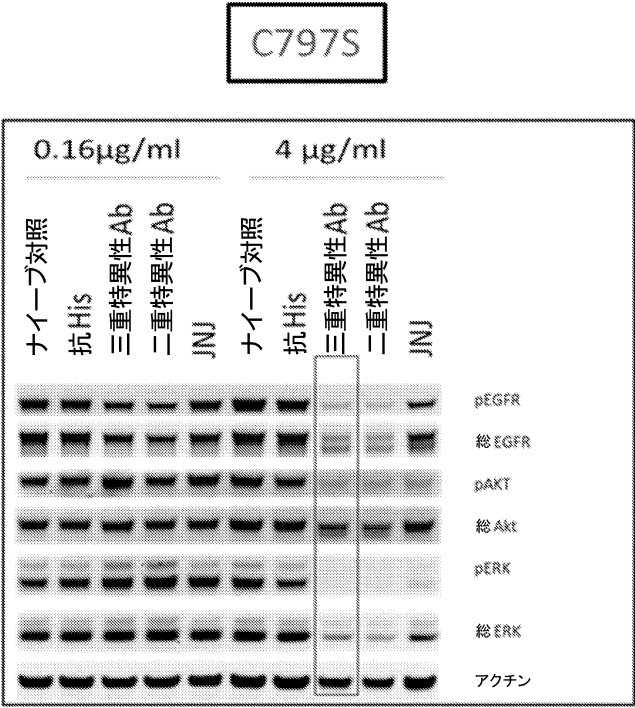
20

30

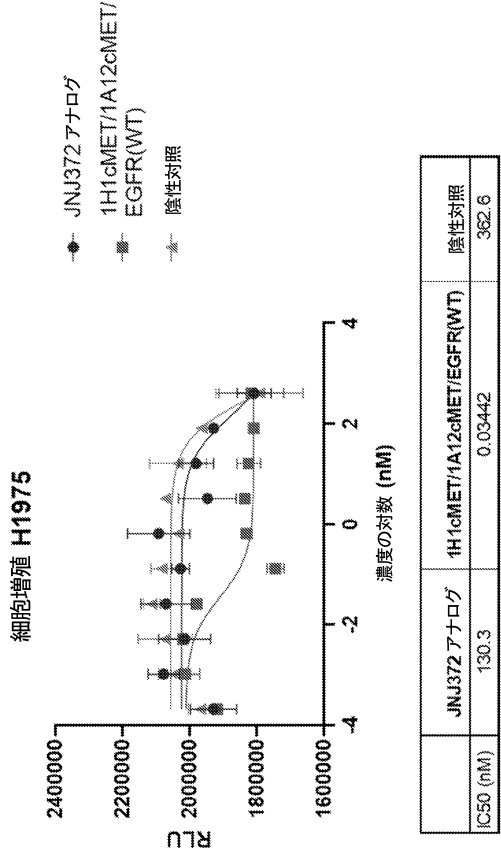
40

50

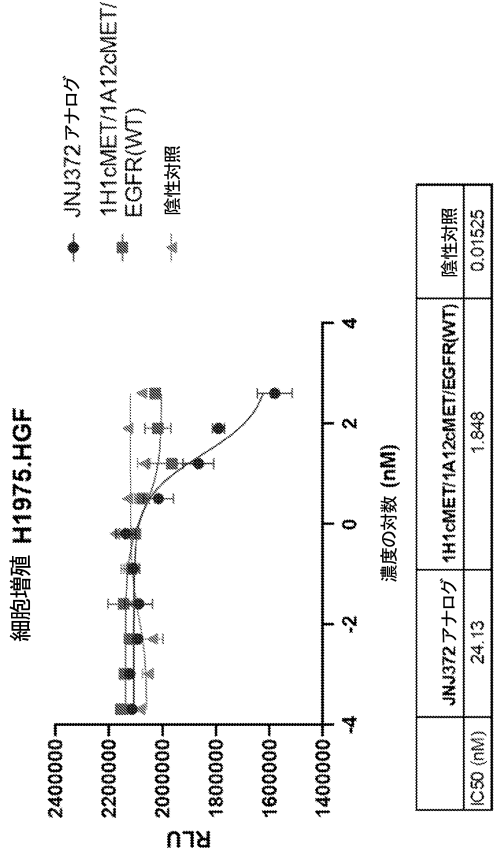
【図 2 5 C】



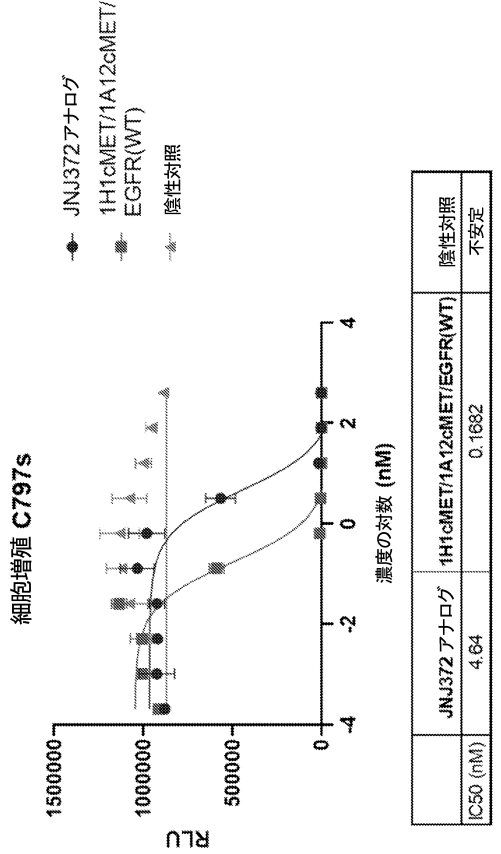
【図 2 6 A】



【図 2 6 B】



【図 2 6 C】



10

20

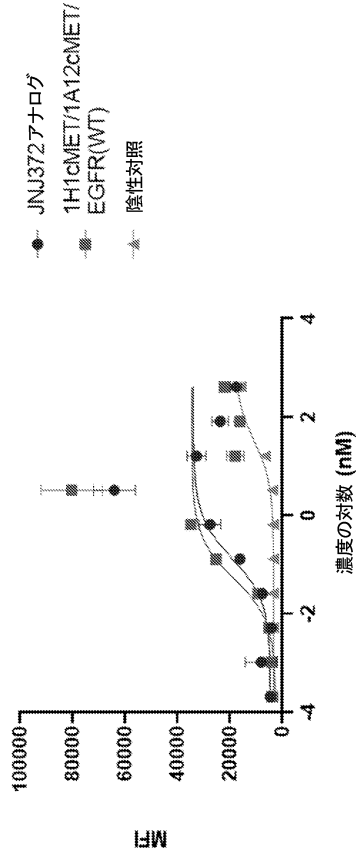
30

40

50

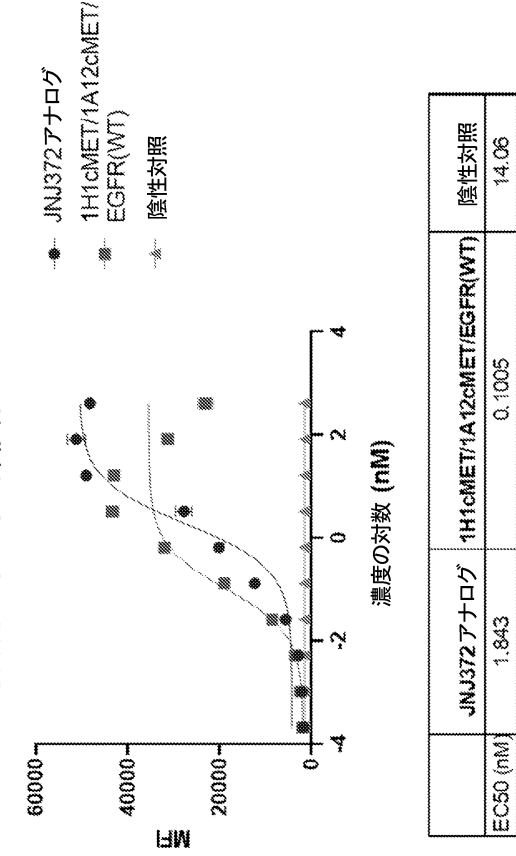
【図 2 7 A】

H1975 における内部移行



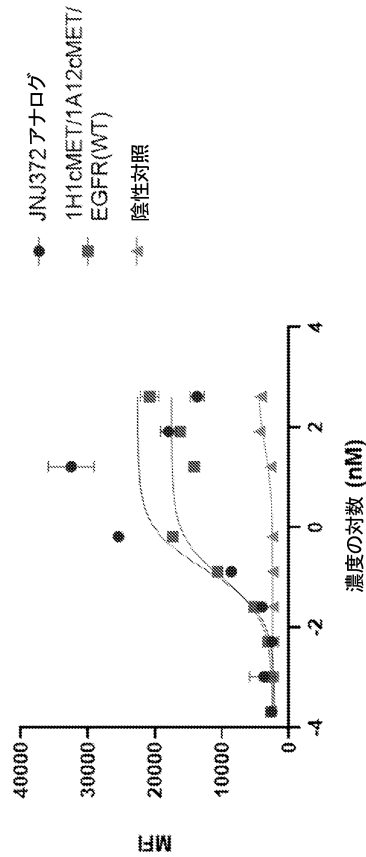
【図 2 7 B】

C797s における内部移行



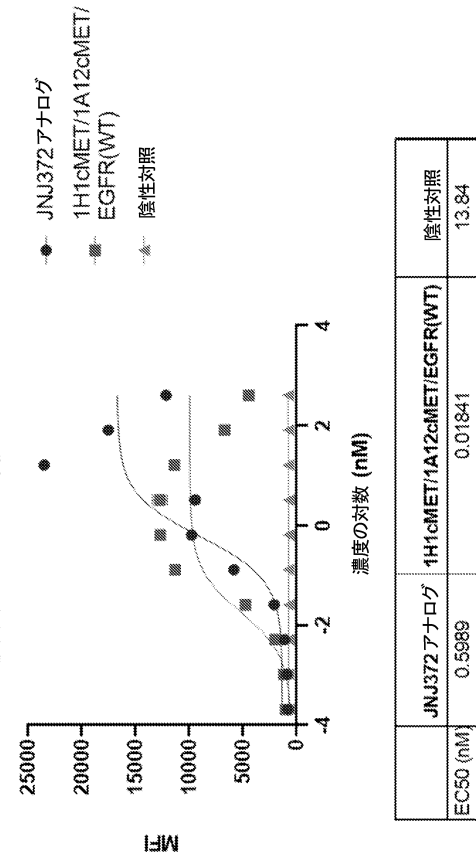
【図 2 7 C】

H1975.HGF における内部移行



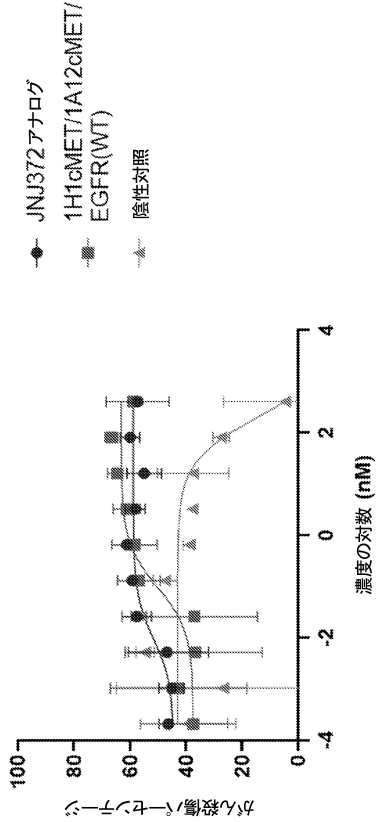
【図 2 7 D】

D770 における内部移行



【図 2 8 A】

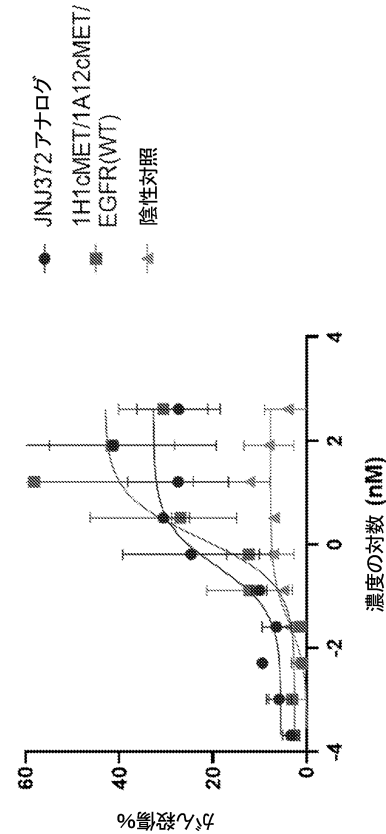
ADCC H1975 GFP LUC



	JNJ372 アナログ	1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)	陰性対照
IC50 (nM)	0.009306	0.09756	195.1

【図 2 8 B】

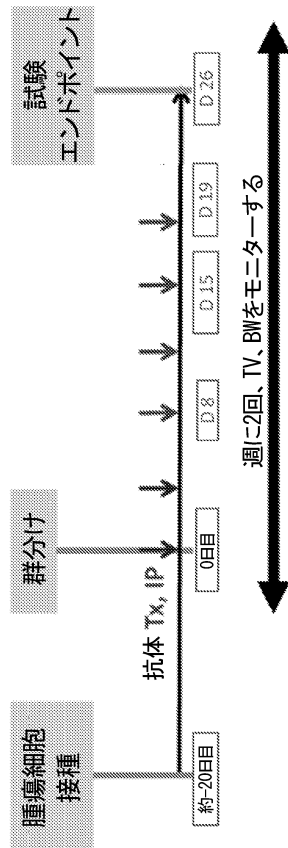
ADCC H1975 GFP LUC HGF



	JNJ372 アナログ	1H1cMET/1A12cMET/EGFR(WT)	陰性対照
IC50 (nM)	0.3709	1.313	0.03146

【図 2 9 A】

試験デザイン

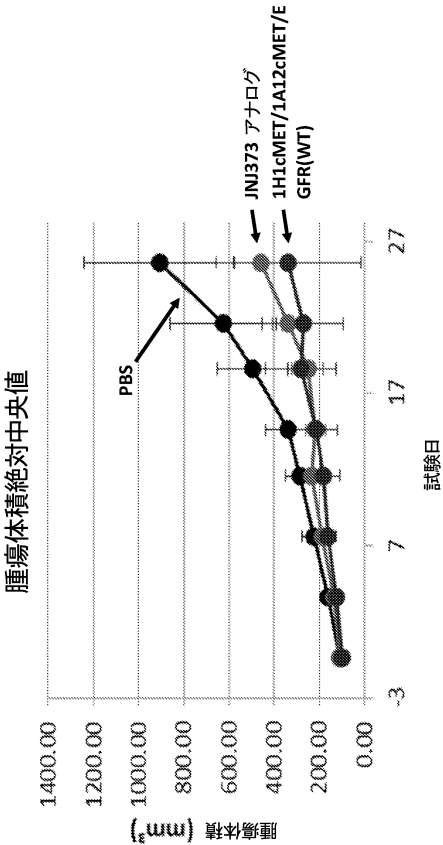


【図 2 9 B】

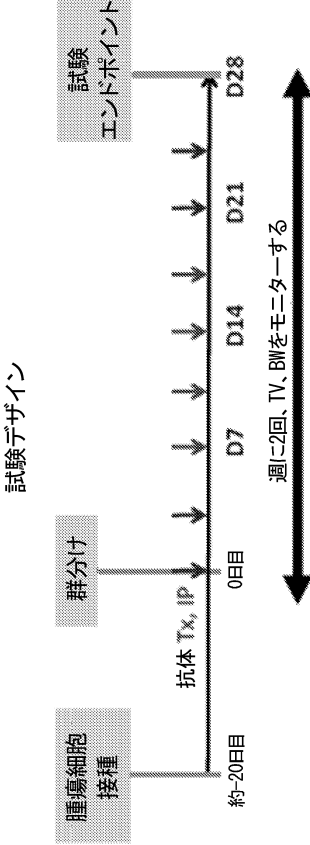
群の指定、用量レベル、および投与スケジュール

群	処置	N	用量 (mg/kg)	ROA	頻度	投与スケジュール ²
1	PBS	4	0	IP	BIW x8	0, 4, 8, 12, 15, 19
2	JNJ372 アナログ	3	10	IP	BIW x8	0, 4, 8, 12, 15, 19
3	1H1cMET/1A12cMET/ EGFR(WT)	3	10	IP	BIW x8	0, 4, 8, 12, 15, 19

【図 29 C】



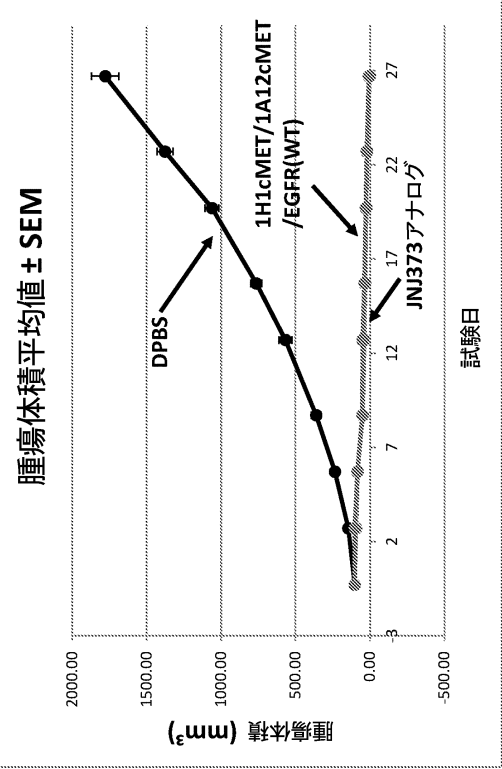
【図 30 A】



【図 30 B】

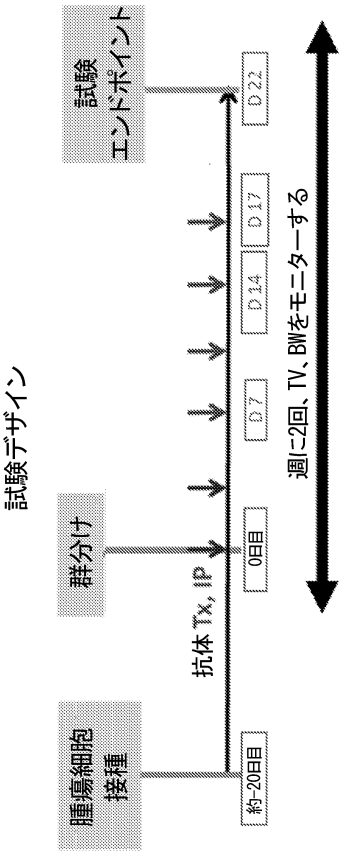
G	処置	N	用量 (mg/kg)	ROA	頻度	投与スケジュール*
1	DPBS	6	0	IP	BIW x8	0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24
2	JNJ372 アナログ	6	10	IP	BIW x8	0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24
3	1H1cMET/1A12cMET/EGFR (WT)	6	10	IP	BIW x8	0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24

【図 30 C】



群の指定、用量レベル、および投与スケジュール

【図 3 1 A】

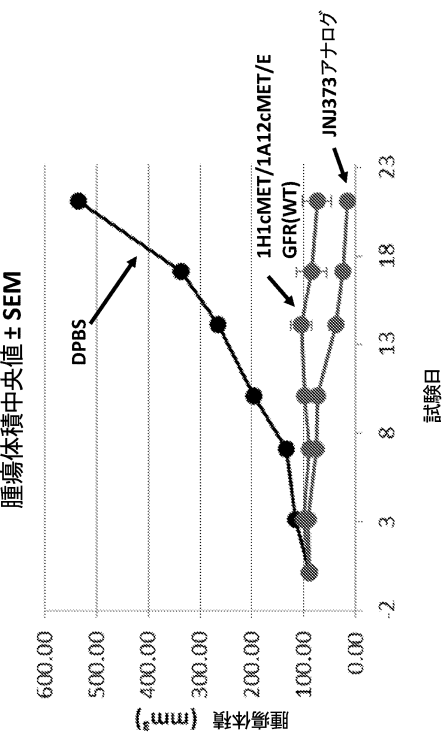


【図 3 1 B】

群の指定、用量レベル、および投与スケジュール

G	処置	N	用量 (mg/kg)	ROA	頻度	投与スケジュール ^a
1	DPBS	6	0	IP	BIW x8	0, 3, 7, 10, 14, 17
2	JNJ373アナログ	6	10	IP	BIW x8	0, 3, 7, 10, 14, 17
3	1H1cMET/1A12cMET/EGFR (WT)	6	10	IP	BIW x8	0, 3, 7, 10, 14, 17

【図 3 1 C】



【図 3 2】

抗体可変ドメイン	VHH CDR1	SEQ ID NO:	VHH CDR2	SEQ ID NO:	VHH CDR3	SEQ ID NO:
cMET-1H1のVHH	ASLFSINTMG	1	AI5WSGGNYATFARG	2	GADRWGTGSMNAPDY	3
cMET-1A12のVHH	GFTFNSYWMY	4	ATDTRGQNTYYTDSVKG	5	ALGNRWGTFPN	6
cMET-1E9のVHH	AFSGNFFNSYAMG	7	AI5RSGSLTYGDSVKG	8	AADRSGSYFLRSTEW	9
cMET-1F3のVHH	GFTFDFASIG	10	CINNNDGSIYYLDSVKG	11	AAVKRPGVDRHCYSIVAVRDYDMDY	12

10

20

30

40

50

【図 33】

抗体可変ドメイン	VH CDR1	SEQ ID NO:	VH CDR2	SEQ ID NO:	VH CDR3	SEQ ID NO:
EGFR VH	GFTFSTYGMH	13	VIWDDGSYKYYGDSVK G	14	ARDGITMVRGVMKDYF DY	15

【図 34】

抗体可変ドメイン	VL CDR1	SEQ ID NO:	VL CDR2	SEQ ID NO:	VL CDR3	SEQ ID NO:
EGFR VH	RASQDISSALV	16	DASSLES	17	QQFNYSYPLT	18

【図 35】

抗体可変ドメイン	アミノ酸配列	SEQ ID NO:
cMET-1H1 の VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLKSCAVS <u>ASLFS</u> INTMGWFRQPGKERE <u>FVA</u> IS WSGGNYATFARGRFTISSEDAKDTVYLQMDNLKPEDTAVYFC <u>ADRWGT</u> GSMNAPDYDYWGQGLTVTVSS	19
cMET-1A12 の VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTF</u> NSYWMYVWRLAPGKIEWVSA TDTRGONTYYTDSVKGRFTISRDNKNMVSLQMNNLKSEDTAVYYC <u>ALGNR</u> WGTFPNRPGTLTVTVSS	20
cMET-1E9 の VHH	QVQLVESVGGGLVQTGGSLTSCAFSGNFFNSYAMGWFRQAPGKERE <u>FVA</u> I SRSGLTYYGDSVKGRFTISRDNKNMTAYLQMNSLEPEDTAVYYC <u>AARRSG</u> SYELRSTEWQDYWGQGLTVTVSS	21
cMET-1F3 の VHH	QVQLVESGGGLVQAGGSVRLSCAAS <u>GFTF</u> DAFSIGWFRQAPGKERE <u>GVSC</u> I NNNDGSIYYLDSVKGRFTISRDNKNMTAYLQMNSLEPEDTAVYYC <u>AAVKRPG</u> VRDHCSIVAVRDYDMDYWGQGLTVTVSS	22
cMET-1H1-v1 のヒト化 VHH (hu1H1v1)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>ASLFS</u> INTMGWFRQAPGKERE <u>FVA</u> IS WSGGNYATFARGRFTISRDNKNMTVYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>GADRWG</u> TGSMNAPDYDYWGQGLTVTVSS	77
cMET-1H1-v2 のヒト化 VHH (hu1H1v2)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>ASLFS</u> INTMGWFRQAPGKERE <u>FVA</u> IS WSGGNYATFARGRFTISRDNKNMTVYLQMESLRAEDTAVYYC <u>GADRWGT</u> GSMNAPDYDYWGQGLTVTVSS	78
cMET-1H1-v2-1 のヒト化 VHH (hu1H1v2-1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>ASLFS</u> INTMGWFRQAPGKERE <u>FVA</u> IS WSGGNYATFARGRFTISSDDSKDTVYLQMESLRAEDTAVYYC <u>GADRWGT</u> GSMNAPDYDYWGQGLTVTVSS	79
cMET-1H1-v3 のヒト化 VHH (hu1H1v3)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS <u>ASLFS</u> INTMGWFRQPGKERE <u>FVA</u> IS WSGGNYATFARGRFTISRDNKNMTVYLQMESLRAEDTAVYFC <u>ADRWGT</u> GSMNAPDYDYWGQGLTVTVSS	80
cMET-1H1-v4 のヒト化 VHH (hu1H1v4)	QVQLVESGGGLVQPGGSLrLSCAVS <u>ASLFS</u> INTMGWFRQPGKERE <u>FVA</u> IS WSGGNYATFARGRFTISSDnsKhTVYLQMeSLraEDTAVYFC <u>ADRWGTGS</u> MNAPDYDYWGqGLTVTVSS	81
cMET-1F3-v1 のヒト化 VHH (hu1F3v1)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTF</u> DAFSIGWFRQAPGKERE <u>GVSC</u> IN NNDGSIYYLDSVKGRFTISRDNKNMTAYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>AAVKRPGV</u> RDHCYSIVAVRDYDMDYWGQGLTVTVSS	82
cMET-1F3-v2 のヒト化 VHH (hu1F3v2)	QVQLVESGGGLVQpGGSVRLSCAAS <u>GFTF</u> DAFSIGWFRQAPGKERE <u>GVSC</u> I NNNDGSIYYLDSVKGRFTISRDNsKNTAYLQMNSLraEDTAVYYC <u>AAVKRPG</u> VRDHCSIVAVRDYDMDYWGqGLTVTVSS	83
cMET-1H1-v5 のヒト化 VHH (hu1H1v5)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>ASLFS</u> INTMGWFRQAPGKERE <u>FVA</u> IS WSGGNYATFARGRFTISSDSKDTVYLQMESLRAEDTAVYYC <u>GADRWGTG</u> SMNAPDYDYWGQGLTVTVSS	84

【図 36】

抗体可変ドメイン	アミノ酸配列	SEQ ID NO:
EGFR VH	QVQLVESGGGVQPGRSLRLSCAAS <u>GFTF</u> STYGMHWVRQAPGKLEWVAVI WDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDNsKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARDGITMV</u> RGVMKDYFDYWGQGLTVTVSS	23
EGFR VL	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISSALVWYQKPGKAPKLLIY <u>DASSLES</u> GVPSRFSGSESGDTFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQFN</u> SYPLTFGGGKVEIK	24

10

20

30

40

50

【図 37-1】

Fc-ヒンジ配列-1 (SEQ ID NO: 25)
EPKSCDKTHTCPPCP

Fc-ヒンジ配列-2 (SEQ ID NO: 26)
GGGSDKTHTCPPCP

Fc-ヒンジ配列-3 (SEQ ID NO: 27)
EPKSSDKTHTCPPCP

Fc-ヒンジ配列-4 (SEQ ID NO: 28)
DKTHTCPPCP

Fc-ヒンジ配列-5 (SEQ ID NO: 29)
STMVRSDKTHTCPPCP

Fc-ノブ (SEQ ID NO: 30)
APELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPYREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

Fc-ホール (SEQ ID NO: 31)
APELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

Fc-WT (SEQ ID NO: 32)
APELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

重鎖 CH1 (SEQ ID NO: 33)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

軽鎖常定ドメイン (CL) (SEQ ID NO: 34)
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPTKSFNRGEC

ヒト IgG1 CH2-V1 (SEQ ID NO: 35)
APELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

ヒト IgG1 CH2-V2 (SEQ ID NO: 36)
APELLGGPDVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKAK

【図 37-3】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
GGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPYREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

二重特異性-V1形式でのdMET/EgFR B_sAbの鎖3 (EgFR-LC)
(SEQ ID NO: 47)
AIQLTQSPSSLASVGDRTVITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIDASSLESQVPSRFSGSESGDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTYPLTGGGKTVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPTKSFNRGEC

三重特異性-V1形式でのdMET/EgFR T_sAbの鎖1 (IH1-リンカー-1A12; V1)
(SEQ ID NO: 48)
QVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSASFISINTMGWFRQGP GKEREFAAISWSGGNYYATFARGRFTISSEDAKDTVYLQMDNLKPEDTAVYFCGADRWGTGSMNAPDYDYWGRGTLTVTSV
GGGSGGGSGGGGS
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYWMYVRLAPGKIEWVSATDTRGQNTYTTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCGADRWGTGSMNAPDYDYWGRGTLTVTSV
EPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPYREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

三重特異性-V1形式でのdMET/EgFR T_sAbの鎖1 (IH1-リンカー-1A12; V2)
(SEQ ID NO: 49)
QVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSASFISINTMGWFRQGP GKEREFAAISWSGGNYYATFARGRFTISSEDAKDTVYLQMDNLKPEDTAVYFCGADRWGTGSMNAPDYDYWGRGTLTVTSV
GGGSGGGGS
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYWMYVRLAPGKIEWVSATDTRGQNTYTTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCALNRWGTFPNRPGLTLTVTSV
GGGSGDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPYREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

三重特異性-V1形式でのdMET/EgFR T_sAbの鎖2 (EgFR-HC-ノブ; V1)
(SEQ ID NO: 50)
QVQLVESGGGVVQPGSRRLSCAASGFTFSTYGMHWWVRQAPGKGLEWVAVIWDGGSYKYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDGITMVRGVMDKYFDYWGGQTLTVTSV
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPYREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

【図 37-2】

リンカーベプチド-1 (SEQ ID NO: 37)
GGGGS

リンカーベプチド-2 (SEQ ID NO: 38)
GGGSGGGGS

リンカーベプチド-3 (SEQ ID NO: 39)
GGGSGGGSGGGGS

リンカーベプチド-4 (SEQ ID NO: 40)
GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS

リンカーベプチド-5 (SEQ ID NO: 41)
GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS

リンカーベプチド-6 (SEQ ID NO: 42)
GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS

二重特異性-V1形式でのdMET/EgFR B_sAbの鎖1 (IH1; V1)
(SEQ ID NO: 43)
QVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSASFISINTMGWFRQGP GKEREFAAISWSGGNYYATFARGRFTISSEDAKDTVYLQMDNLKPEDTAVYFCGADRWGTGSMNAPDYDYWGRGTLTVTSV
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

二重特異性-V1形式でのdMET/EgFR B_sAbの鎖1 (IH1; V2)
(SEQ ID NO: 44)
QVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSASFISINTMGWFRQGP GKEREFAAISWSGGNYYATFARGRFTISSEDAKDTVYLQMDNLKPEDTAVYFCGADRWGTGSMNAPDYDYWGRGTLTVTSV
GGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

二重特異性-V1形式でのdMET/EgFR B_sAbの鎖2 (EgFR-HC-ノブ; V1)
(SEQ ID NO: 45)
QVQLVESGGGVVQPGSRRLSCAASGFTFSTYGMHWWVRQAPGKGLEWVAVIWDGGSYKYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDGITMVRGVMDKYFDYWGGQTLTVTSV
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPYREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

二重特異性-V1形式でのdMET/EgFR B_sAbの鎖2 (EgFR-HC-ノブ; V2)
(SEQ ID NO: 46)
QVQLVESGGGVVQPGSRRLSCAASGFTFSTYGMHWWVRQAPGKGLEWVAVIWDGGSYKYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDGITMVRGVMDKYFDYWGGQTLTVTSV

【図 37-4】

三重特異性-V1形式でのdMET/EgFR T_sAbの鎖2 (EgFR-HC-ノブ; V2)
(SEQ ID NO: 51)
QVQLVESGGGVVQPGSRRLSCAASGFTFSTYGMHWWVRQAPGKGLEWVAVIWDGGSYKYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDGITMVRGVMDKYFDYWGGQTLTVTSV
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
GGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPYREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

三重特異性-V1形式でのdMET/EgFR T_sAbの鎖3 (EgFR-LC)
(SEQ ID NO: 52)
AIQLTQSPSSLASVGDRTVITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIDASSLESQVPSRFSGSESGDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTYPLTGGGKTVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPTKSFNRGEC

二重特異性-V2形式でのdMET/EgFR B_sAbの鎖1 (IH1; V1)
(SEQ ID NO: 53)
QVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSASFISINTMGWFRQGP GKEREFAAISWSGGNYYATFARGRFTISSEDAKDTVYLQMDNLKPEDTAVYFCGADRWGTGSMNAPDYDYWGRGTLTVTSV
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPYREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

二重特異性-V2形式でのdMET/EgFR B_sAbの鎖1 (IH1; V2)
(SEQ ID NO: 54)
QVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSASFISINTMGWFRQGP GKEREFAAISWSGGNYYATFARGRFTISSEDAKDTVYLQMDNLKPEDTAVYFCGADRWGTGSMNAPDYDYWGRGTLTVTSV
GGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPYREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

二重特異性-V2形式でのdMET/EgFR B_sAbの鎖2 (EgFR-ScFv-Fc; V1)
(SEQ ID NO: 55)
QVQLVESGGGVVQPGSRRLSCAASGFTFSTYGMHWWVRQAPGKGLEWVAVIWDGGSYKYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDGITMVRGVMDKYFDYWGGQTLTVTSV
GGGSGGGSGGGGS
AIQLTQSPSSLASVGDRTVITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIDASSLESQVPSRFSGSESGDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTYPLTGGGKTVEIK
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPYREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

二重特異性-V2形式でのdMET/EgFR B_sAbの鎖2 (EgFR-ScFv-Fc; V2)
(SEQ ID NO: 56)

10

20

30

40

50

【図 3 7 - 5】

QVQLVESGGGVQPGRSRLRLSCAASGFTFTSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SK
NTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVTVSS
GGGSGGGGGS
AIQLTQSPSSLASVGDRTVITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSESGDTFTLTISLQPEDF
ATYYCQQFNISYPLTFGGGTKVEIK
GGGSGDKTHTCCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

三重特異性-V2形式でのdMET/EGFR TsAbの鎖1 (IH1-リンカー -IA12: V1)
(SEQ ID NO: 57)
QVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSASLFSINTMGWFRQGPGEREFVAAISWSGGNYYATFARGRFTISSEDAKDTV
YLQMDNLKPEDTAVYFCGADRWGTGSMNAPDYDYWGRGLTVTVSS
GGGSGGGGSGGGGS
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSNYWMYVRLAPGKIEWVVSATDRGQNTYTYDSVKGRFTISRDN AK
NMVSLQMNNLKSED TAVVYCALGNRWGTFPNRGPGLTVTVSS
EPKSGDKTHTCCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPREPVYTLPPYREEMTKNQVSLYCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

三重特異性-V2形式でのdMET/EGFR TsAbの鎖1 (IH1-リンカー -IA12: V2)
(SEQ ID NO: 58)
QVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSASLFSINTMGWFRQGPGEREFVAAISWSGGNYYATFARGRFTISSEDAKDTV
YLQMDNLKPEDTAVYFCGADRWGTGSMNAPDYDYWGRGLTVTVSS
GGGSGGGGGS
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSNYWMYVRLAPGKIEWVVSATDRGQNTYTYDSVKGRFTISRDN AK
NMVSLQMNNLKSED TAVVYCALGNRWGTFPNRGPGLTVTVSS
GGGSGDKTHTCCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPREPVYTLPPYREEMTKNQVSLYCLVKGFY
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

三重特異性-V2形式でのdMET/EGFR TsAbの鎖2 (EGFR-SdF-Fc: V1)
(SEQ ID NO: 59)
QVQLVESGGGVQPGRSRLRLSCAASGFTFTSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SK
NTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVTVSS
GGGSGGGGSGGGGS
AIQLTQSPSSLASVGDRTVITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSESGDTFTLTISLQPEDF
ATYYCQQFNISYPLTFGGGTKVEIK
EPKSGDKTHTCCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPREPVYTLPPYREEMTKNQVSLYCLVKGFY
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

三重特異性-V2形式でのdMET/EGFR TsAbの鎖2 (EGFR-SdF-Fc: V2)
(SEQ ID NO: 60)
QVQLVESGGGVQPGRSRLRLSCAASGFTFTSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SK
NTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVTVSS
GGGSGGGGGS

【図 3 7 - 7】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY
ICNVNHNKPSNTKVDDKV
EPKSGDKTHTCCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPREPVYTLPPYREEMTKNQVSLYCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

三重特異性-V3形式でのdMET/EGFR TsAbの鎖1 (IH1 + EGFR-HC-ノブ: V2)
(SEQ ID NO: 65)
QVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSASLFSINTMGWFRQGPGEREFVAAISWSGGNYYATFARGRFTISSEDAKDTV
YLQMDNLKPEDTAVYFCGADRWGTGSMNAPDYDYWGRGLTVTVSS
GGGSGGGGGS
QVQLVESGGGVQPGRSRLRLSCAASGFTFTSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SK
NTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY
ICNVNHNKPSNTKVDDKV
GGGSGDKTHTCCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPREPVYTLPPYREEMTKNQVSLYCLVKGFY
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

三重特異性-V3形式でのdMET/EGFR TsAbの鎖2 (IA12 + EGFR-HC-ホール: V1)
(SEQ ID NO: 66)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSNYWMYVRLAPGKIEWVVSATDRGQNTYTYDSVKGRFTISRDN AK
NMVSLQMNNLKSED TAVVYCALGNRWGTFPNRGPGLTVTVSS
GGGSGGGGSGGGGS
QVQLVESGGGVQPGRSRLRLSCAASGFTFTSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SK
NTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY
ICNVNHNKPSNTKVDDKV
EPKSGDKTHTCCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

三重特異性-V3形式でのdMET/EGFR TsAbの鎖2 (IA12 + EGFR-HC-ホール: V2)
(SEQ ID NO: 67)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSNYWMYVRLAPGKIEWVVSATDRGQNTYTYDSVKGRFTISRDN AK
NMVSLQMNNLKSED TAVVYCALGNRWGTFPNRGPGLTVTVSS
GGGSGGGGGS
QVQLVESGGGVQPGRSRLRLSCAASGFTFTSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SK
NTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY
ICNVNHNKPSNTKVDDKV
GGGSGDKTHTCCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【図 3 7 - 6】

AIQLTQSPSSLASVGDRTVITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSESGDTFTLTISLQPEDF
ATYYCQQFNISYPLTFGGGTKVEIK
GGGSGDKTHTCCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

二重特異性-V3形式でのdMET/EGFR BsAbの鎖1 (IH1 VH1 + EGFR-HC-IgG1: V1)
(SEQ ID NO: 61)
QVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSASLFSINTMGWFRQGPGEREFVAAISWSGGNYYATFARGRFTISSEDAKDTV
YLQMDNLKPEDTAVYFCGADRWGTGSMNAPDYDYWGRGLTVTVSS
GGGSGGGGSGGGGS
QVQLVESGGGVQPGRSRLRLSCAASGFTFTSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SK
NTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY
ICNVNHNKPSNTKVDDKV
EPKSGDKTHTCCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

二重特異性-V3形式でのdMET/EGFR BsAbの鎖1 (IH1 VH1 + EGFR-HC-IgG1: V2)
(SEQ ID NO: 62)
QVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSASLFSINTMGWFRQGPGEREFVAAISWSGGNYYATFARGRFTISSEDAKDTV
YLQMDNLKPEDTAVYFCGADRWGTGSMNAPDYDYWGRGLTVTVSS
GGGSGGGGGS
QVQLVESGGGVQPGRSRLRLSCAASGFTFTSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SK
NTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY
ICNVNHNKPSNTKVDDKV
GGGSGDKTHTCCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

二重特異性-V3形式でのdMET/EGFR BsAbの鎖2 (EGFR-LC)
(SEQ ID NO: 63)
AIQLTQSPSSLASVGDRTVITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSESGDTFTLTISLQPEDF
ATYYCQQFNISYPLTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYE
KHVKYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

三重特異性-V3形式でのdMET/EGFR TsAbの鎖1 (IH1 + EGFR-HC-ノブ: V1)
(SEQ ID NO: 64)
QVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSASLFSINTMGWFRQGPGEREFVAAISWSGGNYYATFARGRFTISSEDAKDTV
YLQMDNLKPEDTAVYFCGADRWGTGSMNAPDYDYWGRGLTVTVSS
GGGSGGGGSGGGGS
QVQLVESGGGVQPGRSRLRLSCAASGFTFTSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SK
NTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVTVSS

【図 3 7 - 8】

三重特異性-V3形式でのdMET/EGFR TsAbの鎖3 (EGFR-LC)
(SEQ ID NO: 68)
AIQLTQSPSSLASVGDRTVITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSESGDTFTLTISLQPEDF
ATYYCQQFNISYPLTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYE
KHVKYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

二重特異性-V4形式でのdMET/EGFR BsAbの鎖1 (EGFR-HC-IgG1 + VH1: V1)
(SEQ ID NO: 69)
QVQLVESGGGVQPGRSRLRLSCAASGFTFTSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SK
NTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY
ICNVNHNKPSNTKVDDKV
EPKSGDKTHTCCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
GGGSGGGGSGGGGS
QVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSASLFSINTMGWFRQGPGEREFVAAISWSGGNYYATFARGRFTISSEDAKDTV
YLQMDNLKPEDTAVYFCGADRWGTGSMNAPDYDYWGRGLTVTVSS

二重特異性-V4形式でのdMET/EGFR BsAbの鎖1 (EGFR-HC-IgG1 + VH1: V2)
(SEQ ID NO: 70)
QVQLVESGGGVQPGRSRLRLSCAASGFTFTSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SK
NTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY
ICNVNHNKPSNTKVDDKV
GGGSGDKTHTCCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
GGGSGGGGGS
QVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSASLFSINTMGWFRQGPGEREFVAAISWSGGNYYATFARGRFTISSEDAKDTV
YLQMDNLKPEDTAVYFCGADRWGTGSMNAPDYDYWGRGLTVTVSS

二重特異性-V4形式でのdMET/EGFR BsAbの鎖2 (EGFR-LC)
(SEQ ID NO: 71)
AIQLTQSPSSLASVGDRTVITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSESGDTFTLTISLQPEDF
ATYYCQQFNISYPLTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYE
KHVKYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

三重特異性-V4形式でのdMET/EGFR TsAbの鎖1 (EGFR-HC-ノブ + VH1: V1)
(SEQ ID NO: 72)
QVQLVESGGGVQPGRSRLRLSCAASGFTFTSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SK
NTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY
ICNVNHNKPSNTKVDDKV

【手続補正書】

【提出日】令和5年7月20日(2023.7.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2023549537000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US21/59444
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. A61P 35/00 (2022.01) ADD. C07K 16/28 (2022.01) INV. C07K 16/2863 CPC - ADD. A61K 2039/505; A61P 35/00; C07K 2317/53; C07K 2317/55; C07K 2317/565; C07K 2317/622; C07K 2317/92 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 data base consulted during the international search (name of data base 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 2014/0294847 A1 (ABLYNX N.V.) 02 October 2014; Paragraphs: [0011], [0012], [0028], [0118], [0188]	17 — 18, 19, 27, 28, 29 — 1, 2, 6, 7, 11, 20-21
Y — A	US 2003/0194403 A1 (VAN DE WINKEL JAN G J) 16 October 2003; FIG. 15A, FIG 15B; paragraph [0019]	18, 19 — 20/18, 20/19, 21
Y — A	US 2019/0153115 A1 (AMUNIX OPERATING INC.) 23 May 2019; Paragraph [0008]; FIG. 11	19, 27, 28, 29 — 20/19, 21
Y	WO 2020/198683 A1 (AB STUDIO INC.) 01 October 2020; Table 1; paragraphs [0053]-[0054]	29
Y	J.R. VU ET AL. "GenBank accession ABC49636.1" 1-4. . Web. 01 July 2006; Entire Document	28, 29/28
A	H. KIM. "GenBank accession number: KAF5621748.1" 1-2. . Web. 10 July 2020; Entire Document	1, 2, 11/1-2, 20, 21
A	M. HARMSSEN . "GenBank accession CAH60922.1" 1-2. . Web. 26 July 2016; Entire Document	1, 2, 11/1-2, 20, 21
A	Y. WEN. "GenBank accession PDB: 5IMK_B" 1-3. . Web. 01 December 2020; Entire Document	6, 7, 11/6-7
☒ 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 "I" 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 14 November 2022 (14.11.2022)		Date of mailing of the international search report JAN 20 2023
Name and mailing address of the ISA/US 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 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/59444

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:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/59444

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.: 12-16, 22-26, 30-34, 38-43, 47-49-53, 57-63, 67-69, 73-75, 79-81, 85-106
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.:
1-11, 17-21, 27-29, 35-37, 44-46, 54-56, 64-66, 70-72, 76-78, and 82-84, SEQ ID NOs: 1-3 (VHH CDRs 1-3), SEQ ID NO: 19 (VHH sequence), SEQ ID NO: 25 (hinge sequence), SEQ ID NO: 30 (Fc region sequence), SEQ ID NO: 37 (linker peptide sequence), 1st polypeptide: cMET VHH-hinge-Fc; 2nd polypeptide: EGFR VHH-hinge-Fc; 3rd polypeptide: EGFR VL (polypeptide complex configuration).
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.:

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/US21/59444

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020/172528 A1 (ANWITA BIOSCIENCES, INC.) 27 August 2020; Page 106	6, 7, 11/6-7
E,X	WO 2022/104236 A2 (AB THERAPEUTICS, INC.) 19 May 2022; Claim: 1	1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/59444

-***-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 1-11, 17-21, 27-29, 35-37, 44-46, 54-56, 64-66, 70-72, 76-78, and 82-84, SEQ ID NOs: 1-3 (VHH CDRs 1-3), SEQ ID NO: 19 (VHH sequence), SEQ ID NO: 25 (hinge sequence), SEQ ID NO: 30 (Fc region sequence), SEQ ID NO: 37 (linker peptide sequence), 1st polypeptide: cMET VHH-hinge-Fc; 2nd polypeptide: EGFR VH-hinge-Fc; 3rd polypeptide: EGFR VL (polypeptide complex configuration), are directed to antibodies or antigen-binding fragments thereof that bind to cMET, multispecific antibodies or antigen-binding fragments thereof that bind to cMET and EGFR, and polypeptide complexes thereof.

The antibodies and polypeptide complexes of Claims 1 (in-part), 2, 6-7 (each in-part), 11 (in-part), 17-19, 20-21 (each in-part), 27, and 28-29 (each in-part) are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched to the extent that they comprise a cMet VHH encompassing SEQ ID NOs: 1-3 and 19 (first exemplary VHH CDRs 1-3 and VHH sequence, respectively), a hinge sequence encompassing SEQ ID NO: 25 (first exemplary hinge sequence), an Fc region encompassing SEQ ID NO: 30 (first exemplary Fc region sequence), a linker encompassing SEQ ID NO: 37 (first exemplary linker peptide sequence), and a polypeptide complex configuration encompassing a 1st polypeptide comprising cMET VHH-hinge-Fc, a 2nd polypeptide comprising EGFR VH-hinge-Fc, and a 3rd polypeptide comprising EGFR VL (first exemplary polypeptide complex configuration). This first named invention of Group I+ has been selected to encompass the first species of each of the genera found in claims 1, 6-7, 11, 20-21, 28-29, 36-37, 45-46, 55-56, 65-66, 71-72, 77-78, and 83-84 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 VHH sequences and associated CDRs, as well as linker peptides, Fc regions, and hinges, with specified SEQ ID NO: for each, as well as a where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected sequence(s). 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 include SEQ ID NOs: 4-6 and 20 (VHH CDRs 1-3 and VHH sequence) or 1st polypeptide: cMET VHH-hinge-Fc; 2nd polypeptide: EGFR scFv-hinge-Fc (polypeptide complex configuration).

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

No technical features are shared between the antibody, hinge, Fc, and linker sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: an antibody or antigen-binding fragment thereof that binds to cMET comprising a heavy-chain antibody variable domain (VHH) comprising complementarity determining regions 1, 2, and 3; a multi-specific antibody or antigen-binding fragment thereof, comprising a first antigen-binding site that specifically binds to EGFR, and a second antigen-binding site that specifically binds to cMET; and a polypeptide complex, comprising two to four polypeptide chains comprising at least one VHH that binds to cMET, one or more linkers, one or more Fc regions, and at least one of either an scFv that binds to EGFR or a paired VH and VL chain that associate and together bind to EGFR; these shared technical features are previously disclosed by US 2014/0294847 A1 to Ablynx N.V. (hereinafter "Ablynx").

Ablynx discloses an antibody or antigen-binding fragment thereof that binds to cMET (cMET-binding antibodies or fragments thereof; paragraph [0011]) comprising a heavy-chain antibody variable domain, VHH (immunoglobulin single variable domains such as e.g. VHs; paragraph [0012]), comprising complementarity determining regions 1, 2, and 3 (a VHH comprises CDR1, CDR2, and CDR3; paragraph [0028]); a multi-specific antibody or antigen-binding fragment thereof, comprising a first antigen-binding site that specifically binds to EGFR, and a second antigen-binding site that specifically binds to cMET (a construct comprising an antibody against cMET and an antibody against EGFR, which may be a conventional antibody or an scFv; paragraphs [0118], [0188]); and a polypeptide complex (immunoglobulin single variable domains may be linked to other immunoglobulin domains such as Fab', F(ab')₂, and scFv fragments; paragraph [0079]), comprising two to four polypeptide chains comprising at least one VHH that binds to cMET (a polypeptide comprising at least one and possibly two or more single variable domains that are directed against human cMET; paragraph [0088]), one or more linkers (peptide linkers; paragraph [0078]), one or more Fc regions (polypeptides of the invention may be linked to Fc portions of an immunoglobulin; paragraph [0153]), and at least one of either an scFv that binds to EGFR or a paired VH and VL chain that associate and together bind to EGFR (a construct comprising an antibody against cMET and an antibody against EGFR, which may be a conventional antibody or an scFv; paragraphs [0118], [0188]).

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

4 H 0 4 5

C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 C 1 2 N 15/62 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 11/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/08
 C 1 2 N 15/62 Z
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 K 39/395 E
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 47/68
 A 6 1 K 45/00

,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,D
 K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
 A(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,B
 B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
 ,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,
 LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,
 RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,Z
 W

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. T R I T O N

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(74)代理人 100221741

弁理士 酒井 直子

(74)代理人 100114926

弁理士 枝松 義恵

(72)発明者 ザマン モハド サイフ

アメリカ合衆国 9 4 1 1 5 カリフォルニア州 サンフランシスコ エディー ストリート 1 3 5 9

(72)発明者 リュウ ユエ

アメリカ合衆国 9 4 4 0 4 カリフォルニア州 フォスター シティー ピアリー レーン 8 1 5

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA05

4B065 AA91X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

【要約の続き】

