

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-538148

(P2024-538148A)

(43)公表日 令和6年10月18日(2024.10.18)

(51)国際特許分類			F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	
			審査請求	未請求	予備審査請求	未請求
			(全109頁)			
			最終頁に続く			
(21)出願番号			特願2024-522646(P2024-522646)		(71)出願人	
(86)(22)出願日			令和4年10月17日(2022.10.17)		523204776	
(85)翻訳文提出日			令和6年4月16日(2024.4.16)		タボテック バイオセラピューティクス	
(86)国際出願番号			PCT/US2022/078192		(ホンコン) リミテッド	
(87)国際公開番号			WO2023/069888		香港, セントラル, ウィン ウォー スト	
(87)国際公開日			令和5年4月27日(2023.4.27)		リート 11, ウォー ヒン コマーシャル	
(31)優先権主張番号			63/256,705		ビルディング, 9 / フロア, ユニット 1	
(32)優先日			令和3年10月18日(2021.10.18)		(74)代理人	
(33)優先権主張国・地域又は機関			米国(US)		100099759	
(81)指定国・地域			AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR, GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		弁理士 青木 篤	
			最終頁に続く		(74)代理人	
					100123582	
					弁理士 三橋 真二	
					(74)代理人	
					100117019	
					弁理士 渡辺 陽一	
					(74)代理人	
					100141977	
					弁理士 中島 勝	
					(74)代理人	
					100138210	
					最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 抗 E G F R 抗体、抗 c M E T 抗体、抗 V E G F 抗体、多重特異性抗体及びそれらの使用

(57)【要約】

本開示は、E G F R、V E G F、P D - L 1、又は c M E T を標的とする抗体及び断片を提供する。本開示はまた、上皮細胞増殖因子受容体 (E G F R) に結合することができる第 1 の可変ドメイン、c M E T に結合することができる第 2 の可変ドメイン、及び P D - L 1 又は V E G F に結合することができる第 3 の可変ドメインを含む多重特異性抗体を提供する。多重特異性抗体は、がんならびに／又は他の疾患、障害、及び状態の治療に有効であり、病因が E G F R、V E G F 又は P D - L 1、及び c M E T によって媒介される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片であって、H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 が、それぞれ、配列番号 9 5、9 6、及び 9 7；配列番号 9 5、9 6、及び 9 8；配列番号 9 5、9 6、及び 1 0 5；配列番号 1 0 2、1 0 0、及び 1 0 1；ならびに配列番号 1 0 2、1 0 3、及び 1 0 4 から選択される、抗 E G F R 抗体又は抗原結合断片。

【請求項 2】

配列番号 5 ～ 1 2 のいずれか 1 つ又はその抗原結合断片と少なくとも 8 5 % の同一性を有する少なくとも 1 つの抗体単一ドメインを含む、請求項 1 に記載の抗 E G F R 抗体又は抗原結合断片。

10

【請求項 3】

配列番号 1 3 ～ 1 8 のいずれか 1 つ又はその抗原結合断片と少なくとも 8 5 % の同一性を有するタンデム抗体単一ドメイン重鎖を含む、請求項 1 に記載の抗 E G F R 抗体又は抗原結合断片。

【請求項 4】

H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 を含む重鎖可変領域、ならびに L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む抗 c M E T 抗体又はその抗原結合断片であって、H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 が、それぞれ、配列番号 1 0 6、1 0 7、及び 1 3 3；配列番号 1 1 1、1 1 2、及び 1 1 3；配列番号 1 1 1、1 1 4、及び 1 1 3；配列番号 9 9、1 1 8、及び 1 1 9；配列番号 9 9、1 2 0、及び 1 1 9；配列番号 9 9、1 2 1、及び 1 1 9；配列番号 9 9、1 2 2、及び 1 1 9 から選択され；L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 が、それぞれ、配列番号 1 0 8、1 0 9、及び 1 1 0；配列番号 1 1 5、1 1 6、及び 1 1 7；ならびに配列番号 1 2 3、1 2 4、及び 1 2 5 から選択される、抗 c M E T 抗体又は抗原結合断片。

20

【請求項 5】

配列番号 2 4、2 8 ～ 2 9、及び 3 4 ～ 3 7 のいずれか 1 つと少なくとも 8 5 % の同一性を有する重鎖配列、ならびに配列番号 2 6、3 1 ～ 3 2、及び 3 9 ～ 4 0 のいずれか 1 つと少なくとも 8 5 % の同一性を有する軽鎖配列を含む、請求項 4 に記載の抗 c M E T 抗体又は抗原結合断片。

30

【請求項 6】

配列番号 4 1 ～ 4 4 のいずれか 1 つと少なくとも 8 5 % の同一性を有する少なくとも 1 つの c M E T 結合 V H O 配列を含む、請求項 4 に記載の抗 c M E T 抗体又は抗原結合断片。

【請求項 7】

それぞれ、重鎖配列番号 2 3 及び軽鎖配列番号 2 5；重鎖配列番号 2 3 及び軽鎖配列番号 2 6；重鎖配列番号 2 4 及び軽鎖配列番号 2 5；重鎖配列番号 2 4 及び軽鎖配列番号 2 6；重鎖配列番号 2 7 及び軽鎖配列番号 3 0；重鎖配列番号 2 7 及び軽鎖配列番号 3 1；重鎖配列番号 2 7 及び軽鎖配列番号 3 2；重鎖配列番号 2 8 及び軽鎖配列番号 3 0；重鎖配列番号 2 8 及び軽鎖配列番号 3 1；重鎖配列番号 2 8 及び軽鎖配列番号 3 2；重鎖配列番号 2 9 及び軽鎖配列番号 3 0；重鎖配列番号 2 9 及び軽鎖配列番号 3 1；重鎖配列番号 2 9 及び軽鎖配列番号 3 2；重鎖配列番号 3 3 及び軽鎖配列番号 3 8；重鎖配列番号 3 3 及び軽鎖配列番号 3 9；重鎖配列番号 3 3 及び軽鎖配列番号 4 0；重鎖配列番号 3 4 及び軽鎖配列番号 3 8；重鎖配列番号 3 4 及び軽鎖配列番号 3 9；重鎖配列番号 3 4 及び軽鎖配列番号 4 0；重鎖配列番号 3 5 及び軽鎖配列番号 3 8；重鎖配列番号 3 5 及び軽鎖配列番号 3 9；重鎖配列番号 3 5 及び軽鎖配列番号 4 0；重鎖配列番号 3 6 及び軽鎖配列番号 3 8；重鎖配列番号 3 6 及び軽鎖配列番号 3 9；重鎖配列番号 3 6 及び軽鎖配列番号 4 0；重鎖配列番号 3 7 及び軽鎖配列番号 3 8；重鎖配列番号 3 7 及び軽鎖配列番号 3 9；重鎖配列番号 3 7 及び軽鎖配列番号 4 0 から選択される重鎖及び軽鎖を含む、抗 c M E T 抗体又はその抗原結合断片。

40

50

【請求項 8】

HCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびにLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む軽鎖可変領域を含む抗VEGF抗体又はその抗原結合断片であって、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3が、それぞれ、配列番号129、130、及び131；ならびに配列番号129、132、及び131から選択され；LCDR1、LCDR2、及びLCDR3が、それぞれ、配列番号126、127、及び128である、抗VEGF抗体又は抗原結合断片。

【請求項 9】

配列番号73～76のいずれか1つと少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項8に記載の抗VEGF抗体又は抗原結合断片。

10

【請求項 10】

EGFRと結合することができるEGFRアーム、及びcMETと結合することができるcMetアームを含む多重特異性抗体であって、

EGFRアームは、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含む重鎖可変領域を含み、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3が、それぞれ、配列番号95、96、及び97；配列番号95、96、及び98；配列番号95、96、及び105；配列番号102、100、及び101；ならびに配列番号102、103、及び104から選択されるか、又は

EGFRアームは、配列番号1～4から選択される軽鎖配列及び重鎖配列；配列番号5～12から選択される単ドメイン重鎖配列；又は配列番号13～18から選択されるタンDEM単ドメイン重鎖配列を含み；

20

cMETアームは、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびにLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む軽鎖可変領域を含み、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3が、それぞれ、配列番号106、107、及び133；配列番号111、112、及び113；配列番号111、114、及び113；配列番号99、118、及び119；配列番号99、120、及び119；配列番号99、121、及び119；配列番号99、122、及び119から選択され；LCDR1、LCDR2、及びLCDR3が、それぞれ、配列番号108、109、及び110；配列番号115、116、及び117；ならびに配列番号123、124、及び125から選択されるか、又は

30

cMETアームは、配列番号23～40から選択される軽鎖配列及び重鎖配列、又は配列番号41～44から選択される少なくとも1つの単ドメイン重鎖ドメインを含む、多重特異性抗体。

【請求項 11】

EGFRアームが、配列番号5～12から選択される少なくとも1つの単ドメイン重鎖ドメインを含む、請求項10に記載の多重特異性抗体。

【請求項 12】

EGFRアームが、配列番号13～18から選択されるタンDEM単ドメイン重鎖を含む、請求項10に記載の多重特異性抗体。

【請求項 13】

抗EGFRアームが、重鎖配列番号1及び軽鎖配列番号2；重鎖配列番号3及び軽鎖配列番号4；配列番号5～12から選択される単ドメイン重鎖；又は配列番号13～18から選択されるタンDEM単ドメイン重鎖を含む、請求項10に記載の多重特異性抗体。

40

【請求項 14】

cMETアームが、配列番号23～40から選択される軽鎖配列及び重鎖配列を含む、請求項10～13のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 15】

cMETアームが、配列番号41～44から選択される少なくとも1つの単ドメイン重鎖ドメインを含む、請求項10～13のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 16】

50

抗 c M E T アームが、重鎖配列番号 23 及び軽鎖配列番号 25；重鎖配列番号 23 及び軽鎖配列番号 26；重鎖配列番号 24 及び軽鎖配列番号 25；重鎖配列番号 24 及び軽鎖配列番号 26；重鎖配列番号 27 及び軽鎖配列番号 30；重鎖配列番号 27 及び軽鎖配列番号 31；重鎖配列番号 27 及び軽鎖配列番号 32；重鎖配列番号 28 及び軽鎖配列番号 30；重鎖配列番号 28 及び軽鎖配列番号 31；重鎖配列番号 28 及び軽鎖配列番号 32；c h a i n 配列番号 29 及び軽鎖配列番号 30；重鎖配列番号 29 及び軽鎖配列番号 31；重鎖配列番号 29 及び軽鎖配列番号 32；重鎖配列番号 33 及び軽鎖配列番号 38；重鎖配列番号 33 及び軽鎖配列番号 39；重鎖配列番号 33 及び軽鎖配列番号 40；重鎖配列番号 34 及び軽鎖配列番号 38；重鎖配列番号 34 及び軽鎖配列番号 39；重鎖配列番号 34 及び軽鎖配列番号 40；重鎖配列番号 35 及び軽鎖配列番号 38；重鎖配列番号 35 及び軽鎖配列番号 39；重鎖配列番号 35 及び軽鎖配列番号 40；重鎖配列番号 36 及び軽鎖配列番号 38；重鎖配列番号 36 及び軽鎖配列番号 39；重鎖配列番号 36 及び軽鎖配列番号 40；重鎖配列番号 37 及び軽鎖配列番号 39；又は重鎖配列番号 37 及び軽鎖配列番号 40 を含む、請求項 10～13 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

10

【請求項 17】

H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 を含む重鎖可変領域、ならびに L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む抗 V E G F 抗体又はその抗原結合断片をさらに含み、H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 が、それぞれ、配列番号 129、130、及び 131；ならびに配列番号 129、132、及び 131 から選択され；L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 が、それぞれ、配列番号 126、127、及び 128 である、請求項 10～16 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

20

【請求項 18】

抗 V E G F 抗体又は抗原結合断片が、配列番号 73～76 のいずれか 1 つと少なくとも 85% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 10～17 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 19】

配列番号 71～72 のいずれか 1 つと少なくとも 85% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、抗 P D - L 1 抗体又はその抗原結合断片をさらに含み、請求項 10～16 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 20】

多重特異性抗体が、配列番号 45～51 から選択される遮蔽ドメインを含む、請求項 10～19 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

30

【請求項 21】

多重特異性抗体が、配列番号 52～61 から選択される遮蔽ドメインを含む、請求項 10～19 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 22】

多重特異性抗体が、配列番号 62～69 から選択されるプロテアーゼ認識ペプチド配列を含む、請求項 20～21 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 23】

多重特異性抗体が、配列番号 83～94 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 10 に記載の多重特異性抗体。

40

【請求項 24】

多重特異性抗体が、それぞれ、配列番号 90、配列番号 84、及び配列番号 85 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 23 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 25】

請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、又は請求項 10～24 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体、及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 26】

請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、又は請求項 10～2

50

4のいずれか1項に記載の多重特異性抗体をコードする核酸配列。

【請求項27】

請求項26に記載の核酸配列を含む組換え発現ベクター。

【請求項28】

請求項27に記載の組換え発現ベクターを含む、組換え発現形質転換体。

【請求項29】

請求項28に記載の組換え発現形質転換体を培養し、場合により制御されたFabアーム交換を用いて、培養物から抗体もしくは抗原結合断片、又は多重特異性抗体を得ることを含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、又は請求項10～24のいずれか1項に記載の多重特異性抗体を調製するための方法。

10

【請求項30】

対象におけるがんを治療又は予防するための方法であって、薬学的有効量の請求項1～9のいずれか1項に記載の抗体もしくは抗原結合断片又は請求項10～24のいずれか1項に記載の多重特異性抗体、あるいは請求項25に記載の医薬組成物を含む医薬を対象に投与することを含む、方法。

【請求項31】

がんが、肺がん、乳がん、膵臓がん、大腸がん、頭頸部がん、食道がん、又は胃がんである、請求項30に記載のがんを治療又は予防するための方法。

【請求項32】

がんが再発したEGFR陽性がんである、請求項30に記載のがんを治療又は予防するための方法。

20

【請求項33】

対象における疾患を治療又は予防するための方法であって、薬学的有効量の請求項10～24のいずれか1項に記載の多重特異性抗体を含む医薬を対象に投与することを含み、疾患が、EGFR、VEGF又はPD-L1、及びcMETによって介在される、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021年10月18日に出願された米国仮特許出願第63／256,705号に対する優先権を主張し、その内容は、参照によりここに組み込まれる。

30

【0002】

配列表

本出願には、「15271.0011-00304__sql__20221014.xml」という名称のXMLファイルとして電子的に提出された配列リストが含まれ、サイズは140,305バイトであり、2022年10月14日に作成された。配列表に含まれる情報は、参照によりここに組み込まれる。

【0003】

開示の分野

本開示は、上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)、cMET、及びPD-L1/VEGF軸を標的とする抗体、ならびに抗体の使用に関するものであり、がん及び他の疾患、障害、及び病因がEGFR、PD-L1/VEGF、及び／又はcMETによって媒介される状態を治療又は予防する。

40

【背景技術】

【0004】

上皮細胞増殖因子(EGF)受容体(EGFR)は細胞表面受容体であり、ErbB-1受容体、ERBB、ERBB1、HER1、PIG61、mENAとしても知られている。EGFRは、ErbBファミリー受容体の一員であり、ErbB-1(EGFR)、ErbB-2(HER2/c-neu; Her2)、ErbB-3(Her3)及びErbB-4(Her4)の4つの密接に関連する受容体チロシンキナーゼのサブファミリー

50

である。EGFRは、成長因子受容体の1型チロシンキナーゼファミリーのメンバーであり、細胞の成長、分化、及び生存において重要な役割を果たす。

【0005】

EGFRは、上皮細胞増殖因子、アンフィレグリン、ヘパリン結合性ETF、ベタセルリン、及び形質転換成長因子 α (TGF α)を含む特異的リガンドによって活性化される。成長因子リガンドによって活性化されると、受容体は、不活性な、ほとんど単量体の形態から、活性ホモ二量体に変化する。リガンド結合後にホモダイマーを形成することに加えて、EGFRは、ErbB-2のようなErbB受容体ファミリーの別のメンバーと対になって、リガンド結合の非存在下で活性化されたヘテロダイマーを形成することができる。

10

【0006】

EGFRが関与する突然変異は、いくつかの種類のがんで同定されている。第一世代のTKI、例えばゲフィチニブ及びエルロチニブの低分子チロシンキナーゼ阻害薬(TKI)は、細胞内チロシンキナーゼ領域におけるEGFRの自己リン酸化を遮断し、それによって下流のシグナル伝達イベントを阻害する。T790M変異によるH1975(L858R/T790M)及びH820(del(E746、A750), T790M)のような肺がん細胞株は、異なる世代のTKI分子に抵抗性である。

アフチニブ、ダコチニブ、ネラチニブなどの2nd世代のTKIは、EGFR T790Mに対して有望な活性を示したが、同時に野生型EGFRを抑制することによる用量制限毒性のために限られた有効性しか示さなかった。H1975-HGF異種移植モデルは、Janssenの特許US2018/0258173 A1の図13に示されるエルロチニブ及びアフチニブに耐性である。オシメルチニブは、3rd世代TKIとして、EGFR T790M耐性変異を獲得した非小細胞肺がんに対して承認されている。しかし、オシメルチニブで治療された患者は最終的に薬剤耐性を獲得する。EGFR(C797S)の突然変異が頻繁に出現する機序である。多数の研究により、1st及び3rd世代TKIの両方に対する主要な耐性機序として、MET遺伝子増幅によるcMETの発現増加又はHGFの発現増加によるcMetの活性化が強調されている。

20

【0007】

セツキシマブ及びパニツムマブはいずれも、EGFRの細胞外部分を標的とし、リガンド結合を遮断することによって機能し、それによって細胞増殖の阻害につながる下流事象を阻害する。しかしながら、腫瘍に他の突然変異が含まれる患者には通常、セツキシマブ又はパニツムマブ療法は有益ではない。KRASの機能獲得型変異は、たとえEGFRが遮断されていても増殖シグナルを持続的に送ることによって、腫瘍細胞のシグナル伝達特性を変化させる。がん細胞を過剰発現するEGFRを標的とした現在のEGFR標的療法の副作用は、腫瘍外の他の正常組織におけるEGFRの基礎発現による毒性に苦しむ。EGFR遺伝子の活性化突然変異、主にL858R突然変異、エクソン19欠失、及びエクソン20突然変異は、EGFRキナーゼ活性のリガンド非依存性活性化をもたらす。EGFR及び間葉-上皮移行因子(MET)シグナル伝達経路の両方の異常な活性化は、肺がんにおける腫瘍細胞の増殖及び増殖の促進に関与している(Bean, Brennan et al. 2007, Engelman, Zejnullahu et al. 2007)。

30

【0008】

METは、チロシンキナーゼスーパーファミリーのメンバーであるヒト肝細胞増殖因子(HGF; 散乱因子としても知られる)のヒト受容体である。cMETリガンドは、HGF及びそのスプライシングアイソフォーム(NK1、NK2)を含む強力なマイトジェン/モルフォゲンである。HGFの発現は、HGF/cMETシグナル伝達経路の活性化とも関連しており、EGFR標的療法による選択下での腫瘍の逃避機構の1つでもある。リガンドがcMETに結合すると、受容体の多量体化、細胞内領域の複数のチロシン残基のリン酸化、下流のシグナル伝達の触媒活性化が起こる。HGF/cMETシグナル伝達経路は、正常な体の発生と創傷治癒において重要な役割を果たす。しかしながら、がんにおける異常なcMET活性化は、腫瘍の進行、血管新生、浸潤性増殖、及びがんの転移をも

40

50

たらず。過剰発現、増幅、又は突然変異を介したヒトがんにおけるHGF又はcMETの調節不全及び／又は過剰活性化は、予後不良に関連している。cMETは、HGF関連様式及びHGF非依存様式で活性化され得る。大腸がん、肺がん、胃がん、腎がんなど様々ながんではcMET、MET遺伝子増幅あるいは変異の過剰発現が報告されており、リガンド非依存的な受容体活性化を促す可能性がある(Birchmeier, Birchmeier et al. 2003)。cMETの存在量はまた、ホモ二量体化及びヘテロ二量体化を誘発し、続いてリガンドの非存在下で細胞内シグナル伝達を活性化する可能性がある。

【0009】

METとEGFRは、多くのヒト腫瘍でも共発現している。一方の受容体を遮断すると、他方の受容体がアップレギュレートされる傾向があり、頻繁かつしばしば迅速に、単一の抗腫瘍剤治療に対する耐性が生じる(Engelman, Zejnullahu et al. 2007)。逆に、cMET阻害剤に長期間曝露されたcMET増幅肺がん細胞は、EGFR経路を介して耐性を発現する(McDermott, Pusapati et al. 2010)。EGFR標的療法に対する耐性におけるcMET/HGFシグナル伝達は、耐性を治療するための分子の開発を助長している。残念ながら、抗体ベースのアプローチには抗HGF抗体が含まれ、抗cMET抗体は臨床的に有効ではなかった(Lee, Sung et al. 2015)。さらに、いくつかのインビボ研究は、いくつかのcMET小分子阻害剤が、心拍数加速、心筋変性、腎毒性、及び体重減少などの潜在的な副作用を有することを示した(Cui, Shen et al. 2013)。

【0010】

EGFR経路とcMET経路の両方を遮断するという課題に取り組むため、様々な多重特異性EGFR×cMET抗体が開発されている。2+2単鎖(sc)Fv-mAb融合フォーマットを有するSamsung ME22S(US2015030599)、SEED 1+1多重特異性抗体フォーマットを有するMerck(WO2017/076492)、セツキシマブ上に融合したcMETの2:1 scFvを有するGenentech、セツキシマブフォーマットに融合した1+1 scFab cMETを有するRoche Glycart(UWO2017/076492)、2+2 scFv-Fab-Fc/scFv-Fabフォーマットを有するLilly LY3164530(US20130156772)、FIT Ig 2+2フォーマットを有するEpimab、共通軽鎖1+1フォーマットを有するMerus MCLA-129(US2020024892)、及びJanssen/Genmab 1+1 DuoBodyフォーマット(US20180258173)を含む様々なアーキテクチャが存在する。各分子は、異なる範囲の有効性を有するが、それでもなお、耐性の誘導ならびに用量制限有害作用の発生のために、特定の患者サブセットに限定された適用に苦しむ。

【0011】

プログラムデスリガンド-1(PD-L1)は、NSCLCの19.6%~65.3%で発現している(Pawelczyk, Piotrowska et al. 2019)。さらに、EGFR変異の存在はPD-L1発現と連鎖している。EGF刺激、エクソン-19欠失、及びL858R変異によるEGFR活性化もPD-L1発現を誘導できた。このようなEGFR活性化は、腫瘍細胞及び末梢血単核細胞共培養系においてPD-L1/VEGF軸を介してT細胞のアポトーシスを誘導することができる。したがって、EGFR-TKIによるEGFRの阻害は、T細胞の阻害を解き放ち、インターフェロン-γの産生を増強することができる(Chen, Fang et al. 2015, Fan, Liu et al. 2015)。cMET及びプログラム死-1(PD-1)ヒト化多重特異性モノクローナル抗体は、cMETを遮断することによって腫瘍の進行、移動、転移、及び血管新生を阻害するために開発され、またcMET及びPD-L1を過剰発現するがん細胞においてPD-1を遮断することによって全身性T細胞機能を救済することができる。さらに、このようなBsAbは、T細胞と腫瘍細胞とを橋渡しすることができ、T細胞が腫瘍細胞を直接標的化することを可能にする(Sun, Wu et al. 2017)。他の研究では、多重特異性cMET/PD-L1 CAR-Tは、肝細胞がんの治療に対して、一価cMET CAR-Tよりも有効である。インビボ実験では、cMET/PD-L1 CAR-T細胞が腫瘍増殖を有意に阻害し、生存持

10

20

30

40

50

続性を改善することが実証されている (Jiang, Li et al. 2021)。

【0012】

現在、PD-1とそのそれぞれのリガンドPD-L1を含む免疫療法は有望である。PD-L1 (B7-H1又はCD274としても知られる)は、様々な腫瘍において過剰発現されるPD-1の同族リガンドである。PD-1とPD-L1が結合すると、NK細胞やT細胞の活性化、増殖、生存が阻害され、やがて腫瘍細胞の免疫回避につながる。最近の研究では、PD-1/PD-L1経路を遮断することで、Tリンパ球の作用を回復させることで内因性抗腫瘍免疫を増強できることが実証されている。このように、PD-1/PD-L1軸を操作することは、NSCLCに対する有望な治療選択肢である可能性がある。抗PD-1/PD-L1抗体は、EGFR-TKI抵抗性患者、特にEGFR変異を有するEGFR-TKI抵抗性NSCLC患者に対する任意療法となりうる。

10

【0013】

EGFR+がんを封じ込めるより良い戦略を得るために、代替治療法が開発されている。がん細胞とその微小環境との相互作用は、固形腫瘍の発生及び進行に重要である (Holmgren, O'Reilly et al. 1995)。腫瘍の増殖及び転移は、微小血管系の発生及び／又はリモデリングに決定的に依存している (Folkman 1995)。炎症性乳がんは、血管新生の鍵となるメディエーターであり、内皮や腫瘍細胞の増殖や運動性、血管透過性に関与するVEGFなどの血管新生因子が高発現していることから、病理学的には高い血管分布と微小血管密度の増加を特徴とする (Kaumaya and Foy 2012)。腫瘍形成における休眠と活発な成長との間の移行は、「血管新生スイッチ」によって誘発されるようである (Holmgren, O'Reilly et al. 1995)。この血管新生スイッチは、最近、いくつかの型のがんで立証されている。VEGFは、今日知られている最も血管新生促進因子の1つを構成する (Troiani, Martinelli et al. 2012)。多くの異なるタイプのがんでは、VEGFの遺伝子発現、及び分泌レベルが上昇する (Fukumura, Xavier et al. 1998)。VEGFは、VEGF受容体 (VEGFR) -1及び／又はVEGFR-2シグナル伝達を介して、血管新生因子として働くだけでなく、転移の重要なプロモーターである。内皮細胞はVEGFR-2活性化を介して反応する一方、マクロファージなどの浸潤細胞はVEGFR-1シグナル伝達を介して活性化され、このシグナル伝達は新生血管における内皮前駆細胞の動員にも関与している (Kaumaya and Foy 2012)。

20

【0014】

血管新生は、固形腫瘍、増殖性網膜症又は加齢黄斑変性 (AMD) のような眼内新生血管症候群、関節リウマチ、及び乾癬を含む様々な疾患の病因に関与している (Klagsbrun and D'Amore 1991, Folkman and Shing 1992)。固形腫瘍の場合、新生血管は、腫瘍細胞が正常細胞と比較して増殖優位性及び増殖自律性を獲得することを可能にする。したがって、乳がんならびにいくつかの他の腫瘍において、腫瘍切片中の微小血管の密度と患者の生存率との間に相関関係が観察されている (Weidner, Semple et al. 1991, Horak, Leek et al. 1992, Macchiarini, Fontanini et al. 1992)。

30

【0015】

抗EGFR、cMET、PD-L1/VEGF、及びHGF免疫療法でのヒト腫瘍での1つ又は複数の課題に対処するために、本明細書は、新規の抗EGFR、抗cMET、及び抗VEGF抗体を提供する。本開示はまた、EGFRに結合することができる第1の変ドメイン (例えば、EGFRの細胞外ドメイン)、cMETに結合することができる第2の変ドメイン (例えば、cMETの細胞外ドメイン)、及びPD-L1又はVEGFを遮断することができる第3の変ドメインを含む、多重特異性抗体などの新規の多重特異性抗体を提供する。

40

【0016】

cMET、PD-L1/VEGF、及びEGFRを高親和性で結合する本開示の多機能抗体は、以下の1つ以上の利点を提供することができる。例えば、本開示の多機能性抗体は、HGFによるcMET活性化、ならびに、EGFファミリー及びHGFファミリーのリガンドによるEGFR活性化を効果的に中和することができ、及び／又は、cMET及

50

びEGFR（野生型及び変異体の両方）の内在化及び／又は分解において、単剤の組み合わせと比較して優れた活性を提供することができる。このような多機能抗体は、ある種のガンに対する効果的な薬理的介入として必要である。このような多機能性抗体は、EGFR、cMET、及びHERファミリーメンバー間のヘテロダイマークラスター形成の可能性を防止することができる。このような多機能性抗体は、PD-1及びPD-L1の関与をブロックして、付近の免疫細胞の活性を増強することができる。特に、本開示の多機能抗体は、（a）1つ以上のKRAS及びExon20突然変異を有することを特徴とするガンをより効果的に治療することができ；（b）エルロチニブ、ゲフィチニブ、ラパチニブ及びベムラフェニブを含むがこれらに限定されない他のcMET及び／又はEGFR阻害剤に対する耐性の発現を予防又は遅延させる上で、単剤の関連する組み合わせと比較して優れた活性を示すことができる；（c）測定可能なアゴニストEGFR及びcMET活性を最小限又は全く誘発しない；（d）PD-L1及びPD-1の結合を遮断する；又は血管新生のVEGF活性を遮断する；又は（f）インビボでの安定性、物理的及び化学的安定性、限定されないが、ガンの治療における開発及び／又は使用に許容される熱安定性、溶解性、低い自己会合性、及び薬物動態特性を示すことができる。

10

【発明の概要】

【0017】

本開示は、EGFR、PD-L1／VEGF、及びcMETに対する抗体又はその抗原結合断片、そのような抗体及び断片をコード化する核酸、抗体及び断片を調製する方法、ならびにEGFR、PD-L1／VEGF、及びcMET媒介疾患又は障害などの疾患、例えば、肺、頭頸部、腎臓、肝臓、胃、結腸直腸、トリプルネガティブ乳、膵臓、及び神経内分泌ガンを含むヒトガンの治療方法を提供する。

20

【0018】

一態様では、本開示は、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3と命名される3つの相補性決定領域（CDR）を含む重鎖可変領域を含む抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここで、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3は、それぞれ配列番号95、96、及び97；配列番号95、96、及び98；配列番号95、96、及び105；配列番号102、100、及び101；ならびに配列番号102、103、及び104から選択される。

30

【0019】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号5～12又はその抗原結合断片から選択される少なくとも1つの抗体単ドメインを含む抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態では、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は、任意選択でリンカーを介して連結された、タンデム抗体単ドメイン重鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は、配列番号13～18から選択されるタンデム抗体単ドメイン重鎖又はその抗原結合断片を含み、2つのEGFR結合VHO配列がリンカーを介して連結されている。

【0020】

一部の実施形態では、本開示は、配列番号5～12のいずれか1つ又はその抗原結合断片と少なくとも85%の同一性を有する少なくとも1つの抗体単ドメインを含む抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を提供する。一部の実施形態では、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は、配列番号13～18又はその抗原結合断片のいずれか1つと少なくとも85%の同一性を有するタンデム抗体単ドメイン重鎖を含む。

40

【0021】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号5～12から選択される少なくとも1つの抗体単ドメインを含むか、又は配列番号13～18から選択されるタンデム抗体単ドメイン重鎖を含む、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片によって認識されるEGFR（例えば、ヒトEGFR）上の1つ以上のエピトープと結合する、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を提供する。

50

【0022】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヒト抗体重鎖配列番号：1及びヒト抗体軽鎖配列番号2；又はヒト抗体重鎖配列番号3、及びヒト抗体軽鎖配列番号4を含む抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0023】

別の態様では、本開示は、抗cMET抗体又はその抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3と命名される3つの相補性決定領域（CDR）を含む重鎖可変領域を含む抗cMET抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここで、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3は、それぞれ配列番号106、107、及び133；配列番号111、112、及び113；配列番号111、114、及び113；配列番号99、118及び119；配列番号99、120及び119；配列番号99、121、及び119；ならびに配列番号99、122、及び119から選択される。

10

【0024】

一部の実施形態では、本開示は、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3と命名される3つのCDRを含む軽鎖可変領域を含む抗cMET抗体又はその抗原結合断片を提供し、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3は、それぞれ配列番号108、109、及び110；配列番号115、116、及び117；配列番号123、124、及び125から選択される。

【0025】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号24、28～29、及び34～37から選択される抗体重鎖配列、ならびに配列番号26、31～32、及び39～40から選択される抗体軽鎖配列を含む、抗cMET抗体又はその抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号23、27、及び33から選択される抗体重鎖配列、ならびに配列番号25、30、及び38から選択される抗体軽鎖配列を含む、抗cMET抗体又はその抗原結合断片を提供する。一部の実施形態では、本開示は、配列番号41～44から選択される少なくとも1つのcMET結合VHO（可変重鎖のみ）配列を含む抗cMET抗体又はその抗原結合断片を提供する。

20

【0026】

一部の実施形態では、本開示は、配列番号23、24、27～29、及び33～37のいずれか1つと少なくとも85%の同一性を有する抗体重鎖配列、ならびに配列番号25、26、30～32、及び38～40のいずれか1つと少なくとも85%の同一性を有する抗体軽鎖配列を含む、抗cMET抗体又はその抗原結合断片を提供する。一部の実施形態では、本開示は、配列番号41～44のいずれか1つと少なくとも85%の同一性を有する少なくとも1つのcMET結合VHO配列を含む抗cMET抗体又はその抗原結合断片を提供する。

30

【0027】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号23、24、27～29、及び33～37から選択される抗体重鎖配列、ならびに配列番号25、26、30～32、及び38～40から選択される抗体軽鎖配列を含む、抗cMET抗体又はその抗原結合断片によって認識されるcMET上の1つ以上のエピトープに結合する、抗cMET抗体又はその抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号41～44から選択される少なくとも1つのcMET結合VHO配列を含む抗cMET抗体又はその抗原結合断片によって認識されるcMET上の1つ以上のエピトープに結合する抗cMET抗体又はその抗原結合断片を提供する。

40

【0028】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヒト抗体重鎖配列番号23及びヒト抗体軽鎖配列番号25；ヒト抗体重鎖配列番号23及びヒト抗体軽鎖配列番号26；ヒト抗体重鎖配列番号24及びヒト抗体軽鎖配列番号25；ヒト抗体重鎖配列番号24及びヒト抗体軽鎖配列番号26；ヒト抗体重鎖配列番号27及びヒト抗体軽鎖配列番号30；ヒト抗体重鎖配

50

列番号 27 及びヒト抗体軽鎖配列番号 31；ヒト抗体重鎖配列番号 27 及びヒト抗体軽鎖配列番号 32；ヒト抗体重鎖配列番号 28 及びヒト抗体軽鎖配列番号 30；ヒト抗体重鎖配列番号 28 及びヒト抗体軽鎖配列番号 31；ヒト抗体重鎖配列番号 28 及びヒト抗体軽鎖配列番号 32；ヒト抗体重鎖配列番号 29 及びヒト抗体軽鎖配列番号 30；ヒト抗体重鎖配列番号 29 及びヒト抗体軽鎖配列番号 31；ヒト抗体重鎖配列番号 29 及びヒト抗体軽鎖配列番号 32；ヒト抗体重鎖配列番号 33 及びヒト抗体軽鎖配列番号 38；ヒト抗体重鎖配列番号 33 及びヒト抗体軽鎖配列番号 39；ヒト抗体重鎖配列番号 33 及びヒト抗体軽鎖配列番号 40；ヒト抗体重鎖配列番号 34 及びヒト抗体軽鎖配列番号 38；ヒト抗体重鎖配列番号 34 及びヒト抗体軽鎖配列番号 39；ヒト抗体重鎖配列番号 34 及びヒト抗体軽鎖配列番号 40；ヒト抗体重鎖配列番号 35 及びヒト抗体軽鎖配列番号 38；ヒト抗体重鎖配列番号 35 及びヒト抗体軽鎖配列番号 39；ヒト抗体重鎖配列番号 35 及びヒト抗体軽鎖配列番号 40；ヒト抗体重鎖配列番号 36 及びヒト抗体軽鎖配列番号 38；ヒト抗体重鎖配列番号 36 及びヒト抗体軽鎖配列番号 39；ヒト抗体重鎖配列番号 36 及びヒト抗体軽鎖配列番号 40；ヒト抗体重鎖配列番号 37 及びヒト抗体軽鎖配列番号 38；ヒト抗体重鎖配列番号 37 及びヒト抗体軽鎖配列番号 39；ヒト抗体重鎖配列番号 37 及びヒト抗体軽鎖配列番号 40 から選択されるヒト抗体重鎖及びヒト抗体軽鎖を含む抗 c M E T 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

10

【0029】

別の局面において、本開示は、配列番号 71～72 から選択されるアミノ酸配列を含む抗 P D L - 1 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

20

【0030】

一部の実施形態では、本開示は、配列番号 71～72 のいずれか 1 つと少なくとも 85 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗 P D - L 1 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0031】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号 71 - 72 から選択されるアミノ酸配列を含む抗 P D - L 1 抗体又はその抗原結合断片によって認識される P D - L 1 上の 1 つ以上のエピトープと結合する抗 P D - L 1 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0032】

別の態様では、本開示は、抗 V E G F 抗体又はその抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 と命名される 3 つの相補性決定領域 (C D R) を含む重鎖可変領域を含む抗 V E G F 抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここで、H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 は、それぞれ配列番号 129、130、及び 131；配列番号 129、132、及び 131 から選択される。

30

【0033】

一部の実施形態では、本開示は、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 と呼ばれる 3 つの C D R を含む軽鎖可変領域を含む抗 V E G F 抗体又はその抗原結合断片を提供し、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 126、127、及び 128 である。

【0034】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号 73～76 から選択されるアミノ酸配列を含む抗 V E G F 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

40

【0035】

一部の実施形態では、本開示は、配列番号 73～76 のいずれか 1 つと少なくとも 85 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、抗 V E G F 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0036】

一部の実施形態では、本開示は、配列番号 73～76 から選択されるアミノ酸配列を含む抗 V E G F 抗体又はその抗原結合断片によって認識される V E G F 上の 1 つ以上のエピトープと結合する、抗 V E G F 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

50

【0037】

別の局面において、本開示は、EGFR及びcMET、ならびにVEGF又はPD-L1を結合し、そして1つ以上の望ましい機能的特性を示す、多重特異性抗体を提供する。そのような特性には、例えば、ヒトEGFR及びcMETへの高親和性特異的結合、EGFRへの結合からEGFなどのEGFRリガンドのブロック能力、cMETへのHGFなどのcMETリガンドのブロック能力、PD-L1又はVEGFへの結合能力、及びPD-L1のPD-L1への結合からのブロック能力が含まれる。

【0038】

いくつかの実施形態では、cMETに結合する二価抗cMET抗体は、腫瘍細胞増殖をもたらし得る。したがって、ここに開示する多重特異性抗体は、好ましくは、一価のcMET結合（すなわち、cMETのエピトープに結合する1つのFabアーム）を有する。

10

【0039】

いくつかの実施形態は、1のcMET結合価数を有する多重特異性抗体を提供する。

【0040】

いくつかの実施形態は、1又は2のEGFR結合価数を有する多重特異性抗体を提供する。

【0041】

いくつかの態様は、1又は2のPD-L1又はPD-1結合価数を有する多重特異性抗体を提供する。

【0042】

いくつかの実施形態では、本開示は、EGFR（例えば、ヒトEGFR）に結合することができるEGFRアーム、cMET（例えば、ヒトcMET）に結合することができるcMETアーム、PD-L1（例えば、ヒトPD-L1）又はVEGF（例えば、ヒトVEGF）に結合することができる第3の可変ドメインを含む三重特異性抗体を提供する。抗体は、2：1：1又は2：1：2の抗EGFR、抗cMET、及び抗PD-L1又は抗VEGFの化学量論を有する、IgG1形式の全長抗体であり得る。

20

【0043】

いくつかの実施形態では、本開示は、EGFRに結合することができる第1の可変ドメイン（例えば、EGFRの細胞外ドメイン）を含むEGFRアーム、cMETに結合することができる第2の可変ドメイン（例えば、cMETの細胞外ドメイン）を含むcMETアーム、及びPD-L1又はVEGFに結合することができる第3の可変ドメインを含む三重特異性抗体を提供する。抗体は、2：1：1又は2：1：2の抗EGFR、抗cMET、及び抗PD-L1又は抗VEGFの化学量論を有する、IgG1形式の全長抗体であり得る。

30

【0044】

いくつかの実施形態では、本開示は、NからC末端にアミン酸配列を含むヒトIgG重鎖融合を含むことができるEGFRを標的とすることができる結合アームを含む多重特異的な結合を提供し、これらに限定されないが、配列A-遮蔽A-リンカーA-プロテアーゼ配列A-リンカーB-EGFRを標的とするVHO-AリンカーC-EGFRを標的とするVHO-BリンカーD-Fcを含む。いくつかの実施形態では、本開示は、EGFR及びPD-L1／VEGFの両方を標的とすることができる結合アームを含む多重特異性抗体であって、シグナル配列A-遮蔽-AリンカーA-プロテアーゼ配列A-リンカーVHO-A標的EGFR-リンカーVHO-B標的EGFR-リンカーD-Fc-抗PD-L1／VEGFを含むヒトIgG重鎖融合を含む多重特異性抗体を提供する。このIgGは、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、及び／又はIgG4 Fcフレームワークを有し得る。

40

【0045】

いくつかの実施形態では、本開示は、cMETを標的化することができる結合アームを含む多重特異性抗体を提供し、この結合アームは、cMETを標的化するNからC末端までのアミノ酸配列を含むヒトIgG重鎖融合体、シグナル配列C-遮蔽C-リンカーE-

50

プロテアーゼ配列BーリンカーFーIgG1重鎖融合体、及びNからC末端にアミノ酸配列を含むヒトIgG軽鎖融合体、シグナル配列Dー遮蔽DーリンカーGープロテアーゼ配列CーリンカーHーcMETを標的とするIgG軽鎖を含み得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本開示は、cMET及びPD-L1/VEGFの両方を標的化することができる結合アームを含む、NからC末端までのアミノ酸配列を含むヒトIgG重鎖融合体、シグナル配列Cー遮蔽CーリンカーEープロテアーゼ配列BーリンカーFーcMETを標的化するIgG1重鎖ー抗PD-L1/VEGF、及びNからC末端までのアミノ酸配列を含むヒトIgG軽鎖融合体、シグナル配列Dー遮蔽DーリンカーGープロテアーゼ配列CーリンカーHーcMETを標的とするIgG1軽鎖ー抗PD-L1/VEGFを含む多重特異性抗体を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、cMET及びPD-L1/VEGFの両方を標的とすることができる結合アームを含む多重特異性抗体であって、シグナル配列A遮蔽ーAリンカーAープロテアーゼ配列AーリンカーVHOーA標的化cMETーリンカーVHOーB標的化cMETーリンカーDーFcー抗PD-L1/VEGFを含むヒトIgG重鎖融合を含む多重特異性抗体を提供する。このIgGは、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、及び／又はIgG4 Fcフレームワークを有し得る。

10

20

30

40

50

【0046】

遮蔽（遮蔽A、B、C、D）は同じであっても異なってもよい。リンカー（リンカーA、B、C、D、E、F、G、H）は同じであっても異なってもよい。プロテアーゼ配列（プロテアーゼ配列A、B、C）は、同じであっても異なってもよい。

【0047】

いくつかの実施形態は、前記腫瘍に対する免疫細胞活性を高めるために、免疫チェックポイント調節ドメインが付加された本開示の多重特異性抗体を提供する。いくつかの実施形態では、免疫調節ドメインは、B7-1ポリペプチド、PD-L1ポリペプチド、抗PD-L1結合ドメイン、及び抗PD-L1結合ドメインからなる群から選択される。

【0048】

いくつかの実施形態では、本開示は、EGFRを標的とすることができる結合アーム、cMetを標的とすることができる結合アーム、及びVEGFを標的とすることができる結合アームを含む多重特異性抗体を提供し、ここで、EGFRアーム、cMETアーム、及びVEGFアームは、それぞれ、配列番号83～94から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本開示は、表10に示されるアミノ酸配列を含む多重特異性抗体を提供する。

【0049】

いくつかの実施形態では、本開示は、EGFRを標的化することができる結合アームを含む多重特異性抗体を提供し、ここで、結合アームは、配列番号1及び3から選択されるヒトIgG1 Fab重鎖配列、配列番号2及び4から選択される軽鎖配列、及び／又は配列番号5～12から選択される1つ以上の単一ドメインVHO配列、及び／又は配列番号13～18から選択される1つ以上のタンデム単一ドメインVHO配列を含む。

【0050】

いくつかの実施形態では、本開示は、cMETを標的化することができる結合アームを含む多重特異性抗体を提供し、ここで、結合アームは、配列番号23～24、27～29、及び33～37から選択されるヒトIgG1 Fab重鎖配列、配列番号25～26、30～32、及び38～40から選択される軽鎖配列、及び／又は配列番号41～44から選択される1つ以上の単一ドメインVHO配列を含む。

【0051】

EGFRは、がんの発生に寄与する多くの他の細胞表面マーカーと相互作用することが認識されている（Wang, Ma et al. 2015, Kennedy, Hastings et al. 2016）。いくつかの実施形態では、本開示は、HER2、HER3、HER4及び対応する下流シグナル伝達因子から選択されるHERファミリー受容体とEGFR受容体との会合を効果的に阻害することができる多重特異性抗体を提供する。いくつかの実施形態では、本開示

は、EGFRを標的化し得る結合アームを含む多重特異性抗体を提供し、ここで、結合アームは、配列番号1及び3から選択されるヒトIgG1 Fab重鎖配列、ならびに配列番号2及び4から選択される軽鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、本開示は、EGFRを標的化することができる結合アームを含む多重特異性抗体を提供し、ここで、結合アームは、配列番号5～18から選択される1つ以上の単ドメインVH O配列を含む。

【0052】

cMETと他の受容体とのヘテロ二量体化は、がんの発生に寄与する (Viticcchie and Muller 2015)。いくつかの実施形態では、本開示は、プレキシンB1ファミリーメンバー、CD44ファミリーメンバー、a6b4、a5b1、a3b1、a2b1を含むインテグリンファミリー受容体、及びRon、IGFR、RET、Fas及びDR5のような死受容体、ならびに対応する下流のシグナル伝達因子などのRTKの1つ以上とcMET受容体の会合を効果的に阻害することができる多重特異性抗体を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、cMETを標的化することができる結合アームを含む多重特異性抗体を提供し、ここで、結合アームは、配列番号23～24、27～29、33～37から選択される重鎖配列、ならびに配列番号25～26、30～32、及び38～40から選択される軽鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、本開示は、cMETを標的化することができる結合アームを含む多重特異性抗体を提供し、ここで、結合アームは、配列番号41～44から選択される1つ以上の単ドメインVH O配列を含む。

【0053】

いくつかの実施形態は、腫瘍微小環境において見出されるプロテアーゼ及び／又は他のインサイチュ特異的酵素によって除去され得る、1つ以上の遮蔽されたエピトープ、遮蔽、又はキャップ（例えば、遮蔽A、B、C、D）を有する多重特異性抗体を提供する。遮蔽されたエピトープの存在は、多重特異性抗体によって誘発される全身毒性を最小限にするためである。

【0054】

いくつかの実施形態では、本開示は、cMET及び／又はEGFR mAb結合をマスクする1つ以上の遮蔽又はキャップを含む多重特異性抗体を提供する。いくつかの実施形態では、抗体のための遮蔽又はキャップは、配列番号45～51から選択される。いくつかの実施形態では、cMET及び／又はEGFR単ドメイン結合をマスクする遮蔽又はキャップは、配列番号52～61から選択される。いくつかの実施形態では、本開示は、多重特異性抗体を提供し、ここで、遮蔽又はキャップは、プロテアーゼ基質リンカー及び任意にペプチドリinker又はスペーサーを介して付着される。プロテアーゼ基質リンカーは、配列番号62～69から選択される。

【0055】

いくつかの実施形態では、本開示の抗体（例えば、抗EGFR、抗cMET、抗PD-L1、抗VEGF、又は多重特異性抗体）は、全抗体、抗体断片、抗体模倣物、ヒト化抗体、単鎖抗体、免疫複合体、脱フコシル化抗体、又は多重特異性抗体であり得る。抗体断片は、UniBody、ドメイン抗体、及びVH Oドメインからなる群から選択され得る。

【0056】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される本開示の抗体又は断片（例えば、抗EGFR、抗cMET、抗PD-L1、抗VEGF、又は多重特異性抗体）は、ヒト、ヒト化、又はキメラ抗体又は抗原結合断片であり得る。

【0057】

いくつかの実施形態では、本開示の抗体（例えば、抗EGFR、抗cMET、抗PD-L1、抗VEGF、又は多重特異性抗体）は、全長IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4抗体であってもよく、あるいはFab、F(ab')₂又はscFv断片などのその抗原結合断片であってもよい。抗体骨格は、機能性に影響を与えるように、例えば、残留エフェクター機能を排除するように修飾することができる。

【0058】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で開示する抗体又は断片及び治療薬を含む免疫コンジュゲートを提供する。いくつかの実施形態では、治療薬は、細胞毒素又は放射性同位体を担持する。

【0059】

いくつかの実施形態は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、及び／又はIgG4フレームワーク中にあり得る多重特異性抗体を提供する。多重特異性抗体は、強化されたプロテアーゼ安定性を有するヒンジ領域を有するように操作することができる。多重特異性抗体はまた、より短い及びより長い半減期を有するように操作することができる。

【0060】

いくつかの実施形態では、多重特異性抗体の重鎖は、IgG1抗体、好ましくはヒトIgG1抗体の定常領域を含む。前記IgG1定常領域のCH2領域は、抗体のADCC、ADCP、及び／又はCDC活性を変更するように操作することができる。好ましい実施形態では、前記変化は、ADCC（抗体依存性細胞傷害）、ADCP（抗体依存性細胞食作用）、及び／又はCDC活性の増強をもたらす。好ましい実施形態では、多重特異性抗体のCH3領域は、EGFRと結合する第1の重鎖及びcMETと結合する第2の重鎖を含む重鎖のヘテロ二量体化を促進するように操作される。

【0061】

一実施形態では、多重特異性抗体は、それらの親mAbと比較した場合、EGFR及びcMETのより高レベルのダウンモジュレーションを誘導することができる。この多重特異性抗体活性は、EGFR及びcMETシグナル伝達カスケードによって駆動される腫瘍細胞の生存率を低下させることができる。

【0062】

いくつかの実施形態は、ヒトEGFR及びcMETを同時に標的とし、これに結合し、高い親和性を有し、タンパク質レベルでEGFRを効果的に遮断することができる多重特異性抗体を提供する。多重特異性抗体は、cMET及びEGFRタンパク質の両方に結合するか、又は別の標的タンパク質の結合に影響を及ぼすことなく1つの標的タンパク質に結合し、cMET及びEGFRに同時に結合する能力を有する。多重特異性抗体は、血管内皮細胞、ヒト肺がん細胞、ヒト乳がん細胞、ヒト膵がん細胞、及び／又はヒト胃がん細胞の増殖を阻害する。

【0063】

いくつかの実施形態では、本開示は、本開示の抗体又は断片（例えば、抗EGFR、抗cMET、抗PD-L1、抗VEGF、又は多重特異性抗体）及びキャリアを含む組成物を提供する。

【0064】

いくつかの実施形態では、本開示は、本開示の抗体又は断片（例えば、抗EGFR、抗cMET、抗PD-L1、抗VEGF、又は多重特異性抗体）及び薬学的に許容されるキャリアを含む医薬組成物を提供する。

【0065】

いくつかの実施形態は、本明細書に開示される多重特異性抗体を含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、組成物中に10mg/mL～250mg/mLの濃度で存在することができる。

【0066】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、少なくとも1つの緩衝剤、少なくとも1つの安定剤、及び／又は少なくとも1つの界面活性剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、組成物が液体である。いくつかの実施形態では、この組成物は、皮下注射用に製剤化される。いくつかの実施形態では、この組成物が無菌である。いくつかの実施形態では、組成物は、ヒスチジン塩酸塩、トレハロース二水和物、メチオニン及び／又はポリソルベートをさらに含む。

【0067】

いくつかの実施形態では、本開示は、cMET、EGFR、及びPD-L1／VEGF

10

20

30

40

50

を発現する標的細胞に関連する疾患を治療又は予防するための方法であって、疾患を治療又は予防するのに有効な量で、抗cMET×抗EGFR×PD-L1／VEGF多重特異性抗体又はその抗原結合部分などの本開示の抗体を対象に投与することを含む方法を提供する。いくつかの例では、治療又は予防された疾患はヒトのがんである。いくつかの例において、治療又は予防される疾患は、肺がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、胃がん、乳がん、腸がん、神経内分泌、多形性神経膠芽腫、及び膵臓がんを含む。

【0068】

いくつかの実施形態では、本開示は、cMET、PD-L1／VEGF、及びEGFRを発現する標的細胞に関連するがんを治療又は予防する際に使用するための、本開示の抗体、例えば、抗cMET×抗EGFR×PD-L1／VEGF多重特異性抗体、又はその抗原結合部分を提供する。いくつかの実施形態では、治療又は予防される疾患はヒトがんである。いくつかの実施形態では、治療又は予防される疾患は、肺がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、胃がん、腸がん、神経内分泌、多形性神経膠芽腫、乳がん、及び膵臓がんを含む。

10

【0069】

いくつかの実施形態では、本開示は、cMET、PD-L1／VEGF、及びEGFRを発現する標的細胞に関連するがんを治療又は予防する際に使用するための医薬の製造のための、本開示の抗体、例えば、抗cMET×抗EGFR×PD-L1／VEGF多重特異性抗体、又はその抗原結合部分の使用を提供する。いくつかの実施形態では、本開示の医薬によって治療又は予防される疾患は、ヒトがんである。いくつかの実施形態では、本開示の医薬によって治療又は予防される疾患は、肺がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、胃がん、腸がん、神経内分泌、乳房、多形性神経膠芽腫、及び膵臓がんを含む。

20

【0070】

いくつかの実施形態では、本開示の抗体又は断片によって治療又は予防されるがんの種類は、従来のがんであり得、好ましくは、肺がん、乳がん、膵臓がん、及び胃がんから選択される。

【0071】

いくつかの態様は、最良の相乗的パートナーを決定するために、EGFRインヒビターと共に高用量の化学療法を用いる併用レジメンに開発することができる多重特異性抗体を提供する。

30

【0072】

いくつかの態様は、最良の相乗的パートナーを決定するために、cMETインヒビターと共に高用量の化学療法を用いる併用レジメンに開発することができる多重特異性抗体を提供する。

【0073】

いくつかの実施形態は、例えば、エルロチニブ、ゲフィチニブ、オシメルチニブ、ダコミチニブ、もしくはアファチニブ；エルロチニブ、ゲフィチニブ、オシメルチニブ、ダコミチニブ、もしくはアファチニブの類似体；又はそれぞれの化合物及び／又はその類似体の1つ以上の組み合わせを含むが、これらに限定されない、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤に抵抗性である腫瘍を治療するために使用され得る、本開示の多重特異性抗体を提供する。

40

【0074】

いくつかの実施形態は、例えば、クリゾチニブ、カボザンチニブ、チバンチニブ、テプトチニブ；クリゾチニブ、カボザンチニブ、チバンチニブ、テプトチニブの類似体；又はそれぞれの化合物及び／又はその類似体の1つ以上の組み合わせを含むが、これらに限定されない、cMETチロシンキナーゼ阻害剤での処置に抵抗性である腫瘍を処置するために使用され得る、本開示の多重特異性抗体を提供する。

【0075】

いくつかの実施形態では、本開示は、本開示の抗体又はその抗原結合部分の重鎖又は軽鎖をコード化する単離された核酸分子を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、

50

そのような核酸の1つ以上を含む発現ベクター、及びそのような発現ベクターの1つ以上を含む宿主細胞を提供する。

【0076】

いくつかの実施形態では、本開示は、本開示の抗体又は抗原結合部分を発現するハイブリドーマを提供する。

【0077】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヒトEGFR及びcMETならびにPD-L1又はVEGF上のエピトープに結合する、単離された多重特異性抗体又は抗原結合部分の重鎖又は軽鎖をコードする単離された核酸分子を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、そのような核酸分子を含む発現ベクター、及びそのような発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。

10

【0078】

いくつかの実施形態は、ここに開示する組換え発現形質転換体を培養するステップと、培養物から多重特異性抗体を得るステップを含む、ここに開示する多重特異性抗体を生産する方法を提供する。

【0079】

いくつかの実施形態は、がんの治療又は予防のための医薬の製造における、本明細書に開示される多重特異性抗体の適用を提供する。

【0080】

いくつかの実施形態は、マスクを用いてcMETを標的とし、別のマスクを用いてEGFRを標的とする多重特異性抗体をコードする核酸を提供する。

20

【0081】

いくつかの実施形態では、本開示は、抗cMET×抗EGFR×PD-L1／VEGF多重特異性抗体を調製するための方法を提供し、この方法は、本開示の抗体をコードする1つ以上の核酸分子を含む宿主細胞を獲得するステップと、宿主細胞培養において宿主細胞を増殖させるステップと、1つ以上の核酸分子が発現される宿主細胞培養条件を提供するステップと、宿主細胞又は宿主細胞培養から抗体を回収するステップとを含む。

【0082】

いくつかの実施形態では、本開示は、単離された多重特異性抗体、抗原結合部分、抗体断片、又は多重特異性抗体模倣物をコードするcDNAを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、前記cDNAをファージ中に発現させ、その結果、前記cDNAによってコードされる多重特異性抗体、その抗原結合部分、抗体断片、又は多重特異性抗体模倣物（例えば、抗cMET、抗PD-L1／VEGF、及び抗EGFR多重特異性抗体）が前記ファージの表面上に提示されること；多重特異性抗体、抗原結合部分、抗体断片、又は多重特異性抗体模倣物を提示するファージを選択すること；多重特異性抗体、抗原結合部分、抗体断片、又は多重特異性抗体模倣物をコードする、前記選択されるファージから核酸分子を回収すること；回収された前記核酸分子を宿主細胞で発現させること；及び前記宿主細胞から多重特異性抗体、抗原結合部分、抗体断片、又は多重特異性抗体模倣物を回収することを提供する。

30

【0083】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で開示する多重特異性抗体を作製するための方法を提供する。多重特異性抗体の親抗体をコードする組換えDNAは、DNA組換え技術によって調製され、次に、親抗体を発現するために哺乳動物細胞にトランスフェクトされる。精製、同定、及びスクリーニングの後、制御されたFabアーム交換又は他の多重特異性抗体生成プロセスを用いて多重特異性抗体が生成され、例えばEGFR及びcMETへの同時結合の生物学的効果を示す多重特異性抗体が生成される。多重特異性抗体親和性及び遮断効率は、インビトロ実験の完了を通して同定される。

40

【0084】

本開示のこれら及び他の実施形態を、本明細書でより詳細に説明する。

【図面の簡単な説明】

50

【0085】

【図1】図1は、がんにおけるEGFR及びcMETシグナル伝達経路の阻害剤のプロファイルを示す。EGFがEGFRに、HGFがcMETに結合すると、特定のチロシン残基がリン酸化され、その後これらの受容体が活性化される。ある種のがんにおけるEGFR及びcMET RTKの過剰発現は、下流のシグナル伝達経路PI3K/Akt及びMAPK(RAS-RAF、MEK-ERK/MAPK)の活性化をもたらす。これらのシグナル伝達カスケードの誘導は、細胞死経路の調節異常を介したがん細胞生存の刺激をもたらす。いくつかの阻害薬は、チロシンキナーゼドメインやリガンドに結合して受容体を不活性化することにより、これらの経路を阻害する。EGFR及びcMETシグナル伝達経路のTKI及びmAbは、図に示すように、阻害又は活性化の矢印でマークされた標的を四角で示してある。

10

【図2A】図2は、ELISAを用いて、7D VHヒットがEGFRに結合し、EGFR-EGF結合をブロックすることを示す。図2Aは、7D VHヒット(7D VH1、7D VH2、7D VH3、7D VH4、7D VH5、及び7D VH6)がELISA形式でEGFR細胞外ドメイン(ECD)に結合したことを示す。gp120 mAbによる結合はなかった。セツキシマブ及び7D VHOは、ELISAフォーマットでEGFR ECDに結合したヒットである。このEGFR結合実験において、ng/mL単位のEC50値は、セツキシマブ約10 ng/mL；7D VH1(配列番号5に記載のFv)約14 ng/mL；7D VH2(配列番号6に記載のFv)約3 ng/mL；7D VH3(配列番号7に記載のFv)約3 ng/mL；7D VH4(配列番号8に記載のFv)約3 ng/mL；7D VH5(配列番号9に記載のFv)約3 ng/mL；及び7D VH6(配列番号10に記載のFv)約2 ng/mLであった。

20

【図2B】図2Bは、TAVO412E(本明細書では「TAVO412」とも呼ばれる)の組換えヒトEGFR ECDへの結合を、EC50値が0.059 nMのELISAフォーマットで示す。

【図2C】図2Cは、0.109 nMのEC50値でのELISAフォーマットにおける組換えカニクイザルEGFR ECDへのTAVO412Eの結合を示す。図2A、2B、及び2Cにおいて、y軸はELISA結合レベルを反映する450 nmでの吸光度を表し、x軸は試験試薬の濃度を表した。

【図2D】図2Dは、7D VHヒットが、HCC827細胞においてEGFR ECDがEGFに結合するのをブロックしたことを示す。gp120 mAbによる遮断はなかった。このEGFリガンド-EGFR結合遮断実験において、EC50値は(ng/mLの単位で)：セツキシマブ約65 ng/mL；7D VH1(配列番号5に記載のFv)約25 ng/mL；7D VH2(配列番号6に記載のFv)約23 ng/mL；7D VH3(配列番号7に記載のFv)約31 ng/mL；7D VH4(配列番号8に記載のFv)約38 ng/mL；7D VH5(配列番号9に記載のFv)約34 ng/mL；及び7D VH6(配列番号10に記載のFv)約36 ng/mLである。図2Dにおいて、y軸は細胞上の結合レベルを反映する幾何平均蛍光強度(gMFI)を表し、x軸は試験試薬の濃度を表した。

30

【図2E】図2Eは、TAVO412Eが、1.53 nMのIC50値で、ELISAフォーマットにおいて、EGFR ECDのEGFへの結合を遮断したことを示す。図2Eにおいて、y軸はELISAによるEGFRへのEGFの結合レベルを反映する450 nmでの吸光度を表し、x軸は試験試薬の濃度を表した。

40

【図3A】図3は、cMETヒットがcMETに結合し、ELISAを用いてcMET-HGF結合をブロックすることを示す。図3A~3Gにおいて、y軸はELISA結合レベルを反映する450 nmでの吸光度を表し、x軸は試験試薬の濃度を表した。図3Aは、ELISAフォーマットでcMET細胞外ドメイン(ECD)に結合したcMETヒットを示す。被験物質及び配列情報を以下の表に示す。アミバンタマブアナログは、関連する低フコシル化を有するJNJ-61186372重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を使用する。用語amivantamab、amivantamab類似体、JNJ-611863

50

72、又はJNJ-6372は、全て、同一の関連する低フコシル化を有する同一のアミノ酸配列を指す。

【表1】

試験品名	配列情報
met 4K v1	HC Fv 配列番号 34 及び LC Fv 配列番号 39 を有する mAb
met 4K v2	HC Fv 配列番号 34 及び LC Fv 配列番号 40 を有する mAb
met 4K v3	HC Fv 配列番号 35 及び LC Fv 配列番号 39 を有する mAb
met 4K v4	HC Fv 配列番号 35 及び LC Fv 配列番号 40 を有する mAb
met 4K v5	HC Fv 配列番号 36 及び LC Fv 配列番号 39 を有する mAb
met 4K v6	HC Fv 配列番号 36 及び LC Fv 配列番号 40 を有する mAb
met 4K v7	HC Fv 配列番号 37 及び LC Fv 配列番号 39 を有する mAb
オナルツズマブ	HC Fv 配列番号 33 及び LC Fv 配列番号 38 を有する mAb
gp120 (挿入アーム) x JNJ cMET 結合アーム アミバンタマブ cMet	HC Fv 配列番号 82 及び LC Fv 配列番号 81 を有する mAb と HC Fv 配列番号 77 及び LC Fv 配列番号 78 を有する mAb を含む二重特異性 Ab HC Fv 配列番号 77 及び LC Fv 配列番号 78 を有する mAb

図3Aは、ELISAアッセイにおいてcMET ECDに結合したオナルツズマブ及びEV1（配列番号24に記載の重鎖Fv、配列番号26に記載の軽鎖Fv）、TV1（配列番号28に記載の重鎖Fv、配列番号30に記載の軽鎖Fv）、TV4（配列番号29に記載の重鎖Fv、配列番号32に記載の軽鎖Fv）ヒットを示す。このcMET結合実験において、EC50値（ng/mL単位）は、オナルツズマブ約25 ng/mL、EV1約17.5 ng/mL、TV1約18.5 ng/mL、TV4約18.0 ng/mLであった。

【図3B】図3Bは、TAVO412Eが組換えヒトcMETに対して0.234 nMのEC50値で強力な結合を有することを示す。アイソタイプmAbによるヒトcMETへの結合はなかった。

【図3C】図3Cは、TAVO412Eが、0.595 nMのEC50値で、組換えカニクイザルcMETへの強力な結合を有したことを示す。アイソタイプmAbによるカニクイザルcMETへの結合はなかった。リガンド遮断アッセイの模式図を図3Eに示す。ストレプトアビジンをELISAプレート上にコーティングした。続いて、ビオチン化cMET ECDをこの層に加えた。

【図3D】次に、cMET ECDへの結合を競合させるために、抗体及びリガンドを加えた。一次抗体はウサギポリクローナル抗-HGF Abであり、二次抗体は検出用のHRP標識抗-ウサギ抗体であった。

【図3E】アッセイフォーマットは、後述するように、cMETHGF遮断アッセイで使用するために再フォーマットすることができる。

【図3F】図3Fは、cMETヒットが、ELISAフォーマットにおいて、cMET ECDのHGFへの結合を遮断したことを示す。gp120 mAbによる遮断はなかった。このcMET-HGF遮断結合実験において、EC50値（単位ng/mL）は、オナルツズマブ約93 ng/mL；EV1約93 ng/mL；TV1約122 ng/mL；TV4約108 ng/mLであった。

【図3G】図3Gは、TAVO412Eがヒト肝細胞成長因子（HGF）の組換えヒトcMETへの結合を8.05 nMのIC50値で遮断したことを示す。

【図4A】図4に、TAVO412EがVEGFに結合し、ELISA法を用いてVEGF-VEGFR結合を遮断する様子を示す。図4A～Cにおいて、y軸はELISA結合

レベルを反映する450nmでの吸光度を表し、x軸は試験試薬の濃度を表した。図4Aは、TAVO412Eが0.084nMのEC50値でELISA形式で組換えヒトVEGF165に結合したことを示す。アイソタイプmAbによる結合はなかった。

【図4B】図4Bは、0.346nMのEC50値でのELISAフォーマットにおける組換えカニクイザルVEGF165へのTAVO412Eの結合を示す。

【図4C】図4Cは、TAVO412Eが組換えヒトVEGFRへの組換えヒトVEGF165の結合を14.8nMのIC50値でブロックしたことを示す。

【図5A】図5は、抗cMET×抗EGFR多重特異性抗体についての構造設計を示す。抗cMET×抗EGFR多重特異性抗体は、EGFR結合アームを黒色で、cMET結合アームを濃い灰色で、VEGF結合アームを薄い灰色で示すように図示されている。図5Aは、EGFR結合アームが1つ又は2つのVHODメインの価数を有することができることを示す。cMET結合アームは、1つのFabドメインの結合価を有することができる。VEGF結合アームは、1～2ドメインの結合価を有することができる。EGFRVHODメインは、Fc上のタンデムFc融合分子として、又はcMET重鎖上のC末端融合として、FcのN末端又はC末端融合と同じ重鎖上にあり得る。

【図5B】図5Bは、EGFR結合アームが1つ又は2つのVHODメインの価数を有することができることを示す。cMET結合アームは、Fcドメイン上に1つ又は2つのVHODメインの価数を有することができる。VEGF結合アームは、1～2ドメインの結合価を有することができる。EGFRVHODメインは、FcのN末端又はC末端融合物と同じ重鎖上に、Fc上のタンデム融合分子として、又はcMETVHO重鎖融合物上のC末端融合物として存在することができる。cMETVHODメインは、FcのN末端融合として、Fc上のタンデム融合分子として、又はEGFRVHO重鎖融合分子上のN末端融合として、同じ重鎖上にあり得る。

【図6A】図6は、TAVO412EのCD16a、CD32a、CD64、及びC1qへの結合を示す。図6A～Dにおいて、y軸はELISA結合レベルを反映する450nmでの吸光度を表し、x軸は試験試薬の濃度を表した。図6Aは、TAVO412EがELISAフォーマットで組換えヒトCD16aに結合し、EC50値が0.46nMであることを示し、これと比較して、ヒトIgG1を有するアイソタイプmAbはEC50値が3.7nMであった。

【図6B】図6Bは、TAVO412EがELISAフォーマットで組換えヒトCD32aに結合し、EC50値が2.9nMであったのに対して、ヒトIgG1を有するアイソタイプmAbはEC50値が14.0nMであったことを示す。

【図6C】図6Cは、TAVO412EがELISA形式で組換えヒトCD64にEC50値0.16nMで結合したのに対し、ヒトIgG1を有するアイソタイプmAbがEC50値0.12nMで結合することを示す。

【図6D】図6Dは、TAVO412EがELISA形式で組換えヒトC1qに結合し、EC50値が14.2nMであることを示し、これと比較して、ヒトIgG1を有するアイソタイプmAbはEC50値が14.1nMであった。

【図7A】図7は、H292細胞におけるEGFRへのEGFRリガンドの結合の阻害を示す。図7Aは、H292細胞のリガンド遮断を特徴付けるために使用されたFACSベースのアッセイのアッセイ形式を示す(EGFR:cMET比365000対64000)。抗cMET×抗EGFR多重特異性抗体を加えて、0.2mg/mLのEGFと競合させて細胞への結合を阻止した。EGFはAF488nm標識ウサギ抗-EGF抗体を用いて検出した。図7Bは、gMFIを測定して、競合mAbの存在下におけるEGF結合のレベルを決定したことを示す。

【図7B】図7Bにおいて、y軸はH292細胞に対する結合レベルを反映するgMFIを表し、x軸は試験試薬の濃度を表した。このアッセイでは、競合cMET抗体は、H292細胞株へのEGF結合にあまり影響を及ぼさない。EGFR抗体は、EGFRに結合し、EGFRへの結合について、EGFと競合する。

【図8A】図8は、HCC827細胞におけるEGFRへのEGFRリガンドの結合の阻

10

20

30

40

50

害を示す。図 8 A は、HCC827 細胞のリガンド遮断を特徴付けるために使用された FACS ベースのアッセイのアッセイ形式を示す (EGFR : cMET 比 420000 ~ 204000)。

【図 8 B】図 8 B は、gMFI を測定して、競合 mAb の存在下における EGF 結合のレベルを決定したことを示す。図 8 B において、y 軸は HCC827 細胞に対する結合レベルを反映する gMFI を表し、x 軸は試験試薬の濃度を表した。このアッセイでは、競合 cMET 抗体は、HCC827 細胞株への EGF 結合にあまり影響を及ぼさない。EGFR 抗体は、EGFR に結合し、EGFR への結合について、EGF と競合する。この EGFR-EGF 阻害実験において、EGFR × cMet ヒットに対する ng/mL 単位の EC50 値は、7D VH6 × TV4 約 0.63 nM ; 7D VH6 × EV1 約 0.63 nM ; 7D VH4 × TV4 約 0.93 nM ; 7D VH4 × EV1 約 0.81 nM ; セツキシマブ × gp120 約 0.60 nM ; セツキシマブ ~ 0.33 nM ; 7D VH4-Fc 約 0.18 nM ; 及び 7D VH6-Fc 約 0.23 nM であった。

【図 9 A】図 9 にウエスタンブロット法を用いた NCI-H1975 細胞における EGFR のリン酸化阻害を示す。図 9 A : 上のパネルは、(1) 培地のみ、(2) EGF のみ、(3) 7D VH4-Fc (配列番号 8)、(4) gp120 (重鎖 Fv、配列番号 82 及び軽鎖 Fv、配列番号 81)、(5) 7D VH6-Fc (配列番号 10)、(6) EV1 (重鎖 Fv、配列番号 24 及び軽鎖 Fv、配列番号 26)、(7) TV4 (重鎖 Fv、配列番号 29 及び軽鎖 Fv、配列番号 32)、(8) 7D VH4 × EV1 二重特異性抗体、(9) 7D VH4 × TV4 二重特異性抗体に対応するウエスタンブロットレーンを示す ; (10) 7D VH6 × EV1 二重特異性抗体、(11) 7D VH6 × TV4 二重特異性抗体、及び (12) セツキシマブ × gp120 二重特異性抗体 (一価 EGFR 結合アーム)。積分値は、各レーンの b アクチンレベルに対して正規化する。4 種類の候補 BsAb はいずれも EGFR のリン酸化を阻害することができ、1 種類の武装化セツキシマブ × gp120 と同様の阻害作用を示した。

【図 9 B】図 9 B : 上のパネルは、(1) 培地のみ ; (2) EGF のみ ; (3) 7D VH4 × EV1 ; (4) 7D VH4 × TV4 ; (5) 7D VH6 × EV1 ; (6) 7D VH6 × TV4 ; (7) セツキシマブ × gp120 ; (8) gp120 ; (9) 7D VH4 × gp120 ; (10) 7D VH6 × gp120 に対応するウエスタンブロットレーンを示す。4 つの候補 (7D VH4 × EV1 ; 7D VH4 × TV4 ; 7D VH6 × EV1 ; 7D VH6 × TV4) の BsAb は全て EGFR リン酸化を阻害することができ、1 アームセツキシマブ × gp120 で同様の阻害効果を有した。

【図 9 C】図 9 C は、ウエスタンブロットを用いて、H292 及び HCC827 細胞における EGFR リン酸化の阻害を示す。図 9 C : (1) 培地のみ ; (2) EGF のみ (3) 7D VH4 × EV1 ; (4) 7D VH4 × TV4 ; (5) 7D VH6 × EV1 ; (6) 7D VH6 × TV4 ; (7) セツキシマブ × gp120 ; (8) gp120 ; (9) 7D VH4 × gp120 ; (10) 7D VH6 × gp120 に対応するウエスタンブロットレーンを有する H292 細胞についての結果。

【図 9 D】図 9 D : (1) 培地のみ ; (2) EGF のみ (3) 7D VH4 × EV1 ; (4) 7D VH4 × TV4 ; (5) 7D VH6 × EV1 ; (6) 7D VH6 × TV4 ; (7) セツキシマブ × gp120 ; (8) gp120 ; (9) 7D VH4 × gp120 ; (10) 7D VH6 × gp120 に対応するウエスタンブロットレーンを有する HCC827 細胞についての結果。4 つの候補 ((7D VH4 × EV1 ; 7D VH4 × TV4 ; 7D VH6 × EV1 ; 7D VH6 × TV4)) のすべての BsAb は EGFR リン酸化を阻害することができ、H292 細胞において 1 つの武装化セツキシマブ × gp120 で同様の阻害作用を示したが、HCC827 細胞では阻害しなかった。

【図 10 A】図 10 は、細胞結合、EGF の HCC827 細胞上の EGFR への結合の遮断、及び HGF の HCC827 細胞上の cMET への結合の遮断によって示されるように、非小細胞肺癌細胞株 HCC827 における TAVO412E の有用性を示す。図 10 A ~ C において、y 軸は HCC827 細胞に対する結合レベルを反映する gMFI 値を表

し、x 軸は試験試薬の濃度を表した。図 10 A は、T A V O 4 1 2 E が H C C 8 2 7 細胞への結合について 1. 0 4 n M の I C 5 0 値を有したことを示す。アイソタイプ m A b は H C C 8 2 7 細胞に結合しなかった。

【図 10 B】図 10 B は、T A V O 4 1 2 E が、H C C 8 2 7 細胞上の E G F R への E G F の結合をブロックすることについて、2. 5 6 n M の I C 5 0 値を有したことを示す。アイソタイプ m A b は、H C C 8 2 7 細胞上の E G F R への E G F 結合を遮断しなかった。

【図 10 C】図 10 C は、T A V O 4 1 2 E が、H C C 8 2 7 細胞上の c M E T への H G F の結合をブロックすることについて、0. 2 8 n M の I C 5 0 値を有したことを示す。アイソタイプ m A b は、H C C 8 2 7 細胞上の c M E T への H G F 結合を遮断しなかった。

【図 11 A】図 11 は、H 2 9 2 及び H C C 8 2 7 細胞における E G F R 及び c M E T のリン酸化の阻害を示す。図 11 A ~ B において、y 軸は対照 m A b で示された E G F R リン酸化のパーセント値として示され、x 軸は試験物質の濃度であった。図 11 A は、T A V O 4 1 2 E が、0. 7 9 n M の I C 5 0 値で、E G F の存在下、H 2 9 2 細胞において E G F R リン酸化を阻害したことを示す。アイソタイプ m A b は E G F R リン酸化を阻害しなかった。

【図 11 B】図 11 B は、T A V O 4 1 2 E が、E G F 及び H G F の存在下、H 2 9 2 細胞において、I C 5 0 値 0. 7 8 n M で E G F R リン酸化を阻害したことを示す。アイソタイプ m A b は E G F R リン酸化を阻害しなかった。

【図 11 C】図 11 C ~ D において、y 軸は、コントロール m A b において示される c M E T リン酸化パーセントとして示され、そして x 軸は、試験物質の濃度である。図 11 C は、T A V O 4 1 2 E が H G F 存在下で H C C 8 2 7 細胞において c M E T リン酸化を 1. 4 1 n M の I C 5 0 値で阻害したことを示す。アイソタイプ m A b は c M E T リン酸化を阻害しなかった。

【図 11 D】図 11 D は、1. 9 9 n M の I C 5 0 値で、H G F 及び E G F の存在下、H C C 8 2 7 細胞において c M E T リン酸化を阻害する T A V O 4 1 2 E を示す。アイソタイプ m A b は c M E T リン酸化を阻害しなかった。

【図 12 A】図 12 は、H C C 8 2 7 細胞の増殖の阻害を示す。図 12 A ~ B において、y 軸はパーセント生存率として示され、x 軸は試験物質の濃度であった。図 12 A は、T A V O 4 1 2 E が 1. 7 6 n M の I C 5 0 値で H C C 8 2 7 細胞の増殖を阻害したことを示す。アイソタイプ m A b は H C C 8 2 7 細胞の増殖を阻害しなかった。

【図 12 B】図 12 B は、T A V O 4 1 2 E が、E G F 及び H G F の存在下において H C C 8 2 7 細胞の増殖を 1. 3 9 n M の I C 5 0 値で阻害したことを示す。アイソタイプ m A b は H C C 8 2 7 細胞の増殖を阻害しなかった。

【図 13 A】図 13 は、ウエスタンブロットにより検出された H 1 9 7 5、H C C 8 2 7、及び H 2 9 2 細胞における c M E T リン酸化の阻害を示す。図 13 A は H C I - H 1 9 7 5 の結果を示し、図 13 B は H C C 8 2 7 の結果を示し、図 13 C は H 2 9 2 細胞の結果を示す。

【図 13 B】それぞれのウエスタンブロットレーンは、(1) 培地のみ；(2) H G F のみ；(3) 7 D V H 4 × E V 1；(4) 7 D V H 4 × T V 4；(5) 7 D V H 6 × E V 1；(6) 7 D V H 6 × T V 4；(7) J N J 6 3 7 2 c M E T (c M E T 重鎖 F v 配列番号 7 7 及び c M E T 軽鎖 F v 配列番号 7 8) × g p 1 2 0；(8) g p 1 2 0；(9) E V 1 × g p 1 2 0；(10) T V 1 × g p 1 2 0 に相当した。

【図 13 C】4 種 (7 D V H 4 × E V 1；7 D V H 4 × T V 4；7 D V H 6 × E V 1；7 D V H 6 × T V 4) の B s A b は、H C C 8 2 7、H 2 9 2 及び N C I - H 1 9 7 5 において、それらの一価の親 A b よりも有意な阻害効果を有した。

【図 14 A】図 14 は、H C C 8 2 7 細胞に対する T A V O 4 1 2 E の F c エフェクター機能を示す。図 14 A ~ B において、y 軸は A D C C (図 14 A) 又は A D C P (図 14 B) 活性化のレベルとして示され、x 軸は試験物質の濃度である。図 14 C ~ E において

10

20

30

40

50

、y 軸は溶解パーセントとして示され、x 軸は試験物質の濃度である。図 14 A は、0.022 nM の IC50 値で、HCC827 細胞の存在下で TAVO412E が誘導した ADC レポーター活性を示す。アイソタイプ mAb は HCC827 細胞の ADC レポーター活性を誘導しなかった。

【図 14 B】図 14 B は、TAVO412E が HCC827 細胞に対して約 0.27 nM の IC50 値で ADC レポーター活性を有したことを示す。アイソタイプ mAb は HCC827 細胞の ADC レポーター活性を持たなかった。

【図 14 C】図 14 C は、TAVO412E が 0.12 nM の IC50 値で HCC827 細胞に対して ADC 死滅活性を有したことを示す。アイソタイプ mAb は HCC827 細胞の ADC レポーター活性を持たなかった。

【図 14 D】図 14 D は、TAVO412E が 0.16 nM の IC50 値で HCC827 細胞に対して ADC 死滅活性を有したことを示す。アイソタイプ mAb は HCC827 細胞の ADC レポーター活性を持たなかった。

【図 14 E】図 14 E は、TAVO412E が 3.76 nM の IC50 値で HCC827 細胞に対して CDC 死滅活性を有したことを示す。アイソタイプ mAb は HCC827 細胞の ADC レポーター活性を持たなかった。

【図 15 A】非小細胞肺癌細胞株 NCI-H1975 に対する TAVO412E の抗腫瘍活性を図 15 に示す。図 15 A は、1 mg/kg で 42%、3 mg/kg で 76%、10 mg/kg で 94% の NCI-H1975 腫瘍増殖抑制を 13 日目に示している。TAVO412E は、H1975 細胞において用量依存性の腫瘍増殖阻害を有した。

【図 15 B】図 15 B は、TAVO412E が、インビボ NCI-H1975 異種移植モデルから切除した腫瘍において EGFR の分解を誘導し、EGFR のリン酸化を減少させたことを示している。ウエスタンブロットで示された TAVO412 は TAVO412E を言及した。

【図 15 C】図 15 C は、TAVO412E が、インビボ NCI-H1975 異種移植モデルから切除された腫瘍において cMET の分解を誘導し、ならびに cMET リン酸化の減少を誘導することを示す。ウエスタンブロットで示された TAVO412 は TAVO412E を言及した。

【図 15 D】図 15 D は、図 15 B 及び C における対照アイソタイプ mAb 及び TAVO412E についての結果の棒グラフ表現を示す。TAVO412E は、インビボ NCI-H1975 異種移植モデル実験から切除された腫瘍において、cMET 及び EGFR の全及びリン酸化形態のレベルを減少させた。

【図 16 A】NSCLC 株 HCC827 に対する TAVO412E の抗腫瘍活性を図 16 に示す。図 16 A は、13 日目における 1 mg/kg で 45%、3 mg/kg で 79%、及び 10 mg/kg で 94% の HCC827 腫瘍増殖阻害を示す。TAVO412E は、HCC827 異種移植片において用量依存性の腫瘍増殖阻害を有した。

【図 16 B】図 16 B は、TAVO412E が、インビボ HCC827 異種移植モデル実験から切除された腫瘍において、EGFR 及び cMET の分解を誘導することを示す。ウエスタンブロットで示された TAVO412 は TAVO412E を言及した。

【図 16 C】図 16 C は、図 16 B における対照アイソタイプ mAb 及び TAVO412E についての定量結果の棒グラフ表現を示す。TAVO412E は、インビボ HCC827 異種移植モデル実験から切除した腫瘍において、cMET 及び EGFR の総及びリン酸化型のレベルを低下させた。

【図 17 A】トリプルネガティブ乳がん (TNBC) 細胞株 MDA-MB-468 に対する TAVO412E の抗腫瘍活性を図 17 に示す。図 17 A は、1.11 nM の結合についての EC50 値で MDA-MB-468 に結合した TAVO412E を示す。TAVO412E は、MDA-MB-468 異種移植片において用量依存性の腫瘍増殖阻害を有した。図 17 A において、y 軸は細胞結合についての gMFI であり、x 軸は試験物質の濃度であった。

【図 17 B】図 17 B-C において、y 軸は EGFR リン酸化のパーセンテージであり、

x 軸は被験物質の濃度である。図 17B は、TAVO412E が、9.08 nM の IC50 値で、ヒト EGF の存在下、MDA-MB-468 細胞においてヒト EGF R リン酸化を阻害したことを示す。アイソタイプ mAb はヒト EGF R リン酸化を阻害しなかった。

【図 17C】図 17C は、TAVO412E が、ヒト EGF 及びヒト HGF の存在下、MDA-MB-468 細胞においてヒト EGF R リン酸化を 8.50 nM の IC50 値で阻害したことを示す。アイソタイプ mAb は EGF R リン酸化を阻害しなかった。

【図 18A】図 18 は、TNBC 細胞株 MDA-MB-231 に対する TAVO412E の抗腫瘍活性を示す。図 18A は、0.37 nM の結合についての EC50 値で MDA-MB-231 に結合した TAVO412E を示す。図 18A において、y 軸は細胞結合についての gMFI であり、x 軸は試験物質の濃度であった。

【図 18B】図 18B 及び D において、y 軸はレポータープロンプ活性化時の相対発光単位 (RLU) として表される発光であり、x 軸は試験物質の濃度である。図 18B は、TAVO412E が MDA-MB-231 細胞の存在下で 0.087 nM の EC50 値で ADCP レポーター活性を有したことを示す。アイソタイプ mAb は、ADCP レポーターアッセイ応答を有さなかった。

【図 18C】図 18C、E、及び F において、y 軸は溶解パーセントであり、x 軸は試験物質の濃度であった。図 18C は、TAVO412E が 0.156 nM の EC50 値で MDA-MB-231 細胞の ADCP 死滅を有したことを示す。アイソタイプ mAb は、ADCP 死滅応答を有さなかった。

【図 18D】図 18D は、0.13 nM の EC50 値で、MDA-MB-231 細胞の存在下で TAVO412E が誘導した ADCP レポーター活性を示す。アイソタイプ mAb は、ADCP レポーターアッセイ応答を有さなかった。

【図 18E】図 18E は、TAVO412E が 0.12 nM の EC50 値で MDA-MB-231 細胞の ADCP 死滅を有したことを示す。アイソタイプ mAb は、ADCP 死滅応答を有さなかった。

【図 18F】図 18F は、TAVO412E が 1.22 nM の EC50 値で MDA-MB-231 細胞の CDC 死滅を有したことを示す。アイソタイプ mAb は、CDC 死滅応答を有さなかった。

【図 19A】トリプルネガティブ乳がん細胞株 MDA-MB-231 に対する TAVO412E の抗腫瘍活性を図 19 に示す。図 19A は、20 日目の 10 mg / kg 投与で 62 % の MDA-MB-231 腫瘍増殖阻害を示す。

【図 19B】図 19B は、TAVO412E が、インビボ MDA-MB-231 異種移植モデル実験から切除された腫瘍において、EGFR 及び cMET の分解を誘導することを示す。ウエスタンブロットで示された TAVO412 は TAVO412E を言及した。

【図 19C】図 19C は、図 19B における対照アイソタイプ mAb 及び TAVO412E についての定量結果の棒グラフ表現を示す。TAVO412E は、インビボ MDA-MB-231 異種移植モデル実験において、cMET 及び EGFR の全形態のレベルを減少させた。

【図 20A】細胞結合、HGF の MKN45 細胞上の cMET への結合の遮断、及び SNU-5 細胞の増殖阻害によって示されるように、胃がん細胞株 SNU-5 及び MKN-45 における TAVO412E の有用性の実証。図 20A ~ C において、y 軸は細胞結合の gMFI 値であり、x 軸は試験物質の濃度である。図 20D において、y 軸は生存率パーセントであり、x 軸は試験物質の濃度であった。図 20A は、TAVO412E が MKN45 細胞への結合について 1.78 nM の EC50 値を有したことを示す。アイソタイプ mAb は MKN45 細胞に結合しなかった。

【図 20B】図 20B は、TAVO412E が、MKN45 細胞上の cMET への HGF の結合をブロックすることについて、0.28 nM の IC50 値を有したことを示す。アイソタイプ mAb は、MKN45 細胞上の cMET への HGF 結合を遮断しなかった。

【図 20C】図 20C は、TAVO412E が SNU-5 細胞への結合について 1.99 nM の EC50 値を有したことを示す。アイソタイプ mAb は SNU-5 細胞に結合しな

10

20

30

40

50

かった。

【図20D】図20Dは、TAVO412Eが、2.66 nMのSNU-5細胞の増殖の阻害についてのIC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbはSNU-5細胞の増殖を阻害しなかった。

【図21A】図21は、胃がん細胞株SNU-5に対するTAVO412Eのインビトロ抗腫瘍活性を示す。実験プロトコールは、実施例16に記載のものと同様であった。図21A～Bにおいて、y軸はADCCレポータープロンプアッセイ応答のRLU値であり、x軸は試験物質の濃度であった。図21Cにおいて、y軸は溶解パーセントであり、x軸は試験物質の濃度であった。図21Aは、0.18 nMのEC50値で、SNU-5細胞の存在下でTAVO412Eが誘導したADCCレポーター活性を示す。アイソタイプmAbは、ADCCレポーターアッセイ応答を有さなかった。

10

【図21B】図21Bは、TAVO412Eが0.20 nMのEC50値でSNU-5細胞に対してADCPレポーター活性を有したことを示す。アイソタイプmAbは、ADCPレポーターアッセイ応答を有さなかった。

【図21C】図21Cは、TAVO412Eが1.19 nMのEC50値でSNU-5細胞のCDC死滅を有したことを示す。アイソタイプmAbは、CDC死滅応答を有さなかった。

【図22A】図22は、胃がん細胞株MKN45に対するTAVO412Eのインビボ抗腫瘍活性を示す。図22Aは、21日目における3 mg / kg 投与での70%のMKN-45腫瘍成長阻害を示す。

20

【図22B】図22Bは、TAVO412Eが、インビボMKN45異種移植モデル実験から切除された腫瘍において、EGFR及びcMETの分解を誘導したことを示す。ウェスタンブロットで示されたTAVO412はTAVO412Eを言及した。

【図22C】図22Cは、図22Bにおける対照アイソタイプmAb及びTAVO412Eについての定量結果の棒グラフ表現を示す。TAVO412Eは、インビボMKN45異種移植モデル実験において、cMET及びEGFRの全形態のレベルを低下させた。

【図23A】細胞結合、ADCCレポーターアッセイ、及びADCPレポーターアッセイによって示されるように、膵管腺がん細胞株BxPC-3におけるインビトロTAVO412Eの有用性の実証。図23Aにおいて、y軸は細胞結合のgMFIであり、x軸は試験物質の濃度であった。図23B～Cにおいて、y軸はADCCレポータープロンプアッセイ応答のRLUであり、x軸は被験物質の濃度である。図23Aは、TAVO412EがBxPC-3細胞への結合について0.90 nMのEC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbはBxPC-3細胞に結合しなかった。

30

【図23B】図23Bは、TAVO412Eが、BxPC-3細胞に対するADCCレポーターアッセイについて、0.20 nMのEC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbは、BxPC-3細胞に対してADCCレポーターアッセイ活性化を有さなかった。

【図23C】図23Cは、TAVO412Eが、BxPC-3細胞に対するADCPレポーターアッセイについて、0.65 nMのEC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbは、BxPC-3細胞に対してADCPレポーターアッセイ活性化を示さなかった。

40

【図24A】図24は、BxPC-3細胞におけるEGFR及びcMETのリン酸化のインビトロ阻害を示す。実験は、実施例12に記載したのと同様に行った。図24A～Dにおいて、y軸は対照mAbで示された受容体リン酸化パーセントの値として示され、x軸は試験物質の濃度であった。図24Aは、TAVO412Eが、組換えヒトEGFの存在下、BxPC-3細胞において、3.45 nMのIC50値でEGFRリン酸化を阻害したことを示す。アイソタイプmAbはEGFRリン酸化を阻害しなかった。

【図24B】図24Bは、TAVO412Eが、組換えヒトHGFの存在下、BxPC-3細胞においてcMETリン酸化を1.18 nMのIC50値で阻害したことを示す。アイソタイプmAbはcMETリン酸化を阻害しなかった。

50

【図24C】図24Cは、TAVO412Eが、組換えヒトEGF及び組換えヒトHGFの存在下、BxPC-3細胞において、 1.13 nM のIC50値でEGFRリン酸化を阻害したことを示す。アイソタイプmAbはEGFRリン酸化を阻害しなかった。

【図24D】図24Dは、TAVO412Eが、組換えヒトEGF及び組換えヒトHGFの存在下、BxPC-3細胞においてcMETリン酸化を 0.44 nM のIC50値で阻害したことを示す。アイソタイプmAbはcMETリン酸化を阻害しなかった。

【図25A】図25は、TAVO412Eの膵管腺がん細胞株BxPC-3に対するインビボ抗腫瘍活性を示す。図25Aは、TAVO412E処理の結果、 10 mg/kg 投与で80%の34日目にBxPC-3腫瘍増殖阻害を示す。

【図25B】図25Bは、TAVO412Eが、インビボBxPC-3異種移植モデル実験において、腫瘍においてEGFR及びcMETの分解を誘導したことを示す。ウエスタンブロットで示されたTAVO412はTAVO412Eを言及した。

【図25C】図25Cは、図25Bの対照アイソタイプmAb及びTAVO412Eについての結果の棒グラフ表示を示す。TAVO412Eは、インビボBxPC-3異種移植モデル実験において、cMET及びEGFRの全形態のレベルを低下させた。

【図26A】図26は、インビトロでの肝臓がん細胞株HCC9810、インビボでのトリプルネガティブ乳がん細胞株HCC70、及びインビボでの頭頸部がん細胞株Faduに対するTAVO412Eの抗腫瘍活性を示す。図26Aは、TAVO412Eが 0.098 nM のEC50値でHCC9810細胞株に対してADCC活性を有したことを示す。図26Aにおいて、y軸は溶解パーセントであり、x軸は試験物質の濃度であった。

【図26B】図26Bは、TAVO412E処理が、 10 mg/kg 投与で26%の21日目にHCC-70腫瘍増殖阻害をもたらしたことを示す。

【図26C】図26Cは、TAVO412E処理が、 10 mg/kg 投与で95%のDay 21でFadu腫瘍増殖阻害をもたらしたことを示す。

【図27A】細胞結合、ADCCレポーターアッセイ、及びADCC死滅アッセイにより示される頭頸部食道扁平上皮がん細胞株KYSE-150におけるTAVO412Eのインビトロ抗腫瘍活性の実証図27Aにおいて、y軸は細胞結合についてのgMFIであり、x軸は試験物質の濃度であった。図27Aは、TAVO412Eが、 0.39 nM のKYSE-150細胞への結合についてのEC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbはKYSE-150細胞に結合しなかった。

【図27B】図27Bにおいて、y軸はADCCレポータープローブアッセイのRLUであり、x軸は試験物質の濃度であった。図27Bは、TAVO412Eが、KYSE-150細胞に対するADCCレポーターアッセイについて 0.15 nM のEC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbは、KYSE-150細胞に対してADCCレポーターアッセイ活性化を示さなかった。

【図27C】図27Cにおいて、y軸は溶解パーセントであり、x軸は試験物質の濃度であった。図27Cは、TAVO412Eが、KYSE-150細胞に対するADCC死滅応答について 0.038 nM のEC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbは、KYSE-150細胞に対してADCC死滅応答を有さなかった。

【図28A】細胞結合、ADCCレポーターアッセイ、及びADCC死滅アッセイによって示されるように、中皮腫がん細胞株NCI-H226におけるTAVO412E抗腫瘍インビトロ活性の実証。図28Aにおいて、y軸は細胞結合についてのgMFIであり、x軸は試験物質の濃度であった。図28Aは、TAVO412EがNCI-H226細胞への結合について 0.78 nM のEC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbはNCI-H226細胞に結合しなかった。

【図28B】図28Bにおいて、y軸はADCCレポータープローブアッセイのRLUであり、x軸は試験物質の濃度であった。図28Bは、TAVO412EがNCI-H226細胞に対するADCCレポーターアッセイについて 0.17 nM のEC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbは、NCI-H226細胞に対してADCCレポーターアッセイ活性化を有さなかった。

10

20

30

40

50

【図 28C】図 28C において、y 軸は溶解パーセントであり、x 軸は試験物質の濃度であった。図 28C は、TAVO412E が NCIE-H226 細胞に対する ADC C 死滅について 0.025 nM の EC50 値を有したことを示す。アイソタイプ mAb は NCIE-H226 細胞に対して ADC C 死滅応答を示さなかった。

【図 29A】細胞結合、ADC C レポーターアッセイ、及び ADC C 死滅アッセイによって示されるように、大腸がん細胞株 HT-29 における TAVO412E 抗腫瘍インビトロ活性の実証。図 29A において、y 軸は細胞結合についての gMFI であり、x 軸は試験物質の濃度であった。図 29A は、TAVO412E が HT-29 細胞への結合について 0.23 nM の EC50 値を有したことを示す。アイソタイプ mAb は HT-29 細胞に結合しなかった。

10

【図 29B】図 29B において、y 軸は ADC C レポータープロブアッセイの RLU であり、x 軸は試験物質の濃度であった。図 28B は、TAVO412E が、HT-29 細胞に対する ADC C レポーターアッセイについて、0.078 nM の EC50 値を有したことを示す。アイソタイプ mAb は、HT-29 細胞に対して ADC C レポーターアッセイ活性化を有さなかった。

【図 29C】図 29C において、y 軸は溶解パーセントであり、x 軸は試験物質の濃度であった。図 27C は、TAVO412E が、HT-29 細胞に対する ADC C 死滅応答について 0.023 nM の EC50 値を有したことを示す。アイソタイプ mAb は HT-29 細胞に対して ADC C 死滅応答を示さなかった。

20

【発明を実施するための形態】

【0086】

定義

特許及び特許出願を含むがこれらに限定されない、この明細書において引用されるすべての刊行物は、あたかも完全に記載されているかのように、参照によりここに組み込まれる。

【0087】

本明細書で使用される用語は、実施形態を説明することのみを目的としており、限定を意図するものではないことを理解されたい。他に規定されない限り、本明細書において使用される全ての技術的及び科学的用語は、本開示に関連する、当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有している。

30

【0088】

本開示を試験するための実践において、ここに記載のものと類似又は同等の任意の方法及び材料を使用することができるが、例示的材料及び方法をここに記載する。本開示の説明及び特許請求において、以下の用語が使用される。

【0089】

本明細書及び同時提出の特許請求の範囲で用いられているように、単数表現は、コンテンツが明確に定められていない限り、複数の存在を包含するものである。したがって、例えば、「1つの細胞」への言及は、2つ以上の細胞の組み合わせなどを含む。

【0090】

「抗体（複数可）」又は「抗体」は、広義の意味であり、マウス、ヒト、ヒト化及びキメラのモノクローナル抗体を含むモノクローナル抗体、抗体断片、多重特異性又は多重特異性抗体、ダイマー、テトラマー、又はマルチマー抗体、単鎖抗体、ドメイン抗体、及び必要な特異性の抗原結合部位を含むイムノグロブリン分子の任意の他の修飾された立体配置を含むイムノグロブリン分子を含む。

40

【0091】

「全長抗体分子」は、ジスルフィド結合によって相互に連結された2つの重鎖（HC）及び2つの軽鎖（LC）、ならびにその多量体（例えば、IgM）を含む。それぞれの重鎖は、重鎖可変領域（V_H）及び重鎖定常領域（ドメインCH1、ヒンジ、CH2及びCH3を含む）を含む。それぞれの軽鎖は、軽鎖可変領域（V_L）と軽鎖定数領域（CL）で構成されている。V_H領域とV_L領域は、補完性決定領域（CDR）と呼ばれる超変動

50

性の領域にさらに細分化され、フレームワーク領域（FR）に散在する。それぞれの V_H と V_L は3つのCDRと4つのFR部分からなり、アミノ末端からカルボキシル末端へFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順で配列している。

【0092】

「相補性決定領域（CDR）」は、抗体における「抗原結合部位」である。CDRは、（i）相補性決定領域（CDR）、 V_H （HCDR1、HCDR2、HCDR3）内の3つ、及び V_L （LCDR1、LCDR2、LCDR3）内の3つは、配列変動性（Wu and Kabat 1970）に基づいて定義される（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991）。（ii）「超可変領域」、「HVR」、又は「HV」、 V_H の3つ（H1、H2、H3）及び V_L の3つ（L1、L2、L3）は、Chothia及びLesk（Chothia and Lesk 1987）によって定義される超可変である抗体可変領域のことをいう。国際Immunogenetics（IMGT）データベース（<http://www.imgt.org>）は、抗原結合部位の標準化された番号と定義を提供する。CDR、HV及びIMGT描写の間の対応が記載されている（Lefranc, Pommie et al. 2003）。用語「CDR」、「HCDR1」、「HCDR2」、「HCDR3」、「LCDR1」、「LCDR2」、及び「LCDR3」は、本明細書において別途明示的に述べられない限り、上記の方法、Kabat、Chothia、又はIMGTのいずれかによって定義されるCDRを含む。

【0093】

免疫グロブリンは、重鎖定常領域アミノ酸配列に応じて、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMの5つの主要なクラスに割り当てられることがある。IgAとIgGはさらにアイソタイプIgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4に分類される。任意の脊椎動物種の抗体軽鎖は、その定常領域のアミノ酸配列に基づいて、2つの明確に異なるタイプ、すなわちカッパ（ κ ）及びラムダ（ λ ）のうちの1つに割り当てることができる。

【0094】

「抗体断片」、「抗原結合断片」、又は「抗原結合部分」は、重鎖相補性決定領域（HCDR）1、2及び3、軽鎖相補性決定領域（LCDR）1、2及び3、重鎖可変領域（ V_H ）、又は軽鎖可変領域（ V_L ）などの、重鎖及び／又は軽鎖抗原結合部位を保持する免疫グロブリン分子の一部を指す。抗体断片には、周知のFab、F(ab')₂、Fd及びFv断片、ならびに1つの V_H 領域からなるドメインアンチウイルス（dAb）が含まれる。 V_H 及び V_L 領域は、合成リンカーを介して互いに連結されて、種々のタイプの一本鎖抗体設計を形成し、 V_H/V_L ドメインは、内部で又は中間で対合し得、この場合、 V_H および V_L ドメインは、別々の一本鎖抗体構築物によって発現されて、一本鎖Fv（scFv）またはダイアボディなどの一価抗原結合部位を形成する（例えば、WO1998/44001、WO1988/01649、WO1994/13804、及びWO1992/01047に記載される）。

【0095】

「モノクローナル抗体」は、抗体重鎖からのC末端リジンの除去などの可能な周知の変更を除いて、各重鎖及び各軽鎖において単一のアミノ酸組成を有する抗体集団を指す。モノクローナル抗体は、多重特異性モノクローナル抗体が複数の、例えば2つの異なる抗原性エピトープと結合することを除いて、典型的には1つの抗原性エピトープと結合する。モノクローナル抗体は、抗体集団内で不均一なグリコシル化を有し得る。モノクローナル抗体は、単一特異性又は多重特異性、あるいは一価、二価、又は多価であり得る。多重特異性抗体は、モノクローナル抗体という用語に含まれる。

【0096】

「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体又は抗体断片を指す。「単離された抗体」は、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%、99%又は100%純粋である抗体などの、より高い純度に単離された抗体を含む。

【0097】

「ヒト化抗体」は、抗原結合部位が非ヒト種に由来し、可変領域フレームワークがヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体を指す。ヒト化抗体は、フレームワークが発現されたヒトイムノグロブリン又はヒトイムノグロブリン生殖系列遺伝子配列の正確なコピーでないように、フレームワークに置換を含み得る。

【0098】

「ヒト抗体」は、フレームワーク及び抗原結合部位の両方がヒト起源の配列に由来し、ヒト対象に投与された場合に最小の免疫応答を有するように最適化されている、重鎖及び軽鎖可変領域を有する抗体を指す。抗体が定常領域又は定常領域の一部を含む場合、定常領域もヒト起源の配列に由来する。

【0099】

「抗標的」は、EGFRなどの特定の標的分子に結合することができる抗体又は抗体ドメインを指す（すなわち、抗EGFRは、EGFRに結合することができる抗体又は抗体ドメインである）。「EGFR」というスタイルは、EGFRタンパク質又はEGFR遺伝子産物を意味する。「EGFR」というスタイルは、EGFR遺伝子を意味する。

【0100】

「cMET×EGFR×PD-L1/VEGF」は、cMET、EGFR、及びPD-L1又はVEGFに結合することができる多重特異性抗体又は抗体断片を指す。多重特異性抗体を作製するプロセスは、親mAbのアミノ酸配列の組換え修飾を必要とする。各親mAbのCH1、CL、及びFcドメインのアミノ酸配列は同じではないが、cMET×EGFRとEGFR×cMET多重特異性抗体との間の結合に有意差は存在しない。cMET×EGFR×PD-L1/VEGF多重特異性は、異なる構造-機能活性プロファイルを有するPD-L1/VEGFと異なる構造異性体であり得る。

【0101】

本明細書全体を通して、抗体定常領域中のアミノ酸残基の番号付けは、別段の明示がない限り、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)に記載されているEUインデックスに従う。

【0102】

慣用的な1文字及び3文字のアミノ酸コードは、表1に示されるように、本明細書中で使用される。

【0103】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 1

アミノ酸	3 文字コード	1 文字コード
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン酸	Gln	E
グルタミン	Glu	Q
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リジン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリーヌ	Ser	S
スレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

【0104】

ポリペプチド、核酸、融合タンパク質、及び本明細書で提供される他の組成は、本明細書で提供されるアミノ酸配列又はDNA配列に対して列挙されたパーセント同一性を有する、ポリペプチド、核酸、融合タンパク質などを包含し得る。用語「同一性」は、配列のアラインメント及び比較によって決定されるような、2つ以上のポリペプチド分子又は2つ以上の核酸分子の配列間の関係を指す。「同一性パーセント」、「相同性パーセント」、「配列同一性」又は「配列相同性」などは、比較される分子におけるアミノ酸又はヌクレオチド間の同一残基のパーセントを意味し、比較される分子の最小のサイズに基づいて計算される。これらの計算のために、アラインメントにおけるギャップ（もしあれば）は、好ましくは、特定の数学的モデル又はコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によって対処される。整列された核酸又はポリペプチドの同一性を計算するために使用できる方法には、Computational Molecular Biology, (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; and Carillo et al., 1988, SIAM J. Applied Math. 48:1073が含まれる。パーセント同一性の計算において、比較される配列は、代表的には、配列間で最大の一一致を与える様式で整列される。

【0105】

哺乳動物IgG重鎖の定常領域配列は、配列においてCH1-ヒンジ-CH2-CH3と指定される。IgGの「ヒンジ」、「ヒンジ領域」又は「ヒンジドメイン」は、一般に、EUインデックスによれば、ヒトIgG1のGlu216を含み、Pro230で終結すると定義されるが、機能的には、鎖の柔軟な部分は、Glu216からGly237までなどの上側及び下側ヒンジ領域と呼ばれる追加の残基を含むと考えられ、下側ヒンジは、FcγR結合が一般に起因するFc領域の残基233～239と呼ばれている。他のIgGアイソタイプのヒンジ領域は、重鎖間S-S結合を形成する最初と最後のシステイン残基を配置することによって、IgG1配列と整列させることができる。境界は、EU指標に従って番号付けされたように、わずかに変化し得るが、CH1領域は、免疫グロブリン重鎖分子のV_H領域及びヒンジ領域のアミノ末端に近接し、そして例えば、約EU位置118～215からの、免疫グロブリン重鎖の第1の（最もアミノ末端の）定常領域を含む。Fcドメインはアミノ酸231からアミノ酸447まで伸びる；CH2ドメインはおおよそAla231からLys340又はGly341までであり、CH3はおおよそGly341又はGln342からLys447までである。CH1領域のIgG重鎖定常領域の残基はLysで終結する。Fcドメイン含有分子は、抗体定常領域の少なくともCH2及びCH3ドメインを含み、したがって、IgG重鎖定常領域のほぼAla231～Lys447の少なくとも領域を含む。Fcドメイン含有分子は、ヒンジ領域の少なくとも一部を任意に含むことができる。

10

【0106】

「エピトープ」は、抗体が特異的に結合する抗原の一部を指す。エピトープは、典型的には、アミノ酸又は多糖側鎖などの部分の化学的に活性な（極性、非極性又は疎水性の）表面グループからなり、特定の3次元構造特性ならびに特定の電荷特性を有し得る。エピトープは、立体配座的空間単位を形成する連続及び／又は不連続のアミノ酸から構成され得る。不連続なエピトープの場合、抗原の線状配列の異なる部分からのアミノ酸は、タンパク質分子の折り畳みを通して3次元空間で近接する。抗体「エピトープ」は、そのエピトープを同定するために用いられる方法論に依存する。

20

【0107】

「リーダー配列」は、本明細書で使用される場合、ヒトB2Mリーダーを含む、哺乳動物細胞によってプロセシングされ得る任意のシグナルペプチドを含む。このような配列は、当該技術分野において周知である。

30

【0108】

「切断可能なリンカー」は、酵素によって切断可能なペプチド基質である。操作可能に、切断可能なリンカーは、酵素によって切断されると、マスキングドメインを有する本遮蔽抗体の活性化を可能にする。好ましくは、切断可能なリンカーは、標的細胞（例えば、がん腫細胞）又は組織の中又は近くの部位であり得る所望の作用部位で活性化が起こるように選択される。例えば、切断可能リンカーは、標的部位における切断可能リンカーの切断速度が標的部位以外の部位における切断速度よりも大きくなるように、作用部位において特異的又は高度に発現される酵素に特異的なペプチド基質である。

【0109】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」は、ここでは交換可能に使用され、コードされたアミノ酸及びコードされていないアミノ酸、化学的又は生化学的に修飾又は誘導されたアミノ酸、及び修飾されたペプチド骨格を有するポリペプチドを含み得る、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指す。この用語はまた、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、タンパク質分解性切断などのような、ポリペプチドの同時翻訳（例えば、シグナルペプチド切断）及び翻訳後修飾を有するポリペプチドを含む。

40

【0110】

さらに、本明細書中で使用される場合、「ポリペプチド」は、タンパク質が所望の活性を維持する場合、天然配列に対する欠失、付加、及び置換（一般に、当業者に公知である

50

ように、本質的に保存的)などの修飾を含むタンパク質をいう。これらの修飾は、部位特異的突然変異誘発によるように意図的であり得るか、又はタンパク質を生産する宿主の突然変異、又はPCR増幅もしくは他の組換えDNA法に起因するエラーによるように偶発的であり得る。

【0111】

本開示における用語「マスキングドメイン」又は「遮蔽」又は「キャップ」は、抗体に融合することができ、その抗原への結合において抗体をマスキングすることができるタンパク質ドメインを指す。遮蔽ドメインは、抗体がその標的のエピトープを認識するのを遮蔽することができるため、抗体は、不活性な遮蔽された抗体形態として維持される。遮蔽ドメインを除去すると、抗体の可変ドメインが露出され、その標的に結合し、その標的に作用を及ぼすことができる。

10

【0112】

用語「組換え」は、核酸分子を記載するために本明細書中で使用される場合、ゲノム、cDNA、ウイルス、半合成、及び／又は合成起源のポリヌクレオチドを意味し、これは、その起源又は操作によって、天然において関連するポリヌクレオチド配列の全て又は一部と関連しない。用語「組換え」は、タンパク質又はポリペプチドに関して使用される場合、組換えポリヌクレオチドからの発現によって産生されるポリペプチドをいう。用語「組換え」は、宿主細胞又はウイルスに関して使用される場合、組換えポリヌクレオチドが導入されている宿主細胞又はウイルスを指す。組換えはまた、材料(例えば、細胞、核酸、タンパク質、又はベクター)に関して、材料が異種材料(例えば、細胞、核酸、タンパク質、又はベクター)の導入によって修飾されていることを指すために、本明細書で使用する。

20

【0113】

用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」及び「核酸分子」は、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、ヌクレオチドのポリマー形態を含むように、ここでは交換可能に使用される。この用語は、分子の一次構造のみを指す。

【0114】

「ベクター」は、生物系内で複製され得るか、又はそのような系間を移動され得る、ポリヌクレオチドを指す。ベクターポリヌクレオチドは、代表的には、複製起点、ポリアデニル化シグナル又は選択マーカーのようなエレメントを含み、これらは、生物学的系(例えば、細胞、ウイルス、動物、植物、及びベクターを複製し得る生物学的成分を利用する再構築された生物学的系)におけるこれらのポリヌクレオチドの複製又は維持を容易にするように機能する。ベクターポリヌクレオチドは、DNA又はRNA分子、cDNA、又はこれらのハイブリッド、一本鎖又は二本鎖であり得る。

30

【0115】

「発現ベクター」は、生物系又は再構築された生物系において、発現ベクターに存在するポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの翻訳を指令するために利用することができるベクターを指す。

【0116】

本明細書で使用される場合、核酸配列、タンパク質、又はポリペプチドに関して用いられる用語「異種」は、これらの分子が、異種核酸配列、タンパク質、又はポリペプチドが由来する細胞において天然に存在しないことを意味する。例えば、ヒト細胞ではない細胞に挿入されるヒトポリペプチドをコードする核酸配列は、その文脈において異種核酸配列である。異種核酸は、異なる生物又は動物種に由来し得るが、このような核酸は、異種であるために別々の生物種に由来する必要はない。例えば、いくつかの場合において、合成核酸配列又はそれからコードされるポリペプチドは、細胞が以前に合成核酸を含まなかったという点で、それが導入される細胞に対して異種であり得る。従って、合成核酸配列又はそれからコードされるポリペプチドは、例えば、合成核酸配列又はそれからコードされるポリペプチドの1つ以上の成分が元々ヒト細胞に由来する場合でさえ、ヒト細胞に対し

40

50

て異種であると考えられ得る。

【0117】

「宿主細胞」は、本明細書中で使用される場合、インビボ又はインビトロの真核細胞、又は単細胞実体として培養された多細胞生物（例えば、細胞株）由来の細胞を示し、この真核細胞は、核酸（例えば、本開示の多量体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクター）のレシピエントとして使用され得るか、又は使用されてきたものであり、そしてこの核酸によって遺伝的に修飾された元の細胞の子孫を含む。単一細胞の子孫は、自然突然変異、偶発的突然変異、又は意図的突然変異のために、必ずしも完全には、形態において、又はゲノム又は全DNA補体において、元の親と同一ではないことが理解される。「組換え宿主細胞」（「遺伝子修飾された宿主細胞」とも呼ばれる）は、異種核酸、例えば、発現ベクターが導入された宿主細胞である。例えば、遺伝的に修飾された真核生物宿主細胞は、適切な真核生物宿主細胞に異種核酸、例えば、その真核生物宿主細胞に外来である外因性核酸、又は、その真核生物宿主細胞に通常見出されない組換え核酸を導入することによって、遺伝的に修飾される。

10

【0118】

「特異的結合」又は「特異的に結合する」又は「結合する」は、他の抗原に対するよりも大きな親和性で特定の抗原に結合する抗体を指す。典型的には、結合のための均衡解離定数（ K_D ）が約 1×10^{-8} M 以下、例えば約 1×10^{-9} M 以下、約 1×10^{-10} M 以下、約 1×10^{-11} M 以下、又は約 1×10^{-12} M 以下であるとき、典型的には、非特異的な抗原（例えば、BSA、カゼイン）に結合するためのその K_D より少なくとも 100 倍小さい K_D で、「特異的に結合」する。 K_D は、標準的な手順を使用して測定することができる。

20

【0119】

ここで用いられるように、「治療」、「治療する」などの用語は、所望の薬理学的及び／又は生理的効果を得ることを指す。効果は、疾患又はその症状を完全に又は部分的に予防するという意味での予防的であってもよく、及び／又は疾患及び／又は疾患に起因する副作用の部分的又は完全な治癒という意味での治療的であってもよい。「治療」は、ここで用いる場合、哺乳動物、例えばヒトにおける疾病の任意の処置を包含し、（a）疾病の素因があり得るが、まだ疾病を有すると診断されていない対象において疾病が起こるのを防止すること；（b）疾病を阻害すること、すなわち、その発達を阻止すること；及び（c）疾病を緩和すること、すなわち、疾病の退行を引き起こすことを含む。

30

【0120】

用語「個体」、「対象」、「宿主」、及び「患者」は、本明細書において互換的に使用され、限定されないが、ネズミ（例えば、ラット、マウス）、ウサギ目（例えば、ウサギ）、非ヒト霊長類、ヒト、イヌ、ネコ、有蹄類（例えば、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ）などを含む哺乳動物を指す。

【0121】

「治療有効量」又は「有効量」は、疾患を処置するために哺乳動物又は他の対象に投与された場合に、疾患に対するそのような処置に影響を及ぼすのに十分である、薬剤の量、又は2つの薬剤の組み合わせ量を指す。「治療有効量」は、薬剤、疾患及びその重症度、ならびに処置される対象の年齢、体重などに依存して変化する。

40

【0122】

本開示がさらに説明される前に、本開示は、説明された実施形態に限定されず、したがって、当然のことながら変化し得ることを理解されたい。また、本明細書で使用される用語は、実施形態を説明することのみを目的としており、限定を意図するものではないことを理解されたい。

【0123】

以下の実施例は、開示の範囲を限定することを意図しないさらなる詳細を提供する。

【0124】

多重特異性抗体フォーマット

50

いくつかの実施形態では、本開示は、ヒト c M E T、E G F R、及び P D - L 1 / V E G F のうちの 2 つ以上を同時に標的とする多重特異性抗体を提供する。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、1 又は 2 セットの軽鎖及び 0、1 又は 2 セットの重鎖を含む。それぞれの親抗体からの軽鎖及び重鎖の構造ならびに種々の多重特異性フォーマットを図 5 に示す。

【0125】

いくつかの実施形態では、本開示は、分子間相互作用を形成して、F a b アームのそれぞれのエピトープへの結合を遮断することができる遮蔽の組み合わせを提供する。これらの分子間相互作用は、重鎖遮蔽融合物の領域と軽鎖遮蔽融合物の領域との会合を含み得る。

10

【0126】

いくつかの実施形態では、本開示は、N から C 末端に：シグナル配列 A - 遮蔽 A - リンカー A - プロテアーゼ配列 A - リンカー B - I g G 1 重鎖を含むヒト I g G 1 重鎖融合体；及び N から C 末端へ：シグナル配列 B - 遮蔽 B - リンカー B - プロテアーゼ配列 B - リンカー C - I g G 1 軽鎖を含むヒト I g G 1 軽鎖融合体を含む多重特異性抗体を提供する。一実施形態では、ヒト I g G 1 重鎖融合体は、N から C 末端に：シグナル配列 A - 遮蔽 A - リンカー A - プロテアーゼ配列 A - リンカー B - I g G 1 重鎖 - S D を含み；ヒト I g G 1 軽鎖融合体は、N から C 末端に、シグナル配列 B - 遮蔽 B - リンカー B - プロテアーゼ配列 B - リンカー C - I g G 1 軽鎖 - S D を含む。S D は、P D - L 1 / V E G F (P D - L 1 又は V E G F のいずれか) に結合することができる単一のドメインを指す。遮蔽 A は遮蔽 B と同じであっても異なってもよく、リンカー A はリンカー B と同じであっても異なってもよく、プロテアーゼ配列 B はプロテアーゼ配列 A と同じであっても異なってもよい。

20

【0127】

いくつかの実施形態では、本開示は、E G F R を標的とする第 1 の可変ドメインを含む抗 E G F R アーム (例えば、I g G 1 重鎖及び / 又は I g G 1 軽鎖)、c M E T を標的とする第 2 の可変ドメインを含む抗 c M E T アーム (例えば、I g G 1 重鎖及び / 又は I g G 1 軽鎖)、及び P D - L 1 を標的とする第 3 の可変ドメインを含む抗 P D - L 1 アーム、又は V E G F を標的とする第 3 の可変ドメインを含む抗 V E G F アームを含む、多重特異性抗体を提供する。

30

【0128】

いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、N 末端から C 末端までを含むヒト I g G 1 重鎖融合を含む E G F R を標的とすることができる一価結合アーム、シグナル配列 A - 遮蔽 - A リンカー A - プロテアーゼ配列 A - リンカー B - E G F R を標的とする I g G 1 重鎖 - 抗 P D - L 1 又は抗 V E G F ; 及び N 末端から C 末端までを含むヒト I g G 1 軽鎖融合を含む一価結合アーム、シグナル配列 B - 遮蔽 - B リンカー B - プロテアーゼ配列 B - リンカー C - E G F R を標的とする I g G 1 軽鎖 - 抗 P D - L 1 又は抗 V E G F を含む。

【0129】

いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、N から C 末端までを含むヒト I g G 1 重鎖融合を含む c M E T を標的とすることができる一価結合アーム、シグナル配列 A - 遮蔽 - A リンカー A - プロテアーゼ配列 A - リンカー B - I g G 1 重鎖標的化 c M E T - 抗 P D - L 1 又は抗 V E G F ; 及び N から C 末端までのアミノ酸配列を含むヒト I g G 1 軽鎖融合を含む一価結合アームを含み、シグナル配列 B - 遮蔽 - B リンカー B - プロテアーゼ配列 B - リンカー C - I g G 1 軽鎖標的化 c M E T - 抗 P D - L 1 又は抗 V E G F 。

40

【0130】

いくつかの実施形態では、多重特異性結合は、N から C 末端までを含むヒト I g G 1 重鎖融合を含む E G F R を標的とすることができる一価又は二価結合アーム、シグナル A 配列 - A 遮蔽 - A リンカー A - プロテアーゼ配列 A - リンカー B - E G F R - C - F c - 抗 P D - L 1 又は抗 V E G F を結合することができる 1 つ、2 つ以上の V H O を含み、ここ

50

で、2つ以上のV H Oは1つ以上のリンカー又はスペーサーで任意に接続される。

【0131】

いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、NからC末端に、シグナル配列A、E G F R-リンカーC-F c-抗P D-L 1又は抗V E G Fに結合することができる1つ、2つ又はそれ以上のV H Oを含むヒトI g G 1重鎖融合体を含むE G F Rを標的とすることができる一価又は二価の結合アームを含み、ここで、2つ又はそれ以上のV H Oは、場合により1つ以上のリンカーで接続される。

【0132】

いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、1つの単ドメイン抗P D-L 1又は抗V E G FとのヒトI g G 1重鎖及び軽鎖融合を含むc M E Tを標的とすることができる一価結合アームを含む。

10

【0133】

本開示は、制御されたF a bアーム交換を介して、又は共発現を介して、C H 1、C H 2、及びC H 3ドメインにおける十分に確立された点変異を使用して生成され得る、多重特異性抗体を提供する。いくつかの実施形態では、全ての構築物は対称的であり、その結果、それぞれの親抗体の点突然変異の選択に優先性はない。

【0134】

リーダー配列

特定の実施形態では、リーダーペプチドは、分泌されたそれぞれの親抗体タンパク質として、本開示に記載の多重特異性抗体の細胞培養上清への分泌を駆動するように選択される。任意の既知の分泌タンパク質／ペプチドのための任意のリーダーペプチドを使用することができる。

20

【0135】

本明細書で使用される場合、「リーダーペプチド」又は「シグナルペプチド」は、通常16～30アミノ酸長の短いペプチドを含み、これは、分泌経路に向かう運命にある、新たに合成されたタンパク質のほとんどのN末端に存在する。リードペプチドは配列が極めて不均一であり、多くの原核及び真核リードペプチドは異なる種間でも機能的に交換可能であるが、タンパク質分泌の効率はリード／シグナルペプチドの配列によって強く決定される可能性がある。

【0136】

特定の実施形態では、リーダーペプチドは、特定のオルガネラ（小胞体、ゴルジ、又はエンドソームなど）の内部に存在するか、細胞から分泌されるか、又はほとんどの細胞膜に挿入されるタンパク質に由来する。

30

【0137】

特定の実施形態では、リーダーペプチドは、真核生物タンパク質由来である。

【0138】

特定の実施形態では、リーダーペプチドは、分泌タンパク質、例えば、細胞外に分泌されるタンパク質に由来する。

【0139】

特定の実施形態では、リーダーペプチドは、膜貫通タンパク質に由来する。

40

【0140】

特定の実施形態では、リーダーペプチドは、シグナルペプチダーゼによって認識され切断されるアミノ酸のストレッチを含む。

【0141】

特定の実施形態では、リーダーペプチドは、シグナルペプチダーゼの切断認識配列を含まない。

【0142】

特定の実施形態では、リーダーペプチドは、組織プラスミノゲン活性化因子（t P A）、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D H S V g D）、成長ホルモン、サイトカイン、リポタンパク質輸出シグナル、C D 2、C D 3 δ、C D 3 ε、C D 3 γ、C D 3 ζ、

50

CD4、CD8 α 、CD19、CD28、4-1BB又はGM-CSFR、又はS.cerevisiae接合因子 α -1シグナルペプチドのシグナルペプチドである。

【0143】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のリーダー配列は、例えば、ヒトCD4又はCD8リーダー配列、非ヒト霊長類CD4又はCD8リーダー配列、げっ歯類CD4又はCD8リーダー配列などを含むが、これらに限定されない、哺乳動物CD4又はCD8リーダー配列であり得る。いくつかの実施形態では、CD4又はCD8リーダーは、ヒトCD4又はCD8リーダー配列と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0144】

抗EGFR抗体、抗cMET抗体、及び多重特異性抗体

いくつかの実施形態では、本開示は、治療用cMET、EGFR、及びPD-L1/VEGF抗体ならびに抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態では、遮蔽は、cMET、EGFR、及びPD-L1/VEGF抗体及び抗原結合断片のそれぞれのFabドメインに、プロテアーゼ切断リンカー配列を介して取り付けられ、遮蔽されたcMET $\times$ EGFR $\times$ PD-L1/VEGF多重特異性抗体を作製する。このような治療用抗体のcMET、EGFR、及びPD-L1/VEGF標的は、病理学的部位及び正常組織において異なる発現レベルを有する。遮蔽されたcMET $\times$ EGFR $\times$ PD-L1/VEGF多重特異性抗体は、CDR結合ドメインに対するマスキングドメインの阻害効果のために、正常組織において不活性のままである。マスキングドメインは、疾患部位のプロテアーゼによって切断され、遮蔽されたcMET $\times$ EGFR $\times$ PD-L1/VEGF多重特異性抗体は、活性cMET $\times$ EGFR $\times$ PD-L1/VEGF多重特異性抗体に変換される。

20

【0145】

いくつかの実施形態では、本開示の遮蔽cMET $\times$ EGFR $\times$ PD-L1/VEGF多重特異性抗体設計に適用可能な治療用抗体及び断片は、2つの重鎖及び2つの軽鎖を含む全長抗体を含む。抗体は、ヒト抗体又はヒト化抗体であり得る。ヒト化抗体には、キメラ抗体及びCDR移植抗体が含まれる。キメラ抗体は、ヒト定常領域に連結された非ヒト抗体可変領域を含む抗体である。CDR移植抗体は、ヒト「レシピエント」抗体からのフレームワーク領域に連結された非ヒト「ドナー」抗体からのCDRを含む抗体である。代表的なヒト又はヒト化抗体には、IgG、IgM、IgE、IgA、及びIgD抗体が含まれる。本抗体は、任意のクラス(IgG、IgM、IgE、IgA、IgDなど)又はアイソタイプであり得る。例えば、ヒト抗体は、アイソタイプ、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4のうちの少なくとも1つなどの、IgGFcドメインを含み得る。

30

【0146】

いくつかの実施形態では、本開示は、cMET及びEGFRにそれぞれ結合するCDR結合領域を形成するヒト抗体重鎖及び軽鎖配列を提供する。

【0147】

1つの態様では、本開示は、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、HC DR1、HC DR2、及びHC DR3と命名される3つの相補性決定領域(CDR)を含む重鎖可変領域を含む抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を提供し、HC DR1、HC DR2、及びHC DR3は、それぞれ配列番号95、96、及び97；配列番号95、96、及び98；配列番号95、96、及び105；配列番号102、100、及び101；ならびに配列番号102、103、及び104から選択される。

40

【0148】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号5~12から選択される少なくとも1つの抗体単ドメイン又はその抗原結合断片を含む、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態では、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は、配列番号13~18から選択されるタンデム抗体単ドメイン重鎖又はその抗原結合断片を含み

50

、２つのEGFR結合VHO配列がリンカーを介して連結されている。

【0149】

一部の実施形態では、本開示は、配列番号５～１２又はその抗原結合断片のいずれか１つと少なくとも８５％（例えば、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％）の同一性を有する少なくとも１つの抗体単ドメインを含む抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態では、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は、配列番号１３～１８又はその抗原結合断片のいずれか１つと少なくとも８５％（例えば、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％）の同一性を有するタンデム抗体単ドメイン重鎖を含む。

【0150】

一部の実施形態では、本開示は、配列番号５～１２から選択される少なくとも１つの抗体単ドメインを含むか、又は配列番号１３～１８から選択されるタンデム抗体単ドメイン重鎖を含む、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片によって認識されるヒトEGFR上の１つ以上のエピトープと結合する、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0151】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヒト抗体重鎖配列番号１及びヒト抗体軽鎖配列番号２；又はヒト抗体重鎖配列番号３及びヒト抗体軽鎖配列番号４を含む抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0152】

非限定的な例として、本開示は、表２に示される特定のCDRとともに、配列番号１～１８として示される抗EGFR重鎖及び軽鎖可変領域アミノ酸配列を提供する。

【0153】

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 2 抗 EGFR 抗体

説明	可変領域アミノ酸配列 (配列番号)	CDR (配列番号)
マツズマブ VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTSHWMHWVRQAPGQGLEWIGEFNPSNG RTNYNEKFKSKATMTVDTSTNTAYMELS SLRSEDTAVYYCASRDYDYDGRYFDYWG QGTLVTVSS (配列番号 1)	
マツズマブ VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCSASSSV TYMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLAGSV PSRFGSGSGTDYFTISLQPEDATYYC QQWSSSHITFGQGTKVEIK (配列番号 2)	
セツキシマ ブ VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFS LTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGN TDYNTPFSTRLSINKDNSKSQVFFKMNSL QSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGT LTVSA (配列番号 3)	
セツキシマ ブ VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIG TNIHWYQQRNGSPRLIKYASESISGIPS RFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQ QNNNWPTTFGAGTKLELK (配列番号 4)	
7D VH1	EVQLVESGGGVVRRPGGSLRLTCAASGRT SRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGD STGYADSVKGRFTISRDNKNSVDLQMN SLRAEDTALYYCAAAAGSAWYGTLYEYD YWGQGTQVTVSS (配列番号 5)	HCDR1: <u>SYGMG</u> (配列番号 95) HCDR2: <u>GISWRGDSTGYADSVKG</u> (配列 番号 96) HCDR3: <u>AAGSAWYGTLYEYDY</u> (配列番号 97)
7D VH2	EVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRT SRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGD STGYADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMN SLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDY WGQGTQVTVSS (配列番号 6)	HCDR1: <u>SYGMG</u> (配列番号 95) HCDR2: <u>GISWRGDSTGYADSVKG</u> (配列 番号 96) HCDR3: <u>AAGSAWYGTLYEYDY</u> (配列番号 97)
7D VH3	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRT SRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGD STGYADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMN SLKPEDTAIYYCAAAAGWAWYGTLYEYD YWGQGTQVTVSS (配列番号 7)	HCDR1: <u>SYGMG</u> (配列番号 95) HCDR2: <u>GISWRGDSTGYADSVKG</u> (配列 番号 96) HCDR3: <u>AAGWAWYGTLYEYDY</u> (配列番 号 98)
7D VH4	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRT SRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGD STGYADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMN SLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYDYDY WGQGTQVTVSS (配列番号 8)	HCDR1: <u>SYGMG</u> (配列番号 95) HCDR2: <u>GISWRGDSTGYADSVKG</u> (配列 番号 96) HCDR3: <u>AAGSAWYGTLYDYDY</u> (配列番 号 105)

【 0 1 5 4 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

7D VH5	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRT SR <u>SYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGD</u> <u>STGYADSVKGRFTISRDN</u> AKNTVDLQMN SLKPEDTAIYYCAA <u>AAGSAWYGTLYEYDY</u> WGEGTQVTVSS (配列番号 9)	HCDR1: <u>SYGMG</u> (配列番号 95) HCDR2: <u>GISWRGDSTGYADSVKG</u> (配列 番号 96) HCDR3: <u>AAGSAWYGTLYEYDY</u> (配列番号 97)
7D VH6	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRT SR <u>SYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGD</u> <u>STGYADSVKGRFTISRDN</u> AKNTVDLQMN SLKPEDTAIYYCAA <u>AAGWAWYGTLYEYD</u> <u>YW</u> EGTQVTVSS (配列番号 10)	HCDR1: <u>SYGMG</u> (配列番号 95) HCDR2: <u>GISWRGDSTGYADSVKG</u> (配列 番号 96) HCDR3: <u>AAGWAWYGTLYEYDY</u> (配列番 号 98)
EGA1	<u>QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR</u> <u>TFSSYAMGWFRQAPGKQREFVAAIRWSG</u> <u>GYTTYTDSVKGRFTISRDN</u> AKTTVYLQMN <u>SLKPEDTAVYYCAATYLSSDYSRYALPQ</u> <u>RPLDYDYWGQGTQVTVSS</u> (配列番号 11)	HCDR1: <u>SYAMG</u> (配列番号 102) HCDR2: <u>IRWSGGYTTYTDSVKG</u> (配列番号 100) HCDR3: <u>TYLSSDYSRYALPQRPLDYDY</u> (配列番号 101)
9G8	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT FSSYAMGWFRQAPGKEREFVVA <u>INWSSG</u> <u>STYYADSVKGRFTISRDN</u> AKNTMYLQMN SLKPEDTAVYYCAAGY <u>QINSGNYNFKDYE</u> <u>YDYWGQGTQVTVSS</u> (配列番号 12)	HCDR1: <u>SYAMG</u> (配列番号 102) HCDR2: <u>AINWSSGSTYYADSVKGRF</u> (配 列番号 103) HCDR3: <u>GYQINSGNYNFKDYEYDY</u> (配列 番号 104)
7D_VHH6- (G4S)2- EGA1	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRT SR <u>SYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGD</u> STGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMN SLKPEDTAIYYCAA <u>AAGWAWYGTLYEYDY</u> WGEGTQVTVSSGGGGSGGGGSQVQLQE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAM GWFRQAPGKQREFVAAIRWSGGYTTYTD SVKGRFTISRDNAKTTVYLQMN <u>SLKPEDT</u> AVYYCAATYLSSDYSRYALPQRPLDYDY WGQGTQVTVSS (配列番号 13)	

【 0 1 5 5 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

7D_VHH6- (G4S)2- 9G8	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRT SRSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGD STGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMN SLKPEDTAIYYCAAAAGWAWYGTLYEYDY WGEQTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVE SGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAM GWFRQAPGKEREFFVAINWSSGSTYYAD SVKGRFTISRDNANTMYLQMNLSKPEDT AVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQ GTQVTVSS (配列番号 14)	
EGA1- (G4S)2- 7D_VHH6	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR TFSSYAMGWFRQAPGKQREFVAAIRWSG GYTTYTDSVKGRFTISRDNANTTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAATYLSSDYSRYALPQR PLDYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGS QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRT SRSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGD STGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMN SLKPEDTAIYYCAAAAGWAWYGTLYEYDY WGEQTQVTVSS (配列番号 15)	
9G8- (G4S)2- 7D_VHH6	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT FSSYAMGWFRQAPGKEREFFVAINWSSG STYYADSVKGRFTISRDNANTMYLQMN SLKPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYE YDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSQVK LEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRS YGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDSTG YADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNLSKP EDTAIYYCAAAAGWAWYGTLYEYDYWGE GTQVTVSS (配列番号 16)	

【 0 1 5 6 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

7D_VHH6- (G4S)3- EGA1	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRT SRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGD STGYADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMN SLKPEDTAIYYCAAAAGWAWYGTLYEYDY WGEQTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGS QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR TFSSYAMGWFRQAPGKQREFVAAIRWSG GYTTYTDSVKGRFTISRDNKTTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAATYLSSDYSRYALPQR PLDYDYWGQGTQVTVSS (配列番号 17)	
7D_VHH6- (G4S)4- EGA1	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRT SRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGD STGYADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMN SLKPEDTAIYYCAAAAGWAWYGTLYEYDY WGEQTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGS GGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSC AASGRTFSSYAMGWFRQAPGKQREFVA AIRWSGGYTTYTDSVKGRFTISRDNKTT VYLQMNSLKPEDTAVYYCAATYLSSDYS RYALPQRPLDYDYWGQGTQVTVSS (配 列番号 18)	

10

20

【0157】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示する多重特異性抗体は、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3と呼ばれる3つの相補性決定領域(CDR)を含む重鎖可変領域を含む抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を含み、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3は、それぞれ配列番号95、96、及び97；配列番号95、96、及び98；配列番号95、96、及び105；配列番号102、100、及び101；及び配列番号102、103、及び104から選択される。

30

【0158】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される多重特異性抗体の抗EGFRアームは、ヒト抗体重鎖配列番号1及びヒト抗体軽鎖配列番号2；ヒト抗体重鎖配列番号3及びヒト抗体軽鎖配列番号4を含む。いくつかの実施形態では、本開示の多重特異性抗体は、配列番号19～22から選択されるリンカーを用いてFcに連結される、配列番号5～12から選択されるEGFR結合VH0配列を含む。いくつかの実施形態では、本開示の多重特異性抗体は、配列番号19～22から選択されるリンカーを使用してFcに連結された、配列番号13～18から選択されるEGFR結合VH0配列を含む。配列番号20に示されるリンカー配列の選択は、好ましい開発可能性プロフィールを可能にする。

40

【0159】

50

【表 4】

表 3

配列番号	説明	アミノ酸配列
19	リンカー1	GGGGS
20	リンカー2	GGGSGGGGS
21	リンカー3	GGGSGGGSGGGGS
22	リンカー4	GGGSGGGSGGGSGGGGS

【0160】

別の態様では、本開示は、抗cMET抗体又はその抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3と命名される3つの相補性決定領域（CDR）を含む重鎖可変領域であって、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3は、それぞれ配列番号106、107、及び133；配列番号111、112、及び113；配列番号111、114、及び113；配列番号99、118及び119；配列番号99、120及び119；配列番号99、121、及び119；配列番号99、122、及び119から選択される重鎖可変領域と、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3と命名される3つのCDRを含む軽鎖可変領域であって、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3は、それぞれ配列番号108、109、及び110；配列番号115、116、及び117；配列番号123、124、及び125から選択される軽鎖可変領域とを含む抗cMET抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0161】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号23、24、27～29、及び33～37から選択されるヒト抗体重鎖配列、ならびに配列番号25、26、30～32、及び38～40から選択されるヒト抗体軽鎖配列を含む、抗cMET抗体又はその抗原結合断片を提供する。一部の実施形態では、本開示は、配列番号41～44から選択される少なくとも1つのcMET結合VH0配列を含む抗cMET抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0162】

一部の実施形態では、本開示は、配列番号23、24、27～29、及び33～37のいずれか1つと少なくとも85％（例えば、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、又は100％）の同一性を有するヒト抗体重鎖配列、ならびに配列番号25、26、30～32、及び38～40のいずれか1つと少なくとも85％の同一性を有するヒト抗体軽鎖配列を含む、抗cMET抗体又はその抗原結合断片を提供する。一部の実施形態では、本開示は、配列番号41～44のいずれか1つと少なくとも85％（例えば、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、又は100％）の同一性を有する少なくとも1つのcMET結合VH0配列を含む抗cMET抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0163】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号23、24、27～29、及び33～3

7 から選択される抗体重鎖配列、ならびに配列番号 25、26、30～32、及び 38～40 から選択される抗体軽鎖配列を含む、抗 c M E T 抗体又はその抗原結合断片によって認識される c M E T 上の 1 つ以上のエピトープに結合する、抗 c M E T 抗体又はその抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号 41～44 から選択される少なくとも 1 つの c M E T 結合 V H O 配列を含む抗 c M E T 抗体又はその抗原結合断片によって認識される c M E T 上の 1 つ以上のエピトープに結合する抗 c M E T 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0164】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヒト抗体重鎖配列番号 23 及びヒト抗体軽鎖配列番号 25；ヒト抗体重鎖配列番号 23 及びヒト抗体軽鎖配列番号 26；ヒト抗体重鎖配列番号 24 及びヒト抗体軽鎖配列番号 25；ヒト抗体重鎖配列番号 24 及びヒト抗体軽鎖配列番号 26；ヒト抗体重鎖配列番号 27 及びヒト抗体軽鎖配列番号 30；ヒト抗体重鎖配列番号 27 及びヒト抗体軽鎖配列番号 31；ヒト抗体重鎖配列番号 27 及びヒト抗体軽鎖配列番号 32；ヒト抗体重鎖配列番号 28 及びヒト抗体軽鎖配列番号 30；ヒト抗体重鎖配列番号 28 及びヒト抗体軽鎖配列番号 31；ヒト抗体重鎖配列番号 28 及びヒト抗体軽鎖配列番号 32；ヒト抗体重鎖配列番号 29 及びヒト抗体軽鎖配列番号 30；ヒト抗体重鎖配列番号 29 及びヒト抗体軽鎖配列番号 31；ヒト抗体重鎖配列番号 29 及びヒト抗体軽鎖配列番号 32；ヒト抗体重鎖配列番号 33 及びヒト抗体軽鎖配列番号 38；ヒト抗体重鎖配列番号 33 及びヒト抗体軽鎖配列番号 39；ヒト抗体重鎖配列番号 33 及びヒト抗体軽鎖配列番号 40；ヒト抗体重鎖配列番号 34 及びヒト抗体軽鎖配列番号 38；ヒト抗体重鎖配列番号 34 及びヒト抗体軽鎖配列番号 39；ヒト抗体重鎖配列番号 34 及びヒト抗体軽鎖配列番号 40；ヒト抗体重鎖配列番号 35 及びヒト抗体軽鎖配列番号 38；ヒト抗体重鎖配列番号 35 及びヒト抗体軽鎖配列番号 39；ヒト抗体重鎖配列番号 35 及びヒト抗体軽鎖配列番号 40；ヒト抗体重鎖配列番号 36 及びヒト抗体軽鎖配列番号 38；ヒト抗体重鎖配列番号 36 及びヒト抗体軽鎖配列番号 39；ヒト抗体重鎖配列番号 36 及びヒト抗体軽鎖配列番号 40；ヒト抗体重鎖配列番号 37 及びヒト抗体軽鎖配列番号 38；ヒト抗体重鎖配列番号 37 及びヒト抗体軽鎖配列番号 39；ヒト抗体重鎖配列番号 37 及びヒト抗体軽鎖配列番号 40 から選択されるヒト抗体重鎖及びヒト抗体軽鎖を含む抗 c M E T 抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【0165】

非限定的な例として、本開示は、配列番号 23～44 として示される抗 c M E T 重鎖及び軽鎖可変領域アミノ酸配列、ならびに表 4 に示される特定の C D R を提供する。

【0166】

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表 4 抗 cMET 抗体

説明	アミノ酸配列 (配列番号)	CDR (配列番号)
cMET EVH0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTDYMHWRQAPGQGLEWMGRVNP NRRGTTYNQKFEGRVMTTDTSTSTAY MELRSLRSDDTAVYYCARANWLDYWGG GTTVTVSS (配列番号 23)	
cMET EVH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTDYMHWRQAPGQGLEWMGRVNP NRGGTTYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAY MELRSLRSDDTAVYYCARANWLDYWGG QGTTVTVSS (配列番号 24)	HCDR1: <u>DYYMH</u> (配列番号 106) HCDR2: <u>RVNPNRGGTTYAQKFQG</u> (配 列番号 107) HCDR3: <u>ANWLDY</u> (配列番号 133)
cMET EVL0	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSVSSS VSSIYLHWYQQKPGKAPKLLIYSTNLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQVYSGYPLTFGGGTKVEIK (配 列番号 25)	
cMET EVL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRVSQS <u>VSSIYLHWYQQKPGKAPKLLIYSTNLQ</u> <u>SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF</u> <u>ATYYCQVYSGYPLTFGGGTKVEIK</u> (配列 番号 26)	LCDR1: <u>RVSQSVSSIYLH</u> (配列番号 108) LCDR2: <u>STSNLQS</u> (配列番号 109) LCDR3: <u>QVYSGYPLT</u> (配列番号 110)
cMET TVH0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY IFTAYTMHWVRQAPGQGLEWMGWIKPN NGLANYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYM ELRSLRSDDTAVYYCARSEITTEFDYWGG QGTLVTVSS (配列番号 27)	
cMET TVH1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY IFTAYTMHWVRQAPGQGLEWMGGIKPN <u>NGLANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM</u> <u>ELSSLRSED</u> TAVYYCARSEITTEFDYWGG QGTLVTVSS (配列番号 28)	HCDR1: <u>AYTMH</u> (配列番号 111) HCDR2: <u>GIKPNNGLANYAQKFQG</u> (配列 番号 112) HCDR3: <u>SEITTEFDY</u> (配列番号 113)
cMET TVH2	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGYI <u>FTAYTMHWVRQPPGKGLEWIGGIKPN</u> <u>GLANYNP</u> SLKSRATLSVDKSKNQASMK <u>LSSVTAADTAVYYCARSEITTEFDYWGG</u> GTLVTVSS (配列番号 29)	HCDR1: <u>AYTMH</u> (配列番号 111) HCDR2: <u>GIKPNNGLANYNP</u> SLKS (配列 番号 114) HCDR3: <u>SEITTEFDY</u> (配列番号 113)
cMET TVL0	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSES VDSYANSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRAS TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQSKEDPLTFGGGTKVEIK (配列番号 30)	

【 0 1 6 7 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

cMET TVL1	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRASES VDSYANSFMHWLQQRPGQPPRLIYRA SNLESGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVE AEDVGYYCQQSKEDPLTFGGGTKVEI K (配列番号 31)	LCDR1: <u>RASESVDSYANSFMH</u> (配列番 号 115) LCDR2: <u>RASNLES</u> (配列番号 116) LCDR3: <u>QQSKEDPLT</u> (配列番号 117)
cMET TVL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASES VDSYANSFMHWYQQKPGKAPKLLIYRA SNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQSKEDPLTFGGGTKVEIK (配列番号 32)	LCDR1: <u>RASESVDSYANSFMH</u> (配列番 号 115) LCDR2: <u>RASNLES</u> (配列番号 116) LCDR3: <u>QQSKEDPLT</u> (配列番号 117)
cMET OVH0	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGY TFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPS NSDTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYW GQGTLLTVSS (配列番号 33)	
cMET OVH1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKMSCKASG YTFTSYWLHWVRQAPGQGLEWIGMIDP SNSDTRFAQKFQGRATLTADESTSTAY MELSSLRSEDVAVYYCATYGSYVSPLD YWGQGTTTVTVSS (配列番号 34)	HCDR1: <u>SYWLH</u> (配列番号 99) HCDR2: <u>MIDPSNSDTRFAQKFQG</u> (配列 番号 118) HCDR3: <u>YGSYVSPLDY</u> (配列番号 119)
cMET OVH2	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAASGY TFTSYWLHWVRQPPGKGLEWIGMIDPS NSDTRFNPSLKSRTVMSVDTSKNQASL KLSSVTAVDVAVYYCATYGSYVSPLDY WGQGTTTVTVSS (配列番号 35)	HCDR1: <u>SYWLH</u> (配列番号 99) HCDR2: <u>MIDPSNSDTRFNPSLKS</u> (配列 番号 120) HCDR3: <u>YGSYVSPLDY</u> (配列番号 119)
cMET OVH3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGY TFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPS NSDTRYAASVKGRFTISVDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCATYGSYVSPLDYW GQGTTTVTVSS (配列番号 36)	HCDR1: <u>SYWLH</u> (配列番号 99) HCDR2: <u>MIDPSNSDTRYAASVKG</u> (配列 番号 121) HCDR3: <u>YGSYVSPLDY</u> (配列番号 119)
cMET OVH4	EVQLVESGGGLVQPGGSVRMSCAASGY TFTSYWLHWVRQAPGKGLEWIGMIDPS NSDTRYAAPFKGRATLSVDDSKNTAYM QLNSLKTEDTAVYYCATYGSYVSPLDY WGQGTTTVTVSS (配列番号 37)	HCDR1: <u>SYWLH</u> (配列番号 99) HCDR2: <u>MIDPSNSDTRYAAPFKG</u> (配列 番号 122) HCDR3: <u>YGSYVSPLDY</u> (配列番号 119)
cMET OVLO	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICKSSQS LLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYW ASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQYYAYPWTFGQGKVE IK (配列番号 38)	

【 0 1 6 8 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

cMET_OVL1	DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRSSQS LLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYW ASTRESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSV QPDDFATYYCQQYYAYPWTFGGGTKLE IK (配列番号 39)	LCDR1: <u>RSSQSLLYTSSQKNYLA</u> (配列 番号 123) LCDR2: <u>WASTRES</u> (配列番号 124) LCDR3: <u>QQYYAYPWT</u> (配列番号 125)
cMET_OVL2	DIVMTQTTPSLPVNPGEPAVSCRSSQ SLLYTSSQKNYLAWYLQKPGQSPQLLIY WASTRESGVPRFSGSGSGSDFTLKIS WVEAEDLGVIYCQQYYAYPWTFGGGT KLEIK (配列番号 40)	LCDR1: <u>RSSQSLLYTSSQKNYLA</u> (配列 番号 123) LCDR2: <u>WASTRES</u> (配列番号 124) LCDR3: <u>QQYYAYPWT</u> (配列番号 125)
cMET_4E9v VHH	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF ILDYYAIGWFRQAPGKEREGVLCIDASDD ITYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCATPIGLSSSCLLEYDY DYWGQGTQVTVSS (配列番号 41)	
cMET_4E9z VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF ILDYYAIGWFRQAPGKEREGVLCIDASDD ITYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCATPIGLSSSCLLEYDY DYWGQGTQVTVSS (配列番号 42)	
cMET_33H10 VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGF TFDDYAIGWFRQAPGEEREGVSSISSTY GLTYADSVKGRFTISSNNAKNTVYLQM NNLKPEDTAVYYCAATPIERLGLDAYEY DYWGQGTQVTVSS (配列番号 43)	
cMET_33H10z VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFDDYAIGWFRQAPGEEREGVSSISSTY GLTYADSVKGRFTISSDNKNTVYLQM NSLRAEDTAVYYCAATPIERLGLDAYEY DYWGQGTQVTVSS (配列番号 44)	

10

20

30

【0169】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示の多重特異性抗体は、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3と呼ばれる3つの相補性決定領域(CDR)を含む重鎖可変領域であって、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3は、それぞれ配列番号106、107、及び133；配列番号111、112、及び113；配列番号111、114、及び113；配列番号99、118及び119；配列番号99、120及び119；配列番号99、121、及び119；配列番号99、122、及び119から選択される重鎖可変領域と、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3と呼ばれる3つのCDRを含む軽鎖可変領域であって、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3は、それぞれ配列番号108、109、及び110；配列番号115、116、及び117；配列番号123、124、及び125から選択される軽鎖可変領域とを含む抗cMET抗体又はその抗原結合断片を含む。

40

【0170】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される多重特異性抗体の抗cMETアームは、それぞれ、ヒト抗体重鎖の配列番号23及びヒト抗体軽鎖の配列番号25；ヒト抗体重鎖の配列番号23及びヒト抗体軽鎖の配列番号26；ヒト抗体重鎖の配列番号24及びヒト抗体軽鎖の配列番号25；ヒト抗体重鎖の配列番号24及びヒト抗体軽鎖の配列番号26；ヒト抗体重鎖の配列番号27及びヒト抗体軽鎖の配列番号30；ヒト抗体重鎖の配列

50

番号 27 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 31；ヒト抗体重鎖の配列番号 27 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 32；ヒト抗体重鎖の配列番号 28 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 30；ヒト抗体重鎖の配列番号 28 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 31；ヒト抗体重鎖の配列番号 28 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 32；ヒト抗体重鎖の配列番号 29 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 30；ヒト抗体重鎖の配列番号 29 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 31；ヒト抗体重鎖の配列番号 29 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 32；ヒト抗体重鎖の配列番号 33 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 38；ヒト抗体重鎖の配列番号 33 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 39；ヒト抗体重鎖の配列番号 33 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 40；ヒト抗体重鎖の配列番号 34 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 38；ヒト抗体重鎖の配列番号 34 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 39；ヒト抗体重鎖の配列番号 34 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 40；ヒト抗体重鎖の配列番号 35 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 38；ヒト抗体重鎖の配列番号 35 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 39；ヒト抗体重鎖の配列番号 35 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 40；ヒト抗体重鎖の配列番号 36 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 38；ヒト抗体重鎖の配列番号 36 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 39；ヒト抗体重鎖の配列番号 36 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 40；ヒト抗体重鎖の配列番号 37 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 38；ヒト抗体重鎖の配列番号 37 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 39；またはヒト抗体重鎖の配列番号 37 及びヒト抗体軽鎖の配列番号 40を含む。

10

【0171】

いくつかの実施形態では、本開示の多重特異性抗体は、配列番号 19～22 から選択されるリンカーを使用してFcに連結される、配列番号 41～44 から選択されるcMET結合VHO配列を含む。

20

【0172】**遮蔽**

本開示のいくつかの実施形態では、治療用多重特異性cMET×EGFR抗体は、マスキングドメインを含む抗cMET抗体アーム及びマスキングドメインを含む抗EGFR抗体アームを含む。抗cMET又は抗EGFR生物製剤の長期投与は、患者にとって大きな危険因子となる。したがって、抗cMET及び／又は抗EGFR抗体アームをマスキングドメインを有する遮蔽アームに変換することにより、それぞれの抗体アームの安全性プロファイル及び治療ウィンドウを増加させることができる。

【0173】

30

遮蔽又はマスキングドメインは、cMET及びEGFRへの結合から多重特異性抗体CDRを遮断することができる配列である。非限定的な例として、本開示は、配列番号 45～51 として示される遮蔽又はマスキングペプチド配列を提供する。いくつかの実施形態では、配列番号 45 は配列番号 48 と対合し；配列番号 46 は配列番号 48 と対合し；配列番号 47 は配列番号 48 と対合し；配列番号 50 は配列番号 51 と対合し、配列番号 49 はN末端重鎖又はN末端軽鎖融合物のいずれかとしてそれ自体と対合することができる。

【0174】

40

50

【表 6】

表 5

配列番号	説明	アミノ酸配列
45	FI1	EIDQCIVDDITYNVQDTFHKKHEEGHMLNCTCFGQGRGRWKSPVDQ CQDSETGTFYQIGDSWEKYVHGVRYQCYCYGRGIGEWHCQPLQTYP S
46	FI2	EIDQCIVDDITYNVQDTFHKKHEEGHMLNCTCFGQGRGRWKCEPVDQ CQDSETGTFYQIGDSWEKYVHGVRYQCYCYGRGIGEWHCQPLQTYP S
47	FI3	EIDQCIVDDITYNVQDTFHKKHEEGHMLQCTCFGQGRGRWKCDPVDQ CQDSETGTFYQIGDSWEKYVHGVRYQCYCYGRGIGEWHCQPLQTYP S
48	CO	EVGQRGVVGLPGQRGERGFPGLPGY
49	IgG1 ヒンジ	EPKSCDKTHTCPPCP
50	ヒト IGF2 A 鎖	GIVEECCFRSCDLALLETYCA
51	ヒト IGF2 B 鎖	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYF

【0175】

いくつかの実施形態では、本開示は、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3と呼ばれる3つの相補性決定領域（CDR）を含む、遮蔽ドメインとして使用することができる重鎖可変領域を提供し、ここで、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3は、それぞれ配列番号134、135、及び136；配列番号134、135、及び137；配列番号134、138、及び136；配列番号134、138、及び137；配列番号139、135、及び136；配列番号139、138、及び137；並びに配列番号140、141、及び136から選択される。

【0176】

非限定的な例として、本開示は、EGFR VHO mAbの配列番号5～12又は13～18及びcMET VHO mAbの配列番号41～44又はcMET mAbの配列番号23～40のいずれかについて、配列番号52～61として示される遮蔽ドメインのアミノ酸配列を提供する。

【0177】

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表 6

説明	アミノ酸配列 (配列番号)	CDR (配列番号)
K VHO1	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGNTI SRYATGWFRQTPGNEREFVAAIRWTNGNT YYADSVGEGRFTISRDSGKNTVYLQMNNLQ PEDTAVYYCASRFLPYASSNAYHEALYNY DYWGQGTQVTVSS (配列番号 52)	HCDR1: <u>RYATG</u> (配列番号 134) HCDR2: <u>AIRWTNGNTYYADSVGE</u> (配列番 号 135) HCDR3: <u>RFLPYASSNAYHEALYNYDY</u> (配 列番号 136)
K VHO2	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGNTI SRYATGWFRQTPGNEREFVAAIRWTNGNT YYADSVGEGRFTISRDSGKNTVYLQMNNLQ PEDTAVYYCASRFLPYASSNAYHESLYNY DYWGQGTQVTVSS (配列番号 53)	HCDR1: <u>RYATG</u> (配列番号 134) HCDR2: <u>AIRWTNGNTYYADSVGE</u> (配列番 号 135) HCDR3: <u>RFLPYASSNAYHESLYNYDY</u> (配 列番号 137)
K VHO3	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGNTI SRYATGWFRQTPGNEREFVAAIRWENGNT YYADSVGEGRFTISRDSGKNTVYLQMNNLQ PEDTAVYYCASRFLPYASSNAYHEALYNY DYWGQGTQVTVSS (配列番号 54)	HCDR1: <u>RYATG</u> (配列番号 134) HCDR2: <u>AIRWENGNTYYADSVGE</u> (配列番 号 138) HCDR3: <u>RFLPYASSNAYHEALYNYDY</u> (配 列番号 136)
K VHO4	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGNTI SRYATGWFRQTPGNEREFVAAIRWENGNT YYADSVGEGRFTISRDSGKNTVYLQMNNLQ PEDTAVYYCASRFLPYASSNAYHESLYNY DYWGQGTQVTVSS (配列番号 55)	HCDR1: <u>RYATG</u> (配列番号 134) HCDR2: <u>AIRWENGNTYYADSVGE</u> (配列番 号 138) HCDR3: <u>RFLPYASSNAYHESLYNYDY</u> (配 列番号 137)
CH1 VHO1	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGNTI SRYATGWFRQTPGNEREFVAAIRWTNGNT YYADSVGEGRFTISRDSGKNTVYLQRFLPYA SSNAYHEALYNYDYWGQGTQVTVSS (配 列番号 56)	HCDR1: <u>GNTISRYATG</u> (配列番号 139) HCDR2: <u>AIRWTNGNTYYADSVGE</u> (配列番 号 135) HCDR3: <u>RFLPYASSNAYHEALYNYDY</u> (配 列番号 136)
CH1 VHO2	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGNTI SRYATGWFRQTPGNEREFVAAIRWENGNT YYADSVGEGRFTISRDSGKNTVYLQRFLPYA SSNAYHESLYNYDYWGQGTQVTVSS (配 列番号 57)	HCDR1: <u>GNTISRYATG</u> (配列番号 139) HCDR2: <u>AIRWENGNTYYADSVGE</u> (配列番 号 138) HCDR3: <u>RFLPYASSNAYHESLYNYDY</u> (配 列番号 137)
CH1 VHO3	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGNT LSRYAMGWFRQAPGNEREFVAAIRWNNGN THYADSVKGRFTISRDSAKNTVYLQMNNL QPEDTAVYYCASRFLPYASSNAYHEALYN YDYWGQGTQVTVSS (配列番号 58)	HCDR1: <u>GNTLSRYAMG</u> (配列番号 140) HCDR2: <u>AIRWNNGNTHYADSVKG</u> (配列番 号 141) HCDR3: <u>RFLPYASSNAYHEALYNYDY</u> (配 列番号 136)

【 0 1 7 8 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

CH1 VH04	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTLSRYAMGWFRQAPGKEREFVAAIRWNNGNTHYVDSVKGRFTISRDNAKNSVYLQMNSLR AEDTAVYYCASRFLPYASSNAYHEALYNYDYWGQGTLLVTVSS (配列番号 59)	HCDR1: <u>GNTLSRYAMG</u> (配列番号 140) HCDR2: <u>AIRWNNGNTHYVDSVKG</u> (配列番号 141) HCDR3: <u>RFLPYASSNAYHEALYNYDY</u> (配列番号 136)
CH1 VH05	QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGNTLSRYAMGWFRQAPGKEREFVAAIRWNNGNTHYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYYCASRFLPYASSNAYHEALYNYDYWGQGTLLVTVSS (配列番号 60)	HCDR1: <u>GNTLSRYAMG</u> (配列番号 140) HCDR2: <u>AIRWNNGNTHYSTSLKS</u> (配列番号 141) HCDR3: <u>RFLPYASSNAYHEALYNYDY</u> (配列番号 136)
CH1 VH06	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGNTLSRYAMGWFRQAPGQEREFVAAIRWNNGNTHYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCASRFLPYASSNAYHEALYNYDYWGQGTLLVTVSS (配列番号 61)	HCDR1: <u>GNTLSRYAMG</u> (配列番号 140) HCDR2: <u>AIRWNNGNTHYAQKFQG</u> (配列番号 141) HCDR3: <u>RFLPYASSNAYHEALYNYDY</u> (配列番号 136)

10

【0179】

非限定的な例として、遮蔽ドメインは、配列番号 19～22 に列挙されるリンカーを用いて、抗 E G F R 及び抗 c M E T 結合アームの N 又は C 末端に融合することができる。

20

【0180】

プロテアーゼで切断できるリンカー

遮蔽ドメインを抗体重鎖又は軽鎖に連結する、プロテアーゼ切断可能なリンカーは、プロテアーゼによって切断可能なペプチド基質である。この配列は、1つ以上のプロテアーゼ基質配列及び任意のリンカースペーサー配列を含む。遮蔽配列は、重鎖又は軽鎖のいずれかに融合され得る配列の対として存在する。抗体の 2 つの F a b アームドメインの各々について、遮蔽配列は、1 つのプロテアーゼ切断可能リンカーを介して抗体重鎖の N 末端に融合され、相補配列は、別のプロテアーゼ切断可能リンカーを介して抗体軽鎖の N 末端に融合される。あるいは、リンカーを使用して、単一ドメインの抗 E G F R、抗 c M E T、抗 V E G F、及び抗 P D - L 1 分子と一緒に連結することができる。

30

【0181】

腫瘍微小環境及び炎症部位を含む多くの疾患組織は、その過剰発現が疾患進行と関連する様々なタイプのプロテアーゼとともに豊富に存在する。疾患組織において、遮蔽された抗体のプロテアーゼ切断可能なリンカー配列は、抗体鎖から遮蔽を解放する適切なタイプのプロテアーゼによって認識される。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、2 つのプロテアーゼ切断可能リンカー又は 2 つのプロテアーゼ切断可能リンカー配列のうちの 1 つを切断することができ、したがって、遮蔽ドメインは不活性である。いずれの場合も、遮蔽ドメインは、F a b アームのその標的抗原への結合を妨害又は遮断することはできない。その結果、遮蔽された抗体は、その標的に結合し、その機能的活性を発揮する活性抗体に変換される。

40

【0182】

いくつかの実施形態では、遮蔽抗体中の 2 つの遮蔽ドメインを 2 つの F a b ドメインに連結するプロテアーゼ切断可能リンカー配列は、同じタイプのプロテアーゼによって切断される同じ配列を含む。

【0183】

いくつかの実施形態では、遮蔽抗体中の 2 つのマスキングドメイン及び 2 つの F a b ドメインを連結するプロテアーゼ切断可能リンカー配列は、異なるタイプのプロテアーゼによって切断される基質配列を有する異なる配列を含む。

【0184】

マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) ファミリーの中で、MMP 2 と MMP 9

50

は、乳がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、及び肺がんを含む多くのタイプのがんでアップレギュレートされる。その上、MMP 2 及び MMP 9 の発現及び活性は、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、慢性閉塞性肺疾患、炎症性腸疾患及び骨粗鬆症を含む多くの自己免疫疾患及び炎症性疾患の進行とも関連する（Lin、Luら、2020年）。本開示は、MMP 2 及び MMP 9 によって切断される基質ペプチド配列を含む、プロテアーゼ切断可能なリンカー配列を提供する。非限定的な例として、本開示は、配列番号 62～66 として示される MMP 2、及び MMP 9 切断可能基質ペプチド配列を提供する。非限定的な例として、本開示は、配列番号 67 として示される MMP 3 切断可能基質ペプチド配列を提供する。

【0185】

ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子（uPA）は、多くの種類のがん、特に乳がんで過剰発現していることが報告されている（BBanys-Paluchowski, Witzel et al. 2019）。uPA は、基底膜又は細胞外マトリックスを分解することができるプラスミノゲンのプラスミンへの変換を触媒することができるセリンプロテアーゼである。マトリックスの分解は、周囲組織への腫瘍細胞の移動及び侵入を促進することができる。本開示は、uPA によって切断された基質ペプチド配列を含むプロテアーゼ切断可能なリンカー配列を提供する。非限定的な例として、本開示は、配列番号 68 及び 69 として示される uPA 切断可能な基質ペプチド配列を提供する。

【0186】

【表 8】

表 7

配列番号	説明	アミノ酸配列
62	MMP2 及び MMP9 の基質配列	GPLGVR
63	MMP2 及び MMP9 の基質配列	PLGLAR
64	MMP2 及び MMP9 の基質配列	PLGLAG
65	MMP2 及び MMP9 の基質配列	IPVSLRSG
66	MMP2 及び MMP9 の基質配列	GPLGMLSQ
67	MMP3 の基質配列	RPKPVEVWRK
68	uPA の基質配列	LSGRSDNH
69	uPA の基質配列	TGRGPSWV

【0187】

本開示のプロテアーゼ切断可能リンカーは、例えば、遮蔽配列とプロテアーゼ基質ペプチド配列との間、及び／又は、プロテアーゼ基質ペプチド配列と抗体鎖との間に介在する1つ以上のリンカーペプチドを含み得る。

【0188】

リンカー

適切なリンカー（「スペーサー」とも呼ばれる）は、容易に選択することができ、1アミノ酸～30アミノ酸（例えば、1～30の間の任意の特定の整数、又は1アミノ酸（例えば、Gly）～約20アミノ酸、2～15、3～12、4～10、5～9、6～8、又は7～8アミノ酸）などのいくつかの適切な長さのいずれかであり得る。代表的なリンカーを表3に示す。

10

【0189】

例示的リンカーは、グリシンポリマー（G）_n、グリシン-セリンポリマー（例えば、（GS）_n、（GSGGS）_nおよび（GGGS）_nを含み、ここで、nは、少なくとも1つの整数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20）、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、アラニン-プロリンポリマー、イムノグロブリンアイソタイプ及びサブタイプヒンジ（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgMを含み得る）、及び当該技術分野において周知である他の柔軟なリンカーを含む。GlyとSerはともに比較的構造化されていないため、よって、コンポーネント間のニュートラルなテザーとして機能する。

20

【0190】

特定の実施形態では、リンカーはグリシンポリマーである。グリシンは、アラニンよりもかなり多くのファイブサイ空間にアクセスし、より長い側鎖を有する残基よりも制限がはるかに少ない（Scheraga 2008）。例示的リンカーは、GGS；GGS G；GGS GG；GGGS；GSGSG；GSGGG；GGGSG；GSSSGなどを含むが、これらに限定されない、アミノ酸配列を含み得る。

【0191】

特定の実施形態では、リンカーはアラニン-プロリンポリマーである。例示的リンカーは、（AP）_nを含むが、これに限定されない、アミノ酸配列を含み得、ここで、nは、少なくとも1つの整数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20である。

30

【0192】

特定の実施形態では、リンカーは剛性リンカーである（Chen, Zaro et al. 2013）。代表的な剛性リンカーは、プロリンに富む配列（XP）_nを含むが、これらに限定されない、アミノ酸配列を含むことができ、ここでXは、任意のアミノ酸、好ましくはAla、Lys、又はGluを示し、ここでnは、少なくとも1つの整数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20である。例示的な剛性リンカーはまた、（EAAAK）_nの配列を有するαヘリックス形成リンカー（ここで、nは、少なくとも1つの整数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20である）を含むが、これらに限定されない、アミノ酸配列を含み得る。

40

【0193】

抗PD-L1抗体及び抗VEGF抗体

特定の実施形態では、本開示の免疫調節ドメインは、PD-L1ポリペプチドである。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドのPD-L1ポリペプチドは、PD-L1アミノ酸配列の配列番号70のアミノ酸19～290と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。FTVTVPKDLVVYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEEDLKVQ

50

HSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPY
NKINQRILVVDPTSEHELTCAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLF
NVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNERTHLVILGAILLC
LGVALTFIFRLRKGRMMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET（配列番号 70）。

【0194】

特定の実施形態では、本開示の適切な免疫調節ドメインは、PD-L1 ペプチド、抗 PD-L1 の Ig 可変ドメイン又は scFv 形式を含む。場合によっては、本開示の多量体ポリペプチドの抗 PD-L1 抗体の一本鎖 Fv ポリペプチドは、抗 PD-L1 抗体の一本鎖 Fv ポリペプチドと、配列番号 71 又は配列番号 72 として、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0195】

いくつかの実施形態では、本開示は、HCDR1、HCDR2、及び HCDR3 と称される 3 つの相補性決定領域（CDR）を含む重鎖可変領域であって、HCDR1、HCDR2、及び HCDR3 は、それぞれ配列番号 129、130、及び 131；配列番号 129、132、及び 131 から選択される重鎖可変領域と、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 と称される 3 つの CDR を含む軽鎖可変領域であって、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 は、それぞれ配列番号 126、127、及び 128 である軽鎖可変領域とを含む抗 VEGF 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

20

【0196】

いくつかの場合において、本開示の多量体ポリペプチドの抗 VEGF 抗体の一本鎖 Fv ポリペプチドは、配列番号 73、配列番号 74、配列番号 75 又は配列番号 76 に記載の抗 VEGF 抗体の一本鎖 Fv ポリペプチドと少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0197】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示の多重特異性抗体は、HCDR1、HCDR2、及び HCDR3 と呼ばれる 3 つの相補性決定領域（CDR）を含む重鎖可変領域であって、HCDR1、HCDR2、及び HCDR3 は、それぞれ配列番号 129、130、及び 131；配列番号 129、132、及び 131；から選択される重鎖可変領域と、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 と呼ばれる 3 つの CDR を含む軽鎖可変領域であって、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 は、それぞれ、配列番号 126、127、及び 128 である軽鎖可変領域とを含む抗 VEGF 抗体又はその抗原結合断片を含む。

30

【0198】

いくつかの実施形態では、本開示は、アミバンタマブに対する対照二重特異性 Ab Fv 配列を提供する：EGFR 結合アームは、重鎖 Fv の配列番号 79 及び軽鎖 Fv の配列番号 80 で示され；cMET 結合アームは、重鎖 Fv の配列番号 77 及び軽鎖 Fv の配列番号 78 で示される。抗 gp120 mAb v12 のヌル対照 Ab Fv 配列は、重鎖 Fv（配列番号 82）及び軽鎖（配列番号 81 に示す）を含む。

40

【0199】

50

【表 9 - 1】

表 8

名称	可变領域配列 (配列番号)	CDR (配列番号)
AT PD-L1 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHW VRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDY WGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIK (配列番号 71)	
San PDL1 scFv	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT SSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKGGGG SGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRLRLDCKA SGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWDGSKRYY ADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCA TNDDYWGQGTLLVTVSS (配列番号 72)	
VEGF VL1-VH1 scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISNYLNWYQ QKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGKLEIKGGG GSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKPGASVKVSC ASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPT YAQKFTGRFVFLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYF CAKYPHYYGSSHWFYFDVWGQGTLLVTVSS (配列番号 73)	LCDR1: RASQDISNYLN (配列番号 126) LCDR2: FTSSLHS (配列番号 127) LCDR3: QQYSTVPWT (配列番号 128) HCDR1: NYGMN (配列番号 129) HCDR2: WINTYTGEPTYAQKFTG (配列番号 130) HCDR3: YPHYYGSSHWFYFDV (配列番号 131)
VEGF VL1-VH2 scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISNYLNWYQ QKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGKLEIKGGG GSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC ASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPT YAQKFQGRFTFTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAKYPHYYGSSHWFYFDVWGQGTLLVTVSS (配列番号 74)	LCDR1: RASQDISNYLN (配列番号 126) LCDR2: FTSSLHS (配列番号 127) LCDR3: QQYSTVPWT (配列番号 128) HCDR1: NYGMN (配列番号 129) HCDR2: WINTYTGEPTYAQKFQG (配列番号 132) HCDR3: YPHYYGSSHWFYFDV (配列番号 131)

【0200】

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

VEGF VH1- VL1 scFv	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYAQQFTGRFVF SLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYFCAKYPHYYGSSH WYFDVWGQGTLLTVSS GGGSGGGSGGGGS DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQ QKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKLEIK (配列 番号 75)	HCDR1: NYGMN (配列番号 129) HCDR2: WINTYTGEPTYAQQFTG (配列 番号 130) HCDR3: YPHYYGSSHWYFDV (配列番号 131) LCDR1: RASQDISNYLN (配列 番号 126) LCDR2: FTSSLHS (配列番号 127) LCDR3: QQYSTVPWT (配列番 号 128)
VEGF VH2- VL1 scFv	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYAQKFQGRFTF TADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAKYPHYYGSS HWYFDVWGQGTLLTVSS GGGSGGGSGGGGS DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQ QKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKLEIK (配列 番号 76)	HCDR1: NYGMN (配列番号 129) HCDR2: WINTYTGEPTYAQKFQG (配列 番号 132) HCDR3: YPHYYGSSHWYFDV (配列番号 131) LCDR1: RASQDISNYLN (配列 番号 126) LCDR2: FTSSLHS (配列番号 127) LCDR3: QQYSTVPWT (配列番 号 128)
アミヴァ ンタ mab cMET 重鎖 Fv	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISW VRQAPGHGLEWMGWISAYNGYTNYAQKLQGRVTMT TDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFD YWGQGTLLTVSS (配列番号 77)	
アミヴァ ンタ mab cMET 軽鎖 Fv	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWF QHKPGKAPKLLIYAASSLLSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTREIK (配列 番号 78)	
アミヴァ ンタ mab EGFR 重鎖 Fv	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYKYGDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGV MKDYFDYWGQGTLLTVSS (配列番号 79)	

【 0 2 0 1 】

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

アミヴァ ンタ mab EGFR 軽鎖 Fv	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISSALVWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSESGTDFTLT SSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGKTKVEIK (配列 番号 80)	
gp120 軽鎖 Fv	EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRSSHISRRVAWY QHKGQAPRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTL TITRVEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERK (配 列番号 81)	
gp120 重鎖 Fv	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFIHW VRQAPGQRFEWMGWINPYNGNKEFSKAFQDRVTF TASANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSP QDNYMDVWGKGTIVVSS (配列番号 82)	

10

【0202】

いくつかの実施形態では、遮蔽された c M E T × E G F R 多重特異性抗体などの多重特異性抗体は、修飾された F c 領域を含み得、ここで、修飾された F c 領域は、天然 F c 領域に対して少なくとも 1 つのアミノ酸修飾を含む。いくつかの実施形態では、遮蔽 c M E T × E G F R 多重特異性抗体などの多重特異性抗体には、修飾 F c 領域が提供され、ここで、天然に存在する F c 領域は、生物学的環境における親の天然抗体と比較した場合に、抗体の半減期、例えば、血清半減期又はインビトロアッセイによって測定される半減期を延長するように修飾される。単独又は組み合わせで作製され得る例示的な突然変異は、T 2 5 0 Q、M 2 5 2 Y、I 2 5 3 A、S 2 5 4 T、T 2 5 6 E、P 2 5 7 I、T 3 0 7 A、D 3 7 6 V、E 3 8 0 A、M 4 2 8 L、H 4 3 3 K、N 4 3 4 S、N 4 3 4 A、N 4 3 4 H、N 4 3 4 F、H 4 3 5 A 及び H 4 3 5 R 突然変異である。

20

【0203】

特定の実施形態では、半減期の延長は、E U インデックス (Dall'Acqua, Kiener et al. 2006) に従って、I g G 1 F c 残基番号付けにおける M 2 5 2 Y / S 2 5 4 T / T 2 5 6 E 変異を操作することによって実現することができる。

30

【0204】

特定の実施形態では、半減期の延長はまた、I g G 1 F c における M 4 2 8 L / N 4 3 4 S 変異を操作することによって実現することができる (Zalevsky, Chamberlain et al. 2010)。

【0205】

特定の実施形態では、半減期の延長はまた、I g G 1 F c における T 2 5 0 Q / M 4 2 8 L 変異を操作することによって実現することができる (Hinton, Xiong et al. 2006)。

【0206】

特定の実施形態では、半減期の延長はまた、I g G 1 F c における N 4 3 4 A 変異を操作することによって実現することができる (Shields, Namenuk et al. 20011)。

40

【0207】

特定の実施形態では、半減期の延長はまた、I g G 1 F c における T 3 0 7 A / E 3 8 0 A / N 4 3 4 A 変異を操作することによって実現することができる (Petkova, Akilesh et al. 2006)。

【0208】

抗体半減期の延長に対する F c 工学の有効性は、天然型 I g G F c を有する抗体と比較して、マウスにおける P K 研究において評価することができる。

【0209】

50

いくつかの実施形態では、遮蔽された c M E T × E G F R 多重特異性抗体には、天然に存在する F c 領域が修飾されて、野生型抗体を残基 2 2 2 - 2 3 7 (E U 番号付け) の間又はその位置で切断するプロテアーゼによるタンパク質分解に対する抗体耐性を増強する修飾 F c 領域が提供される。

【 0 2 1 0 】

特定の実施形態では、タンパク質分解に対する耐性は、 E U インデックス (Kinder, Greenplate et al. 2013) に従った残基番号付けで、親天然抗体と比較した場合、ヒンジ領域において G 2 3 6 が欠失した E 2 3 3 P 変異を操作することによって実現することができる。

【 0 2 1 1 】

エフェクター機能が望まれない場合、本開示の抗体は、活性化 F c 受容体 (F c R) への抗体の結合を低減する、及び／又は C 1 q 結合、補体依存性細胞傷害 (C D C) 、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) 又は食作用 (A D C P) などの F c エフェクター機能を低減する、少なくとも 1 つの変異を抗体 F c に導入するようにさらに操作することができる。

【 0 2 1 2 】

活性化 F c R への抗体の結合を低下させ、続いてエフェクター機能を低下させるために変異され得る F c 位置は、例えば、 (Xu, Alegre et al. 2000) (Vafa, Gilliland et al. 2014) (Vafa, Gilliland et al. 2014) (Bolt, Routledge et al. 1993, Shields, Namenuk et al. 2001, Chu, Vostiar et al. 2008) に記載されているものである。最小限の A D C C 、 A D C P 、 C D C 、及び／又は F c 媒介細胞活性化を伴う F c 変異は、また、 I g G 1 、 I g G 2 及び I g G 4 のシグマ変異として記載されている (Tam, McCarthy et al. 2017) 。単独又は組合せで行われ得る例示的変異は、 I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 又は I g G 4 における K 2 1 4 T 、 E 2 3 3 P 、 L 2 3 4 V 、 L 2 3 4 A 、 G 2 3 6 の欠失、 V 2 3 4 A 、 F 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A 、 G 2 3 7 A 、 P 2 3 8 A 、 P 2 3 8 S 、 D 2 6 5 A 、 S 2 6 7 E 、 H 2 6 8 A 、 H 2 6 8 Q 、 Q 2 6 8 A 、 N 2 9 7 A 、 A 3 2 7 Q 、 P 3 2 9 A 、 D 2 7 0 A 、 Q 2 9 5 A 、 V 3 0 9 L 、 A 3 2 7 S 、 L 3 2 8 F 、 A 3 3 0 S 及び P 3 3 1 S 変異である。

【 0 2 1 3 】

A D C C を減少させるために作られ得る例示的組合せ変異は、 I g G 1 上の L 2 3 4 A / L 2 3 5 A 、 I g G 2 上の V 2 3 4 A / G 2 3 7 A / P 2 3 8 S / H 2 6 8 A / V 3 0 9 L / A 3 3 0 S / P 3 3 1 S 、 I g G 4 上の F 2 3 4 A / L 2 3 5 A 、 I g G 4 上の S 2 2 8 P / F 2 3 4 A / L 2 3 5 A 、 I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 または I g G 4 上の N 2 9 7 A 、 I g G 2 上の V 2 3 4 A / G 2 3 7 A 、 I g G 1 上の K 2 1 4 T / E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 欠失 / A 3 2 7 G / P 3 3 1 A / D 3 6 5 E / L 3 5 8 M 、 I g G 2 上の H 2 6 8 Q / V 3 0 9 L / A 3 3 0 S / P 3 3 1 S 、 I g G 1 上の S 2 6 7 E / L 3 2 8 F 、 I g G 1 上の L 2 3 4 F / L 2 3 5 E / D 2 6 5 A 、 I g G 1 上の L 2 3 4 A / L 2 3 5 A / G 2 3 7 A / P 2 3 8 S / H 2 6 8 A / A 3 3 0 S / P 3 3 1 S 、 I g G 4 上の S 2 2 8 P / F 2 3 4 A / L 2 3 5 A / G 2 3 7 A / P 2 3 8 S 、および I g G 4 上の S 2 2 8 P / F 2 3 4 A / L 2 3 5 A / G 2 3 6 欠失 / G 2 3 7 A / P 2 3 8 S である。ハイブリッド I g G 2 / 4 F c 領域も、 I g G 2 からの残基 1 1 7 ~ 2 6 0 及び I g G 4 からの残基 2 6 1 ~ 4 4 7 を有する F c のように、用いてもよい。

【 0 2 1 4 】

いくつかの実施形態では、遮蔽された c M E T × E G F R 多重特異性抗体は、天然に存在する F c 領域が F c ヘテロ二量体化による多重特異性抗体の生成を促進するように修飾されている修飾 F c 領域とともに提供される。

【 0 2 1 5 】

特定の実施形態では、 F c ヘテロ二量化は、2つの親抗体上の F 4 0 5 L 及び K 4 0 9 R 変異を操作し、 F a b アーム交換 (Labrijn, Meesters et al. 2014) として知ら

10

20

30

40

50

れるプロセスで多重特異性抗体を生成することによって実現することができる。

【0216】

特定の実施形態では、Fcヘテロ二量体化は、ノブ・イン・ホール戦略（例えば、WO 2006/028936 参照）を促進するためにFc突然変異によって実現することもできる。小さい側鎖（ホール）をもつアミノ酸を一方のFcドメインに導入し、大きい側鎖（ノブ）をもつアミノ酸をもう一方のFcドメインに導入する。2つの重鎖の同時発現後、ヘテロ二量体は、「ホール」を有する重鎖と、「ノブ」を有する重鎖との優先的相互作用の結果として形成される（Ridgway, Presta et al. 1996）。ノブ及びホールを形成する例示的Fc変異対は、T366Y/F405A、T366W/F405W、F405W/Y407A、T394W/Y407T、T394S/Y407A、T366W/T394S、F405W/T394S及びT366W/T366S/L368A/Y407Vである。共発現の代わりに、制御されたFabアーム交換を適用して、対応する親抗体の別々の形質移入及び精製から多重特異性抗体を生成することができる。

10

【0217】

特定の実施形態では、Fcヘテロ二量体化はまた、静電的にマッチした相互作用戦略を促進するためにFc突然変異によって実現することができる（Gunasekaran, Pentony et al. 2010）。米国特許出願公開第2010/0015133号；同第2009/0182127号；同第2010/028637号又は同第2011/0123532に記載されているように、変異を操作して、一方のFcドメインに正に荷電した残基を、他方のFcドメインに負に荷電した残基を生成することができる。重鎖ヘテロ二量体化は、2つの突然変異Fc間の静電的に整合した相互作用によって形成される。

20

【0218】

いくつかの実施形態では、遮蔽されたcMET×EGFR×PD-L1/VEGF多重特異性抗体には、修飾Fc領域が提供され、天然に存在するFc領域は、細胞表面受容体との相互作用の際に、抗体の多量体化を促進するように修飾されるが、このような操作された抗体は、溶液中に単量体として存在する。抗体多量体化を容易にするFc変異には、（Diebolder, Beurskens et al. 2014）に記載されているように、E345R突然変異、E430G突然変異、E345R/E430G突然変異、及びE345R/E430G/Y440R突然変異が含まれるが、これらに限定されない。そのような変異には、（Zhang, Armstrong et al. 2017）に記載されているようなT437R突然変異、T437R/K248E突然変異、及びT437R/K338A突然変異も含まれ得るが、これらに限定されない。

30

【0219】

保存的修飾をさらに含む本開示の抗体は、本開示の範囲内である。「保存的修飾」とは、アミノ酸配列を含む抗体の結合特性に有意に影響しない、又は変化させないアミノ酸修飾を指す。保存的修飾には、アミノ酸の置換、付加、及び欠失が含まれる。保存的置換は、アミノ酸が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、十分に定義されており、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン）、芳香族側鎖（例えば、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン、チロシン）、脂肪族側鎖（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン）、アミド（例えば、アスパラギン、グルタミン）、β分枝側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び硫黄含有側鎖（システイン、メチオニン）を有するアミノ酸を含む。さらに、アラニンスキニング突然変異誘発について以前に記載したように、ポリペプチド中の任意の天然残基をアラニンで置換することもできる。本開示の抗体に対するアミノ酸置換は、既知の方法、例えば、PCR突然変異誘発（米国特許第4,683,195号）によって行ってもよい。あるいは、変異体のライブラリーは、例えば、11個のアミノ酸（Ala、C

40

50

y s、A s p、G l u、G l y、L y s、A s n、A r g、S e r、T y r、T r p) をコードするランダム (N N K) 又は非ランダムのコドン、例えば D V K のコドンを用いて作製することができる。得られた抗体変異体は、本明細書に記載のアッセイを用いて、その特徴について試験することができる。

【0220】

本開示の抗体は、グリコシル化、異性化、脱グリコシル化、及び／又はポリエチレングリコール部分の付加（ペグ化）及び脂質化などの天然に存在しない共有結合修飾などのプロセスによって翻訳後修飾することができる。このような修飾は、インビボ又はインビトロで起こり得る。例えば、本開示の抗体は、それらの薬物動態プロファイルを改善するために、ポリエチレングリコールにコンジュゲート（PEG化）され得る。コンジュゲーションは、当業者に知られている技術によって実施することができる。治療用抗体とPEGとのコンジュゲーションは、機能を妨げずに薬力学を増強することが示されている。

10

【0221】

本開示の抗体は、安定性、選択性、交差反応性、親和性、免疫原性、及び／又は他の望ましい生物学的又は生物物理学的特性を改善するために修飾され得る。抗体の安定性は、（１）固有の安定性に影響する個々のドメインのコアパッキング、（２）H CとL Cの対合に影響するタンパク質／タンパク質界面相互作用、（３）極性及び荷電残基の埋没、（４）極性及び荷電残基のH結合ネットワーク、及び（５）他の分子内及び分子間力の中の表面電荷及び極性残基の分布を含む、多くの要因によって影響を受ける（Worn and Pluckthun 2001）。潜在的構造不安定化残基は、抗体の結晶構造に基づいて、又は特定の場合には分子モデリングによって同定され得、そして抗体安定性に対する残基の効果は、同定された残基において変異を有する修飾体を生成及び評価することによって試験され得る。示差走査熱量測定によって測定される熱転移中間点（ T_m ）を上げることが、抗体安定性を高める方法の1つである。通常、タンパク質 T_m はその安定性と相関し、溶解状態でのアンフォールディングや変質に対する感受性、及びタンパク質のアンフォールディングの傾向に依存する分解過程と逆相関する。いくつかの研究は、D S Cにより熱安定性として測定される製剤の物理的安定性のランキングと他の方法により測定される物理的安定性の間の相関を見出した。製剤研究から、F a b T_m は対応するm A bの長期の物理学的安定性に意味を持つことが示唆されている。

20

【0222】

本開示の抗体は、製造及び薬物安定性を改善するアミノ酸置換をF c領域に有し得る。例えば、I g G 1はH 2 2 4 S（又はH 2 2 4 Q）のヒンジ2 2 1－D K T H T C－2 2 6（欧州ナンバリング）で、急激に誘発される切断を阻止する。I g G 4はS 2 2 8 P変異で、半抗体交換を阻止する。

30

【0223】

三重特異性 c M e t × E G F R × V E G F 抗体

c M e t × E G F R × V E G F 分子を作製するための特定の成分のアミノ酸配列は、以下の表に例示される。

【0224】

40

【表 10 - 1】

表 9

配列番号	説明	アミノ酸配列
83	7D_VHH6-(G4S)2-EGA1-Fc.IgG1 ノブ_LPLIL	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKERE VSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYC AAAAGWAWYGTLYEYDYWGEQTQVTVSSGGGGSGGGGSQVQLQESG GGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKQREFVAAIRWSG GYTTYTDSVKGRFTISRDNANTTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATYLSSD YSRYALPQRPLDYDYWGQGTQVTVSSGGGGSDKHTCPPCPAPELLG GPSVFLLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPPEEQYNSTLRVVSILTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
84	E_VH1-IgG1_ホ ール_LPLIL	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDYYMHWRQAPGQGLEW MGRVNPNGRTTYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELSRLSDDTAVYY CARANWLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSDDL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFL LPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP PEEQYNSTLRVVSILTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPN NYKTTPLVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
85	E_VL1 カッパ LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRVQSQSVSSIYLHWYQQKPGKAPKLLIY STSNLQSGVPSRFSGSGSDFTLTITSSSLQPEDFATYYCQVYSGYPLTF GGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
86	7D_VHH6-(G4S)2-EGA1-Fc.IgG1_ノブ_LPLIL-切断可能リンカー-scFv_VEGF	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKERE VSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYC AAAAGWAWYGTLYEYDYWGEQTQVTVSSGGGGSGGGGSQVQLQESG GGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKQREFVAAIRWSG GYTTYTDSVKGRFTISRDNANTTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATYLSSD YSRYALPQRPLDYDYWGQGTQVTVSSGGGGSDKHTCPPCPAPELLG GPSVFLLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPPEEQYNSTLRVVSILTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGKGGGGSPGLAGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGS GTDFLTITSSSLQPEDFATYYCQYQSTVPWTFGQGTKEIKGGSEKSSG SGSESKSTGGSEQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYFTNYGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYAQKFQGRVTITADESTSTAYMEL SSLRSEDATVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSS

【 0 2 2 5 】

10

20

30

40

50

【表 10 - 2】

87	E_VH1-IgG1_ホ ール_LPLIL-切 断可能リンカー -scFv_VEGF	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHVVRQAPGGGLEW MGRVNPNGGGTTYAQKFQGRVTMTTDTSTAYMELSLRLSDDTAVYY CARANWLDYWGGGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL LPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP PEEQYNSTLRVVSILTTLHQQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPLVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGSPLGLAGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGGGKLEIKGGSEGKSSGSGSE SKSTGGSEQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQ APGGGLEWMGWINTYTGEPTYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE EDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGTLLVTVSS
88	7D_VHH6- (G4S)2-EGA1- Fc_IgG1_ノブ _LPLIL-切断可 能リンカー- scFv_VEGF_CC	QVKLEESGGGSGVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREF VSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYC AAAAGWAWYGTLYEYDYGEGTQVTVSSGGGGSGGGGSQVQLQESG GGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKQREFVAAIRWSG GYTTYTDSVKGRFTISRDNAKTTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATYLSDD YSRYALPQRPLDYDWGQGTQVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPPEEQYNSTLRVVSILTTLHQQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGKGGGGSPLGLAGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGGGKLEIKGGSEGKSSG SGSESKSTGGSEQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYGMN WVRQAPGQCLEWMGWINTYTGEPTYAQKFQGRVTITADESTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGTLLVTVSS
89	E_VH1-IgG1_ホ ール_LPLIL-切 断可能リンカー - scFv_VEGF_CC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHVVRQAPGGGLEW MGRVNPNGGGTTYAQKFQGRVTMTTDTSTAYMELSLRLSDDTAVYY CARANWLDYWGGGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL LPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP PEEQYNSTLRVVSILTTLHQQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPLVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGSPLGLAGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGGGKLEIKGGSEGKSSGSGSE SKSTGGSEQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQ APGQCLEWMGWINTYTGEPTYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE EDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGTLLVTVSS

【0226】

10

20

30

40

50

【表 10 - 3】

90	7D_VHH6- (G4S)2-EGA1- Fc_IgG1_ノブ _LPLIL-(G4S)4- scFv_VEGF	QVKLEESGGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKERE VSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYC AAAAGWAWYGTLYEYDYWGEQTQVTVSSGGGGSGGGGSQVQLQESG GGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKQREFVAAIRWSG GYTTYTDSVKGRFTISRDNANTTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATYLSSD YSRYALPQRPLDYDYWGQGTQVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPPEEQYNSTLRVVSILTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKAPKVLITYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKEIKGGSE GKSSGSGSESKSTGGSEQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYFTTN YGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYAQKFQGRVTITADESTSTA YMESSLRSEDATVYYCAKYPHYGGSSHWYFDVWGQGTTLVTVSS
91	E_VH1-IgG1_ホ ール_LPLIL- (G4S)4- scFv_VEGF	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDYYMHWRQAPGQGLEW MGRVNPNRGGTTTAAQKFQGRVTMTTDTSTAYMELSLRSDDTAVYY CARANWLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL LPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP PEEQYNSTLRVVSILTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPN NYKTTPLVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVITITCRASQDISNYLNWYQQKPKAPKVLITYFTSSLHSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKEIKGGSEKSSG SGSESKSTGGSEQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYFTTN YGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYAQKFQGRVTITADESTSTAYMEL SSLRSEDATVYYCAKYPHYGGSSHWYFDVWGQGTTLVTVSS
92	7D_VHH6- (G4S)2-EGA1- Fc_IgG1_ノブ _LPLIL-(G4S)4- scFv_VEGF_CC	QVKLEESGGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKERE VSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYC AAAAGWAWYGTLYEYDYWGEQTQVTVSSGGGGSGGGGSQVQLQESG GGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKQREFVAAIRWSG GYTTYTDSVKGRFTISRDNANTTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATYLSSD YSRYALPQRPLDYDYWGQGTQVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPPEEQYNSTLRVVSILTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKAPKVLITYFTSSLHSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGCGTKLEIKGG SEGKSSGSGSESKSTGGSEQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTF TNYGMNWVRQAPGQCLEWMGWINTYTGEPTYAQKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSEDATVYYCAKYPHYGGSSHWYFDVWGQGTTLVTVSS

10

20

30

40

【0227】

【表 10 - 4】

93	E_VH1-IgG1_ホ ーレ_LPLIL- (G4S)4- scFv_VEGF_CC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHVWRQAPGQGLEW MGRVNPNGGGTTYAQKFQGRVTMTTDSISTAYMELSRLSDDTAVYY CARANWLDYWGGGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL LPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP PEEQYNSTLRVVSILTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPLVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLITYFTSSLHSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGCGTKLEIKGGSEGKSSG SGSESKSTGGSEQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYGMN WVRQAPGQCLEWMGWINTYTGEPTYAQKFQGRVTITADESTSTAYMEL SSLRSED TAVYYCAKYPHYGGSSHWYFDVWGQGLTVTVSS
94	E_VH1-IgG1_ホ ーレ_LPLIL- (G4S)4- scFv_PD-L1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHVWRQAPGQGLEW MGRVNPNGGGTTYAQKFQGRVTMTTDSISTAYMELSRLSDDTAVYY CARANWLDYWGGGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL LPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP PEEQYNSTLRVVSILTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPLVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYLYHPATFGCGTKVEIKGGSEGKSS GSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHW VRQAPGKCLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED TAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS

【0228】

特定の多重特異性物質のアミノ酸配列の組成を以下の表で強調する。TAVO412AからTAVO412Hの配列は、以下の表に示すようなオープンリーディングフレームの同時発現を介して調製する。

【0229】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 10

多重特異性抗体 及び 説明	完全 TAVO412 構築物のアミノ酸配列
TAVO-412A	配列番号 83 + 配列番号 84 + 配列番号 85
TAVO-412B (切断可能リンカーを有する二価 scFv)	配列番号 86 + 配列番号 87 + 配列番号 85
TAVO-412C 切断可能リンカーを有しない二価 scFv)	配列番号 90 + 配列番号 91 + 配列番号 85
TAVO-412D (断可能リンカーを有する一価 scFv)	配列番号 86 + 配列番号 84 + 配列番号 85
TAVO-412E (断可能リンカーを有しない一価 scFv)	配列番号 90 + 配列番号 84 + 配列番号 85
TAVO-412F (断可能リンカーを有する一価 scFv)	配列番号 83 + 配列番号 87 + 配列番号 85
TAVO-412G (断可能リンカーを有しない一価 scFv)	配列番号 83 + 配列番号 91 + 配列番号 85
TAVO-412H	配列番号 83+ 配列番号 85 + 配列番号 94

【0230】

抗体の発現と精製

いくつかの実施形態では、本開示の多重特異性抗体などの抗体は、単一の核酸（例えば、多重特異性抗体の軽鎖及び重鎖ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単一の核酸）によって、又はそれぞれが親抗体の異なる部分をコードする2つ以上の別々の核酸によってコードすることができる。

【0231】

本明細書に記載の核酸は、ベクター、例えば、核酸発現ベクター及び／又はターゲティングベクターに挿入することができる。このようなベクターは、種々の方法において、例えば、細胞又はトランスジェニック動物における、本明細書に記載のマスキングドメインを有する遮蔽された抗体の発現のために使用され得る。ベクターは、代表的には、そのベクターが使用される宿主細胞において機能的であるように選択される。本明細書中に記載されるマスキングドメインを有する遮蔽された抗体をコードする核酸分子は、原核生物、酵母、昆虫（バキュロウイルス系）及び／又は真核生物宿主細胞において増幅／発現され得る。宿主細胞の選択は、部分的には、本明細書に記載の多重特異性抗体が翻訳後修飾（例えば、グリコシル化及び／又はリン酸化）されるかどうかによって依存する。もしそうなら、酵母、昆虫、又は哺乳動物の宿主細胞が好ましい。発現ベクターは、典型的には、以下の構成要素の1つ以上を含む：プロモーター、1つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナー及びアクセプタープライス部位を含む完全なイントロン配列、分泌のためのリーダー配列、リボゾーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるべきポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、及び選択マーカーエレメント。

【0232】

ほとんどの場合、リーダー又はシグナル配列は、その分泌を導くために、本明細書に記載の遮蔽された c M E T × E G F R × P D − L 1 / V E G F 多重特異性抗体の N 末端で操作される。遮蔽された c M E T × E G F R × P D − L 1 / V E G F 多重特異性抗体の宿主細胞からの分泌は、抗体からのシグナルペプチドの除去をもたらす。したがって、成熟した遮蔽された c M E T × E G F R × P D − L 1 / V E G F 多重特異性抗体は、いかなるリーダー配列又はシグナル配列も欠く。真核生物宿主細胞発現系においてグリコシル化が望まれる場合など、いくつかの場合において、グリコシル化又は収率を改善するために様々なプレ配列を操作することができる。例えば、シグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変化させるか、又はプレ配列を加えることができ、これもグリコシル化に影響を与え得る。

10

【0233】

本開示は、本開示の核酸又はベクターを含む細胞（例えば、単離又は精製細胞）をさらに提供する。細胞は、本開示の核酸又はベクターで形質転換されて、それによってコードされるポリペプチドを産生することができる任意のタイプの細胞であり得る。本願明細書に記載の遮蔽された c M E T × E G F R × P D − L 1 / V E G F 多重特異性抗体を発現させるために、上述のように得られた部分的又は全長の軽鎖及び重鎖をコードしている D N A を、遺伝子が転写及び翻訳制御配列に作動可能に連結されるように、発現ベクターに挿入する。

【0234】

単離された細胞に核酸及びベクターを導入する方法、ならびにインビトロで形質転換された宿主細胞の培養及び選択方法は、当該技術分野において公知であり、塩化カルシウム媒介形質転換、形質導入、接合、トリパレンタル接合、D E A E、デキストラン媒介形質移入、感染、リボソームによる膜融合、D N A 被覆マイクロプロジェクトルによる高速衝撃、単一細胞への直接マイクロインジェクション、及びエレクトロポレーションの使用を含む。

20

【0235】

本開示の核酸又はベクターを細胞に導入した後、その細胞は、コードされた配列の発現に適切な条件下で培養される。次に、抗体、抗原結合断片、又は抗体の一部を細胞から単離することができる。

【0236】

特定の実施形態では、本明細書に記載の遮蔽された c M E T × E G F R × P D − L 1 / V E G F 多重特異性抗体と一緒にコードする 2 つ以上のベクターを、細胞に導入することができる。

30

【0237】

特定の実施形態では、細胞培地に分泌された、本明細書に記載の遮蔽された c M E T × E G F R × P D − L 1 / V E G F 多重特異性抗体の精製は、アフィニティークロマトグラフィー、イムノアフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィー、モレキュラーシーブクロマトグラフィー、分取ゲル電気泳動又は等電点電気泳動、クロマトフォーカシング、及び高圧液体クロマトグラフィーを含む様々な技術を用いて達成することができる。例えば、F c 領域を含む抗体は、F c 領域に選択的に結合するプロテイン A によるアフィニティークロマトグラフィーによって精製され得る。

40

【0238】

遮蔽された c M E T × E G F R × P D − L 1 / V E G F 多重特異性抗体の修飾形態は、その C 末端又は N 末端のいずれかに、ヘキサヒスチジン又は他の小ペプチド、例えば F L A G (E a s t m a n K o d a k C o . , N e w H a v e n , C o n n .) 又は M y c (I n v i t r o g e n) などの親和性タグを用いて調製し、ワンステップアフィニティークラムによって精製することができる。例えば、ポリヒスチジンは、ニッケルに大きな親和性及び特異性で結合し、したがって、ニッケルの親和性カラム (Q i a g e n (登録商標) ニッケルカラムなど) は、ポリヒスチジntag 化選択的結合剤の精製のために使用され得る。場合によっては、1 つ以上の精製工程が用いられてもよい。

50

【0239】

多重特異抗体の結合及び機能活性に及ぼす影響

いくつかの実施形態では、遮蔽されたcMET×EGFR×PD-L1／VEGF多重特異性抗体上のマスキングドメインは、それぞれの抗原、cMET、EGFR、及びPD-L1／VEGFに結合するFabアームの能力を阻害又は遮断することができる。マスキングドメインは、それぞれの抗原への結合において、遮蔽された多重特異性抗体の最大結合能力を低下させ得る。マスキングドメインはまた、それぞれの抗原への結合において、遮蔽された多重特異性抗体の結合親和性を低下させ得る。

【0240】

マスキングドメインがプロテアーゼによって切断されると、遮蔽された抗体は、その標的に結合する抗体の能力の回復を伴って、活性多重特異性抗体に変換される。遮蔽された多重特異性抗体からのマスキングドメインの除去は、組換え又は精製プロテアーゼを用いたインビトロプロテアーゼ切断アッセイによって実現することができる。遮蔽された多重特異性抗体からのマスキングドメインの除去はまた、疾患部位で過剰発現されたプロテアーゼによってインビボで実現することができる。マスキングドメインの除去は、SDS-PAGE、IEX、又はHIC分析によって、マスキングドメインを有する遮蔽された抗体の重鎖及び軽鎖の分子量を、マスキングドメインを有さない活性抗体と比較することによって評価することができる。

【0241】

インビトロ及び細胞ベースのアッセイは、遮蔽抗体、活性抗体、及びその抗原への結合におけるプロテアーゼ切断後の変換された抗体の決定における使用について、当該技術分野において十分に記載されている。例えば、抗体の結合は、組換え又は精製抗原を固定化し、固定化抗原で抗体を隔離し、結合した抗体の量を測定することによって、ELISAによって決定することができる。これはまた、結合相互作用の速度論的分析のためのBiacore（登録商標）機器を用いて実施することができる。細胞ベースの結合アッセイでは、抗体の結合は、フローサイトメトリーによって、抗体と細胞表面上に抗原を発現している細胞とをインキュベートし、細胞表面抗原に結合した抗体の量を測定することによって決定することができる。

【0242】

医薬組成物

いくつかの実施形態では、本開示による使用のための、本開示の抗体、例えば、遮蔽されたcMET×EGFR×PD-L1／VEGF多重特異性抗体は、ここでの方法における使用のために、組成物、特に医薬組成物に製剤化することができる。このような組成物は、適切な担体（例えば、薬学的に受容可能な薬剤）との混合物において、本開示において記載される治療的又は予防的に有効な量の多重特異性抗体を含む。典型的に、本開示において記載される多重特異性抗体は、医薬組成物における製剤化の前に動物への投与のために十分に精製される。

【0243】

薬学的に許容される薬剤には、担体、賦形剤、希釈剤、抗酸化剤、防腐剤、着色剤、着香剤及び希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、充填剤、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、等張化剤、共溶媒、湿潤剤、錯化剤、緩衝剤、抗菌剤、及び界面活性剤が含まれる。

【0244】

組成物は、液体形態又は凍結乾燥又は凍結乾燥形態であり得、1つ以上の凍結保護剤、賦形剤、界面活性剤、高分子量構造添加剤及び／又は増量剤を含み得る。

【0245】

組成物は、非経口投与に適切であり得る。

例示的な組成物は、関節内、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、病巣内、直腸内、経皮、経口、及び吸入経路などの、当業者が利用可能な任意の経路による動物への注射又は注入に適している。

【0246】

10

20

30

40

50

本明細書に記載の医薬組成物は、製品の局所濃度（例えば、ボーラス、デポー効果）、持続放出、及び／又は特定の局所環境における増大した安定性又は半減期を提供する様式で、制御又は持続送達のために製剤化することができる。

【0247】

利用方法

いくつかの実施形態では、本開示の抗体、例えば、本明細書に記載の遮蔽cMET×EGFR×PD-L1／VEGF多重特異性抗体は、胃、肺、脾臓、結腸直腸、及び／又は他のがんの治療に有用である。対応する治療抗体とは対照的に、遮蔽されたcMET×EGFR×PD-L1／VEGF多重特異性抗体は、疾患部位において過剰発現されたプロテアーゼによる遮蔽ドメインの除去によって、疾患部位において特異的に活性抗体への遮蔽された抗体の変換により、これらの疾患を治療する上で同等の有効性を有する可能性がある。しかしながら、遮蔽された抗体は、マスキングドメインを切断するのに必要な十分なプロテアーゼを欠く正常組織における遮蔽ドメインによる抗体活性のマスキングのために、低下した系統的毒性を有し得る。要するに、本明細書に記載の遮蔽された多重特異性抗体は、疾患の治療における対応する治療用抗体として有効であるが、安全性プロフィールがかなり改善されている可能性がある。改善された安全性プロフィールにより、遮蔽された多重特異性抗体を含む増加したレベルの投薬が、改善された処置効力で患者に投与され得る。

10

【0248】

一部の実施形態では、本開示は、対象におけるがんを治療する方法を提供し、この方法は、対象に、治療有効量の遮蔽cMET×EGFR×PD-L1／VEGF多重特異性抗体を投与することを含む。本開示はまた、がんを処置する方法における、本明細書において提供される遮蔽された多重特異性抗体の使用；及びがんにおいて使用するための薬剤の製造における、本明細書において提供される遮蔽されたcMET×EGFR×PD-L1／VEGF多重特異性抗体の使用を提供する。例示的ながんは、非小細胞肺癌、女性乳がん、膵がん、結腸直腸がん、及び腹膜がんを含むが、これらに限定されない。

20

【0249】

ここで説明される様々な要素の全ての組み合わせは、ここで特に指示されない限り、又は文脈によって明らかに矛盾しない限り、本開示の範囲内である。

【0250】

本開示は、以下の実験の詳細からよりよく理解される。しかしながら、当業者は、論じられた特定の方法及び結果が、本開示の単なる例示であることを容易に理解する。

30

【実施例】

【0251】

実施例1：抗EGFR抗体及び抗cMET抗体の発現及び精製

抗cMET抗体及び抗EGFR抗体を作製した。それらは、多重特異性抗体を評価するために使用された。抗EGFR、抗cMET、抗cMET×抗VEGF、及び抗EGFR×抗VEGF親mAbを発現する重鎖及び軽鎖構築物を調製した。これらの抗cMET、抗VEGF、及び抗EGFR抗体の重鎖及び軽鎖をコードしているプラスミドを、トランスフェクションキットの指示書（Thermo Scientific）に従ってExp i 293 F細胞に同時にトランスフェクトした。トランスフェクション後の5日目に細胞をスピンドウンし、上清を0.2 µmフィルターに通した。上清からの発現された抗体の精製は、プロテインAアガロースカラム（GE Healthcare Life Sciences）でのアフィニティークロマトグラフィーによって達成された。精製された抗体を透析によりDPBS、pH 7.2に緩衝液交換し、タンパク質濃度を280 nmでのUV吸収により決定した。ノブ・イン・ホール変異を有するヒトIgG1バックボーン中のcMet×EGFR×VEGF Abを、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株において発現させ、標準的なプロテインAアフィニティー捕捉し、続いて鉄交換クロマトグラフィーによって精製した。タンパク質はSECでは単量体であり、SDS-PAGEでは純粋であった。

40

50

【0252】

実施例2：遮蔽された抗EGFR及び抗cMET親抗体の発現及び精製

抗cMET及び抗EGFR抗体を用いて、遮蔽された多重特異性抗体を評価した。遮蔽された抗cMET及び抗EGFR親mAbを発現する重鎖及び軽鎖構築物を調製した。これらの遮蔽された抗cMET及び抗EGFR抗体の重鎖及び軽鎖をコードしているプラスミドを、トランスフェクションキットの指示書（Thermo Scientific）に従ってExp i 293 F細胞に同時にトランスフェクトした。トランスフェクション後の5日目に細胞をスピンドウンし、上清を0.2 µmフィルターに通した。上清からの発現された抗体の精製は、プロテインAアガロースカラム（GE Healthcare Life Sciences）でのアフィニティークロマトグラフィーによって達成された。精製抗体を透析によりDPBS、pH 7.2に緩衝液交換し、タンパク質濃度を280 nmでのUV吸収により決定した。

10

【0253】

実施例3：プロテイナーゼによるマスキングドメインを含む遮蔽抗体の消化

インビトロのプロテアーゼ切断アッセイは、遮蔽ドメインが、プロテアーゼによってマスクされたAbから除去され得るかどうかを評価するために設定される。MMP2については、組換えヒトMMP2を、製造業者（R&D Systems）の指示に従ってp-アミノ酢酸フェニル水銀（APMA）と共にインキュベートすることによって活性化する。10 mgのマスキされた抗体を50 ngの活性化MMP2と共に37℃で一晩インキュベートし、マスクされたモノクローナル抗体の消化を還元条件下でSDS-PAGEにより評価する。消化されたマスクされたAbの重鎖及び軽鎖の分子量は、対応する未消化のプロ抗体と比較してわずかに小さいことが観察される。プロテアーゼ処理により、キャップされていないmAbの分子量は、遮蔽されていない二重特異性Ab及び親の遮蔽されていないmAbのそれにより近い。

20

【0254】

実施例4：EGFRの結合とEGFR hit抗体によるEGFの遮断

図2Aに示すように、ELISAベースの結合アッセイを用いて、抗EGFR mAbによるEGFRへの結合を評価した。このアッセイでは、ヒトEGFRをプレート上にコーティングし、次にEGFR VHO mAbを加えた。洗浄後、HRP結合抗His二次抗体（BioLegend）によりEGFRの存在を検出した。結果は、抗EGFR VHO mAb（7D VH1～7D VH6）及び陽性対照としてのセツキシマブがEGFRに結合できることを示す。TAVO412E、抗cMET、抗EGFR、抗VEGF三重特異性抗体は、EC50値が0.059 nMのヒトEGFR、及びEC50値が0.109 nMのカニクイザルEGFRに結合することができる（図2B、2C）。図3Eに例示されるアッセイ形式を使用した、EGFリガンド-EGFR遮断アッセイの結果を図2Dに示す。使用した受容体はEGFRであり、使用したリガンドは1 mg/mLのEGFであった。同様に、これらの同じ分子は、EGFRへの結合からEGFを遮断することができる。TAVO412EはヒトEGFのEGFRへの結合をIC50値1.5 nMで遮断することができた。

30

【0255】

実施例5：cMETの結合及びcMETヒット抗体によるHGF結合の遮断

図3A、3B、及び3Cに示すように、ELISAベースの結合アッセイを用いて、抗cMET mAbのcMETへの結合を評価した。結果は、抗cMET mAbがcMETに結合したことを示した。TAVO412EはヒトcMETにEC50値0.234 nMで結合し、カニクイザルcMETにはEC50値0.59 nMで結合した。これらの抗cMET mAbはまた、図3F及び3Gに示されるように生成されたデータとともに、図3Eに示されるようなプロトコルを使用して、cMETへのHGF結合をブロックした。このアッセイでは、ヒトHGFをプレート上にコーティングし、次にcMET mAbを加えた。洗浄後、cMETの存在を、HRP結合抗His二次抗体（BioLegend）によって検出した。使用した受容体はcMETであり、使用したリガンドはHGF

40

50

であった。TAVO412EはヒトHGFのcMETへの結合をIC50値8.0nMで遮断することができた。

【0256】

実施例6：TAVO412EによるVEGFの結合及びVEGFの遮断

ELISAベースの結合アッセイを用いて、TAVO412EによるVEGFへの結合を評価した。このアッセイでは、ヒトVEGF165をプレート上にコーティングし、次にTAVO412E希釈物を加えた。非特異的結合を洗浄した後、結合したTAVO412Eの存在を、HRP結合抗Fc二次抗体(BioLegend)によって検出した。TAVO412EはヒトVEGF165とEC50値0.085nMで結合し(図4A)、カニクイザルVEGF165とEC50値0.346nMで結合した(図4B)。同様に、TAVO412EはVEGFのVEGFRへの結合をIC50値14.8nMで阻害することができた(図4C)。

10

【0257】

実施例7：三重特異性抗体TAVO412の設計

図5は、抗cMET×抗EGFR×抗VEGF多重特異性抗体についての構造設計を示す。図5に示す抗cMET×抗EGFR多重特異性抗体は、EGFR結合アームを黒色で、cMET結合アームを濃い灰色で、VEGF結合アームを薄い灰色で図に示す。図5Aは、EGFR結合アームが1つ又は2つのVHODメインの価数を有することができることを示す。cMET結合アームは、1つのFabドメインの結合価を有することができる。VEGF結合アームは、1~2ドメインの結合価を有することができる。EGFR VHOドメインは、Fc上のタンデムFc融合分子として、又はcMET重鎖上のC末端融合として、FcのN末端及びC末端融合と同じ重鎖上にあり得る。図5Bは、EGFR結合アームが1つ又は2つのVHODメインの価数を有することができることを示す。cMET結合アームは、Fcドメイン上に1つ又は2つのVHODメインの価数を有することができる。cMET VHOドメインは、FcのN末端融合として、Fc上のタンデム融合分子として、又はEGFR VHO重鎖融合分子上のN末端融合として、同じ重鎖上にあり得る。

20

【0258】

AVO412Eは、IgG1サブクラスのヒト化抗体であり、1つの重鎖と1つの軽鎖(カッパ)と、1つの鎖と2つのナノボディドメインが、カルボキシ末端単鎖Fvを有するIgG1 Fcに融合したものである。3つの鎖は複数のジスルフィド結合によって安定化されている。TAVO412Eは、各重鎖の定常領域が単一のN-結合型糖鎖部位を有する糖タンパク質である。ヘテロダイマーFcを作製するために、臨床的に検証されたノブ・イン・ホール技術をTAVO412に使用した。EGFR-VEGF結合アームはノブ変異T366Wを有するFcを有し、cMETアームはホール変異Y407V、L368A、T366Sを有するFcを有する。重鎖は、ノブ・イン・ホール変異を用いてヘテロダイマーFcを形成した。Fcエフェクター機能を増強するために、両方の重鎖は、以下の臨床的に確認された変異を有する：F243L、R292P、Y300L、V305I、P396L。TAVO412は、図5Aの囲みで示すように、タンデム抗EGFR VHOドメイン、抗cMET Fab、及び抗VEGF scFvドメインを有するEGFRアームを有する。抗VEGF scFvを最適化するために使用したリンカーは、より良好な活性及び安定性のために選択した。抗EGFRアームと抗VEGFアームを連結するためのG4Sリンカーの数を、より良好な安定性と開発可能性のために最適化した。

30

40

【0259】

実施例8：Fcγ受容体及びC1qへのTAVO412Eの結合

TAVO412Eは、以下のFc操作F243L、R292P、Y300L、V305I、P396Lを含むことにより、強化されたADCCを有するように設計された。抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)、抗体依存性細胞食作用(ADCP)、補体依存性細胞傷害(CDC)を含む抗体のFc介在性エフェクター機能は、ほとんどの臨床的に承認された抗がん抗体の治療効果に極めて重要であることが示されている。これらのエフェク

50

ター機能の大部分は、抗体の定常（Fc）領域を介して誘導され、抗体は補体タンパク質や特殊なFc受容体と相互作用することができる。TAVO412EのCD16A、CD32A、CD64、及びC1qへの結合において、このような活性を示す代替アッセイを示すことができる。組換えCD16A、CD32A、CD64及び精製ヒトC1qに対するTAVO412の結合活性をELISA（TAVO412-009）を用いて評価した。TAVO412は、Fcエフェクター機能を増強する突然変異を有する。かなりの程度までTAVO412の抗腫瘍効果は、補体成分1q（C1q）、Fcγ受容体IIIIa（FcγRIIIa又はCD16A）、及び／又はFcγ受容体I（FcγRI又はCD64）への結合によるFcエフェクター機能に依存する。ヒトCD16a、CD32a、又はCD64への結合を測定するために、ビオチン化組換えタンパク質をストレプトアビジンでプレコートしたプレートに加えた。試験抗体を連続希釈し、プレートに加えた。1時間のインキュベーション後、HRP結合ヤギ抗ヒトFc抗体を加えることにより結合を検出した。発色反応の結果を450nmで測定した。C1qへの結合のために、ELISAプレートを連続希釈した試験抗体でコーティングし、次にヒトC1qを加えた。ヒツジ抗ヒトC1q-HRP標識抗体を用いて結合を検出し、呈色反応を行った。CD16a、CD32a、C1q、およびCD64の結合曲線を図6に示す。TAVO412Eは、CD16a（EC50値0.46nM）（図6A）、CD32a（EC50値2.91nM）（図6B）、CD64（EC50値0.16nM）（図6C）、C1q（EC50値0.16nM）（図6D）で結合した。全体として、TAVO412EはヒトIgG1アイソタイプよりもCD16a、CD32A及びC1qへの結合が良好であった。

10

20

【0260】

実施例9：H292細胞におけるEGFRへのEGFの結合阻害

図7Aは、H292細胞のリガンド遮断を特徴付けるために使用されたFACSベースのアッセイのアッセイ形式を示す。抗cMET×抗EGFR多重特異性抗体を加えて、0.2mg/mLのEGFと競合させて細胞への結合を競合させた。EGFはAF488nm標識ウサギ抗-EGF抗体を用いて検出した。図7Bは、gMFIを測定して、競合mAbの存在下におけるEGF結合のレベルを決定したことを示す。このアッセイにおいて、競合cMET抗体は、H292細胞株へのEGF結合をブロックしなかった。EGFR抗体は、EGFRへのEGF結合を遮断することができた。図8は、HCC827細胞におけるEGFRへのEGF結合の阻害を示す。図8Aは、HCC827細胞のリガンド遮断を特徴付けるために使用されたFACSベースのアッセイのアッセイ形式を示す。抗cMET×抗EGFR多重特異性抗体を加えて、細胞への結合から1mg/mL EGFと競合させた。EGFはAF488nm標識ウサギ抗-EGF抗体を用いて検出した。図8Bは、gMFIを測定して、競合mAbの存在下におけるEGF結合のレベルを決定したことを示す。このアッセイにおいて、競合cMET抗体は、HCC827細胞株へのEGF結合をブロックしなかった。EGFR抗体は、HCC827細胞株上のEGFRへの結合からEGFを遮断した。このEGFR-EGF阻害実験において、EGFR×cMetヒットに対するng/mL単位のEC50値は、7D VH6×TV4~0.63nM；7D VH6×EV1~0.63nM；7D VH4×TV4~0.93nM；7D VH4×EV1~0.81nM；セツキシマブ×gp120~0.60nM；セツキシマブ~0.33nM；7D VH4-Fc~0.18nM；及び7D VH6-Fc~0.23nMであった。

30

40

【0261】

実施例10：ウエスタンブロット法を用いたH1975細胞におけるEGFRリン酸化の阻害

図9に示すように、cMET×EGFR BsAbはウエスタンブロットを用いてNCI-H1975細胞におけるEGFRリン酸化を阻害することができる。H1975細胞を 2×10^5 細胞/ウェルで12ウェルプレートに播種した。NCI-H1975細胞はL858R T790M EGFR及びcMET WT遺伝子型を有する。非FBS培地中、37℃で18時間飢餓させた後、33.3nM抗体を1時間添加し、次に500ng

50

／mLのEGFリガンド処理を30分間行った。細胞を収集し、ホスファターゼ及びプロテアーゼ阻害剤を供給した細胞抽出緩衝液により溶解した。図9Aにおいて、上のパネルは、(1)培地のみ；(2)EGFのみ；(3)7D VH4-Fc；(4)gp120；(5)7D VH6-Fc；(6)EV1（配列番号22及び配列番号24）；(7)TV4；(8)7D VH4×EV1；(9)7D VH4×TV4；(10)7D VH4×EV1；(11)7D VH6×TV4；(12)セツキシマブ×gp120に対応するウエスタンブロットレーンを有する。積分値は、各レーンのbアクチンレベルに対して正規化した。4種類の候補BsAbはいずれもEGFRのリン酸化を阻害することができ、1種類の武装化セツキシマブ×gp120で同様の阻害作用を示した。図9Bにおいて、上のパネルは、(1)培地のみ；(2)EGFのみ；(3)7D VH4×EV1；(4)7D VH4×TV1；(5)7D VH6×EV1；(6)7D VH6×TV4；(7)セツキシマブ×gp120；(8)gp120；(9)7D VH4×gp120；(10)7D VH6×gp120に対応するウエスタンブロットレーンを有する。積分値は、各レーンのbアクチンレベルに対して正規化した。我々の4種類の候補BsAbはいずれもEGFRのリン酸化を阻害することが可能であり、1種類の武装化セツキシマブ×gp120で同様の阻害作用を示した。

10

20

30

【0262】

図9Cにおいて、H292及びHCC827細胞を、ウェル当たり 2×10^5 細胞の濃度で12ウェルプレートに播種した。HCC827細胞は、EGFR及びWT cMETにおいて欠失E746及びA750を有する。H292細胞はWT EGFR及びWT cMETを有する。非FBS培地で飢餓させ、37℃で18時間インキュベートした後、33.3nM抗体を加え、1時間インキュベートし、次に500ng/mLのEGFリガンド処理を30分間行った。細胞を収集し、ホスファターゼ及びプロテアーゼインヒビターを含む細胞抽出緩衝液により溶解した。図9Cにおいて、ウエスタンブロットレーンを有するH292細胞についての結果は、(1)培地のみ、(2)EGFのみ、(3)7D VH4×EV1、(4)7D VH4×TV1、(5)7D VH6×EV1、(6)7D VH6×TV4、(7)セツキシマブ×gp120、(8)gp120、(9)7D VH4×gp120、(10)7D VH6×gp120に対応する。図9Dにおいて、ウエスタンブロットレーンを有するHCC827細胞についての結果は、(1)培地のみ、(2)EGFのみ、(3)7D VH4×EV1、(4)7D VH4×TV1、(5)7D VH6×EV1、(6)7D VH6×TV4、(7)セツキシマブ×gp120、(8)gp120、(9)7D VH4×gp120、(10)7D VH6×gp120に対応する。積分値は、各レーンのbアクチンレベルに対して正規化した。4種類の候補BsAbの全てがEGFRリン酸化を阻害でき、H292細胞において1種類の武装化セツキシマブ×gp120で同様の阻害作用を示したが、HCC827細胞では阻害しなかった。

【0263】

実施例11：非小細胞肺癌細胞株HCC827におけるTAVO412Eの有用性の実証

図10は、TAVO412E細胞結合、HCC827細胞上のEGFRへの結合からのEGFの遮断、及びHCC827細胞上のcMETへの結合からのHGFの遮断を実証した。細胞結合実験では、HCC827細胞を96ウェルプレートに50,000細胞／ウェルで播種した。抗体の連続希釈液を加え、暗所にて4℃で1時間インキュベーションした。洗浄後、Alexa Fluor 647 Fcγ断片特異的ヤギ抗ヒトIgGを、Beckmanフローサイトメーターでの638nmの励起及び660nmの発光での検出のために使用した。HCC827細胞実験におけるEGFRへの結合からのEGFの遮断において、細胞を回収し、96ウェルプレートに50,000細胞／ウェルで播種した。抗体の連続希釈液を加え、暗所にて4℃で1時間インキュベーションした。洗浄後、細胞を暗所、4℃で1時間、EGFとインキュベーションした。ウサギポリクローナル抗ヒトEGF及びAlexa Fluor 488抗ウサギIgG1を、Beckmanフロ

40

50

ーサイトメーターでの488nmの励起及び525nmの発光での検出に使用した。HCC827実験におけるHGFのcMETへの結合の遮断において、細胞を回収し、96ウェルプレートに50,000細胞／ウェルで播種した。連続抗体希釈液を加え、暗所にて4℃で0.5時間インキュベーションした。0.7μg/mLのビオチン化HGFを添加し、洗浄後4℃の暗所で0.5時間インキュベートした。ストレプトアビジン-AF488を使用して、Beckmanフローサイトメーターで488nmの励起及び525nmの発光でビオチン化HGFを検出した。図10A～Cにおいて、y軸はHCC827細胞に対する結合レベルを反映するgMFIを表し、x軸は試験試薬の濃度を表した。図10Aは、TAVO412EがHCC827細胞への結合について1.04nMのIC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbはHCC827細胞に結合しなかった。図10Bは、TAVO412Eが、HCC827細胞上のEGFRへのEGFの結合をブロックすることについて、2.56nMのIC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbは、HCC827細胞上のEGFRへのEGF結合を遮断しなかった。図10Cは、TAVO412Eが、HCC827細胞上のcMETへのHGFの結合をブロックすることについて、0.28nMのIC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbは、HCC827細胞上のcMETへのHGF結合を遮断しなかった。

10

【0264】

実施例12：H292及びHCC827細胞におけるEGFR及びcMETのリン酸化のTAVO412E阻害

このアッセイでは、H292又はHCC827細胞のいずれかを96ウェルプレートに40,000細胞／ウェルの密度で播種し、一晚インキュベーションした。細胞を無血清培地で24時間飢餓させた。連続抗体希釈物をプレートに加え、37℃で1時間インキュベートし、次に、リガンド（HGF又はHGF+EGF）を加え、37℃で15分間インキュベーションした。細胞をリンインヒビターを含む溶解緩衝液で溶解し、細胞溶解物を384ウェルプレートに移し、HTRF抗体とともにRTで4時間インキュベーションした。プレートはDecan Sparkプレートリーダー上で320/615、320/665で読み取った。リン酸化比パーセンテージ（%）を、各薬物／濃度について決定し、そして用量応答曲線を作成した。図11A～Dにおいて、y軸は対照mAbで示されたEGFRリン酸化パーセントの値として示され、x軸は試験物質の濃度である。図11Aは、TAVO412Eが、0.79nMのIC50値で、EGFの存在下、H292細胞においてEGFRリン酸化を阻害したことを示す。アイソタイプmAbはEGFRリン酸化を阻害しなかった。図11Bは、TAVO412Eが、EGF及びHGFの存在下、H292細胞において、IC50値0.78nMでEGFRリン酸化を阻害したことを示す。アイソタイプmAbはEGFRリン酸化を阻害しなかった。図11Cは、TAVO412EがHGF存在下でHCC827細胞においてcMETリン酸化を1.41nMのIC50値で阻害したことを示す。アイソタイプmAbはcMETリン酸化を阻害しなかった。図11Dは、TAVO412Eが、1.99nMのIC50値で、HGF及びEGFの存在下、HCC827細胞においてcMETリン酸化を阻害したことを示す。アイソタイプmAbはcMETリン酸化を阻害しなかった。

20

30

【0265】

実施例13：HCC827細胞の増殖のTAVO412E阻害

HCC827細胞を96ウェルプレートに10,000細胞／ウェルで播種し、一晚インキュベーションした。次に、細胞を無血清培地で飢餓させ、続いて24時間培養した。翌日、連続抗体希釈物をプレートに加えた。3日間のインキュベーション後、Tecan Sparkマイクロプレートリーダーを用いて560nm及び590nmで細胞生存率検出のためにPrestoBlue試薬を加えた。生存率は、（試験抗体の蛍光培地対照の蛍光）／（未処理細胞対照の蛍光－培地対照の蛍光）として計算した。図12Aは、TAVO412Eが1.76nMのIC50値でHCC827細胞の増殖を阻害したことを示す。アイソタイプmAbはHCC827細胞の増殖を阻害しなかった。図12Bは、TAVO412Eが、EGF及びHGFの存在下においてHCC827細胞の増殖を1.39

40

50

nMのIC50値で阻害したことを示す。アイソタイプmAbはHCC827細胞の増殖を阻害しなかった。

【0266】

実施例14：ウエスタンブロットを用いたH1975、HCC827、H292細胞におけるcMETリン酸化のインビトロ阻害

図13では、細胞を 2×10^5 細胞／ウェルで12ウェルプレートに播種した。非FBS培地で18時間、37℃で飢餓させた後、細胞を33.3nM抗体で1時間インキュベートし、次に500ng/mLのHGFリガンド処理で30分間処理した。細胞を収集し、ホスファターゼ及びプロテアーゼ阻害剤を供給した細胞抽出緩衝液により溶解した。図13AはHCE-H1975の結果を示し、図13BはHCC827の結果を示し、図13CはH292細胞の結果を示す。ウエスタンブロットのレーンは、(1)培地のみ、(2)HGFのみ、(3)7D VH4×EV1、(4)7D VH4×TV1、(5)7D VH6×EV1、(6)7D VH6×TV4、(7)セツキシマブ×gp120、(8)gp120、(9)7D VH4×gp120、(10)7D VH6×gp120に相当した。4つのBsAbは、HCC827、H292、及びNCI-H1975細胞において、それらの単味親Abよりも有意な阻害効果を示した。

【0267】

実施例15：HCC827細胞に対するTAVO412EのインビトロFcエフェクター機能

図14A及び14Bに示すようなレポーター分析のために、標的細胞（1ウェル当たり 2×10^4 細胞）及びJurkat-CD16A-V158又はJurkat-CD32A-H131レポーター細胞（1ウェル当たり 2×10^5 細胞）を回収し、96ウェルプレートにおいて10：1のE：T比率で共培養した。段階希釈した試験抗体をプレートに分注し、37℃で6時間培養した。インキュベーション後、細胞上清を白壁プレートに移し、Bio-Lite試薬を各ウェルに加えた。発光はDecan Spark（登録商標）を用いて測定した。図14Cに示すように、HCC827細胞中のADCC活性を測定するために、標的細胞を丸底96ウェルプレートに 1×10^4 細胞／ウェルで播種し、試験抗体の連続希釈と共にまず37℃で15分間培養し、次に凍結PBM Cを回収し、E：T比率50：1でプレートに加えた。プレートを遠心分離してエフェクターと標的細胞との接触を確実にし、37℃で4時間インキュベーションした。遠心分離後、細胞上清を新しい平底プレートに移した。LDHキットを用いて細胞溶解を試験した。Decan Spark（登録商標）を用いて492nm及び650nmで吸光度を読み取った。ADCC%は（実験的放出－自然放出）／（最大放出－自然放出）として計算した。図14Dに示すように、NSCLCがん細胞株におけるADCP－マクロファージ死滅活性を測定するために、単球をPBM Cから単離し、25ng/mLのMCSF及び50ng/mLのIFN γ のサイトカインで誘導してマクロファージに分化させた。標的細胞を回収し、CSFEで染色した。分化したマクロファージ（ 1×10^5 細胞／ウェル）と標識した標的細胞（ 5×10^4 細胞／ウェル）をE：T=2：1で96穴プレートで共培養した。24時間のインキュベーション後、細胞を回収し、Alexa647標識CD14及びCD11b抗体で30分間染色した。洗浄後、細胞をベックマンフローサイトメトリーで638nm及び660nmで測定した。死滅パーセントは、（（各抗体についての[最低mAb]の平均%FITC+AF647）－%FITC+AF647－試料）／（各抗体についての[最低mAb]の平均%FITC+AF647）のような式を用いて決定した。図14Eに示すCDC実験のために、細胞を回収し、96ウェルプレートに、基本培地中に最適化された細胞密度で播種した。細胞を、一連の抗体希釈液を加えてインキュベートし、RTで1時間インキュベーションした。ウサギ血清をプレートに分注し、37℃で1時間培養した。インキュベーション後、細胞上清を新しいプレートに移し、LDHキットを用いて細胞溶解を検出した。吸光度値をDecan Spark（登録商標）で492nm及び650nmで読み取った。試料の吸光度値を対照の吸光度値で割ることにより、溶解%を計算した。用量反応曲線はGraphPad Prism 9.3.1により作成

10

20

30

40

50

した。図14Aは、TAVO412EがHCC827細胞に対してADCCレポーター活性を有し、IC50値が0.2 nMであったことを示す。アイソタイプmAbはHCC827細胞のADCPレポーター活性を持たなかった。図14Bは、TAVO412EがHCC827細胞に対して約1 nMのIC50値でADCPレポーター活性を有したことを示す。アイソタイプmAbはHCC827細胞のADCPレポーター活性を持たなかった。図14Cは、TAVO412Eが0.12 nMのIC50値でHCC827細胞に対してADCC死滅活性を有したことを示す。アイソタイプmAbはHCC827細胞のADCPレポーター活性を持たなかった。図14Dは、0.16 nMのIC50値で、TAVO412EがHCC827細胞に対して誘導したADCP死滅活性を示す。アイソタイプmAbはHCC827細胞のADCPレポーター活性を持たなかった。図14Eは、TAVO412Eが3.76 nMのIC50値でHCC827細胞に対してCDC死滅活性を有したことを示す。アイソタイプmAbはHCC827細胞のADCPレポーター活性を持たなかった。

10

【0268】

実施例16：非小細胞肺がん細胞株H1975に対するTAVO412Eのインビボ抗腫瘍活性

異種移植モデル実験では以下のガイドラインを用いた。動物の世話及び使用を含むすべてのプロトコル及び修正又は手順は、研究を行う前に、GenePharma Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)によって検討され、承認された。腫瘍細胞を雌Balb/cヌードマウスに皮下移植し、平均腫瘍体積が100~200 mm³に達したときに処置を開始した。試験抗体は週2回の投与法で腹腔内に注射した。腫瘍増殖及び体重をエンドポイントまで週2回測定し、腫瘍体積を縦×横2×0.5として決定した。腫瘍増殖抑制(TGI)は $TGI\% = 1 - T/C$ として算出した。ここで、T及びCはそれぞれ最終日の投与群及び対照群の平均腫瘍体積であった。

20

【0269】

インビボでの受容体分解実験には以下のプロトコルを用いた。確立された腫瘍を有するマウスを、2用量の溶媒対照で処置した。2 nd投与の24時間後、腫瘍を採取し、液化窒素中で瞬間凍結した。腫瘍を、ホモジナイザーを用いて、プロテアーゼ及びフォスファターゼインヒビターカクテルを含む氷冷RIPA緩衝液中で溶解した。溶解物を遠心分離によって清澄化し、タンパク質濃度をBCAタンパク質アッセイによって決定した。タンパク質試料をSDS-PAGEによって分離し、PVDF膜に移した。膜を5%BSA遮断緩衝液中、室温で1時間遮断し、適切な一次抗体と共に4℃で一晩インキュベーションした。ECL検出は、膜及びECL試薬をインキュベートすることによって行った。e-BLOT WB IMAGERを用いて画像を取得した。ウエスタンブロット画像をimage Jソフトウェアで分析した。ローディング対照に対する平均総タンパク質(GAPDH)をグラフ化し、GraphPad Prismバージョン9.3.1を用いて統計解析を行った。

30

【0270】

図15Aは、1 mg/kgで42%の13日目、3 mg/kgで76%、10 mg/kgで94%のH1975腫瘍成長阻害を示す。TAVO412Eは、H1975細胞において用量依存性の腫瘍増殖阻害を有した。図15Bは、TAVO412Eが、EGFRリン酸化の減少と同様に、インビボH1975異種移植モデルにおいて、腫瘍においてEGFRの分解を誘導することを示す。図15Cは、TAVO412Eが、インビボH1975異種移植片モデルにおいて腫瘍においてcMETの分解を誘導し、ならびにcMETリン酸化の減少を誘導したことを示す。図15Dは、図15B及びCにおける対照アイソタイプmAb及びTAVO412Eについての結果の棒グラフ表現を示す。TAVO412Eは、インビボH1975異種移植モデル実験において、cMET及びEGFRの総及びリン酸化形態のレベルを減少させた。

40

【0271】

50

実施例 17：非小細胞肺がん細胞株 HCC827 に対する TAVO412E のインビボ抗腫瘍活性

異種移植及び受容体分解プロトコールは、実施例 16 に概説される。図 16A は、13 日目の 1 mg/kg で 45%、 3 mg/kg で 79%、及び 10 mg/kg で 94% の HCC827 腫瘍増殖阻害を示す。TAVO412E は HCC827 細胞において用量依存的な腫瘍増殖抑制を示した。図 16B は、TAVO412E が、インビボ HCC827 異種移植モデル実験において、腫瘍において EGFR 及び cMET の分解を誘導することを示す。図 16C は、図 16B の対照イソタイプ mAb 及び TAVO412E についての結果の棒グラフ表示を示す。TAVO412E は、インビボ HCC827 異種移植モデル実験において、cMET 及び EGFR の全形態のレベルを低下させた。

10

【0272】

実施例 18：トリプルネガティブ乳がん細胞株 MDA-MB-468 に対する TAVO412E のインビトロ抗腫瘍活性

図 17A は、TAVO412E の MDA-MB-468 への結合を示し、結合についての EC50 値は 1.11 nM であった。TAVO412E は、H1975 細胞において用量依存性の腫瘍増殖阻害を有した。図 17B は、TAVO412E が、ヒト EGFR の存在下、MDA-MB-468 細胞においてヒト EGFR リン酸化を阻害したことを示し、IC50 値は 9.08 nM であった。アイソタイプ mAb は、ヒト EGFR リン酸化を阻害しなかった。図 17C は、TAVO412E が、ヒト EGFR 及びヒト HGF の存在下、MDA-MB-468 細胞においてヒト EGFR リン酸化を阻害したことを示し、IC50 値は 8.50 nM であった。アイソタイプ mAb は EGFR リン酸化を阻害しなかった。

20

【0273】

実施例 19：トリプルネガティブ乳がん細胞株 MDA-MB-231 に対する TAVO412E のインビトロ抗腫瘍活性

ADCC 実験のために、凍結 PBMC を回収し、一晚培養した。翌日、標的細胞を丸底 96 ウェルプレートに播種し、試験抗体の連続希釈液と共にまず 37°C で 15 分間培養し、次に PBMC を 50:1 の E:T 比で加えた。プレートを遠心分離してエフェクターと標的細胞との接触を確実にし、 37°C で 4 時間インキュベーションした。遠心分離後、細胞上清を新しい平底プレートに移した。LDH キットを用いて細胞溶解を試験した。Decan Spark (登録商標) を用いて 492 nm 及び 650 nm で吸光度を読み取った。ADCC% は (実験的放出 - 自然放出) / (最大放出 - 自然放出) として計算した。ADCP 実験では、単球を PBMC から単離し、MCSF と IFN γ のサイトカインで処理してマクロファージに分化させた。標的細胞を回収し、CSFE で染色した。分化したマクロファージ及び標識した標的細胞を 2:1 の E:T 比で共培養し、試験抗体の連続希釈液を加え、インキュベーションした。24 時間のインキュベーション後、細胞を回収し、Alexa647 標識した CD14 及び CD11b 抗体で 30 分間染色した。洗浄後、細胞を Beckman フローサイトメトリーで 638 nm 及び 660 nm で測定した。死滅パーセントは、(各抗体についての [最低 mAb] の平均 % FITC + AF647) - % FITC + AF647 - 試料 / (各抗体についての [最低 mAb] の平均 % FITC + AF647) のような式を用いて決定した。次に、3 つの独立した測定結果を収集し、グラフ化し、GraphPad Prism 9.3.1 で処理した。CDC 実験のために、細胞を回収し、96 ウェルプレートに、基本培地中に最適化された細胞密度で播種した。連続抗体希釈液を加え、RT で 1 時間インキュベーションした。ウサギ血清をプレートに分注し、 37°C で 1~4 時間培養した。インキュベーション後、細胞上清を新しいプレートに移し、LDH キットを用いて細胞溶解を試験した。吸光度値を Decan Spark (登録商標) で 492 nm 及び 650 nm で読み取った。試料の吸光度値を対照の吸光度値で割ることにより、溶解%を計算した。用量反応曲線は GraphPad Prism 9.3.1 により作成した。

30

40

【0274】

図 18A は、 0.37 nM の結合についての EC50 値で MDA-MB-231 に結合

50

したTAVO412Eを示す。図18Bは、TAVO412Eが0.087nMのEC50値でMDA-MB-231細胞に対してADCPレポーター活性を有したことを示す。アイソタイプmAbは、ADCPレポーターアッセイ応答を有さなかった。図18Cは、TAVO412Eが0.156nMのEC50値でMDA-MB-231細胞のADCP死滅を有したことを示す。アイソタイプmAbは、ADCP死滅応答を有さなかった。図18Dは、TAVO412Eが0.18nMのEC50値でMDA-MB-231細胞に対してADCCレポーター活性を有したことを示す。アイソタイプmAbは、ADCPレポーターアッセイ応答を有さなかった。図18Eは、TAVO412Eが0.13nMのEC50値でMDA-MB-231細胞のADCC死滅を有したことを示す。アイソタイプmAbは、ADCC死滅応答を有さなかった。図18Fは、TAVO412Eが1.22nMのEC50値でMDA-MB-231細胞のCDC死滅を有したことを示す。アイソタイプmAbは、CDC死滅応答を有さなかった。

10

【0275】

実施例20：トリプルネガティブ乳がん細胞株MDA-MB-231に対するTAVO412Eのインビボ抗腫瘍活性

異種移植及び受容体分解プロトコールは、実施例16に概説される。図19Aは、20日目で10mg/kg投与での62%のMDA-MB-231腫瘍増殖阻害を示す。図19Bは、TAVO412Eが、インビボMDA-MB-231異種移植片モデル実験において、腫瘍においてEGFR及びcMETの分解を誘導することを示す。図19Cは、図19Bにおける対照アイソタイプmAb及びTAVO412Eについての結果の棒グラフ表現を示す。TAVO412Eは、インビボMDA-MB-231異種移植モデル実験において、cMET及びEGFRの全形態のレベルを減少させた。

20

【0276】

実施例21：細胞結合、HGFのMKN45細胞上のcMETへの結合の遮断、及びSNU-5細胞の増殖阻害によって示される胃がん細胞株SNU-5及びMKN-45におけるインビトロTAVO412Eの有用性

MKN45実験におけるHGF遮断のために、細胞を回収し、50,000細胞/ウェルで96ウェルプレートに播種した。HGFの連続希釈及び0.1mg/mLの試験抗体を順次添加し、暗所にて4℃で1時間インキュベーションした。洗浄後、Alexa Fluor 488抗ウサギIgG1を使用して、励起488nm及び発光525nmにてBeckmanフローサイトメーターで試験抗体を検出した。増殖阻害試験では、飢餓のない3k SNU-5細胞/ウェルを96ウェルプレートに入れた。細胞を試験品で6日間処理し、細胞増殖/生存についてアラマブルーを用いて測定した。図20Aは、TAVO412EがMKN45細胞への結合について1.78nMのEC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbはMKN45細胞に結合しなかった。図20Bは、TAVO412Eが、MKN45細胞上のcMETへのHGFの結合をブロックすることについて、0.28nMのIC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbは、MKN45細胞上のcMETへのHGF結合を遮断しなかった。図20Cは、TAVO412EがSNU-5細胞への結合について1.99nMのEC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbはSNU-5細胞に結合した。図20Dは、TAVO412Eが、2.66nMのSNU-5細胞の増殖の阻害についてのIC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbはSNU-5細胞の増殖を阻害しなかった。

30

40

【0277】

実施例22：胃がん細胞株SNU-5に対するTAVO412Eのインビトロ抗腫瘍活性

実験プロトコールは図18で説明した。図21Aは、TAVO412Eが0.18nMのEC50値でSNU-5細胞に対してADCCレポーター活性を有したことを示す。アイソタイプmAbは、ADCCレポーターアッセイ応答を有さなかった。図21Bは、TAVO412Eが0.20nMのEC50値でSNU-5細胞に対してADCPレポーター活性を有したことを示す。アイソタイプmAbは、ADCPレポーターアッセイ応答を有さなかった。図21Cは、TAVO412Eが1.19nMのEC50値でSNU-5

50

細胞のCDC死滅を有したことを示す。アイソタイプmAbは、CDC死滅応答を有さなかった。

【0278】

実施例23：胃がん細胞株MKN45に対するTAVO412Eのインビボ抗腫瘍活性

異種移植及び受容体分解プロトコールは、実施例16に概説される。図22Aは、21日目に3mg/kgの用量で70%のMKN-45腫瘍成長阻害を示す。図22Bは、TAVO412Eが、インビボMKN45異種移植モデル実験において、腫瘍においてEGFR及びcMETの分解を誘導したことを示す。図22Cは、図22Bにおける対照アイソタイプmAb及びTAVO412Eについての結果の棒グラフ表現を示す。TAVO412Eは、インビボMKN45異種移植モデル実験から切除した腫瘍において、cMET及びEGFRの全形態のレベルを低下させた。

10

【0279】

実施例24：細胞結合、ADCCレポーターアッセイ、及びADCPレポーターアッセイにより示される膵管腺がん細胞株BxPC-3におけるインビトロTAVO412Eの有用性

図23Aは、TAVO412EがBxPC-3細胞への結合について0.90nMのEC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbはBxPC-3細胞に結合しなかった。図23Bは、TAVO412Eが、BxPC-3細胞に対するADCCレポーターアッセイについて、0.20nMのEC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbは、BxPC-3細胞に対してADCCレポーターアッセイ活性化を有さなかった。図23Cは、TAVO412Eが、BxPC-3細胞に対するADCPレポーターアッセイについて、0.65nMのEC50値を有したことを示す。アイソタイプmAbは、BxPC-3細胞に対してADCPレポーターアッセイ活性化を示さなかった。

20

【0280】

実施例25：BxPC-3細胞におけるEGFR及びcMETのリン酸化のインビトロ阻害

この実験は、図11について記載されたものと同様に行われた。図24A～Dにおいて、y軸は対照mAbで示された受容体リン酸化パーセントの値として示され、x軸は試験物質の濃度であった。図24Aは、TAVO412Eが、組換えヒトEGFの存在下、BxPC-3細胞において、3.45nMのIC50値でEGFRリン酸化を阻害したことを示す。アイソタイプmAbはEGFRリン酸化を阻害しなかった。図24Bは、TAVO412Eが、組換えヒトHGFの存在下、BxPC-3細胞においてcMETリン酸化を1.18nMのIC50値で阻害したことを示す。アイソタイプmAbはcMETリン酸化を阻害しなかった。図24Cは、TAVO412Eが、組換えヒトEGF及び組換えヒトHGFの存在下、BxPC-3細胞において、IC50値1.13nMでEGFRリン酸化を阻害したことを示す。アイソタイプmAbはEGFRリン酸化を阻害しなかった。図24Dは、TAVO412Eが、組換えヒトEGF及び組換えヒトHGFの存在下、BxPC-3細胞においてcMETリン酸化を阻害することを、0.44nMのIC50値で示す。アイソタイプmAbはcMETリン酸化を阻害しなかった。

30

【0281】

実施例26：膵管腺がん細胞株BxPC-3に対するTAVO412Eのインビトロ抗腫瘍活性

異種移植及び受容体分解プロトコールは、実施例16に概説される。図25Aは、TAVO412E処理の結果、34日目の10mg/kg投与で80%のBxPC-3腫瘍増殖阻害を示す。図25Bは、TAVO412Eが、インビボBxPC-3異種移植モデル実験において、腫瘍においてEGFR及びcMETの分解を誘導したことを示す。図25Cは、図25Bの対照アイソタイプmAb及びTAVO412Eについての結果の棒グラフ表現を示す。TAVO412Eは、インビボBxPC-3異種移植モデル実験から切除した腫瘍において、cMET及びEGFRの全形態のレベルを低下させた。

40

【0282】

50

実施例 27：インビトロでの肝がん細胞株 HCC9810、インビボでのトリプルネガティブ乳がん細胞株 HCC70、及びインビボでの頭頸部がん細胞株 FaDu に対する TAVO412E の抗腫瘍活性

異種移植及び受容体分解プロトコールは、実施例 16 に概説される。図 26A は、TAVO412E が 0.098 nM の EC50 値で HCC9810 細胞株に対して ADCC 活性を有したことを示す。図 26B は、TAVO412E 処理の結果、10 mg/kg 投与で 21 日目に 26% の HCC-70 腫瘍増殖阻害がもたらされたことを示す。図 26C は、TAVO412E 処置が、21 日目に 10 mg/kg の投薬で 95% の FaDu 腫瘍増殖阻害をもたらしたことを示す。

【0283】

実施例 28：細胞結合、ADCC レポーターアッセイ、及び ADCC 殺菌アッセイにより示される頭部及び首の食道中へん平上皮がん細胞株 KYSE-150 におけるインビトロ抗がん活性

図 27A は、TAVO412E が、0.39 nM の KYSE-150 細胞への結合についての EC50 値を有したことを示す。アイソタイプ mAb は KYSE-150 細胞に結合しなかった。図 27B は、TAVO412E が、KYSE-150 細胞に対する ADCC レポーターアッセイについて 0.15 nM の EC50 値を有したことを示す。アイソタイプ mAb は、KYSE-150 細胞に対して ADCC レポーターアッセイ活性化を示さなかった。図 27C は、TAVO412E が、0.038 nM の KYSE-150 細胞に対する ADCC 死滅アッセイについての EC50 値を有したことを示す。アイソタイプ mAb は、KYSE-150 細胞に対して ADCC 死滅応答を有さなかった。

【0284】

実施例 29：細胞結合、ADCC レポーターアッセイ、及び ADCC 死滅アッセイによって示されるように、中皮腫がん細胞株 NCI-H226 における TAVO412E の抗腫瘍インビトロ活性

図 28A は、TAVO412E が NCI-H226 細胞への結合について 0.78 nM の EC50 値を有したことを示す。アイソタイプ mAb は NCI-H226 細胞に結合しなかった。図 28B は、TAVO412E が NCI-H226 細胞に対する ADCC レポーターアッセイについて 0.17 nM の EC50 値を有したことを示す。アイソタイプ mAb は、NCI-H226 細胞に対して ADCC レポーターアッセイ活性化を有さなかった。図 28C は、TAVO412E が、NCI-H226 細胞に対する ADCC 死滅アッセイについて 0.025 nM の EC50 値を有したことを示す。アイソタイプ mAb は NCI-H226 細胞に対して ADCC 死滅応答を示さなかった。

【0285】

実施例 30：細胞結合、ADCC レポーターアッセイ、及び ADCC 死滅アッセイにより示される大腸がん細胞株 HT-29 における TAVO412E のインビトロ抗腫瘍活性

図 29A は、TAVO412E が HT-29 細胞への結合について 0.23 nM の EC50 値を有したことを示す。アイソタイプ mAb は HT-29 細胞に結合しなかった。図 29B は、TAVO412E が、HT-29 細胞に対する ADCC レポーターアッセイについて、0.078 nM の EC50 値を有したことを示す。アイソタイプ mAb は、HT-29 細胞に対して ADCC レポーターアッセイ活性化を有さなかった。図 29C は、TAVO412E が、HT-29 細胞に対する ADCC 死滅アッセイについて 0.023 nM の EC50 値を有したことを示す。アイソタイプ mAb は HT-29 細胞に対して ADCC 死滅応答を示さなかった。

【0286】

参考資料

Banys-Paluchowski, M., I. Witzel, B. Aktas, P. A. Fasching, A. Hartkopf, W. Janni, S. Kasimir-Bauer, K. Pantel, G. Schon, B. Rack, S. Riethdorf, E. F. Solomayer, T. Fehm and V. Muller (2019). "The prognostic relevance of urokinase-type plasminogen activator (uPA) in the blood of patients

10

20

30

40

50

with metastatic breast cancer." Sci Rep 9(1): 2318.

Bean, J., C. Brennan, J. Y. Shih, G. Riely, A. Viale, L. Wang, D. Chitale, N. Motoi, J. Szoke, S. Broderick, M. Balak, W. C. Chang, C. J. Yu, A. Gazdar, H. Pass, V. Rusch, W. Gerald, S. F. Huang, P. C. Yang, V. Miller, M. Ladanyi, C. H. Yang and W. Pao (2007). "MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib." Proc Natl Acad Sci U S A 104(52): 20932-20937.

Birchmeier, C., W. Birchmeier, E. Gherardi and G. F. Vande Woude (2003). "Met, metastasis, motility and more." Nat Rev Mol Cell Biol 4(12): 915-925.

Bolt, S., E. Routledge, I. Lloyd, L. Chatenoud, H. Pope, S. D. Gorman, M. Clark and H. Waldmann (1993). "The generation of a humanized, non-mitogenic CD3 monoclonal antibody which retains in vitro immunosuppressive properties." Eur J Immunol 23(2): 403-411.

Chen, N., W. Fang, J. Zhan, S. Hong, Y. Tang, S. Kang, Y. Zhang, X. He, T. Zhou, T. Qin, Y. Huang, X. Yi and L. Zhang (2015). "Upregulation of PD-L1 by EGFR Activation Mediates the Immune Escape in EGFR-Driven NSCLC: Implication for Optional Immune Targeted Therapy for NSCLC Patients with EGFR Mutation." J Thorac Oncol 10(6): 910-923.

Chen, X., J. L. Zaro and W. C. Shen (2013). "Fusion protein linkers: property, design and functionality." Adv Drug Deliv Rev 65(10): 1357-1369.

Chothia, C. and A. M. Lesk (1987). "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins." J Mol Biol 196(4): 901-917.

Chu, S. Y., I. Vostiar, S. Karki, G. L. Moore, G. A. Lazar, E. Pong, P. F. Joyce, D. E. Szymkowski and J. R. Desjarlais (2008). "Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIb with Fc-engineered antibodies." Mol Immunol 45(15): 3926-3933.

Cui, J. J., H. Shen, M. Tran-Dube, M. Nambu, M. McTigue, N. Grodsky, K. Ryan, S. Yamazaki, S. Aguirre, M. Parker, Q. Li, H. Zou and J. Christensen (2013). "Lessons from (S)-6-(1-(6-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]pyridazin-3-yl)ethyl)quinoline (PF-04254644), an inhibitor of receptor tyrosine kinase c-Met with high protein kinase selectivity but broad phosphodiesterase family inhibition leading to myocardial degeneration in rats." J Med Chem 56(17): 6651-6665.

Dall'Acqua, W. F., P. A. Kiener and H. Wu (2006). "Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn)." J Biol Chem 281(33): 23514-23524.

Diebolder, C. A., F. J. Beurskens, R. N. de Jong, R. I. Koning, K. Strumane, M. A. Lindorfer, M. Voorhorst, D. Ugurlar, S. Rosati, A. J. Heck, J. G. van de Winkel, I. A. Wilson, A. J. Koster, R. P. Taylor, E. O. Saphire, D. R. Burton, J. Schuurman, P. Gros and P. W. Parren (2014). "Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface." Science 343(6176): 1260-1263.

Engelman, J. A., K. Zejnullahu, T. Mitsudomi, Y. Song, C. Hyland, J. O. Park, N. Lindeman, C. M. Gale, X. Zhao, J. Christensen, T. Kosaka, A. J. Holmes, A. M. Rogers, F. Cappuzzo, T. Mok, C. Lee, B. E. Johnson, L. C. Cantley and P. A. Janne (2007). "MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling." Science 316(582

10

20

30

40

50

7): 1039-1043.

Fan, J. B., W. Liu, X. H. Zhu, K. Yuan, D. W. Xu, J. J. Chen and Z. M. Cui (2015). "EGFR-AKT-mTOR activation mediates epiregulin-induced pleiotropic functions in cultured osteoblasts." Mol Cell Biochem 398(1-2): 105-113.

Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." Nat Med 1(1): 27-31.

Folkman, J. and Y. Shing (1992). "Angiogenesis." J Biol Chem 267(16): 10931-10934.

Fukumura, D., R. Xavier, T. Sugiura, Y. Chen, E. C. Park, N. Lu, M. Selig, G. Nielsen, T. Taksir, R. K. Jain and B. Seed (1998). "Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells." Cell 94(6): 715-725.

Gunasekaran, K., M. Pentony, M. Shen, L. Garrett, C. Forte, A. Woodward, S. B. Ng, T. Born, M. Retter, K. Manchulenko, H. Sweet, I. N. Foltz, M. Wittekind and W. Yan (2010). "Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG." J Biol Chem 285(25): 19637-19646.

Hinton, P. R., J. M. Xiong, M. G. Johlfs, M. T. Tang, S. Keller and N. Tsurushita (2006). "An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life." J Immunol 176(1): 346-356.

Holmgren, L., M. S. O'Reilly and J. Folkman (1995). "Dormancy of micro metastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression." Nat Med 1(2): 149-153.

Horak, E. R., R. Leek, N. Klenk, S. LeJeune, K. Smith, N. Stuart, M. Greenall, K. Stepniowska and A. L. Harris (1992). "Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer." Lancet 340(8828): 1120-1124.

Jiang, W., T. Li, J. Guo, J. Wang, L. Jia, X. Shi, T. Yang, R. Jiao, X. Wei, Z. Feng, Q. Tang and G. Ji (2021). "Bispecific c-Met/PD-L1 CAR-T Cells Have Enhanced Therapeutic Effects on Hepatocellular Carcinoma." Front Oncol 11: 546586.

Kaumaya, P. T. P. and K. C. Foy (2012). "Peptide vaccines and peptidomimetics targeting HER and VEGF proteins may offer a potentially new paradigm in cancer immunotherapy." Future Oncol 8(8): 961-987.

Kennedy, S. P., J. F. Hastings, J. Z. Han and D. R. Croucher (2016). "The Under-Appreciated Promiscuity of the Epidermal Growth Factor Receptor Family." Front Cell Dev Biol 4: 88.

Kinder, M., A. R. Greenplate, K. D. Grugan, K. L. Soring, K. A. Heeringa, S. G. McCarthy, G. Bannish, M. Perpetua, F. Lynch, R. E. Jordan, W. R. Strohl and R. J. Brezski (2013). "Engineered protease-resistant antibodies with selectable cell-killing functions." J Biol Chem 288(43): 30843-30854.

Klagsbrun, M. and P. A. D'Amore (1991). "Regulators of angiogenesis." Annu Rev Physiol 53: 217-239.

Labrijn, A. F., J. I. Meesters, B. E. de Goeij, E. T. van den Bremer, J. Neijssen, M. D. van Kampen, K. Strumane, S. Verploegen, A. Kundu, M. J. Gramer, P. H. van Berkel, J. G. van de Winkel, J. Schuurman and P. W. Parren (2014). "Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange." Proc Natl Acad Sci U S A 110(13): 5145-5150.

- Lee, D., E. S. Sung, J. H. Ahn, S. An, J. Huh and W. K. You (2015). "Development of antibody-based c-Met inhibitors for targeted cancer therapy." Immunotargets Ther 4: 35-44.
- Lefranc, M. P., C. Pommie, M. Ruiz, V. Giudicelli, E. Foulquier, L. Truong, V. Thouvenin-Contet and G. Lefranc (2003). "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains." Dev Comp Immunol 27(1): 55-77.
- Lin, W. W., Y. C. Lu, C. H. Chuang and T. L. Cheng (2020). "Ab locks for improving the selectivity and safety of antibody drugs." J Biomed Sci 27(1): 76.
- Macchiaroni, P., G. Fontanini, M. J. Hardin, F. Squartini and C. A. Angelotti (1992). "Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer." Lancet 340(8812): 145-146.
- McDermott, U., R. V. Pusapati, J. G. Christensen, N. S. Gray and J. Settleman (2010). "Acquired resistance of non-small cell lung cancer cells to MET kinase inhibition is mediated by a switch to epidermal growth factor receptor dependency." Cancer Res 70(4): 1625-1634.
- Pawelczyk, K., A. Piotrowska, U. Ciesielska, K. Jablonska, N. Gletzel-Plucinska, J. Grzegorzolka, M. Podhorska-Okolow, P. Dziegiel and K. Nowinska (2019). "Role of PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Their Prognostic Significance according to Clinicopathological Factors and Diagnostic Markers." Int J Mol Sci 20(4).
- Petkova, S. B., S. Akilesh, T. J. Sproule, G. J. Christianson, H. Al Khabbaz, A. C. Brown, L. G. Presta, Y. G. Meng and D. C. Roopenian (2006). "Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease." Int Immunol 18(12): 1759-1769.
- Ridgway, J. B., L. G. Presta and P. Carter (1996). "'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization." Protein Eng 9(7): 617-621.
- Scheraga, H. A. (2008). "From helix-coil transitions to protein folding." Biopolymers 89(5): 479-485.
- Shields, R. L., A. K. Namenuk, K. Hong, Y. G. Meng, J. Rae, J. Briggs, D. Xie, J. Lai, A. Stadlen, B. Li, J. A. Fox and L. G. Presta (2001). "High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R." J Biol Chem 276(9): 6591-6604.
- Shields, R. L., A. K. Namenuk, K. Hong, Y. G. Meng, J. Rae, J. Briggs, D. Xie, J. Lai, A. Stadlen, B. Li, J. A. Fox and L. G. Presta (2001). "High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R." J Biol Chem 276(9): 6591-6604.
- Sun, Z. J., Y. Wu, W. H. Hou, Y. X. Wang, Q. Y. Yuan, H. J. Wang and M. Yu (2017). "A novel bispecific c-MET/PD-1 antibody with therapeutic potential in solid cancer." Oncotarget 8(17): 29067-29079.
- Tam, S. H., S. G. McCarthy, A. A. Armstrong, S. Somani, S. J. Wu, X. Liu, A. Gervais, R. Ernst, D. Saro, R. Decker, J. Luo, G. L. Gilliland, M. L. Chiu and B. J. Scallan (2017). "Functional, Biophysical, and Structural Characterization of Human IgG1 and IgG4 Fc Variants with Ablated Immune Functionality." Antibodies (Basel) 6(3).

10

20

30

40

50

- Troiani, T., E. Martinelli, M. Orditura, F. De Vita, F. Ciardiello and F. Morgillo (2012). "Beyond bevacizumab: new anti-VEGF strategies in colorectal cancer." Expert Opin Investig Drugs 21(7): 949-959.
- Vafa, O., G. L. Gilliland, R. J. Brezski, B. Strake, T. Wilkinson, E. R. Lacy, B. Scallon, A. Teplyakov, T. J. Malia and W. R. Strohl (2014). "An engineered Fc variant of an IgG eliminates all immune effector functions via structural perturbations." Methods 65(1): 114-126.
- Viticchie, G. and P. A. J. Muller (2015). "c-Met and Other Cell Surface Molecules: Interaction, Activation and Functional Consequences." Biomedicines 3(1): 46-70.
- Wang, D. D., L. Ma, M. P. Wong, V. H. Lee and H. Yan (2015). "Contribution of EGFR and ErbB-3 Heterodimerization to the EGFR Mutation-Induced Gefitinib- and Erlotinib-Resistance in Non-Small-Cell Lung Carcinoma Treatments." PLoS One 10(5): e0128360.
- Weidner, N., J. P. Semple, W. R. Welch and J. Folkman (1991). "Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma." N Engl J Med 324(1): 1-8.
- Worn, A. and A. Pluckthun (2001). "Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments." J Mol Biol 305(5): 989-1010.
- Wu, T. T. and E. A. Kabat (1970). "An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity." J Exp Med 132(2): 211-250.
- Xu, D., M. L. Alegre, S. S. Varga, A. L. Rothermel, A. M. Collins, V. L. Pulito, L. S. Hanna, K. P. Dolan, P. W. Parren, J. A. Bluestone, L. K. Joliffe and R. A. Zivin (2000). "In vitro characterization of five humanized OKT3 effector function variant antibodies." Cell Immunol 200(1): 16-26.
- Zalevsky, J., A. K. Chamberlain, H. M. Horton, S. Karki, I. W. Leung, T. J. Sproule, G. A. Lazar, D. C. Roopenian and J. R. Desjarlais (2010). "Enhanced antibody half-life improves in vivo activity." Nat Biotechnol 28(2): 157-159.
- Zhang, D., A. A. Armstrong, S. H. Tam, S. G. McCarthy, J. Luo, G. L. Gilliland and M. L. Chiu (2017). "Functional optimization of agonistic antibodies to OX40 receptor with novel Fc mutations to promote antibody multimerization." MAbs 9: 1129-1142.

10

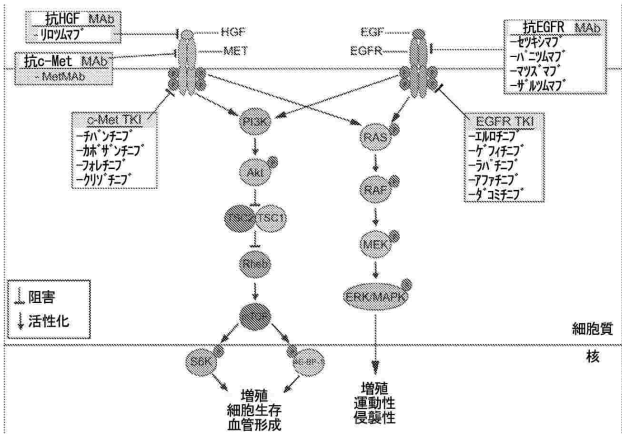
20

30

40

50

【図面】
【図 1】



Stone, J Carcinog Mutagen 2014, 5:3, <http://dx.doi.org/10.4172/2157-2518.1000173>

Fig. 1

【図 2 A】

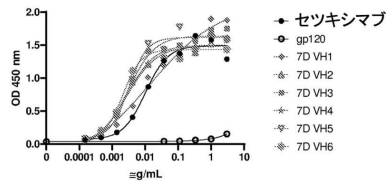


Fig. 2A

【図 2 B】

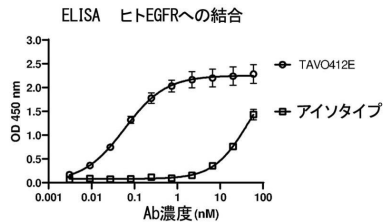


Fig. 2B

【図 2 C】

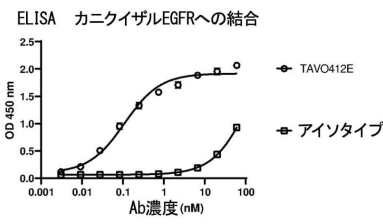


Fig. 2C

【図 2 D】

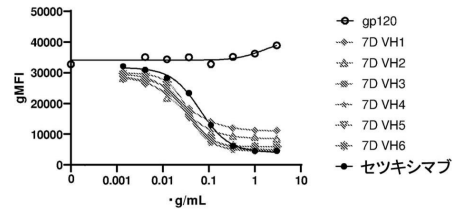


Fig. 2D

【図 2 E】

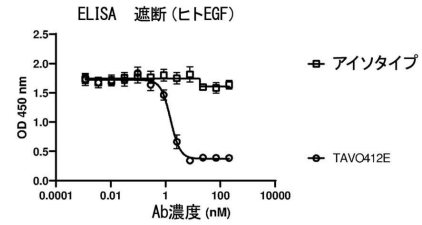


Fig. 2E

【図 3 A】

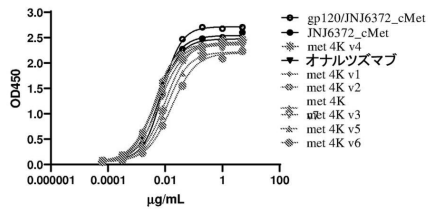


Fig. 3A

【図 3 B】

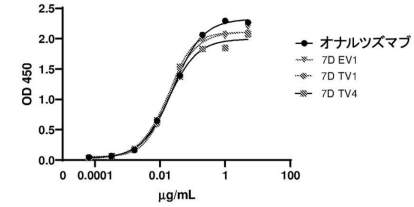


Fig. 3B

【図 3 C】

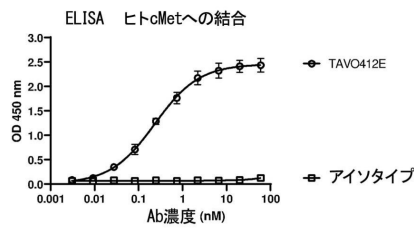


Fig. 3C

【図 3 D】

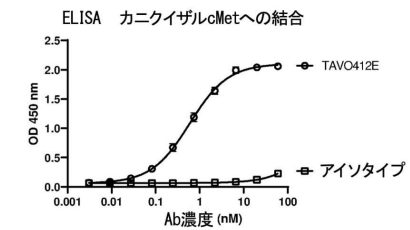


Fig. 3D

10

20

30

40

50

【図 3 E】

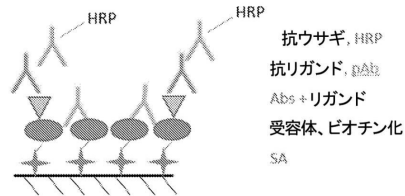


Fig. 3E

【図 3 F】

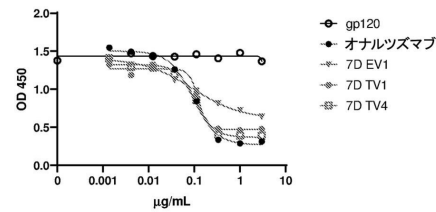


Fig. 3F

【図 3 G】

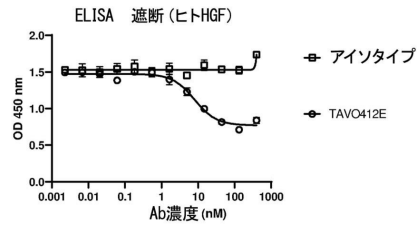


Fig. 3G

【図 4 A】

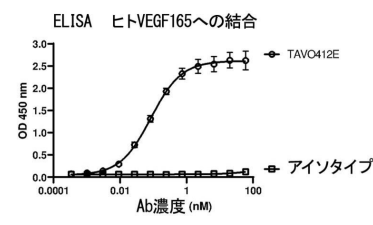


Fig. 4A

【図 4 B】

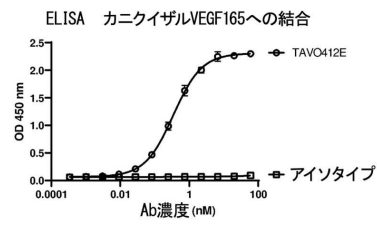


Fig. 4B

【図 4 C】

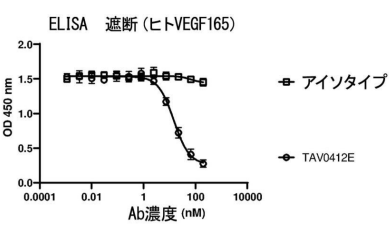


Fig. 4C

10

20

30

40

50

【図 5 A】

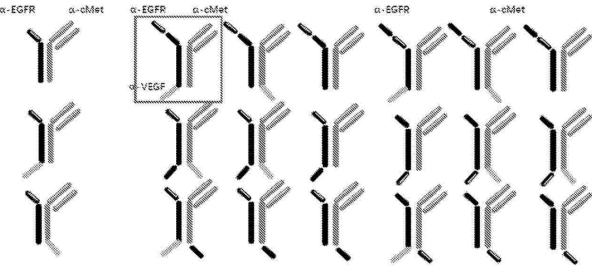


Fig. 5A

【図 5 B】

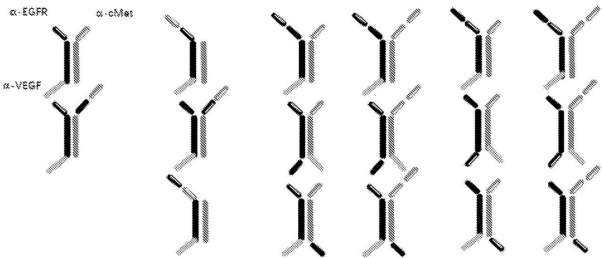


Fig. 5B

10

【図 6 A】

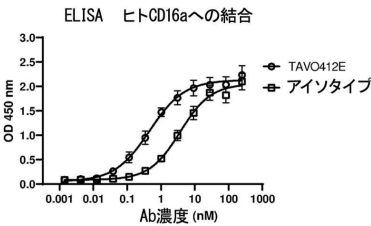


Fig. 6A

【図 6 B】

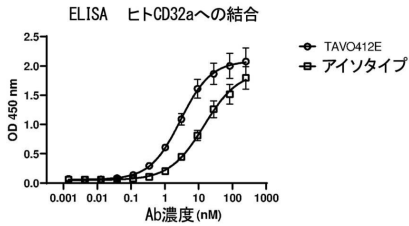


Fig. 6B

20

【図 6 C】

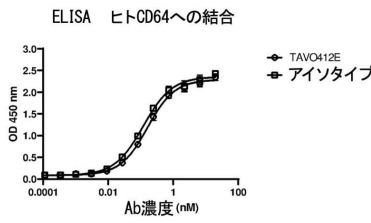


Fig. 6C

【図 6 D】

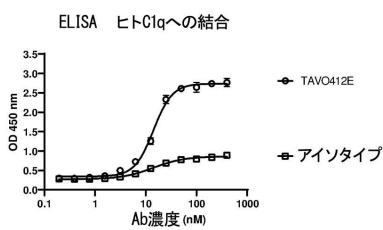


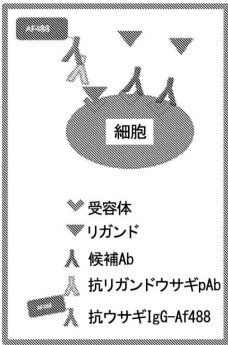
Fig. 6D

30

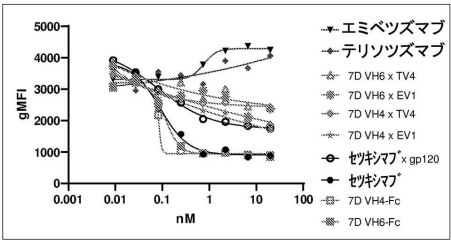
40

50

【図 7 A】

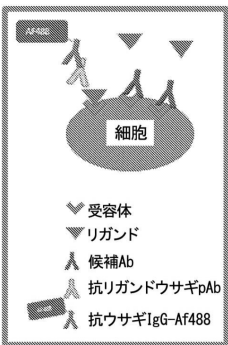


【図 7 B】

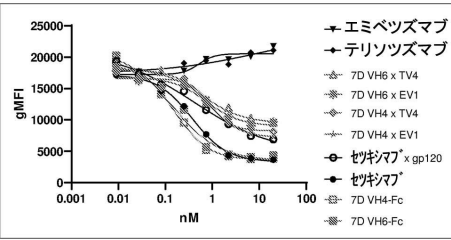


10

【図 8 A】



【図 8 B】



20

【図 9 A】



【図 9 B】



30

40

50

【図 9 C】



Fig. 9C

【図 9 D】



Fig. 9D

【図 1 0 A】

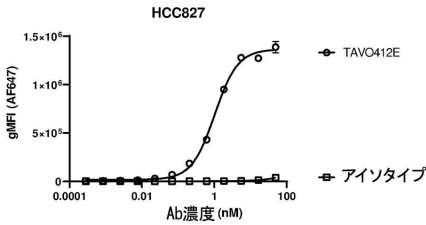


Fig. 10A

【図 1 0 B】

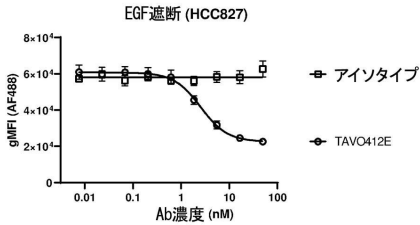


Fig. 10B

【図 1 0 C】

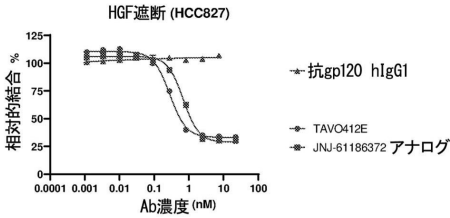


Fig. 10C

【図 1 1 A】

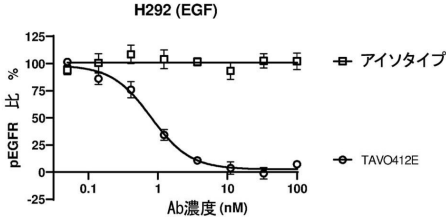


Fig. 11A

10

20

30

40

50

【図 1 1 B】

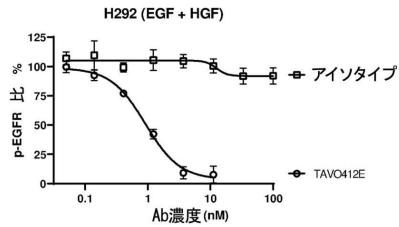


Fig. 11B

【図 1 1 C】

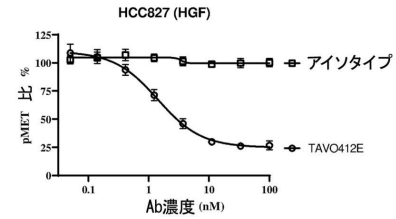


Fig. 11C

10

【図 1 1 D】

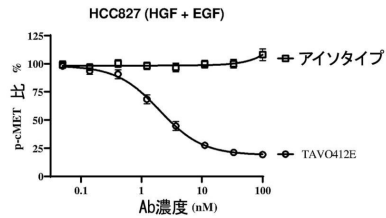


Fig. 11D

【図 1 2 A】

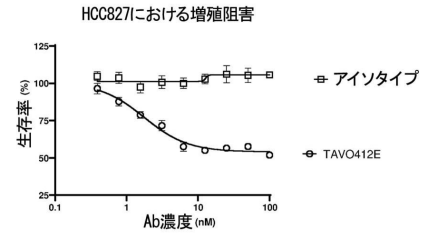


Fig. 12A

20

【図 1 2 B】

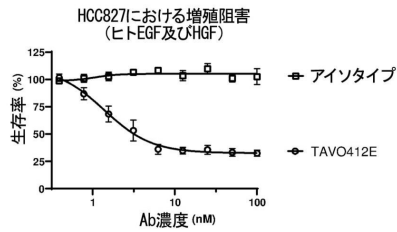


Fig. 12B

【図 1 3 A】

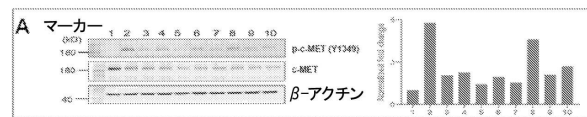


Fig. 13A

30

【図 1 3 B】

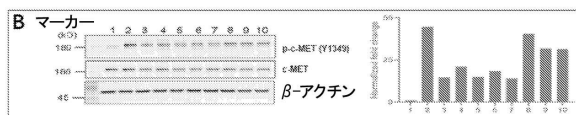


Fig. 13B

【図 1 3 C】



Fig. 13C

40

50

【図 1 4 A】

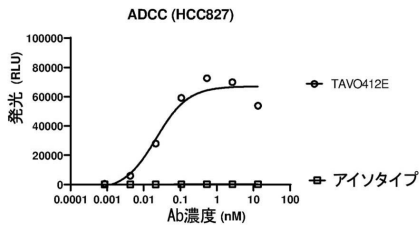


Fig. 14A

【図 1 4 B】

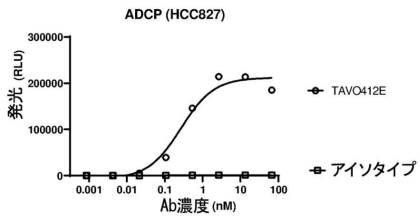


Fig. 14B

【図 1 4 C】

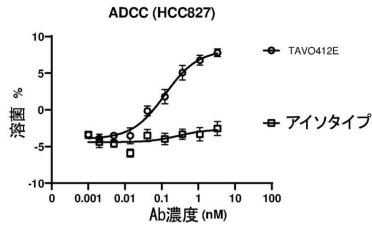


Fig. 14C

【図 1 4 D】

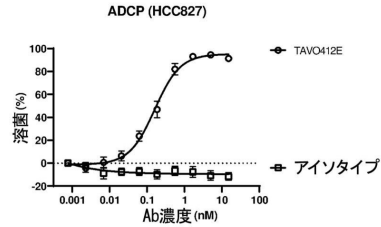


Fig. 14D

【図 1 4 E】

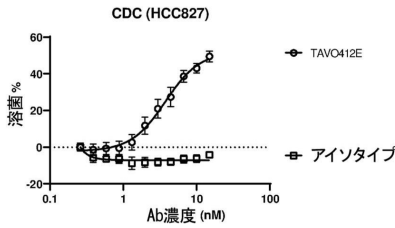


Fig. 14E

【図 1 5 A】

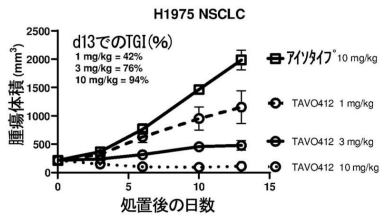


Fig. 15A

10

20

30

40

50

【図 15 B】

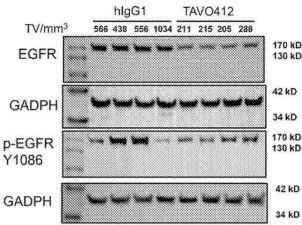


Fig. 15B

【図 15 C】

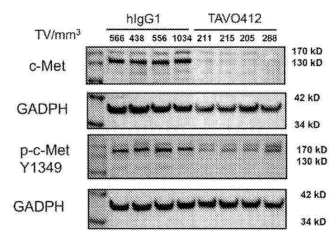


Fig. 15C

【図 15 D】

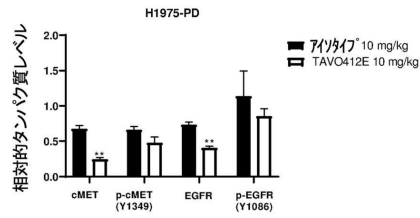


Fig. 15D

【図 16 A】

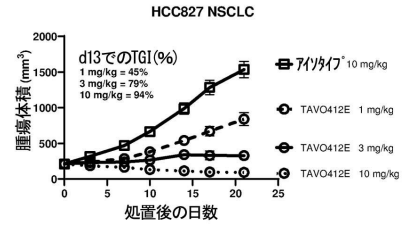


Fig. 16A

【図 16 B】

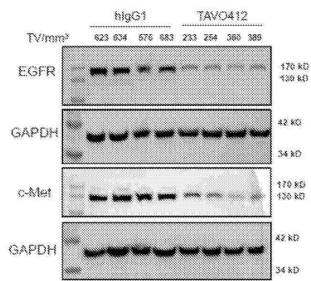


Fig. 16B

【図 16 C】

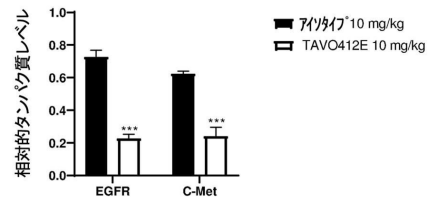


Fig. 16C

10

20

30

40

50

【図 17 A】

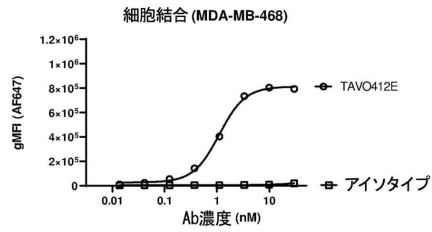


Fig. 17A

【図 17 B】

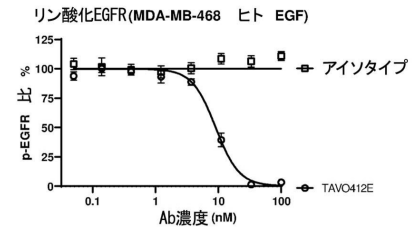


Fig. 17B

【図 17 C】

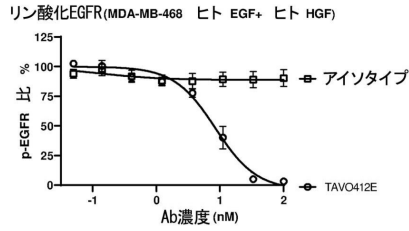


Fig. 17C

【図 18 A】

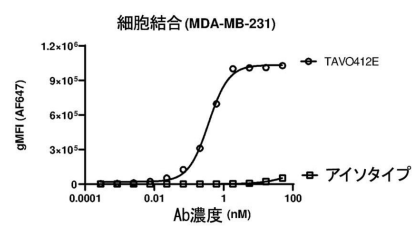


Fig. 18A

【図 18 B】

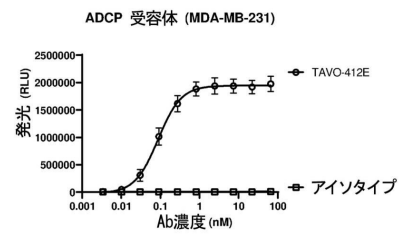


Fig. 18B

【図 18 C】

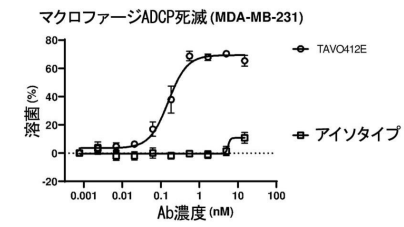


Fig. 18C

10

20

30

40

50

【図 18 D】

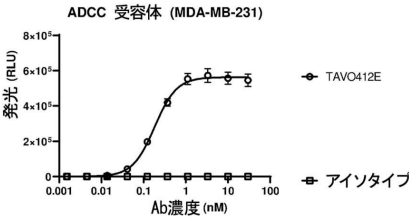


Fig. 18D

【図 18 E】

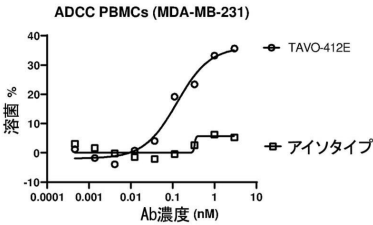


Fig. 18E

【図 18 F】

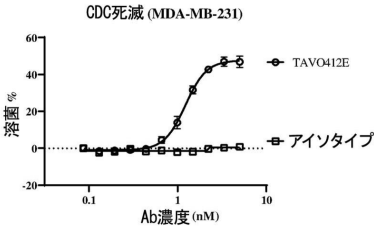


Fig. 18F

【図 19 A】

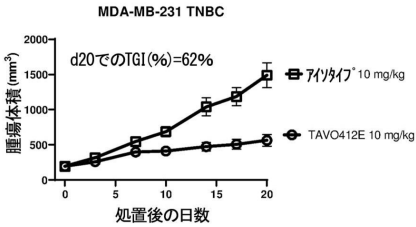


Fig. 19A

【図 19 B】

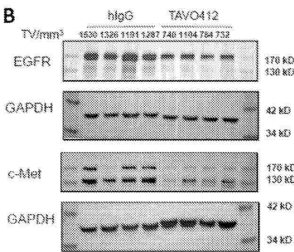


Fig. 19B

【図 19 C】

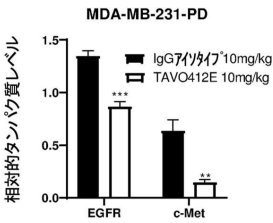


Fig. 19C

10

20

30

40

50

【図 2 0 A】

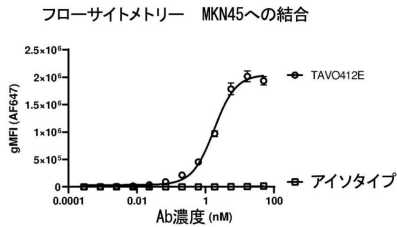


Fig. 20A

【図 2 0 B】

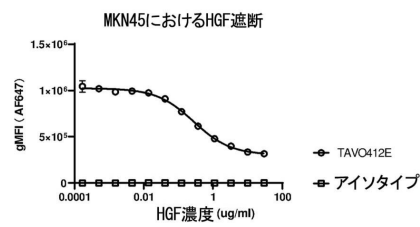


Fig. 20B

【図 2 0 C】

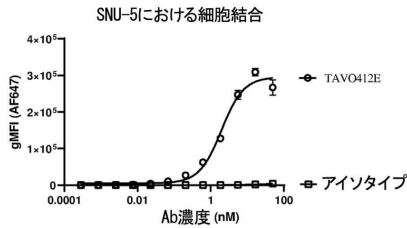


Fig. 20C

【図 2 0 D】

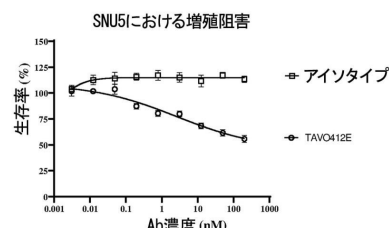


Fig. 20D

【図 2 1 A】

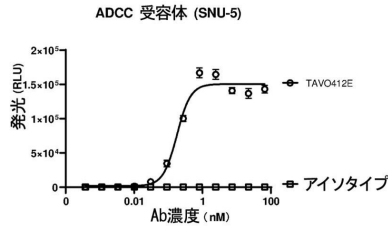


Fig. 21A

【図 2 1 B】

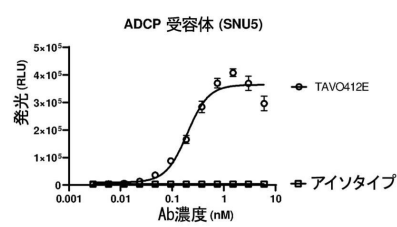


Fig. 21B

10

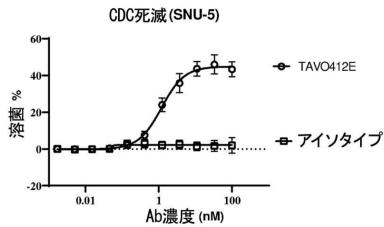
20

30

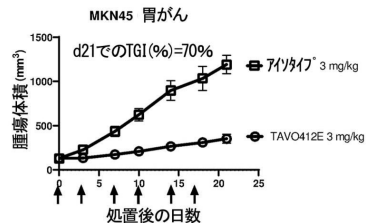
40

50

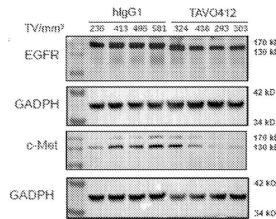
【図 2 1 C】



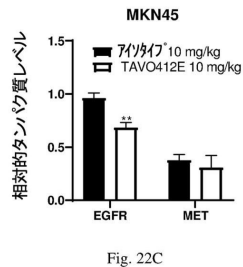
【図 2 2 A】



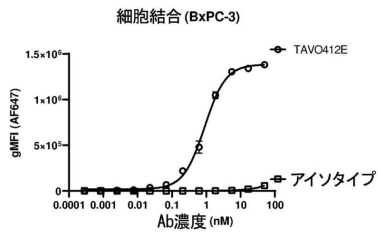
【図 2 2 B】



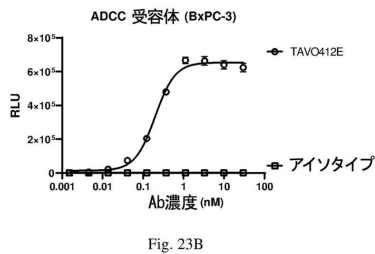
【図 2 2 C】



【図 2 3 A】



【図 2 3 B】



10

20

30

40

50

【図 2 3 C】

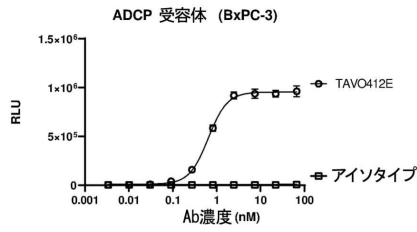


Fig. 23C

【図 2 4 A】

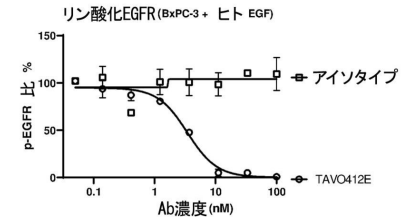


Fig. 24A

【図 2 4 B】

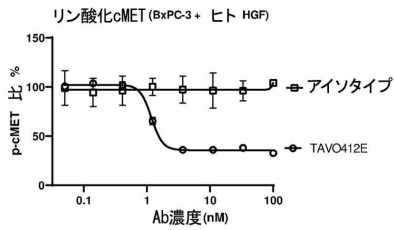


Fig. 24B

【図 2 4 C】

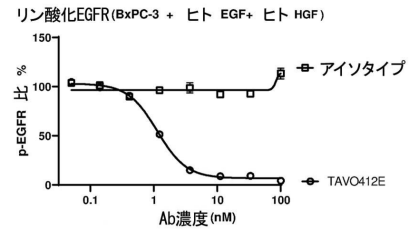


Fig. 24C

【図 2 4 D】

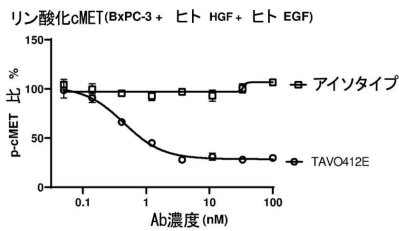


Fig. 24D

【図 2 5 A】

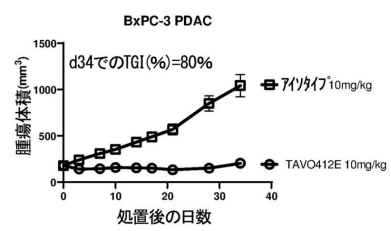


Fig. 25A

10

20

30

40

50

【図 2 5 B】

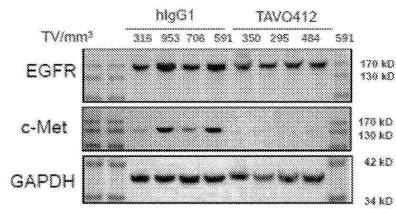


Fig. 25B

【図 2 5 C】

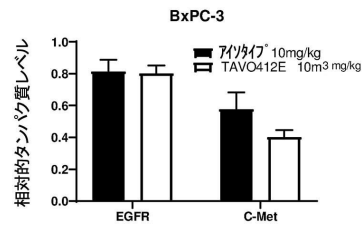
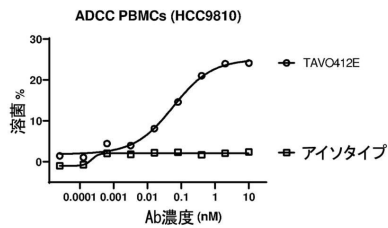


Fig. 25C

10

【図 2 6 A】



	TAVO412E
EC50 (nM)	0.09788
95% CI (nM)	0.08855 ~ 0.1080
効率 (y軸)	658792

Fig. 26A

【図 2 6 B】

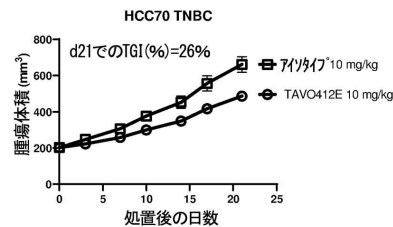


Fig. 26B

20

【図 2 6 C】

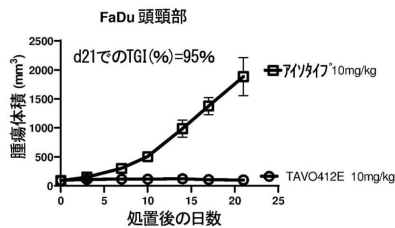


Fig. 26C

【図 2 7 A】

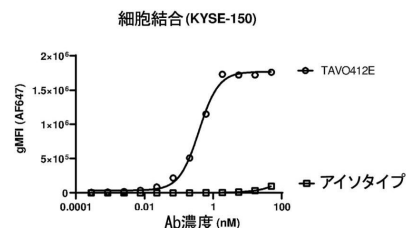


Fig. 27A

30

40

50

【図 2 7 B】

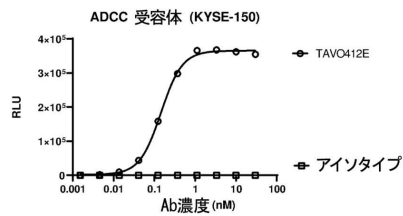


Fig. 27B

【図 2 7 C】

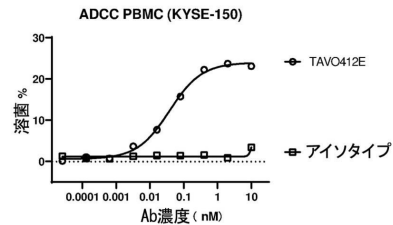


Fig. 27C

【図 2 8 A】

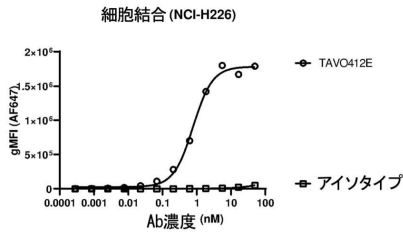


Fig. 28A

【図 2 8 B】

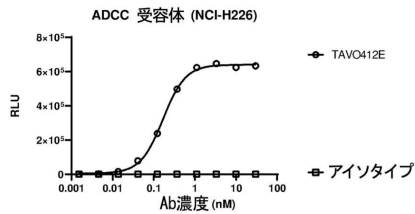


Fig. 28B

【図 2 8 C】

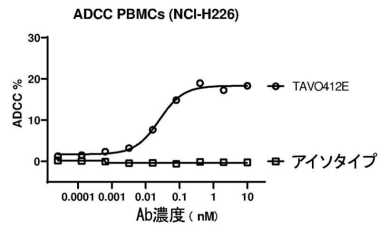


Fig. 28C

【図 2 9 A】

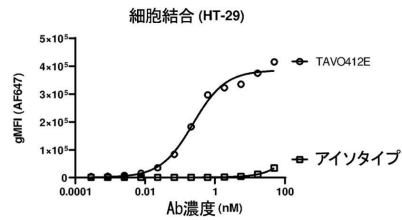


Fig. 29A

10

20

30

40

50

【図 2 9 B】

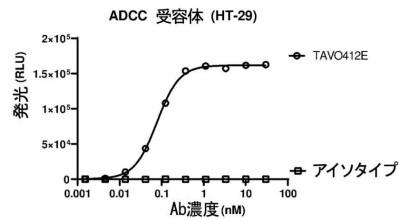


Fig. 29B

【図 2 9 C】

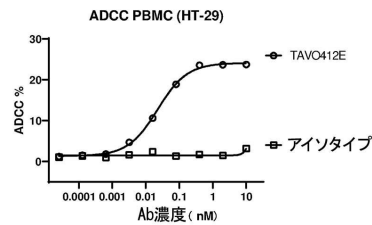


Fig. 29C

10

【配列表】

2024538148000001.xml

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/078192

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. **C07K16/28 C07K16/22 A61P35/00**
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/042289 A2 (ABLYNX NV [BE]; LAEREMANS TOON [BE] ET AL.) 19 April 2007 (2007-04-19) page 1, line 1 - line 14 page 1, line 25 - page 2, line 17 page 10, line 8 - page 13, line 8; sequences 43, 55, 67 page 24, line 17 - page 25, line 5; table 1 page 92, line 17 - page 96, line 11; examples 5-12; tables 2-4,7; sequences 81, 43, 55, 67,114, 122 -----	1-3, 25-32
X	EP 2 747 783 B1 (ABLYNX NV [BE]) 14 June 2017 (2017-06-14) paragraphs [0011] - [0018], [0021] - [0026], [0067] - [0079], [0088] - [0093]; examples 1-19; sequences 102, 187 ----- -/--	10-33

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 February 2023

Date of mailing of the international search report

07/03/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stein, Annette

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/078192

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 832 748 A1 (SAMSUNG ELECTRONICS CO LTD [KR]) 4 February 2015 (2015-02-04) paragraphs [0005] - [0010], [0015] - [0038], [0058] - [0063], [0073] - [0086]; examples 1-11 -----	10-33
X	WO 2014/081954 A1 (JANSSEN BIOTECH INC [US]) 30 May 2014 (2014-05-30) page 4, line 5 - page 7, line 2 page 32, line 30 - page 33, line 14 page 47, line 10 - page 66, line 4 examples 10-19 -----	10-33
A	SCHMITZ KARL R ET AL: "Structural Evaluation of EGFR Inhibition Mechanisms for Nanobodies/VHH Domains", STRUCTURE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 21, no. 7, 20 June 2013 (2013-06-20), pages 1214-1224, XP028576947, ISSN: 0969-2126, DOI: 10.1016/J.STR.2013.05.008 the whole document, in particular tables 1, 3, S1, figures 2, 3 and S2 -& Schmitz Karl R ET AL: "Structure, Volume 21 Supplemental Information Structural Evaluation of EGFR Inhibition Mechanisms for Nanobodies/VHH Domains", 2 July 2013 (2013-07-02), pages 1-8, XP093005530, Retrieved from the Internet: URL:https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0969212613001664-mmcl.pdf [retrieved on 2022-12-06] -----	1-3, 10-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2022/078192
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/078192

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-3, 10-33 (all partially)
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2022 /078192

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-3, 25-32(all partially)

An anti-EGFR antibody or an antigen-binding fragment thereof, comprising a heavy chain variable region comprising HCDR1, HCDR2, and HCDR3, wherein the HCDR1, HCDR2, and HCDR3 are selected from SEQ ID NOs: 95, 96, and 97, respectively, and related subject-matter.

2. claims: 1-3, 25-32(all partially)

An anti-EGFR antibody or an antigen-binding fragment thereof, comprising a heavy chain variable region comprising HCDR1, HCDR2, and HCDR3, wherein the HCDR1, HCDR2, and HCDR3 are selected from SEQ ID NOs: 95, 96, and 98, respectively, and related subject-matter.

3. claims: 1-3, 25-32(all partially)

An anti-EGFR antibody or an antigen-binding fragment thereof, comprising a heavy chain variable region comprising HCDR1, HCDR2, and HCDR3, wherein the HCDR1, HCDR2, and HCDR3 are selected from SEQ ID NOs: 95, 96, and 105, respectively, and related subject-matter.

4. claims: 1-3, 25-32(all partially)

An anti-EGFR antibody or an antigen-binding fragment thereof, comprising a heavy chain variable region comprising HCDR1, HCDR2, and HCDR3, wherein the HCDR1, HCDR2, and HCDR3 are selected from SEQ ID NOs: 102, 100, and 101, respectively, and related subject-matter.

5. claims: 1-3, 25-32(all partially)

An anti-EGFR antibody or an antigen-binding fragment thereof, comprising a heavy chain variable region comprising HCDR1, HCDR2, and HCDR3, wherein the HCDR1, HCDR2, and HCDR3 are selected from SEQ ID NOs: 102, 103, and 104, respectively, and related subject-matter.

6-26. claims: 4-7(completely); 10-33(partially)

An anti-cMET antibody or antigen-binding fragment thereof as recited in present claim 4, wherein each of the alternative antibodies represent a single, independent invention and related subject-matter.

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/US2022/078192

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

27-28. claims: 8, 9(completely); 17, 18, 20-22, 25-33(partially)

An anti-VEGF antibody or antigen-binding fragment thereof, as recited in present claim 8, wherein each of the antibodies represent a single, independent invention, and related subject-matter.

29. claims: 10-33(partially)

A multispecific antibody comprising an EGFR arm that can bind EGFR and a cMET arm than can bind cMET, wherein the EGFR arm comprises a heavy chain variable region comprising HCDR1, HCDR2, and HCDR3, wherein the HCDR1, HCDR2, and HCDR3 are selected from SEQ ID NOs: 95, 96, and 97, respectively, and related subject-matter.

30. claims: 10-33(partially)

A multispecific antibody comprising an EGFR arm that can bind EGFR and a cMET arm than can bind cMET, wherein the EGFR arm comprises a heavy chain variable region comprising HCDR1, HCDR2, and HCDR3, wherein the HCDR1, HCDR2, and HCDR3 are selected from SEQ ID NOs: 95, 96, and 98, respectively, and related subject-matter.

31. claims: 10-33(partially)

A multispecific antibody comprising an EGFR arm that can bind EGFR and a cMET arm than can bind cMET, wherein the EGFR arm comprises a heavy chain variable region comprising HCDR1, HCDR2, and HCDR3, wherein the HCDR1, HCDR2, and HCDR3 are selected from SEQ ID NOs: 95, 96, and 105, respectively, and related subject-matter.

32. claims: 10-33(partially)

A multispecific antibody comprising an EGFR arm that can bind EGFR and a cMET arm than can bind cMET, wherein the EGFR arm comprises a heavy chain variable region comprising HCDR1, HCDR2, and HCDR3, wherein the HCDR1, HCDR2, and HCDR3 are selected from SEQ ID NOs: 102, 100, and 101, respectively, and related subject-matter.

33. claims: 10-33(partially)

A multispecific antibody comprising an EGFR arm that can bind EGFR and a cMET arm than can bind cMET, wherein the EGFR arm comprises a heavy chain variable region comprising HCDR1, HCDR2, and HCDR3, wherein the HCDR1, HCDR2, and HCDR3

10

20

30

40

50

International Application No. **PCT/US2022 /078192**

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

are selected from SEQ ID NOs: 102, 103, and 104,
respectively, and related subject-matter.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/078192

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 2007042289	A2	19-04-2007	AU	2006301426 A1		19-04-2007
			CA	2624781 A1		19-04-2007
			CN	101321784 A		10-12-2008
			EP	1934259 A2		25-06-2008
			JP	2009511032 A		19-03-2009
			WO	2007042289 A2		19-04-2007

EP 2747783	B1	14-06-2017	AU	2013201446 A1		02-05-2013
			CA	2850261 A1		04-04-2013
			CN	103889451 A		25-06-2014
			CN	106046161 A		26-10-2016
			EP	2747783 A2		02-07-2014
			JP	6219287 B2		25-10-2017
			JP	2015501135 A		15-01-2015
			WO	2013045707 A2		04-04-2013

EP 2832748	A1	04-02-2015	EP	2832748 A1		04-02-2015
			KR	20150014551 A		09-02-2015
			US	2015030599 A1		29-01-2015
			WO	2015016559 A1		05-02-2015

WO 2014081954	A1	30-05-2014	AU	2013347962 A1		28-05-2015
			AU	2019200441 A1		07-02-2019
			AU	2021202394 A1		20-05-2021
			CA	2893505 A1		30-05-2014
			CA	3182876 A1		30-05-2014
			CL	2015001356 A1		06-11-2015
			CN	104955838 A		30-09-2015
			CN	113201073 A		03-08-2021
			CY	1121270 T1		29-05-2020
			DK	2922872 T3		02-01-2019
			DK	3447069 T3		16-11-2020
			EA	201590985 A1		30-11-2015
			EP	2922872 A1		30-09-2015
			EP	3447069 A1		27-02-2019
			EP	3808767 A1		21-04-2021
			ES	2700231 T3		14-02-2019
			ES	2831374 T3		08-06-2021
			HR	P20182128 T1		08-02-2019
			HR	P20201848 T1		08-01-2021
			HU	E041499 T2		28-05-2019
			HU	E052548 T2		28-05-2021
			HU	S2200016 I1		28-05-2022
			JP	6423357 B2		14-11-2018
			JP	6773746 B2		21-10-2020
			JP	7019771 B2		15-02-2022
			JP	2016505537 A		25-02-2016
			JP	2019048817 A		28-03-2019
			JP	2021006561 A		21-01-2021
			JP	2022062155 A		19-04-2022
			KR	20150087365 A		29-07-2015
			KR	20220032654 A		15-03-2022
			LT	2922872 T		27-12-2018
			LT	3447069 T		10-12-2020
			LT	PA2022507 I1		27-06-2022
			MX	361088 B		26-11-2018
			NI	201500069 A		19-10-2015
			NL	301173 I1		04-05-2022

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/078192

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		NZ 708352 A	25-10-2019
		PE 20151181 A1	19-08-2015
		PH 12015501118 A1	01-02-2016
		PL 2922872 T3	29-03-2019
		PT 2922872 T	18-01-2019
		PT 3447069 T	13-11-2020
		SG 11201503938V A	29-06-2015
		SI 2922872 T1	31-01-2019
		SI 3447069 T1	26-02-2021
		UA 117121 C2	25-06-2018
		US 2014141000 A1	22-05-2014
		US 2014255408 A1	11-09-2014
		US 2017101475 A1	13-04-2017
		WO 2014081954 A1	30-05-2014

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/08
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 P 35/00

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

弁理士 池田 達則

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(72)発明者 プー プー

香港, セントラル, ウィン ウォー ストリート 11, ウォー ヒン コマーシャル ビルディング
 , 9/フロア, ユニット 1

(72)発明者 チャン ソンリン

香港, セントラル, ウィン ウォー ストリート 11, ウォー ヒン コマーシャル ビルディング
 , 9/フロア, ユニット 1

(72)発明者 チン イン

香港, セントラル, ウィン ウォー ストリート 11, ウォー ヒン コマーシャル ビルディング
 , 9/フロア, ユニット 1

(72)発明者 マリア ピー. マックウィリアムズ

アメリカ合衆国, ペンシルベニア 19002, ローワー グウィネッド, ノリスタウン ロード
 727, ビルディング 3, スイート 101

(72)発明者 マン-チョン フン

アメリカ合衆国, ペンシルベニア 19002, ローワー グウィネッド, ノリスタウン ロード
 727, ビルディング 3, スイート 101

(72)発明者 マーク エル. チウ

アメリカ合衆国, ペンシルベニア 19002, ローワー グウィネッド, ノリスタウン ロード
 727, ビルディング 3, スイート 101

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01

4B065 AA91X AA93X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44

4C085 AA13 AA14 BB11 CC22 DD62 EE01 GG01

4H045 AA11 AA30 DA76 EA22 EA28 FA72 FA74 GA26