

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6309657号
(P6309657)

(45) 発行日 平成30年4月11日(2018.4.11)

(24) 登録日 平成30年3月23日(2018.3.23)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C O 7 K	16/30 (2006.01)	C O 7 K	16/30
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21

請求項の数 27 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-641 (P2017-641)	(73) 特許権者	500033483
(22) 出願日	平成29年1月5日(2017.1.5)		ビエール、ファーブル、メディカマン
(62) 分割の表示	特願2015-244007 (P2015-244007) の分割		フランス国ブローニュ、ピヤンクール、ブ ラス、アベル、ガンズ、45
原出願日	平成21年12月2日(2009.12.2)	(74) 代理人	100091982
(65) 公開番号	特開2017-99392 (P2017-99392A)		弁理士 永井 浩之
(43) 公開日	平成29年6月8日(2017.6.8)	(74) 代理人	100091487
審査請求日	平成29年2月6日(2017.2.6)		弁理士 中村 行孝
(31) 優先権主張番号	PCT/IB2008/055663	(74) 代理人	100082991
(32) 優先日	平成20年12月2日(2008.12.2)		弁理士 佐藤 泰和
(33) 優先権主張国	国際事務局 (IB)	(74) 代理人	100105153
(31) 優先権主張番号	61/184,502		弁理士 朝倉 悟
(32) 優先日	平成21年6月5日(2009.6.5)	(74) 代理人	100126099
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 反町 洋

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な抗cME T抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

c - M e t 二量体化を阻害することができるモノクローナル抗体またはその二価の機能性断片であって、配列番号37のアミノ酸配列を含む完全重鎖と、配列番号40のアミノ酸配列を含む完全軽鎖とを含んでなる、モノクローナル抗体またはその二価の機能性断片。

【請求項2】

下記の核酸：

a) 請求項1に記載の抗体またはその二価の機能性断片をコードする核酸、DNAまたはRNA、

b) a) で定義された核酸の相補性核酸から選択される、単離核酸。

【請求項3】

請求項2に記載の核酸を含んでなるベクター。

【請求項4】

請求項3に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項5】

請求項3に記載のベクターによって形質転換された少なくとも1個の細胞を含んでなる、ヒトを除くトランスジェニック動物。

【請求項6】

下記の段階：

a) 請求項4に記載の細胞の培地および適当な培養条件での培養、および

b) このようにして培養培地または前記培養細胞から出発して産生された前記抗体またはその二価の機能性断片の回収

を含んでなる、請求項1に記載の抗体またはその二価の機能性断片の産生方法。

【請求項7】

請求項6に記載の方法によって得ることができる、抗体またはその二価の機能性断片。

【請求項8】

医薬としての、請求項1または7に記載の抗体。

【請求項9】

請求項1、7および8のいずれか一項に記載の抗体またはその二価の機能性断片からなる化合物を活性成分として含んでなる、組成物。

【請求項10】

同時、単独または逐次使用の組合せ物として抗腫瘍抗体を更に含んでなる、請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

同時、単独または逐次使用の組合せ物として細胞傷害性/細胞増殖抑制剤を更に含んでなる、請求項9に記載の組成物。

【請求項12】

前記細胞傷害性/細胞増殖抑制剤が同時使用のために前記抗体またはその二価の機能性断片に化学的にカップリングしている、請求項11に記載の組成物。

【請求項13】

前記細胞傷害性/細胞増殖抑制剤が、アルキル化剤、代謝拮抗薬、抗腫瘍抗生物質、有糸分裂抑制因子、クロマチン機能阻害薬、抗血管新生薬、抗エストロゲン剤、抗アンドロゲン剤および免疫調節剤からなる群から選択される、請求項12に記載の組成物。

【請求項14】

前記細胞傷害性/細胞増殖抑制剤が、有糸分裂抑制因子である、請求項13に記載の組成物。

【請求項15】

前記抗体またはその二価の機能性断片の少なくとも1つが細胞毒素および/または放射性元素と接合している、請求項9に記載の組成物。

【請求項16】

前記毒素および/または放射性元素を、同時使用の組成物の成分の少なくとも1つに化学的にカップリングしている、請求項15に記載の組成物。

【請求項17】

医薬としての、請求項9～16のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項18】

腫瘍細胞の成長および/または増殖を阻害するための、請求項9～17のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項19】

癌を予防または治療するための、請求項9～18のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項20】

前記癌が前立腺癌、骨肉腫、肺癌、乳癌、子宮内膜癌、神経膠芽腫または結腸癌から選択される癌である、請求項19に記載の組成物。

【請求項21】

前記癌がHGF依存性および独立性のMet-活性化関連癌である、請求項19または20に記載の組成物。

【請求項22】

腫瘍細胞の成長および/または増殖の阻害を目的とする医薬の調製のための、請求項1、7および8のいずれか一項に記載の抗体またはその二価の機能性断片、または請求項9

10

20

30

40

50

～ 17 のいずれか一項に記載の組成物の、使用。

【請求項 23】

癌の予防または治療を目的とする医薬の調製のための、請求項 1、7 および 8 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその二価の機能性断片、もしくは請求項 9～17 のいずれか一項に記載の組成物の使用、または請求項 22 に記載の使用。

【請求項 24】

前記癌が前立腺癌、骨肉腫、肺癌、乳癌、子宮内膜癌、神経膠芽腫または結腸癌から選択される癌である、請求項 23 に記載の使用。

【請求項 25】

前記癌が HGF 依存性および独立性の Met - 活性化関連癌である、請求項 23 または 24 に記載の使用。

【請求項 26】

c - Met 受容体の異常存在が疑われる生物試料から出発する c - Met 受容体の過剰発現または過小発現によって誘発される疾病のインビトロでの検出するのを補助する方法であって、前記生物試料を請求項 1、7 および 8 のいずれか一項に記載の抗体と接触させる段階を含んでなる、方法。

【請求項 27】

前記抗体は標識することが可能である、請求項 26 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト c - Met 受容体に特異的に結合することができおよび/または前記受容体のチロシンキナーゼ活性を特異的に阻害することができる新規な二価の抗体、並びに前記抗体をコードするアミノ酸および核酸配列に関する。更に詳細には、本発明による抗体は、c - Met の二量体化を阻害することができる。本発明は、更に、前記受容体の過剰発現と関連した癌または任意の疾患の予防および/または治療処置のための医薬としての前記抗体の使用、並びに c - Met の過剰発現と関連した疾病の診断のための方法またはキットを含んでなる。本発明は、最後に、腫瘍進行または転移に与する他の増殖因子および/または化合物に対する他の抗体および/または化合物、および/または抗癌剤または毒素と接合した薬剤と組合せた前記抗体を含んでなる生成物および/または組成物、およびある種の癌の予防および/または治療のためのそれらの使用を含んでなる。

【背景技術】

【0002】

トラスツズマブ、セツキシマブ、ベバシズマブ、イマチニブおよびゲフィチニブ阻害薬のような受容体チロシンキナーゼ (RTK) を標的とする薬剤は、選択した癌の治療のためのこのタンパク質クラスを標的とすることの重要性を明示している。

【0003】

c - Met は、RON および SEA も包含する RTK のサブファミリーの典型的なメンバーである。c - Met RTK ファミリーは、構造的に他の RTK ファミリーとは異なっており、細胞分散因子 (SF) とも呼ばれる肝細胞増殖因子 (HGF) に対する唯一の既知の高親和性を有する受容体である [D.P. Bottaro et al., Science 1991, 251:802-804; L. Naldini et al., Eur. Mol. Biol. Org. J. 1991, 10:2867-2878]。c - Met および HGF は様々な組織で広く発現し、それらの発現は通常はそれぞれ上皮および間葉起源の細胞に限定されている [M.F. Di Renzo et al., Oncogene 1991, 6:1997-2003; E. Sonnenberg et al., J. Cell. Biol. 1993, 123:223-235]。それらは、いずれも正常な哺乳類の発生に必要であり、細胞遊走、形態形成分化、および三次元的管構造の組織化、並びに成長および血管形成に特に重要であることが示されている [F. Baldt et al., Nature 1995, 376:768-771; C. Schmidt et al., Nature. 1995:373:699-702; Tsarfaty et al., Science 1994, 263:98-101]。c - Met および HGF の制御調節は、哺乳類発生、組織維持および修復に重要であることが示されている [Nagayama T., Nagayama M., Koha

10

20

30

40

50

ra S., Kamiguchi H., Shibuya M., Katoh Y., Itoh J., Shinohara Y., Brain Res. 2004, 5;999(2):155-66; Tahara Y., Ido A., Yamamoto S., Miyata Y., Uto H., Horii T., Hayashi K., Tsubouchi H., J Pharmacol Exp Ther. 2003, 307(1):146-51] とともに、それらの調節異常は癌の進行に関係している。

【 0 0 0 4 】

c - M e t の不適当な活性化によって行われるシグナル伝達異常は、ヒトの癌で見られる極めて頻繁な変化の1つであり、腫瘍形成および転移に決定的な役割を果たしている [Birchmeier et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003, 4:915-925; L. Trusolino and Comoglio P. M., Nat Rev. 癌 . 2002, 2(4):289-300]。

【 0 0 0 5 】

不適当な c - M e t 活性化は、c - M e t の過剰発現および/またはパラクリンまたはオートクリン活性化などのリガンド依存性および非依存性機構によって、または機能獲得変異によって生じる可能性がある [J.G. Christensen, Burrows J. and Salgia R., Cancer Letters. 2005, 225:1-26]。しかしながら、A T P およびチロシン含有ペプチド基質に対するキナーゼの結合親和性および結合キネティクス (kinetics) を調節するには、リガンドの存在下または非存在下では、c - M e t 受容体のオリゴマー化が必要である [Hays JL, Watowich SJ, Biochemistry, 2004 Aug 17, 43:10570-8]。活性化 c - M e t は、細胞質ドメインに位置するそのマルチドッキング部位へのシグナル伝達エフェクターを動員し、R a s - M A P K、P I 3 K、S r c および S t a t 3 など幾つかの重要なシグナル伝達経路を活性化する [Gao CF, Vande Woude GF, Cell Res. 2005, 15(1):49-51; Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, Oncogene. 2000, 19(49):5582-9]。これらの経路は、腫瘍細胞増殖、侵襲および血管形成、およびアポトーシスの回避に固有である [Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, Oncogene, 2000, 19(49):5582-9; Gu H., Neel BG, Trends Cell Biol. 2003 Mar, 13(3):122-30; Fan S., Ma YX, Wang JA, Yuan RQ, Meng Q., Cao Y., Laterra JJ, Goldberg ID, Rosen EM, Oncogene. 2000 Apr 27, 19(18):2212-23]。更に、他の R T K と比べて c - M e t シグナル伝達のユニークな一面は、この受容体による細胞機能の調節の複雑さに更に加えることができる 6 4 インテグリン [Trusolino L., Bertotti A., Comoglio PM, Cell. 2001, 107:643-54]、C D 4 4 v 6 [Van der Voort R., Taher TE, WielengaVJ, Spaargaren M., Prevo R., Smit L., David G., Hartmann G., Gherardi E., Pals ST, J. Biol. Chem. 1999, 274(10):6499-506]、P l e x i n B 1 またはセマフォリン [Giordano S., Corso S., Conrotto P., Artigiani S., Gilestro G., Barberis D., Tamagnone L., Comoglio PM, Nat Cell Biol. 2002, 4(9):720-4; Conrotto P., Valdembrì D., Corso S., Serini G., Tamagnone L., Comoglio PM, Bussolino F., Giordano S., Blood. 2005, 105(11):4321-9; Conrotto P., Corso S., Gamberini S., Comoglio PM, Giordano S., Oncogene. 2004, 23:5131-7] のような焦点接着複合体および非キナーゼ結合パートナーとのその相互作用の報告である。最後に、最近のデータは、c - M e t がゲフィチニブまたはエルロチニブに対する腫瘍の耐性に関与している可能性があり、E G F R および c - M e t の両方を標的とする化合物の組合せは極めて興味深いことがあることを示唆している [Engelman JA et al., Science, 2007, 316:1039-43]。

【 0 0 0 6 】

過去数年間に、癌細胞系における c - M e t シグナル伝達を弱める目的で多くの様々な方法が開発されてきた。これらの方法としては、i) c - M e t または H G F / S F に対する中和抗体 [Cao B., Su Y., Oskarsson M., Zhao P., Kort EJ, Fisher RJ, Wang LM, Vande Woude GF, Proc Natl Acad Sci US A. 2001, 98(13):7443-8; Martens T., Schmidt NO, Eckerich C., Fillbrandt R., Merchant M., Schwall R., Westphal M., Lamszus K., Clin Cancer Res. 2006, 12(20):6144-52] または c - M e t へのリガンド結合を防止するための H G F / S F 拮抗剤 N K 4 の使用 [Kuba K., Matsumoto K., Date K., Shimura H., Tanaka M., Nakamura T., 癌 Res., 2000, 60:6737-43]、i i) キナーゼ活性をブロックする c - M e t に対する小 A T P 結合部位阻害剤 [Christensen JG, Schreck

10

20

30

40

50

R., Burrows J., Kuruganti P., Chan E, Le P., Chen J., Wang X., Ruslim L., Blake R., Lipson KE, Ramphal J., Do S., Cui JJ, Cherrington JM, Mendel DB, Cancer Res. 2003, 63:7345-55]、i i i) マルチドッキング部位への接近を干渉する遺伝子工学処理したSH2ドメインポリペプチドおよび受容体またはリガンド発現を減少させるRNAiまたはリボザイムが挙げられる。これらの方法のほとんどは、c-Metを選択的に阻害して腫瘍を阻害し、c-Metが癌における治療介入に重要である可能性があることを示している。

【0007】

c-Metターゲティングのために産生された分子の中、幾つかは抗体である。最も広汎に記載されているものは、Genentech製の抗c-Met5D5抗体[WO 96/38557号]であり、様々なモデルに単独で添加したときには強力な作動薬として、またFab断片として用いたときには拮抗薬として作用する。one armed 5D5(OA5D5)として報告されかつ大腸菌(E. Coli)において組換えタンパク質として産生されたこの抗体の一価の遺伝子工学処理した形態も、Genentechによる特許出願[WO 2006/015371号]の主題である。しかしながら、この分子は、その特定のスカフォールドのために抗体として認識されず、ヒトにおいて免疫原性でありうる突然変異も示す。活性という点で、このグリコシル化されていない分子はエフェクター機能を欠いており、最終的に、OA5D5がc-Metの二量体化を阻害することを、データによって明確に示していない。更に、c-Metを発現するが、HGF mRNAおよびタンパク質を発現せずかつリガンドとは非依存的に増殖する神経膠芽腫細胞系であるG55インビボモデルで試験したときには、one armed抗c-MetはG55腫瘍増殖に有意な効果を示さず、OA5D5は主としてHGF結合をブロックすることによって作用し、HGFとは非依存的に活性化された腫瘍を標的とすることはできないことを示唆している[Martens T. et al, Clin. Cancer Res., 2006, 12(20):6144-6152]。

【0008】

c-Metをターゲティングするもう一つの抗体は、「主としてc-Met拮抗剤としてまた幾つかの場合にはc-Met作動薬として」作用する抗体としてPfizerによって報告されている[WO2005/016382号]。c-Met二量体化に対するPfizer抗体の任意の効果を示すデータは、この出願明細書には記載されていない。

【0009】

本発明の革新的態様の1つは、内因性作動薬活性を持たずかつc-Met二量体化を阻害するキメラおよび/またはヒト化モノクローナル抗体を生成することである。更に詳細には、本発明の革新的一態様は、拮抗薬活性を有しかつc-Met二量体化を阻害するキメラおよび/またはヒト化モノクローナル抗体を生成することである。

【0010】

この方法は、またリガンド依存性の腫瘍のターゲティングに加えて、c-Metの過剰発現またはシグナル伝達のためのオリゴマー化に依存性のままである細胞内ドメインの突然変異により、c-Metのリガンド非依存性活性化を損なうであろう。この抗体の活性のもう一つの態様は、c-Met機能を損なうc-Metとそのパートナーとの相互作用に対する立体障害である可能性がある。この抗体は、c-Met受容体の特異的阻害に関連した機能に加えADCCおよびCDCのようなエフェクター機能を得るために、ヒト化および遺伝子工学処理され優先的には、限定されないが、ヒトIgG1として、処理される。

【発明の概要】

【0011】

驚くべきことには、本発明者らは、c-Metに結合することができるだけでなくc-Met二量体化を阻害することもできるキメラおよび/またはヒト化モノクローナル拮抗薬抗体であって、c-Metに対して既成の拮抗薬抗体とは反対に二価である前記モノクローナル抗体を生成させることに初めて成功した。従来、c-Metとそのパートナーとの二量体化を阻害することができる抗体は興味深いものであると時折示唆されていること

10

20

30

40

50

が真実であれば、抗体がそのようにすることができることは開示または明確に示唆されたことはなかった。更に、抗体の特異性に関しては、活性な二価の抗体の生成に成功するかは全く明らかではなかった。

【 0 0 1 2 】

以前に説明されているように、このような抗体はより大きな患者の個体群にとって実質的な利益を提供するので、c - M e t 二量体化の阻害は本発明の主要な態様である。本発明までの場合であつたりリガンド依存性の活性化したc - M e t 癌だけでなく、リガンド非依存性の活性化したc - M e t 癌も、本発明の方法によって生成した抗体で治療することができた。

【 0 0 1 3 】

抗体は、c - M e t - R L u c / c - M e t - Y F P を両方とも発現する細胞上でB R E T 分析によって評価し、B R E T シグナルを少なくとも40%、好ましくは45%、50%、55%、および最も好ましくは60%阻害する能力で選択した。

【 0 0 1 4 】

B R E T 法は、タンパク質二量体化の典型的なものとして知られている [Angers et al ., PNAS, 2000, 97:3684-89] 。

【 0 0 1 5 】

B R E T 法は、当業者に周知であり、下記の実施例で詳細に説明される。更に詳細には、B R E T (生物発光共鳴エネルギー移動) は、生物発光ドナー (ウミシイタケルシフェラーゼ (R l u c)) と、G F P (緑色蛍光タンパク質) または Y F P (黄色蛍光タンパク質) の変異体である蛍光受容体との間に起こる非放射性エネルギー移動である。本発明の場合には、E Y F P (強化黄色蛍光タンパク質) を用いた。移動の効果は、ドナーと受容体の間の配置および距離によって変化する。次いで、エネルギー移動は、2個の分子が極めて接近している (1 ~ 10 nm) ときにのみ起こることができる。この特性を用いて、タンパク質 - タンパク質相互作用分析を行う。実際に、2個のパートナーの間の相互作用を検討するためには、第一のパートナーをウミシイタケルシフェラーゼに遺伝学的に融合させ、第二のものをG F P の黄色変異体に融合させる。融合タンパク質を、通常は哺乳類細胞で発現させるが強制的なものではない。膜透過性基質 (コエレンテラジン) の存在下では、R l u c は青色光を放射する。G F P 変異体がR l u c から10 nm より近ければ、エネルギー移動が起こり、追加の黄色シグナルを検出することができる。B R E T シグナルは、受容体により放射される光とドナーにより放射される光の比として測定される。従って、2個の融合タンパク質が接近しまたはコンホメーション変化によりR l u c とG F P 変異体が一層近くなれば、B R E T シグナルは増加する。

【 0 0 1 6 】

B R E T 分析が好ましい実施形態にある場合には、当業者に知られている任意の方法を用いてc - M e t 二量体化を測定することができる。F R E T (蛍光共鳴エネルギー移動) 、H T R F (均一時間分解蛍光) 、F L I M (蛍光寿命イメージング顕微鏡法) またはS W - F C C S (単一波長蛍光相互相関分光法) の方法が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 1 7 】

共免疫沈降法、アルファスクリーン、化学的架橋、二重ハイブリッド、アフィニティークロマトグラフィー、E L I S A またはファウエスタンプロット法のような他の古典的手法を用いることもできる。

【 0 0 1 8 】

「抗体 (antibody) 」、「抗体類 (antibodies) 」または「免疫グロブリン」は、最も広義に互換的に用いられ、モノクローナル抗体 (例えば、完全長のまたは完全なモノクローナル抗体) 、ポリクローナル抗体、多価抗体または多重特異性抗体 (例えば、所望な生物活性を示す限り、二重特異性抗体) が挙げられる。

【 0 0 1 9 】

更に詳細には、このような分子は、ジスルフィド結合によって相互連結した少なくとも

10

20

30

40

50

2本の重(H)鎖と2本の軽(L)鎖を含んでなる糖タンパク質である。それぞれの重鎖は、重鎖可変領域(またはドメイン)(本明細書ではH C V RまたはV Hと略記する)と、重鎖定常領域とからなる。重鎖定常領域は、3個のドメインC H 1、C H 2およびC H 3からなっている。それぞれの軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書ではL C V RまたはV Lと略記する)と、軽鎖定常領域とからなっている。軽鎖定常領域は、1個のドメインC Lからなっている。V HおよびV L領域は、更にフレームワーク領域(F R)と呼ばれる一層保存されている領域が散在した相補性決定領域(C D R)と呼ばれる超可変領域にさらに分けることができる。それぞれのV HおよびV Lは3個のC D Rおよび4個のF Rからなっており、アミノ末端からカルボキシ末端へと下記の順序:F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4で配置されている。重および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的補体系の第一成分(C 1 q)など、宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介することがある。

10

【0020】

免疫グロブリンの重鎖は、F d領域、ヒンジ領域およびF c領域(結晶性断片)の3つの機能性領域に分けることができる。F d領域はV HおよびC H 1ドメインを含んでなり、軽鎖と組み合わさって抗原結合断片F a bを形成する。F c断片は、例えば、補体の固定およびエフェクター細胞の同種のF c受容体への結合などを含む、免疫グロブリンエフェクター機能に関与している。I g G、I g AおよびI g D免疫グロブリンクラスで見られるヒンジ領域は、F a b部分がF c領域に対して空間的に自由に動くことができるようにする柔軟なスペーサーとして作用する。ヒンジドメインは構造的に多様であり、免疫グロブリンクラスおよびサブクラスの中で配列および長さがいずれも変化する。

20

【0021】

結晶学的研究によれば、免疫グロブリンのヒンジ領域は、更に構造および機能上から、上部ヒンジ、コアおよび下部ヒンジの3つの領域に分けることができる(Shin et al., Immunological Reviews 130:87, 1992)。上部ヒンジは、C H 1のカルボニル末端から動きを制限するヒンジにおける第一の残基であって、通常は2本の重鎖の間に鎖間ジスルフィド結合を形成する第一のシステイン残基までのアミノ酸を包含する。上部ヒンジ領域の長さは、抗体の分節柔軟性と相関している。コアヒンジ領域は、重鎖間ジスルフィド橋を含む。下部ヒンジ領域は、C H 2ドメインでの残基のアミノ末端と連結し、これを包含している。ヒトI g G 1のコアヒンジ領域は、配列C y s - P r o - P r o - C y sを含んでおり、ジスルフィド結合を形成することによって二量体化すると、ピボットとして作用すると思われる環状オクタペプチドを生じることによって柔軟性が付与される。免疫グロブリンのヒンジ領域におけるポリペプチド配列の構造および柔軟性によって可能となるコンホメーション変化は、抗体のF c部分のエフェクター機能に影響することがある。

30

【0022】

「モノクローナル抗体」という用語は、その通常の意味に準じて用いられ、実質的に均質な抗体の個体群から得られる抗体、すなわちこの個体群を含んでなる個々の抗体が、少量で存在することがある可能な天然に存在する突然変異体を除き、同一であることを表す。換言すれば、モノクローナル抗体は、細胞(例えば、ハイブリドーマ細胞、均質抗体をコードするDNAでトランスフェクションした真核生物の宿主細胞、均質抗体をコードするDNAでトランスフェクションした原核生物の宿主細胞など)の単クローンの増殖から生じ、および一般的に単クラスおよびサブクラスの重鎖および単タイプの軽鎖を特徴とする、均質抗体である。モノクローナル抗体は、特異性が高く、単一抗原に対応する。更に、典型的には決定基またはエピトープに対する様々な抗体を包含するポリクローナル抗体製剤とは対照的に、それぞれのモノクローナル抗体は抗原上の単一決定基に対応する。

40

【0023】

本明細書の記載において、抗体化合物またはそれらの配列に結合したポリペプチド、ポリペプチド配列、アミノ酸配列、ペプチドおよびタンパク質という用語は、相互可換であ

50

る。

【0024】

本発明は、c - M e t二量体化を阻害することができ、かつそれぞれ配列番号1、2および3のアミノ酸配列を有するCDR - H 1、CDR - H 2およびCDR - H 3を含んでなる重鎖または最適アラインメント後に配列番号1、2および3の配列と少なくとも80%の同一性を有する配列と、それぞれ配列番号5、6および7のアミノ酸配列を有するCDR - L 1、CDR - L 2およびCDR - L 3を含んでなる軽鎖または最適アラインメント後に配列番号5、6または7の配列と少なくとも80%の同一性を有する配列とを含んでなる、モノクローナル抗体またはその二価の機能性断片もしくは誘導体であって、前記抗体が、配列番号56のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域をも含んでなることをさらに特徴とする、モノクローナル抗体またはその二価の機能性断片もしくは誘導体に関する。

10

【0025】

更に詳細には、本発明は、上記のように配列番号57のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域をも含んでなることを特徴とする、モノクローナル抗体またはその二価の機能性断片もしくは誘導体に関する。

【0026】

換言すれば、本発明は、c - M e t二量体化を阻害することができ、かつそれぞれ配列番号1、2および3のアミノ酸配列を有するCDR - H 1、CDR - H 2およびCDR - H 3を含んでなる重鎖または最適アラインメント後に配列番号1、2および3の配列と少なくとも80%の同一性を有する配列と、それぞれ配列番号5、6および7のアミノ酸配列を有するCDR - L 1、CDR - L 2およびCDR - L 3を含んでなる軽鎖または最適アラインメント後に配列番号5、6または7の配列と少なくとも80%の同一性を有する配列とを含んでなる、モノクローナル抗体またはその二価の機能性断片もしくは誘導体であって、前記抗体が、配列番号57のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域をも含んでなることをさらに特徴とする、モノクローナル抗体または二価の機能性断片もしくは誘導体に関する。

20

【0027】

更に詳細には、本発明は、上記のように配列番号21のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域をも含んでなることを特徴とする、モノクローナル抗体またはその二価の機能性断片もしくは誘導体に関する。

30

【0028】

換言すれば、本発明は、c - M e t二量体化を阻害することができ、かつそれぞれ配列番号1、2および3のアミノ酸配列を有するCDR - H 1、CDR - H 2およびCDR - H 3を含んでなる重鎖または最適アラインメント後に配列番号1、2および3の配列と少なくとも80%の同一性を有する配列と、それぞれ配列番号5、6および7のアミノ酸配列を有するCDR - L 1、CDR - L 2およびCDR - L 3を含んでなる軽鎖または最適アラインメント後に配列番号5、6または7の配列と少なくとも80%の同一性を有する配列とを含んでなる、モノクローナル抗体またはその二価の機能性断片もしくは誘導体であって、前記抗体が、配列番号21のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域をも含んでなることをさらに特徴とする、モノクローナル抗体またはその二価の機能性断片もしくは誘導体にも関する。

40

【0029】

当業者には明らかであるように、配列番号57および21の共通配列は、配列番号56の共通配列の中に含まれる。

【0030】

【表 1】

表 1

	#01	#02	#03	#04	#05	#06	#07	#08	#09	#10	#11	#12	#13	#14
配列番号 56	x1	x2	x3	C	X5	X6	X7	X8	X9	C	X11	X12	C	X14
配列番号 57	x1	x2	x3	C	X5	X6	X7	X8	X9	C	P	P	C	P
配列番号 21	x1	x2	x3	C	X5	-	C	X8	X9	C	X11	X12	C	X14

配列番号:56 について:

X1: P, R, C, - X5: D, C, G, - X8: H, V, K, - X12: P, -
 X2: K, C, R, - X6: K, C, - X9: T, C, E, P, - X14: P, T
 X3: S, C, D, - X7: T, C, - X11: P, I

【 0 0 3 1 】

「機能性断片または誘導体」という表現は、本明細書において後で詳細に定義される。

【 0 0 3 2 】

C D R 領域または C D R とは、I M G T によって定義された免疫グロブリンの重および軽鎖の超可変領域を示すことを意味する。

【 0 0 3 3 】

I M G T のユニークナンバリングは、どのような抗原受容体、鎖のタイプ、または種であっても可変ドメインを比較するために定義されている [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997); Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P., Pommie, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. および Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]。I M G T のユニークナンバリングでは、保存されるアミノ酸は常に同じ位置を有し、例えば、システイン 23 (1 s t - C Y S)、トリプトファン 41 (C O N S E R V E D - T R P)、疎水性アミノ酸 89、システイン 104 (2 n d - C Y S)、フェニルアラニンまたはトリプトファン 118 (J - P H E または J - T R P) である。I M G T ユニークナンバリングにより、フレームワーク領域 (F R 1 - I M G T : 1 ~ 26 位、F R 2 - I M G T : 39 ~ 55 位、F R 3 - I M G T : 66 ~ 104 位および F R 4 - I M G T : 118 ~ 128 位) および相補性決定領域 (C D R 1 - I M G T : 27 ~ 38 位、C D R 2 - I M G T : 56 ~ 65 位および C D R 3 - I M G T : 105 ~ 117 位) の標準化限界が設定される。ギャップは非占有位置を表すので、C D R - I M G T 長 (括弧で示されドットによって区切られている、例えば [8 . 8 . 13]) は、重要な情報となる。I M G T ユニークナンバリングは、I M G T C o l l i e r s d e P e r l e s と呼ばれる 2 D 図形表現 [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002); Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)] および I M G T / 3 D s t r u c t u r e - D B における 3 D 構造 [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., 「T 細胞受容体および M H C 構造データ (T cell receptor and MHC structure data)」. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)] において用いられる。

【 0 0 3 4 】

3 種類の重鎖 C D R と 3 種類の軽鎖 C D R が存在する。C D R という用語は、本明細書では、抗体が認識する抗原またはエピトープに対する抗体の親和性による結合に参与するアミノ酸残基の大部分を含むこれらの領域の、場合によっては、1 つ、またはこれらの領域の幾つか、または全部を示す目的で用いられる。

【 0 0 3 5 】

本発明の意味における 2 個の核酸またはアミノ酸配列間の「同一性率」とは、最良のア

10

20

30

40

50

ラインメント（最適アラインメント）後に得られる比較を行う2配列間のヌクレオチドまたは同一アミノ酸残基の割合を示すことを意味し、この割合は純粋に統計学的なものであり、2配列間の差異はランダムかつそれらの全長にわたって分布している。2個の核酸またはアミノ酸配列間の配列の比較は、従来それらを最適な状態に整列した後にこれらの配列を比較することによって行われ、前記比較はセグメントによってまたは「比較ウィンドウ」によって行うことができる。比較のための配列の最適アラインメントは、手作業の他に、SmithおよびWaterman(1981)の局所的相同性アルゴリズム法 [Ad. App. Math. 2:482]、NeddlemanおよびWunsch(1970)の局所的相同性アルゴリズム法 [J. Mol. Biol. 48: 443]、PearsonおよびLipman(1988)の類似性検索法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444]、これらのアルゴリズムを用いるコンピューターソフトウェア法 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIのGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA、あるいはBLASTNまたはBLASTP比較ソフトウェア)によって行うことができる。

10

【0036】

2個の核酸またはアミノ酸配列間の同一性の割合は、最適状態に整列したこれら2個の配列を比較することによって決定され、比較を行う核酸またはアミノ酸配列は、これら2個の配列間で最適アラインメントに対する参照配列に関して付加または欠失を含んでなる可能性がある。同一性の割合は、ヌクレオチドまたはアミノ酸残基が2個の配列間で同一である同一位置の数を決定し、この同一位置の数を比較ウィンドウにおける位置の総数で割り、得られた結果に100を乗じて、これら2個の配列間の同一性の割合を得ることによって計算される。

20

【0037】

例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>なるサイトで入手可能なBLASTプログラム「BLAST2配列」(Tatusova et al., 「Blast2配列 - タンパク質およびヌクレオチド配列を比較するための新たなツール (Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences)」, FEMS Microbiol Lett. 174:247-250)を用いることができ、用いられるパラメーターはデフォルトによって与えられるものであり(詳細には、パラメーターについては「オープンギャップペナルティー」: 5、および「延長ギャップペナルティー」: 2であり、選択されるマトリックスは、例えば、プログラムによって提案されているマトリックス「BLOSUM62」である)、比較を行う2個の配列間の同一性の割合は、プログラムによって直接計算される。

30

【0038】

参照アミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有するアミノ酸配列に関しては、参照配列に対してある種の変更、詳細には少なくとも1個のアミノ酸の欠失、付加または置換、トランケーションまたは伸張を有するものが好ましい。1個以上の連続的または非連続的アミノ酸の置換の場合には、置換アミノ酸が「同等な」アミノ酸によって置き換えられている置換が好ましい。「同等なアミノ酸」という表現は、本明細書では、対応する抗体の生物活性を本質的に変更することなくしかしながら基本構造のアミノ酸の1つで置換することができ、かつ後で、特に実施例で定義されるような任意のアミノ酸を示すものである。これらの同等なアミノ酸は、それらが置換されるアミノ酸との構造的相同性が、または様々な抗体間で実施することができる生物活性の比較試験の結果に基づいて決定することができる。

40

【0039】

例えば、対応する変更された抗体の生物活性に大きな変更を生じることなく行うことができる置換の可能性が挙げられる。

【0040】

非制限的例として、下表2に、変更された抗体の生物活性が保存されると考えられる置換の可能性を示す。逆置換も、当然のことながら同一条件では可能である。

【0041】

50

【表 2】

表 2

元の残基	置換
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

10

20

30

【0042】

ここで、本発明は、自然状態の抗体に関するものではなく、すなわち、抗体は自然環境中にはなく、天然供給源から精製によって単離または得ることができ、あるいは遺伝学組換えまたは化学的合成により得ることができ、抗体はその上更に記載されるように非天然アミノ酸を含むことができることを理解しなければならない。

40

【0043】

また、上記のように、本発明は、更に詳細には、拮抗薬活性を有するキメラおよび/またはヒト化二価抗体、または任意の二価の機能性断片もしくは誘導体に関することも理解しなければならない。従来技術の二価抗体は、作動薬または部分作動薬である。上記のように変更されたヒンジを包含する、すなわち配列番号56、57または21のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を包含する本発明のモノクローナル抗体は、新規であり、下記の実施例から明らかになるようにこのような変更されたヒンジのないキメラまたはヒト化

50

抗体 2 2 4 G 1 1 と比較して改良された拮抗薬活性を有するという特徴を提供する。

【 0 0 4 4 】

従来技術とは反対に、発明者らは、抗体のフォーマットを変更することなしに改良された拮抗薬活性を得ている。実際に、抗体 5 D 5 によって表される最近の従来技術では、拮抗薬活性を生成するには、一価の抗体断片を開発する必要があった。本願明細書では、本発明のヒンジを用いることによって、拮抗薬活性が増加した完全な二価抗体を得ることが初めて可能となり、これは一般的知識に反することである。

【 0 0 4 5 】

好ましい実施形態では、本発明の抗体は、配列番号 2 2 ~ 2 8 および 5 8 ~ 7 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 2 2 ~ 2 8 および 5 8 ~ 7 2 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を有する配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【 0 0 4 6 】

更に明確にするために、下表 3 および 4 に、本発明の様々な好ましいヒンジのアミノ酸およびヌクレオチド配列を再編成する。

【 0 0 4 7 】

【 表 3 】

表 3

配列番号	アミノ酸	配列番号	ヌクレオチド
22	RKCCVECP	29	AGGAAGTGCTGTGTGGAGTGCCCCCCTGCCCA
23	PRDCGCKPCICT	30	CCCCGGGACTGTGGGTGCAAGCCTTGCAATTTGTACC
24	PKSCGCKPCICT	31	CCCAAGAGCTGTGGGTGCAAGCCTTGCAATTTGTACC
25	PKSCGCKPCICP	32	CCAAAGAGCTGCGGCTGCAAGCCTTGTATCTGTCCC
26	PRDCGCKPCPPCP	33	CCACGGGACTGTGGCTGCAAGCCTGCCCTCCGTGTCCA
27	PRDCGHTCPPCP	34	CCCAGAGACTGTGGGTGTCACACCTGCCCTCCTTGTCT
28	PKSCDCHCPPCP	35	CCAAAAGCTGCGATTGCCACTGTCTCCATGTCCA

【 0 0 4 8 】

【表 4】

表 4

配列番号	アミノ酸	配列番号	ヌクレオチド
58	CKSCDKTHTCPPCP	73	TGCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTGCCCT
59	PCSCDKTHTCPPCP	74	CCCTGCAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTGCCCT
60	PKCCDKTHTCPPCP	75	CCCAAGTGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTGCCCT
61	PKSCCKTHTCPPCP	76	CCTAAGAGCTGTTGCAAGACCCACACCTGTCCCCCTGCCCT
62	PKSCDCTHTCPPCP	77	CCCAAGAGCTGCGACTGCACCCACACCTGTCCCCCTGCCCT
63	PKSCDKCHTCPPCP	78	CCCAAGAGCTGCGACAAGTGCCACACCTGTCCCCCTGCCCT
64	PKSCDKTHCCPPCP	79	CCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACTGCTGTCCCCCTGCCCT
65	KCDKTHTCPPCP	80	AAGTGCACAAGACCCACACCTGTCCCCCTGCCCT
66	PKSCDCHTCPPCP	81	CCCAAGAGCTGCGACTGCCACACCTGTCCCCCTGCCCT
67	PKSCDCTHCPPCP	82	CCCAAGAGCTGCGACTGCACCCACTGCCCCCTGCCCT
68	PCSCCKHTCPPCP	83	CCCTGCAGTGCAAGCACACCTGTCCCCCTGCCCT
69	PSCCTHTCPPCP	84	CCTAGTGCTGCACCCACACCTGTCCCCCTGCCCT
70	PSCDKHCCPPCP	85	CCCAGTGCGACAAGCACTGCTGCCCCCTGCCCT
71	PKSCTCPPCP	86	CCCAAGAGCTGCACCTGTCCCCTTGTCT
72	PKSCDKVCEPPCP	87	CCCAAGAGCTGCGATAAGTGGTGGAGTGCCCCCTTGTCT

10

20

【0049】

第一の方法によれば、抗体はその重鎖配列によって定義される。更に詳細には、本発明の抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体の1つは、配列番号1～3のアミノ酸配列を含んでなるCDRから選択される少なくとも1種類のCDRを含んでなる重鎖を含んでなることを特徴とする。

30

【0050】

上記配列は、下記の配列である：

配列番号1：GYIFTAYT

配列番号2：IKPNGLA

配列番号3：ARSEITTEFDY。

【0051】

好ましい態様によれば、本発明の抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体の1つは、少なくとも1つ、好ましくは2つ、最も好ましくは3つのCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3から選択されるCDRを含んでなる重鎖を含んでなり、

CDR-H1は配列番号1のアミノ酸配列を含んでなり、

CDR-H2は配列番号2のアミノ酸配列を含んでなり、

CDR-H3は配列番号3のアミノ酸配列を含んでなる。

40

【0052】

第二の方法では、抗体はその軽鎖配列によって現在、定義される。更に詳細には、本発明の第二の特定態様によれば、抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体の1つは、配列番号5～7のアミノ酸配列を含んでなるCDRから選択される少なくとも1つのCDR

50

を含んでなる軽鎖を含んでなることを特徴とする。

【0053】

上記配列は、下記の配列である：

配列番号5：E S V D S Y A N S F

配列番号6：R A S

配列番号7：Q Q S K E D P L T。

【0054】

もう一つの好ましい態様によれば、本発明の抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体の1つは、少なくとも1つ、好ましくは2つ、最も好ましくは3つのCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3から選択されるCDRを含んでなる軽鎖を含んでなり、

CDR-L1は配列番号5のアミノ酸配列を含んでなり、

CDR-L2は配列番号6のアミノ酸配列を含んでなり、

CDR-L3は配列番号7のアミノ酸配列を含んでなる。

10

【0055】

本発明によるモノクローナル抗体を分泌することができるネズミハイブリドーマ、特にネズミ起源のハイブリドーマを、2007年3月14日にCNCM (Institut Pasteur, Paris, France) にCNCM I - 3731の番号で寄託した。

【0056】

本願明細書では、IgG1は、好ましくはエフェクター機能、最も好ましくはADCCおよびCDCを得る上で好ましい。

20

【0057】

当業者であれば、エフェクター機能としては、例えば、C1q結合、補体依存性細胞傷害性(CDC)、Fc受容体結合、抗体-依存性細胞媒介細胞傷害性(ADCC)、貪食作用、および細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体; BCR)の下方制御(down regulation)が挙げられる。

【0058】

本発明による抗体は、好ましくは特にネズミ、キメラまたはヒト化起源の特異的モノクローナル抗体であり、それは当業者に周知の標準的方法に準じて得ることができる。

【0059】

一般に、モノクローナル抗体またはそれらの機能性断片もしくは誘導体、特にネズミ起源のものの調製のためには、マニュアル「抗体」(Harlow and Lane, 抗体: 実験室便覧 (Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) に詳細に記載されている手法またはKohlerおよびMilstein (Nature, 256:495-497, 1975) によって報告されているハイブリドーマからの調製の手法を参照することができる。

30

【0060】

本発明によるモノクローナル抗体は、例えば、c-Met、または本発明によるモノクローナル抗体によって特異的に認識されるエピトープを含むその断片の1つに対して免疫した動物細胞から得ることができる。前記c-Metまたはその断片の1つは、特にc-MetをコードするcDNA配列に含まれる核酸配列を用いて開始される遺伝学的組換えによってまたはc-Metのペプチド配列に含まれるアミノ酸の配列から開始されるペプチド合成によって通常の作業方法に準じて産生させることができる。

40

【0061】

本発明によるモノクローナル抗体は、例えば、c-Metまたは本発明によるモノクローナル抗体によって特異的に認識されるエピトープを含むその断片の1つが予め固定されているアフィニティーカラム上で精製することができる。更に詳細には、前記モノクローナル抗体は、プロテインAおよび/またはG上でのクロマトグラフィーの後に、残留タンパク質混入物並びにDNAおよびLPSの除去を目的とするイオン交換クロマトグラフィーを行いまたは行わず、それ自体の二量体または他のマルチマーの存在による潜在的集合体を除去するためのSephacrylゲル上での排除クロマトグラフィーを行うまたは

50

行わないことによって、精製することができる。更に一層好ましい方法では、これらの手法のすべてを同時または連続的に用いることができる。

【0062】

本発明の抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、好ましくはキメラ抗体からなる。

【0063】

キメラ抗体とは、所定の種の抗体由来の天然可変（軽鎖および重鎖）領域を前記所定の種とは異種（例えば、マウス、ウマ、ウサギ、イヌ、ウシ、ニワトリなど）の抗体の軽鎖および重鎖定常領域と組み合わせて含む抗体を示すものである。

【0064】

本発明によるキメラ型の抗体またはそれらの断片は、遺伝学的組換えの手法を用いることによって調製することができる。例えば、キメラ抗体は、プロモーターと、本発明による非ヒト、特にネズミのモノクローナル抗体の可変領域をコードする配列と、ヒト抗体の定常領域をコードする配列とを含む組換えDNAをクローニングすることによって産生させることができる。このような組換え遺伝子によってコードされる本発明のキメラ抗体は、例えば、マウス-ヒトキメラであり、この抗体の特異性はネズミDNA由来の可変領域によって決定され、そのアイソタイプはヒトDNA由来の定常領域によって決定される。キメラ抗体の調製方法については、例えば、Verhoeyn et al. (BioEssays, 8:74, 1988)、Morrisson et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6851-6855, 1984)、または米国特許第4,816,567号明細書の文献を参照することができる。

【0065】

更に詳細には、前記抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体は、配列番号46のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号46の配列と少なくとも80%の同一性を有する配列を含んでなる配列のキメラ重鎖可変ドメインを含んでなる。

配列番号46: EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYIFRAYT
MHWVRQSLGESLDWIGGIKPNNGLANYNQKFKGKATLTVD
KSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYCARSEITTEFDYWGQGTAL
LTVSS。

【0066】

更に詳細には、前記抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体は、配列番号47のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号47の配列と少なくとも80%の同一性を有する配列を含んでなる配列のキメラ軽鎖可変ドメインを含んでなる。

配列番号47: DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYAN
NSFMHWYQQKPKGQPPKLLIYRASNLLESGLPARFSGSGSRT
DFTLTINPVEADDVATYYCQQSKEDPLTFGSGTKLEMKR。

【0067】

更に詳細には、本発明による[224G11][IgG2chim]と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号46のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号47のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号22のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【0068】

本願明細書において、角括弧の使用は必要なく、例えば、[224G11][IgG2chim]という表示は224G11IgG2chimと同一であると考えなければならない。同様に、抗体がネズミ抗体であることを示すには、ネズミという表現またはmという文字を加えることができ、抗体がキメラ抗体であることを示すには、chimという表現またはcという文字を加えることができ、抗体がヒト化抗体であることを示すには、hum、hz、Hzという表現またはhという文字を加えることができる。一例として、キメラ抗体224G1IgG2は、c224G11IgG2、c224G11[IgG2]、c[224G11]IgG2、c[224G11][IgG2]、224G11IgG

10

20

30

40

50

2 c h i m、2 2 4 G 1 1 [I g G 2 c h i m]、[2 2 4 G 1 1] I g G 2 c h i m または [2 2 4 G 1 1] [I g G 2 c h i m] と表すことができる。

【 0 0 6 9 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [T H 7 c h i m] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【 0 0 7 0 】

本願明細書において、表示 T H 7 は、C 7 6 - 9 または T H 7 C 7 6 - 9 と同一であると考えるなければならない。符号 は欠失を意味する。

【 0 0 7 1 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [M H c h i m] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【 0 0 7 2 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [M U P 9 H c h i m] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【 0 0 7 3 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [M M C H c h i m] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【 0 0 7 4 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [C 1] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【 0 0 7 5 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [C 2] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【 0 0 7 6 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [C 3] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号 6 0 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【 0 0 7 7 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [C 5] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【 0 0 7 8 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [C 6] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、

10

20

30

40

50

および配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【 0 0 7 9 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [C 7] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【 0 0 8 0 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [C 9] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

10

【 0 0 8 1 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [1 - 3] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【 0 0 8 2 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [C 7 6] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

20

【 0 0 8 3 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [C 6 9] と命名された好ましい抗体またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号 6 7 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【 0 0 8 4 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [C 2 5 - 7] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号 6 8 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

30

【 0 0 8 5 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [C 5 2 - 6] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号 6 9 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【 0 0 8 6 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [C 9 2 - 7] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号 7 0 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

40

【 0 0 8 7 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [5 - 6 - 7 - 8] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【 0 0 8 8 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [I g G 1 / I g G 2] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖

50

可変ドメイン、および配列番号72のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【0089】

本発明の抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、好ましくはヒト抗体からなる。

【0090】

「ヒト抗体」という用語は、ヒト免疫グロブリン配列由来の1以上の可変および定常領域を有するすべての抗体を包含する。好ましい実施形態では、すべての可変および定常ドメイン（または領域）は、ヒト免疫グロブリン配列（完全ヒト抗体）に由来する。換言すれば、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列由来の（存在するとすれば）可変および定常領域を有する、すなわちヒトによって産生される抗体のアミノ酸配列に対応するおよび/または当業者に知られているヒト抗体を作成する任意の手法を用いて作成されたアミノ酸配列を有する任意の抗体を包含する。

10

【0091】

一実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、トランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから得られる、不死化細胞に融合したヒト重鎖導入遺伝子と軽鎖導入遺伝子とを含んでなるゲノムを有するB細胞を包含するハイブリドーマによって産生される。

【0092】

このようなトランスジェニックマウスの例としては、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の大きな断片を含んでなり、マウス抗体産生を欠いている遺伝子工学的処理をしたマウス系統であるXENOMOUSE（商標）を挙げることができる（Green et al., 1994, Nature Genetics, 7:13-21）。XENOMOUSE（商標）は、完全ヒト抗体の成人様ヒトレパートリーを産生し、抗原特異的ヒトモノクローナル抗体を生成する。第二世代のXENOMOUSE（商標）は、ヒト抗体レパートリーの約80%を含んでいる（Green & Jakobovits, 1998, J. Exp. Med., 188:483-495）。

20

【0093】

ファージディスプレイ法のような当業者に知られている任意の他の手法を、本発明によるヒト抗体の生成に用いることもできる。

【0094】

本発明の抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、好ましくはヒト化抗体からなっている。

30

【0095】

「ヒト化抗体」という表現は、非ヒト起源の抗体由来のCDR領域を含む抗体であって、抗体分子の他の部分は1個（または数個）のヒト抗体に由来する抗体を示すことを意味する。更に、その骨格セグメント残基（FRと呼ばれる）の幾つかは結合親和性を保存するために変更することができる（Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988）。

【0096】

本発明によるヒト化抗体またはそれらの断片は、当業者に知られている手法によって調製することができる（例えば、文献Singer et al., J. Immun. 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10: 1-142, 1992、またはBebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992に記載されているもの）。

40

【0097】

他のヒト化法は当業者に知られており、例えば、特許出願EP0451261号明細書、EP0682040号明細書、EP09127号明細書、EP0566647号明細書またはUS5,530,101号明細書、US6,180,370号明細書、US5,585,089号明細書およびUS5,693,761号明細書にProtein Design Lab (PDL)によって記載された「CDRグラフティング」法である。下記

50

の特許出願明細書も挙げることができる：US 5, 639, 641号明細書、US 6, 054, 297号明細書、US 5, 886, 152号明細書およびUS 5, 877, 293号明細書。

【0098】

更に詳細には、前記抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体は、配列番号4のアミノ酸配列を含んでなる配列のヒト化重鎖可変ドメインまたは最適アラインメント後に配列番号4の配列と少なくとも80%の同一性を有する配列を含んでなる。

配列番号4：QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIF TAYTM
HWVRQAPGQGLEWMGWIKPNNGLANYA QKFQGRVTMTRDT
SISTAYMELSR LRSDDTAVYYCARSEITTEFDYWGQGT L V
TVSS。

10

【0099】

更に詳細には、前記抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体は、配列番号8、9または10のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号8、9または10の配列と少なくとも80%の同一性を有する配列を含んでなる配列の群から選択されるヒト化重鎖可変ドメインを含んでなる。

配列番号8：DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVD SYAN
SFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGSRTD
FTLTISSSLQAEDVAVYYCQQSKEDPLTFGGG TKVEIKR、

配列番号9：DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVD SYAN
SFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGS GTD
FTLTISSSLQAEDVAVYYCQQSKEDPLTFGGG TKVEIKR、

20

配列番号10：DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVD SYA
NSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGS GT
DFTLTISSSLQAEDVAVYYCQQSKEDPLTFGGG TKVEIKR。

【0100】

更に詳細には、本発明による[224G11][IgG2H α 1]と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号4のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号8のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号22のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

30

【0101】

もう一つの態様では、本発明による[224G11][IgG2H α 2]と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号4のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号9のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号22のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【0102】

もう一つの態様では、本発明による[224G11][IgG2H α 3]と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号4のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号10のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号22のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

40

【0103】

もう一つの態様では、本発明による[224G11][TH7H α 1]と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号4のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号8のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号28のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【0104】

もう一つの態様では、本発明による[224G11][TH7 α 2]と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号4のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号9のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号28のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

50

【 0 1 0 5 】

もう一つの態様では、本発明による [2 2 4 G 1 1] [T H 7 H z 3] と命名された好ましい抗体、またはその二価の機能性断片もしくは誘導体は、配列番号 4 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン、および配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含んでなるヒンジ領域を含んでなる。

【 0 1 0 6 】

もう一つの態様では、本発明の抗体は、それぞれそれらの全重鎖および全軽鎖によって記載することができる。

【 0 1 0 7 】

例えば、本発明の抗体 [2 2 4 G 1 1] [I g G 2 c h i m] は、配列番号 5 0 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 5 0 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 5 2 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 5 2 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

10

【 0 1 0 8 】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [2 2 4 G 1 1] [T H 7 c h i m] は、配列番号 5 1 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 5 1 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 5 2 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 5 2 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

20

【 0 1 0 9 】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [2 2 4 G 1 1] [C 1] は、配列番号 8 8 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 8 8 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 5 2 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 5 2 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

【 0 1 1 0 】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [2 2 4 G 1 1] [C 2] は、配列番号 8 9 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 8 9 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 5 2 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 5 2 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

30

【 0 1 1 1 】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [2 2 4 G 1 1] [C 3] は、配列番号 9 0 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 9 0 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 5 2 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 5 2 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

【 0 1 1 2 】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [2 2 4 G 1 1] [C 5] は、配列番号 9 1 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 9 1 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 5 2 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 5 2 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

40

【 0 1 1 3 】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [2 2 4 G 1 1] [C 6] は、配列番号 9 2 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 9 2 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 5 2 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 5 2 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

50

【 0 1 1 4 】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [2 2 4 G 1 1] [C 7] は、配列番号 9 3 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 9 3 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 5 2 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 5 2 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

【 0 1 1 5 】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [2 2 4 G 1 1] [C 9] は、配列番号 9 4 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 9 4 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 5 2 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 5 2 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

10

【 0 1 1 6 】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [2 2 4 G 1 1] [1 - 3] は、配列番号 9 5 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 9 5 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 5 2 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 5 2 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

【 0 1 1 7 】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [2 2 4 G 1 1] [C 7 6] は、配列番号 9 6 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 9 6 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 5 2 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 5 2 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

20

【 0 1 1 8 】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [2 2 4 G 1 1] [C 6 9] は、配列番号 9 7 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 9 7 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 5 2 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 5 2 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

30

【 0 1 1 9 】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [2 2 4 G 1 1] [C 2 5 - 7] は、配列番号 9 8 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 9 8 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 5 2 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 5 2 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

【 0 1 2 0 】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [2 2 4 G 1 1] [C 5 2 - 6] は、配列番号 9 9 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 9 9 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 5 2 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 5 2 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

40

【 0 1 2 1 】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [2 2 4 G 1 1] [C 9 2 - 7] は、配列番号 1 0 0 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 1 0 0 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 5 2 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 5 2 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

【 0 1 2 2 】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [2 2 4 G 1 1] [5 - 6 - 7 - 8] は、配列

50

番号 100 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 100 の配列と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 52 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 52 の配列と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

【0123】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [224G11] [IgG1/IgG2] は、配列番号 102 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 102 の配列と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 52 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 52 の配列と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

10

【0124】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [224G11] [IgG2Hz1] は、配列番号 36 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 36 の配列と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 38 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 38 の配列と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

【0125】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [224G11] [IgG2Hz2] は、配列番号 36 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 36 の配列と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 39 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 39 の配列と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

20

【0126】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [224G11] [IgG2Hz3] は、配列番号 36 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 36 の配列と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 40 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 40 の配列と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

【0127】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [224G11] [TH7Hz1] は、配列番号 37 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 37 の配列と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 38 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 38 の配列と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

30

【0128】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [224G11] [TH7Hz2] は、配列番号 37 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 37 の配列と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 39 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 39 の配列と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

40

【0129】

もう一つの例としては、本発明の抗体 [224G11] [TH7Hz3] は、配列番号 37 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 37 の配列と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含んでなる完全重鎖、および配列番号 40 のアミノ酸配列または最適アラインメント後に配列番号 40 の配列と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含んでなる完全軽鎖を含んでなる。

【0130】

本発明による他の抗体またはその誘導体の例は、配列番号 88 ~ 102 (対応するヌクレオチド配列は、配列番号 103 ~ 117) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる完全重鎖を含んでなる。

50

【0131】

本発明による抗体の「機能性断片」とは、詳細には、Fv、scFv（sc：一本鎖）、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc断片または二重特異性抗体のような抗体断片、またはポリ(エチレン)グリコール(「PEG化」)(Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEGまたはFab'-PEGと呼ばれるペグ化断片)(「PEG」：ポリ(エチレン)グリコール)のようなポリ(アルキレン)グリコールの付加などの化学修飾によって、もしくはリポソームへの組込みによって半減期が増加された任意の断片を示すことを意味し、前記断片は、本発明による配列番号1～3および5～7の配列の特徴的なCDRの少なくとも1つを有し、特に、一般的には、詳細にはc-Metを認識して結合し、必要な場合には、c-Metの活性を阻害する能力のような、それが由来する抗体のたとえ部分的であっても活性を示すことができる。

10

【0132】

好ましくは、前記機能性断片は、それらが由来する抗体の重または軽可変鎖の部分配列から構成されまたは含んでなり、前記部分配列は、それが由来する抗体と同一の結合特異性、およびc-Metに関して十分な親和性、好ましくは、それが由来する抗体の親和性の少なくとも1/100、より好ましくは少なくとも1/10を保持するに十分なものである。このような機能性断片は、それが由来する抗体の配列の最低でも5つのアミノ酸、好ましくは6、7、8、9、10、12、15、25、50および100の連続するアミノ酸を含む。

【0133】

好ましくは、これらの機能性断片は、Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、F(ab')、scFv-Fc型または二重特異性抗体の断片であり、一般にそれらが由来する抗体と同じ結合特異性を有する。本発明の更に好ましい実施形態では、これらの断片はF(ab')₂断片のような二価の断片の中から選択される。

20

本発明によれば、本発明の抗体断片は、ペプシンまたはパピンのような酵素による消化および/または化学的還元によるジスルフィド橋の開裂による消化のような方法によって上記のような抗体から出発して得ることができる。もう一つの方法では、本発明に含まれる抗体断片は、同様に当業者に周知の遺伝子組換えの手法によって、または例えばApplied Biosystems社などによって供給されるような自動ペプチド合成装置によるペプチド合成によって得ることができる。

30

【0134】

「二価の断片」とは、2個のアームと、更に詳細にはF(ab')₂断片とを含んでなる任意の抗体断片と理解されねばならない。

【0135】

本発明による抗体の「誘導體」とは、タンパク質スカフォールドと、結合能を保持するために元の抗体から選択される少なくとも1種のCDRとを含んでなる結合タンパク質を意味する。このような化合物は当業者に周知であり、下記の明細書で更に詳細に説明される。

【0136】

更に詳細には、本発明による抗体、またはその機能性断片もしくは誘導體は、前記誘導體が元の抗体のパラトープ認識特性が保存されるように少なくとも1つのCDRがグラフトされたスカフォールドを含んでなる結合タンパク質であることを特徴とする。

40

【0137】

本発明に記載の6種のCDR配列中1または数種の配列は、タンパク質スカフォールド上に存在することができる。この場合、このタンパク質スカフォールドはグラフトされるCDRの適当な折りたたみを有するタンパク質主鎖を再生するので、それらの抗原パラトープ認識特性を保持することができる。

【0138】

当業者であれば、元の抗体から選択される少なくとも1つのCDRをグラフトすることができるタンパク質スカフォールドを選択する方法を知っている。更に詳細には、選択さ

50

れるこのようなスカフォールドは、下記のような幾つの特徴を示すことが知られている (Skerra A., J. Mol. Recogn., 13, 2000, 167-187) :

系統発生的保存が良好なこと

周知の三次元分子構成を有する強固な構造 (例えば、結晶学またはNMR)

サイズが小さいこと

転写後修飾がないかまたはごく僅かであること

産生、発現および精製が容易なこと。

【0139】

このようなタンパク質スカフォールドは、限定なしに、フィブロネクチンおよび優先的には第10フィブロネクチンIII型ドメイン(FNfn10)、リボカリン、アンチカリン (Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74(4):257-75)、ブドウ球菌プロテインAのドメインB由来のプロテインZ誘導体、チオレドキシンAまたは「アンキリン反復」(Kohl et al., PNAS, 2003, vol. 100, No.4, 1700-1705)、「アルマジロ反復」、「ロインリッチ反復」または「テトラトリコペプチド反復」のような反復ドメインを有する任意のタンパク質からなる群から選択される構造であることができる。

10

【0140】

毒素 (例えば、サソリ、昆虫、植物、軟体動物毒素など) 由来のスカフォールド、またはニューロン型一酸化窒素シンターゼのタンパク質阻害剤(PIN)を挙げることもできる。

【0141】

このようなハイブリッド構造の非限定的例としては、抗CD4抗体、すなわち13B8.2抗体のCDR-H1(重鎖)のPINの露出したループの1つへの挿入を挙げるができる。得られた結合タンパク質の結合特性は、元の抗体と同様のままである (Bes et al., BBRC 343, 2006, 334-344)。ネオカルジノスタチンのループ上での抗リゾチームVHH抗体のCDR-H3(重鎖)のグラフトを挙げることもできる (Nicaise et al., 2004)。

20

【0142】

上記のように、このようなタンパク質スカフォールドは、元の抗体由来の1~6種のCDRを含んでなることができる。好ましい実施形態では、何らの限定なしに、当業者であれば重鎖から少なくとも1つのCDRを選択するであろうし、前記重鎖は特に抗体特異性に関係していることが知られている。目的とするCDRの選択は、既知の方法によることが当業者には明らかであろう (BES et al., FEBS letters 508, 2001, 67-74)。

30

【0143】

証拠として、これらの例は制限的ではなく、知られているまたは報告されている任意の他のスカフォールドを本明細書に包含しなければならない。

【0144】

新規な態様によれば、本発明は、下記の核酸：

a) 本発明による抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体の1つをコードする核酸、DNAまたはRNA、

b) 配列番号11、配列番号12、配列番号13の配列と、配列番号15、配列番号16および配列番号17の配列とを含んでなる核酸、

40

c) 配列番号14と、配列番号18、19または20の配列とを含んでなる核酸配列、

d) b)またはc)で定義された核酸の対応するRNA核酸、

e) a)、b)およびc)で定義された核酸の相補性核酸、および

f) 配列番号11~13および15~17の配列のCDRの少なくとも1つと高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズすることができる少なくとも18個のヌクレオチドの核酸

から選択されることを特徴とする単離核酸に関する。

【0145】

50

更にもう一つの態様によれば、本発明は、下記の核酸：

本発明による抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体の1つをコードする核酸、DNAまたはRNAであって、前記抗体のヒンジ領域をコードする核酸配列が、配列番号29～35および配列番号73～87の配列からなる群から選択される配列を含んでなりまたは有するもの

から選択されることを特徴とする単離核酸に関する。

【0146】

核酸、ヌクレック(nucleic)または核酸配列、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド配列、ヌクレオチド配列、本発明で同じように用いられる用語は、修飾または未修飾であり、核酸の断片または領域を画定することができ、非天然(unnatural)ヌクレオチドを含むまたは含まない、かつ二本鎖DNA、一本鎖DNA並びに前記DNAの転写産物にちょうど対応させることができるヌクレオチドの正確な連鎖を示すものと解釈される。

10

【0147】

本明細書では、本発明は、天然染色体環境、すなわち天然状態でのヌクレオチド配列に関するものではないことも理解しなければならない。本発明は、単離されおよび/または精製された、すなわち、例えば、コピーによって直接または間接的に選択された配列に関するものであり、その配列の環境は少なくとも部分的に修飾されている。従って、同様に本明細書では、例えば宿主細胞の遺伝学組換えによって得られるまたは化学合成によって得られる単離核酸を示すものと解釈される。

20

【0148】

高ストリンジェンシー条件下でのハイブリダイゼーションは、温度条件およびイオン濃度条件は、相補性DNAの2つの断片の間のハイブリダイゼーションを維持できるような方法で選択されることを示している。例えば、上記ポリヌクレオチド断片の画定を目的とするハイブリダイゼーション段階の高ストリンジェンシー条件は、有利には次の通りである。

【0149】

DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションは、(1)5×SSC(1×SSCは、0.15M NaCl + 0.015Mクエン酸ナトリウム溶液に相当する)、50%ホルムアミド、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、10×Denhardt溶液、5%デキストラン硫酸および1%サケ精子DNAを含むリン酸緩衝液(20mM、pH7.5)中で42℃で、3時間の予備ハイブリダイゼーション、(2)プローブのサイズによって変化する温度(すなわち、プローブサイズ>100ヌクレオチドでは42℃)で20時間の実際のハイブリダイゼーションの後、2×SSC+2%SDS中で20分、20分間の2回の洗浄、0.1×SSC+0.1%SDS中で20分、20分間の1回の洗浄の、2段階で行う。最後の洗浄は、0.1×SSC+0.1%SDS中でプローブサイズ>100ヌクレオチドについては60℃で30分間行った。画定したサイズのポリヌクレオチドについて上記した高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を、Sambrook et al.の教示(1989,分子クローニング:実験室便覧(Molecular cloning:a laboratory manual),第2版,Cold Spring Harbor)に準じて、当業者は、一層大きなまたは一層小さなサイズのオリゴヌクレオチドに適合させることができる。

30

40

【0150】

本発明は、本発明による核酸を含んでなるベクターにも関する。

【0151】

本発明は、特に本発明によるヌクレオチド配列を含むクローニングおよび/または発現ベクターを目的とする。

【0152】

本発明によるベクターは、好ましくは決められた宿主細胞で翻訳されたヌクレオチド配列を発現および/または分泌することができる成分を含む。従って、ベクターは、プロモ

50

クター、翻訳の開始および終止シグナル、並びに適当な転写調節領域を含んでいなければならない。ベクターは、宿主細胞で安定的に保持されなければならない、かつ場合によっては翻訳タンパク質の分泌を指定する特定のシグナルを有することができる。これらの様々な成分は、用いられる宿主細胞の機能によって、当業者により選択され、最適化される。この趣意で、本発明によるヌクレオチド配列は、選択された宿主の自律性の複製ベクターに挿入することができ、または選択された宿主の組み込みベクターであることができる。

【0153】

このようなベクターは、当業者によって現在用いられている方法により調製され、得られるクローンをリポフェクション、電気穿孔、熱ショックまたは化学的方法のような標準的方法によって適当な宿主に導入することができる。

【0154】

本発明によるベクターは、例えば、プラスミドまたはウイルス起源のベクターである。それらは、宿主細胞を形質転換し、本発明によるヌクレオチド配列をクローニングまたは発現させるのに有用である。

【0155】

本発明は、本発明によるベクターによって形質転換されたまたはを含んでなる宿主細胞も含んでなる。

【0156】

宿主細胞は、原核生物または真核生物系、例えば、細菌細胞、更には酵母細胞または動物細胞、詳細には哺乳類細胞から選択することができる。昆虫細胞または植物細胞を用いることもできる。

【0157】

本発明は、本発明によって形質転換された少なくとも1つの細胞を含んでなるヒト以外の動物にも関する。

【0158】

もう一つの態様によれば、本発明の主題は、本発明による抗体、またはその機能性断片の1つを産生する方法であって、下記の段階：

a) 培地および適当な培養条件での本発明による宿主細胞の培養、および

b) 培地または前記培養細胞から出発して産生した前記抗体、またはそれらの機能性断片の1つの回収

を含んでなることを特徴とする方法である。

【0159】

本発明による形質転換細胞は、本発明による組換えポリペプチドの調製方法に用いることができる。組換え形態での本発明によるポリペプチドの調製方法であって、ベクターおよび/または本発明によるベクターによって形質転換した細胞を用いることを特徴とする方法は、それら自身本発明に含まれる。好ましくは、本発明によるベクターによって形質転換した細胞は、前記ポリペプチドを発現させる条件下で培養され、前記組換えペプチドが回収される。

【0160】

上記のように、宿主細胞は、原核生物または真核生物系から選択することができる。詳細には、本発明によるヌクレオチド配列を特定し、このような原核生物または真核生物系での分泌を促進することができる。従って、このような配列を有する本発明によるベクターは、分泌しようとする組換えタンパク質の産生に好都合に用いることができる。要するに、目的とするこれらの組換えタンパク質の精製は、宿主細胞の内部よりはむしろ細胞培養物の上清に含まれているという事実によって容易になる。

【0161】

同様に、本発明によるポリペプチドを化学合成によって調製することもできる。このような調製方法も、同様に本発明の主題である。当業者であれば、化学合成の方法、例えば、固相を用いる手法 [Steward et al., 1984, 固相ペプチド合成 (Solid phase peptide synthesis), Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 第2版 (1984)] または断片

10

20

30

40

50

の縮合によるまたは溶液での古典的合成による部分固相を用いる手法を知っている。化学合成によって得ることができかつ対応する非天然アミノ酸を含むことができるポリペプチドも、本発明に包含される。

【0162】

本発明による方法によって得ることができる抗体、またはそれらの機能性断片もしくは誘導体の1つも、同様に本発明に包含される。

【0163】

本発明は、医薬としての本発明の抗体にも関する。

【0164】

本発明は、また本発明による抗体、またはその機能性断片の1つからなる、好ましくは賦形剤および/または薬学上許容可能なビヒクルと混合した化合物を活性成分として含んでなる医薬組成物にも関する。

10

【0165】

本発明のもう一つの補完的实施形態は、同時、単独または逐次使用の組合せ物として抗腫瘍抗体をさらに含んでなる上記のような組成物である。

【0166】

最も好ましくは、前記第二の抗腫瘍抗体は、抗IGF-IR、抗EGFR、抗HER2/neu、抗VEGFR、抗VEGFなど、当業者に知られている抗体または任意の他の抗腫瘍抗体から選択することができる。上記抗体の機能性断片または誘導体の第二の抗体としての使用が本発明の部分であることは明らかである。

20

【0167】

最も好ましい抗体としては、例えば、抗体C225(アービタックス(Erbix))のような抗EGFR抗体が選択される。

【0168】

「同時使用」は、本発明による組成物の2種類の化合物を単一かつ同一医薬形態で投与する意味と理解される。

【0169】

「単独使用」は、本発明による組成物の2種類の化合物を別個の医薬形態で同時に投与する意味と理解される。

【0170】

「逐次使用」は、本発明による組成物の2種類の化合物をそれぞれ別個の医薬形態で連続的に投与する意味と理解される。

30

【0171】

一般的やり方では、本発明による組成物は、癌の治療効果をかなり増加させる。換言すれば、本発明による抗c-Met抗体の治療効果は、細胞傷害性剤の投与によって予想外に強化される。本発明による組成物によって得られるもう一つの主要なその後の利点は、活性成分を一層低めの有効用量で用いることが可能であり、副作用、特に細胞傷害性剤の効果が出現する危険性を回避しまたは減少させることができることに関する。

【0172】

更に、本発明によるこの組成物は、予想される治療効果を一層速やかに達成することができる。

40

【0173】

本発明の組成物は、同時、単独または逐次使用の組合せ物として細胞傷害性/細胞増殖抑制剤をさらに含んでなることも特徴とすることができる。

【0174】

「抗癌治療剤」または「細胞傷害性/細胞増殖抑制剤」とは、被験者に投与したときに、被験者の身体における癌の発生を治療または予防する物質を意味する。このような薬剤の非制限的例としては、アルキル化剤、代謝拮抗薬、抗腫瘍抗生物質、有糸分裂抑制因子、クロマチン機能阻害薬、抗血管新生薬、抗エストロゲン剤、抗アンドロゲン剤または免疫調節剤が挙げられる。

50

【 0 1 7 5 】

このような薬剤は、例えば、V I D A Lの2001年版に腫瘍学および血液学の欄「細胞傷害性」に添付された化合物に当てられた頁に引用され、この文献に引用されている細胞傷害性化合物は本明細書において好ましい細胞傷害性薬剤として引用される。

【 0 1 7 6 】

更に詳細には、下記の薬剤は、本発明に好ましい。

【 0 1 7 7 】

「アルキル化剤」とは、細胞内で任意の分子、好ましくは核酸（例えば、DNA）を架橋またはアルキル化することができる任意の物質を指す。アルキル化剤の例としては、メクロレタミン、クロラムブシル（chlorambucil）、メルファラン（melphalen）、クロロヒドレート（chlorydrate）、ピポブロマン（pipobromen）、プレドニムスチン、リン酸二ナトリウム（disodic - phosphate）またはエストラムスチンなどのナイトロジェンマスタード；シクロホスファミド、アルトレタミン、トロフォスファミド、スルホホスファミドまたはイホスファミドなどのオキサザホスホリン（oxazophorin）；チオテパ、トリエチレンアミンまたはアルテトラミンなどのアジリジンまたはイミン - エチレン；カルムスチン、ストレプトゾシン、フォテムスチンまたはロムスチンなどのニトロソ尿素；プスルファン、トレオスルファンまたはインプロスルファンなどのスルホン酸アルキル；ダカルバジンなどのトリアゼン；またはシスプラチン、オキサリプラチンもしくはカルボプラチンなどの白金複合体が挙げられる。

【 0 1 7 8 】

「代謝拮抗物質」は、ある種の活性、通常はDNA合成を妨げることによって細胞増殖および/または代謝を遮断する物質をいう。代謝拮抗物質の例としては、メトトレキサート、5 - フルオロウラシル、フロクスウリジン、5 - フルオロデオキシウリジン、カペシタピン、シタラピン、フルダラピン、シトシンアラビノシド、6 - メルカプトプリン（6 - MP）、6 - チオグアニン（6 - TG）、クロロデオキシアデノシン、5 - アザシチジン、ゲムシタピン、クラドリピン、デオキシコフォルマイシンおよびペントスタチンが挙げられる。

【 0 1 7 9 】

「抗腫瘍抗生物質」とは、DNA、RNAおよび/またはタンパク質合成を防止または阻害することができる化合物をいう。抗腫瘍抗生物質の例としては、ドキソルピシン、ダウノルピシン、イダルピシン、バルルピシン、ミトキサントロン、ダクチノマイシン、ミトラマイシン、プリカマイシン、マイトマイシンC、プレオマイシンおよびプロカルバジンが挙げられる。

【 0 1 8 0 】

「有糸分裂抑制因子」は、細胞サイクルおよび有糸分裂の正常な進行を妨げる。一般に、パクリタキセルおよびドセタキセルなどの微小管阻害剤またはタキソイドは有糸分裂を阻害することができる。ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシンおよびピノレルピンなどのピンカルカロイドも、有糸分裂を阻害することができる。

【 0 1 8 1 】

「クロマチン機能阻害剤」または「トポイソメラーゼ阻害剤」は、トポイソメラーゼIまたはトポイソメラーゼIIなどの、クロマチン形成タンパク質の正常な機能を阻害する物質をいう。クロマチン機能阻害剤の例としては、トポイソメラーゼIとしては、トポテカンまたはイリノテカンのようなカンプトテシンおよびその誘導体；およびトポイソメラーゼIIとしては、エトポシド、エトポシドリン酸およびテニポシドが挙げられる。

【 0 1 8 2 】

「抗血管新生剤」とは、血管の成長を阻害する任意の薬剤、化合物、物質または因子をいう。抗血管新生剤の例としては、ラゾキシシン、マリマスタット、パチマスタット、プリノマスタット、タノマスタット、イロマスタット、CGS - 27023A、ハロフギノン、COL - 3、ネオバスタット、BMS - 275291、サリドマイド、CDC501、DMXAA、L - 651582、スクアラミン、エンドスタチン、SU5416、SU6

10

20

30

40

50

668、インターフェロン- β 、EMD121974、インターロイキン-12、IM862、アンジオスタチンおよびピタキシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0183】

「抗エストロゲン剤」または「エストロゲン拮抗剤」とは、エストロゲンの作用を減少、拮抗または阻害する物質をいう。抗エストロゲン剤の例としては、タモキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、ヨードキシフェン、アナストロゾール、レトロゾールおよびエキセメスタンが挙げられる。

【0184】

「抗アンドロゲン剤」または「アンドロゲン拮抗剤」とは、アンドロゲン作用を減少、拮抗または阻害する物質をいう。抗アンドロゲン剤の例としては、フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、スピロノラクトン、シプロテロン酢酸、フィナステリドおよびシミチジンが挙げられる。

10

【0185】

「免疫調節剤」は、免疫系を刺激する物質である。

【0186】

免疫調節剤の例としては、インターフェロン、アルデスロイキン、OCT-43、デニロイキンディフィトックス (denileukin diflitox) およびインターロイキン-2のようなインターロイキン、タソネルミンのような腫瘍壊死因子、またはレンチナン、シゾフィラン、ロキニメックス、ピドチモド、ペガデマゼ、チモペンチン、ポリI:Cもしくはレバミゾールと5-フルオロウラシルとの組合せのような他種の免疫調節剤が挙げられる。

20

【0187】

更に詳細については、当業者であれば、「Association Francaise des Enseignants de Chimie Therapeutique」によって編集された「治療化学概論 (Traite de chimie therapeutique)」という標題の便覧、第6巻、抗腫瘍薬と癌治療の展望 (Medicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers)、TEC&DOC刊、2003年を参照することができる。

【0188】

化学薬剤または細胞傷害性剤としては、例えば、ゲフィチニブまたはエルロチニブのようなすべてのキナーゼ阻害剤を挙げることができる。

30

【0189】

特に好ましい実施形態では、本発明による組合せ物としての前記組成物は、前記細胞傷害性剤が同時使用のために前記抗体に化学的にカップリングしていることを特徴とする。

【0190】

前記細胞傷害性剤と本発明による前記抗体との間のカップリングを促進するには、特にカップリングを行う2つの化合物の間にポリエチレングリコールのようなポリ(アルキレン)グリコールあるいはアミノ酸などのスペーサー分子を導入し、またはもう一つの実施形態では、本発明による前記抗体と反応することができる機能が導入されている前記細胞傷害性剤の活性誘導体を用いることが可能である。これらのカップリング法は当業者に周知であり、本明細書の説明ではこれ以上詳細には説明しない。

40

【0191】

本発明は、もう一つの態様では、前記抗体の少なくとも1つ、またはそれらの機能性断片もしくは誘導体の1つを細胞毒素および/または放射性元素と接合させることを特徴とする組成物に関する。

【0192】

好ましくは、前記毒素または前記放射性元素は、c-Metを発現する細胞の少なくとも1つの細胞活性を阻害することができ、更に好ましくは前記細胞の成長または増殖を防止し、特に前記細胞を完全に不活性化することができる。

【0193】

また、好ましくは、前記毒素は腸内細菌毒素、特にシュードモナス外毒素Aである。

50

【0194】

放射性元素（または放射性同位元素）、好ましくは治療に用いられる抗体に接合したものは、 γ 線を放射する放射性同位元素であり、好ましくはヨウ素¹³¹、イットリウム⁹⁰、金¹⁹⁹、パラジウム¹⁰⁰、銅⁶⁷、ビスマス²¹⁷およびアンチモン²¹¹である。および β 線を放射する放射性同位元素も、同様に治療に用いることができる。

【0195】

本発明による少なくとも1つの抗体、またはその機能性断片の1つに接合した毒素または放射性元素は、前記毒素または前記放射性元素を前記の少なくとも1つの抗体に、特に結合分子を導入してまたは導入せずに2個の化合物の間の共有カップリングによって結合させる任意の手段を示すものと解釈される。

10

【0196】

接合の成分のすべてまたは部分を化学（共有）、静電または非共有的に結合させる薬剤の中では、特にベンゾキノ、カルボジイミド、更に詳細にはEDC（1-エチル-3-[3-ジメチル-アミノプロピル]-カルボジイミド塩酸塩）、ジマレイミド、ジチオビス-ニトロ安息香酸（DTNB）、N-スクシンイミジルS-アセチルチオ-アセテート（SATA）、紫外線（U.V.）と反応する1以上のフェニルアジド基を有する架橋剤、および好ましくはN-[4-(アジドサリチルアミノ)ブチル]-3'-(2'-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド（APDP）、N-スクシンイミド-イル3-(2'-ピリジルジチオ)プロピオネート（SPDP）、6-ヒドラジノ-ニコチンアミド（HYNIC）を挙げることができる。

20

【0197】

カップリングのもう一つの形態であって、特に放射性元素に対するものは、二官能価イオンキレート剤の使用であることができる。

【0198】

これらのキレートの中では、金属、特に放射性金属、および免疫グロブリンを結合する目的で開発されたEDTA（エチレンジアミン四酢酸）またはDTPA（ジエチレントリアミン五酢酸）から誘導されるキレートを挙げることができる。例えば、DTPAおよびその誘導体は、炭素鎖上の様々な基によって置換し、リガンド-金属錯体の安定性および剛性を増加させることができる（Krejcarek et al. (1977); Brechbiel et al. (1991); Gansow (1991); 米国特許第4,831,175号明細書）。

30

【0199】

例えば、遊離形態または金属イオンとの錯体形態のいずれかで薬および生物学で広汎に長期間使用されているジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）およびその誘導体は、金属イオンと安定なキレートを形成しかつ癌治療における放射免疫接合体の開発のため抗体などの治療または診断目的のタンパク質とカップリングする顕著な特徴を有する（Meases et al., 1984; Gansow et al., 1990）。

【0200】

また、好ましくは、前記接合体を形成する本発明の少なくとも1つの抗体は、その機能性断片、特にscFv断片などそれらのFc成分を切断した断片から選択される。

【0201】

上記のように、本発明の好ましい実施形態では、前記細胞傷害性/細胞増殖抑制剤または前記毒素および/または放射性元素は、同時使用の目的で前記組成物の成分の少なくとも1つに化学的にカップリングされる。

40

【0202】

本発明は、上記組成物を医薬として含んでなる。

【0203】

本発明は、医薬の調製の目的で本発明による組成物の使用をさらに含んでなる。

【0204】

もう一つの態様では、本発明は、腫瘍細胞の成長および/または増殖の阻害を目的とする医薬を調製するため上記した抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体の1つ、およ

50

び/または組成物の使用を論じるものである。

【0205】

本発明のもう一つの態様は、上記の抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体の1つおよび/または組成物の使用、または癌の予防もしくは治療を目的とする医薬を調製するための上記の使用である。

【0206】

本発明には、本発明による抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体の1つ、本発明によるハイブリドーマによって産生された抗体、または本発明による組成物を、投与を必要とする患者に投与することを含んでなる、患者での腫瘍細胞の成長および/または増殖の阻害を目的とする方法も包含される。

10

【0207】

本発明は、本発明による抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体の1つ、本発明によるハイブリドーマによって産生された抗体、または本発明による組成物を、患者に投与することを含んでなる、投与を必要とする患者での癌の予防または治療方法もさらに含んでなる。

【0208】

特に好ましい態様では、前記癌は、前立腺癌、骨肉腫、肺癌、乳癌、子宮内膜癌、神経膠芽腫または結腸癌から選択される癌である。

【0209】

上記のように、本発明の利点は、HGF依存性および非依存性のMet活性化に関連した癌を治療できることである。

20

【0210】

本発明は、更にもう一つの態様では、c-Met受容体の異常存在が疑われる生物試料から出発するc-Met受容体の過剰発現または過小発現によって誘発される疾病のインビトロ診断の方法であって、前記生物試料を本発明の抗体と接触させる段階を含んでなり、必要ならば、前記抗体を標識することができることを特徴とする前記方法を包含する。

【0211】

好ましくは、前記診断方法におけるc-Met受容体の異常存在と関係している上記疾病は、癌である。

【0212】

前記抗体、またはその機能性断片の1つは、免疫接合体または標識抗体の形態で存在して、検出可能なおよび/または定量可能なシグナルが得られるようにすることができる。

30

【0213】

本発明によって標識した抗体またはそれらの機能性断片としては、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコースアミラーゼ、カルボニックアンヒドラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、リソチーム、マレートデヒドロゲナーゼ、またはグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼのような酵素で、またはビオチン、ジゴキシゲニンまたは5-プロモデオキシウリジンのような分子によって接合させることができる免疫接合体と呼ばれる抗体が挙げられる。蛍光標識を本発明による抗体またはそれらの機能性断片に接合させることもでき、特にフルオレセインおよびその誘導体、フルオロクロム、ローダミンおよびその誘導体、GFP (GFP:「緑色蛍光タンパク質」)、ダンシル、ウンベリフェロンなどが挙げられる。このような接合体において、本発明の抗体またはそれらの機能性断片は、当業者に知られている方法によって調製することができる。それらは、直接またはグルタルアルデヒドのようなポリアルデヒド、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DPTA)などのスペーサー基または結合基の介在によって、または治療用接合体について上記したようなカップリング剤の存在下にて、酵素または蛍光標識にカップリングすることができる。フルオレセインタイプの標識を含む接合体は、イソチオシアネートの反応によって調製することができる。

40

【0214】

50

他の接合体は、ルミノールおよびジオキセタンなどの化学発光標識、ルシフェラーゼおよびルシフェリンなどの生物発光標識、またはヨウ素¹²³、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹²⁶、ヨウ素¹³³、臭素⁷⁷、テクネチウム^{99m}、インジウム¹¹¹、インジウム^{113m}、ガリウム⁵⁷、ガリウム⁵⁸、ルテニウム⁹⁵、ルテニウム⁹⁷、ルテニウム¹⁰³、ルテニウム¹⁰⁵、水銀¹⁰⁷、水銀²⁰³、レニウム^{99m}、レニウム¹⁰¹、レニウム¹⁰⁵、スカンジウム⁴⁷、テルル^{121m}、テルル^{122m}、テルル^{125m}、ツリウム¹⁶⁵、ツリウム¹⁶⁷、ツリウム¹⁶⁸、フッ素¹⁸、イットリウム¹⁹⁹およびヨウ素¹³¹などの放射性標識も含むことができる。治療用の放射性同位元素を直接または上記のEDTAもしくはDTPAなどのキレート剤を介して抗体に結合させるための当業者に知られている既存の方法は、診断に用いることができる放射性元素について使用することができる。同様に、クロラミンT法によるNa[¹²⁵I][Hunter W.M. and Greenwood F.C. (1962) Nature 194:495]、Crockford et al.の手法(米国特許第4,424,200号明細書)によるテクネチウム^{99m}、またはHnatowich(米国特許第4,479,930号明細書)により記載されているようなDTPAを介した標識を挙げることができる。

10

【0215】

従って、本発明による抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体は、生物試料におけるc-Met受容体の過剰発現または過小発現、好ましくは過剰発現の検出および/または定量的方法であって、下記の段階

a) 生物試料と本発明による抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体との接触、および

20

b) ことによると形成されるc-Met/抗体複合体の証明を含んでなることを特徴とする、方法に用いることができる。

【0216】

特定の実施形態では、本発明による抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体を、生物試料におけるc-Met受容体の検出および/または定量的方法に用いて、c-Met-依存性癌の予防的および/または治療的処置の効果を観察することができる。

【0217】

更に一般的には、本発明による抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体を、c-Met受容体の発現を定性的および/または定量的に観察しなければならない任意の状況に好都合に用いることができる。

30

【0218】

好ましくは、生物試料は、血清、全血、細胞、組織試料またはヒトの生検材料などの生物学的流体によって形成される。

【0219】

任意の手続きまたは通常試験を用いて、このような検出および/または投薬を行うことができる。前記試験は、競争またはサンドイッチ試験、または抗体-抗原タイプの免疫複合体の形成に依存している当業者に知られている任意の試験であることができる。本発明による適用の後で、抗体またはその機能性断片もしくは誘導体を固定または標識することができる。この固定は、当業者に知られている非常に多くの支持体上で行うことができる。これらの支持体としては、特にガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロンまたは天然または修飾細胞を挙げることができる。これらの支持体は、可溶性または不溶性であることもできる。

40

【0220】

例えば、好ましい方法は、免疫蛍光またはラジオイムノアッセイ(RIA)法または準ずるものによるELISA法による免疫酵素法を利用している。

【0221】

従って、本発明は、またc-Met受容体の過剰発現または過小発現によって誘発される疾病の診断方法を行い、または生物試料におけるc-Met受容体の過剰発現または過小発現、好ましくは前記受容体の過剰発現の検出および/または定量的方法を行うのに必

50

要なキットまたはセットを含んでなり、前記キットまたはセットは、下記の成分：

- a) 本発明による抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体、
 - b) 場合によっては、免疫反応に好都合な媒質の形成のための試薬、
 - c) 場合によっては、免疫反応によって産生した c - M e t / 抗体複合体を証明することができる試薬
- を含んでなることを特徴とする。

【0222】

本発明の主題は、また c - M e t 受容体を発現または過剰発現する細胞への生物活性化合物の特異的ターゲティングを目的とする医薬を調製するための本発明による抗体または組成物の使用である。

10

【0223】

本明細書では、生物活性化合物は、細胞活性、詳細にはそれらの成長、それらの増殖、転写または遺伝子翻訳を調節、特に阻害することができる任意の化合物を示すものと解釈される。

【0224】

本発明の主題は、また本発明による抗体、またはその機能性断片もしくは誘導体であって、好ましくは標識され、特に放射能標識されたものを含んでなるインビボ診断試薬、および医療画像化における、詳細には c - M e t 受容体の細胞による発現または過剰発現と関係した癌を検出するための、その使用である。

20

【0225】

本発明は、更に組合せ物としての組成物、または医薬としての本発明による抗 c - M e t / 毒素接合体または放射性元素にも関する。

【0226】

好ましくは、組合せ物としての前記組成物または本発明による前記接合体は、賦形剤および/または薬学上許容可能なビヒクルと混合される。

【0227】

本発明の説明では、薬学上許容可能なビヒクルは、副作用を誘発しない医薬組成物に入り、例えば、活性化合物の投与を促進し、体内におけるその寿命および/または効力を増加させ、溶液でのその溶解度を増加させ、あるいはその保存を向上させることができる化合物または化合物の組合せを示すものと解釈される。これらの薬学上許容可能なビヒクルは周知のものであり、選択される活性化合物の性質および投与様式の機能に応じて当業者によって馴化される。

30

【0228】

好ましくは、これらの化合物は、全身経路によって、詳細には静脈内経路によって、筋肉内、皮内、腹腔内または皮下経路によって、または経口経路によって投与される。更に好ましくは、本発明による抗体を含んでなる組成物は、連続的に数回投与される。

【0229】

それらの投与様式、投薬量および最適医薬形態は、例えば、患者の年齢または体重、患者の一般的健康状態の重さ、治療および注目される副作用に対する耐性など患者に適合した治療の確立を一般に考慮した基準によって決定することができる。

40

【0230】

本発明の他の特徴および利点は、実施例および図面による説明に継続して現れる。

【図面の簡単な説明】

【0231】

【図1】A549細胞上での c - M e t 受容体リン酸化に対する無関連のマウスおよびヒト起源の I g G 1 M a b および P B S の効果。

【図2】図2Aおよび2B：A549細胞上での c - M e t 受容体リン酸化に対するヒト I g G 1 / アイソタイプとして生成したネズミおよびヒト化 2 2 4 G 1 1 M a b の効果。図2A：HGF [1 0 0 n g / m l] による c - M e t リン酸化の最大刺激に対する割合として計算した作動薬効果。図2B：HGF [1 0 0 n g / m l] による c - M e t リ

50

ン酸化の最大刺激の阻害率として計算した拮抗薬効果。

【図3】図3Aおよび3B：A549細胞上でのc-Met受容体リン酸化に対するネズミ224G11Mabおよび様々な遺伝子工学処理したヒンジ領域を含むキメラ224G11Mabの比較。図3A：HGF[100ng/ml]によるc-Metリン酸化の最大刺激に対する割合として計算した作動薬効果。図3B：HGF[100ng/ml]によるc-Metリン酸化の最大刺激の阻害率として計算した拮抗薬効果。

【図4】図4Aおよび4B：A549細胞上でのc-Met受容体リン酸化に対するネズミ224G11MabおよびヒトIgG2/アイソタイプとして産生したキメラおよびヒト化224G11Mabの比較。図4A：HGF[100ng/ml]によるc-Metリン酸化の最大刺激に対する割合として計算した作動薬効果。図4B：HGF[100ng/ml]によるc-Metリン酸化の最大刺激の阻害率として計算した拮抗薬効果。

【図5】図5Aおよび5B：A549細胞上でのc-Met受容体リン酸化に対するネズミ224G11Mabおよび遺伝子工学処理したヒンジ変異体TH7IgG1/として産生したキメラおよびヒト化224G11Mabの比較。図5A：HGF[100ng/ml]によるc-Metリン酸化の最大刺激に対する割合として計算した作動薬効果。図5B：HGF[100ng/ml]によるc-Metリン酸化の最大刺激の阻害率として計算した拮抗薬効果。

【図6】図6Aおよび6B：図A：c-Met二量体化モデル、および図B：c-Met活性化モデルを用いるBRETモデル。

【図7】図7Aおよび7B：図A：c-Met二量体化モデル、および図B：c-Met活性化モデルを用いるBRETモデル。

【図8】図8Aおよび8B：図A：c-Met二量体化モデル、および図B：c-Met活性化モデルを用いるBRETモデル。

【図9】図9Aおよび9B：図A：c-Met二量体化モデル、および図B：c-Met活性化モデルを用いるBRETモデル。

【図10】図10Aおよび10B：図A：c-Met二量体化モデル、および図B：c-Met活性化モデルを用いるBRETモデル。

【図11】キメラおよびヒト化224G11形態によって認識されるc-Met。

【図12】インビトロでのNCI-H441細胞のHGF誘発増殖に対するネズミおよびキメラ抗体の効果。NCI-H441細胞は、無血清培地で培養した。24時間培養後、m224G11および[224G11]chimを、HGFの非存在下または存在下にて加えた。黒矢印は、HGFの非存在下(左下向き矢印)または存在下(右下向き矢印)における細胞のみを培養したウェルを示す。ネズミIgG1(mIgG1)を、アイソタイプコントロールとして導入した。

【図13】NCI-H441異種移植モデルに対するネズミおよびIgG1キメラ224G11Mabのインビトロ比較。

【図14】図14Aおよび14B：インビトロでのNCI-H441細胞のHGF誘発増殖に対するネズミ224G11Mabおよびこの抗体の様々なキメラおよびヒト化バージョンの効果。NCI-H441細胞は、無血清培地で培養した。24時間培養後、試験を行う抗体をHGFの非存在下または存在下にて加えた。パネル(図14A)に、ネズミm224G11、キメラIgG1[224G11]chim、ヒト化IgG1[224G11][Hz1]、[224G11][Hz2]、[224G11][Hz3]バージョンを示した。パネル(図14B)に、ネズミm224G11および様々なキメラIgG1形態([224G11]chim、[224G11][MHchim]、[224G11][MUP9Hchim]、[224G11][MMCHchim]、[224G11][TH7chim])を示した。黒矢印は、HGFの非存在下(左下向き矢印)または存在下(右下向き矢印)における細胞のみを培養したウェルを示す。ネズミIgG1を、作動薬活性についての負のコントロールとして導入した。m5D5を、用量-依存性の完全な作動薬コントロールとして用いた。

【図15】インビトロでのNCI-H441細胞のHGF誘発増殖に対するネズミ224

10

20

30

40

50

G 1 1 M a b およびこの抗体の様々なキメラおよびヒト化バージョンの効果。N C I - H 4 4 1 細胞は、無血清培地で培養した。2 4 時間培養後、試験を行う抗体をH G F の非存在下または存在下にて加えた。ネズミ m 2 2 4 G 1 1、[2 2 4 G 1 1] c h i m、[2 2 4 G 1 1] [T H 7 c h i m]) I g G 1 キメラ形態および [2 2 4 G 1 1] [T H 7 H z 1]、[2 2 4 G 1 1] [T H 7 H z 3]) を示した。黒矢印は、H G F の非存在下 (左下向き矢印) または存在下 (右下向き矢印) における細胞のみを培養したウェルを示す。ネズミ I g G 1 を、作動薬活性についての負のコントロールとして導入した。m 5 D 5 を、用量 - 依存性の完全な作動薬コントロールとして用いた。

【図 1 6】N C I - H 4 4 1 異種移植モデルに対するネズミ、キメラおよびヒト化 2 2 4 G 1 1 M a b の インビボ での比較。

10

【図 1 7】図 1 7 A : H G F [1 0 0 n g / m l] による c - M e t リン酸化の最大刺激に対する割合として計算した作動薬効果。図 1 7 B : H G F [1 0 0 n g / m l] による c - M e t リン酸化の最大刺激の阻害率として計算した拮抗薬効果。

【図 1 8】c - M e t 活性化モデルを用いる B R E T モデル。

【図 1 9】A 5 4 9 細胞上での c - M e t 分解に対する m 2 2 4 G 1 1 および h 2 2 4 G 1 1 の効果。A) 4 つの非依存性実験の平均値 + / - s . e . m . (標準誤差) B) 行った 4 つの非依存性実験の典型的なウェスタンブロットイメージ。

【図 2 0】N C I - H 4 4 1 細胞上での c - M e t 分解に対する m 2 2 4 G 1 1 および h 2 2 4 G 1 1 の効果。A) 4 つの非依存性実験の平均値 + / - s . e . m . B) 行った 4 つの非依存性実験の典型的なウェスタンブロットイメージ。

20

【図 2 1】c - M e t シェディング (s h e d d i n g) を評価するための E L I S A のセットアップ。

【図 2 2】m 2 2 4 G 1 1 で 5 日間処理した N C I - H 4 4 1 細胞での c - M e t シェディングのインビトロ評価。m I g G 1 は、アイソタイプコントロールとして用いた無関連の抗体である。

【図 2 3】m 2 2 4 G 1 1 で 5 日間処理した増幅 H s 7 4 6 T、M K N 4 5 および E B C - 1 細胞系での c - M e t シェディングのインビトロ評価。m I g G 1 は、アイソタイプコントロールとして用いた無関連の抗体である。P M A は、正のコントロールとして用いたシェディング誘発因子である。

【図 2 4】m 2 2 4 G 1 1 で 5 日間処理した N C I - H 4 4 1 および増幅 H s 7 4 6 T、M K N 4 5 および E B C - 1 細胞系での c - M e t シェディングのインビトロ評価。m I g G 1 は、アイソタイプコントロールとして用いた無関連の抗体である。P M A は、正のコントロールとして用いたシェディング誘発因子である。

30

【図 2 5】H s 7 4 6 T 細胞系での h 2 2 4 G 1 1 の固有のリン酸化の検討。

【図 2 6】N C I - H 4 4 1 細胞系での h 2 2 4 G 1 1 の固有のリン酸化の検討。A) ホスホ - E L I S A、および B) ウェスタンブロット分析。

【図 2 7】H s 5 7 8 T 細胞系での h 2 2 4 G 1 1 の固有のリン酸化の検討。A) ホスホ - E L I S A、および B) ウェスタンブロット分析。

【図 2 8】N C I - H 1 2 5 細胞系での h 2 2 4 G 1 1 の固有のリン酸化の検討。A) ホスホ - E L I S A、および B) ウェスタンブロット分析。

40

【図 2 9】T 9 8 G 細胞系での h 2 2 4 G 1 1 の固有のリン酸化の検討。A) ホスホ - E L I S A、および B) ウェスタンブロット分析。

【図 3 0】M D A - M B - 2 3 1 細胞系での h 2 2 4 G 1 1 の固有のリン酸化の検討。A) ホスホ - E L I S A、および B) ウェスタンブロット分析。

【図 3 1】P C 3 細胞系での h 2 2 4 G 1 1 の固有のリン酸化の検討。A) ホスホ - E L I S A、および B) ウェスタンブロット分析。

【図 3 2】H U V E C 細胞での h 2 2 4 G 1 1 の固有のリン酸化の検討。

【図 3 3】N C I - H 4 4 1 異種移植モデルでの、野生型ネズミ 2 2 4 G 1 1 抗体と、キメラヒンジ - 遺伝子工学処理した 2 2 4 G 1 1 [C 2 D 5 - 7] M a b との インビボ 比較。

50

【図34】Hs746TおよびNCI-H441細胞でのh224G11によるADCC誘導。h224G11を装填した(黒四角)または装填していない(白四角)⁵¹Cr標識した(A)Hs746Tまたは(B)NCI-H441細胞を、様々な比率のヒトNK細胞と混合し、4時間インキュベーションした。細胞を回収して、ライシス(lysis)によって溶出された⁵¹Crのcpmを計測した。結果は、エフェクター/ターゲット細胞比に対するライシスの割合としてプロットしている。NL:非装填細胞。

【図35】様々なレベルのc-Metを発現した腫瘍異種移植片でのh224G11染色(A:c-MetについてのHs746T増幅細胞系、B:NCI-H441高レベルのc-Met発現、およびC:MCF-7低レベルのc-Met)。

【実施例】

【0232】

例1:c-Metに対する抗体の生成

抗c-Met抗体を生成させるために、8週齢のBALB/cを、CHOの細胞膜上にc-Metを発現するトランスフェクションしたCHO細胞系(20×10⁶個/用量/マウス)で3~5回皮下免疫し、または最初の免疫には完全Freundアジュバントと、また引き続く免疫には不完全Freundアジュバントと、混合したc-Met細胞外ドメイン融合タンパク質(10~15μg/用量/マウス)(R&D Systems,Catalog #358MT)またはこの組換えタンパク質の断片を2~3回皮下に免疫した。マウスにCHO-cMet細胞と組換えタンパク質との両方を投与した混合プロトコルも行った。細胞融合の3日前に、マウスに組換えタンパク質または断片をi.p.またはi.v.で追加免疫した。次いで、マウスの脾臓を回収してSP2/0-Ag14骨髓腫細胞(ATCC)に融合させ、HAT選択を行った。4回の融合を行った。一般に、モノクローナル抗体またはそれらの機能性断片、特にネズミ起源のもの調製には、マニュアル「抗体」(Harlow and Lane, 抗体:実験室マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988)に詳細に記載されている手法、またはKohler and Milstein(Nature, 256:495-497, 1975)によって報告されているハイブリドーマの調製手法を参照することができる。

【0233】

得られたハイブリドーマを、最初にc-Met組換えタンパク質上でELISAによってスクリーニングした後、A549NSCLC、BxPC3膵臓、およびU87-MG神経膠芽腫細胞系上でFACS分析によってスクリーニングし、産生した抗体は腫瘍細胞上の本来の受容体を認識することもできることを確かめた。これら2種類の試験で陽性反応を示すものを増幅して、クローニングし、1セットのハイブリドーマを回収して、精製し、BxPC3モデルにおけるインビトロでの細胞増殖を阻害するその能力についてスクリーニングした。

【0234】

その目的のために、50,000個のBxPC3細胞を、96穴プレートで2mML-グルタミンを補足しSVFを含まないRPMI培地で培養した。24時間の培養後、試験を行う抗体を、0.0097~40μg/mlの最終濃度でhHGF100ng/mlの添加の60分前に添加した。3日後に、細胞を[³H]チミジン0.5μCiで16時間パルス標識した。トリクロロ酢酸不溶性DNAに組込まれた[³H]チミジンの大きさを、液体シンチレーションカウンティングによって定量した。結果を、それぞれのMabの本質的な作動薬効果を実際に評価するために生データとして表した。

【0235】

次いで、少なくとも50%細胞増殖を阻害する抗体を、c-Met二量体化に対するそれらの活性およびトランスフェクション細胞に対する活性化BRET分析について評価した。c-Met受容体活性を、活性化c-Metに対するGab1シグナル伝達分子増加を測定することによって定量した。その目的のために、c-Met二量体化のためにC-Met-R1ucまたはC-Met-R1ucとC-Met-K1100A-YFPとを発現するCHO安定細胞系、またはc-Met活性化のためにC-Met-R1ucとY

10

20

30

40

50

F Pに融合したG a b 1の突然変異形態とを発現するC H O安定細胞系 [Marounet al., Mol. Cell. Biol., 1999, 19:1784-1799] を生成した。細胞を、白色の96穴マイクロプレート中のD M E M - F 1 2 / F B S 5 %培養培地にB R E T実験の1または2日前に分配した。細胞を最初に5 % C O₂で37 °Cにて培養して、細胞をプレートに接着させた。次に、細胞を200 μl D M E M / ウェルで一晩飢餓状態に置いた。実験の直前に、D M E Mを除去し、細胞をすばやくP B Sで洗浄した。細胞を、試験を行う抗体または参照化合物の存在または非存在下において37 °CにてP B S中で10分間インキュベーションした後、H G Fを含むまたは含まないコエレンテラジンを50 μlの最終容積で添加した。37 °Cで更に10分間インキュベーションした後、485 nmおよび530 nmにおける発光取得(light-emission acquisition)を、M i t h r a s ルミノメーター(Berthold)を用いて開始した(1 s / 波長 / ウェル 15回反復)。

10

【0236】

B R E T比は、以前に[(530 nmにおける発光) - (485 nmにおける発光) × C f] / (485 nmにおける発光) (上記式中、C fは、同一実験条件でR l u c融合タンパク質のみを発現する細胞についての(530 nmにおける発光) / (485 nmにおける発光)に相当する)として定義されている [Angers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:3684-3689]。この方程式を簡略化すると、B R E T比は、R . r e n i f o r m i s ルシフェラーゼに融合したパートナーだけがアッセイに存在するときに同一実験条件下で得られた比530 / 485 nmによって補正された、2つのパートナーが存在するときに得られた比530 / 485 nmに相当することを示している。理解しやすくするため、結果をミリB R E T単位(m B U)で表しており、m B UはB R E T比に1000を乗じたものに相当する。

20

【0237】

この第二のインビトロ試験の後、i) 増殖の機能試験において全分子として固有活性を持たない、i i) B x P C 3増殖を有意に阻害する、およびi i i) c - M e t二量体化を阻害する抗体224G11を選択した。実験では、G e n e t e c h製でありかつA T C Cで入手可能な5 D 5 M a bを、固有作動薬活性に対するコントロールとして添加した。

【0238】

例2 : C D R - 移植によるマウス224G11 M a bのヒト化工程

30

1°) 軽鎖可変ドメイン(V L)のヒト化

予備段階として、224G11 V Lのヌクレオチド配列をI M G Tデータベース(<http://imgt.cines.fr>)に含まれるネズミの生殖細胞系遺伝子配列と比較した。それぞれ、V領域について99.31%およびJ領域について94.28%の配列同一性を示すネズミI G K V 3 - 5 * 0 1およびI G K J 4 * 0 1生殖細胞系遺伝子を同定した。これらの高い相同性に関して、対応するマウス生殖細胞系の代わりに224G11 V Lヌクレオチド配列を用いて、直接ヒト相同性を調査した。

【0239】

第二段階では、224G11 V Lと最高の同一性を示すヒト生殖細胞系遺伝子を調査して、C D R移植のための最良のヒト候補を同定した。選択を最適にするため、アミノ酸配列間のアラインメントを行った。ヒトI G K V 4 - 1 * 0 1生殖細胞系遺伝子では、配列同一性は67.30%となったが、C D R 1については異なる長さを示した(224G11 V Lでは10アミノ酸、およびI G K V 4 - 1 * 0 1では12アミノ酸)。J領域については、ヒトI G K J 4 * 0 2生殖細胞系遺伝子(配列同一性77.14%)を選択した。

40

【0240】

次の段階では、マウス224G11 V LのC D R領域を、上記で選択したヒトフレームワーク配列に移植した。それぞれのアミノ酸位置を、V H / V L界面、抗原結合またはC D R構造における関与、可変ドメインの3D構造における残基の局在化、C D Rアンカー、V e r n i e rゾーンに属する残基のような幾つかの基準について分析した。配列番号

50

8、配列番号9および配列番号10に対応し、FR領域およびマウス224G11VLに対応するCDRにそれぞれ4つ(4、39、40、84)、2つ(39、40)または1つ(40)のネズミ残基を含む3種類のヒト化バージョンを構築した。

【0241】

2°) 重鎖可変ドメイン(VH)のヒト化

予備段階として、224G11VHのヌクレオチド配列を、IMGTデータベース(<http://imgt.cines.fr>)に含まれるネズミの生殖細胞系遺伝子配列と比較した。

【0242】

それぞれ、V領域について92.70%、D領域について75.00%およびJ領域について89.36%の配列同一性を有するネズミIGHV1-18*01、IGHD2-4*01およびIGHJ2*01生殖細胞系遺伝子を同定した。対応するマウス生殖細胞系の代わりに、これらの高い相同性に関して、224G11VHヌクレオチド配列を直接用いてヒト相同性を検索することに決定した。

10

【0243】

第二段階では、224G11VHと最良の同一性を示すヒト生殖細胞系遺伝子を検索して、CDR移植のための最良のヒト候補を同定した。この目的のため、224G11VHのヌクレオチド配列を、IMGTデータベースに属するヒト生殖細胞系遺伝子配列と共にアライメントした。ヒトIGHV1-2*02V配列は、ヌクレオチドレベルでは75.00%およびアミノ酸レベルでは64.30%の配列同一性を示した。J領域についての相同性の検索では、ヒトIGHJ4*04生殖細胞系遺伝子が78.72%の配列同一性で同定された。

20

【0244】

次の段階では、マウス224G11VHCDR領域を、上記で選択されたヒトフレームワーク配列に移植した。それぞれのアミノ酸位置を、VH/VL界面、抗原結合またはCDR構造における関与、可変ドメインの3D構造における残基の局在化、CDRアンカー、Vernierゾーンに属する残基のような幾つかの基準について分析した。配列番号4に対応する1つの完全にヒト化形態を構築し、これは、FR領域およびマウス224G11VHに対応するCDRに全くヒト残基のみを含む。

【0245】

例3：改良されたヒンジ変異体の遺伝子工学処理

30

ヒンジ領域は、免疫グロブリンの可変ドメインの柔軟性に強力に関与していることは、当業者に周知である(Brekke et al., 1995; Roux et al., 1997を参照)。224G11Mabのキメラ化工程中に、マウス定常ドメインIGHG1をヒト起源の同等なIGHG1部分で置換した。ヒンジ領域のアミノ酸配列は高度に分岐していたので、ヒンジ領域の「ネズミ化(murinization)」を行ってその長さと同剛性を保持した。ヒトIGHG2ヒンジ領域は、マウスIGHG1ヒンジの最も近い相同物に対応しているため、この配列も同様に考慮した。マウスIGHG1およびヒトIGHG2ヒンジの部分にヒトIGHG1ヒンジ部分に組み込むことによって、一連の7種類のヒンジ配列を構築した(配列番号22~28)。

【0246】

40

もう一つの一連のヒンジ変異体をデザインして構築し(配列番号58~72)、付加システインおよびヒンジドメインに沿ったその位置、ヒンジドメインに沿った1、2、3または4つのアミノ酸の欠失、およびこれら2つのパラメーターの組合せ(システイン付加およびアミノ酸欠失)の影響を評価した。

【0247】

例4：ヒト化224G11Mabおよび遺伝子工学処理したヒンジMabフォーマットの産生

キメラ、ヒト化および/または遺伝子工学処理したヒンジ領域を含むすべての上記Mab形態を、一過性トランスフェクションおよびpCEP4発現ベクターを有するHEK293/EBNA系を用いることによって産生した(InVitrogen, 米国)。

50

【 0 2 4 8 】

2 2 4 G 1 1 M a b 軽鎖 (配列番号 1 8、配列番号 1 9 および配列番号 2 0) および重鎖 (配列番号 1 4) の可変ドメインのヒト化バージョンに対応する全ヌクレオチド配列を、包括的遺伝子合成によって合成した (Genecust, ルクセンブルグ)。それらを、ヒト I g G 1 または I g G 2 免疫グロブリンの定常ドメイン [C H 1 - H i n g e - C H 2 - C H 3] の全コード配列を有する p C E P 4 ベクター (InVitrogen, 米国) にサブクロニングした。ヒンジ領域の修飾を、 { N h e 1 I - B c l 1 } 制限断片を所望な修飾を有する同等な部分に交換することによって行い、それぞれの { N h e 1 - B c l 1 } 断片は包括的遺伝子合成によって合成した (Genecust, ルクセンブルグ)。すべてのクロニング段階は、実験室マニュアル (Sambrook and Russel, 2001) に記載の通常分子生物学の手法によってまたは供給業者の指示に従って行った。それぞれの遺伝子構築物は、 B i g D y e ターミネーターサイクルシークエンシングキット (Applied Biosystems, 米国) を用いるヌクレオチドシークエンシングによって完全に確認し、 3 1 0 0 G e n e t i c A n a l y z e r (Applied Biosystems, 米国) を用いて分析した。

10

【 0 2 4 9 】

懸濁液に馴化した H E K 2 9 3 E B N A 細胞 (InVitrogen, 米国) は、オービタルシェーカー (1 1 0 r p m 回転速度) 上で 2 5 0 m l フラスコ中の 6 m M グルタミンを補足した 5 0 m l の無血清培地 E x c e l l 2 9 3 (SAFC Biosciences) で日常的に増殖した。一過性トランスフェクションは、 1 m g / m l の最終濃度で混合した水中で調製した線状の 2 5 k D a ポリエチレンイミン (P E I) (Polysciences) およびプラスミド D N A (重鎖対軽鎖プラスミド比 1 : 1 に対して最終濃度 1 . 2 5 μ g / m l) を用いて 2 . 1 0 ⁶ 細胞 / m l で行った。トランスフェクションの 4 時間後に、培養物を 1 容の新鮮な培養培地で希釈し、最終細胞密度 1 0 ⁶ 細胞 / m l を達成した。培養工程は、細胞生育力および M a b 産生に基づいて観察した。典型的には、培養物を 4 ~ 5 日間保持した。M a b は、プロテイン A 樹脂 (GEHealthcare, 米国) 上で通常のクロマトグラフィー法を用いて精製した。

20

【 0 2 5 0 】

すべての様々な形態の M a b は、機能評価に適したレベルで産生した。生産性レベルは、典型的には 1 5 ~ 3 0 m g / l の精製 M a b である。

【 0 2 5 1 】

例 5 : ホスホ - c - M e t 特異的 E L I S A アッセイによる c - M e t リン酸化状態の評価

30

この機能アッセイにより、M a b のみによるまたは H G F の共存における c - M e t リン酸化状態の変化を観察することができる。

【 0 2 5 2 】

A 5 4 9 細胞を、1 2 M W プレートの完全増殖培地 [F 1 2 K + 1 0 % F C S] に播種した。細胞を H G F [1 0 0 n g / m l] で刺激する前に 1 6 時間飢餓状態に置き、試験を行うそれぞれの M a b を、リガンド刺激の 1 5 分前に 3 0 μ g / m l の最終濃度で加えた。H G F 添加の 1 5 分後に氷冷ライシスバッファーを加えて、リン酸化反応を停止した。細胞を機械的に掻き出し、細胞溶解物を 1 3 , 0 0 0 r p m、4、1 0 分間の遠心分離によって集め、細胞溶解物は上清相に相当する。タンパク質含量を B C A キット (Pierce) を用いて定量し、使用まで - 2 0 で保管した。c - M e t のリン酸化状態を、E L I S A によって定量した。ヤギ抗 c - M e t M a b (R & D, 参照番号 A F 2 7 6) をキャプチャー抗体として用い (4 で一晩コーティング)、T B S - B S A 5 % 緩衝液による飽和段階 (室温 (R T) で 1 時間) の後、タンパク質溶解物 2 5 μ g を、コーティングを施した 9 6 M W プレートのそれぞれのウェルに加えた。R T で 9 0 分間インキュベーションの後、プレートを 4 回洗浄し、検出抗体を加えた (抗ホスホ - c - M e t M a b ; 1 2 3 0、1 2 3 4 および 1 2 3 5 位のリン酸化 T y r 残基に対する)。更に 1 時間インキュベーションして 4 回洗浄した後、H R P (Biosource) にカップリングした抗ウサギ抗体を室温で 1 時間加え、発光検出を、ルミノールを加えることによって行った。発光は、M i t h

40

50

r a s L B 9 2 0 マルチモードプレートリーダー (Berthold) 上で読み取った。

【 0 2 5 3 】

基底および HGF [1 0 0 n g / m l] 誘発 c - M e t 受容体リン酸化レベルはいずれも、P B S 処理によってもまたは付加ヒト c - M e t 受容体をターゲットとしないマウスまたはヒト M a b の添加によっても影響を受けなかった (図 1)。一方、マウス (m) 2 2 4 G 1 1 M a b は、HGF [1 0 0 n g / m l] 誘発 c - M e t リン酸化を強力に阻害したが (図 2 B)、それだけで受容体リン酸化を変更しなかった (図 2 A)。驚くべきことには、ヒト定常ドメイン I g G 1 / と組み合わせさせた m 2 2 4 G 1 1 由来の可変ドメイン (V H + V L) を意味するキメラ形態の 2 2 4 G 1 1 M a b (2 2 4 G 1 1 c h i m / I g G 1) は、減少した拮抗薬効力と関連した強力な作動薬活性 (最大 HGF 効果 1 7 %、図 2 A) を生じた (HGF 最大効果を 7 5 % 阻害する m 2 2 4 G 1 1 と比較して、HGF 最大効果を 5 4 % 阻害、図 2 B)。またヒト I g G 1 / 主鎖上で構築された 2 2 4 G 1 1 M a b の 3 種類のヒト化形態である [2 2 4 G 1 1] H z 1 / I g G 1、[2 2 4 G 1 1] H z 2 / I g G 1 および [2 2 4 G 1 1] H z 3 / I g G 1 も、マウス 2 2 4 G 1 1 と比較して減少した拮抗薬効果と有意な作動薬活性 (最大 HGF レベルの 1 1 ~ 2 4 %) を生じた (図 2 A および 2 B)。重鎖ヒンジドメインの一連の遺伝子工学処理したバージョンを構築し、c - M e t 受容体リン酸化アッセイを行った。図 3 A に示されるように、h I g G 1 / アイソタイプと関連した作動薬効果の著しい減少が I g G 2 ベースの構築物と遺伝子工学処理した I g G 1 / 構築物 [M H、M U P 9 H および T H 7] のいずれについても観察された。拮抗薬効果も、付随して増加した。最高のヒト配列を有する h I g G 1 / ベースの T H 7 ヒンジ変異体を選択して、ヒト化工程を完成した。次の段階で、2 2 4 G 1 1 M a b 可変ドメインの 3 種類のヒト化バージョンを、ヒト I g G 2 / または I g G 1 / ベースの T H 7 遺伝子工学処理したヒンジ定常ドメインに組み合わせることによって作成した。h I g G 2 / ヒト化構築物については、ヒト化バージョン H z 3 は強力なアゴニズムを示し (図 4 A)、3 種類すべてのヒト化バージョンについては、拮抗薬効果はネズミ 2 2 4 G 1 1 M a b で観察されたものより低く、およびキメラ h I g G 1 ベースの M a b に匹敵した (HGF 効果の阻害 5 6 ~ 5 7 %、図 4 B)。一方、3 種類のヒト化バージョン H z 1、H z 2 または H z 3 と遺伝子工学処理した I g G 1 / T H 7 変異体の組合せは、c - M e t 受容体リン酸化の弱い作動薬活性 (5 ~ 6 % の HGF 効果) および強力な拮抗薬効果 (HGF 効果の阻害 6 8 ~ 7 2 %) に関してマウス 2 2 4 G 1 1 M a b の特性をほぼ完全に回復した (図 5 A および 5 B)。これらの変異体は、キメラ I g G 1 ベースの 2 2 4 G 1 1 M a b と比較して高度に改良されていたが、I g G 2 ベースのヒト化形態と比較しても高度に改良されていた。

【 0 2 5 4 】

第二の一連の重鎖ヒンジドメインの遺伝子工学処理したバージョンを構築し、c - M e t 受容体リン酸化アッセイを行った。図 1 7 A に示されるように、すべての新たなバージョン (c 2 2 4 G 1 1 [C 2]、c 2 2 4 G 1 1 [C 3]、c 2 2 4 G 1 1 [C 5]、c 2 2 4 G 1 1 [C 6]、c 2 2 4 G 1 1 [C 7]、c 2 2 4 G 1 1 [1 - 3]、c 2 2 4 G 1 1 [C 7 6]、c 2 2 4 G 1 1 [C 6 9]、c 2 2 4 G 1 1 [C 2 5 - 7]、c 2 2 4 G 1 1 [C 5 2 - 6]、c 2 2 4 G 1 1 [C 9 2 - 7] および c 2 2 4 G 1 1 [5 - 6 - 7 - 8]) は、それらのアゴニズム活性が c 2 2 4 G 1 1 についての 2 3 % と比較して HGF 効果の 6 ~ 1 4 % の間にあるので、c 2 2 4 G 1 1 より弱い作動薬効果を示した。c 2 2 4 G 1 1 [T H 7] として、すべての新たなバージョンでは拮抗薬効果が付随して増加した [図 1 7 B]。これらの結果は、点突然変異および / または欠失による重鎖ドメインの遺伝子工学処理は抗体の作動薬 / 拮抗薬特性を変更する可能性があることを示していた。

【 0 2 5 5 】

例 6 : B R E T 分析

最初のセットの実験では、無関連のマウス I g G 1、ヒト I g G 1 およびヒト I g G 2 は、いずれの B R E T モデルでも HGF 誘発 B R E T シグナルの効果を持たなかった (1

10

20

30

40

50

2回の独立した実験からの典型的実験；図6)。これらのM a bを、直ちにコントロールとして引用する。

【0256】

マウス224G11M a bのI g G 1キメラ形態([224G11]c h i m)のc - M e t二量体化およびc - m e t活性化B R E Tモデルに対する効果を評価した。マウス224G11M a bは、c - M e t二量体化モデルではH G F誘発B R E Tシグナルの59.4%を阻害したが、[224G11]c h i m M a bは28.9%しか阻害しなかった(図7A)。[224G11]c h i mおよびm224G11抗体はH G F誘発B R E Tシグナルをそれぞれ34.5%および56.4%阻害した(図7B)ので、[224G11]c h i m抗体はH G F誘発c - M e t活性化の阻害にも余り有効ではなかった。更に、[224G11]c h i mはc - M e t活性化に対してH G F誘発シグナルの32.9%に対応する部分作動薬効果を有したが、m224G11単独ではc - M e t活性化に全く効果がなかった。m224G11については21.3%であったのに対して[224G11]c h i m単独ではH G F誘発シグナルの46.6%に対応するB R E T増加を誘発したので、この[224G11]c h i mの部分作動薬効果はc - M e t二量体化B R E Tモデルでも見られた(図7A)。

10

【0257】

図8Aおよび8Bにおいて、224G11抗体のヒンジが突然変異したキメラ形態は、それぞれ[224G11][M H c h i m]、[224G11][M U P 9 H c h i m]、[224G11][M M C H c h i m]および[224G11][T H 7 c h i m]についてH G F誘発活性化B R E Tシグナルを59.7%、64.4%、53.2%および73.8%阻害し(図8B)、H G F誘発c - M e t二量体化B R E Tシグナルを61.8%、64.4%、52.5%および64.4%阻害した(図8A)ので、H G F誘発B R E Tシグナルに対して[224G11]c h i mよりも大きな阻害効果を示した。c - M e t活性化に対して部分作動薬効果を有する[224G11]c h i mとは逆に、224G11抗体のヒンジが突然変異したキメラ形態は、m224G11について見られるようにc - M e t活性化単独に対しては有意な効果を示さなかった(それぞれ5.1%、7.6%、-2.0%および-6.9%)。

20

【0258】

図9Bでは、[224G11][T H 7 c h i m]と同様に、T H 7ヒンジを有する224G11I g G 1抗体の3種類のヒト化バージョンは、単独で試験したときには活性化モデルにB R E Tシグナルの有意な増加を誘発せず、H G F誘発B R E Tシグナルを強的に阻害した：H z 1、H z 2およびH z 3形態について、それぞれ59.9%、41.8%および57.9%。更に、[224G11][T H 7 H z 1]、[224G11][T H 7 H z 2]および[224G11][T H 7 H z 3]は、二量体化モデルではH G F誘発B R E Tシグナルを、それぞれ52.2%、35.8%および49.4%阻害した(図9A)。

30

【0259】

[224G11]c h i mとは逆に、224G11I g G 2抗体のキメラ形態([224G11][I g G 2c h i m])は、単独では部分作動薬効果示さず、c - M e t活性化モデルではH G F効果の66.3%を阻害した(図10B)。c - M e t二量体化モデルでは、[224G11][I g G 2c h i m]は、H G F誘発B R E Tシグナルの62.4%を阻害した(図10A)。

40

【0260】

重鎖ヒンジドメインの遺伝子工学処理したバージョンの第二の一連の作動薬効果を、c - M e t活性化B R E Tモデルで評価した(図18)。c - M e t活性化についての部分作動薬効果を有するc224G11とは対照的に、224G11抗体のc224G11[C2]、c224G11[C3]、c224G11[C5]、c224G11[C6]、c224G11[C7]、c224G11[1-3]、c224G11[C76]、c224G11[C69]、c224G11[C25-7]、c224G11[C5

50

2 - 6]、c 2 2 4 G 1 1 [C 9 2 - 7] および c 2 2 4 G 1 1 [5 - 6 - 7 - 8] ヒンジが突然変異したキメラ形態は、c - M e t 活性化単独については有意な効果を示さなかった。

【 0 2 6 1 】

例 7 : キメラおよびヒト化 2 2 4 G 1 1 形態による c - M e t 認識

直接 E L I S A を開始し、組換え c - M e t 上での様々なキメラおよびヒト化形態の結合能を決定した。簡単に説明すれば、R & D S y s t e m s 製の組換え二量体性 c - M e t を、9 6 穴の I m m u n l o n I I プレート上に 1 . 2 5 μ g / m l でコーティングした。4 で一晩インキュベーションした後、ウェルを 0 . 5 % ゼラチン / P B S 溶液で飽和した。次いで、プレートを 3 7 で 1 時間インキュベーションした後、試験を行う抗体の 2 倍希釈液を加えた。プレートを更に 1 時間インキュベーションした後、ネズミの抗体を検出するためのヤギ抗マウス I g G H R P と、キメラおよびヒト化抗体認識のためのヤギ抗ヒト 軽鎖 H R P を加えた。プレートを 1 時間インキュベーションし、ペルオキシダーゼ基質 T M B U p t i m a を加え、5 分後に 1 M H ₂ S O ₄ で中和した。図 1 1 に示した結果は、すべての試験形態は c - M e t 認識について類似していることを示していた。

10

【 0 2 6 2 】

例 8 : インビトロでの N C I - H 4 4 1 細胞の H G F 誘発増殖に対するネズミおよびキメラ 2 2 4 G 1 1 の効果

A T C C の N C I - H 4 4 1 細胞を、R P M I 1 6 4 0 培地 (I n v i t r o g e n C o r p o r a t i o n , S c o t l a n d , 英 国) 、 1 0 % F C S (I n v i t r o g e n C o r p o r a t i o n) 、 1 % L - グルタミン (I n v i t r o g e n c o r p o r a t i o n) 中で常法により培養した。増殖アッセイのため、細胞を使用の 3 日前に継代し、プレートに播種する前に増殖のコンフルエント期になるようにした。N C I - H 4 4 1 細胞を、9 6 穴組織培養プレートで 2 0 0 μ l の無血清培地 (R P M I 1 6 4 0 培地 + 1 % L - グルタミン) 中で 3 . 7 5 \times 1 0 ⁴ 細胞 / ウェルの密度で播種した。2 4 時間の培養後、試験を行う抗体を N C I - H 4 4 1 に加え、3 7 で 3 0 分間インキュベーションした後、H G F を 4 0 0 n g / m l (5 n M) の最終濃度で更に 1 4 2 時間加えた。それぞれの抗体について試験した用量は、1 0 ~ 0 . 0 0 9 7 μ g / m l (それぞれのウェルでの最終濃度) の範囲である。この実験において、ネズミ I g G 1 M a b をネズミアイソタイプコントロールとして加え、試験した抗体は下記のものであった：m 2 2 4 G 1 1 およびそのヒト I g G 1 キメラ形態であって、[2 2 4 G 1 1] c h i m として同定されたもの。細胞単独 - / + H G F で培養したウェルも包含された。次いで、細胞を、[³ H] チミジン (A m e r s h a m B i o s c i e n c e s A B , U p p s a l a , スウェーデン) 0 . 2 5 μ C i で 7 時間および 3 0 分間パルス標識した。トリクロロ酢酸不溶性の D N A に取り込まれた [³ H] チミジンの大きさを、液体シンチレーションカウンティングによって定量した。結果は、未変換 c p m データとして表しており、腫瘍細胞に抗 c - M e t M a b を単独で加えたときに起こり得る潜在的な固有作動薬活性を一層良好に評価できる。

20

30

【 0 2 6 3 】

図 1 2 に示した結果は、予想されるように、ネズミ抗体 m 2 2 4 G 1 1 は、癌細胞に単独で加えたときには、試験用量がいくらであっても作動薬効果を示さなかった。この実験でこの化合物について観察された c p m 変動に関するアイソタイプコントロールでは、H G F 誘発増殖の有意な阻害は観察されなかった。m 2 2 4 G 1 1 抗体を単独で加えたときには、m I g G 1 アイソタイプコントロール M a b または細胞単独と比較して作動薬効果を全く示さなかった。7 8 % に達する用量依存性抗増殖活性が、m 2 2 4 G 1 1 について見られた (阻害 % の計算 : 1 0 0 - [(試験細胞 + M a b の c p m - バックグラウンド m I g G 1 の平均 c p m) \times 1 0 0 / (細胞 + H G F の平均 c p m - 細胞単独の平均 c p m)]) 。驚くべきことには、2 2 4 G 1 1 M a b のキメラ形態を単独で加えたときには、有意な用量依存性作動薬効果を誘発した。この作動薬効果は、インビトロでの H G F 誘発増殖阻害に影響し、ネズミ 2 2 4 G 1 1 についての 7 8 % からそのキメラ形態についての 5 0 % へと変化した。このような「低め」のインビトロでの固有作動薬活性が、未変化の

40

50

インビボ効果と互換性があるかどうかを決定するため、m 2 2 4 G 1 1 および [2 2 4 G 1 1] c h i m の両方をインビボ試験のために産生した。上記検討では、30 μ g / マウスの用量は有意なインビボ活性を示したので、その用量をインビボ評価に選択した。

【 0 2 6 4 】

例 9 : N C I - H 4 4 1 異種移植モデルでのネズミおよびキメラ 2 2 4 G 1 1 M a b のインビボ比較

N C I - H 4 4 1 は、乳頭状肺腺癌に由来し、高レベル c - M e t を発現し、c - M e t R T K の構成性リン酸化を示す。

【 0 2 6 5 】

N C I - H 4 4 1 異種移植モデルでの抗体のインビボ効果を評価するため、6 ~ 8 週齢の無胸腺マウスを滅菌フィルターを頂部に取り付けられたケージに収容し、無菌条件に保持し、仏国および欧州指針に準じて操作した。マウスに、 9×10^6 個の細胞を皮下投与した。次いで、細胞移植の6日後に、腫瘍は測定可能となり(約 100 mm^3)、動物を類似した腫瘍サイズの6尾のマウスの群に分け、最初に抗体 / マウスを60 μ g の初回量で投与し、次いで週2回それぞれの試験抗体を30 μ g / 用量で投与した。マウスを、異種移植片増殖速度の観察のために追跡した。腫瘍体積は、式：(パイ) / $6 \times$ 長さ \times 幅 \times 高さによって計算した。図13に示した結果は、作動薬活性を欠いているネズミ M a b は、予想されるように、インビボでは低試験用量であっても強力な拮抗薬として機能することを示している。ネズミ M a b で見られたのとは対照的に、キメラ抗体は、大変一過性のインビボ活性を示し、腫瘍は細胞接種後20日で治療を完全に免れた。この実験は、拮抗薬活性の減少を生じるインビボでの作動薬効果の増加も、インビボでの拮抗薬活性の有意な喪失に關与していることを明らかに示している。

【 0 2 6 6 】

例 10 : N C I - H 4 4 1 細胞のインビボでの H G F 誘発増殖に対するネズミ 2 2 4 G 1 1 M a b ならびにこの抗体の様々なキメラおよびヒト化バージョンの効果

A T C C の N C I - H 4 4 1 細胞を、R P M I 1 6 4 0 培地 (Invitrogen Corporation, Scotland, 英国)、10% F C S (Invitrogen Corporation)、1% L - グルタミン (Invitrogen corporation) 中で常法により培養した。増殖アッセイのため、細胞を使用の3日前に継代し、プレートに播種する前に増殖のコンフルエント期になるようにした。N C I - H 4 4 1 細胞を、96穴組織培養プレートで200 μ l の無血清培地 (R P M I 1 6 4 0 培地 + 1% L - グルタミン) 中で 3.75×10^4 細胞 / ウェルの密度で播種した。24時間の培養後、試験を行う抗体を N C I - H 4 4 1 に加え、37 で30分間インキュベーションした後、H G F を400 ng / ml (5 nM) の最終濃度で更に142時間に加えた。それぞれの抗体について試験した用量は、10 ~ 0.0097 μ g / ml (それぞれのウェルでの最終濃度) の範囲である。この実験において、ネズミ I g G 1 M a b をネズミアイソタイプコントロールとしておよび作動薬の負のコントロールとして加えた。試験した抗体は下記のものであった：i) m 2 2 4 G 1 1、ii) それぞれ、[2 2 4 G 1 1] c h i m、[2 2 4 G 1 1] [M H c h i m]、[2 2 4 G 1 1] [M U P 9 H c h i m]、[2 2 4 G 1 1] [M M C H c h i m]、[2 2 4 G 1 1] [T H 7 c h i m] として同定されるそのヒト I g G 1 キメラ形態、iii) それぞれ、[2 2 4 G 1 1] [H z 1]、[2 2 4 G 1 1] [H z 2]、[2 2 4 G 1 1] [H z 3] と表されるそのヒト化 I g G 1 キメラ形態。細胞単独 - / + H G F で培養したウェルも包含された。ハイブリドーマ細胞系として A T C C で入手可能な G e n e t e c h 製の 5 D 5 全長 (whole) 抗体を、完全作動薬の正のコントロールとして導入し、その後 m 5 D 5 と命名した。次いで、細胞を、[3 H] チミジン (Amersham Biosciences AB, Uppsala, スウェーデン) 0.25 μ Ci で7時間および30分間パルス標識した。トリクロロ酢酸不溶性の D N A に取り込まれた [3 H] チミジンの大きさを、液体シンチレーションカウンティングによって定量した。結果は、未変換 c p m データとして表しており、腫瘍細胞に抗 c - M e t M a b を単独に加えたときに起こり得る潜在的な固有作動薬活性を一層良好に評価できる。

10

20

30

40

50

【0267】

図14Aに記載の結果は、予想された通り、アイソタイプコントロールまたはm224G11のいずれもNCI-H441増殖に対して作動薬活性を全く示さないことを示していた。アイソタイプコントロールはHGF誘発細胞増殖に対して効果が見られなかったが、m224G11は、10 μ g/mlの最終濃度で加えたときには66%阻害を示した。作動薬コントロールとして用いたm5D5は、予想されたように、単独で細胞に加えたときには完全な用量依存性作動薬効果を示した。既に観察されているように、[224G11]chim Mabは有意な用量依存性作動薬効果を示し、このキメラ形態の阻害活性は、ネズミ形態についての66%の代わりに19%と減少した。単独で加えると、3種類のIgG1ヒト化Mabは、m224G11形態と比較して用量依存性作動薬効果を示した。[224G11][Hz1]、[224G11][Hz2]および[224G11][Hz3]は、約46、30および35%の類似する拮抗薬活性を示した。これらの活性は、m224G11について見られた活性より有意に低い。図14Bでは、様々なIgG1キメラ形態を試験した。NCI-H441細胞に単独で加えたときに用量依存性作動薬効果を示した[224G11]chim形態と比較して、[224G11][MHchim]、[224G11][MUP9Hchim]、[224G11][MMCHchim]、[224G11][TH7chim]形態は有意な固有作動薬効果を持たなかった。それらの拮抗薬活性は、m224G11Mab(57%)について見られたものより高く、[224G11][MHchim]、[224G11][MUP9Hchim]、[224G11][MMCHchim]および[224G11][TH7chim]について阻害はそれぞれ79、78、84および93%に達した。

【0268】

例11：224G11Mabの様々なIgG1ヒト化形態のインビトロ効果

ATCCのNCI-H441細胞を、RPMI1640培地(Invitrogen Corporation, Scotland, 英国)、10%FCS(Invitrogen Corporation)、1%L-グルタミン(Invitrogen corporation)中で常法により培養した。増殖アッセイのため、細胞を使用の3日前に継代し、プレートに播種するに増殖のコンフルエント期になるようにした。NCI-H441細胞を、96穴組織培養プレートで200 μ lの無血清培地(RPMI1640培地+1%L-グルタミン)中で3.75 \times 10⁴細胞/ウェルの密度で播種した。24時間の培養後、試験を行う抗体をNCI-H441に加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベーションした後、HGFを400ng/ml(5nM)の最終濃度で更に142時間で加えた。それぞれの抗体について試験した用量は、10 \sim 0.0097 μ g/ml(それぞれのウェルでの最終濃度)の範囲である。この実験において、作動薬活性についてのネズミIgG1Mabをバックグラウンドの負のコントロールとして加え、試験した抗体は下記のものであった：i)m224G11、ii)それぞれ、[224G11]chim、[224G11][TH7chim]として同定されたそのヒトIgG1キメラ形態、iii)それぞれ、[224G11][TH7Hz1]、[224G11][TH7Hz3]と表されるそのヒト化IgG1形態。細胞単独-/+HGFで培養したウェルも包含された。ハイブリドーマ細胞系としてATCCから入手可能なGene tech製の5D5全長抗体を、完全作動薬の正のコントロールとして導入し、その後m5D5と命名した。次いで、細胞を、[³H]チミジン(Amersham Biosciences AB, Uppsala, スウェーデン)0.25 μ Ciで7時間および30分間パルス標識した。トリクロロ酢酸不溶性のDNAに取り込まれた[³H]チミジンの大きさを、液体シンチレーションカウンティングによって定量した。結果は、未変換cpmデータとして表しており、腫瘍細胞に抗c-Met Mabを単独で加えたときに起こり得る潜在的な固有作動薬活性を一層良好に評価できる。

【0269】

図15は、m224G11Mabが通常の阻害効果(74%阻害)を示したことを示していた。キメラIgG1形態[224G11]chimは、予想されたように、用量依存性の固有作動薬効果、およびネズミ形態と比較して低めの拮抗薬効果を示した：74%阻

10

20

30

40

50

害に対して33%。[224G11][TH7chim]は、この実験では極めて弱い作動薬活性を有した。しかしながら、それは、ネズミMabについて見られたものに近い高い阻害効果(81%)を示した。2種類のヒト化形態は、固有作動薬効果を持たず、またネズミMabまたは[224G11][TH7chim]について見られたものに近い拮抗薬活性を有しており、[224G11][TH7Hz1]および[224G11][TH7Hz3]についてはそれぞれ67および76%阻害であった。

【0270】

例12：野生型またはTH7-遺伝子工学処理したヒンジ(NCI-H441異種移植モデル)を有するネズミ、キメラおよびヒト化224G11Mabのインビボ比較

NCI-H441は、乳頭状肺腺癌由来であり、高レベルのc-Metを発現し、c-MetRTKの構成的リン酸化を明らかにしている。

10

【0271】

224G11ネズミの抗体のインビボ活性をセーブするためのヒンジの遺伝子工学処理の必要性を評価するため、6~8週齢の無胸腺マウスを滅菌フィルターを頂部に取り付けたケージに収容し、無菌条件に保持し、仏国および欧州指針に準じて操作した。マウスに、 9×10^6 個の細胞を皮下接種した。次いで、細胞移植の6日後に、腫瘍は測定可能となり(約 100 mm^3)、動物を類似した腫瘍サイズの6尾のマウスの群に分け、最初に抗体/マウスを2mgの初回量で投与し、次いで週2回それぞれの試験抗体を1mg/用量で投与した。m224G11、野生型ヒンジ(c224G11)を示すキメラ形態、TH7遺伝子工学処理キメラ形態(224G11[TH7chim])、野生型ヒンジを有する3種類のヒト化形態(224G11[IgG1Hz1]、224G11[IgG1Hz2]および224G11[IgG1Hz3])、および3種類の対応するTH7-遺伝子工学処理形態(224G11[TH7Hz1]、224G11[TH7Hz2]および224G11[TH7Hz3])を含む10種類の抗体を、この実験で評価した。マウスを、異種移植片増殖速度の観察のために追跡した。

20

【0272】

腫瘍体積は、式： $(\text{パイ}) / 6 \times \text{長さ} \times \text{幅} \times \text{高さ}$ によって計算した。

【0273】

図16に示した結果は、作動薬活性を欠いているネズミMabは、予想されるように、インビボでは強力な拮抗薬として機能することを示している。ネズミMabで見られたのとは対照的に、野生型ヒンジを有するキメラおよびヒト化抗体はいずれも、大変一過性のインビボ活性のみを示した。いずれにせよ、野生型ヒンジをTH7遺伝子工学処理したものに代えることによって、ネズミ抗体で見られたインビボ活性が完全に回復した。この実験は、拮抗薬活性の減少を生じるインビトロでの作動薬効果の増加も、インビボでの拮抗薬活性の有意な喪失に関与していることを明らかに示している。ネズミMabのインビボ特性を保持するには、野生型の代わりにTH7遺伝子工学処理領域が必要であることも示している。

30

【0274】

例13：インビトロでのc-Metダウンレギュレーションに対するm224G11およびそのヒト化形態h224G11の効果

40

下記の例では、紛らわしさを回避するため、h224G11という表現は、本発明の抗体のヒト化形態224G11[TH7Hz3]を指す。

【0275】

c-Met受容体分解に対する抗c-Met抗体の活性を検討するために、2種類の細胞系を選択した。A549(#HTB-174)およびNCI-H441(#CCCL-185)は、ATCCコレクションからの2種類のNSCLC細胞系である。NCI-H441細胞を、6穴プレートで、RPMI1640+1%L-グルタミン+10%の熱不活性化したFBS中に、 3×10^4 細胞/ cm^2 で、37にて5%CO₂雰囲気中で24時間播種した。A549細胞を、6穴プレートで、F12K+10%の熱不活性化したFBS中に、 2×10^4 細胞/ cm^2 で、37にて5%CO₂雰囲気中で24時間播種し

50

た。

【0276】

次いで、細胞をリン酸緩衝食塩水(PBS)を用いて2回洗浄した後、更に24時間血清飢餓状態とした。抗c-Met抗体(10 μ g/ml)、無関連のmIgG1(10 μ g/ml)、またはHGF(400ng/mL)を、無血清DMEM培地に37 $^{\circ}$ Cで加えた。4時間または24時間インキュベーションした後、培地を徐々に除き、細胞を冷PBSで2回洗浄した。細胞を、500 μ lの氷冷ライシスバッファー[50mM Tris-HCl(pH7.5); 150mM NaCl; 1% Nonidet P40; 0.5%デオキシコール酸; および1錠の完全プロテアーゼ阻害剤カクテル+1%アンチホスファターゼ]で溶解した。細胞溶解物を4 $^{\circ}$ Cで90分間振盪し、15,000rpmで10分間遠心分離した。この段階において、細胞溶解物をウェスタンブロット分析で必要とされるまで-20 $^{\circ}$ Cで保管することができた。タンパク質濃度は、BCAを用いて定量した。全細胞溶解物(20 μ l中5 μ g)をSDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロース膜に移した。膜を0.1%TBS-Tween20(TBST); 5%乾燥脱脂粉乳で室温にて1時間飽和し、TBST-5%乾燥脱脂粉乳中で4 $^{\circ}$ Cにて抗c-Met抗体(希釈度1/1000)で反応させた。抗体は、1%乾燥脱脂粉乳を含むトリス緩衝食塩水-0.1%Tween20(v/v)(TBST)で希釈した。次いで、膜をTBSTで洗浄し、ペルオキシダーゼ接合二次抗体(希釈度1:1000)と共に室温で1時間インキュベーションした。免疫反応性タンパク質を、ECL(Pierce # 32209)で可視化した。c-Met可視化の後、膜を再度TBSTで洗浄し、TBST-5%乾燥脱脂粉乳中でマウス抗GAPDH抗体(希釈度1/20000)と共にRTで1時間インキュベーションした。次いで、膜をTBSTで洗浄し、ペルオキシダーゼ接合二次抗体と共に室温で1時間インキュベーションした。膜を洗浄し、GAPDHを、ECLを用いて明らかにした。バンド強度は、デンストメトリーによって定量した。

【0277】

図19Aおよび20Aに示した結果は、m224G11およびh224G11はA549およびNCI-H441細胞系のいずれにおいても用量依存的にc-Metを有意に下降調節することができることを示していた。この下降調節は4時間のインキュベーション時間後には既に有意であり、24時間後更に増加した。図19Aおよび20Aに示したヒトグラムは、それぞれ4および3回の独立した実験の平均値に相当する。1つの有意な実験に対応するウェスタンブロット分析画像を、図19Bおよび20Bに包含させた。

【0278】

例14: インビトロでのc-Metシェディングに対するm224G11およびそのヒト化形態h224G11の効果

c-Met受容体の可溶性シェディング形態は、天然ではヒト腫瘍を異種移植したマウスの血清またはc-Metを発現している腫瘍を有するヒト患者の血清に見られる。更に、DN30Mabのようなc-Metに対する抗体は、インビトロ実験におけるc-Metシェディング誘発因子として記載されている。m224G11がそのような特性を有するかどうかを決定するため、細胞を6穴プレートで、10%FCs培地中に播種した。細胞が80%コンフルエンスに達したときに、培地を除去し、新鮮な完全培地+/-試験を行う化合物を加えた。細胞を、m224G11、アイソタイプコントロールmIgG1またはPBSと共に更に72時間インキュベーションした。PMA(ホルボールミリステートアセテート)を、シェディング誘発因子として導入した。HGFも細胞で試験し、天然に存在するシェディングに対するc-Metリガンドの影響を決定した。次いで、上清を集めて0.2 μ mフィルターで濾過した後、ELISA試験を用いて、c-Metの可溶性形態をm224G11またはc11E1と同じエピトープを認識しない抗c-Met抗体で捕捉した(図21)。更に、それぞれのウェル由来の細胞をPBSで洗浄し、溶解して、タンパク質濃度を決定した。ELISAのため、224D10をキャプチャー抗体として使い、プレート飽和の後、6穴プレートからの濾過した上清をELISA試験に加えた。モノマー性c-Met形態を、正のコントロールとして用いた。上清をインキュベ

ションした後、プレートを洗浄して未結合 c - M e t を除去し、c 1 1 E 1 を用いて 2 2 4 G 1 1 M a b によって捕捉された c - M e t を検出した。試験の顕色(revelation)は、HRP 接合抗 h F c ポリクローナル抗体を添加することによって最後に行った。

【 0 2 7 9 】

図 2 2 に示される結果は、c - M e t の天然シェディングは、細胞をインビトロで 7 2 時間培養したときに起きたことを示している。m I g G 1 の効果は見られなかった。しかしながら、m 2 2 4 G 1 1 の添加は c - M e t シェディングを阻害すると思われた。これらの結果は、図 2 3 の他の 3 種類の細胞系 (H s 7 4 6 T 、 E B C 1 および M K N 4 5) について確かめられた。その第二の実験では、正のシェディング誘発因子として加えた P M A は、予想した通り、c - M e t シェディングを少なくとも 2 細胞系 (H s 7 4 6 T および M K N 4 5) で有意に増加した。最後に、第三の実験では (図 2 4) 、 H G F をコントロールとして導入した。細胞単独または細胞 + m I g G 1 と比較して、H G F によっては更なるシェディングは誘発されなかった。また、c - M e t シェディングの有意な阻害は、m 2 2 4 G 1 1 で再度観察された。

【 0 2 8 0 】

例 1 5 : 様々な細胞系に対する h 2 2 4 G 1 1 A b の本質的効果

本発明の上記実験では、5 D 5 などの他の抗体で見られたのとは対照的に、m 2 2 4 G 1 1 およびそのヒト化形態 h 2 2 4 G 1 1 は有意な固有活性腫瘍細胞系を示さないことが明らかになった。この特性を他の細胞系にひろげるため、H s 7 4 6 T 、 N C I - H 4 4 1 、 H s 5 7 8 T 、 N C I - H 1 2 5 、 T 9 8 G 、 M D A - M B - 2 3 1 、 P C 3 など様々なレベルの c - M e t 発現を有する癌細胞系のセットで、ウェスタンブロット分析およびホスホ E L I S A 実験を様々な時間に加えた抗体単独で行った。同じ試験は、正常細胞 H U V E C でも行った。

【 0 2 8 1 】

ホスホ c M e t E L I S A アッセイの方法は、本特許明細書の例 5 に既に記載した。ウェスタンブロット分析については、タンパク質溶解物をペレット化した細胞からプロテアーゼおよびホスファターゼ阻害薬 [1 0 n M T r i s (p H 7 . 4) 、 1 5 0 m M N a C l 、 1 m M E D T A 、 1 m M E G T A 、 0 . 5 % N o n i d e t P 4 0 、 1 0 0 m M フッ化ナトリウム、1 0 m M ピロリン酸ナトリウム、2 m M オルトバナジウム酸ナトリウム、2 m M P M S F 、 1 0 m g / m l ロイペプチン、1 0 m g / m l アプロチニン] を用いて 4 でライシスバッファー中でインキュベーションすることによって作製した。タンパク質溶解物を遠心分離によって細胞破片を除き、8 % S D S - P A G E ゲル上で電気泳動によって分離し、ニトロセルロース膜にエレクトロトランスファーした。c - M e t 実験については、溶解物を目的とする特異的タンパク質について免疫沈降させた後、電気泳動およびトランスファーした。

【 0 2 8 2 】

図 2 5 ~ 3 2 に示された結果も、h 2 2 4 G 1 1 抗体の固有活性は、試験細胞で見られなかったことを再度明らかにしている。

【 0 2 8 3 】

例 1 6 : ネズミ野生型 2 2 4 G 1 1 と、2 2 4 G 1 1 [C 2 D 5 - 7] (N C I - H 4 4 1 異種移植モデル) として記載されたキメラヒンジ遺伝子工学処理 2 2 4 G 1 1 形態とのインビボ比較

N C I - H 4 4 1 は、乳頭状肺腺癌由来であり、高レベルの c - M e t を発現し、c - M e t R T K の構成的リン酸化を示す。

【 0 2 8 4 】

2 2 4 G 1 1 ネズミの抗体のインビボ活性をセーブするためのヒンジの遺伝子工学処理の必要性を評価するため、6 ~ 8 週齢の無胸腺マウスを、滅菌フィルターを頂部に取り付けたケージに収容し、無菌条件に保持し、仏国および欧州指針に準じて操作した。マウスに、 9×10^6 個の N C I - H 4 4 1 細胞を皮下接種した。次いで、細胞移植の 6 日後に、腫瘍は測定可能となり (約 100 mm^3) 、動物を類似した腫瘍サイズの 6 尾

10

20

30

40

50

のマウスの群に分け、最初に抗体 / マウスを 2 mg の初回量で投与し、次いで週 2 回それぞれの試験抗体を 1 mg / 用量で投与した。マウスを、異種移植片増殖速度の観察のために追跡した。腫瘍体積は、式： $(\text{パイ}) / 6 \times \text{長さ} \times \text{幅} \times \text{高さ}$ によって計算した。図 3 3 に示した結果は、インビトロでは作動薬活性を欠いているネズミ M a b は、予想されるように、強力なインビボ拮抗薬として機能することを示している。インビトロで得られた結果から示唆されるように、リン酸化アッセイでは、有意な作動薬効果を示さなかった c 2 2 4 G 1 1 [C 2 D 5 - 7] ヒンジ遺伝子工学処理した抗体は、N C I - H 4 4 1 異種移植モデルに対する m 2 2 4 G 1 1 の活性に匹敵する強力なインビボ活性を示す。

【 0 2 8 5 】

例 1 7 : A D C C 試験における h 2 2 4 G 1 1 の評価

h 2 2 4 G 1 1 は I g G 1 アイソタイプであるので、A D C C はヒトにおけるそのインビボ効果の部分である可能性がある。イン・トロでの [^{51}Cr] 放出細胞傷害性アッセイは、ターゲット細胞として H s 7 4 6 T または N C I - H 4 4 1 細胞と、ヒト末梢血単核リンパ球から精製した N K 細胞を用いて行った。

【 0 2 8 6 】

簡単に説明すれば、百万個の H s 7 4 6 T または N C I - H 4 4 1 ターゲット細胞を、 $100 \mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr クロム (Perkin Elmer) の存在下にて $20 \mu\text{g}$ の h 2 2 4 G 1 1 A b と共にまたはなしで、1 時間インキュベーションした。次いで、 4×10^3 個の細胞を、末梢血単核細胞 (P B M C) から単離したヒト天然キラー (N K) 細胞と共に N e g a t i v e s e l e c t i o n (Stemcell Technologies) を用いて培養した。細胞を、一緒にして更に 4 時間、 37°C でインキュベーションした。細胞溶解率は、下式から計算した： $[(\text{実験での } ^{51}\text{Cr} \text{ 放出} - \text{自発的 } ^{51}\text{Cr} \text{ 放出}) / (\text{完全な } ^{51}\text{Cr} \text{ 放出} - \text{自発的 } ^{51}\text{Cr} \text{ 放出})] \times 100$ 。自発的放出は、ターゲット細胞を天然キラー細胞の非存在下で培養したときに得られるカウント数を表す。完全放出は、ターゲット細胞を 1% T r i t o n X - 1 0 0 で溶解したときに得られるカウント数を表す。h 2 2 4 G 1 1 は、N K / ターゲット細胞比 1 0 0 では、H s 7 4 6 T (図 3 4 a) および N C I - H 4 4 1 (図 3 4 b) 細胞の溶解を、それぞれ 6 2 . 9 % および 6 3 . 2 % 有意に増加した。

【 0 2 8 7 】

例 1 8 : 免疫組織化学的検討 (I H C)

パラフィン包埋腫瘍 I H C 染色の手順：冷凍腫瘍の $8 \sim 12 \mu\text{M}$ 切片を、予め冷却した -20°C のアセトンで直ぐに 3 分間固定した。次に、スライドを室温で 3 0 分間 ~ 1 時間冷却した。P B S で 2 回洗浄した後、内在性ペルオキシダーゼ活性をペルオキシダーゼ遮断試薬 (Dako K4007) を用いて 5 分間遮断した。切片を P B S で洗浄して、アビジン / ビオチン遮断試薬 (Dako X0590) 中でインキュベーションした直後、非特異的部位を P B S - B S A 4 % で室温にて 3 0 分間飽和した。次いで、スライドを、ビオチン化 h 2 2 4 G 1 1 ($50 \sim 10 \mu\text{g} / \text{ml}$) またはヒトビオチン化 I g G 1 / ($50 \sim 10 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、結合部位) をネガティブコントロールとして室温にて 2 時間インキュベーションした。

【 0 2 8 8 】

切片を P B S で洗浄し、ストレプトアビジン - ペルオキシダーゼ複合体ユニバーサル (Dako K0679) と共に 3 0 ~ 4 5 分間インキュベーションした。3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾールを用いて、赤色反応生成物を発色させた (Sigma)。スライドをヘマトキシリンに 4 分間浸漬して対比染色した (Dako S3309)。

【 0 2 8 9 】

結果を、図 3 5 に示す。

【 0 2 9 0 】

h 2 2 4 G 1 1 は、様々な腫瘍タイプの細胞膜を差別的に染色する。この免疫組織化学の手順では、赤色反応生成物は細胞膜の正の染色に相関し、赤色反応生成物の欠如は負の染色および細胞膜が可視化されないことと相関している。I g G コントロールであるヒト I g G 1 / は、コントロールと同等のアイソタイプである。

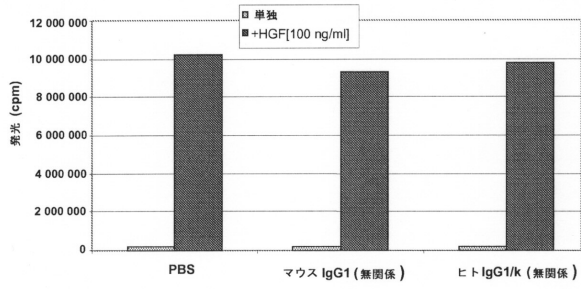
10

20

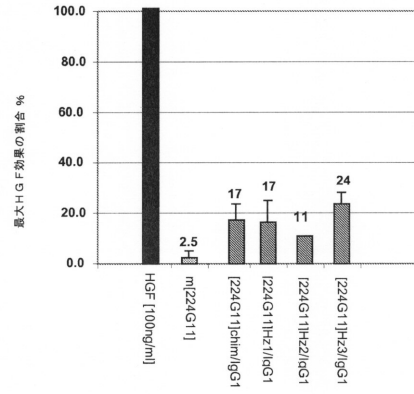
30

40

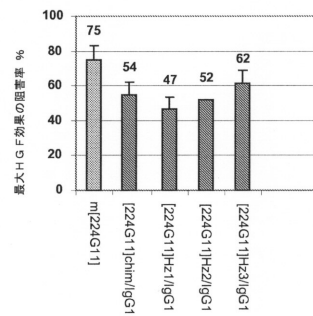
【 図 1 】



【 図 2 】

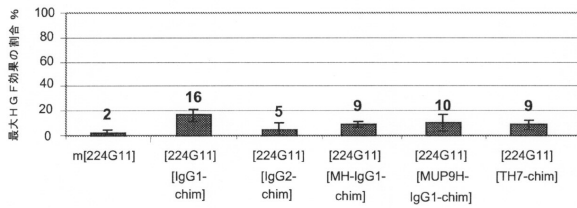


A

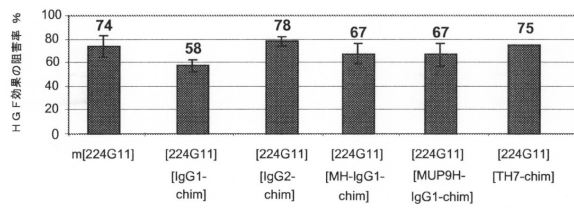


B

【 図 3 】

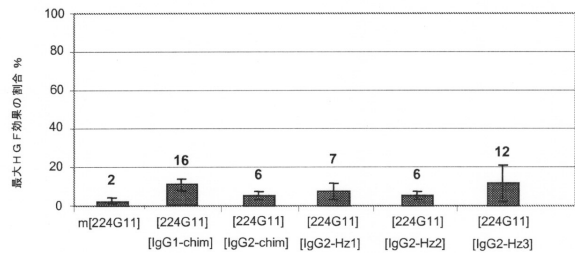


A

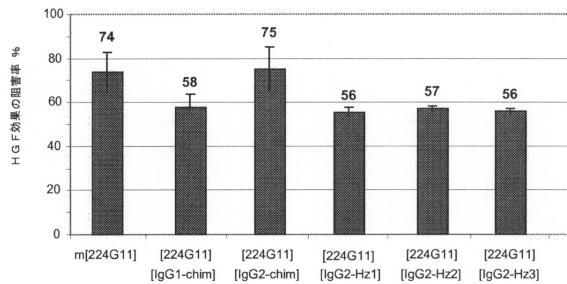


B

【 図 4 】

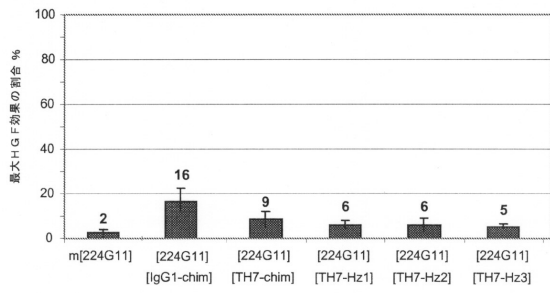


A

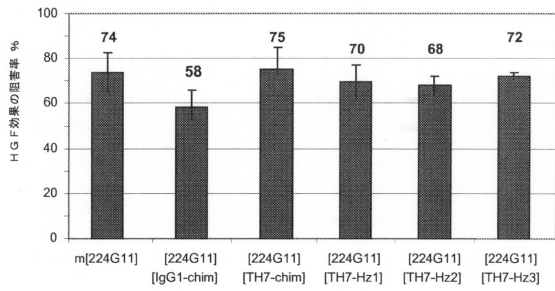


B

【 図 5 】

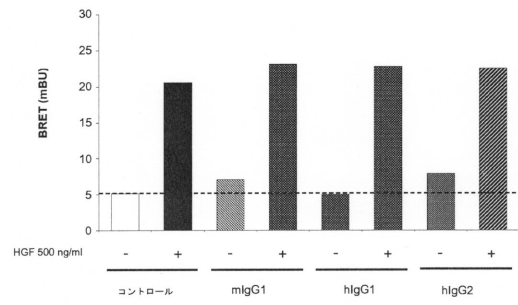


A

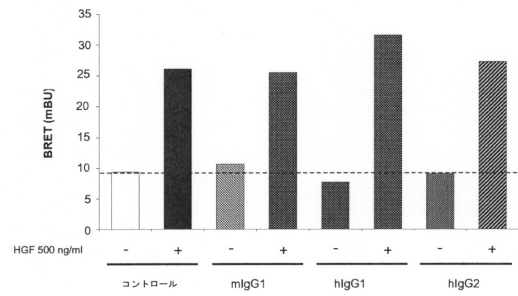


B

【 図 6 】

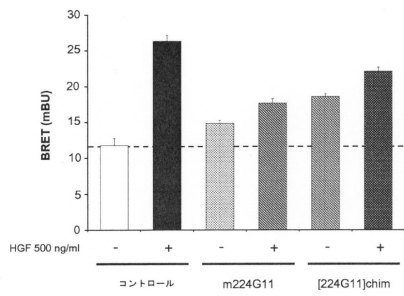


A

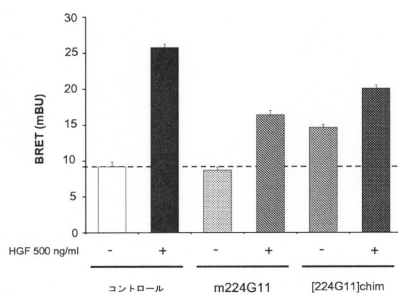


B

【 図 7 】

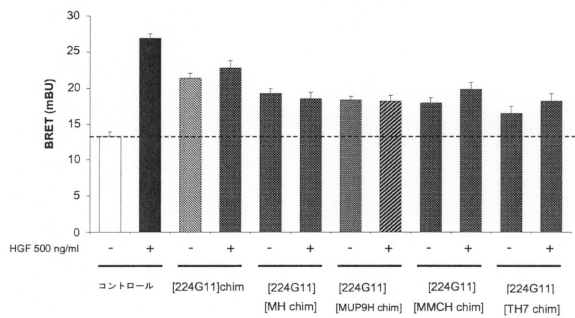


A

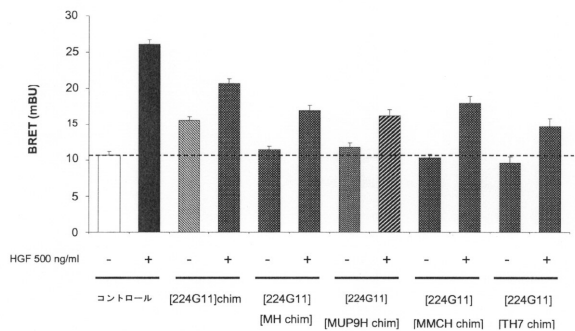


B

【 図 8 】

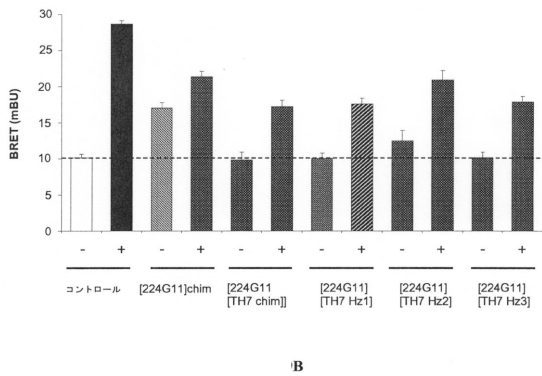
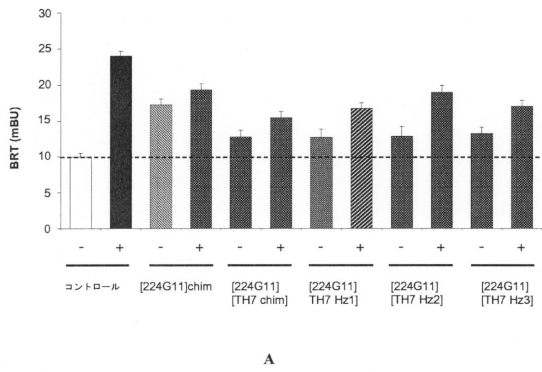


A

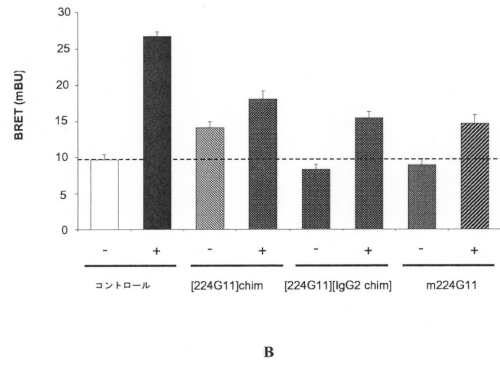
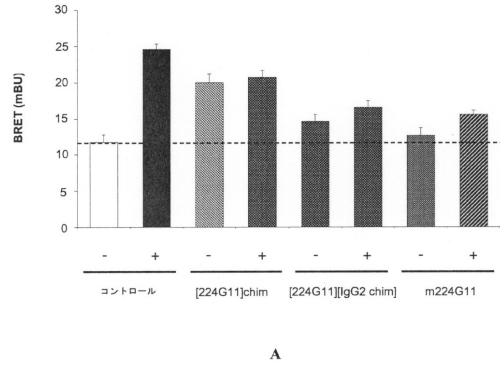


B

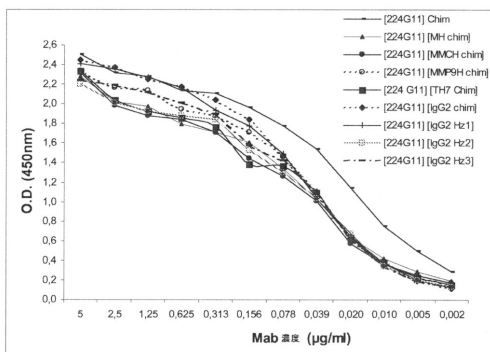
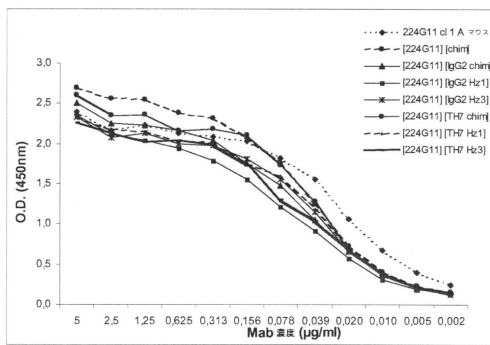
【 図 9 】



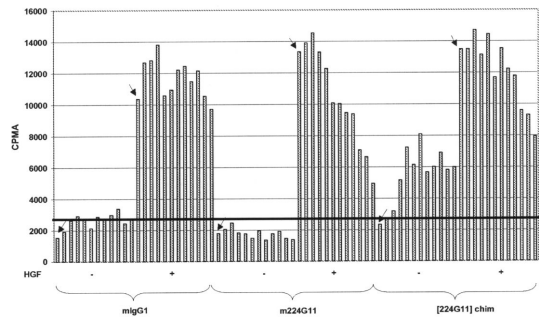
【 図 10 】



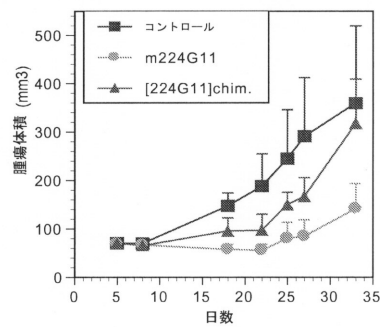
【 図 11 】



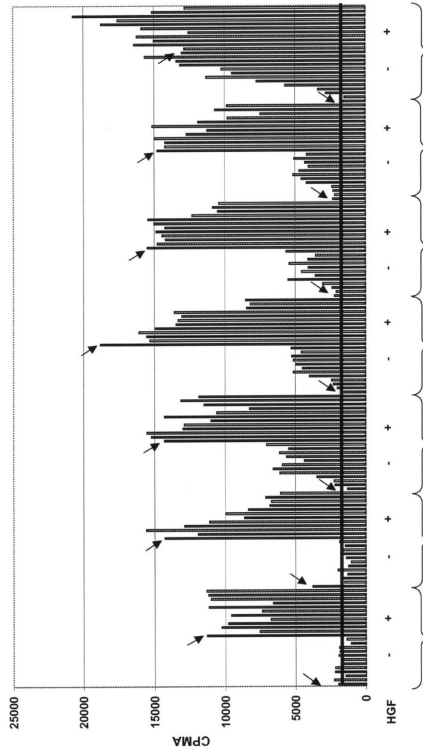
【 図 12 】



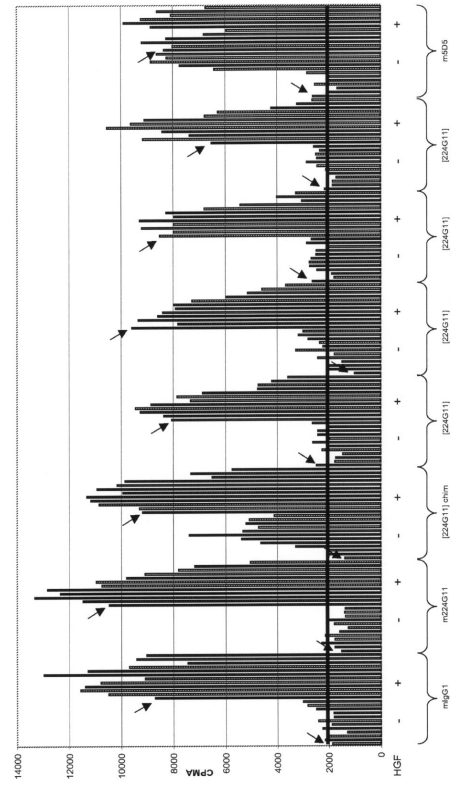
【 図 13 】



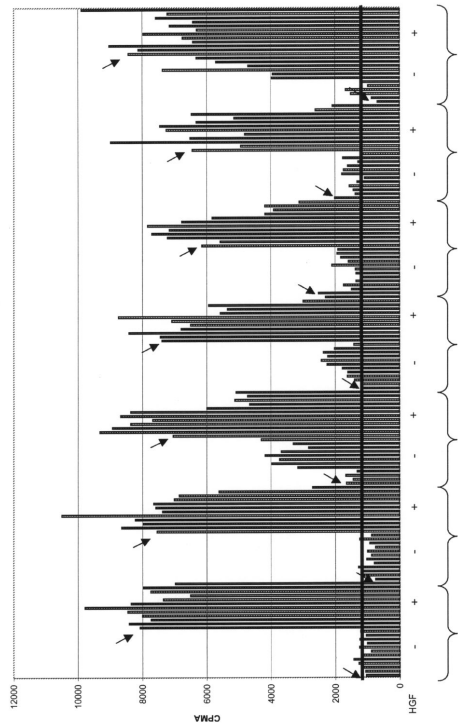
【 14 A 】



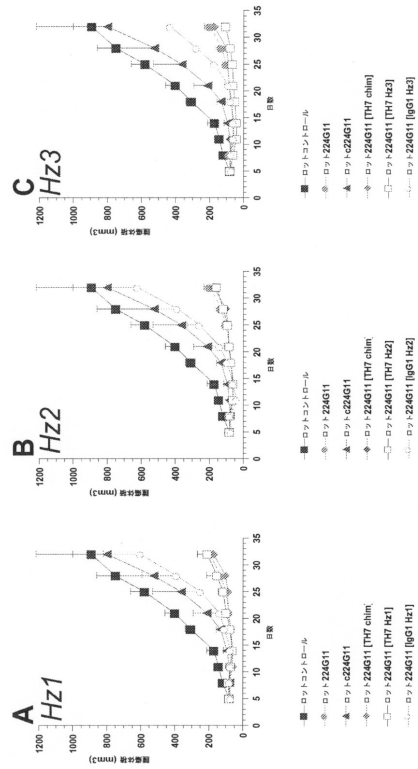
【 14 B 】



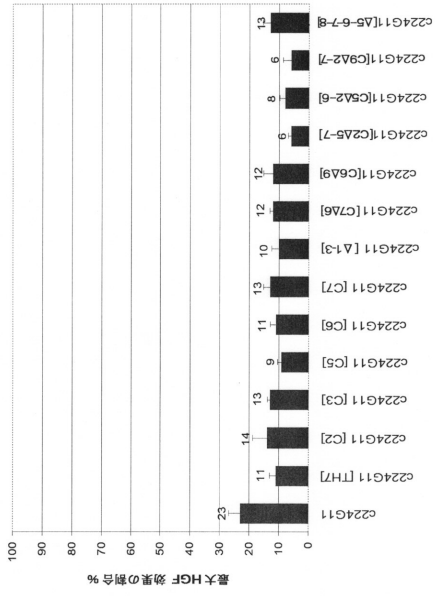
【 15 】



【 16 】



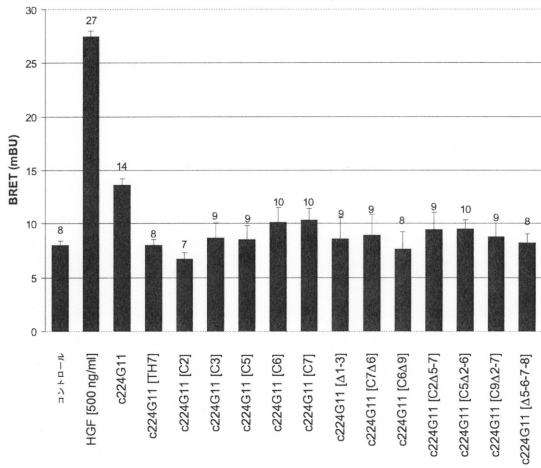
【 17 A 】



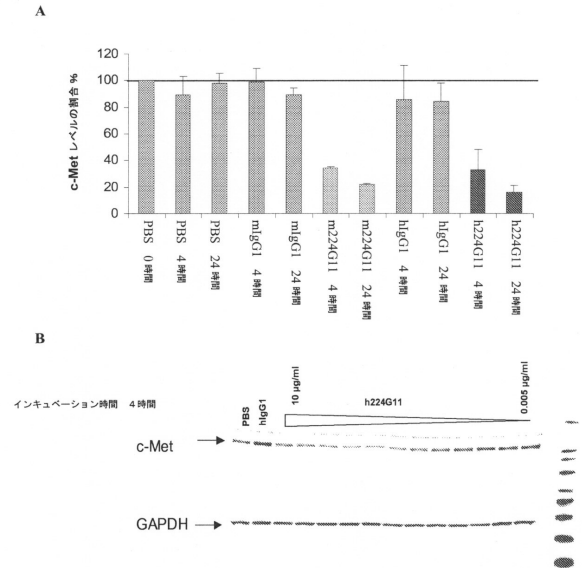
【 17 B 】



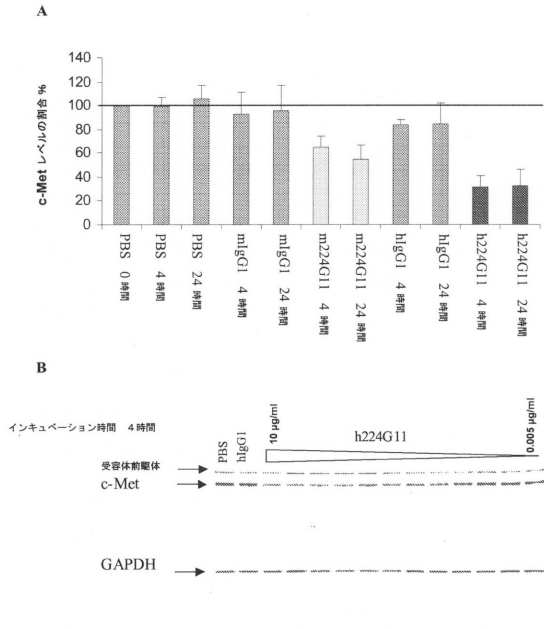
【 18 】



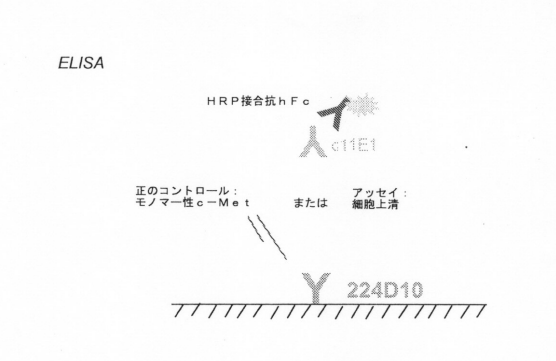
【 19 】



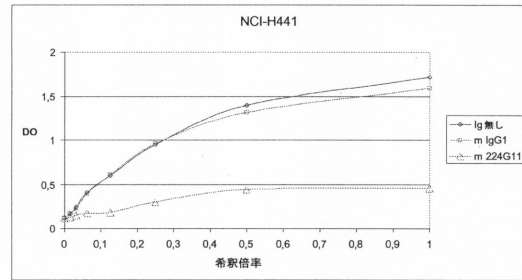
【 図 20 】



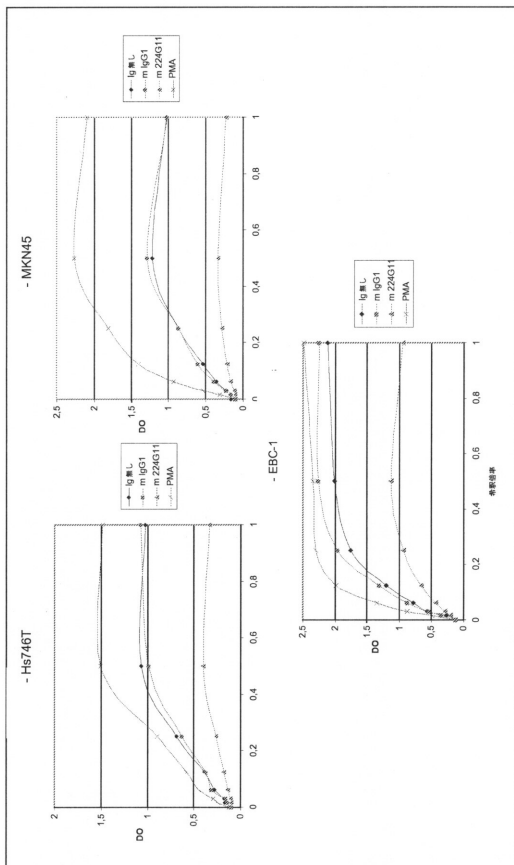
【 図 21 】



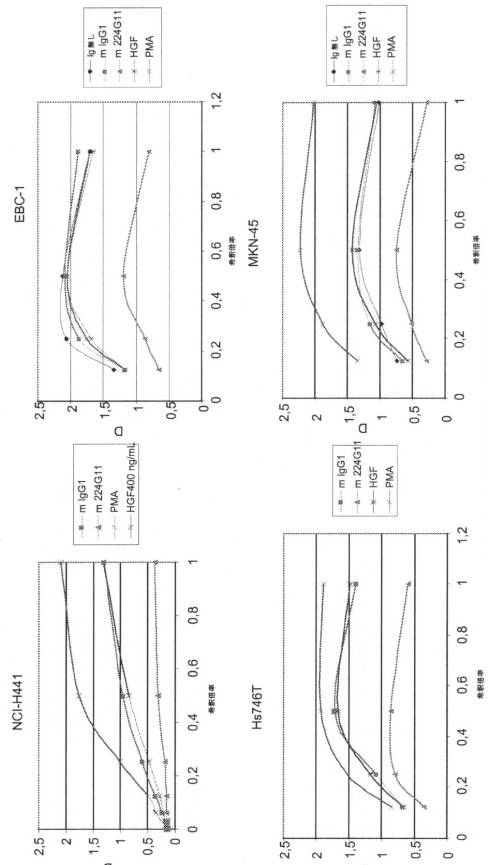
【 図 22 】



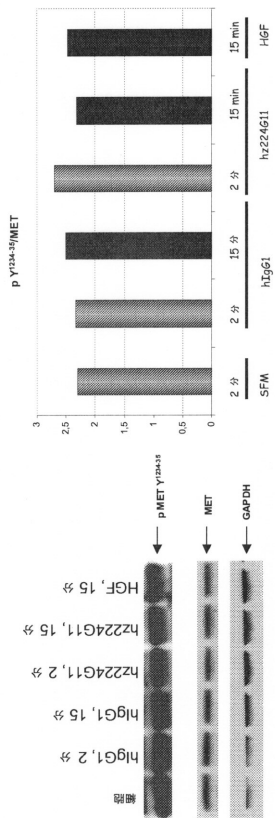
【 図 23 】



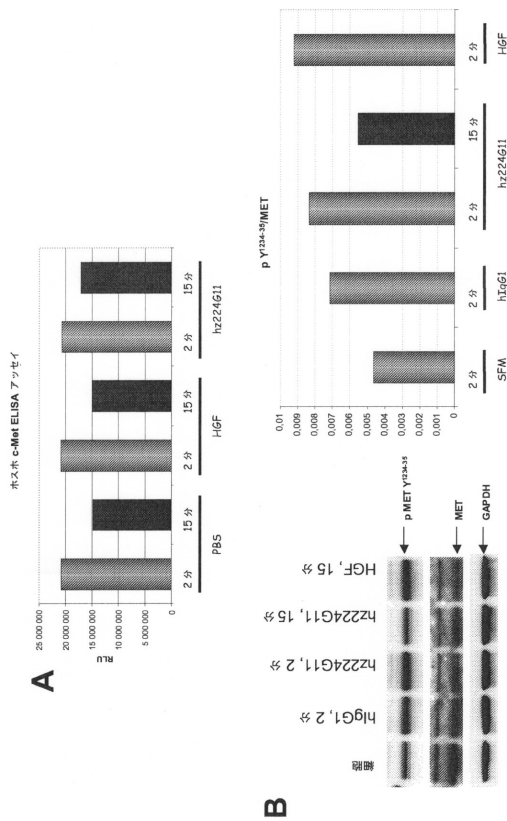
【 図 24 】



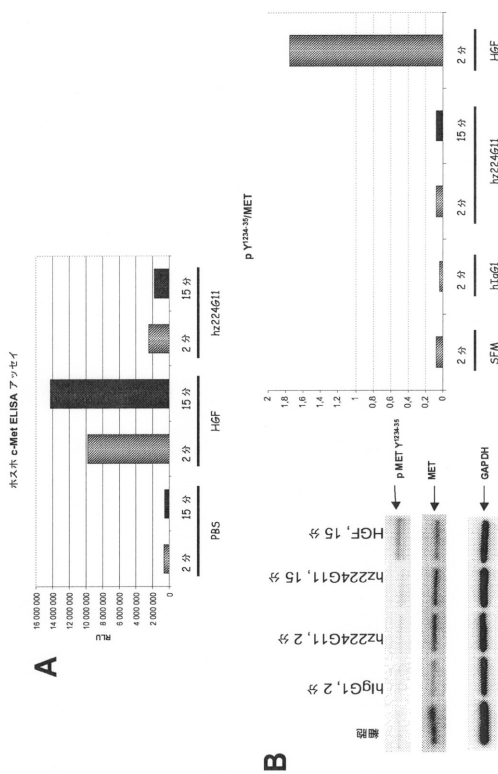
【 25 】



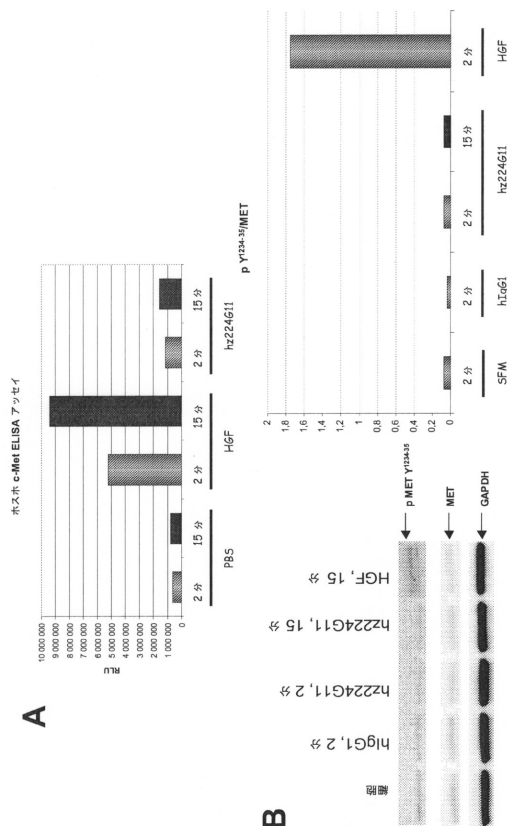
【 26 】



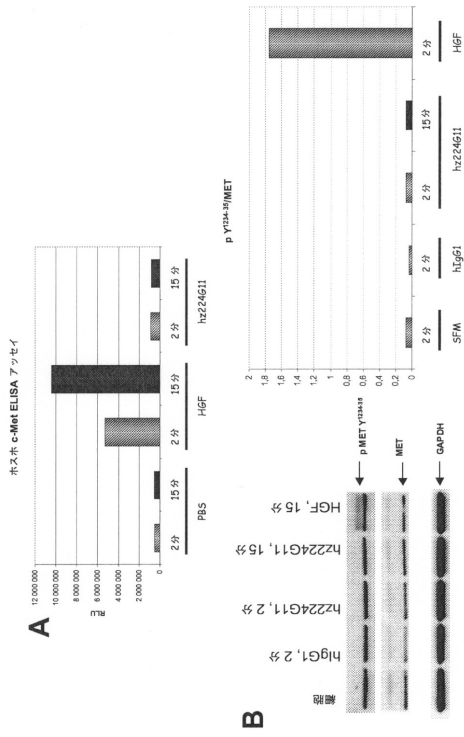
【 27 】



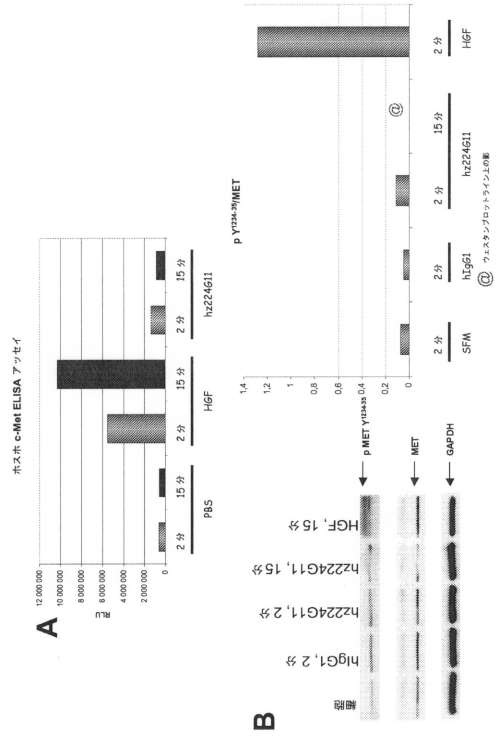
【 28 】



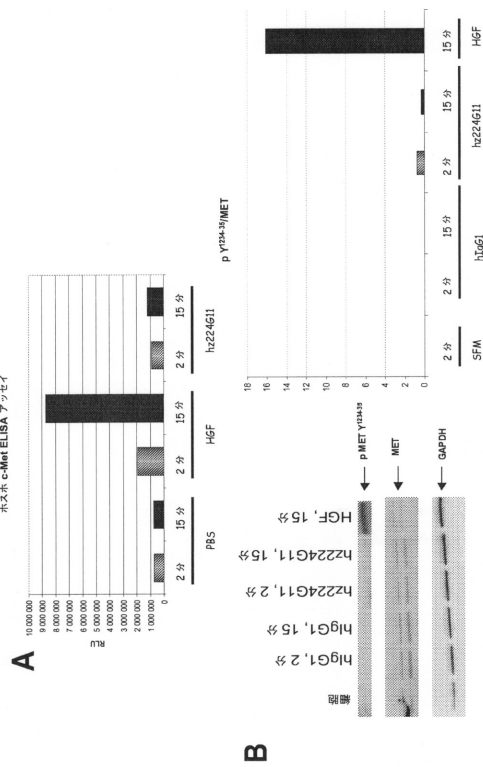
【 29 】



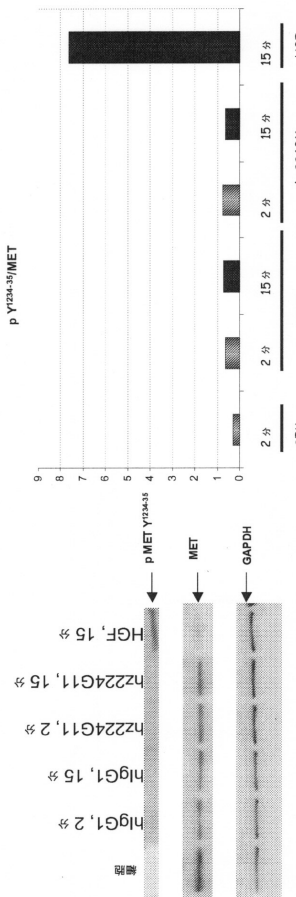
【 30 】



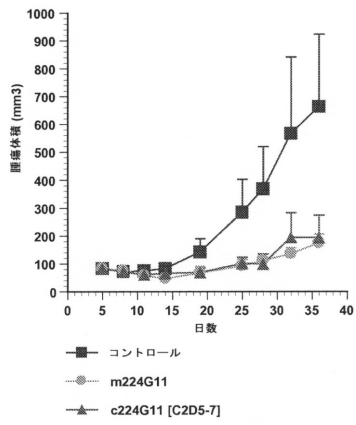
【 31 】



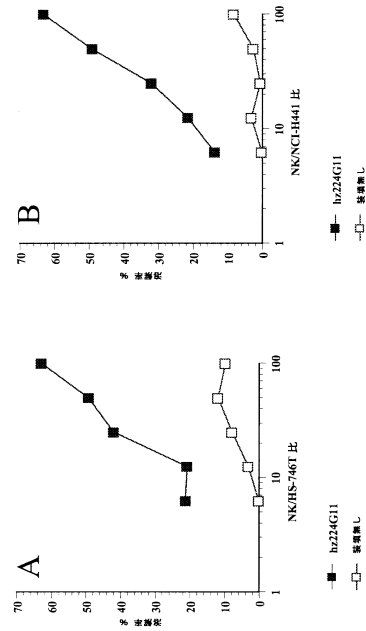
【 32 】



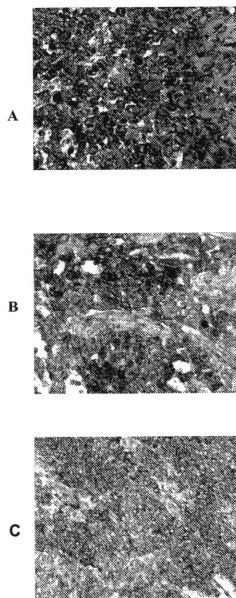
【 図 3 3 】



【 図 3 4 】



【 図 3 5 】



【配列表】

0006309657000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 0 1 K	67/027 (2006.01)	A 0 1 K	67/027
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	G 0 1 N	33/574 A
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
C 1 2 N	5/20 (2006.01)	C 1 2 N	5/20

(74)代理人 100176083

弁理士 松山 祐子

(72)発明者 リリアーヌ、ゲッチ

フランス国エーズ、ルウト、ド、クルス、15

(72)発明者 ティエリー、ウルチ

フランス国マシイ、ル、クロ、ベルブ、ルウト、デ、エトル、7

(72)発明者 セドリック、ベス

フランス国ビルビーユ、ブルバル、デ、アカンテ、12

審査官 小金井 悟

- (56)参考文献 国際公開第2009/007427(WO, A2)
 米国特許出願公開第2005/0233960(US, A1)
 国際公開第2006/015371(WO, A2)
 米国特許第06207152(US, B1)
 国際公開第2007/126799(WO, A2)
 国際公開第2006/116260(WO, A2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00 - 15/90

C 0 7 K 1/00 - 19/00

P u b M e d