

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-504608

(P2017-504608A)

(43) 公表日 平成29年2月9日 (2017. 2. 9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46 Z N A	4 C O 8 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 H O 4 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 68 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-541550 (P2016-541550)	(71) 出願人	594197872
(86) (22) 出願日	平成26年12月17日 (2014. 12. 17)		イーライ リリー アンド カンパニー
(85) 翻訳文提出日	平成28年6月20日 (2016. 6. 20)		アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/070850		8 5 インディアナポリス リリー コー
(87) 国際公開番号	W02015/100104		ポレイト センター (番地なし)
(87) 国際公開日	平成27年7月2日 (2015. 7. 2)	(74) 代理人	100092783
(31) 優先権主張番号	61/920, 097		弁理士 小林 浩
(32) 優先日	平成25年12月23日 (2013. 12. 23)	(74) 代理人	100095360
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 片山 英二
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100176094
			弁理士 箱田 満
		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 E G F RおよびME Tに結合する多機能性抗体

(57) 【要約】

ヒト上皮成長因子受容体 (E G F R) と M E T の両方に結合し、それらの活性を阻害し、且つ、癌および E G F R と M E T が発病に介在する他の疾患、障害、または体調の治療に有効である多機能性抗体および / または抗原結合断片を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) METに結合し、且つ、

(i) それぞれGYTF TDYYMH (配列番号 11)、RVNPNRR GTTYNQ K FEG (配列番号 12)、およびARANWLDY (配列番号 13) のアミノ酸配列からなる重鎖CDRであるHCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む重鎖、および

(ii) それぞれSVSSSVSSIYLH (配列番号 14)、YSTSNLAS (配列番号 15) およびQVYSGYPLT (配列番号 16) のアミノ酸配列からなる軽鎖CDRであるLCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む軽鎖

を含む抗体、および

10

(b) EGFRに結合し、且つ、

(i) それぞれGFSLTNYGVH (配列番号 1)、 X_1 がYまたはWであり、且つ、 X_2 がKまたはTであるVI X_1 SGGNTDYNTPF X_2 G (配列番号 9)、およびARALDYDYDFAY (配列番号 3) のアミノ酸配列からなるscFv CDRであるscFv-HCDR1、scFv-HCDR2、およびscFv-HCDR3を含むHCVRドメイン、および

(ii) それぞれRASYSIGTNIH (配列番号 4)、 X_1 がRまたはYであり、 X_2 がKまたはSであり、且つ、 X_3 がEまたはRである X_1 YAX X_2 X_3 SIS (配列番号 10)、およびQQNNAWPTT (配列番号 6) のアミノ酸配列からなるscFv CDRであるscFv-LCDR1、scFv-LCDR2、およびscFv-LC

20

DR3を含むLCVRドメイン

を含むscFvポリペプチド

を含む多機能性抗体。

【請求項 2】

EGFRに結合する前記scFvが

(i) それぞれGFSLTNYGVH (配列番号 1)、VIYSGGNTDYNTPF KG (配列番号 2)、およびARALDYDYDFAY (配列番号 3) のアミノ酸配列からなるscFv CDRであるscFv-HCDR1、scFv-HCDR2、およびscFv-HCDR3を含むHCVRドメイン、および

(ii) それぞれRASYSIGTNIH (配列番号 4)、RYAKESIS (配列番号 5)、およびQQNNAWPTT (配列番号 6) のアミノ酸配列からなるscFv CDRであるscFv-LCDR1、scFv-LCDR2、およびscFv-LCDR3を含むLCVRドメイン

30

を含む、請求項 1 に記載の多機能性抗体。

【請求項 3】

前記scFvポリペプチドが

(a) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含むHCVRドメイン、および

(b) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含むLCVRドメイン

を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の多機能性抗体。

40

【請求項 4】

前記重鎖が配列番号 53 のアミノ酸配列を含み、且つ、前記軽鎖が配列番号 33 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 から請求項 3 の何れか一項に記載の多機能性抗体。

【請求項 5】

前記scFvポリペプチドのC末端がペプチドリンカーを介して前記MET抗体重鎖のN末端に融合する、請求項 1 から請求項 3 の何れか一項に記載の多機能性抗体。

【請求項 6】

配列番号 25 のアミノ酸配列を含む請求項 1 から請求項 5 の何れか一項に記載の多機能性抗体。

【請求項 7】

前記重鎖が配列番号 27 のアミノ酸配列を含み、且つ、前記軽鎖が配列番号 33 のアミ

50

ノ酸配列を含む、請求項 1 から請求項 6 の何れか一項に記載の多機能性抗体。

【請求項 8】

M E T に結合する前記抗体が

(a) 各々がそれぞれ G Y T F T D Y Y M H (配列番号 1 1)、R V N P N R R G T T Y N Q K F E G (配列番号 1 2)、および A R A N W L D Y (配列番号 1 3) のアミノ酸配列からなる重鎖 C D R である H C D R 1、H C D R 2、および H C D R 3 を含む重鎖である第 1 重鎖と第 2 重鎖、および

(b) 各々がそれぞれ S V S S S V S S I Y L H (配列番号 1 4)、Y S T S N L A S (配列番号 1 5) および Q V Y S G Y P L T (配列番号 1 6) のアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R である L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 を含む軽鎖である第 1 軽鎖と第 2 軽鎖

を含む、請求項 1 から請求項 7 の何れか一項に記載の多機能性抗体。

【請求項 9】

前記第 1 s c F v ポリペプチドと前記第 2 s c F v ポリペプチドが各々

(i) それぞれ G F S L T N Y G V H (配列番号 1)、V I Y S G G N T D Y N T P F K G (配列番号 2)、および A R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号 3) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、および s c F v - H C D R 3 を含む H C V R ドメイン、および

(i i) R A S Y S I G T N I H (配列番号 4)、R Y A K E S I S (配列番号 5)、および Q Q N N A W P T T (配列番号 6) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、および s c F v - L C D R 3 を含む L C V R ドメイン

を含む、請求項 8 に記載の多機能性抗体。

【請求項 10】

前記第 1 s c F v ポリペプチドと前記第 2 s c F v ポリペプチドが各々

(a) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む H C V R ドメイン、および

(b) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む L C V R ドメイン

を含む、請求項 9 に記載の多機能性抗体。

【請求項 11】

前記第 1 s c F v ポリペプチドと前記第 2 s c F v ポリペプチドが各々配列番号 23 のアミノ酸配列を含む、請求項 10 に記載の多機能性抗体。

【請求項 12】

M E T に結合する前記抗体が

(i) 各々が配列番号 53 のアミノ酸配列を含む重鎖である第 1 重鎖と第 2 重鎖、および

(i i) 各々が配列番号 33 のアミノ酸配列を含む軽鎖である第 1 軽鎖と第 2 軽鎖

を含む、請求項 11 に記載の多機能性抗体。

【請求項 13】

前記第 1 s c F v ポリペプチドの C 末端がペプチドリinker を介して前記第 1 重鎖の N 末端に融合し、且つ、前記第 2 s c F v ポリペプチドの C 末端がペプチドリinker を介して前記第 2 重鎖の N 末端に融合する、請求項 12 に記載の多機能性抗体。

【請求項 14】

2 つの第 1 ポリペプチドと 2 つの第 2 ポリペプチドを含み、両方の第 1 ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号 27 であり、且つ、両方の第 2 ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号 33 である、請求項 13 に記載の多機能性抗体。

【請求項 15】

前記多機能性抗体によって細胞表面の M E T と E G F R の内部移行および / または分解が誘導される、請求項 1 から請求項 14 の何れか一項に記載の多機能性抗体。

【請求項 16】

E G F R に結合する前記 s c F v が

10

20

30

40

50

(i) それぞれ G F S L T N Y G V H (配列番号 1)、V I W S G G N T D Y N T P F T G (配列番号 7)、および A R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号 3) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、および s c F v - H C D R 3 を含む H C V R ドメイン、および

(i i) それぞれ R A S Y S I G T N I H (配列番号 4)、Y Y A S R S I S (配列番号 8)、および Q Q N N A W P T T (配列番号 6) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、s c F v - L C D R 3 を含む L C V R ドメイン

を含む、請求項 1 に記載の多機能性抗体。

【請求項 17】

10

前記 s c F v ポリペプチドが

(a) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む H C V R ドメイン、および

(b) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む L C V R ドメイン

を含む、請求項 16 に記載の多機能性抗体。

【請求項 18】

M E T に結合する前記抗体が

(i) 配列番号 53 のアミノ酸配列を含む重鎖、および

(i i) 配列番号 33 のアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む、請求項 16 から請求項 17 の何れか一項に記載の多機能性抗体。

【請求項 19】

20

前記 s c F v ポリペプチドの C 末端がペプチドリinker を介して前記 M E T 抗体重鎖の N 末端に融合する、請求項 16 から請求項 18 の何れか一項に記載の多機能性抗体。

【請求項 20】

配列番号 26 のアミノ酸配列を含む請求項 16 から請求項 19 の何れか一項に記載の多機能性抗体。

【請求項 21】

(i) 配列番号 29 のアミノ酸配列、および

(i i) 配列番号 33 のアミノ酸配列

を含む請求項 16 から請求項 20 の何れか一項に記載の多機能性抗体。

【請求項 22】

30

M E T に結合する前記抗体が

(a) 両方ともそれぞれ G Y T F T D Y Y M H (配列番号 11)、R V N P N R R G T T Y N Q K F E G (配列番号 12)、および A R A N W L D Y (配列番号 13) のアミノ酸配列からなる重鎖 C D R である H C D R 1、H C D R 2、および H C D R 3 を含む重鎖である第 1 重鎖と第 2 重鎖、および

(b) 両方ともそれぞれ S V S S S V S S I Y L H (配列番号 14)、Y S T S N L A S (配列番号 15) および Q V Y S G Y P L T (配列番号 16) のアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R である L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 を含む軽鎖である第 1 軽鎖と第 2 軽鎖

を含む、請求項 21 に記載の多機能性抗体。

40

【請求項 23】

前記第 1 s c F v ポリペプチドと前記第 2 s c F v ポリペプチドが各々

(i) それぞれ G F S L T N Y G V H (配列番号 1)、V I W S G G N T D Y N T P F T G (配列番号 7)、および A R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号 3) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、および s c F v - H C D R 3 を含む H C V R ドメイン、および

(i i) それぞれ R A S Y S I G T N I H (配列番号 4)、Y Y A S R S I S (配列番号 8)、および Q Q N N A W P T T (配列番号 6) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、s c F v - L C D R 3 を含む L C V R ドメイン

50

を含む、請求項 22 に記載の多機能性抗体。

【請求項 24】

前記第 1 s c F v ポリペプチドと前記第 2 s c F v ポリペプチドが各々

(i) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む H C V R ドメイン、および

(i i) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む L C V R ドメイン

を含む、請求項 23 に記載の多機能性抗体。

【請求項 25】

前記第 1 s c F v ポリペプチドと前記第 2 s c F v ポリペプチドが各々配列番号 24 のアミノ酸配列を含む、請求項 24 に記載の多機能性抗体。

【請求項 26】

M E T に結合する前記抗体が

(i) 両方とも配列番号 53 のアミノ酸配列を含む重鎖である第 1 重鎖と第 2 重鎖、および

(i i) 両方とも配列番号 33 のアミノ酸配列を含む軽鎖である第 1 軽鎖と第 2 軽鎖を含む、請求項 25 に記載の多機能性抗体。

【請求項 27】

前記第 1 s c F v ポリペプチドの C 末端がペプチドリinker を介して前記第 1 重鎖の N 末端に融合し、且つ、前記第 2 s c F v ポリペプチドの C 末端がペプチドリinker を介して前記第 2 重鎖の N 末端に融合する、請求項 26 に記載の多機能性抗体。

【請求項 28】

2 つの第 1 ポリペプチドと 2 つの第 2 ポリペプチドを含み、両方の第 1 ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号 29 であり、且つ、両方の第 2 ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号 33 である、請求項 27 に記載の多機能性抗体。

【請求項 29】

請求項 1 から請求項 28 の何れか一項に記載の多機能性抗体またはその M E T および E G F R 結合断片、および薬学的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 30】

治療に使用するための請求項 1 から請求項 28 の何れか一項に記載の多機能性抗体またはその M E T および E G F R 結合断片。

【請求項 31】

癌の治療に使用するための請求項 1 から請求項 28 の何れか一項に記載の多機能性抗体またはその M E T および E G F R 結合断片。

【請求項 32】

N S C L C、S C L C、胃癌、大腸癌、胆管癌、食道癌、黒色腫、ブドウ膜黒色腫、腎臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸部癌、または頭頸部癌の治療に使用するための請求項 1 から請求項 28 の何れか一項に記載の多機能性抗体またはその M E T および E G F R 結合断片。

【請求項 33】

N S C L C、S C L C、胃癌、大腸癌、胆管癌、食道癌、黒色腫、ブドウ膜黒色腫、腎臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸部癌、または頭頸部癌であって、1 つ以上の K R A S 突然変異を有する細胞を含むことを特徴とする前記癌の治療に使用するための請求項 1 から請求項 28 の何れか一項に記載の多機能性抗体またはその M E T および E G F R 結合断片。

【請求項 34】

癌を治療する方法であって、それを必要とする患者に請求項 1 から請求項 28 の何れか一項に記載の多機能性抗体またはその M E T および E G F R 結合断片の有効量を投与することを含む前記方法。

【請求項 35】

前記癌がヒトにおける N S C L C、S C L C、胃癌、大腸癌、胆管癌、食道癌、黒色腫、ブドウ膜黒色腫、腎臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸部癌、または頭頸部癌である、請求

10

20

30

40

50

項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記腫瘍が 1 つ以上の K R A S 突然変異を有する細胞を含むことを特徴とする、請求項 3 4 または請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

配列番号 2 7 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む D N A 分子。

【請求項 3 8】

配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む D N A 分子。

10

【請求項 3 9】

(a) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および

(b) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

を含む D N A 分子。

【請求項 4 0】

請求項 3 7 から請求項 3 9 の何れか一項に記載の D N A 分子によって形質転換された哺乳類細胞であって、配列番号 2 7 のアミノ酸配列を有する第 1 ポリペプチドおよび配列番号 3 3 のアミノ酸配列を有する第 2 ポリペプチドを含む多機能性抗体を発現することが可能である前記細胞。

20

【請求項 4 1】

前記哺乳類細胞が C H O である、請求項 4 0 に記載の哺乳類細胞。

【請求項 4 2】

アミノ酸配列が配列番号 2 7 である第 1 ポリペプチドとアミノ酸配列が配列番号 3 3 である第 2 ポリペプチドを含む多機能性抗体の生産方法であって、(1) 前記多機能性抗体が発現するような条件下で請求項 4 0 または請求項 4 1 に記載の哺乳類細胞を培養すること、および(2) 発現した前記多機能性抗体を回収することを含む前記方法。

【請求項 4 3】

請求項 4 2 に記載の方法によって生産された、M E T と E G F R に結合する多機能性抗体。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明はヒト上皮成長因子受容体(E G F R)および M E T に結合する多機能性抗体、それらの製造方法、それら多機能性抗体を含む医薬組成物、およびそれらの使用方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

E G F R はタイプ 1 チロシンキナーゼファミリー増殖因子受容体のメンバーであり、細胞の増殖、分化、および生存に重要な役割を果たす。これらの受容体の活性化は典型的には特異的なリガンド結合と後続のチロシンキナーゼドメインの自己リン酸化を経て生じる。この活性化によって細胞の増殖と生存の両方に関わる細胞内シグナル伝達経路のカスケードが始動する。

40

【0 0 0 3】

E G F R を標的とし、且つ、E G F R シグナル伝達経路を遮断する様々な癌治療戦略が確立している。小分子チロシンキナーゼ阻害剤、例えば、ゲフィチニブとエルロチニブは細胞内チロシンキナーゼ領域での E G F R の自己リン酸化を妨害することによって下流のシグナル伝達事象を阻害する。抗 E G F R チロシンキナーゼ阻害剤の臨床使用の主要な課題のうちの 1 つはこのクラスの治療薬に対する癌の先天的および後天的な耐性である。他

50

方、ある特定の治療用モノクローナル抗体 (mAb) は EGF R の細胞外部分を標的とし、それによってリガンド結合を妨げることで下流事象を阻害して細胞増殖を抑制する。キメラマウス/ヒト抗 EGF R モノクローナル抗体 C 2 2 5 (またはセツキシマブ) と完全ヒト抗 EGF R モノクローナル抗体であるパニツムマブは転移性大腸癌と頭頸部癌の治療用に認可されており、それらは EGF R の外側部分を標的とする。しかしながら、K R A S 突然変異を含有する腫瘍を有する患者はセツキシマブ療法またはパニツムマブ療法から利益を受けないことが多い。K R A S 突然変異は EGF R が阻害されていても増殖シグナルを絶えず送り続けることで腫瘍細胞におけるシグナル伝達特性を変化させる。

【 0 0 0 4 】

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 M E T はヒト肝細胞増殖因子 (H G F) のヒト受容体である。M E T への H G F の結合によって受容体の二量体化または多量体化、細胞内領域内の複数のチロシン残基のリン酸化、触媒活性化、および下流シグナル伝達が起こる。M E T は受容体の過剰発現、増幅、および突然変異をはじめとするリガンド非依存的な機構によっても活性化される。M E T 活性化によって細胞の増殖、移動、形態形成、および生存が増進し、それらは侵襲性細胞形質および臨床転帰不良と関係する。したがって、M E T も抗癌治療の標的である。例えば、当技術分野においてワン・アームド (one - armed) 5 D 5、O A 5 D 5 または M e t M A b としても知られているオナルツズマブは癌の有望な治療用に開発され、且つ、M E T 刺激性モノクローナル抗体 5 D 5 から派生したヒト化一価拮抗性抗 M E T 抗体である (例えば、S p i g e l , D . R . , et al . , Randomized Phase II Trial of Onartuzumab in Combination With Erlotinib in Patients With Advanced Non Small - Cell Lung Cancer , J . Clinical Oncology , 31 (32) : 4105 - 4114 (2013 年 11 月) および Xiang H . , et al . , Onartuzumab (Met MAb) : Using Nonclinical Pharmacokinetic and Concentration - Effect Data to Support Clinical Development , Clin Cancer Res . , (2013) を参照されたい)。オナルツズマブは M E T に結合し、M E T と共に細胞表面に居続けて H G F 結合とその後の M E T リン酸化ならびに下流シグナル伝達活性および細胞応答を妨害する。

【 0 0 0 5 】

国際公開第 2 0 1 0 / 0 5 9 6 5 4 号パンフレットは、M E T の α 鎖内のエピトープに結合し、且つ、H G F の存在下または不在下で、および既知の M E T アンタゴニストに対して概ね耐性である機能獲得型突然変異を特徴とする腫瘍において M E T の内部移行および/または分解を誘導する高親和性拮抗性抗体をはじめとする様々な M E T 抗体について記載している。国際公開第 2 0 1 0 / 0 5 9 6 5 4 号パンフレットにおいて開示されている M E T 抗体のうちの 1 つである L Y 2 8 7 5 3 5 8 は M E T に対してアゴニスト活性を全く持たないか、または無視できるほどにしか持たないことが報告されている (例えば、Zeng , W . ら、第 1 0 4 回、A A C R 年次大会、ポスター番号 5 4 6 5 (2 0 1 3 年 4 月) を参照されたい)。

【 0 0 0 6 】

米国特許第 7 7 2 3 4 8 4 号明細書は EGF R の活性化を阻害するヒト化および親和性最適化 EGF R 特異的抗体とそれらの抗原結合部分について記載している。より具体的には、この特許は室温で実施される S a p i d y n e K I N E X A によって測定されるとピコモラー以下の結合親和性 (K d) でヒト上皮成長因子受容体 (EGF R) に結合する完全長モノクローナル抗体について特に記載している。

【 0 0 0 7 】

M E T および EGF R は多くの腫瘍で共発現する。一方の受容体の阻害によってしばしば他方の受容体が上方制御される傾向があり、単剤処理に対してすぐに耐性になることが

10

20

30

40

50

多い (Engelman, J. A., et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. Science, 2007; 316:1039-43)。逆に、MET 阻害剤に対して長期にわたって曝露された MET 増幅肺癌細胞は EGF R 経路を介して耐性を発達させる (McDermott, U., et al., 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., 2010; 70(4):1625-34)。MET 抗体と EGF R 抗体の共投与には 2 つの別個の製品の注射または 2 つの異なる抗体の共製剤の単回注射が必要である。2 回の注射は投与量と投与タイミングを自由に行うことができるが、コンプライアンスと痛みの両方の点で患者にとって不都合である。共製剤も投与量についていくらかの自由度を提供することができるが、それら 2 つの異なる抗体の異なる分子特性のために両方の抗体が化学的および物理的に安定であることを可能にする製剤条件を見つけることは多くの場合に非常に難しく、または不可能である。

【0008】

国際公開第 199509917 号パンフレットは、異なる特異性を有する完全抗体に融合した単鎖断片可変 (scFv) 抗体を作製することにより組換え DNA 技術を用いて二特異的 4 価抗体を作製するための方法について開示している。この遺伝子融合体は形質移入により発現して二重特異性を有する 4 価抗体を生じる。しかしながら、当業者が有用な二特異的抗体を作製しようとして国際公開第 199509917 号パンフレットを含む当技術分野の教示に従うと、それにより生じる二特異的抗体の化学的および物理的安定性に関連する重大な問題にしばしば出くわすことが当技術分野において一般に認識されている。しばしば、これらの問題を十分に克服するためにそれにより生じる二特異的抗体においてアミノ酸を変更する必要がある。当技術分野においてはそれにより生じる問題を克服するアミノ酸の変更の必要性も実際の変更も示唆されていない。さらに、必要な変更は日常的なものでも共通一般知識に由来するものでもないことが非常に多い。同様に、既知の抗体から作製された二特異的抗体は親抗体自体と比較すると少なくとも 1 つの重要な機能的薬物動態特性または機能的薬力学特性の点であまり望ましくないといえることが多い。

【0009】

PCT 国際公開第 2010/115551 号パンフレットは三価二特異的抗ヒト EGF R および MET 抗体 (BsAB01) を開示しており、その中で単鎖 Fab 断片、すなわち、ワン・アームド 5D5 がセツキシマブの 2 本の重鎖のうちの 1 本のカルボキシル末端に融合した。BsAB01 は単一特異的一価親 MET 抗体によって誘導される MET の内部移行と比較して MET の内部移行を減少させることが報告されている。OVCA R-8 増殖アッセイにおいて、BsAB01 はセツキシマブとオナルツズマブの混合物による 2 % 阻害に対して 8 % 阻害を誘発した。HGF の存在下で BsAB01 はセツキシマブとオナルツズマブの混合物による 10 % 阻害に対して 15 % 阻害を誘発した。

【0010】

さらに、還元条件下で 2 つの親抗体 (この事例では EGF R または MET のどちらかに対する特異性を有するもの) を混合し、続いて再酸化することを伴う過程である制御 Fab アーム交換 (cFAE) を用いる EGF R と cMET の両方を標的とする二特異的抗体である EM1-mAb の作製が開示されている (Moore, S., EORTC 年次大会、ポスター番号 B241 (2013 年 10 月))。EM1-mAb は少なくとも 1 種類のインビトロ ERK リン酸化アッセイにおいて一価対照抗体の混合物と比較して優れた活性を特に示すことが報告された。

【0011】

米国特許出願公開 2014/0302029 号明細書は EGF R と cMET の両方を標

的とする二特異的抗体の作製について記載しており、それらの抗体は c - M e t に対するマウス抗体（すなわち、A b F 4 6）の親和性成熟化およびヒト化誘導体の I g G 2 F c の C 末端にセツキシマブの配列に基づく抗 E G F R s c F v を融合することにより作製された。

【 0 0 1 2 】

したがって、ある特定の癌の有効な薬理的介入として、高い親和性で M E T と E G F R に結合し、H G F による M E T 活性化と E G F ファミリーリガンドによる E G F R 活性化を効果的に中和し、および / または単剤の混合物と比べて M E T と E G F R（野生型および変異体の両方）の内部移行および / または分解の点で優れた活性を提供する多機能性抗体が必要である。特に、i）1 つ以上の K R A S 突然変異を有することを特徴とする癌をより効果的に治療することができ、i i）単剤の適切な混合物と比較するとエルロチニブ、ゲフィチニブ、ラパチニブおよびベムラフェニブを含むがこれらに限定されない他の M E T 阻害剤および / または E G F R 阻害剤に対する耐性の発生を防止または遅滞化する点で優れた活性を示し、i i i）測定可能なアゴニスト活性を最小限にしか、または全く誘発せず、および / または i v）癌治療において開発および / または使用するために許容可能である熱安定性、溶解性、低自己会合性、ならびに薬物動態特性を含むがこれらに限定されないインビボ安定性、物理的安定性および化学的安定性を示すような抗 M E T / E G F R 抗体が望ましい。しかしながら、本発明者らが国際公開第 2 0 1 0 / 0 5 9 6 5 4 号パンフレットに記載のある特定の抗 M E T 抗体と米国特許第 7 7 2 3 4 8 4 号明細書に記載のある特定の抗 E G F R 抗体を含む四価多機能性抗 M E T / E G F R 抗体を作製しようとして国際公開第 9 5 / 0 9 9 1 7 号パンフレットの教示に概ね従うと、本発明者らは化学的および物理的安定性に関する重大な問題ならびに標的受容体である M E T と E G F R の一方または両方に対する所望の結合特性の喪失に出くわした。したがって、これらの問題を十分に克服するために多数のアミノ酸変更を伴う徹底的な技術的努力が必要であった。当技術分野においては変更の必要性も実際の変更も示唆されていない。さらに、幾つかの変更は日常的なものでも共通一般知識に由来するものでもない。同様に、親抗体自体はこれらの問題を有していなかった。このことは重要な領域の周りの局所的環境が多機能性抗 M E T / E G F R 抗体の文脈では異なっていたことを示唆している。

【 発明の概要 】

【 0 0 1 3 】

したがって、本発明は E G F R と M E T に結合する四価多機能性抗体を提供する。これらの多機能性抗体は細胞表面上での E G F R と M E T の共局在、M E T の内部移行および / または分解、および驚くべきことに高い M E T 発現を有する腫瘍細胞においてセツキシマブと比較してずっと高い程度の E G F R の内部移行と分解を誘導する。また、これらの抗 M E T / E G F R 多機能性抗体は低程度から中程度の M E T 発現を有する腫瘍細胞において親抗 M E T 抗体よりも高い M E T への結合活性を示す。

【 0 0 1 4 】

したがって、本発明は E G F R と M E T に結合する四価多機能性抗体を提供する。これらの多機能性抗体は細胞表面上での E G F R と M E T の共局在、M E T の内部移行および / または分解、および驚くべきことに高い M E T 発現を有する腫瘍細胞においてセツキシマブと比較してずっと高い程度の E G F R の内部移行と分解を誘導する。また、これらの抗 M E T / E G F R 多機能性抗体は低程度から中程度の M E T 発現を有する腫瘍細胞において親抗 M E T 抗体よりも高い M E T への結合活性を示す。さらに、これらの多機能性抗 M E T / E G F R 抗体は細胞培養ならびにマウス異種移植モデルにおける腫瘍細胞増殖の阻害の点で 2 つの個々の抗体の混合物と比較して優れた活性を示す。それらの抗体は、H G F および / または E G F の存在下でエルロチニブおよび P L X 4 0 3 2（すなわち、B - R a f 阻害剤）をはじめとする様々な標的療法に対する腫瘍細胞感受性を復活させる点でも個々の M E T 抗体と E G F R 抗体の組合せよりも優れた活性を有するようである。そのような抗 M E T / E G F R 抗体は高 E G F R 発現腫瘍、または 1 種類以上の抗 E G F R 抗体（例えば、セツキシマブ、パニツムマブなど）および / もしくは E G F R の 1 種類以

上の小分子阻害剤（例えば、エルロチニブ）に対して耐性である、または耐性になった腫瘍であって、K R A S突然変異を有する腫瘍を含むがこれらに限定されない腫瘍に対してより有効である可能性もある。本発明の様々な実施形態ではこれらの多機能性抗体はM E TとE G F Rに同時に結合し、H G FによるM E Tの活性化とE G FによるE G F Rの活性化を中和し、M E TとE G F Rを発現する多くの種類の癌細胞のリガンド依存のおよびリガンド非依存の細胞増殖を抑制し、細胞表面上でのE G F RとM E Tの共局在を誘導し、M E Tの内部移行および/または分解を誘導し、且つ、驚くべきことに高いM E T発現を有する腫瘍細胞においてセツキシマブと比較してずっと高い程度のE G F Rの内部移行と分解を誘導する。

【0015】

10

本発明の実施形態は、

(a) M E Tに結合し、且つ、

(i) それぞれG Y T F T D Y Y M H (配列番号11)、R V N P N R R G T T Y N Q K F E G (配列番号12)、およびA R A N W L D Y (配列番号13)のアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域(C D R)であるH C D R 1、H C D R 2、およびH C D R 3を含む重鎖、および

(ii) それぞれS V S S S V S S I Y L H (配列番号14)、Y S T S N L A S (配列番号15)およびQ V Y S G Y P L T (配列番号16)のアミノ酸配列からなる軽鎖C D RであるL C D R 1、L C D R 2、およびL C D R 3を含む軽鎖

を含む抗体、および

20

(b) ヒトE G F Rに結合し、且つ、

(i) それぞれG F S L T N Y G V H (配列番号1)、X₁がYまたはWであり、且つ、X₂がKまたはTであるV I X₁ S G G N T D Y N T P F X₂ G (配列番号9)、およびA R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号3)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、およびs c F v - H C D R 3を含むH C V Rドメイン、および

(ii) それぞれR A S Y S I G T N I H (配列番号4)、X₁がRまたはYであり、X₂がKまたはSであり、且つ、X₃がEまたはRであるX₁ Y A X₂ X₃ S I S (配列番号10)、およびQ Q N N A W P T T (配列番号6)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、およびs c F v - L C

30

D R 3を含むL C V Rドメイン

を含むs c F vポリペプチド

を含み、且つ、前記s c F vポリペプチドのC末端がペプチドリナーを介して前記M E T抗体重鎖のN末端に融合している多機能性抗体である。

【0016】

本発明の別の実施形態は、

(a) M E Tに結合し、且つ、

(i) 各々がそれぞれG Y T F T D Y Y M H (配列番号11)、R V N P N R R G T T Y N Q K F E G (配列番号12)、およびA R A N W L D Y (配列番号13)のアミノ酸配列からなる重鎖C D RであるH C D R 1、H C D R 2、およびH C D R 3を含む重鎖

40

である第1重鎖と第2重鎖、および

(ii) 各々がそれぞれS V S S S V S S I Y L H (配列番号14)、Y S T S N L A S (配列番号15)およびQ V Y S G Y P L T (配列番号16)のアミノ酸配列からなる軽鎖C D RであるL C D R 1、L C D R 2、およびL C D R 3を含む軽鎖である第1軽鎖と第2軽鎖

を含む抗体、および

(b) 各々がヒトE G F Rに結合し、且つ、各々が

(i) それぞれG F S L T N Y G V H (配列番号1)、X₁がYまたはWであり、且つ、X₂がKまたはTであるV I X₁ S G G N T D Y N T P F X₂ G (配列番号9)、およびA R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号3)のアミノ酸配列からなるs c F v C D

50

Rであるs c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、およびs c F v - H C D R 3を含むH C V Rドメイン、および

(i i)それぞれR A S Y S I G T N I H (配列番号4)、X₁がRまたはYであり、X₂がKまたはSであり、且つ、X₃がEまたはRであるX₁ Y A X₂ X₃ S I S (配列番号10)、およびQ Q N N A W P T T (配列番号6)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、およびs c F v - L C D R 3を含むL C V Rドメイン

を含むs c F vポリペプチドである第1 s c F vポリペプチドと第2 s c F vポリペプチド

を含み、且つ、前記第1 s c F vポリペプチドのC末端がペプチドリinkerを介して前記第1重鎖のN末端に融合しており、前記第2 s c F vポリペプチドのC末端がペプチドリinkerを介して前記第2重鎖のN末端に融合している多機能性抗体である。

10

【0017】

本発明の追加の実施形態は、2つの第1ポリペプチドと2つの第2ポリペプチドを含み、両方の第1ポリペプチドが配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号52または配列番号53のアミノ酸配列を含み、且つ、両方の第2ポリペプチドが配列番号33のアミノ酸配列を含む多機能性抗体であって、E G F RとM E Tに結合する前記多機能性抗体である。

【0018】

本発明の別の実施形態は、前述の多機能性抗体のうちのいずれか1つまたはそのM E TおよびE G F R結合断片、および薬学的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤を含む医薬組成物である。

20

【0019】

本発明の別の実施形態は、治療に使用するための前述の多機能性抗体のうちのいずれか1つまたはそのM E TおよびE G F R結合断片である。

【0020】

本発明の別の実施形態は、癌の治療に使用するための前述の多機能性抗体のうちのいずれか1つまたはそのM E TおよびE G F R結合断片である。

【0021】

本発明の別の実施形態は、患者の腫瘍がM E TとE G F Rの両方を発現している癌の治療に使用するための前述の多機能性抗体のうちのいずれか1つまたはそのM E TおよびE G F R結合断片である。

30

【0022】

本発明の別の実施形態は、患者の腫瘍が低レベル、中レベル、または高レベルでM E Tおよび/またはE G F Rを発現している癌、ならびに/または1種類以上の抗E G F R抗体(例えば、セツキシマブ、パニツムマブなど)および/もしくはE G F Rの1種類以上の小分子阻害剤(例えば、エルロチニブ)に対して耐性である、または耐性になった腫瘍であって、K R A S突然変異を有する腫瘍を含むがこれらに限定されない腫瘍の治療に使用するための前述の多機能性抗体のうちのいずれか1つまたはそのM E TおよびE G F R結合断片である。当該発明の様々な実施形態では患者の腫瘍が低レベル、中レベル、または高レベルでM E Tおよび/またはE G F Rを発現している癌、ならびに/または1種類以上の抗E G F R抗体(例えば、セツキシマブ、パニツムマブなど)および/もしくはE G F Rの1種類以上の小分子阻害剤(例えば、エルロチニブ)に対して耐性である、または耐性になった腫瘍であって、1つ以上のK R A S突然変異を有する腫瘍を含むがこれらに限定されない腫瘍を治療するための多機能性抗体またはそのM E TおよびE G F R結合断片の使用は、本発明の多機能性抗体またはそのM E TおよびE G F R結合断片を患者に投与するステップの前に癌の治療を必要とする患者を特定するステップをさらに含み得る。

40

【0023】

本発明の別の実施形態は、N S C L C、S C L C、胃癌、大腸癌、胆管癌、食道癌、ブ

50

ドウ膜黒色腫を含むがこれに限定されない黒色腫、腎臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸部癌、または頭頸部癌の治療に使用するための前述の多機能性抗体のうちのいずれか1つまたはそのMETおよびEGFR結合断片である。

【0024】

本発明の別の実施形態は癌を治療する方法であって、それを必要とするヒト患者に前述の多機能性抗体のうちのいずれか1つまたはそのMETおよびEGFR結合断片の有効量を投与することを含む方法である。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】抗MET/EGFR多機能性抗体NH-YKおよびNH-H9が癌細胞株H1993 (NSCLC)、MKN45 (胃癌)、およびH441 (NSCLC) においてEGFRとMETの分解を誘導することを示しているウエスタンブロッティングの結果を図示している図である。それらの癌細胞株は100 nMの抗体NH-YK、抗体NH-H9または対照抗体で処理された。EGFRとMETの分解は細胞溶解物のウエスタンブロッティングによって決定された。抗MET/EGFR多機能性抗体NH-YKおよびNH-H9はEGFRのかなりの分解を引き起こすが、セツキシマブまたは親抗MET抗体とセツキシマブの混合物はそうではなかった。レーン1: hIgG4; レーン2: 抗MET抗体; レーン3: セツキシマブ; レーン4: 抗MET抗体 + セツキシマブ; レーン5: NH-YK; レーン6: NH-H9。

10

【0026】

【図2】H1993マウス異種移植モデルにおいて腫瘍体積がベヒクル対照または親抗MET抗体とセツキシマブの混合物の投与と比較すると(86.1%のT/C%)抗MET/EGFR多機能性抗体NH-YKの投与によって有意に減少する(28.5%のT/C%、 $p < 0.001$)ことを示しているグラフである。

20

【0027】

【図3】H441マウス異種移植モデルにおいて腫瘍体積がベヒクル対照または親抗MET抗体とセツキシマブの混合物の投与と比較すると抗MET/EGFR多機能性抗体NH-YKの投与によって有意に減少する(28.5%のT/C%、 $p < 0.001$)ことを示しているグラフである。

【0028】

【図4】EBC-1 NSCLCマウス異種移植モデルにおいて腫瘍体積がベヒクル対照の投与と比較すると抗MET/EGFR多機能性抗体NH-YKの投与によって有意に減少する(32.9%のT/C% ($p < 0.001$))ことを示しているグラフである。

30

【0029】

【図5】MKN45胃異種移植モデルにおいて親抗MET抗体とセツキシマブの混合物またはベヒクル対照の投与と比較すると抗MET/EGFR多機能性抗体NH-YKの投与によって同等の抗腫瘍作用(それぞれT/C% = 17.4%、 $p < 0.001$ および18.6%、 $p < 0.001$)が生じることを示しているグラフである。

【0030】

【図6】H1993 NSCLC異種移植片を担持する免疫不全マウスにおいて抗MET/EGFR多機能性抗体H9の27 mg/kgでの投与によって他のあらゆる処理よりも有意に高い抗腫瘍作用が生じたことを示しているグラフである。マウス異種移植片は、連続5週間にわたって週に一度ベヒクル対照、抗MET/EGFR多機能性抗体H9 (4 mg/kgおよび27 mg/kg)、抗METのみ (3 mg/kgおよび20 mg/kg)、セツキシマブ (3 mg/kgおよび20 mg/kg)、または抗METとセツキシマブの混合物 (それぞれの抗体について3 mg/kgと20 mg/kg) のいずれかで処理された。

40

【0031】

【図7】H441異種移植片を担持する免疫不全マウスにおいて抗MET/EGFR多機能性抗体H9の27 mg/kgでの投与によって他のあらゆる処理よりも有意に高い抗腫

50

瘍作用が生じたことを示しているグラフである。マウス異種移植片は、連続5週間にわたって週に一度ベヒクル対照、抗MET/EGFR多機能性抗体H9(4mg/kgおよび27mg/kg)、抗METのみ(3mg/kgおよび20mg/kg)、セツキシマブ(3mg/kgおよび20mg/kg)、または抗METとセツキシマブの混合物(それぞれの抗体について3mg/kgと20mg/kg)のいずれかで処理された。

【発明を実施するための形態】

【0032】

「EGFR」、「ErbB1」、および「EGF受容体」という用語はEGFRタンパク質(例えば、UniProtKB/Swiss-ProtエントリP00533を参照されたい)を指すために本明細書において互換的に使用される。本明細書において、「EGFR細胞外ドメイン」または「EGFR ECD」は細胞膜に固定されているか、または循環している細胞外にあるEGFRのドメインであって、その断片を含むものを指す。1つの実施形態ではEGFRの細胞外ドメインは、境界はおおよそそのものであり、約1~3アミノ酸変わり得るが、「ドメインI」(アミノ酸残基約1~158)、「ドメインII」(アミノ酸残基159~336)、「ドメインIII」(アミノ酸残基337~470)、および「ドメインIV」(アミノ酸残基471~645)の4つのドメインを含み得る。

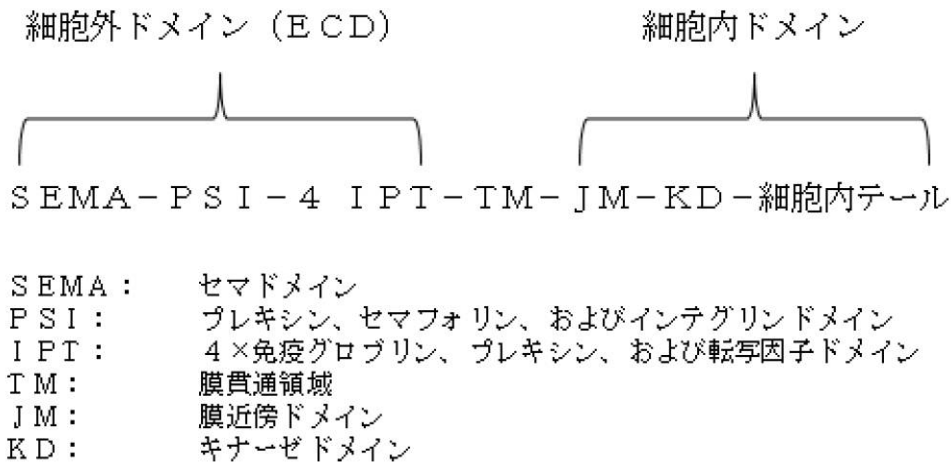
10

【0033】

「METポリペプチド」、「MET受容体」、「MET」、「HGF受容体」または「HGF」という用語は本明細書において互換的に使用され、別段の指示が無い限りヒト肝細胞増殖因子に結合するヒト受容体チロシンキナーゼならびにその機能的に活性である突然変異型を指すものとする。METの具体例には、例えば、GenBank受託番号NM_000245で規定されるヌクレオチド配列によってコードされるヒトポリペプチド、またはGenBank受託番号NP_000236で規定されるポリペプチド配列によってコードされるヒトタンパク質が挙げられる。METの構造は模式的に次のように示される。

20

【化1】



30

40

【0034】

ヒトMETの細胞外ドメイン(本明細書においてはMET-ECD)は例えば配列番号35に示されるアミノ酸配列を有する。しかしながら、配列番号35のアミノ酸1~24はシグナル配列を含む。したがって、別段の指定が無い限り、本明細書において使用される場合の「MET-ECD」という用語は配列番号35のアミノ酸25で始まりアミノ酸932で終わる成熟タンパク質(すなわち、配列番号36)を意味する。SEMAドメインはMETのN末端のおよそ500アミノ酸残基から成り、α鎖(配列番号35のアミノ酸残基25~307(すなわち、配列番号37)とβ鎖の一部(配列番号35のアミノ酸残基308~519(すなわち、配列番号38))を含む。

50

【 0 0 3 5 】

本明細書において使用される場合、腫瘍または細胞株について M E T または E G F R の細胞表面発現を言及するときの「低程度」、「中程度」、および「高程度」という用語はそれぞれ細胞あたり約 30 万未満の数の受容体、約 30 万を超える数の受容体、および約 100 万を超える数の受容体を意味するものとする。

【 0 0 3 6 】

本明細書において使用される場合、「多機能性抗体」は 1 つの抗原結合特異性を有する抗体および異なる抗原結合特異性を有する抗原結合断片を含む分子を指す。好ましくは、多機能性抗体は i) M E T に対する抗原結合特異性を有する抗体および i i) E G F R に対する抗原結合特異性を有する単鎖可変断片 (s c F v) を含む分子を指す。

10

【 0 0 3 7 】

別段の指示が無い限り、「抗体」という用語は本明細書において使用される場合にジスルフィド結合によって連結されている 2 本の重鎖 (H C) と 2 本の軽鎖 (L C) を含む免疫グロブリン分子を指すものとする。各鎖のアミノ末端部分はそこに含まれる C D R を介した抗原認識に主に関与する約 100 ~ 約 110 アミノ酸からなる可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分はエフェクター機能に主に関与する定常領域を規定する。

【 0 0 3 8 】

別段の指示が無い限り、「N H - Y K」という用語は本発明の多機能性抗体への言及で本明細書において使用される場合に 2 つの第 1 ポリペプチドと 2 つの第 2 ポリペプチドを含み、両方の第 1 ポリペプチドが配列番号 27 のアミノ酸配列を含み、且つ、両方の第 2 ポリペプチドが配列番号 33 のアミノ酸配列を含む多機能性抗体であって、E G F R と M E T に結合する前記多機能性抗体を指すものとする。

20

【 0 0 3 9 】

別段の指示が無い限り、「N H - H 9」という用語は本発明の多機能性抗体への言及で本明細書において使用される場合に 2 つの第 1 ポリペプチドと 2 つの第 2 ポリペプチドを含み、両方の第 1 ポリペプチドが配列番号 29 のアミノ酸配列を含み、且つ、両方の第 2 ポリペプチドが配列番号 33 のアミノ酸配列を含む多機能性抗体であって、E G F R と M E T に結合する前記多機能性抗体を指すものとする。

【 0 0 4 0 】

別段の指示が無い限り、「H 9」という用語は本発明の多機能性抗体への言及で本明細書において使用される場合に 2 つの第 1 ポリペプチドと 2 つの第 2 ポリペプチドを含み、両方の第 1 ポリペプチドが配列番号 52 のアミノ酸配列を含み、且つ、両方の第 2 ポリペプチドが配列番号 33 のアミノ酸配列を含む多機能性抗体であって、E G F R と M E T に結合する前記多機能性抗体を指すものとする。

30

【 0 0 4 1 】

別段の指示が無い限り、「Y K」という用語は本発明の多機能性抗体への言及で本明細書において使用される場合に 2 つの第 1 ポリペプチドと 2 つの第 2 ポリペプチドを含み、両方の第 1 ポリペプチドが配列番号 31 のアミノ酸配列を含み、且つ、両方の第 2 ポリペプチドが配列番号 33 のアミノ酸配列を含む多機能性抗体であって、E G F R と M E T に結合する前記多機能性抗体を指すものとする。

40

【 0 0 4 2 】

「抗原結合断片」という用語は本明細書において使用される場合に抗原に結合する能力を保持するあらゆる抗体断片を意味するものとする。そのような「抗原結合断片」は F v 断片、s c F v 断片、F a b 断片、F (a b ')₂ 断片、F a b ' 断片、s c F v - F c 断片およびディアボディからなる群より選択され得る。抗体の抗原結合断片は典型的には少なくとも 1 つの可変領域を含む。好ましくは、抗原結合断片は重鎖可変領域 (H C V R) と軽鎖可変領域 (L C V R) を含む。より好ましくは、抗原結合断片は M E T と E G F R の両方に対する抗原結合特異性を付与する H C V R と L C V R を含む (すなわち、「M E T および E G F R 結合断片」)。

【 0 0 4 3 】

50

「相補性決定領域」および「CDR」という用語は本明細書において使用される場合に抗体またはその抗原結合断片のHCポリペプチドとLCポリペプチドの両方の可変領域内に見られる非連続的な抗原結合位置を意味するものとする。これらの特定の領域はKabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971)、Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版、米国保険福祉省、NIH文書番号91-3242 (1991年)、Chothia, et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)、MacCallum, et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)、および North, et al., J. Mol. Biol., 406, 228-256 (2011)を含む他の文書に記載されており、相互に比較すると重複するアミノ酸残基または部分集合になっているアミノ酸残基が定義に含まれる。

10

20

30

40

50

【0044】

CDRにはフレームワーク領域(「FR」と呼ばれるよりよく保存されている領域が点在する。LCVRとHCVRの各々がアミノ末端からカルボキシ末端まで次の順序: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で配置されている3つのCDRと4つのFRから構成されている。軽鎖の3つのCDRは「LCDR1、LCDR2、およびLCDR3」と呼ばれ、重鎖の3つのCDRは「HCDR1、HCDR2、およびHCDR3」と呼ばれる。それらのCDRは抗原との特異的な相互作用を形成する残基の大半を含む。LCVR領域内およびHCVR領域内でのCDRアミノ酸残基の番号付けと位置付けは公知の慣習(例えば、Kabat (1991)、Chothia (1987)、および/または North (2011))に従う。本発明の様々な実施形態では前記抗体および/または抗原結合断片(例えば、scFv)のFRはヒト生殖系列配列と同一であっても自然にまたは人工的に修飾されていてもよい。

【0045】

「単鎖可変断片」または「scFv」または「scFvポリペプチド」はリンカー分子を介して連結されているLCVRドメインとHCVRドメインを含む単一折り畳みポリペプチドを指す。そのようなscFvポリペプチドではHCVRドメインとLCVRドメインはHCVR-リンカー-LCVRの順序またはLCVR-リンカー-HCVRの順序のどちらかであり得る。そのリンカーは、抗原を認識するための機能的単量体単位としてHCVRドメインとLCVRドメインが折りたたまれることを可能にする柔軟なペプチドリンカーであり得る。scFvのLCVRドメインの3つのCDRは本明細書において「scFv-LCDR1、scFv-LCDR2、およびscFv-LCDR3」と呼ばれ、scFvのHCVRドメインの3つのCDRは本明細書において「scFv-HCDR1、scFv-HCDR2、およびscFv-HCDR3」と呼ばれる。

【0046】

「表面プラズモン共鳴(SPR)」という用語は本明細書において使用される場合に例えばBiacore(商標)システム(Biacoreライフサイエンス・ディビジョン、GEヘルスケア社、ピスカタウェイ、ニュージャージー州)を使用してバイオセンサーマトリックス内でタンパク質濃度の変化を検出することによりリアルタイムでの相互作用分析を可能にする光学的現象を指す。

【0047】

「 K_D 」という用語は本明細書において使用される場合に特定の抗体抗原間相互作用または抗体断片抗原間相互作用の平衡解離定数を指すものとする。

【0048】

「特異的に結合する」という用語またはそのような用語は抗体またはその抗原結合断片が生理的条件下で抗原と比較的に安定な複合体を形成することを意味する。抗体が抗原に特異的に結合するか決定するための方法は当技術分野においてよく知られており、それら

には、例えば、平衡透析、SPRなどが含まれる。例えば、METまたはEGFRに「特異的に結合する」抗体は、本発明の文脈で使用される場合、SPRアッセイで測定すると約10 nM未満、約5 nM未満、約4 nM未満、約3 nM未満、約2 nM未満、約1 nM未満、約0.5 nM未満、約0.3 nM未満、約0.2 nM未満、または約0.1 nM未満の K_D でMET-ECD（またはその一部）および/またはEGFR-ECD（またはその一部）に結合する抗体を含む（例えば、本明細書中の実施例1を参照されたい）。好ましくは、本発明の多機能性抗体はSPRアッセイで測定すると約10 nMと約0.1 nMの間、約5 nMと約0.1 nMの間、約2 nMと約0.1 nMの間、約1 nMと約0.1 nMの間、約0.75 nMと約0.1 nMの間、約0.5 nMと約0.1 nMの間の K_D でMET-ECD（またはその一部）およびEGFR-ECD（またはその一部）に特異的に結合する。

10

【0049】

「エピトープ」という用語はパラトープとして知られる抗体分子の可変領域内の特定の抗原結合部位と相互作用する抗原性決定因子を指す。単一の抗原が1つより多くのエピトープを有することがあり得る。したがって、異なる抗体が一抗原上の異なる領域に結合することもあれば、異なる生物学的効果を有することもある。エピトープは立体的または直鎖状のどちらかであり得る。立体構造エピトープは直鎖状ポリペプチド鎖の様々な区分に由来する空間的に並置されているアミノ酸によって形成される。直鎖状エピトープはポリペプチド鎖内の隣接するアミノ酸残基により形成されるものである。ある特定の状況ではエピトープは抗原上の多糖、ホスホリル基、またはスフホニル基の部分を含み得る。

20

【0050】

「リンカー分子」または「リンカー」という用語は本発明内で使用される場合に好ましくはペプチドリリンカーを表す。本発明のある特定の実施形態で活用されるペプチドリリンカーは、抗体、抗原結合部位、および/または様々な抗原結合部位を含む抗体断片（例えばscFv、完全長抗体、 V_H ドメインおよび/または V_L ドメイン）を結合して本発明に従う多機能性抗体を形成するために使用される。好ましくは、それらのペプチドリリンカーは少なくとも5アミノ酸を有する、好ましくは少なくとも10アミノ酸からなる、より好ましくは10アミノ酸と50アミノ酸の間の高グリシンペプチドである。本発明の幾つかの実施形態では前記高グリシンペプチドリリンカーは $(G_xS)_n$ であり、 G = グリシン、 S = セリン、 $(x = 3$ および $n = 3, 4, 5$ または $6)$ または $(x = 4$ および $n = 2, 3, 4$ または $5)$ である。例えば、本発明の幾つかの実施形態では前記高グリシンペプチドリリンカーは $(G_xS)_n$ であり、 G = グリシン、 S = セリン、 $x = 4$ および $n = 2, 3, 4$ または 5 である（すなわち、それぞれGGGGSGGGGS（配列番号47）、GGGGSGGGGS（配列番号48）、GGGGSGGGGS（配列番号49）、またはGGGGSGGGGS（配列番号50）。本発明のある特定の実施形態では追加のグリシンまたはトレオニン、例えば、GSTG、TG、GG、またはGGGTを $(G_xS)_n$ 形式の高グリシンペプチドリリンカーのどちらかの末端に付加することができる。例えば、本発明の幾つかの実施形態では前記高グリシンペプチドリリンカーはGGGSGGGGS（配列番号51）である。

30

40

【0051】

「C末端」という用語、およびカルボキシル末端、カルボキシ末端、C末端、C終端、またはCOOH末端を含むがこれらに限定されないその用語の文法的変形は、遊離カルボキシル基（-COOH）によって終了することがあり得るアミノ酸鎖（タンパク質またはポリペプチド）の終端を表すために本明細書において使用される。タンパク質がメッセンジャーRNAから翻訳されるとき、そのタンパク質はN末端からC末端に向かって作製される。ペプチド配列を表すための習慣によると、C終端は右側に示され、N末端からC末端に向かって配列が記載される。

【0052】

「N末端」という用語、およびアミノ末端、 NH_2 末端、N終端またはアミン末端を含

50

むがこれらに限定されないその用語の文法的変形は、遊離アミン基（ $-NH_2$ ）を有するアミノ酸によって終了するアミノ酸鎖（タンパク質またはポリペプチド）の開始点を表すために本明細書において使用される。ペプチド配列を表すための習慣によると、N末端は左側に配置され、N末端からC末端に向かって配列が記載される。

【0053】

「ヒト型操作抗体」または「ヒト化抗体」という語句は本明細書において開示される抗体化合物、ならびに本明細書において開示される抗体化合物と類似の結合特性および機能特性を有し、且つ、非ヒト抗体に由来するCDRの周囲に実質的にヒト型または完全にヒト型であるフレームワーク領域を有する抗体およびそれらの抗原結合断片を指す。「フレームワーク領域」または「フレームワーク配列」はフレームワーク領域1～4のいずれか1つを指す。本発明によって包含されるヒト型操作抗体および抗原結合断片にはフレームワーク領域1～4のいずれか1つ以上が実質的または完全にヒト型である化合物、すなわち、それぞれ実質的または完全にヒト型であるフレームワーク領域1～4の可能な組合せのうちのいずれかが存在する化合物が含まれる。例えば、これにはフレームワーク領域1とフレームワーク領域2、フレームワーク領域1とフレームワーク領域3、フレームワーク領域1、2、および3、などが実質的または完全にヒト型である抗原結合化合物が含まれる。実質的にヒト型のフレームワークは公知のヒト生殖系列フレームワーク配列に対して少なくとも約80%の配列同一性を有するフレームワークである。それらの実質的にヒト型のフレームワークは公知のヒト生殖系列フレームワーク配列に対して少なくとも約85%、約90%、または約95%の配列同一性を有することが好ましい。

10

20

【0054】

完全にヒト型のフレームワークは公知のヒト生殖系列フレームワーク配列と同一のフレームワークである。ヒトフレームワーク生殖系列配列は当技術分野において知られており、それらの配列はIMGT（登録商標）、すなわち、国際Immunogenetics情報システム（例えば、Marie-Paule Lefranc, et al., Nucleic Acid Research, volume 37, Database issue, D1006-D1012を参照されたい）を含む様々な情報源から、またはMarie-Paule Lefranc および Gerard Lefranc著、The Immunoglobulin Facts Book、Academic Press, 2001年、ISBN 012441351から入手可能である。例えば、A11、A17、A18、A19、A20、A27、A30、L1、L11、L12、L2、L5、L15、L6、L8、O12、O2、およびO8からなる群より生殖系列軽鎖フレームワークを選択することができ、およびVH2-5、VH2-26、VH2-70、VH3-20、VH3-72、VH1-46、VH3-9、VH3-66、VH3-74、VH4-31、VH1-18、VH1-69、V1-13-7、VH3-11、VH3-15、VH3-21、VH3-23、VH3-30、VH3-48、VH4-39、VH4-59、およびVH5-51からなる群より生殖系列重鎖フレームワーク領域を選択することができる。

30

【0055】

本明細書において開示される抗体化合物と類似の機能特性を示すヒト型操作抗体は幾つかの異なる方法を用いて作製され得る。本明細書において開示される特定の抗体化合物を鋳型または親抗体化合物として使用して追加の抗体化合物を調製することができる。1つのアプローチでは親抗体化合物のCDRを親抗体化合物フレームワークと高い配列同一性を有するヒトフレームワークに融合させる。概して、その新しいフレームワークの配列同一性は親抗体化合物中の対応するフレームワークの配列に対して少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%同一である。この融合により、親抗体の結合親和性と比較して低下した結合親和性が生じ得る。この場合はQueen et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2869によって開示された特別の基準に基づいてある特定の位置でそのフレームワークを突然変異させて親フレームワークに戻すことができる。マウス抗体のヒト化に有用な方法について記載しているその他の参考文献には

40

米国特許第4816397号明細書、第5225539号明細書、および第569376

50

1号明細書；Levitt, J. Mol. Biol. 168:595-620 (1983)に記載されるコンピュータープログラムであるABMODおよびENCAD、およびWinterおよび共同研究者の方法(Jones et al. Nature 321:522-525 (1986)；Riechmann, et al. Nature, 332:323-327 (1988)、および、et al. Science 239:1534-1536 (1988)が含まれる。

【0056】

本発明の教示の適用に当たって、当業者は本開示のCDR配列およびフレームワーク配列内のアミノ酸を置換し、それによって本配列に由来する可変領域アミノ酸配列をさらに作製するために一般的技術、例えば、部位特異的突然変異形成を用いることができる。特定の置換部位において最大で19種類全ての代替的天然アミノ酸を導入することができる。その後、表示されているインビボ機能を有する配列を特定するために本明細書において開示されている方法を用いてこれらの追加の可変領域アミノ酸配列をスクリーニングすることができる。このように本発明に準ずるヒト型操作抗体およびそれらの抗原結合部分の調製に適切な追加の配列を特定することができる。好ましくは、フレームワーク内のアミノ酸置換は本明細書において開示される3つの軽鎖フレームワーク領域および/または重鎖フレームワーク領域のいずれか1つ以上の中の1つ、2つ、または3つの位置に限定される。好ましくは、それらのCDR内のアミノ酸置換はそれら3つの軽鎖CDRおよび/または重鎖CDRのいずれか1つ以上の中の1つ、2つ、または3つの位置に限定される。上で記載されたこれらのフレームワーク領域およびCDR内の様々な変更の組合せも本明細書において企図されている。

【0057】

下の表1および2は本明細書において開示される好ましいヒト型操作抗体のCDRのアミノ酸配列とコンセンサスアミノ酸配列、および本明細書において開示される好ましいヒト型操作抗体またはそれらの抗原結合断片のHCVRポリペプチドとLCVRポリペプチドのアミノ酸配列の配列番号を示している。

【表1】

表1

	HCDR1	HCDR2	HCDR3	HCVR
抗EGFR scFv YK	GFSLTNYGVH (配列番号1)	VIYSGGNTDYNTPFKG (配列番号2)	ARALDYDYDFAY (配列番号3)	17
抗EGFR scFv H9	GFSLTNYGVH (配列番号1)	VIWSGGNTDYNTPFTH (配列番号7)	ARALDYDYDFAY (配列番号3)	19
抗EGFR scFv コンセンサ ス	GFSLTNYGVH (配列番号1)	VIX ₁ SGGNTDYNTPF _{X₂} G (配列番号9)	ARALDYDYDFAY (配列番号3)	
抗Met抗 体	GYTFTDYMH (配列番号11)	RVNPNRRGTTYNQKFE (配列番号12)	ARANWLDY (配列番号13)	21

上の表1においてX₁はYまたはWであり、X₂はKまたはTである。

【表 2】
表 2

	LCDR1	LCDR2	LCDR3	LCVR
抗 EGFR scFv YK	RASYSIGTNIH (配列番号 4)	RYAKESIS (配列番号 5)	QQNNAWPTT (配列番号 6)	18
抗 EGFR scFv H9	RASYSIGTNIH (配列番号 4)	YYASRSIS (配列番号 8)	QQNNAWPTT (配列番号 6)	20
抗 EGFR scFv コンセンサ ス	RASYSIGTNIH (配列番号 4)	X ₁ YA X ₂ X ₃ SIS (配列番号 10)	QQNNAWPTT (配列番号 6)	
抗 ME T 抗 体	SVSSSVSSIYLH (配列番号 14)	YSTSNLAS (配列番号 15)	QVYSGYPLT (配列番号 16)	22

上の表 2 において X₁ は R または Y であり、X₂ は K または S であり、X₃ は E または R である。

【 0 0 5 8 】

本発明の実施形態は、

(a) 次のもの :

(i) V V D T Y Y D D Q L (配列番号 3 9)、

(i i) I S C G S V N R G T C Q R H V F P H N H T A D I Q S (配列番号 4 0)

、

(i i i) A L G A K V L S S V K D R F I N F (配列番号 4 1)、および

(i v) V R R L K E T K D G F M (配列番号 4 2)

からなる群より選択されるアミノ酸配列において ME T の α 鎖内のエピトープに結合する抗体、および

(b) E G F R に結合し、且つ、

(i) それぞれ G F S L T N Y G V H (配列番号 1)、X₁ が Y または W であり、且つ、X₂ が K または T である V I X₁ S G G N T D Y N T P F X₂ G (配列番号 9)、および A R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号 3) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、および s c F v - H C D R 3 を含む H C V R ドメイン、および

(i i) それぞれ R A S Y S I G T N I H (配列番号 4)、X₁ が R または Y であり、X₂ が K または S であり、且つ、X₃ が E または R である X₁ Y A X₂ X₃ S I S (配列番号 10)、および Q Q N N A W P T T (配列番号 6) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、および s c F v - L C D R 3 を含む L C V R ドメイン

を含む s c F v ポリペプチド

を含む多機能性抗体であって、細胞表面の ME T と E G F R の内部移行および / または分解を誘導する前記多機能性抗体である。

【 0 0 5 9 】

当該発明の様々な実施形態では前記多機能性抗体はアミノ酸配列 i) V V D T Y Y D D Q L (配列番号 3 9)、i i) I S C G S V N R G T C Q R H V F P H N H T A D I Q S

10

20

30

40

50

(配列番号40)、*iii*) ALGAKVLSSVKDRFINF (配列番号41)、および/または *iv*) VRRLETKDGF (配列番号42) においてMETのα鎖内のエピトープに結合する。当該発明の様々な実施形態では前記多機能性抗体は次のもの:

- (*i*) DTYDD (配列番号43)、
- (*ii*) HVFPNHTADIQS (配列番号44)、
- (*iii*) FINF (配列番号45)、および
- (*iv*) KETKDGFM (配列番号46)

からなる群より選択されるアミノ酸配列においてMETのα鎖内のエピトープに結合し得る。

【0060】

10

当該発明の様々な実施形態では前記多機能性抗体はアミノ酸配列DTYDD (配列番号43)、HVFPNHTADIQS (配列番号44)、FINF (配列番号45)、およびKETKDGFM (配列番号46)の全てを特徴とする立体構造エピトープに結合し得る。さらに、当該発明の様々な実施形態では前記多機能性抗体は細胞表面のMETとEGFRのそれぞれHGF非依存のおよびEGF非依存の内部移行および/または分解を誘導する。当該発明の他の実施形態ではEGFRに結合する前記scFvポリペプチドは、

i) それぞれGFSLTNYGVH (配列番号1)、VIYSGGNTDYNTPFKG (配列番号2)、およびARALDYDYDFAY (配列番号3)のアミノ酸配列からなるscFv CDRであるscFv-HCDR1、scFv-HCDR2、およびscFv-HCDR3を含むHCVRドメイン、および *ii*) それぞれRASYSIGTNIH (配列番号4)、RYAKESIS (配列番号5)、およびQQNNAWPTT (配列番号6)のアミノ酸配列からなるscFv CDRであるscFv-LCDR1、scFv-LCDR2、およびscFv-LCDR3を含むLCVRドメインを含む。当該発明の他の実施形態ではEGFRに結合する前記scFvポリペプチドは、*i*) それぞれGFSLTNYGVH (配列番号1)、VIYSGGNTDYNTPFKG (配列番号2)、およびARALDYDYDYDFAY (配列番号3)のアミノ酸配列からなるscFv CDRであるscFv-HCDR1、scFv-HCDR2、およびscFv-HCDR3を含むHCVRドメイン、および *ii*) それぞれRASYSIGTNIH (配列番号4)、RYAKESIS (配列番号5)、およびQQNNAWPTT (配列番号6)のアミノ酸配列からなるscFv CDRであるscFv-LCDR1、scFv-LCDR2、およびscFv-LCDR3を含むLCVRドメインを含み、且つ、前記scFvポリペプチドのC末端がペプチドリンカーを介して前記MET抗体重鎖のN末端に融合している。

20

30

【0061】

本発明の実施形態は、

- (a) METに結合し、且つ、

(*i*) それぞれGYTFTDYMH (配列番号11)、RVNPNRRGTTYNQKFE (配列番号12)、およびARANWLDY (配列番号13)のアミノ酸配列からなる重鎖CDRであるHCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む重鎖、および

40

(*ii*) それぞれSVSSSVSSIYLH (配列番号14)、YSTSNLAS (配列番号15) およびQVYSGYPLT (配列番号16)のアミノ酸配列からなる軽鎖CDRであるLCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む軽鎖を含む抗体、および

- (b) EGFRに結合し、且つ、

(*i*) それぞれGFSLTNYGVH (配列番号1)、 X_1 がYまたはWであり、且つ、 X_2 がKまたはTであるVI X_1 SGGNTDYNTPF X_2 G (配列番号9)、およびARALDYDYDYDFAY (配列番号3)のアミノ酸配列からなるscFv CDRであるscFv-HCDR1、scFv-HCDR2、およびscFv-HCDR3を

50

含むH C V Rドメイン、および

(i i)それぞれR A S Y S I G T N I H (配列番号4)、 X_1 がRまたはYであり、 X_2 がKまたはSであり、且つ、 X_3 がEまたはRである $X_1 Y A X_2 X_3 S I S$ (配列番号10)、およびQ Q N N A W P T T (配列番号6)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、およびs c F v - L C D R 3を含むL C V Rドメイン

を含むs c F vポリペプチド

を含む多機能性抗体である。

【0062】

当該発明の他の実施形態ではE G F Rに結合する前記s c F vポリペプチドは、

(i)それぞれG F S L T N Y G V H (配列番号1)、V I Y S G G N T D Y N T P F K G (配列番号2)、およびA R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号3)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、およびs c F v - H C D R 3を含むH C V Rドメイン、および

(i i)それぞれR A S Y S I G T N I H (配列番号4)、R Y A K E S I S (配列番号5)、およびQ Q N N A W P T T (配列番号6)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、およびs c F v - L C D R 3を含むL C V Rドメイン

を含む。

【0063】

当該発明の他の実施形態ではE G F Rに結合する前記s c F vポリペプチドは配列番号17のアミノ酸配列を含むH C V Rドメインと配列番号18のアミノ酸配列を含むL C V Rドメインを含む。当該発明の他の実施形態ではE G F Rに結合する前記s c F vポリペプチドは、

(i)それぞれG F S L T N Y G V H (配列番号1)、V I Y S G G N T D Y N T P F K G (配列番号2)、およびA R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号3)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、およびs c F v - H C D R 3を含むH C V Rドメイン、および

(i i)それぞれR A S Y S I G T N I H (配列番号4)、R Y A K E S I S (配列番号5)、およびQ Q N N A W P T T (配列番号6)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、およびs c F v - L C D R 3を含むL C V Rドメイン

を含み、且つ、前記s c F vポリペプチドのC末端がペプチドリinkerを介して前記M E T抗体重鎖のN末端に融合している。

【0064】

当該発明の他の実施形態では前記多機能性抗体は、

(i)配列番号53のアミノ酸配列を含む重鎖、および

(i i)配列番号33のアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む。

【0065】

本発明の実施形態は、

(a)M E Tに結合し、且つ、

(i)それぞれG Y T F T D Y Y M H (配列番号11)、R V N P N R R G T T Y N Q K F E G (配列番号12)、およびA R A N W L D Y (配列番号13)のアミノ酸配列からなる重鎖C D RであるH C D R 1、H C D R 2、およびH C D R 3を含む重鎖、および

(i i)それぞれS V S S S V S S I Y L H (配列番号14)、Y S T S N L A S (配列番号15)およびQ V Y S G Y P L T (配列番号16)のアミノ酸配列からなる軽鎖C D RであるL C D R 1、L C D R 2、およびL C D R 3を含む軽鎖

を含む抗体、および

10

20

30

40

50

(b) EGF Rに結合し、且つ、

(i) それぞれG F S L T N Y G V H (配列番号1)、 X_1 がYまたはWであり、且つ、 X_2 がKまたはTであるV I X_1 S G G N T D Y N T P F X_2 G (配列番号9)、およびA R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号3)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、およびs c F v - H C D R 3を含むH C V Rドメイン、および

(ii) それぞれR A S Y S I G T N I H (配列番号4)、 X_1 がRまたはYであり、 X_2 がKまたはSであり、且つ、 X_3 がEまたはRである X_1 Y A X_2 X_3 S I S (配列番号10)、およびQ Q N N A W P T T (配列番号6)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、およびs c F v - L C

10

D R 3を含むL C V Rドメイン
を含むs c F vポリペプチド
を含む多機能性抗体である。

【0066】

当該発明の他の実施形態ではEGF Rに結合する前記s c F vポリペプチドは、

(i) それぞれG F S L T N Y G V H (配列番号1)、V I W S G G N T D Y N T P F T G (配列番号7)、およびA R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号3)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、およびs c F v - H C D R 3を含むH C V Rドメイン、および

(ii) それぞれR A S Y S I G T N I H (配列番号4)、Y Y A S R S I S (配列番号8)、およびQ Q N N A W P T T (配列番号6)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、s c F v - L C D R 3を含むL C V Rドメイン
を含む。

20

【0067】

当該発明の他の実施形態ではEGF Rに結合する前記s c F vポリペプチドは、

(i) それぞれG F S L T N Y G V H (配列番号1)、V I W S G G N T D Y N T P F T G (配列番号7)、およびA R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号3)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、およびs c F v - H C D R 3を含むH C V Rドメイン、および

30

(ii) それぞれR A S Y S I G T N I H (配列番号4)、Y Y A S R S I S (配列番号8)、およびQ Q N N A W P T T (配列番号6)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、s c F v - L C D R 3を含むL C V Rドメイン

を含み、且つ、前記s c F vポリペプチドのC末端がペプチドリinkerを介して前記M E T抗体重鎖のN末端に融合している。

【0068】

当該発明の他の実施形態では前記多機能性抗体は、

(i) 配列番号53のアミノ酸配列を含む重鎖、および

(ii) 配列番号33のアミノ酸配列を含む軽鎖

40

を含む。

【0069】

本発明の別の実施形態は、

(a) M E Tに結合し、且つ、

(i) 各々がそれぞれG Y T F T D Y Y M H (配列番号11)、R V N P N R R G T T Y N Q K F E G (配列番号12)、およびA R A N W L D Y (配列番号13)のアミノ酸配列からなる重鎖C D RであるH C D R 1、H C D R 2、およびH C D R 3を含む重鎖である第1重鎖と第2重鎖、および

(ii) 各々がそれぞれS V S S S V S S I Y L H (配列番号14)、Y S T S N L A S (配列番号15)およびQ V Y S G Y P L T (配列番号16)のアミノ酸配列からな

50

る軽鎖CDRであるLCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む軽鎖である第1軽鎖と第2軽鎖

を含む抗体、および

(b) 各々がヒトEGFRに結合し、且つ、各々が

(i) それぞれGFSLTNYGVH (配列番号1)、 X_1 がYまたはWであり、且つ、 X_2 がKまたはTであるVIX₁SGGNTDYNTPF X_2 G (配列番号9)、およびARALDYDYDYDFAY (配列番号3) のアミノ酸配列からなるscFv CDRであるscFv-HCDR1、scFv-HCDR2、およびscFv-HCDR3を含むHCVRドメイン、および

(ii) それぞれRASYSIGTNIH (配列番号4)、 X_1 がRまたはYであり、 X_2 がKまたはSであり、且つ、 X_3 がEまたはRである X_1 YAX₂ X_3 SIS (配列番号10)、およびQQNNAWPTT (配列番号6) のアミノ酸配列からなるscFv CDRであるscFv-LCDR1、scFv-LCDR2、およびscFv-LCDR3を含むLCVRドメイン

を含むscFvポリペプチドである第1scFvポリペプチドと第2scFvポリペプチド

を含み、且つ、前記第1scFvポリペプチドのC末端がペプチドリナーを介して前記第1重鎖のN末端に融合しており、前記第2scFvポリペプチドのC末端がペプチドリナーを介して前記第2重鎖のN末端に融合している多機能性抗体である。

【0070】

当該発明の様々な実施形態では前記多機能性抗体は次のもの：

(i) VVDITYYDDQL (配列番号39)、

(ii) ISCGSVNRGTCQRHVFPNHTADIQS (配列番号40)、

(iii) ALGAKVLS SVKDRFINF (配列番号41)、および

(iv) VRRLKETKDGFM (配列番号42)

からなる群より選択されるアミノ酸配列においてMETの α 鎖内のエピトープに結合する。

【0071】

当該発明の様々な実施形態では前記多機能性抗体はアミノ酸配列i) VVDITYYDDQL (配列番号39)、ii) ISCGSVNRGTCQRHVFPNHTADIQS (配列番号40)、iii) ALGAKVLS SVKDRFINF (配列番号41)、および/またはiv) VRRLKETKDGFM (配列番号42) においてMETの α 鎖内のエピトープに結合し得る。当該発明の様々な実施形態では前記多機能性抗体はアミノ酸配列DTYYDD (配列番号43)、HVFPHNHTADIQS (配列番号44)、FINF (配列番号45)、およびKETKDGFM (配列番号46) の全てを特徴とする立体構造エピトープに結合し得る。当該発明の他の実施形態では前記多機能性抗体は

(i) 両方とも配列番号53のアミノ酸配列を含む重鎖である第1重鎖と第2重鎖、および

(ii) 両方とも配列番号33のアミノ酸配列を含む軽鎖である第1軽鎖と第2軽鎖を含む。

【0072】

さらに、当該発明の様々な実施形態では前記多機能性抗体は細胞表面のMETとEGFRのそれぞれHGF非依存적およびEGF非依存적の内部移行および/または分解を誘導する。

【0073】

本発明の別の実施形態は、

(a) METに結合し、且つ、

(i) 各々がそれぞれGYTFTDY YMH (配列番号11)、RVNPNRRGT TYNQK FEG (配列番号12)、およびARANWLDY (配列番号13) のアミノ酸配列からなる重鎖CDRであるHCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む重鎖

である第 1 重鎖と第 2 重鎖、および

(i i) 各々がそれぞれ S V S S S V S S I Y L H (配列番号 1 4)、Y S T S N L A S (配列番号 1 5) および Q V Y S G Y P L T (配列番号 1 6) のアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R である L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 を含む軽鎖である第 1 軽鎖と第 2 軽鎖

を含む抗体、および

(b) 各々がヒト E G F R に結合し、且つ、各々が

(i) それぞれ G F S L T N Y G V H (配列番号 1)、 X_1 が Y または W であり、且つ、 X_2 が K または T である V I X_1 S G G N T D Y N T P F X_2 G (配列番号 9)、および A R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号 3) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、および s c F v - H C D R 3 を含む H C V R ドメイン、および

(i i) それぞれ R A S Y S I G T N I H (配列番号 4)、 X_1 が R または Y であり、 X_2 が K または S であり、且つ、 X_3 が E または R である X_1 Y A X_2 X_3 S I S (配列番号 1 0)、および Q Q N N A W P T T (配列番号 6) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、および s c F v - L C D R 3 を含む L C V R ドメイン

を含む s c F v ポリペプチドである第 1 s c F v ポリペプチドと第 2 s c F v ポリペプチド

を含み、且つ、前記第 1 s c F v ポリペプチドの C 末端がペプチドリinker を介して前記第 1 重鎖の N 末端に融合しており、前記第 2 s c F v ポリペプチドの C 末端がペプチドリinker を介して前記第 2 重鎖の N 末端に融合している多機能性抗体である。

【 0 0 7 4 】

当該発明の他の実施形態では E G F R に結合する前記第 1 および第 2 s c F v ポリペプチドの各々が、i) それぞれ G F S L T N Y G V H (配列番号 1)、V I Y S G G N T D Y N T P F K G (配列番号 2)、および A R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号 3) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、および s c F v - H C D R 3 を含む H C V R ドメイン、および i i) それぞれ R A S Y S I G T N I H (配列番号 4)、R Y A K E S I S (配列番号 5)、および Q Q N N A W P T T (配列番号 6) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、および s c F v - L C D R 3 を含む L C V R ドメインを含む。あるいは、E G F R に結合する前記第 1 および第 2 s c F v ポリペプチドの各々が、i) それぞれ G F S L T N Y G V H (配列番号 1)、V I W S G G N T D Y N T P F T G (配列番号 7)、および A R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号 3) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、および s c F v - H C D R 3 を含む H C V R ドメイン、および i i) それぞれ R A S Y S I G T N I H (配列番号 4)、Y Y A S R S I S (配列番号 8)、および Q Q N N A W P T T (配列番号 6) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、および s c F v - L C D R 3 を含む L C V R ドメインを含む。

【 0 0 7 5 】

本発明の別の実施形態は、

(a) M E T に結合し、且つ、

(i) 両方とも配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む重鎖である第 1 重鎖と第 2 重鎖、および

(i i) 両方とも配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖である第 1 軽鎖と第 2 軽鎖を含む抗体、および

(b) 両方とも E G F R に結合し、且つ、両方とも

(i) それぞれ G F S L T N Y G V H (配列番号 1)、 X_1 が Y または W であり、且つ、 X_2 が K または T である V I X_1 S G G N T D Y N T P F X_2 G (配列番号 9)、および A R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号 3) のアミノ酸配列からなる s c F v C D

Rであるs c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、およびs c F v - H C D R 3を含むH C V Rドメイン、および

(i i)それぞれR A S Y S I G T N I H (配列番号4)、X₁がRまたはYであり、X₂がKまたはSであり、且つ、X₃がEまたはRであるX₁ Y A X₂ X₃ S I S (配列番号10)、およびQ Q N N A W P T T (配列番号6)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、およびs c F v - L C D R 3を含むL C V Rドメイン

を含むs c F vポリペプチドである第1 s c F vポリペプチドと第2 s c F vポリペプチド

を含み、且つ、前記第1 s c F vポリペプチドのC末端がペプチドリナーを介して前記第1重鎖のN末端に融合しており、前記第2 s c F vポリペプチドのC末端がペプチドリナーを介して前記第2重鎖のN末端に融合している多機能性抗体である。

【0076】

当該発明の他の実施形態では前記第1および第2 s c F vポリペプチドは、i)それぞれG F S L T N Y G V H (配列番号1)、V I Y S G G N T D Y N T P F K G (配列番号2)、およびA R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号3)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、およびs c F v - H C D R 3を含むH C V Rドメイン、およびi i)それぞれR A S Y S I G T N I H (配列番号4)、R Y A K E S I S (配列番号5)、およびQ Q N N A W P T T (配列番号6)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、およびs c F v - L C D R 3を含むL C V Rドメインを含む。あるいは、両方のs c F vポリペプチドが、i)それぞれG F S L T N Y G V H (配列番号1)、V I W S G G N T D Y N T P F T G (配列番号7)、およびA R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号3)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、およびs c F v - H C D R 3を含むH C V Rドメイン、およびi i)それぞれR A S Y S I G T N I H (配列番号4)、Y Y A S R S I S (配列番号8)、およびQ Q N N A W P T T (配列番号6)のアミノ酸配列からなるs c F v C D Rであるs c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、およびs c F v - L C D R 3を含むL C V Rドメインを含む。

【0077】

1つの実施形態では本発明は、

(a) 2本の重鎖および2本の軽鎖を含み、且つ、次のもの：

(i) V V D T Y Y D D Q L (配列番号39)、

(i i) I S C G S V N R G T C Q R H V F P H N H T A D I Q S (配列番号40)

、

(i i i) A L G A K V L S S V K D R F I N F (配列番号41)、および

(i v) V R R L K E T K D G F M (配列番号42)

からなる群より選択されるアミノ酸配列においてM E Tのα鎖内のエピトープに結合可能である抗体、および

(b) E G F Rに結合可能であり、配列番号17または配列番号19の重鎖可変領域と配列番号18または配列番号20の軽鎖可変領域を含む2つのs c F vポリペプチドを含む多機能性四価抗体であって、細胞表面のM E TとE G F Rの内部移行および/または分解を誘導する前記多機能性抗体を提供する。当該発明の様々な実施形態では前記多機能性抗体はアミノ酸配列i) V V D T Y Y D D Q L (配列番号39)、i i) I S C G S V N R G T C Q R H V F P H N H T A D I Q S (配列番号40)、i i i) A L G A K V L S S V K D R F I N F (配列番号41)、および/またはi v) V R R L K E T K D G F M (配列番号42)においてM E Tのα鎖内のエピトープに結合し得る。当該発明の様々な実施形態では前記多機能性抗体はアミノ酸配列D T Y Y D D (配列番号43)、H V F P H N H T A D I Q S (配列番号44)、F I N F (配列番号45)、およびK E T K D G F M (配列番号46)の全てを特徴とする立体構造エピトープに結合し得る。さらに

10

20

30

40

50

、当該発明の様々な実施形態では前記多機能性抗体は細胞表面のMETとEGFRのそれぞれHGF非依存的およびEGF非依存的な内部移行および/または分解を誘導する。

【0078】

本発明の1つの実施形態では、(a)各々がEGFRに結合可能である2つの同一のscFvポリペプチド、および(b)配列番号36に示されるアミノ酸配列からなるMET-ECDに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、

それぞれSVSSSVSSIYLH(配列番号14)、YSTSNLAS(配列番号15)、およびQVYSGYPLT(配列番号16)のアミノ酸配列からなる軽鎖CDRであるLCDR1、LCDR2、およびLCDR3、ならびに

それぞれGYTFTDYIMH(配列番号11)、RVNPNRRGTTYNQKFE
G(配列番号12)、およびARANWLDY(配列番号13)のアミノ酸配列からなる重鎖CDRであるHCDR1、HCDR2、およびHCDR3

を含む前記抗体またはその抗原結合断片を含む多機能性四価抗体が提供される。

【0079】

本発明の1つの実施形態では、(a)各々がEGFRに結合可能である2つの同一のscFvポリペプチド、および(b)2本の重鎖および2本の軽鎖を含み、且つ、METに結合可能であるMET抗体を含む多機能性四価抗体であって、EGFRに結合可能な前記2つの同一のscFvポリペプチドがC末端でペプチドリinkerを介して前記MET抗体にその完全長抗体の各重鎖のC末端で融合している前記多機能性四価抗体が提供される。本発明の幾つかの実施形態では両方とも抗METクローンC8-H241(国際公開第2010/059654号パンフレットに詳細が記載されている)に由来する配列番号21の重鎖可変領域と配列番号22の軽鎖可変領域を使用してMETに特異的に結合する前記MET抗体の抗原結合部位を形成することができる。

【0080】

遺伝子合成および組換え分子生物学技術により配列番号17のHCVRと配列番号18のLCVR、または配列番号19のHCVRと配列番号20のLCVRを $x=4$ 、 $n=5$ である式 $(G_xS)_n$ の高グリシンリンカーによって連結してEGFRに特異的に結合するscFvを形成する。次にそのEGFR結合性scFvを別の高グリシンリンカーによって抗MET抗体C8-H241(ヒトIgG4サブタイプ)の重鎖のN末端またはC末端に接続し、多機能性抗体NH-YK(抗EGFR YK_n-scFvと抗Met HCの融合体(すなわち、配列番号27)を含む)、NH-H9(抗EGFR H9_n-scFvと抗Met HCの融合体(すなわち、配列番号29)を含む)、YK(抗Met HCと抗EGFR YK-scFvの融合体(すなわち、配列番号31)を含む)、およびH9(抗Met HCと抗EGFR H9-scFvの融合体(すなわち、配列番号52)を含む)を作製する。

【0081】

本発明の別の実施形態は、(a)両方とも配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号52、または配列番号53のアミノ酸配列を含む第1ポリペプチドである2つの第1ポリペプチド、および(b)両方とも配列番号33のアミノ酸配列を含む第2ポリペプチドである2つの第2ポリペプチドを含み、METとEGFRに結合する多機能性抗体である。

【0082】

本発明の別の実施形態は、(a)両方とも配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号52、または配列番号53のアミノ酸配列を含む第1ポリペプチドである2つの第1ポリペプチド、および(b)両方とも配列番号33のアミノ酸配列を含む第2ポリペプチドである2つの第2ポリペプチドを含み、METとEGFRに結合する多機能性抗体、および薬学的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤を含む医薬組成物である。

【0083】

本発明の別の実施形態は癌を治療する方法であって、それを必要とする患者に(a)両

10

20

30

40

50

方とも配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 52、または配列番号 53 のアミノ酸配列を含む第 1 ポリペプチドである 2 つの第 1 ポリペプチド、および (b) 両方とも配列番号 33 のアミノ酸配列を含む第 2 ポリペプチドである 2 つの第 2 ポリペプチドを含み、MET と EGFR に結合する多機能性抗体の有効量を投与することを含む前記方法である。当該発明の幾つかの実施形態では前記癌は NSCLC、SCLC、胃癌、大腸癌、胆管癌、食道癌、黒色腫、ブドウ膜黒色腫、腎臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸部癌、または頭頸部癌である。当該発明の幾つかの実施形態では前記癌患者はヒトである。当該発明の他の実施形態ではその患者の腫瘍は 1 つ以上の KRAS 突然変異を有する細胞を含むことを特徴とする。本発明の他の実施形態では患者の腫瘍が低レベル、中レベル、または高レベルで MET および / または EGFR を発現している癌、ならびに / または 1 種類以上の抗 EGFR 抗体 (例えば、セツキシマブ、パニツムマブなど) および / もしくは EGFR の 1 種類以上の小分子阻害剤 (例えば、エルロチニブ) に対して耐性である、または耐性になった腫瘍であって、KRAS 突然変異を有する腫瘍を含むがこれらに限定されない腫瘍を治療する方法であって、それを必要とする患者に薬学的有効量の前述の多機能性抗体のうちの 1 つまたはその MET および EGFR 結合断片を投与することを含む前記方法を提供する。当該発明の様々な実施形態では患者の腫瘍が低レベル、中レベル、または高レベルで MET および / または EGFR を発現している癌、ならびに / または 1 種類以上の抗 EGFR 抗体 (例えば、セツキシマブ、パニツムマブなど) および / もしくは EGFR の 1 種類以上の小分子阻害剤 (例えば、エルロチニブ) に対して耐性である、または耐性になった腫瘍であって、KRAS 突然変異を有する腫瘍を含むがこれらに限定されない腫瘍を治療する前記方法は、s e 前記多機能性抗体またはその MET および EGFR 結合断片を患者に投与するステップの前に患者の腫瘍が発現する MET と EGFR のレベルを測定することによって、および / または患者の腫瘍が 1 つ以上の KRAS 突然変異を有する細胞を含んでいるか評価することによって癌の治療を必要とする患者を特定するステップをさらに含み得る。

【0084】

下の表 3 は本発明の scFv および scFv 融合体のアミノ酸配列の配列番号を示している。

【表 3】

表 3

	YK-scFv	YK _n -scFv と 抗MET HCVR の融合体	YK _n -scFv と 抗MET HC の 融合体	抗MET HC と Y K-scFv の融合 体
配列番号	23	25	27	31
	H9-scFv	H9 _n -scFv と 抗MET HCVR の融合体	H9 _n -scFv と 抗MET HC の 融合体	抗MET HC と H 9-scFv の融合 体
配列番号	24	26	29	52

上の表 3 に含まれているものを含み、本明細書において scFv に言及するときには使用される場合、下付き文字「n」は抗 EGFR YK scFv または抗 EGFR H9 scFv が前記 MET 抗体重鎖の N 末端に融合していることを表す。

【0085】

本発明の追加の実施形態は、2 つの同一の第 1 ポリペプチドと 2 つの同一の第 2 ポリペ

プチドを含み、第1ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号27または配列番号29であり、且つ、第2ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号33である多機能性抗体であって、EGFRおよびMETに結合する前記多機能性抗体である。さらに、当該発明の様々な実施形態では前記多機能性抗体は細胞表面のMETとEGFRのそれぞれHGF非依存のおよびEGF非依存の内部移行および/または分解を誘導する。

【0086】

標準的分子生物学技術を用いて組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞を形質移入し、本発明の多機能性抗体を産生する単離宿主細胞株である形質転換体を選択し、これらの宿主細胞を培養し、その培地から前記抗体を回収する。

【0087】

本発明は本発明の多機能性抗体を発現する宿主細胞にも関する。原核生物（細菌）発現系および真核生物発現系（酵母、バキュロウイルス、植物、哺乳類および他の動物細胞、遺伝子導入動物、およびハイブリドーマ細胞など）を含む当技術分野において知られている多種多様な宿主発現系を使用して本発明の抗体を発現させることができる。

【0088】

本発明の多機能性抗体は宿主細胞中での免疫グロブリンの組換え発現によって調製され得る。組換え技術によって宿主細胞中で抗体を発現させるためにはその多機能性抗体の軽鎖および/またはscFv重鎖融合体をコードするDNA断片を有する1つ以上の組換え発現ベクターで宿主細胞に対して形質転換、形質導入、感染などを行う。その重鎖と軽鎖は1つのベクター内でそれらに機能的に結合している異なるプロモーターから独立的に発現してよく、あるいは、その重鎖と軽鎖は、1つは重鎖を発現し、1つは軽鎖を発現する2つのベクター内でそれらに機能的に結合している異なるプロモーターから独立的に発現してよい。所望によりその重鎖と軽鎖は異なる宿主細胞内で発現してもよい。それらの宿主細胞を培養している培地中に組換え抗体が分泌されることが好ましく、そこからそれらの抗体を回収または精製することができる。

【0089】

HCVR領域をコードする単離DNAは、重鎖定常領域をコードする別のDNA分子にそのHCVRをコードするDNAを機能的に結合させることにより完全長重鎖遺伝子に変換され得る。ヒトならびに他の哺乳類の重鎖定常領域遺伝子の配列が当技術分野において知られている。例えば標準的PCR増幅によってこれらの領域を包含するDNA断片を得ることができる。重鎖定常領域はKabatt（上掲）に記載されるあらゆるタイプ（例えば、IgG、IgA、IgE、IgMまたはIgD）、クラス（例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃およびIgG₄）またはサブクラスの定常領域およびあらゆるそれらのアロタイプ変異体であり得る。

【0090】

L CVR領域をコードする単離DNAは、軽鎖定常領域をコードする別のDNA分子にそのL CVRをコードするDNAを機能的に結合させることにより完全長軽鎖遺伝子（ならびにFab軽鎖遺伝子）に変換され得る。ヒトならびに他の哺乳類の軽鎖定常領域遺伝子の配列が当技術分野において知られている。標準的PCR増幅によってこれらの領域を包含するDNA断片を得ることができる。軽鎖定常領域はκ定常領域またはλ定常領域であり得る。

【0091】

本発明の組換え発現ベクターは抗体重鎖遺伝子および/または軽鎖遺伝子に加えて宿主細胞内での抗体鎖遺伝子の発現を制御する制御配列を有する。「制御配列」という用語は抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御するプロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御配列（例えば、ポリアデニル化シグナル）を必要に応じて含むものとする。制御配列の選択をはじめとする発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質発現レベルのような因子に依存し得る。哺乳類宿主細胞での発現にとって好ましい制御配列にはサイトメガロウイルス（CMV）、シミアンウイルス40（SV40）、アデノウイルス、（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター（AdMLP））および

10

20

30

40

50

／またはポリオーマウイルスに由来するプロモーターおよび／またはエンハンサーなどの哺乳類細胞において高レベルでタンパク質を発現するように仕向けるウイルス性配列が含まれる。

【0092】

さらに、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞内でそれらのベクターの複製を制御する配列（例えば、複製起点）および1つ以上の選択マーカー遺伝子などの追加の配列を有してよい。選択マーカー遺伝子はそのベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする。例えば、選択マーカー遺伝子は典型的にはそのベクターが導入された宿主細胞にG418、ハイグロマイシン、またはメトトレキサートなどの薬品に対する耐性を付与する。好ましい選択マーカー遺伝子にはジヒドロ葉酸レダクターゼ（dhfr）遺伝子（メトトレキサート選択／増幅についてdhfrマイナス宿主細胞で使用される）、neo遺伝子（G418選択用）、およびGS陰性細胞株（NS0など）での選択／増幅のためのグルタミンシンテターゼ（GS）が含まれる。

10

【0093】

軽鎖および／または重鎖の発現のために標準的技術、例えば、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、DEAEデキストラン形質移入、形質導入、感染などによって宿主細胞に重鎖および／または軽鎖をコードする発現ベクターを導入する。原核宿主細胞または真核宿主細胞のどちらでも本発明の抗体を発現させることが理論的に可能であるが、真核細胞が好ましく、哺乳類宿主細胞が最も好ましい。それは、そのような細胞は正確に折り畳まれ、且つ、免疫活性が有る抗体を組み立て、分泌する可能性が高いからである。本発明の組換え抗体の発現にとって好ましい哺乳類宿主細胞にはチャイニーズハムスター卵巣（CHO細胞）[例えば、Kaufman and Sharp, J. Mol. Biol. 159:601-21, 1982に記載されるようにDHFR選択マーカーと共に使用される、Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20, 1980に記載されるdhfrマイナスCHO細胞を含む]、NS0骨髓腫細胞、COS細胞、およびSP2/0細胞が含まれる。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳類宿主細胞に導入する場合、それらの宿主細胞内で抗体を発現させるのに、またはより好ましくはそれらの宿主細胞を培養している培地の中に抗体を分泌させるのに十分な期間にわたってそれらの宿主細胞を当技術分野において知られている適切な条件下で培養することによってそれらの抗体が産生される。標準的精製方法を用いてその宿主細胞および／または培地から抗体を回収することができる。

20

30

【0094】

完全な抗体の部分または断片、例えば、Fab断片またはscFv分子を従来技術によって産生するために宿主細胞を用いることもできる。例えば、本発明の抗体の軽鎖または重鎖のどちらかをコードするDNAを宿主細胞に形質移入することが望ましい場合が有り得る。EGFRおよびMETへの結合に必要なではない軽鎖および重鎖の一方または両方をコードするDNAの幾らか、または全てを除去するために組換えDNA技術を用いてもよい。そのような短縮型DNA分子から発現される分子も本発明の抗体によって包含される。

40

【0095】

本発明は本発明の核酸分子を含む宿主細胞を提供する。好ましくは、本発明の宿主細胞は本発明の核酸分子を含む1つ以上のベクターまたはコンストラクトを含む。例えば、本発明の宿主細胞は、本発明の抗体のLCVRをコードするポリヌクレオチドおよび／または本発明のHCVRをコードするポリヌクレオチドを含む本発明のベクターが導入された細胞である。本発明は、1つは本発明の抗体のLCVRをコードするポリヌクレオチドを含み、1つは本発明の抗体に存在するHCVRをコードするポリヌクレオチドを含み、それらの遺伝子の高レベルの転写を誘起するためにそれぞれのポリヌクレオチドが（例えば、SV40、CMV、アデノウイルスなどに由来する、CMVエンハンサー/A d M L Pプロモーター制御配列またはSV40エンハンサー/A d M L Pプロモーター制御配列な

50

どの)エンハンサー/プロモーター制御配列に機能的に結合している本発明の2つのベクターが導入された宿主細胞も提供する。

【0096】

一旦発現したところで硫安沈殿、イオン交換カラムクロマトグラフィー、親和性(例えば、プロテインA)カラムクロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、疎水性相互作用カラムクロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などをはじめとする当技術分野の標準的手法によって本発明の完全抗体、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形を精製することができる。医薬用途には少なくとも約90%、約92%、約94%または約96%の均一性を有する実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、約98%から約99%またはそれより高い均一性が最も好ましい。所望により部分的に、または均一になるまで精製されたところで次にそれらの無菌抗体を本明細書において指示されるように治療に使用することができる。

10

【0097】

「単離ポリヌクレオチド」という用語は本明細書において使用される場合にゲノム起源、cDNA起源、または合成起源、またはそれらのある組合せを起源とするポリヌクレオチドを意味し、単離ポリヌクレオチドはその起源によって(1)本来その単離ポリヌクレオチドの中に見出されるポリヌクレオチドの全体または一部と結合していないポリヌクレオチド、(2)本来その単離ポリヌクレオチドが結合していないポリヌクレオチドに結合しているポリヌクレオチド、または(3)本来より長い配列の一部として生じていないポリヌクレオチドである。

20

【0098】

「単離」多機能性抗体は特定され、且つ、その抗体の天然環境の成分から分離および/または回収された抗体である。その抗体の天然環境の汚染混入成分はその抗体の診断上の利用または治療上の利用を妨げる物質であり、それらの汚染混入成分には酵素、ホルモン、および他のタンパク質性溶質または非タンパク質性溶質が含まれ得る。好ましい実施形態では抗体は(1)ローリー法によって測定すると95重量%を超える抗体にまで精製され、最も好ましくは99重量%を超える抗体にまで精製され、(2)スピニングカップシーケネーターを使用してN末端アミノ酸配列または内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで精製され、または(3)クマシーブルー、Simply Blue(商標)SafeStain(Life Technologies社)、または最も好ましくは銀染色を使用する還元条件または非還元条件下でのSDS-PAGEによって均一になるまで精製される。単離抗体にはその抗体の天然環境の少なくとも1つの成分が存在しないので組換え細胞内のその場の抗体が含まれる。

30

【0099】

本明細書において使用される場合、「実質的に純粋な」または「実質的に精製された」は存在する優勢な種である(すなわち、モル基準で組成中の他のあらゆる個々の種よりも多い)化合物または種を意味する。ある特定の実施形態では実質的に精製された組成物は存在する全ての巨大分子種のうちの(モル基準で)少なくとも約50パーセントをその種が構成する組成物である。ある特定の実施形態では実質的に純粋な組成物はその組成物中に存在する全ての巨大分子種のうちの約80%超、85%超、90%超、95%超、または99%超を構成する。ある特定の実施形態ではその種はほぼ均一になるまで精製され(従来の検出方法によって組成物中に汚染混入種を検出することができない)、その組成物は基本的に単一の巨大分子種からなる。

40

【0100】

別の実施形態では本発明は配列番号27、29、および33からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。

【0101】

別の実施形態では本発明は配列番号27、29、および33からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターを提供する。

【0102】

50

本発明は治療に使用するための前述の抗MET/EGFR多機能性抗体のうちのいずれか1つまたはそのMETおよびEGFR結合断片も提供する。

【0103】

本発明は癌の治療に使用するための前述の抗MET/EGFR多機能性抗体のうちのいずれか1つまたはそのMETおよびEGFR結合断片も提供する。

【0104】

本発明はMETとEGFRの両方が発現する癌の治療に使用するための前述の抗MET/EGFR多機能性抗体のうちのいずれか1つまたはそのMETおよびEGFR結合断片も提供する。

【0105】

本発明はNSCLC、SCLC、胃癌、大腸癌、胆管癌、食道癌、ブドウ膜黒色腫を含むがこれに限定されない黒色腫、腎臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸部癌、または頭頸部癌の治療に使用するための前述の抗MET/EGFR多機能性抗体のうちのいずれか1つまたはそのMETおよびEGFR結合断片も提供する。

【0106】

本発明は、癌を治療する方法であって、それを必要とするヒト患者に前述の多機能性抗体のうちのいずれか1つまたはそのMETおよびEGFR結合断片の有効量を投与することを含む方法も提供する。

【0107】

「治療する(treating)」(または「治療する(treat)」または「治療(treatment)」)という用語は症状、障害、体調、または疾患の進行または重症度を遅滞化すること、中断すること、阻止すること、制御すること、停止させること、軽減すること、逆転させることを指すが、疾患に関連する全ての症状、体調、または障害の完全消失を必ずしも伴わない。

【0108】

「癌」(または「一つの癌」)という用語は、肺癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、頭頸部癌、直腸癌、肛門部癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、結腸癌、大腸癌(CRC)、食道癌、ブドウ膜黒色腫を含むがこれに限定されない黒色腫、肝臓癌、子宮頸部癌、膀胱癌、腎尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、上記の癌のうちのいずれかの難治性のものを含む癌、または上記の癌のうちの1つ以上の組合せなどの増殖性疾患を指す。

【0109】

「有効量」という語句は本明細書において使用される場合には所望の治療成果を達成するために必要な(投与量および期間および投与手段についての)量を指す。前記多機能性抗体の有効量は個体の疾患状態、年齢、性別、および体重、および個体において所望の反応を誘発する前記抗体またはそのMETおよびEGFR結合断片の能力などの因子に応じて変わり得る。有効量は前記抗体またはそのMETおよびEGFR結合断片のどの有害作用よりも治療上有益な作用が勝る量でもある。

【0110】

有効量は対象に治療利益を与えるために必要な活性薬剤の少なくとも最少量であって全体として有害な量に満たない量である。別の言い方をすると、本発明の抗体の有効量または治療有効量は、哺乳類動物、好ましくはヒトにおいて癌細胞の数を減らし、腫瘍サイズを縮小し、周辺組織器官への癌細胞浸潤を抑制(すなわち、ある程度まで遅滞化、または停止)し、腫瘍転移を抑制(すなわち、ある程度まで遅滞化、または停止)し、腫瘍増殖をある程度まで抑制し、および/または癌に関連する症状のうちの1つ以上をある程度まで軽減する量である。本発明の抗MET/EGFR多機能性抗体の有効量は単回投与または複数回投与で投与され得る。さらに、本発明の抗MET/EGFR多機能性抗体の有効量は、一回より多くの回数で投与されない場合に有効量未満である量の複数回投与で投与され得る。

【0111】

医療分野ではよく知られているように、どの１人の対象についてもその投与量は、患者の体格、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与時間と投与経路、一般健康状態、および同時に投与されている他の薬品をはじめとする多くの因子に依存する。用量は疾患の種類と重症度に応じてさらに変わり得る。例えば、典型的な用量は約１ｍｇから約１００ｍｇ、好ましくは約２ｍｇから約１００ｍｇ、より好ましくは約５ｍｇから約１００ｍｇ、さらにより好ましくは約５ｍｇから約５０ｍｇ、さらにより好ましくは約５ｍｇから約２５ｍｇ、さらにより好ましくは約５ｍｇから約２０ｍｇ、さらにより好ましくは約５ｍｇから約１５ｍｇの範囲内であり得るが、しかしこの例となる範囲より下または上の用量が特に前述の因子を考慮して想定されている。一日非経口性投与計画は約１０μｇ／ｋｇから約１０ｍｇ／ｋｇまでであり得る。定期的評価によって経過をモニターしてよく、それによって用量が調節される。

10

【０１１２】

本発明の幾つかの実施形態では成人の患者の癌を治療するために本発明の多機能性抗体の一用量が静脈内投与され得る。静脈内投与の典型的な一用量は、例えば、約１００ｍｇから約１２５０ｍｇ、好ましくは約２００ｍｇから約１２５０ｍｇ、より好ましくは約５００ｍｇから約１２５０ｍｇ、さらにより好ましくは約７５０ｍｇから約１２５０ｍｇ、さらにより好ましくは約８００ｍｇから約１２５０ｍｇ、さらにより好ましくは、または最も好ましくは約８００ｍｇから約１０００ｍｇの範囲内であり得るが、しかしこの例となる範囲より下または上の用量が特に前述の因子を考慮して想定されている。あるいは、本発明の多機能性抗体の静脈内投与に典型的な一用量は、例えば、体重に対して約１０ｍ

20

【０１１３】

これらの示唆された抗体の量は治療に関する幅広い裁量の対象である。適切な用量の選択およびスケジュール設定の重要な因子は得られる結果である。この文脈での考慮される因子には治療されている特定の障害、個々の患者の臨床状態、障害の原因、抗体の送達部位、特定の種類の抗体、投与方法、投与スケジュール設定、および医療従事者に知られている他の因子が含まれる。

30

【０１１４】

本発明の抗ＭＥＴ／ＥＧＦＲ多機能性抗体は様々な経路で投与されるヒト医療の医薬として使用され得る。したがって、本発明は、前述の多機能性抗体のうちのいずれか１つまたはそのＭＥＴおよびＥＧＦＲ結合断片、および薬学的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤を含む医薬組成物も提供する。そのような組成物は非経口投与用であることが最も好ましい。非経口という用語は本明細書において使用される場合に静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸投与、腔内投与、または腹腔内投与を含む。静脈内投与または腹腔内投与または皮下投与による非経口送達が好ましい。静脈内投与が最も好ましい。そのような投与に適切なベヒクルは当技術分野においてよく知られている。

40

【０１１５】

前記医薬組成物は典型的には、例えば、密封バイアル瓶、注射筒、または他の送達装置、例えば、ペンをはじめとする提供された容器内において製造条件下および貯蔵条件下で無菌および安定でなければならない。したがって、製剤の作製後にその医薬組成物を無菌濾過するか、あるいは微生物の汚染混入が無いようにしてよい。

【０１１６】

本発明の抗体は単体で、または薬学的に許容可能な担体および／または希釈剤と共にヒト対象に単回投与または複数回投与で投与され得る。そのような医薬組成物は選択した投与モードに対して適切であるように設計されており、薬学的に許容可能な希釈剤、担体、および／または分散剤、緩衝剤、界面活性剤、保存剤、溶解剤、塩化ナトリウムを含むが

50

これに限定されない等張化剤、安定化剤などのような賦形剤が必要に応じて使用される。前記組成物は、例えば、一般的に医師に知られている製剤技術の概要を提供する Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 第19版、Gennaro編, Mack Publishing社、イーストン、ペンシルバニア州(1995年)において開示される従来技術に準じて設計され得る。医薬組成物に適切な担体には本発明の抗体と混合されたときにその分子の活性を保持し、且つ、対象の免疫系と反応しないあらゆる材料が含まれる。

【0117】

後続の非限定的な実施例は本多機能性抗体の様々な特性を例示する。

【実施例】

10

【0118】

参照例1

多機能性抗体NH-YKの発現および精製

基本的に次のように多機能性抗体NH-YKを発現および精製することができる。電気穿孔によりチャイニーズハムスター細胞株CHO K1SV (Lonza Biologicals PLC社、スラウ、英国)に形質移入するために(配列番号27のアミノ酸配列を有する第1ポリペプチドをコードする)配列番号28と(配列番号33の軽鎖アミノ酸配列をコードする)配列番号34のDNAを含むグルタミンシンテターゼ(GS)発現ベクターを使用する。その発現ベクターはSV早期(シミアンウイルス40E)プロモーターとGSの遺伝子をコードする。GSの発現によってCHO K1SV細胞が必要とするアミノ酸であるグルタミン酸の生化学的合成が可能になる。形質移入後に50 μ MのL-メチオニンスルホキシド(MSX)を使用して細胞の一括選択を行う。選択強度を上昇させるためにMSXによるGSの阻害を利用する。内在性レベルのGSを発現するCHO K1SV野生型細胞に対して宿主細胞ゲノムの転写活性領域に発現ベクターcDNAが組み込まれている細胞を選択する。安定な発現細胞の近クローン性増殖を可能にするために形質移入されたプールを低密度で播種する。マスターウェルを多機能性抗体の発現についてスクリーニングし、次に必要に応じて無血清懸濁培養物にスケールアップしてよい。あるいは、一括選択した形質移入体を蛍光活性化細胞選別(FACS)または限界希釈のような単一細胞クローニング法の対象とし、多機能性抗体の発現についてスクリーニングすることができる。適切な細胞株が特定されたところでその細胞株を必要に応じて無血清懸濁培養物にスケールアップしてよい。リン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)またはトリス緩衝液(pH7.4)のような適合性緩衝液で平衡化されたプロテインA親和性カラムに多機能性抗体が分泌されている清澄化培地を負荷する。そのカラムを洗浄して非特異的結合成分を除去する。例えば、結合した多機能性抗体をpH勾配(0.1Mのリン酸ナトリウム緩衝液pH6.8から0.1Mのクエン酸ナトリウム緩衝液pH2.5~3.0など)によって溶出する。例えば、多機能性抗体画分を280nmでの吸光度カッティング、SDS-PAGEまたは分析サイズ排除によって検出および/または収集する。可溶性の凝集体および多量体は、サイズ排除クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、またはハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーをはじめとする一般的技術により効果的に除去され得る。一般的技術を用いてその多機能性抗体を濃縮および/または滅菌濾過することができる。これらのクロマトグラフィーステップの後のその多機能性抗体の純度は90%より高く、好ましくは98%より高い。その多機能性抗体をすぐに-70で凍結してよく、または4で数か月間にわたって貯蔵してよい。

20

30

40

【0119】

多機能性抗体NH-H9の発現および精製

電気穿孔によりチャイニーズハムスター細胞株CHO K1SV (Lonza Biologicals PLC社、スラウ、英国)を形質移入するために(配列番号29のアミノ酸配列を有する第1ポリペプチドをコードする)配列番号30および(配列番号33の軽鎖アミノ酸配列をコードする)配列番号34のDNAを含むグルタミンシンテターゼ(GS

50

）発現ベクターを使用することを除いて基本的に上の参照例 1 . 1 において記載されるように多機能性抗体 NH - H 9 を発現および精製することができる。

【 0 1 2 0 】

多機能性抗体 H 9 の発現および精製

電気穿孔によりチャイニーズハムスター細胞株 CHOK 1 SV (Lonza Biologics PLC 社、スラウ、英国) を形質移入するために配列番号 5 2 のアミノ酸配列を有する第 1 ポリペプチドをコードする DNA と (配列番号 3 3 の軽鎖アミノ酸配列をコードする) 配列番号 3 4 の DNA を含むグルタミンシンテターゼ (GS) 発現ベクターを使用することを除いて基本的に上の参照例 1 . 1 において記載されるように多機能性抗体 H 9 を発現および精製することができる。

10

【 0 1 2 1 】

多機能性抗体 Y K の発現および精製

電気穿孔によりチャイニーズハムスター細胞株 CHOK 1 SV (Lonza Biologics PLC 社、スラウ、英国) ヲ形質移入スルタメニ配列番号 3 1 ノアミノ酸配列ヲ有スル第 1 ポリペプチドヲコードスル DNA ト (配列番号 3 3 ノ軽鎖アミノ酸配列ヲコードスル) 配列番号 3 4 ノ DNA ヲ含ムグルタミンシンテターゼ (GS) 発現ベクターヲ使用スルコトヲ除イテ基本的ニ上ノ参照例 1 . 1 ニオイテ記載サレルヨウニ多機能性抗体 H 9 ヲ発現オヨビ精製スルコトガデキル。

【 0 1 2 2 】

実施例 1: MET と EGFR に対する多機能性抗体の結合分析

BIAcore (登録商標) 2 0 0 0、BIAcore (登録商標) 3 0 0 0、または BIAcore (登録商標) T 1 0 0 (Biacore ライフサイエンス・ディビジョン、GEヘルスケア社、ピスカタウェイ、ニュージャージー州) のような表面プラズモン共鳴バイオセンサーを使用して当技術分野において知られている方法に従って本明細書において開示される抗体などの抗体の結合カインेटクスおよび親和性を測定することができる。特記される場合を除き、BIAcore (登録商標) AB 社 (ウプサラ、スウェーデン) から全ての試薬および材料を購入することができ、25 で測定を実施することができる。簡単に説明すると、HBS - EP 緩衝液 (1 5 0 m M の塩化ナトリウム、3 m M の EDTA、0 . 0 0 5 % (重量 / 体積) の界面活性剤 P - 2 0、および 1 0 m M の N - 2 - ヒドロキシエチル - ピペラジン - N ' - 2 - エタンスルホン酸 (HEPES)、pH 7 . 4) に試料を溶解することができる。捕捉方法論を活用するために 4 つ全てのフローセル (Fc) に固定化プロテイン A (標準的 NH₂ - EDC アミンカップリングを用いて作製され得る) を含む CM5 チップを使用することができる。最初に抗体試料をランニング緩衝液中に希釈して 1 m c g / m L に調製することができ、次に 3 0 秒間にわたって 1 0 μ / 分の流速でそれらの試料の捕捉を試験することができる。捕捉された量に基づいて約 7 0 R U から 9 0 R U の間の捕捉量を標的とするように抗体濃度を調節することができる。ランニング緩衝液中に希釈することにより 1 0 0、5 0、2 5、1 2 . 5、6 . 2 5、3 . 1 3、1 . 5 6、0 . 7 8、0 . 3 9 および 0 (ブランク) n M の終濃度で MET - ECD または ヒト EGFR - ECD を調製することができる。各分析サイクルは (1) 別々のフローセル (Fc 2、Fc 3、および Fc 4) 上での抗体試料の捕捉、(2) 5 0 m c L / 分での Fc 全体への 2 5 0 m c L の MET - ECD または EGFR - ECD の注入 (3 0 0 秒)、(3) 解離相をモニターするための 2 0 分間にわたる緩衝液流動への回帰、(4) 2 5 m c L のグリシン、pH 1 . 5 の注入によるチップ表面の再生 (3 0 秒)、(5) 2 5 m c L の HBS - EP + 緩衝液 (すなわち、0 . 0 0 5 % の代わりに 0 . 0 5 % (重量 / 体積) の界面活性剤 P - 2 0 を有する HBS - EP 緩衝液) の注入によるチップ表面の平衡化 (3 0 秒) から成り得る。Biacore T 1 0 0 評価ソフトウェア、バージョン 2 . 0 または Biacore T 2 0 0 評価ソフトウェア、バージョン 1 . 0 を使用する二重参照と 1 : 1 結合モデルフィットを用いてデータを処理して結合速度 (k_{on} 、 $M^{-1} \text{秒}^{-1}$ 単位)、解離速度 (k_{off} 、 秒^{-1} 単位)、および R_{max} (R U 単位) を決定することができる。平衡解離定数 (K_D) は $K_D = k_{off} / k_{on}$ という

20

30

40

50

関係から計算され得る。

【 0 1 2 3 】

本発明の 4 種類の抗 MET / EGF R 多機能性抗体を試験して基本的に上記のように MET - ECD および EGF R - ECD に対するそれらの結合カインेटイクスと結合親和性を決定した。それらの結果は下の表 4 および 5 に要約されている。抗体 NH - YK、NH - H9、H9、および YK は高い結合親和性 (K_D) で MET - ECD (表 4) と EGF R - ECD (表 5) の両方に結合する。

【表 4】

表 4：多機能性抗体の MET - ECD に対する結合カインेटイクスと親和性

多機能性抗体	k_{on} $M^{-1} \text{ 秒}^{-1} (10^4)$	k_{off} $\text{秒}^{-1} (10^{-5})$	K_D (nM)
NH - YK	7.5	6.3	0.84
NH - H9	10.5	7.9	0.75
H9	9.5	10.9	1.15
YK	12.6	3.3	0.26

10

20

【表 5】

表 5：多機能性抗体の EGF R - ECD に対する結合カインेटイクスと親和性

多機能性抗体	k_{on} $M^{-1} \text{ 秒}^{-1} (10^6)$	k_{off} $\text{秒}^{-1} (10^{-4})$	K_D (nM)
NH - YK	4.0	7.5	0.19
NH - H9	1.8	1.8	0.10
H9	0.57	1.8	0.32
YK	1.3	5.7	0.44

30

【 0 1 2 4 】

実施例 2：細胞表面の MET と EGF R の両方に対する NH - YK の結合

NSCLC 細胞株 H441 (ATCC、マナサス、バージニア州；カタログ番号 HTB - 174) は表面上に MET と EGF R の両方を発現する。H441 細胞 (6×10^6 個) を 100 mm のポリ - D - リシン被覆組織培養ディッシュに播種し、37℃、5% CO_2 で 2 日間培養してよい。その後、それらの細胞を 100 nM の対照 IgG4、100 nM のセツキシマブと 100 nM の抗 MET 抗体の混合物、または 100 nM の NH - YK によって 4℃ で 20 分間にわたって処理することができる。氷冷 DPBS でそれらの細胞を洗浄し、HALT プロテアーゼ・ホスファターゼ阻害剤 (サーモ・サイエンティフィック社、ロックフォード、イリノイ州) を含む CHAPS 溶解緩衝液を使用してそれらの細胞を溶解することができる。抗 MET アガロースまたは抗 EGF R セファロースを使用し、4℃で一晩インキュベートして 600 μ g の各細胞溶解試料に対して免疫沈降 (IP) を実施することができる。その樹脂を洗浄し、結合したタンパク質をその樹脂から溶出し、次に 4 ~ 20% の SDS - PAGE に負荷し、ウェスタンブロット用のニトロセルロー

40

50

ス膜にプロットすることができる。全METまたは全EGFRについてその膜を探索することができる。

【0125】

基本的に上記のように実施された免疫沈降実験から、抗MET/EGFR多機能性抗体NH-YKによる処理の後にMETとEGFRが共沈降するが、抗MET抗体、セツキシマブ、またはさらに抗MET抗体とセツキシマブの混合物のいずれかによる処理の後では共沈降しないことが示されている。これらのデータはNH-YKがMETとEGFRの両方に結合し得ることを表している（データは示されず）。

【0126】

実施例3：多機能性抗体NH-YKおよびNH-H9は細胞表面のMETに対する上昇した結合活性を示す

NSCLC癌細胞株HCC827は高レベルのMET発現を有する。簡単に説明すると、酵素フリー解離緩衝液を用いて細胞培養フラスコからHCC827細胞を外し、それらの細胞をウェル当たりおよそ 5×10^5 細胞の割合で96ウェルプレートに添加することができる。その後、用量設定した非標識抗体（500 nMから開始）がAlexa488標識抗MET抗体と細胞表面METへの結合について競合する能力を決定するためにそれらの非標識抗体を5 nMのその標識抗MET抗体と併用してそれらの細胞を4で1時間にわたって処理することができる。最終的には標識抗MET抗体の結合をFACSにより検出することができる。

【0127】

基本的にこの実施例において説明されるように実施されるアッセイによって示されるように、抗MET/EGFR多機能性抗体NH-YKおよびNH-H9はそれらの親抗MET抗体よりも明らかに高い結合活性を有する（表6）。

【表6】

表6：抗MET/EGFR多機能性抗体はHCC827細胞に対する上昇した結合活性を有する

抗体濃度、					
抗EGFR抗体のMF I (nM)	抗MET抗体のMF I	NH-YKのMF I	NH-H9のMF I	HGF (ng/mL)	
500.00	65.01	3.03	3.05	3.08	25.11
100.00	65.05	4.92	3.49	4.06	43.73
20.00	65.95	13.50	4.88	7.43	53.44
4.00	64.30	35.60	10.03	18.27	57.41
0.80	64.97	51.77	27.35	41.01	57.62
0.16	64.96	59.25	47.81	54.91	60.22
0.03	65.76	59.04	55.62	60.31	61.44

MF I = Alexa488標識抗MET抗体による競合によって表される平均蛍光強度

【0128】

実施例4：抗MET/EGFR多機能性抗体NH-YKおよびNH-H9は細胞表面のEGFRの内部移行と分解についてセツキシマブ投与よりも良好な活性を示す

パートA：NSCLC細胞株H441は中レベルのMETとEGFRの両方をその細胞

表面上に発現する。H 4 4 1 細胞から細胞表面の M E T と E G F R を激減させる能力について抗 M E T / E G F R 多機能性抗体を試験することができる。簡単に説明すると、ウェル当たり 2 m L の培地中の 1.5×10^5 細胞を 6 ウェルプレートに播種し、37、5 % C O ₂ で一晚培養することができる。抗体 N H - Y K、N H - H 9 または対照抗体を 50 n M の濃度で H 4 4 1 細胞に添加することができる。終夜処理の後に酵素フリー解離緩衝液を使用してそれらの細胞をウェルから外し、次に（多機能性抗体処理または対照抗体処理とは異なるエピトープを認識する）標識した E G F R 抗体または M E T 抗体を使用してそれらの細胞を 1 時間にわたって染色することができる。細胞を洗浄し、F A C S により標識化抗体染色について測定を行う。

【 0 1 2 9 】

10

M E T と E G F R の分解をインビボで促進する抗 M E T / E G F R 多機能性抗体 N H - Y K および N H - H 9 の能力を評価するため、基本的にこの実施例のパート A に記載されているようにアッセイを実施した。これらの試験の結果から抗 M E T / E G F R 多機能性抗体 N H - Y K および N H - H 9 はその親抗 M E T 抗体と同様に H 4 4 1 細胞から細胞表面 M E T を激減させることが可能であることが示されている。しかしながら、驚くべきことに抗 M E T / E G F R 多機能性抗体 N H - Y K および N H - H 9 は顕著な E G F R 分解を引き起こしたが、一方でセツキシマブまたは抗 M E T 抗体とセツキシマブの混合物はそうではなかった（表 7）。

【 0 1 3 0 】

20

パート B: N S C L C 細胞株 H 1 9 9 3 は高レベルの M E T と中レベルの E G F R を発現し、胃癌細胞株 M K N 4 5 は高レベルの M E T と低レベルの E G F R を発現し、N S C L C 細胞株 H 4 4 1 は中レベルの M E T と E G F R の両方をその細胞表面上に発現する。簡単に説明すると、ウェル当たり 2 m L の培地中の 5×10^5 細胞を 6 ウェルプレートに播種し、37、5 % C O ₂ で一晚培養することができる。抗 M E T / E G F R 多機能性抗体 N H - Y K、N H - H 9 または対照抗体を 100 n M の濃度でそれらの細胞に添加することができる。終夜処理の後にそれらの細胞を溶解することができ、それぞれ 15 μ g の各試料を 4 ~ 12 % のピストリスゲルに泳動し、P V D F 膜にプロットすることができる。全 E G F R、全 M E T、および G A P D H について膜をウエスタンブロッティングにより探索することができる。

【 0 1 3 1 】

30

M E T と E G F R の分解をインビトロで促進する抗 M E T / E G F R 多機能性抗体 N H - Y K および N H - H 9 の能力を評価するため、基本的にこの実施例のパート B に記載されているようにアッセイを実施した。これらの試験の結果から親抗 M E T 抗体と同様に抗体 N H - Y K および N H - H 9 によって H 1 9 9 3 細胞、M K N 4 5 細胞、および H 4 4 1 細胞から M E T が分解されることが示されている。しかしながら、驚くべきことに抗 M E T / E G F R 多機能性抗体 N H - Y K および N H - H 9 は顕著な E G F R 分解を引き起こすが、一方でセツキシマブまたは親抗 M E T 抗体とセツキシマブの混合物はそうではなかった（図 1）。

【表 7】

表 7. 抗MET/EGFR多機能性抗体はH441細胞上のEGFRの上昇した内部移行活性を有する

抗体濃度、(50 nM)	MF I の AVG	h I g G 4、 MF I のAVG	残存している細胞表面MET の割合 (%)	S t d . E r r
h I g G 4	77.40	77.40	100.00	0.08
セツキシマブ	76.20		98.45	1.69
抗MET抗体	47.44		61.30	0.32
抗MET抗体＋ セツキシマブ	50.41		65.13	0.10
NH-H9	48.84		63.10	0.07
NH-YK	44.89		57.99	2.71
			残存している細胞表面のEG FRの割合 (%)	
h I g G 4	56.29	56.29	100.00	2.09
セツキシマブ	47.25		83.95	0.71
抗MET抗体	58.80		104.47	1.42
抗MET抗体＋ セツキシマブ	50.08		88.98	0.85
NH-H9	17.93		31.86	0.34
NH-YK	17.87		31.74	0.51

MF I = 平均蛍光強度；AVG = 平均；S t d . E r r = 標準誤差

【 0 1 3 2 】

実施例 5：抗MET/EGFR多機能性抗体NH-YKおよびNH-H9はMETとEGFRの両方の活性化を阻止する

パート A：NSCLC 癌細胞株 H596 は HGF の存在下で EGFR 阻害剤の増殖阻害作用に対して耐性を有することが示されている。したがって、抗体が HGF の存在下で H596 細胞の増殖を阻害することができるか決定するためにこの細胞株を使用することができる。簡単に説明すると、ウェル当たり 100 μ L の培地中の 3×10^3 細胞を 96 ウ

エルプレートに播種し、37℃、5%CO₂で一晩培養することができる。抗MET/EGFR多機能性抗体NH-YKおよびNH-H9または対照抗体を100nM（終濃度）から始めて無血清培地中に1:3に希釈し、50μL中の4倍濃度として50ng/mLのHGF（終濃度）と組み合わせてH596細胞に添加することができる。さらに6日の細胞増殖の最後にプレートを30分間にわたって室温まで平衡化することができ、ウェル当たり100μLのCell Titer - Glo（登録商標）試薬（Promega社、フィッツバーグ、ウィスコンシン州）を添加することができる。生物発光を測定することにより細胞生存度を決定することができる。

【0133】

基本的にこの実施例において説明されるように実施されたアッセイから抗MET/EGFR多機能性抗体NH-YKおよびNH-H9はセツキシマブまたは親抗MET抗体とセツキシマブの混合物よりも良好にHGFで刺激を受けたH596のインビトロ増殖を阻害することが示されている。

【表8】

表8: 抗MET/EGFR多機能性抗体はHGFの存在下でのH596増殖の阻害に関して個々の抗体の混合物よりも優れた活性を示す

抗体	hIgG4		セツキシマブ		抗MET抗体	
濃度 (nM)	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
100	132.3	1.1	129.2	4.0	108.6	3.1
33.3	130.9	0.7	127.4	1.8	112.8	1.4
11.1	138.6	1.9	132.6	0.2	121.0	3.1
3.7	137.0	1.6	129.7	2.7	121.4	1.8
1.2	138.5	2.5	132.0	4.7	128.2	0.0
0.4	138.9	0.9	128.6	2.4	129.8	1.8
0.0	100.0	0.6				

10

20

30

【表 9】

抗体濃度 (nM)	抗ME T抗体+セツキシマブ		NH-YK		NH-H9	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
100	98.1	3.1	101.5	0.4	101.6	0.6
33.3	108.0	1.2	101.3	1.7	101.8	1.0
11.1	116.1	2.6	107.1	3.0	104.8	0.8
3.7	116.7	1.6	103.9	1.2	102.6	1.9
1.2	125.0	0.6	108.1	1.3	101.9	1.0
0.4	131.8	1.5	113.4	0.9	106.7	3.1
0.0						

10

20

【表 10】

抗体のみ、(100 nM)	AVG	Std. Err
h I g G 4	102.51	1.06
セツキシマブ	91.35	0.71
抗ME T抗体	92.33	0.98
抗ME T抗体+セツキシマブ	94.03	0.07
NH-YK	94.10	0.38
NH-H9	91.55	0.75
HGF、50 ng/mL	136.66	0.48

30

略語：AVG＝細胞生存度の平均%；Std. Err＝標準誤差

【0134】

パートB：抗ME T / E G F R多機能性抗体が腫瘍細胞の増殖の阻害に関して2つの個々の抗体の混合物よりも優れた活性を有するかインビトロアッセイで決定するために他の腫瘍細胞株を使用してもよい。例えば、結腸癌細胞株GEOは中レベルのME T発現を有しているにもかかわらず、E G F Rリガンド自己分泌活性化によって誘起されることが示されている。肺癌細胞株H1666はE G F R遺伝子の増幅を有し、その増殖はE G F R活性化によって誘起されることが示されている。NSCLC細胞株であるH1993とEBC-1の両方がME T遺伝子の増幅に起因する高レベルのME Tと中レベルのE G F Rを発現する。

40

【0135】

基本的にこの実施例において説明されるように実施されたアッセイから抗ME T / E G F R多機能性抗体NH-YKおよびNH-H9はセツキシマブよりも良好に、驚くべきことにはそれらの親抗ME T抗体とセツキシマブの混合物よりもさらに強力に結腸癌細胞株

50

G E O のインビトロ増殖を阻害することが示されている（表 9）。

【表 1 1】

表 9 : 抗 M E T / E G F R 多機能性抗体は G E O の増殖の阻害に関して個々の抗体の混合物よりも優れた活性を示す

抗体 (nM)	h I g G 4		セツキシマブ		抗 M E T 抗体		
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	
100	102.64	0.54	46.39	1.55	101.71	0.39	10
33.33	102.43	0.33	50.06	0.55	101.48	0.66	
11.11	102.43	0.11	57.67	1.27	102.82	0.66	
3.70	102.22	1.12	67.23	0.68	103.03	0.58	
1.23	103.80	0.45	73.63	2.71	103.42	0.55	
0.41	102.56	1.08	77.70	2.46	103.42	0.22	
0.14	103.30	1.66	89.99	5.56	104.67	0.33	20
0.05	103.00	1.40	100.83	0.80	105.67	0.41	
0.02	103.42	1.11	101.64	0.93	103.90	1.28	
0.00	100.00	0.33					
抗体 (nM)	抗 M E T 抗体 + セツキシマブ		N H - Y K		N H - H 9		
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	
100	57.93	0.52	46.15	1.67	42.65	0.96	30
33.33	61.99	2.02	45.05	1.03	41.33	1.31	
11.11	69.07	2.36	44.44	0.57	43.99	0.44	
3.70	76.49	1.58	47.99	0.79	45.52	1.05	
1.23	77.92	0.99	47.09	0.76	44.21	1.11	
0.41	92.10	4.98	51.33	0.80	47.07	0.65	
0.14	103.72	1.57	61.90	1.74	59.98	1.30	40
0.05	104.32	0.41	77.54	1.87	76.05	1.52	
0.02	104.90	0.55	103.62	2.22	102.97	1.04	
0.00							

略語 : A V G = 細胞生存度の平均 % ; S t d . E r r = 標準誤差

【 0 1 3 6 】

同様に、表 1 0 に示されている結果から抗 M E T / E G F R 多機能性抗体 N H - Y K 、 N H - H 9 、および H 9 はそれぞれセツキシマブよりも良好に、および親抗 M E T 抗体とセツキシマブの混合物よりも強力に H 1 6 6 6 増殖を阻害することが示されている。

【表 1 2】

表 1 0 : 抗ME T / E G F R 多機能性抗体はH 1 6 6 6 増殖の阻害に関して個々の抗体の混合物よりも優れた活性を示す

抗体濃度、 (nM)	h I g G 4		セツキシマブ		抗ME T 抗体	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
100	94.45	0.92	30.60	0.36	101.25	1.63
33.33	103.42	2.64	35.13	1.17	102.15	2.90
11.11	104.25	2.50	41.65	0.63	105.58	2.99
3.70	100.34	0.46	49.31	1.96	106.48	1.57
1.23	101.46	2.01	56.26	0.47	103.49	1.48
0.41	103.94	1.53	68.71	1.40	105.72	1.99
0.14	104.85	2.46	84.94	3.16	101.01	1.33
0.05	104.24	1.46	97.56	1.50	105.35	2.11
0.02	108.89	2.07	102.80	1.80	104.50	2.24
0.00	100.00	0.47				

10

20

【表 1 3】

抗体濃度、 (nM)	抗ME T 抗体+セツキ シマブ		NH-Y K		NH-H 9		H 9	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
100	36.78	0.73	26.36	0.14	23.11	0.27	28.02	0.25
33.33	42.61	0.66	27.94	0.39	24.12	0.29	31.22	1.43
11.11	48.24	0.59	31.92	0.18	26.58	0.40	34.67	0.66
3.70	53.18	1.57	36.86	0.61	31.64	0.52	41.65	0.14
1.23	63.92	1.76	45.62	0.96	38.65	0.75	49.45	0.40
0.41	70.46	0.34	65.52	2.92	52.90	0.75	58.90	1.11
0.14	81.73	1.58	87.22	3.16	77.78	2.82	79.34	2.48
0.05	96.94	1.74	105.13	3.84	100.45	2.88	96.50	1.02
0.02	103.30	1.02	106.30	2.88	104.51	1.19	99.45	2.59
0.00								

30

40

略語：A V G = 細胞生存度の平均% ; S t d . E r r = 標準誤差

50

【 0 1 3 7 】

同様に、表 1 1 に示されている結果から抗 M E T / E G F R 多機能性抗体 N H - Y K および N H - H 9 はそれぞれそれらの親抗 M E T 抗体とセツキシマブの混合物と同等以上に良好に H 1 9 9 3 (表 1 1) と E B C - 1 (表 1 2) の増殖を阻害することが示されている。

【 表 1 4 】

表 1 1 : 抗 M E T / E G F R 多機能性抗体は H 1 9 9 3 増殖の阻害に関して個々の抗体の混合物よりも優れた活性を示す

抗体濃度、(nM)	h I g G 4		セツキシマブ		抗 M E T 抗体	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
100	98.68	2.39	95.77	1.07	53.17	1.11
33.33	101.50	1.91	102.27	2.01	51.66	0.75
11.11	102.77	1.47	101.18	1.95	52.92	0.41
3.70	102.53	1.41	100.52	1.08	57.39	1.31
1.23	99.73	0.63	98.61	0.28	84.82	0.93
0.41	103.23	0.02	97.18	1.78	98.80	1.71
0.14	103.29	0.33	99.45	2.35	99.69	0.98
0.05	102.09	1.01	96.62	1.79	100.67	2.36
0.02	100.28	1.18	97.48	2.79	99.77	0.56
0.00	100.00	0.63				

10

20

【 表 1 5 】

抗体濃度、(nM)	抗 M E T 抗体 + セツキシマブ		N H - Y K		N H - H 9	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
100	47.47	0.76	40.83	0.57	36.90	0.97
33.33	47.95	0.76	42.08	1.18	38.38	0.30
11.11	49.33	0.74	44.42	1.37	40.71	0.97
3.70	53.12	2.03	51.21	0.96	44.22	0.82
1.23	75.00	1.04	84.69	1.33	75.02	0.82
0.41	96.13	2.16	94.11	0.79	94.40	0.45
0.14	99.82	1.74	96.67	1.70	99.09	1.20
0.05	100.80	1.78	98.77	1.20	100.26	0.99
0.02	100.84	0.76	99.43	0.19	100.60	1.43
0.00						

30

40

略語 : A V G = 細胞生存度の平均 % ; S t d . E r r = 標準誤差

50

【表 16】

表 12 : 抗MET/EGFR多機能性抗体はEBC-1増殖の阻害に関して個々の抗体の混合物よりも優れた活性を示す

抗体濃度、(nM)	h I g G 4		セツキシマブ		抗MET抗体	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
100	105.35	1.61	107.55	1.27	48.38	0.14
33.33	102.82	0.74	105.74	1.31	38.11	0.57
11.11	102.08	0.63	105.58	0.98	37.24	0.55
3.70	103.72	1.19	106.17	1.48	35.75	0.87
1.23	103.53	2.28	106.03	0.80	38.84	0.44
0.41	103.48	0.72	105.02	1.70	80.23	1.47
0.14	100.42	1.09	103.51	0.57	99.04	1.21
0.05	100.00	1.96	100.73	0.95	102.58	0.54
0.02	102.36	0.92	102.02	1.88	102.25	0.77
0.00	100.00	0.38				

10

20

【表 17】

抗体濃度、(nM)	抗MET抗体+セツキシマブ		NH-YK		NH-H9	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
100	40.73	0.80	34.95	0.22	22.34	0.27
33.33	36.25	1.20	30.65	0.19	21.30	0.42
11.11	34.08	0.42	30.15	0.47	21.15	0.58
3.70	33.54	0.80	33.04	0.90	22.43	0.37
1.23	35.60	0.50	46.98	1.11	24.23	0.43
0.41	73.46	0.64	91.82	0.83	79.44	0.82
0.14	101.37	1.06	97.62	1.29	97.02	1.89
0.05	102.92	0.80	102.14	1.96	100.50	1.21
0.02	101.88	1.16	101.86	1.82	101.03	0.65
0.00						

30

40

略語：AVG＝細胞生存度の平均%；Std. Err＝標準誤差

実施例 6：抗 MET / EGFR 多機能性抗体 NH - YK および NH - H9 はアポトーシスを誘導する

抗体によって誘導されるアポトーシスをアッセイするために胃癌細胞株 MKN 45 を使用することができる。簡単に説明すると、ウェル当たり 80 μ L の培地中の 3×10^3 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、37、5% CO₂ で一晚培養することができる。Cell Event (商標) 試薬 (Life Technologies 社、カルスバッド、カリフォルニア州) を細胞培養培地に希釈し、ウェル当たり 10 μ L の割合で添加することができる。NH - YK 抗体、NH - H9 抗体または対照抗体を 10 μ L で 100 nM の終濃度になるように 10 倍濃度として MKN 45 細胞に添加した。INCUCYTE (商標) キネティック・イメージング・システム (Essen Bioscience 社、アナーバー、ミシガン州) により総計で 120 時間にわたって 37、5% CO₂ の条件でカスパーゼ 3 / 7 陽性細胞を 3 時間の間隔でリアルタイム測定することができる。

【0139】

基本的にこの実施例において説明されるようにアッセイを実施することで測定されると、抗 MET / EGFR 多機能性抗体 NH - YK および NH - H9 はそれぞれ親 MET 抗体とセツキシマブの混合物よりも MKN 45 のアポトーシスをインビトロで誘導する (表 13)。加えて、基本的にこの実施例において説明されるように実施されるアッセイでは NH - YK はワン・アームド 5D5 とエルロチニブの混合物 (データは示されず) よりも高い程度にまで MKN 45 のアポトーシスを誘導する。

【表 18】

表 13：MKN 45 アポトーシスアッセイ

抗体濃度、(100 nM)	24 時間		48 時間		72 時間	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
未処理	100.00	2.92	100.00	10.14	100.00	13.83
h I g G 4	83.60	8.92	106.20	3.55	111.25	13.78
セツキシマブ	73.56	4.69	121.70	26.26	102.24	10.34
抗 MET 抗体	100.35	7.27	222.81	28.70	275.40	21.16
抗 MET 抗体 + セツキシマブ	126.73	22.78	235.60	29.73	292.40	23.35
NH - YK	114.20	9.96	291.31	19.04	393.83	43.63
NH - H9	94.60	10.59	243.82	35.58	361.13	9.04

【表 19】

抗体濃度、(100 nM)	96時間		120時間	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
未処理	100.00	13.48	100.00	7.55
h I g G 4	91.24	10.61	108.28	12.02
セツキシマブ	107.11	3.56	127.04	14.16
抗ME T抗体	286.63	32.84	353.84	30.08
抗ME T抗体 + セツキシマブ	326.83	32.56	386.84	19.08
NH-YK	446.24	28.10	557.79	32.44
NH-H9	434.42	2.87	515.31	13.63

略語：AVG＝細胞のアポトーシスの平均増加率（%）；Std. Err＝標準
誤差

10

20

【0140】

実施例7：抗MET/EGFR多機能性抗体NH-YKはHGFの存在下で腫瘍細胞のエルロチニブ感受性を復活させる

NSCLC癌細胞株HCC827はEGFR遺伝子増幅および高いMET発現を有する。HCC827細胞はエルロチニブ処理に対して感受性であるが、HGFの存在下ではエルロチニブ処理に耐性になる。簡単に説明すると、ウェル当たり100 μ Lの培地中の3 $\times$ 10³細胞を96ウェルプレートに播種し、37、5%CO₂で一晩培養することができる。NH-YK抗体または対照抗体(h I g G 4)を1時間にわたって細胞に添加し、続いてエルロチニブおよび/またはHGFを50 nMの抗体、50 ng/mLのHGF、および1 μ Mのエルロチニブの終濃度になるように添加することができる。37、95%の相対湿度および5%（体積/体積）CO₂でのさらに3日の細胞増殖の最後にプレートを30分間にわたって室温まで平衡化することができ、ウェル当たり100 μ LのCell Titer - Glo（登録商標）試薬（Promega社）を添加することができる。オービタルシェーカー上でプレートを2分間にわたって振盪して内容物を混合し、その後10分間にわたって放置して室温でインキュベートして生物発光シグナルを安定化させることができる。生物発光を測定することにより細胞生存度を決定することができる。

30

【0141】

基本的にこの実施例において説明されるようにアッセイを実施することで測定されると、抗体NH-YKはセツキシマブと組み合わせた親抗MET抗体よりも良好にHGFの存在下でのHCC827細胞のエルロチニブ感受性をインビトロで復活させることができる（表14）。

40

【表 2 0】

表 1 4 : 抗MET / EGFR 多機能性抗体NH-YKはHGFの存在下でのエルロチニブに対するHCC 8 2 7 感受性の復活に関して個々の抗体の混合物よりも優れた活性を有する

抗体濃度 (5 0 n M)	未処理	エルロチニブ、1 μ M	エルロチニブ + H、5 0 n g / m L	エルロチニブ + H + h I g G 4
AVG	101.27	17.98	80.00	85.14
S t d. E r r	2.26	0.20	3.95	1.39

10

【表 2 1】

抗体濃度 (5 0 n M)	エルロチニブ + H + セツキ シマブ	エルロチニブ + H + 抗MET 抗体	エルロチニブ + H + 抗MET 抗体 + セツキシマブ	エルロチニブ + H + NH-YK
AVG	102.76	46.35	61.33	27.25
S t d. E r r	0.86	0.65	1.59	1.01

20

略語：AVG＝細胞生存度の平均%；S t d. E r r＝標準誤差；H＝HGF

【0 1 4 2】

実施例 8：抗MET / EGFR 多機能性抗体NH-YKはHGFおよびEGFで処理されたHT-29細胞のB-Raf阻害剤であるPLX 4 0 3 2に対する感受性を復活させる

30

結腸癌細胞株HT-29はB-Raf突然変異を有し、且つ、B-Raf阻害剤であるPLX 4 0 3 2に対して感受性である。HGFおよびEGFで刺激されるとHT-29細胞はPLX 4 0 3 2処理または汎Raf阻害剤処理に対して耐性になる。HGFおよびEGFで処理されたHT-29細胞のPLX 4 0 3 2阻害剤感受性を復活させる能力について抗MET / EGFR多機能性抗体を試験することができる。簡単に説明すると、ウェル当たり100 μ Lの培地中の 3×10^3 細胞を96ウェルプレートに播種し、37、5%CO₂で一晩培養することができる。抗体NH-YK、PLX 4 0 3 2、HGF、EGF、陽性対照、および陰性対照を無血清培地中に希釈し、4倍濃度として50 μ L中のHT-29細胞に添加した。試薬の終濃度は抗体については50 nM、HGFおよびEGFについては50 n g / m L、およびPLX 4 0 3 2については1 μ Mから始まる1：5希釈物であり得る。さらに5日の細胞増殖の最後にプレートを30分間にわたって室温まで平衡化することができ、ウェル当たり100 μ LのCell Titer - Glo（登録商標）試薬（Promega社）を添加することができる。生物発光を測定することにより細胞生存度を決定することができる。

40

【0 1 4 3】

基本的にこの実施例において説明されるようにアッセイを実施することで測定されると、抗体NH-YKはHGFおよびEGFで処理されたHT-29細胞のPLX 4 0 3 2感受性を復活させることができる（表 1 5）。加えて、抗体NH-YKはFadu細胞のラパチニブ（すなわち、EGFR / HER-2阻害剤）感受性の復活に関して親抗MET抗

50

体とセツキシマブの混合物よりも優れている（表 1 6 ）。

【表 2 2】

表 1 5 : 抗体 NH-YK は HGF および EGF の存在下で B-R a f 阻害剤である PLX 4 0 3 2 に対する HT-2 9 感受性の復活に関して個々の抗体の混合物よりも優れた活性を有する

PLX濃 度 (nM)	PLX		PLX+H+E		PLX+H+E+h I g G 4		PLX+H+E+ セツキシマブ	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
1000	33.67	0.19	104.02	0.58	108.76	0.64	103.80	2.43
200.00	56.66	0.36	120.67	1.65	124.38	4.18	121.05	1.36
40.00	83.14	0.18	122.51	1.39	124.52	1.61	123.21	1.19
8.00	97.63	1.05	120.42	0.51	125.81	0.31	124.51	0.44
1.60	99.92	0.94	117.09	1.98	116.77	2.15	127.26	0.76
0.32	101.11	1.13	113.02	1.57	120.78	1.56	125.35	2.78
0.00	100.00	1.01						

10

20

【表 2 3】

PLX濃 度 (nM)	PLX+H+E+抗ME T抗体		PLX+H+E+抗ME T抗体+セツキシマブ		PLX+H+E+NH-YK	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
1000	110.65	2.28	97.86	1.41	39.98	0.89
200.00	120.52	1.18	116.73	1.20	59.53	0.94
40.00	122.38	0.19	121.34	0.65	85.59	1.03
8.00	123.57	1.94	122.98	0.70	98.74	0.86
1.60	126.02	0.86	125.28	0.50	100.39	0.11
0.32	123.46	3.30	124.17	0.31	101.93	1.59
0.00						

30

40

略語：PLX=PLX 4 0 3 2；AVG=細胞生存度の平均%；Std. Err
=標準誤差；H=HGF（50 ng/mL）；E=EGF（50 ng/mL）
全ての抗体が50 nMである

【表 2 4】

表 1 6 : 抗MET / EGFR 多機能性抗体NH-YKおよびNH-H9はHGFの存在下でのラパチニブに対するFaDu感受性の復活に関して個々の抗体の混合物よりも優れた活性を有する

ラパチニブ、 μ M	細胞生存率 (%)						
	ラパチニブのみ	ラパチニブ + H	ラパチニブ + H + セツキシマブ	ラパチニブ + H + 抗MET	ラパチニブ + H + セツキシマブ + 抗MET	ラパチニブ + H + NH-H9	ラパチニブ + H + NH-YK
0	95.99	154.12	139.07	130.33	98.43	59.67	60.33
0.001	99.49	154.06	151.14	128.70	98.47	64.58	62.16
0.003	101.04	165.69	155.31	158.30	111.36	63.61	56.71
0.01	95.77	157.19	146.42	143.19	107.71	53.75	53.64
0.03	68.82	150.88	140.30	127.18	92.73	53.60	53.56
0.1	45.42	142.78	131.75	102.62	73.76	42.42	48.89
0.3	32.49	131.23	120.62	79.03	64.03	38.82	45.47
1	26.85	112.89	104.69	60.76	57.14	33.93	37.68
3	18.52	15.06	12.15	15.37	10.44	20.42	29.46
10	17.07	9.65	6.54	9.05	7.41	20.85	17.59

H = HGF (50 ng / ml) ; 全ての抗体が50 nMである

10

20

30

【表 2 5】

ラパチニ ブ、 μ M	細胞生存率 (%)						
	ラパチニ ブのみ	ラパチニ ブ+E	ラパチニ ブ+E+セツ キシマブ	ラパチニ ブ+E+ 抗MET	ラパチニ ブ+E+セツ キシマブ+ 抗MET	ラパチニ ブ+E+ NH-H 9	ラパチニ ブ+E+ NH-Y K
0	102.84	145.35	136.60	144.82	120.07	90.91	110.53
0.001	109.28	149.73	145.86	155.81	132.52	106.86	118.84
0.003	108.81	170.83	156.56	163.50	146.05	108.79	115.48
0.01	78.67	158.71	149.86	147.32	154.82	90.88	109.72
0.03	69.43	160.76	150.95	148.64	122.95	65.99	102.30
0.1	45.64	152.45	101.10	143.07	101.54	42.00	62.87
0.3	32.47	161.37	47.58	137.03	56.25	33.46	40.24
1	26.27	141.20	31.90	128.06	36.16	29.66	27.80
3	18.99	37.11	21.17	18.19	23.48	18.10	19.41
10	19.62	21.39	17.61	15.87	22.55	14.88	7.06

E = EGF (50 ng/ml); 全ての抗体が50 nMである

【0144】

実施例9：マウス異種移植モデルにおけるMETとEGFRの分解

METとEGFRの分解をインビボで促進する抗MET/EGFR多機能性抗体の能力は、当技術分野においてよく知られている方法に従ってH441 (NSCLC) およびMKN45 (胃癌) 異種移植腫瘍を担持するマウスにおいて評価され得る。

【0145】

2つの異なる用量レベル(10 mg/kgと27 mg/kg)での抗体NH-YKの投与によりH441異種移植片において投与から48時間後に親抗MET抗体とセツキシマブの混合物(両方とも20 mg/kgで投与)と同等のレベルでMETの分解が誘導された。対照的に、親抗MET抗体とセツキシマブの混合物(両方とも20 mg/kgで投与)は同じ異種移植モデルにおけるPBS処置対照動物と比較するとEGFR分解の誘導に失敗した。驚くべきことに、PBSで処置されたマウスまたは親抗MET抗体とセツキシマブ(両方とも20 mg/kgで投与)で処置されたマウスのどちらかと比較すると、抗体NH-YKの投与によって顕著なEGFR分解が引き起こされた。同様に、MKN45胃異種移植片を担持する動物では抗体NH-YKによって親抗MET抗体とセツキシマブの混合物(両方とも20 mg/kgで投与)と比較すると同等のMETの分解が引き起こされたが、驚くべきことにさらに増大したEGFRの分解が引き起こされた。

【0146】

実施例10：NSCLCのマウス異種移植モデル(H1993、H441、EBC-1)および胃癌における腫瘍増殖の阻害

6~7週齢のメスの胸腺欠損ヌードマウスが、Harlan Laboratories社(インディアナポリス、インディアナ州)のものを含み、市販されている。それらマ

ウスを1週間にわたって順応させ、通常の低脂肪(4.5%)食を自由に食べさせ、その食餌を試験期間中にわたって継続することができる。腫瘍細胞はATCCから購入可能であり、L-グルタミン、10%のFBSと1mMのビルビン酸ナトリウムが添加された25mMのHEPESを含むRPMI1640(Life Technologies社)などの細胞培養培地中に培養可能である。細胞を脱着させ、無血清培地で洗浄し、その後無血清RPMI1640中に 50×10^6 細胞/mLの終濃度で再懸濁することができる。無血清増殖培地とマトリゲル(Becton Dickinson社、ベッドフォード、マサチューセッツ州)の1:1混合物の中のおよそ 5×10^6 個の腫瘍細胞を対象マウスの横腹に皮下注射することができる。腫瘍重量と体重の測定を週に2回実施する。処理の前にランダム化アルゴリズムを用いて腫瘍サイズに基づいてマウスをランダム化することができる。平均腫瘍体積が 100 mm^3 に達したところで処理を開始することができる。ランダム化マウスは異なる群に分けられ、週に1回尾静脈注射を介して抗体を投与された。

10

【0147】

投与前に全ての試験抗体または対照抗体をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に調製する。カリパス測定によって腫瘍サイズを決定することができる。腫瘍体積(mm^3)を式 $A^2 \times B \times 0.536$ から推定することができる、その式では直角をなしている直径のうちの小さい方がAであり、大きい方がBである。時間および処理群にわたる分散を一様にするために腫瘍体積データを対数スケールに変換することができる。SAS PROC MIXEDソフトウェア(SAS Institutes社、ケーリー、ノースカロライナ州)を使用して二要因反復測定ANOVAにより時間および処理に関して対数体積データを分析することができる。各時点で処理群を指定した対照群と比較する。

20

【0148】

パートA: H1993 NSCLC異種移植片を担持する免疫不全マウスを上記の実施例において説明されるように作製し、連続5週間にわたって週に一度ベヒクル対照、抗体NH-YK、または親MET抗体とセツキシマブの混合物のいずれかで処理した。平均ベヒクル対照腫瘍体積で除算した平均処置腫瘍体積のパーセンテージ(T/C%)の値が親MET抗体とセツキシマブの混合物(両方とも 20 mg/kg で投与)によって86.1%になり、一方で等モル用量の抗体NH-YK(27 mg/kg)によって腫瘍体積が有意に著しく減少した(28.5%のT/C%、 $p < 0.001$) (図2)。H441異種移植片で試験したときも抗体NH-YKはベヒクル対照または親MET抗体とセツキシマブの混合物のどちらかと比較すると優れた効力を示した(図3)。

30

【0149】

パートB: EBC-1 NSCLC異種移植モデルにおいて抗体NH-YKを用いる処理(10 mpk)によって32.9%のT/C%が生じた($p < 0.001$) (図4)。

【0150】

パートC: 胃癌細胞株MKN45は高レベルのMET遺伝子増幅を有し、且つ、MET阻害剤に対して非常に感受性である。MKN45胃異種移植モデルでは抗体NH-YKは親MET抗体とセツキシマブの混合物と同等の抗腫瘍効力を示した(それぞれT/C% = 17.4%、 $p < 0.001$ と18.6%、 $p < 0.001$) (図5)。

40

【0151】

パートD: H1993 NSCLC異種移植モデルでは異種移植片を担持する免疫不全マウスは、連続5週間にわたって週に一度ベヒクル対照、抗MET/EGFR多機能性抗体H9(4 mg/kg および 27 mg/kg)、抗METのみ(3 mg/kg および 20 mg/kg)、セツキシマブ(3 mg/kg および 20 mg/kg)、または抗METとセツキシマブの混合物(それぞれの抗体について 3 mg/kg と 20 mg/kg)のいずれかで処理された。 27 mg/kg の抗MET/EGFR多機能性抗体H9によって他のあらゆる処理よりも有意に高い抗腫瘍作用が生じた($p < 0.001$) (図6)。

【0152】

H441異種移植片で試験したときも抗体H9は個々の処理または親MET抗体とセツ

50

キシマブの混合物と比較すると優れた効力を示した（図 7）。

【 0 1 5 3 】

実施例 1 1：大腸癌の患者由来異種移植片（PDX）モデルにおける腫瘍増殖の阻害

患者由来大腸癌試料を調達することができ、個々の患者に由来する腫瘍断片を一匹の免疫不全マウスに移植し、その腫瘍断片がおよそ $100 \sim 200 \text{ mm}^3$ の体積に到達するまで増殖させることができる。kg 当たり 27 mg の抗体 NH-YK またはベヒクル対照を連続 3～4 週間にわたって週に 1 回投与してよい。電気式カリパスにより腫瘍を週に 2 回測定してよい。体重も定期的に評価することができる。ベヒクル対照群は 4 回のサイクルにわたって週に 1 回のスケジュールで腹腔内（i.p.）注射により投与されるリン酸緩衝生理食塩水（PBS）によって処置され得る。腫瘍体積を式 $A^2 \times B \times 0.536$ を用いて算出することができ、その式では直角をなしている直径のうちの小さい方が A であり、大きい方が B である。

10

【 0 1 5 4 】

2 人の患者に由来する大腸癌腫瘍試料を基本的に上の実施例 1 1 において説明されているように 2 匹の異なる免疫不全マウスにそれぞれ移植した。表 1 7 および 1 8 に示されているように、PDX 腫瘍を有するベヒクル処置動物と比較すると毎週の抗体 NH-YK の投与によって PDX 腫瘍のそれぞれの体積が著しく減少した。

【表 2 6】

表 1 7

PDX（患者番号 1 に由来） の絶対腫瘍体積（ mm^3 ）	0 日目	25 日目
ベヒクル	192.1	1186.1
NH-YK	195.2	23.6

20

【表 2 7】

表 1 8

PDX（患者番号 2 に由来） の絶対腫瘍体積（ mm^3 ）	0 日目	21 日目
ベヒクル	248.4	1141.1
NH-YK	207.8	46.2

30

【 0 1 5 5 】

実施例 1 2：頭頸部扁平上皮癌（SCCHN）の患者由来異種移植片（PDX）モデルにおける腫瘍増殖の阻害

患者由来頭頸部扁平上皮癌（SCCHN）試料を調達することができ、個々の患者に由来する腫瘍断片を一匹の免疫不全マウスに移植し、その腫瘍断片がおよそ $100 \sim 200 \text{ mm}^3$ の体積に到達するまで増殖させることができる。kg 当たり 27 mg の抗体 NH-YK またはベヒクル対照を連続 4 週間にわたって週に 2 回投与してよい。電気式カリパスにより腫瘍を週に 2 回測定してよい。体重も定期的に評価することができる。ベヒクル対照群は 4 回のサイクルにわたって週に 1 回のスケジュールで i.p. 注射により投与される PBS と 28 回のサイクルにわたって日に 1 回の強制経口（p.o.）投与される 20% PEG 400 / 80% [蒸留脱イオン水中の 20% キャプティソル] によって処置され

40

50

得る。腫瘍体積は次の式を用いて算出され得る：腫瘍体積（ mm^3 ）＝幅²×長さ×0.52。

【0156】

2人の患者に由来する頭頸部扁平上皮癌腫瘍試料を基本的に上の実施例12において説明されているように2匹の異なる免疫不全マウスにそれぞれ移植した。表19に示されているように、PDX腫瘍を有するベヒクル処置動物と比較すると週に2回の抗体NH-YKの投与によってPDX腫瘍の体積が著しく減少した。

【表28】

表19

PDX（患者番号1に由来） の絶対腫瘍体積（ mm^3 ）	0日目	46日目
ベヒクル	200	1221±236（SEM）
NH-YK	200	222±121（SEM）

平均値の標準誤差（SEM）

10

【0157】

実施例13：エルロチニブ耐性NSCLC（エルロチニブ耐性HCC-827）のマウス異種移植モデルにおける腫瘍増殖の阻害

6～7週齢のメスの胸腺欠損ヌードマウスが、Harlan Laboratories社（インディアナポリス、インディアナ州）のものを含み、市販されている。それらマウスを1週間にわたって順応させ、通常の下脂肪（4.5%）食を自由に食べさせ、その食餌を試験期間中にわたって継続することができる。HCC-827腫瘍細胞はATCCから購入可能であり、L-グルタミン、10%のFBSと1mMのビルビン酸ナトリウムが添加された25mMのHEPESを含むRPMI1640などの細胞培養培地中に培養可能である。細胞を脱着させ、無血清培地で洗浄し、その後で無血清RPMI1640中に 50×10^6 細胞/mLの終濃度で再懸濁することができる。無血清増殖培地とマトリゲルの1：1混合物の中のおよそ 5×10^6 個の生存腫瘍細胞をメス胸腺欠損ヌードマウスの横腹に皮下移植することができる。一旦腫瘍が構築されたところで耐性腫瘍がエルロチニブの存在下であっても再増殖し始めるまで日に25mg/kgの用量のエルロチニブでそれらのマウスを処置することができる。耐性腫瘍がおよそ 1000mm^3 の平均体積に達したところでそれらの腫瘍を切り出し、 50mm^3 の断片に分割し、且つ、対象メス胸腺欠損ヌードマウスに再移植することができる。再増殖をモニターするため、腫瘍重量と体重の測定を週に2回実施することができる。平均腫瘍体積が 100mm^3 に達したところでランダム化アルゴリズムを用いて動物をランダム化し、処理群に分けた。抗体をPBSに希釈し、および週に1回尾静脈注射を介して投与した。腫瘍がエルロチニブ耐性であることを確実にするため、対照群の動物はPBSベヒクルとkg当たり25mgのエルロチニブを受容した。電気式カリパスにより腫瘍体積（ mm^3 ）を決定した。腫瘍体積を式 $A^2 \times B \times 0.536$ から推定することができ、その式では直角をなしている直径のうちの小さい方がAであり、大きい方がBである。

20

30

40

【0158】

エルロチニブ耐性HCC-827 NSCLC異種移植片を担持する免疫不全マウスを上の実施例において説明されるように作製し、（A）ベヒクルと25mg/kgエルロチニブ（すなわち、対照群）、（B）25mg/kgのエルロチニブと27mg/kgの抗体NH-YKの混合物、（C）25mg/kgのエルロチニブと20mg/kgのセツキシマブの混合物、（D）20mg/kgで投与される親MET抗体と25mg/kgのエルロチニブの混合物、または（E）20mg/kgで投与される親MET抗体、20

50

mg/kgで投与されるセツキシマブ、および25mg/kgのエルロチニブの混合物のいずれかで処理した。抗体NH-YKとエルロチニブの混合物（すなわち、処理群（B））により、他の全ての処理群と比較すると同じ期間またはそれより長い期間の後に絶対腫瘍体積が著しく減少した（表20）。したがって、エルロチニブ耐性腫瘍を有するマウスにおける腫瘍増殖は、特にPBSベヒクル、セツキシマブ、または親MET抗体と組み合わせてエルロチニブで処理された動物と比較すると、エルロチニブと組み合わせた抗体NH-YK（B）はエルロチニブ、セツキシマブおよび親MET抗体の混合物（E）と比較すると優れた抗腫瘍作用も示した。

【表29】

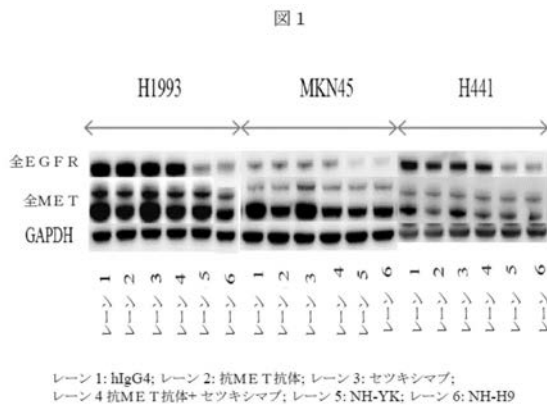
10

表20

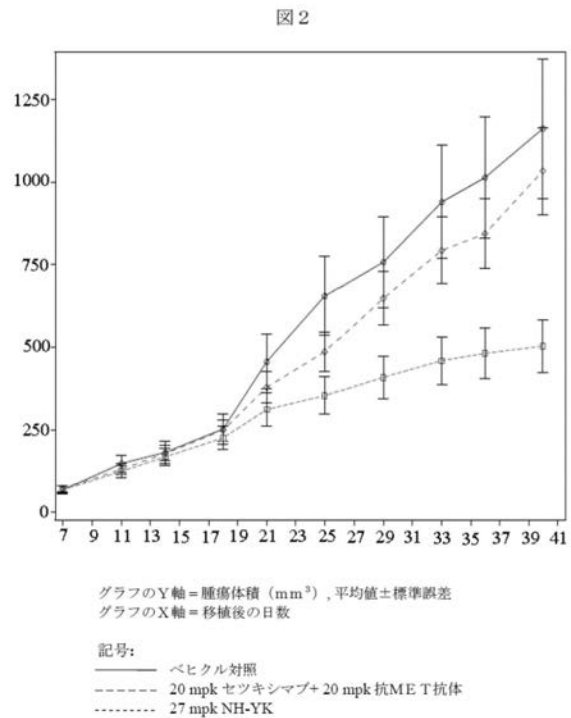
処理群	最終測定日	絶対腫瘍体積 (mm ³)
A	110	2587
B	152	304
C	126	2312
D	126	1706
E	152	1172

20

【図1】

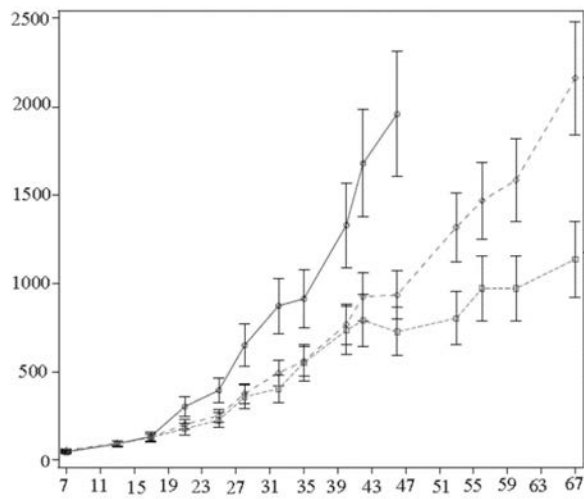


【図2】



【 図 3 】

図 3



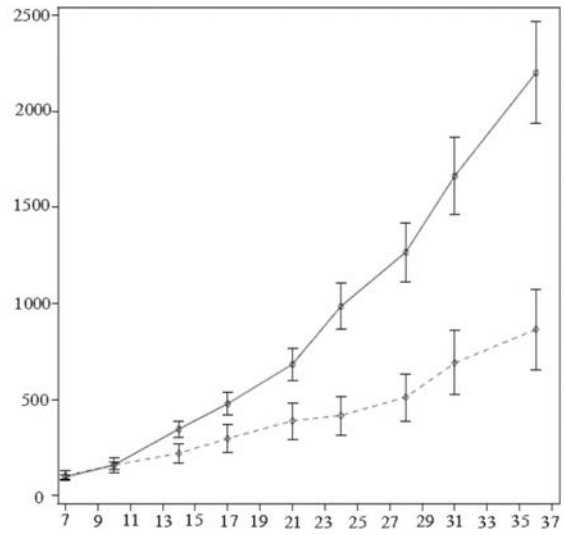
グラフのY軸 = 腫瘍体積 (mm³) , 平均値±標準誤差
グラフのX軸 = 移植後の日数

記号:

—○— ベヒクル対照
- - - □ - - 20 mpk セツキシマブ + 20 mpk 抗MET抗体
..... △ 27 mpk NH-YK

【 図 4 】

図 4



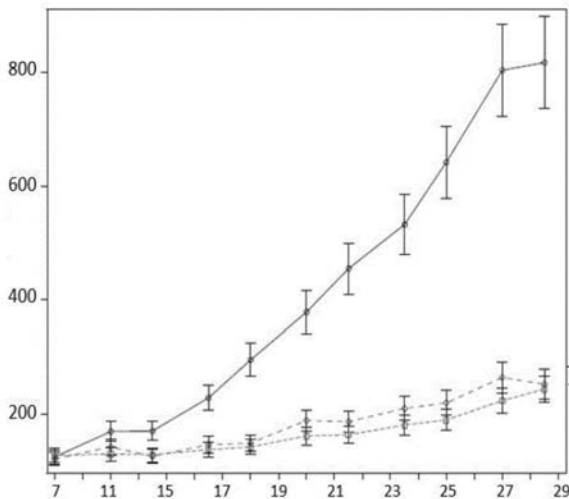
グラフのY軸 = 腫瘍体積 (mm³) , 平均値±標準誤差
グラフのX軸 = 移植後の日数

記号:

—○— ベヒクル対照
..... △ 10 mpk NH-YK

【 図 5 】

図 5



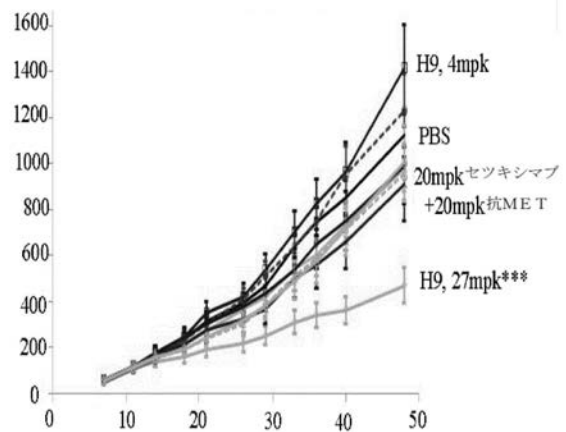
グラフのY軸 = 腫瘍体積 (mm³) , 平均値±標準誤差
グラフのX軸 = 移植後の日数

記号:

—○— ベヒクル対照
- - - □ - - 20 mpk セツキシマブ + 20 mpk 抗MET抗体
..... △ 27 mpk NH-YK

【 図 6 】

図 6



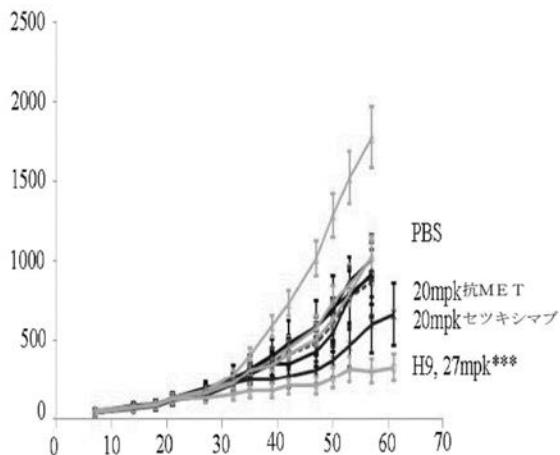
グラフのY軸 = 腫瘍体積 (mm³) , 平均値±標準誤差, 方法 = (Log 体積, SP)
グラフのX軸 = 移植後の日数

記号:

—○— PBS, 0.2 ml, 静脈内投与, 7日に1度×5回
- - - □ - - H9, 4 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回
..... △ H9, 27 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回
—◇— 抗MET, 3 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回
—●— セツキシマブ, 3 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回
- - - ◆ - - <11 セツキシマブ, 3 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回
—●— 抗MET, 3 mg/kg, 静脈内投与, / セツキシマブ, 3 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回
—●— 抗MET, 20 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回
—●— セツキシマブ, 20 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回
- - - ◆ - - <11 セツキシマブ, 20 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回
—●— 抗MET, 20 mg/kg, 静脈内投与, / セツキシマブ, 20 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回

【図 7】

図 7



グラフのY軸 = 腫瘍体積 (mm³) , 平均値±標準誤差, 方法 = (Log体積, SP)
 グラフのX軸 = 移植後の日数

記号:

- PBS, 0.2 ml, 静脈内投与, 7日に1度×5回
- 抗MET, 0.6 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回 / セツキシマブ, 0.6 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回
- 抗MET, 3 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回
- セツキシマブ, 3 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回
- 抗MET, 3 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回 / セツキシマブ, 3 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回
- <n 抗MET, 3 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回 / セツキシマブ, 3 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回
- 抗MET, 20 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回 / セツキシマブ, 20 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回
- H9, 0.8 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回
- H9, 4 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回
- H9, 27 mg/kg, 静脈内投与, 7日に1度×5回

【配列表】

2017504608000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年6月20日(2016.6.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) METに結合し、且つ、

(i) それぞれGYTF TDY YMH (配列番号11)、RVNPNRR GTTYNQ K FEG (配列番号12)、およびARANWLDY (配列番号13)の amino 酸配列からなる重鎖CDRであるHCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む重鎖、および

(ii) それぞれSVSSSVSSIYLH (配列番号14)、YSTSNLAS (配列番号15)およびQVYSGYPLT (配列番号16)の amino 酸配列からなる軽鎖CDRであるLCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む軽鎖

を含む抗体、および

(b) EGFRに結合し、且つ、

(i) それぞれGFSLTNYGVH (配列番号1)、VIYSGGNTDYNTPFKG (配列番号2)またはVIWSGGNTDYNTPTFTG (配列番号7)、およびARALDYDYDFAY (配列番号3)の amino 酸配列からなるscFv CDRであるscFv-HCDR1、scFv-HCDR2、およびscFv-HCDR3を含むHCVRドメイン、および

(i i) それぞれ R A S Y S I G T N I H (配列番号 4)、R Y A K E S I S (配列番号 5) または Y Y A S R S I S (配列番号 8)、および Q Q N N A W P T T (配列番号 6) のアミノ酸配列からなる s c F v CDR である s c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、および s c F v - L C D R 3 を含む L C V R ドメイン

を含む s c F v ポリペプチド

を含む多機能性抗体。

【請求項 2】

前記 s c F v ポリペプチドが

(a) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む H C V R ドメイン、および

(b) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む L C V R ドメイン

を含む、請求項 1 に記載の多機能性抗体。

【請求項 3】

前記重鎖が配列番号 53 のアミノ酸配列を含み、且つ、前記軽鎖が配列番号 33 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 から請求項 2 の何れか一項に記載の多機能性抗体。

【請求項 4】

前記 s c F v ポリペプチドの C 末端がペプチドリンカーを介して前記 M E T 抗体重鎖の N 末端に融合する、請求項 1 から請求項 3 の何れか一項に記載の多機能性抗体。

【請求項 5】

配列番号 25 のアミノ酸配列を含む請求項 1 から請求項 4 の何れか一項に記載の多機能性抗体。

【請求項 6】

前記重鎖が配列番号 27 のアミノ酸配列を含み、且つ、前記軽鎖が配列番号 33 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 から請求項 5 の何れか一項に記載の多機能性抗体。

【請求項 7】

M E T に結合する前記抗体が

(a) 各々がそれぞれ G Y T F T D Y Y M H (配列番号 11)、R V N P N R R G T T Y N Q K F E G (配列番号 12)、および A R A N W L D Y (配列番号 13) のアミノ酸配列からなる重鎖 CDR である H C D R 1、H C D R 2、および H C D R 3 を含む重鎖である第 1 重鎖と第 2 重鎖、および

(b) 各々がそれぞれ S V S S S V S S I Y L H (配列番号 14)、Y S T S N L A S (配列番号 15) および Q V Y S G Y P L T (配列番号 16) のアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR である L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 を含む軽鎖である第 1 軽鎖と第 2 軽鎖

を含む、請求項 1 から請求項 6 の何れか一項に記載の多機能性抗体。

【請求項 8】

前記第 1 s c F v ポリペプチドと前記第 2 s c F v ポリペプチドが各々

(i) それぞれ G F S L T N Y G V H (配列番号 1)、V I Y S G G N T D Y N T P F K G (配列番号 2) または V I W S G G N T D Y N T P F T G (配列番号 7)、および A R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号 3) のアミノ酸配列からなる s c F v CDR である s c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、および s c F v - H C D R 3 を含む H C V R ドメイン、および

(i i) R A S Y S I G T N I H (配列番号 4)、R Y A K E S I S (配列番号 5) または Y Y A S R S I S (配列番号 8)、および Q Q N N A W P T T (配列番号 6) のアミノ酸配列からなる s c F v CDR である s c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、および s c F v - L C D R 3 を含む L C V R ドメイン

を含む、請求項 7 に記載の多機能性抗体。

【請求項 9】

前記第 1 s c F v ポリペプチドと前記第 2 s c F v ポリペプチドが各々

(a) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む H C V R ドメイン、および

(b) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む L C V R ドメイン

を含む、請求項 8 に記載の多機能性抗体。

【請求項 10】

前記第 1 s c F v ポリペプチドと前記第 2 s c F v ポリペプチドが各々配列番号 23 のアミノ酸配列を含む、請求項 9 に記載の多機能性抗体。

【請求項 11】

M E T に結合する前記抗体が

(i) 各々が配列番号 53 のアミノ酸配列を含む重鎖である第 1 重鎖と第 2 重鎖、および

(i i) 各々が配列番号 33 のアミノ酸配列を含む軽鎖である第 1 軽鎖と第 2 軽鎖を含む、請求項 10 に記載の多機能性抗体。

【請求項 12】

前記第 1 s c F v ポリペプチドの C 末端がペプチドリinker を介して前記第 1 重鎖の N 末端に融合し、且つ、前記第 2 s c F v ポリペプチドの C 末端がペプチドリinker を介して前記第 2 重鎖の N 末端に融合する、請求項 11 に記載の多機能性抗体。

【請求項 13】

2 つの第 1 ポリペプチドと 2 つの第 2 ポリペプチドを含み、両方の第 1 ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号 27 であり、且つ、両方の第 2 ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号 33 である、請求項 12 に記載の多機能性抗体。

【請求項 14】

請求項 1 から請求項 13 の何れか一項に記載の多機能性抗体またはその M E T および E G F R 結合断片、および薬学的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 15】

治療に使用するための請求項 1 から請求項 13 の何れか一項に記載の多機能性抗体またはその M E T および E G F R 結合断片。

【請求項 16】

癌の治療に使用するための請求項 1 から請求項 13 の何れか一項に記載の多機能性抗体またはその M E T および E G F R 結合断片。

【請求項 17】

N S C L C、S C L C、胃癌、大腸癌、胆管癌、食道癌、黒色腫、ブドウ膜黒色腫、腎臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸部癌、または頭頸部癌の治療に使用するための請求項 1 から請求項 13 の何れか一項に記載の多機能性抗体またはその M E T および E G F R 結合断片。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0158

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0158】

エルロチニブ耐性 H C C - 827 N S C L C 異種移植片を担持する免疫不全マウスを上記の実施例において説明されるように作製し、(A) ベヒクルと 25 m g / k g エルロチニブ(すなわち、対照群)、(B) 25 m g / k g のエルロチニブと 27 m g / k g の抗体 N H - Y K の混合物、(C) 25 m g / k g のエルロチニブと 20 m g / k g のセツキシマブの混合物、(D) 20 m g / k g で投与される親 M E T 抗体と 25 m g / k g のエルロチニブの混合物、または(E) 20 m g / k g で投与される親 M E T 抗体、20 m g / k g で投与されるセツキシマブ、および 25 m g / k g のエルロチニブの混合物のいずれかで処理した。抗体 N H - Y K とエルロチニブの混合物(すなわち、処理群(B))により、他の全ての処理群と比較すると同じ期間またはそれより長い期間の後に絶対腫

瘍体積が著しく減少した（表 20）。したがって、エルロチニブ耐性腫瘍を有するマウスにおける腫瘍増殖は、特に P B S ベヒクル、セツキシマブ、または親 M E T 抗体と組み合わせてエルロチニブで処理された動物と比較すると、エルロチニブと組み合わせた抗体 N H - Y K による処理によって著しく低下する。エルロチニブと組み合わせた抗体 N H - Y K (B) はエルロチニブ、セツキシマブおよび親 M E T 抗体の混合物 (E) と比較すると優れた抗腫瘍作用も示した。

【表 29】

表 20

処理群	最終測定日	絶対腫瘍体積 (mm ³)
A	1 1 0	2 5 8 7
B	1 5 2	3 0 4
C	1 2 6	2 3 1 2
D	1 2 6	1 7 0 6
E	1 5 2	1 1 7 2

本発明は、以下の態様を含む。

[1]

(a) M E T に結合し、且つ、

(i) それぞれ G Y T F T D Y Y M H (配列番号 1 1)、R V N P N R R G T T Y N Q K F E G (配列番号 1 2)、および A R A N W L D Y (配列番号 1 3) のアミノ酸配列からなる重鎖 C D R である H C D R 1、H C D R 2、および H C D R 3 を含む重鎖、および

(i i) それぞれ S V S S S V S S I Y L H (配列番号 1 4)、Y S T S N L A S (配列番号 1 5) および Q V Y S G Y P L T (配列番号 1 6) のアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R である L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 を含む軽鎖

を含む抗体、および

(b) E G F R に結合し、且つ、

(i) それぞれ G F S L T N Y G V H (配列番号 1)、X₁ が Y または W であり、且つ、X₂ が K または T である V I X₁ S G G N T D Y N T P F X₂ G (配列番号 9)、および A R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号 3) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、および s c F v - H C D R 3 を含む H C V R ドメイン、および

(i i) それぞれ R A S Y S I G T N I H (配列番号 4)、X₁ が R または Y であり、X₂ が K または S であり、且つ、X₃ が E または R である X₁ Y A X₂ X₃ S I S (配列番号 10)、および Q Q N N A W P T T (配列番号 6) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、および s c F v - L C D R 3 を含む L C V R ドメイン

を含む s c F v ポリペプチド

を含む多機能性抗体。

[2]

E G F R に結合する前記 s c F v が

(i) それぞれ G F S L T N Y G V H (配列番号 1)、V I Y S G G N T D Y N T P F K G (配列番号 2)、および A R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号 3) のアミノ酸配列

からなる $s c F v$ CDR である $s c F v - H C D R 1$ 、 $s c F v - H C D R 2$ 、および $s c F v - H C D R 3$ を含む $H C V R$ ドメイン、および

(i i) それぞれ $R A S Y S I G T N I H$ (配列番号 4)、 $R Y A K E S I S$ (配列番号 5)、および $Q Q N N A W P T T$ (配列番号 6) のアミノ酸配列からなる $s c F v$ CDR である $s c F v - L C D R 1$ 、 $s c F v - L C D R 2$ 、および $s c F v - L C D R 3$ を含む $L C V R$ ドメイン

を含む、[1] に記載の多機能性抗体。

[3]

前記 $s c F v$ ポリペプチドが

(a) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む $H C V R$ ドメイン、および

(b) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む $L C V R$ ドメイン

を含む、[1] または [2] に記載の多機能性抗体。

[4]

前記重鎖が配列番号 53 のアミノ酸配列を含み、且つ、前記軽鎖が配列番号 33 のアミノ酸配列を含む、[1] から [3] の何れかに記載の多機能性抗体。

[5]

前記 $s c F v$ ポリペプチドの C 末端がペプチドリinker を介して前記 M E T 抗体重鎖の N 末端に融合する、[1] から [3] の何れかに記載の多機能性抗体。

[6]

配列番号 25 のアミノ酸配列を含む [1] から [5] の何れかに記載の多機能性抗体。

[7]

前記重鎖が配列番号 27 のアミノ酸配列を含み、且つ、前記軽鎖が配列番号 33 のアミノ酸配列を含む、[1] から [6] の何れかに記載の多機能性抗体。

[8]

M E T に結合する前記抗体が

(a) 各々がそれぞれ $G Y T F T D Y Y M H$ (配列番号 11)、 $R V N P N R R G T T Y N Q K F E G$ (配列番号 12)、および $A R A N W L D Y$ (配列番号 13) のアミノ酸配列からなる重鎖 CDR である $H C D R 1$ 、 $H C D R 2$ 、および $H C D R 3$ を含む重鎖である第 1 重鎖と第 2 重鎖、および

(b) 各々がそれぞれ $S V S S S V S S I Y L H$ (配列番号 14)、 $Y S T S N L A S$ (配列番号 15) および $Q V Y S G Y P L T$ (配列番号 16) のアミノ酸配列からなる軽鎖 CDR である $L C D R 1$ 、 $L C D R 2$ 、および $L C D R 3$ を含む軽鎖である第 1 軽鎖と第 2 軽鎖

を含む、[1] から [7] の何れかに記載の多機能性抗体。

[9]

前記第 1 $s c F v$ ポリペプチドと前記第 2 $s c F v$ ポリペプチドが各々

(i) それぞれ $G F S L T N Y G V H$ (配列番号 1)、 $V I Y S G G N T D Y N T P F K G$ (配列番号 2)、および $A R A L D Y Y D Y D F A Y$ (配列番号 3) のアミノ酸配列からなる $s c F v$ CDR である $s c F v - H C D R 1$ 、 $s c F v - H C D R 2$ 、および $s c F v - H C D R 3$ を含む $H C V R$ ドメイン、および

(i i) $R A S Y S I G T N I H$ (配列番号 4)、 $R Y A K E S I S$ (配列番号 5)、および $Q Q N N A W P T T$ (配列番号 6) のアミノ酸配列からなる $s c F v$ CDR である $s c F v - L C D R 1$ 、 $s c F v - L C D R 2$ 、および $s c F v - L C D R 3$ を含む $L C V R$ ドメイン

を含む、[8] に記載の多機能性抗体。

[10]

前記第 1 $s c F v$ ポリペプチドと前記第 2 $s c F v$ ポリペプチドが各々

(a) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む $H C V R$ ドメイン、および

(b) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む $L C V R$ ドメイン

を含む、[9] に記載の多機能性抗体。

[1 1]

前記第 1 s c F v ポリペプチドと前記第 2 s c F v ポリペプチドが各々配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む、[1 0] に記載の多機能性抗体。

[1 2]

M E T に結合する前記抗体が

(i) 各々が配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む重鎖である第 1 重鎖と第 2 重鎖、および

(i i) 各々が配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖である第 1 軽鎖と第 2 軽鎖を含む、[1 1] に記載の多機能性抗体。

[1 3]

前記第 1 s c F v ポリペプチドの C 末端がペプチドリinker を介して前記第 1 重鎖の N 末端に融合し、且つ、前記第 2 s c F v ポリペプチドの C 末端がペプチドリinker を介して前記第 2 重鎖の N 末端に融合する、[1 2] に記載の多機能性抗体。

[1 4]

2 つの第 1 ポリペプチドと 2 つの第 2 ポリペプチドを含み、両方の第 1 ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号 2 7 であり、且つ、両方の第 2 ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号 3 3 である、[1 3] に記載の多機能性抗体。

[1 5]

前記多機能性抗体によって細胞表面の M E T と E G F R の内部移行および / または分解が誘導される、[1] から [1 4] の何れかに記載の多機能性抗体。

[1 6]

E G F R に結合する前記 s c F v が

(i) それぞれ G F S L T N Y G V H (配列番号 1)、V I W S G G N T D Y N T P F T G (配列番号 7)、および A R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号 3) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、および s c F v - H C D R 3 を含む H C V R ドメイン、および

(i i) それぞれ R A S Y S I G T N I H (配列番号 4)、Y Y A S R S I S (配列番号 8)、および Q Q N N A W P T T (配列番号 6) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、s c F v - L C D R 3 を含む L C V R ドメイン

を含む、[1] に記載の多機能性抗体。

[1 7]

前記 s c F v ポリペプチドが

(a) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む H C V R ドメイン、および

(b) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む L C V R ドメインを含む、[1 6] に記載の多機能性抗体。

[1 8]

M E T に結合する前記抗体が

(i) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む重鎖、および

(i i) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む、[1 6] から [1 7] の何れかに記載の多機能性抗体。

[1 9]

前記 s c F v ポリペプチドの C 末端がペプチドリinker を介して前記 M E T 抗体重鎖の N 末端に融合する、[1 6] から [1 8] の何れかに記載の多機能性抗体。

[2 0]

配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む [1 6] から [1 9] の何れかに記載の多機能性抗体。

[2 1]

(i) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列、および

(i i) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列

を含む [1 6] から [2 0] の何れかに記載の多機能性抗体。

[2 2]

M E T に結合する前記抗体が

(a) 両方ともそれぞれ G Y T F T D Y Y M H (配列番号 1 1)、R V N P N R R G T T Y N Q K F E G (配列番号 1 2)、および A R A N W L D Y (配列番号 1 3) のアミノ酸配列からなる重鎖 C D R である H C D R 1、H C D R 2、および H C D R 3 を含む重鎖である第 1 重鎖と第 2 重鎖、および

(b) 両方ともそれぞれ S V S S S V S S I Y L H (配列番号 1 4)、Y S T S N L A S (配列番号 1 5) および Q V Y S G Y P L T (配列番号 1 6) のアミノ酸配列からなる軽鎖 C D R である L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 を含む軽鎖である第 1 軽鎖と第 2 軽鎖

を含む、[2 1] に記載の多機能性抗体。

[2 3]

前記第 1 s c F v ポリペプチドと前記第 2 s c F v ポリペプチドが各々

(i) それぞれ G F S L T N Y G V H (配列番号 1)、V I W S G G N T D Y N T P F T G (配列番号 7)、および A R A L D Y Y D Y D F A Y (配列番号 3) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - H C D R 1、s c F v - H C D R 2、および s c F v - H C D R 3 を含む H C V R ドメイン、および

(i i) それぞれ R A S Y S I G T N I H (配列番号 4)、Y Y A S R S I S (配列番号 8)、および Q Q N N A W P T T (配列番号 6) のアミノ酸配列からなる s c F v C D R である s c F v - L C D R 1、s c F v - L C D R 2、s c F v - L C D R 3 を含む L C V R ドメイン

を含む、[2 2] に記載の多機能性抗体。

[2 4]

前記第 1 s c F v ポリペプチドと前記第 2 s c F v ポリペプチドが各々

(i) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む H C V R ドメイン、および

(i i) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む L C V R ドメイン

を含む、[2 3] に記載の多機能性抗体。

[2 5]

前記第 1 s c F v ポリペプチドと前記第 2 s c F v ポリペプチドが各々配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む、[2 4] に記載の多機能性抗体。

[2 6]

M E T に結合する前記抗体が

(i) 両方とも配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む重鎖である第 1 重鎖と第 2 重鎖、および

(i i) 両方とも配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖である第 1 軽鎖と第 2 軽鎖を含む、[2 5] に記載の多機能性抗体。

[2 7]

前記第 1 s c F v ポリペプチドの C 末端がペプチドリinker を介して前記第 1 重鎖の N 末端に融合し、且つ、前記第 2 s c F v ポリペプチドの C 末端がペプチドリinker を介して前記第 2 重鎖の N 末端に融合する、[2 6] に記載の多機能性抗体。

[2 8]

2 つの第 1 ポリペプチドと 2 つの第 2 ポリペプチドを含み、両方の第 1 ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号 2 9 であり、且つ、両方の第 2 ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号 3 3 である、[2 7] に記載の多機能性抗体。

[2 9]

[1] から [2 8] の何れかに記載の多機能性抗体またはその M E T および E G F R 結合断片、および薬学的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤を含む医薬組成物。

[3 0]

治療に使用するための [1] から [2 8] の何れかに記載の多機能性抗体またはその M

E T および E G F R 結合断片。

[3 1]

癌の治療に使用するための [1] から [2 8] の何れかに記載の多機能性抗体またはその M E T および E G F R 結合断片。

[3 2]

N S C L C、S C L C、胃癌、大腸癌、胆管癌、食道癌、黒色腫、ブドウ膜黒色腫、腎臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸部癌、または頭頸部癌の治療に使用するための [1] から [2 8] の何れかに記載の多機能性抗体またはその M E T および E G F R 結合断片。

[3 3]

N S C L C、S C L C、胃癌、大腸癌、胆管癌、食道癌、黒色腫、ブドウ膜黒色腫、腎臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸部癌、または頭頸部癌であって、1つ以上の K R A S 突然変異を有する細胞を含むことを特徴とする前記癌の治療に使用するための [1] から [2 8] の何れかに記載の多機能性抗体またはその M E T および E G F R 結合断片。

[3 4]

癌を治療する方法であって、それを必要とする患者に [1] から [2 8] の何れかに記載の多機能性抗体またはその M E T および E G F R 結合断片の有効量を投与することを含む前記方法。

[3 5]

前記癌がヒトにおける N S C L C、S C L C、胃癌、大腸癌、胆管癌、食道癌、黒色腫、ブドウ膜黒色腫、腎臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸部癌、または頭頸部癌である、[3 4] に記載の方法。

[3 6]

前記腫瘍が1つ以上の K R A S 突然変異を有する細胞を含むことを特徴とする、[3 4] または [3 5] に記載の方法。

[3 7]

配列番号 2 7 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む D N A 分子。

[3 8]

配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む D N A 分子。

[3 9]

(a) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および

(b) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む D N A 分子。

[4 0]

[3 7] から [3 9] の何れかに記載の D N A 分子によって形質転換された哺乳類細胞であって、配列番号 2 7 のアミノ酸配列を有する第 1 ポリペプチドおよび配列番号 3 3 のアミノ酸配列を有する第 2 ポリペプチドを含む多機能性抗体を発現することが可能である前記細胞。

[4 1]

前記哺乳類細胞が C H O である、[4 0] に記載の哺乳類細胞。

[4 2]

アミノ酸配列が配列番号 2 7 である第 1 ポリペプチドとアミノ酸配列が配列番号 3 3 である第 2 ポリペプチドを含む多機能性抗体の生産方法であって、(1) 前記多機能性抗体が発現するような条件下で [4 0] または [4 1] に記載の哺乳類細胞を培養すること、および (2) 発現した前記多機能性抗体を回収することを含む前記方法。

[4 3]

[4 2] に記載の方法によって生産された、M E T と E G F R に結合する多機能性抗体

°

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/070850

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 C07K16/30 C07K16/46 A61K39/395 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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	R CASTOLDI ET AL: "A novel bispecific EGFR/Met antibody blocks tumor-promoting phenotypic effects induced by resistance to EGFR inhibition and has potent antitumor activity", ONCOGENE, vol. 32, no. 50, 1 July 2013 (2013-07-01), pages 5593-5601, XP055129019, ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/onc.2013.245	1,4-6, 15,29-38
A	whole document, especially the Abstract; page 5594, right-hand column, second paragraph; Figure 6 ----- -/--	2,3, 7-14, 16-28, 39-43

☒ 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

23 March 2015

Date of mailing of the international search report

01/04/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Luyten, Kattie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/070850

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/115551 A1 (ROCHE GLYCART AG [CH]; BOSSENMAIER BIRGIT [DE]; BRINKMANN ULRICH [DE];) 14 October 2010 (2010-10-14) cited in the application	1,4-6, 15,29-38
A	whole document, especially Examples 7, 16; SEQ ID NOS 1-2, 5-6	2,3, 7-14, 16-28, 39-43
A	----- WO 2010/059654 A1 (LILLY CO ELI [US]; DAVIES JULIAN [US]; LIU LING [US]; LU JIRONG [US];) 27 May 2010 (2010-05-27) cited in the application SEQ ID NOS 29, 41	1-43
A	----- HALL ET AL: "A single amino acid mutation in CDR3 of the 3-14-9 L chain abolished expression of the IDA 10-defined idiotope and antigen binding.", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 149, no. 5, 1 September 1992 (1992-09-01), pages 1605-1612, XP055023100, ISSN: 0022-1767 whole document, especially the Abstract	1-43
A	----- WO 2013/134743 A1 (HALOZYME INC [US]) 12 September 2013 (2013-09-12) Examples 1, 2, 15; SEQ ID NOS 29, 1135-1159, 288-468 -----	1-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/070850

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010115551 A1	14-10-2010	AR 076194 A1	26-05-2011
		AR 076195 A1	26-05-2011
		AU 2010233993 A1	08-09-2011
		AU 2010233995 A1	08-09-2011
		CA 2757426 A1	14-10-2010
		CA 2757669 A1	14-10-2010
		CN 102361883 A	22-02-2012
		CN 102361884 A	22-02-2012
		EP 2417160 A1	15-02-2012
		EP 2417164 A1	15-02-2012
		JP 5497887 B2	21-05-2014
		JP 5612663 B2	22-10-2014
		JP 2012522523 A	27-09-2012
		JP 2012522525 A	27-09-2012
		KR 20110124368 A	16-11-2011
		KR 20110126748 A	23-11-2011
		SG 175078 A1	28-11-2011
		SG 175080 A1	28-11-2011
		TW 201039848 A	16-11-2010
		TW 201039849 A	16-11-2010
		US 2010254988 A1	07-10-2010
		US 2010254989 A1	07-10-2010
		US 2013156772 A1	20-06-2013
		US 2013273054 A1	17-10-2013
		WO 2010115551 A1	14-10-2010
		WO 2010115553 A1	14-10-2010
WO 2010059654 A1	27-05-2010	AR 074360 A1	12-01-2011
		AU 2009316742 A1	27-05-2010
		CA 2743508 A1	27-05-2010
		CN 102216333 A	12-10-2011
		EA 201170716 A1	30-12-2011
		EP 2358755 A1	24-08-2011
		JP 2012509881 A	26-04-2012
		KR 20110074612 A	30-06-2011
		NZ 592215 A	28-09-2012
		PA 8849001 A1	28-06-2010
		TW 201023885 A	01-07-2010
		US 2010129369 A1	27-05-2010
		US 2012263723 A1	18-10-2012
		WO 2010059654 A1	27-05-2010
WO 2013134743 A1	12-09-2013	AU 2013229786 A1	25-09-2014
		CA 2866612 A1	12-09-2013
		CN 104379602 A	25-02-2015
		EP 2822970 A1	14-01-2015
		KR 20140130749 A	11-11-2014
		US 2013266579 A1	10-10-2013
		WO 2013134743 A1	12-09-2013

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K	7/06	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 0 7 K	7/08	(2006.01)	C 0 7 K 7/06
			C 0 7 K 7/08

(81) 指定国 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 アルダス, ヘクター
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8, インディアナポリス, ピー・オー・ボックス 6 2 8 8, イーライ リリー アンド カンパニー内

(72) 発明者 アラン, バレット
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8, インディアナポリス, ピー・オー・ボックス 6 2 8 8, イーライ リリー アンド カンパニー内

(72) 発明者 リウ, リン
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8, インディアナポリス, ピー・オー・ボックス 6 2 8 8, イーライ リリー アンド カンパニー内

(72) 発明者 タン, イン
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8, インディアナポリス, ピー・オー・ボックス 6 2 8 8, イーライ リリー アンド カンパニー内

(72) 発明者 チョン, シェン - フン, レインボー
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8, インディアナポリス, ピー・オー・ボックス 6 2 8 8, イーライ リリー アンド カンパニー内

(72) 発明者 ヤチ, ピア, ポリーナ
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8, インディアナポリス, ピー・オー・ボックス 6 2 8 8, イーライ リリー アンド カンパニー内

(72) 発明者 ル, ジロン
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8, インディアナポリス, ピー・オー・ボックス 6 2 8 8, イーライ リリー アンド カンパニー内

F ターム(参考) 4C085 AA13 AA14 AA21 BB01 EE01
4H045 AA11 AA30 BA10 BA15 BA16 BA17 BA41 CA40 DA50 DA75
DA76 EA20 FA74