

(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2014-531217

(P2014-531217A)

(43) 公表日 平成26年11月27日(2014.11.27)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-----------------------------|-----------------|-------------|
| C12N 15/09 (2006.01) | C12N 15/00 ZNAA | 2G045 |
| C07K 16/28 (2006.01) | C07K 16/28 | 4B024 |
| C12N 1/15 (2006.01) | C12N 1/15 | 4B064 |
| C12N 1/19 (2006.01) | C12N 1/19 | 4B065 |
| C12N 1/21 (2006.01) | C12N 1/21 | 4C085 |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-534477 (P2014-534477)
 (86) (22) 出願日 平成24年10月5日 (2012.10.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年6月3日 (2014.6.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2012/008069
 (87) 国際公開番号 WO2013/051878
 (87) 国際公開日 平成25年4月11日 (2013.4.11)
 (31) 優先権主張番号 10-2011-0101292
 (32) 優先日 平成23年10月5日 (2011.10.5)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(71) 出願人 503447036
 サムスン エレクトロニクス カンパニー
 リミテッド
 大韓民国・443-742・キョンギード
 ・スウォンシ・ヨントンク・サムスン
 ーロ・129
 (74) 代理人 110000671
 八田国際特許業務法人
 (72) 発明者 チョン, カンホ
 大韓民国, 443-803 キョンギード
 , スウォンシ, ヨントンク, サムスン
 ーロ, 130, シー/オー サムスン ア
 ドバンスド インスティテュート オブ
 テクノロジー

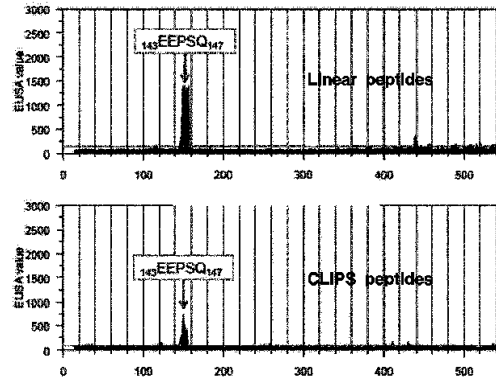
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 c-Met のSEMAドメイン内のエピトープに特異的に結合する抗体

(57) 【要約】

c-Met のSEMAドメイン内のエピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、並びにそれと係わる医薬組成物、方法、キット及び細胞である。

【選択図】 図4



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

c - M e t タンパク質の S E M A ドメイン内のエピトープに特異的に結合する抗体または抗原結合断片であって、前記エピトープは、配列番号 1 のアミノ酸配列またはその部分を有する、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

前記エピトープは、配列番号 2 または配列番号 3 のアミノ酸配列からなることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

前記抗体または抗原結合断片は、

配列番号 4、配列番号 5 及び配列番号 6 からなる群から選択される一つ以上の重鎖相補性決定領域アミノ酸配列を含む重鎖可変領域、並びに配列番号 7、配列番号 8 及び配列番号 9 からなる群から選択される一つ以上の軽鎖相補性決定領域アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、を含むことを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 4】

前記重鎖可変領域は、配列番号 10 のアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域は、配列番号 11 のアミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項 3 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

モノクローナル抗体、二重特異抗体、多重特異抗体、または s c F v、(s c F v)₂、F a b、F a b ' 及び F (a b ')₂ からなる群から選択される抗原結合断片であることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

20

【請求項 6】

前記 c - M e t タンパク質は、ヒト c - M e t、サル c - M e t、マウス c - M e t 及びラット c - M e t であることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のその抗体または抗原結合断片。

【請求項 7】

c - M e t タンパク質の拮抗剤であることを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

30

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片の治療的有効量、及び薬学的に許容可能な担体、希釈剤または賦形剤を含むがん予防用またはがん治療用の医薬組成物。

【請求項 9】

前記がんは、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、皮膚癌、肌または眼球の黒色腫、直腸癌、肛門付近の癌、食道癌、小腸腫瘍、内分泌系腫瘍 (C a n c e r o f t h e E n d o c r i n e G l a n d)、副甲状腺癌、副腎癌、軟部組織肉腫、尿道癌、慢性または急性の白血病、リンパ球性リンパ腫、肝細胞癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽腫、子宮頸部癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞腺腫、乳癌、結腸癌、大腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺腫瘍、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、陰門癌、甲状腺癌、及び頭頸部癌からなる群から選択されることを特徴とする請求項 8 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片、または、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体若しくは抗原結合断片、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を、個体に投与することを、がん治療方法。

【請求項 11】

分析のために c - M e t タンパク質の S E M A ドメイン内のエピトープと試料を接触さ

50

せること(ここで、前記エピトープは配列番号1のアミノ酸配列を含む)、;および、
エピトープの試料への結合を検出すること(ここで前記エピトープ及び試料が1 pM ~
10 nMの範囲の結合親和力を示す場合、前記試料は候補c - M e t拮抗剤とする)、
を含む、c - M e t拮抗剤をスクリーニングする方法。

【請求項12】

前記エピトープは、配列番号2または配列番号3からなることを特徴とする請求項11
に記載の方法。

【請求項13】

前記試料は、抗体を含むことを特徴とする請求項11または12に記載の方法。

【請求項14】

がんを診断、予防または治療するための候補物質をスクリーニングするために使用され
る、請求項11に記載の方法。

【請求項15】

請求項1~7のいずれか1項に記載の抗体またはその抗原結合断片を含む、がん診断用
キット。

【請求項16】

前記がんは、肺癌または卵巣癌であることを特徴とする、請求項15に記載のキット。

【請求項17】

選択的にベクター中にある、請求項1~7のいずれか1項に記載の抗体またはその抗原
結合断片をコードする核酸。

【請求項18】

請求項17に記載の核酸を含む細胞。

【請求項19】

細胞中の請求項17に記載の核酸を発現させることを含む、抗体または抗原結合断片を
作製する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、c - M e tのS E M Aドメイン内のエピトープに特異的に結合する抗体また
はその抗原結合断片、並びにそれと係わる医薬組成物、方法、キット及び細胞に関する。

【背景技術】

【0002】

肝細胞成長因子(HGF: hepatocyte growth factor)は、チロシンキナーゼ受容体で
あるc - M e tの細胞の外部位に結合し、多様な正常細胞及び腫瘍細胞において、分裂、
移動、形態発生、および血管新生を誘発する間充織由来の多面発現性サイトカイン(mese
nchyme-derived pleiotrophic cytokine)の一種である。HGF/c - M e tシグナル伝
達経路の調節は、腫瘍の進行、転移、移動、浸襲及び血管新生のような、がんがんと係わ
る多様なメカニズムに関与する。また、c - M e tの増幅または突然変異は、リガンド非
依存性発がん(tumorigenesis)を誘発するものと見られる。従って、c -
M e tは、抗がん治療のための新たなターゲットとして注目されている。

【0003】

特に、c - M e tは、従来知られている抗がん剤の作用メカニズムにおいて、薬物耐性
に関与すると知られながら、さらに一層、いわゆるオーダーメイド医療における重要性が
認識されている。EGFR(ERBB1)を標的とする代表的な抗がん治療剤であるエル
ピタックス(Erbibitux)またはタルセバ(Tarceva)のような薬物は、がん
発生メカニズムと係わるシグナル伝達を遮断することによって作動する。また、乳癌治療
剤として周知のハーセプチン(Herceptin)は、ERBB2(HER2)を標的
として、細胞増殖に必要なシグナル伝達を遮断することによって作動する。しかし、前記
薬剤に対する耐性がある患者のうち、c - M e tタンパク質の過剰発現などにより、抗が
ん剤の作動を避け、細胞増殖を誘導する他のシグナル伝達メカニズムが活性化されるとい

10

20

30

40

50

う研究が最近発表されている。かような理由により、c - M e t は、抗がん剤と係わって、多数の製薬会社が注目している標的分子になっている。

【0004】

関連技術は、c - M e t の作用を阻害する抗体治療剤を開示している。しかし、前記関連技術は、本来の構造を有する抗体は、c - M e t 分子の二量体化を誘導し、それによって、がんを誘発する問題点が発見された。

【0005】

c - M e t の作用を阻害する抗体治療剤を開示する他の関連技術は、この抗体が、c - M e t のリガンドである H G F c - M e t への c - M e t の結合を阻害する機能はあるが、抗体自体の c - M e t への結合により、リガンドとは係わりなく、c - M e t の二量体化を誘発し、かえってがんを引き起こすシグナルを伝達させるアゴニストとして作用するという副作用が発見された。

10

【0006】

他の関連技術は、c - M e t の二量体化を防止するために、本来は、アゴニストである両腕抗体 (two-armed antibody) を、遺伝子組み換え技術を用いて修飾することで作製した、c - M e t に対する片腕拮抗 (one-armed antagonistic) 抗体を開示しており、現在、それに対する臨床試験段階の製品開発が進められている。しかし、前記関連技術において、前記抗体は、化学療法と併用する治療の場合にのみ効果を示し、抗体単独で処理する場合には、抗がん効果が大きくないことが確認された。従って、従来技術によるとしても、c - M e t の作用を阻害する、がん予防用またはがん治療用の新たな医薬組成物を開発するために、c - M e t 上の標的部分を研究する必要がある。

20

【発明の概要】

【0007】

本発明の一実施形態は、c - M e t タンパク質の S E M A ドメイン内のエピトープに特異的に結合する抗体または抗原結合断片を提供する。

【0008】

本発明の他の実施形態は、c - M e t タンパク質の S E M A ドメイン内のエピトープに特異的に結合する抗体または抗原結合断片を含むがん予防用またはがん治療用の医薬組成物、がんを治療する方法、c - M e t 拮抗剤をスクリーニングする方法、がん診断用キット、抗体または抗原結合断片をコードする核酸、核酸を含む細胞、及び抗体または抗原結合断片を作製する方法を提供する。

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の一実施形態は、配列番号1のアミノ酸配列で表示される c - M e t タンパク質の S E M A ドメイン内のエピトープに特異的に結合する抗体または抗原結合断片を提供する。

【発明の効果】

【0010】

本発明の一実施形態による c - M e t の S E M A ドメイン内のエピトープに特異的に結合する抗体、及びそれを含むがん予防用またはがん治療用の医薬組成物によれば、がんを効率的に予防または治療することができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、所望する C D R に変異を加えた h u A b F 4 6 抗体の s c F v ライブラリー遺伝子を得るためのオーバーラップ・エクステンション P C R (overlap extension P C R) 法を示す概略図である。

【図2】図2は、マウス抗体 A b F 4 6 の全長 c - M e t に対する認識力を確認する結果を示す図である。

【図3】図3は、マウス抗体 A b F 4 6 の S E M A ドメインに対する認識力を確認した結果を示す図である。

50

【図4】図4は、huAbF46抗体のエピトープマッピングの酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）の結果を示すグラフである。

【図5A】図5Aは、SEMAドメイン上のhuAbF46抗体のエピトープ位置を確認する図面である。

【図5B】図5Bは、SEMAドメイン上のhuAbF46抗体のエピトープ位置を確認する図面である。

【図6A】図6Aは、BrdUアッセイによる、ヒト化抗体huAbF46のアゴニスト作用の程度を確認した結果を示すグラフである。

【図6B】図6Bは、BrdUアッセイによる、ヒト化抗体huAbF46のアゴニスト作用の程度を確認した結果を示すグラフである。

【図7】図7は、一実施形態によるhuAbF46-H4-A1（U6-HC7）、huAbF46-H4-A1（IgG2hinge）及びhuAbF46-H4-A1（IgG2Fc）抗体の*in vitro*での細胞増殖（cell viability）分析を行った結果を示すグラフである。

【図8A】図8Aは、Aktリン酸化による、ヒト化抗体huAbF46のアゴニスト作用の程度を確認した結果を示すグラフである。

【図8B】図8Bは、Aktリン酸化による、ヒト化抗体huAbF46のアゴニスト作用の程度を確認した結果を示すグラフである。

【図9】図9は、c-Metの分解程度を測定によって、一実施形態によるhuAbF46-H4-A1、huAbF46-H4-A2、huAbF46-H4-A3、およびhuAbF46-H4-A5抗体の抗がん効果を確認した結果を示すグラフである。

【図10】図10は、一実施形態によるヒト化抗体huAbF46の*in vitro*での細胞増殖分析を行った結果を示すグラフである。

【図11A】図11Aは、一実施形態による、マウス脳癌異種移植動物モデルまたは胃癌異種移植動物モデルを使用して、マウス抗体AbF46及びキメラ抗体chAbF46の*in vivo*での抗がん効果分析の結果を示すグラフである。

【図11B】図11Bは、一実施形態による、マウス脳癌異種移植動物モデルまたは胃癌異種移植動物モデルを使用して、マウス抗体AbF46及びキメラ抗体chAbF46の*in vivo*での抗がん効果分析の結果を示すグラフである。

【図11C】図11Cは、一実施形態による、マウス脳癌異種移植動物モデルまたは胃癌異種移植動物モデルを使用して、マウス抗体AbF46及びキメラ抗体chAbF46の*in vivo*での抗がん効果分析の結果を示すグラフである。

【図12】図12は、一実施形態による、マウス抗体AbF46及びヒト化抗体huAbF46の*in vivo*での抗がん効果分析を、異種移植肺癌マウス動物モデルを対象にして行った結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

ここで、本発明の様々な実施形態が詳細に参照され、その実施例は添付図面に例証されているが、類似の番号は各図面を通して同一の要素を示している。この点については、この実施形態が異なる形態を持ちうること、および、ここに述べられる説明に限られているものとして解釈されるべきではない。したがって、実施形態は、図を参照することによって、この記述の様態を説明するために下に単に記載されたのみである。ここに用いられているように、「および/または」という語は、関連する記載された項目の一つ以上のすべての組合せを含む。

【0013】

本発明の一実施形態は、配列番号1のアミノ酸配列で表示されるc-Metタンパク質のSEMAドメイン内のエピトープに特異的に結合する抗体または抗原結合断片を提供する。

【0014】

用語「c-Met」または「c-Metタンパク質」は、肝細胞成長因子（HGF）と

10

20

30

40

50

結合する受容体チロシンキナーゼを意味する。前記タンパク質は、例えば、GenBank Accession Number NM_000245でもって提供されたヌクレオチド配列によってコードされたポリペプチド、またはGenBank Accession Number NM_000236でもって提供されたポリペプチド配列によってコードされたタンパク質、またはその細胞外ドメインを含む。受容体チロシンキナーゼ c - M e t は、例えば、発がん、がん転移、がん細胞移動、がん細胞浸透、新生血管生成過程のようなさまざまなメカニズムに参与する。

【0015】

肝細胞成長因子 (H G F : hepatocyte growth factor) の受容体である c - M e t は、細胞外部位、膜透過部位、細胞内部位の3つの部分に区分され、細胞外部位の場合、二硫化結合によって、 α -小単位体と β -小単位体とが連結された形態で、HGF結合ドメインであるS E M Aドメイン、P S Iドメイン (plexin-semaphorins-integrin homology domain) 及びI P Tドメイン (immunoglobulin-like fold shared by plexins and transcriptional factors domain) からなる。すなわち、c - M e t タンパク質のS E M Aドメインは、c - M e t の細胞外部位に存在するドメインであり、HGFが結合する部位に該当する。特に、前記配列番号1のアミノ酸配列を有するエピトープ (epitope) は、c - M e t タンパク質のS E M Aドメイン内のエピトープのうち、2番及び3番のプロペラドメイン間のループ (loop) 部位に該当する。

10

【0016】

用語「エピトープ」は、抗原決定部位 (antigenic determinant) であり、抗体によって認識される抗原の一部を意味するものであると解釈される。一実施形態によれば、前記エピトープは、配列番号2または配列番号3のアミノ酸配列を有するポリペプチドでもありうる。前記ポリペプチドもまた、c - M e t タンパク質のS E M Aドメイン内に存在するエピトープでもありうる。

20

【0017】

前記配列番号2のアミノ酸配列を有するエピトープは、c - M e t タンパク質のS E M Aドメイン内の2番及び3番のプロペラ構造のドメイン間のループ部位のうち、最外に位置した領域に該当し、前記配列番号3のアミノ酸配列を有するエピトープは、一実施形態による抗体または抗原結合断片が最も特異的に結合する部位である。

【0018】

前記抗体または抗原結合断片は、配列番号4、配列番号5及び配列番号6からなる群から選択される一つ以上の重鎖相補性決定領域のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、並びに配列番号7、配列番号8及び配列番号9からなる群から選択される一つ以上の軽鎖相補性決定領域のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含みうるものでもある。

30

【0019】

前記重鎖可変領域は、配列番号10のアミノ酸配列を有し、前記軽鎖可変領域は、配列番号11のアミノ酸配列を有していてもよい。

【0020】

前記抗体またはその抗原結合断片 (antigen binding fragment) は、モノクローナル抗体、またはs c F v、(s c F v)₂、F a b、F a b ' 及びF (a b ')₂ からなる群から選択される抗原結合断片でもあってもよい。

40

【0021】

天然に存在するインタクトな抗体または免疫グロブリンは、下記4個のポリペプチドを含む：2個の全長軽鎖 (light chain)、及び2個の全長重鎖 (heavy chain) であり、それぞれの軽鎖は、重鎖とジスルフィド結合で結合されている。抗体の不変領域は、重鎖不変領域及び軽鎖不変領域に分けられ、重鎖不変領域は、ガンマ (γ) 型、ミュー (μ) 型、アルファ (α) 型、デルタ (δ) 型及びイプシロン (ϵ) 型を有し、サブクラスとして、ガンマ1 (γ 1) 型、ガンマ2 (γ 2) 型、ガンマ3 (γ 3) 型、ガンマ4 (γ 4) 型、アルファ1 (α 1) 型及びアルファ2 (α 2) 型を有する。軽鎖の不変領域は、カッパ (κ) 型及びラムダ (λ) 型を有する。軽鎖は、抗体において配列が異なり、特定抗原に対する抗体の結合および特異性に利用される。

50

【0022】

用語「重鎖」は、抗原への特異性を決定するアミノ酸配列を有する可変領域 V_H と、3個の不変領域ドメイン C_{H1} 、 C_{H2} 及び C_{H3} を有する不変領域と、を含む全長重鎖、およびその断片のいずれをも含む意味に解釈される。また、用語「軽鎖」は、抗原への特異性を決定するアミノ酸配列を有する可変領域 V_L と、不変領域ドメイン C_L と、を含む全長軽鎖、およびその断片をいずれをも含む意味に解釈される。

【0023】

用語「CDR (complementarity determining region)」は、免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の高度可変領域 (hypervariable region) のアミノ酸配列を意味する。前記CDRは、抗体が、抗原またはエピトープに結合するにおいて、主な接触残基を提供することができる。重鎖及び軽鎖は、それぞれ3個のCDRを含んでもよい(CDRH1、CDRH2、CDRH3、及びCDRL1、CDRL2、CDRL3)。4個のフレームワーク領域は、CDRよりはさらに高度に保存されたアミノ酸配列を有し、 V_H または V_L においてCDR領域を分離する。

10

【0024】

用語「抗原結合断片」は、免疫グロブリン全体構造に対するその断片であり、抗原が結合することができる部分を含むポリペプチドの一部を意味する。例えば、抗原結合断片は、 $F(ab')_2$ 断片、 Fab' 断片、 Fab 断片、 Fv 断片または $scFv$ 断片があるが、それらに限定されるものではない。 Fab 断片は、1個の抗原結合部位を有し、軽鎖及び重鎖の可変領域、軽鎖の不変領域、並びに重鎖の最初の不変領域 C_{H1} を含む。 Fab' 断片は、重鎖 C_{H1} ドメインのC末端に、一つ以上のシステイン残基を含むヒンジ領域 (hinge region) を追加して含むという点で、 Fab と違いがある。 $F(ab')_2$ 断片は、 Fab' のヒンジ領域のシステイン残基が、ジスルフィド結合をなしながら生成される。 Fv は、重鎖可変部位及び軽鎖可変部位のみを有している最小の抗体断片であり、 Fv 断片を生成する組み換え技術は、当業者にとって周知である。二本鎖 Fv (two-chain Fv) は、非共有結合によって、重鎖可変部位と軽鎖可変部位とが結合されている。単鎖 Fv (single-chain Fv) は、一般的に、ペプチドリッカーを介して、重鎖の可変領域と、軽鎖の可変領域とが共有結合で連結されるか、あるいはC末端においてそのまま結合されており、二本鎖 Fv のように、ダイマーのような構造をなすことができる。前記抗原結合断片は、タンパク質加水分解酵素を利用して得られ(例えば、全体抗体をパパイニンで制限切断すれば、 Fab を得ることができ、ペプシンで切断すれば、 $F(ab')_2$ 断片を得ることができる)、遺伝子組み換え技術を用いて作製することができる。

20

30

【0025】

前記 $c-Met$ は、ヒト $c-Met$ 、サル $c-Met$ 、マウス $c-Met$ 及びラット $c-Met$ からなる群から選択される $c-Met$ から由来したものである。

【0026】

本発明の他の実施形態は、配列番号1のアミノ酸配列で表示される $c-Met$ タンパク質のSEMAドメイン内のエピトープに特異的に結合する抗体または抗原結合断片の治療的有効量、薬学的に許容される担体、及び希釈剤または賦形剤を含むがん予防用またはがん治療用の医薬組成物を提供する。

40

【0027】

前記がんは、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、皮膚癌、肌または眼球の黒色腫、直腸癌、肛門付近の癌、食道癌、小腸腫瘍、内分泌系腫瘍 (Cancer of the Endocrine Gland)、副甲状腺癌、副腎癌、軟部組織肉腫、尿道癌、慢性または急性の白血病、リンパ球性リンパ腫、肝細胞癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽腫、子宮頸部癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞腺腫、乳癌、結腸癌、大腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺腫瘍、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、陰門癌、甲状腺癌及び頭頸部癌からなる群から選択されるものである。

【0028】

一実施形態によれば、前記エピトープは、配列番号2または配列番号3のアミノ酸配列

50

を有するポリペプチドであってもよい。

【0029】

がん予防用または、がん治療用の前記医薬組成物は、作製薬学的に許容される担体を含んでもよい。前記組成物に含まれる薬学的に許容される担体は、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、澱粉、アカシアゴム（アラビア・ゴム、gum acacia）、リン酸カルシウム、アルギネート、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微晶質セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、シロップ、メチルセルロース、オキシ安息香酸メチル（メチルヒドロキシベンゾエート）、プロピルヒドロキシベンゾエート、滑石、ステアリン酸マグネシウムおよび／またはミネラルオイルなどを含むが、それらに限定されるのではない。前記医薬組成物は、前記成分以外に、潤滑剤、湿潤剤、甘味剤、香味剤（flavor enhancer）、乳化剤、懸濁液剤、保存剤などをさらに含んでもよい。

10

【0030】

前記がん予防用またはがん治療用の医薬組成物は、経口または非経口で投与することができる。非経口投与である場合には、静脈内注入、皮下注入、筋肉注入、腹腔注入、内皮投与、局所投与、鼻内投与、肺内投与及び直腸内投与などで投与することができる。経口投与時、タンパク質またはペプチドは消化されることから、経口用組成物においては、分解を避ける為に、有効成分をコーティングすること、または剤形化することができる。また、前記医薬組成物は、投与後に標的細胞に向かうための能力を備えることができる。

【0031】

前記がん予防用またはがん治療用の医薬組成物の適する投与量は、製剤化方法；投与方式；患者の年齢、体重、性別、病的状態、飲食物；投与時間；投与経路；排泄速度及び反応感受性；のような要因によって、多様に処方されることができる。前記組成物の望ましい投与量は、成人を基準にして、0.001～100mg/kgの範囲内である。用語「治療的有效量（therapeutically effective amount）」は、がんの予防または治療、または血管新生による疾患の予防または治療に十分な量を意味する。

20

【0032】

前記組成物は、当業者が容易に実施することができる方法により、薬学的に許容される担体及び／または賦形剤を利用して、製剤化することによって、単位用量形態で作製されることも、あるいは多用量容器内に込められて作製されることもできる。このとき、剤形は、オイル内または水性媒質内の溶液、懸濁液、シロップ剤、乳化液状、エキス剤、散剤、粉末剤、顆粒剤、錠剤またはカプセル剤の形態でもあり、分散剤または安定化剤を追加して含んでもよい。また、前記組成物は、個別治療剤として投与することも、あるいは他の治療剤と併用して投与することもでき、従来の治療剤と、順次または同時に投与される。一方、前記組成物は、抗体またはその抗原結合断片を含むので、免疫リポソームに剤形化される。抗体を含むリポソームは、当業者に周知の方法によって作製される。前記免疫リポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、及びポリエチレングリコール誘導体化されたホスファチジルエタノールアミンを含む脂質組成物であり、逆相蒸発法によって作製することもできる。例えば、抗体のFab'断片は、チオール・ジスルフィド交換反応を介して、リポソームに接合される。ドキソルビシンのような化学治療剤が追加してリポソーム内に含まれてもよい。

30

40

【0033】

前記抗体または抗原結合断片は、c-Metタンパク質の拮抗剤（antagonist）でもある。

【0034】

用語「拮抗剤（アンタゴニスト）」は、標的物（例えば、c-Met）の生理活性のうち一つ以上を、部分的に、あるいは完全に遮断、抑制または中和させる全ての分子を含む概念に解釈される。例えば、アンタゴニスト（拮抗剤）抗体は、抗体に結合する抗原（例えば、c-Met）の生理活性を抑制する、あるいは低減する抗体を意味する。前記アンタゴニストは、リガンドに対する受容体の結合により、受容体リン酸化（phosphorylatio

50

n) を低下させたり、あるいはリガンドによって活性化された細胞を不活性化させたり、あるいは死滅させたりすることができる。また、アンタゴニストは、受容体とリガンドとの間の相互作用を完全に断絶すること、あるいは受容体の三次構造の変化または減少調節 (down regulation) することによって、前記相互作用を実質的に低減させることができる。

【0035】

一実施形態において、前記抗体またはその抗原結合断片は、配列番号6、配列番号7及び配列番号8からなる群から選択される一つ以上の重鎖相補性決定領域のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、並びに配列番号9、配列番号10及び配列番号11からなる群から選択される一つ以上の軽鎖相補性決定領域のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでいてもよい。また、前記重鎖可変領域は、配列番号12のアミノ酸配列からなり、前記軽鎖可変領域は、配列番号13のアミノ酸配列を有していてもよい。

10

【0036】

本発明の他の一実施形態においては、c-Metタンパク質のSEMAドメイン内のエピトープに特異的に結合する抗体または抗原結合断片の治療的有効量であって、前記エピトープは、配列番号1のアミノ酸配列またはその部分であり、薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含むがん予防用またはがん治療用の医薬組成物を個体に投与する段階を含むがん治療方法を提供する。

【0037】

がん予防用またはがん治療用の医薬組成物及び、その投与方法は、前述の通りである。

20

【0038】

前記がん予防用またはがん治療用の医薬組成物が投与される個体は、全ての動物を含む。例えば、前記動物は、ヒト、イヌ、ネコまたはマウスでもよい。

【0039】

本発明のさらに他の一実施形態は、c-Met拮抗剤(アンタゴニスト)をスクリーニングする方法を提供し、該方法は、分析のためにc-Metタンパク質のSEMAドメイン内のエピトープと試料を接触させること(ここで、前記エピトープは配列番号1のアミノ酸配列、またはその部分を含む)、;および、エピトープの試料への結合を検出すること(ここで前記エピトープ及び試料が1pM~10nMの範囲の結合親和力を示す場合、前記試料は候補c-Met拮抗剤とする)、を含む、c-Met拮抗剤をスクリーニングすることを含む。

30

【0040】

前記スクリーニング方法によれば、まず、配列番号1のアミノ酸配列またはその部分を有するc-Metタンパク質のSEMAドメイン内のエピトープを、分析する試料と接触させる。前記c-Metは、ヒトc-Met、サルc-Met、マウスc-Met及びラットc-Metからなる群から選択されるc-Metから由来したものであるが、それらに限定されるものではない。本明細書で使用された用語「試料(サンプル)」は、該試料が、配列番号1のアミノ酸配列またはその部分を有するc-Metタンパク質のSEMAドメイン内のエピトープと結合するか否かということを確認するスクリーニング方法において使用された未知の物質を意味する。前記試料は、例えば、抗体・抗原結合断片のようなポリペプチド、化学物質、ポリヌクレオチド、アンチセンスRNA、shRNA(short hairpin RNA)、siRNA(small interference RNA)及び天産抽出物を含むが、それらに限定されるのではない。

40

【0041】

次に、分析する試料と、配列番号1のアミノ酸配列またはその部分を有するc-Metタンパク質のSEMAドメイン内のエピトープとの結合親和力が測定される。前記結合親和力の測定は、当業者に公知の多様な方法を介して実施される。例えば、前記結合親和力は、ピアコア(Biacore)装置を使用して測定することができる。一般的に、治療用薬品として、前記結合親和力が認められる範囲は、結合定数である K_D 値が10nM以下であると定義される。すなわち、例えば、配列番号1のアミノ酸配列として表示されるc-M

50

e tタンパク質のS E M Aドメイン内のエピトープと、分析する試料（例えば、抗体）との結合親和力は、ピアコア装置を用いて表面プラズモン共鳴（surface Plasmon resonance）方法で測定したとき、1 p M ~ 1 0 n M、または1 0 p M ~ 1 0 n M、または1 0 0 p M ~ 1 0 n Mである場合、前記試料（例えば、抗体）をがん予防用またはがん治療用の候補物質と判断する。

【0042】

前記エピトープは、配列番号2または配列番号3のアミノ酸配列を有するポリペプチドであってもよい。すなわち、前記スクリーニング方法で、配列番号1のアミノ酸配列、またはその部分を有するc - M e tタンパク質のS E M Aドメイン内のエピトープの代わりに、前記配列番号2または3のアミノ酸配列を有するポリペプチドを使用する場合にも、前述と同様のスクリーニング結果を得ることができる。

10

【0043】

本発明の他の一実施形態は、前記抗体またはその抗原結合断片、抗体、抗体断片及びタンパク質のエピトープ結合を利用する多様な適用のための生命工学的ツールを含むがん診断キットを提供する。

【0044】

前記がんは、例えば、肺癌または卵巣癌であってもよいが、それらに限定されるものではない。一部の肺癌患者または卵巣癌患者において、前記c - M e tタンパク質のS E M Aドメイン内で、配列番号3で表示されるエピトープのうち、168番目のアミノ酸であるG l uが、A s pに変異が起こったと知られている（M. Sattler et al., Th er . A d v . M e d . O n c o l . 2 0 1 1 , 3 (4) : 1 7 1 - 1 8 4 ）。

20

【0045】

前記配列番号1のアミノ酸配列、配列番号2のアミノ酸配列または配列番号3のアミノ酸配列を有するc - M e tタンパク質のS E M Aドメイン内のエピトープに特異的に結合する抗体または抗原結合断片は、生物学的試料に含まれてもよい。例えば、前記生物学的試料は、がんの疑いがある患者の組織、細胞または全血であってもよいが、それらに限定されるものではない。

【0046】

配列番号1のアミノ酸配列、配列番号2のアミノ酸配列または配列番号3のアミノ酸配列を有するc - M e tタンパク質のS E M Aドメイン内のエピトープに特異的に結合する抗体または抗原結合断片は、前記配列番号3のアミノ酸配列を有するエピトープに対する高い結合親和力を有し、前記変異を有するc - M e tタンパク質のエピトープ（配列番号70）に対する低い結合親和力を有する。従って、がんの疑いのある患者に由来する生物学的試料を、配列番号3のアミノ酸配列を有するエピトープと接触させた場合、抗原 - 抗体複合体が形成され、配列番号70のアミノ酸配列を有するエピトープと接触させた場合、抗原 - 抗体複合体が形成されなければ、前記患者は、がんを患っていると診断される。

30

【0047】

前記抗原 - 抗体複合体の形成は、比色法（colormetric method）、電気化学法（electrochemical method）、蛍光法（fluorimetric method）、発光法（luminometry）、粒子計数法（particle counting method）、肉眼測定法（visual assessment）または閃光計数法（scintillation counting method）のような多様な検出（detection）方法を使用して確認することができる。

40

【0048】

本明細書で使用された前記用語「検出」は、抗原 - 抗体複合体を検出するためのものであり、さまざまなマーカーを使用して行われる方法をいう。マーカーの例としては、酵素、蛍光物質、リガンド、発光物質、ナノ粒子または放射性同位体を含むが、それらに限定されるものではない。

【0049】

前記酵素の例としては、アセチルコリンエステラーゼ、アルカリホスファターゼ、D - ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（horseradish peroxidase

50

)及び -ラクタマーゼを含む。蛍光物質の例としては、フルオレシニン、 Eu^{3+} 、 Eu^{3+} キレート及びクリプテートを含む。リガンドは、ビオチン誘導体などであり得る。発光物質は、アクリジニウムエステル及びイソルミノール誘導体などでもあり得る。ナノ粒子の例としては、コロイド金ナノ粒子、及び着色されたラテックスナノ粒子を含む。放射性同位体の例としては、 ^{57}Co 、 ^3H 、 ^{125}I 及び ^{125}I -ボントン (Bonton) ハンター (Hunter) 試薬を含む。

【0050】

例えば、抗原-抗体複合体は、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) を利用して検出される。ELISAの例としては、固体支持体に付着された抗原を認知する標識された抗体を利用する直接的ELISA (直接法)、固体支持体に付着された抗原を認知する抗体の複合体において、捕獲抗体を認知する標識された二次抗体を利用する間接的ELISA (間接法)、固体支持体に付着された抗体と抗原との複合体において、抗原を認知する標識された他の抗体を利用する直接的サンドイッチELISA ()、並びに固体支持体に付着された抗体と抗原との複合体において、抗原を認知する他の抗体と反応させた後、該抗体を認知する標識された二次抗体を利用する間接的サンドイッチELISAを含む。前記抗体またはその抗原結合断片は、検出標識を有することができる。抗体またはその抗原結合断片が検出標識を有さない場合は、前記抗体または抗原結合断片は、これらを捕獲することができ、さらに検出標識を有する他の抗体で処理される。

10

【0051】

一実施形態によれば、c-Metタンパク質のSEMAドメイン内のエピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸であって、前記エピトープは、配列番号1のアミノ酸配列またはその部分を有する、核酸が提供される。前記抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸は、例えば、DNAまたはRNAであってもよく、選択的にベクターに挿入されたものであってもよい。

20

【0052】

本発明の他の一実施形態によれば、c-Metタンパク質のSEMAドメイン内のエピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸を含む細胞が提供される。前記エピトープは配列番号1のアミノ酸配列またはその部分を有する。

【0053】

本発明の他の一実施形態によれば、c-Metタンパク質のSEMAドメイン内のエピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を作製する方法が提供される。前記エピトープは配列番号1のアミノ酸配列またはその部分を有し、前記抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸を細胞で発現させる。

30

【実施例】

【0054】

以下、一つ以上の具体例について、実施例を介してさらに詳細に説明する。しかし、それら実施例は、一つ以上の具体例を例示的に説明するためのものであり、発明の範囲がそれら実施例に限定されるものではない。

【0055】

実施例1：c-Metに対するマウス抗体AbF46の生産

40

(1) マウスの免疫処理

ハイブリドーマ細胞株の開発に必要な免疫化されたマウスを得るために、5匹のマウスに、1匹当たり100 μg のヒトc-Met/Fc融合タンパク質 (R&D Systems社製) と、同量の完全フロイントアジュバント (complete Freund's adjuvant) とを混合し、4~6週齢BALB/cマウス (日本エスエルシー株式会社製) の腹腔内に注射した。2週後に、前述と同様の方法で、抗原 (先に注射した量の半分) を、不完全フロイントアジュバント (incomplete Freund's adjuvant) と混合し、マウスの腹腔内に注射した。1週間後、最後のブースティング (boosting) を行い、3日後に、前記マウスの尾から採血して血清を得た後、1/1,000で、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈し、ELISAで、c-Metを認知する抗体の力価 (titer) が増大することを確認した。そ

50

の後、得られた結果から抗体の量が十分に得られるマウスを選別し、細胞融合工程を遂行した。

【0056】

(2) 細胞融合及びハイブリドーマ細胞の作製

細胞融合実験の3日前、50 μ gのPBSと、ヒトc-Met/Fc融合タンパク質との混合物を腹腔内に注射して免疫化させたマウスに麻酔をかけ、胴体の左側に位置した脾臓(spleen)を摘出した。摘出した脾臓をメッシュですりつぶして細胞を分離し、培養培地(DMEM)と混合し、脾臓細胞懸濁液を作った。前記懸濁液を遠心分離し、細胞層を回収した。前記得られた脾臓細胞 1×10^8 個と、骨髓腫細胞(Sp2/0) 1×10^8 個とを混合した後、遠心分離し、細胞を沈殿させた。遠心分離された沈殿物を徐々に分散させ、培養培地(DMEM)に入っている45%ポリエチレングリコール(PEG)(1ml)で処理し、37で1分間維持した後、培養培地(DMEM)1mlを添加した。その後培養培地(DMEM)10mlを1分間添加し、37の水で5分間放置した後、50mlに合わせてさらに遠心分離した。細胞沈殿物を分離培地(HAT培地)に、 $1 \sim 2 \times 10^5$ /mlに再懸濁させ、96ウェル(well)プレートに0.1mlずつ分注した後、37二酸化炭素細菌培養器で培養し、ハイブリドーマ細胞を作製した。

10

【0057】

(3) c-Metタンパク質に対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞の選別

前記(2)で作製されたハイブリドーマ細胞群において、c-Metタンパク質にだけ特異的に反応するハイブリドーマ細胞を選別するために、ヒトc-Met/Fc融合タンパク質と、ヒトFcタンパク質とを抗原として利用したELISA分析法を介してスクリーニングした。

20

【0058】

マイクロタイタープレートに、ヒトc-Met/Fc融合タンパク質を、1ウェル当たりそれぞれ50 μ l(2 μ g/ml)ずつ加えてプレート表面に付着させ、反応していない抗原は、洗浄して除去した。c-MetではないFcに結合される抗体を選別して除外させるために、ヒトFcタンパク質を、前述のと同じ方法で、プレート表面に付着させた。ハイブリドーマ細胞の培養液を、それぞれウェルに50 μ lずつ加え、1時間反応させた後、リン酸緩衝溶液・トゥイーン20(TBST)溶液で十分に洗浄し、反応していない培養液を除去した。ここに、ヤギ抗マウスIgGホースラディッシュペルオキシダーゼ(goat anti-mouse IgG-HRP)を加え、1時間室温で反応させた後、TBST溶液で十分に洗浄した。次に、ペルオキシダーゼの基質溶液(OPD)を加えて反応させ、その反応程度は、ELISA読取器(reader)を用いて、450nmでの吸光度を測定することで評価した。この方法を通じて、ヒトFcには結合しないが、ヒトc-Metタンパク質にだけ特異的に結合する抗体を分泌するハイブリドーマ細胞株を反復して選別した。反復選別によって得たハイブリドーマ細胞株に対して、限界希釈(limiting dilution)を行い、モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞株1個のクローンを最終的に得た。最終選別されたモノクローナル抗体生産ハイブリドーマを、韓国細胞株銀行に寄託し、受託番号KCLRF-BP-00220を受けた。

30

40

【0059】

(4) モノクローナル抗体の生産及び精製

前記(3)で得たハイブリドーマ細胞を無血清培地で培養し、培養液からモノクローナル抗体を生産精製した。

【0060】

まず、10%FBSが含まれた培養培地(DMEM)培地50mlで培養された前記ハイブリドーマ細胞を遠心分離し、細胞沈殿物を20mlPBSで2回以上洗浄し、FBSが除去された状態で、培養培地(DMEM)培地50mlを細胞沈殿物に再懸濁させた後、3日間37二酸化炭素培養基で培養した。その後、遠心分離を介して、抗体を生産する細胞を除去し、抗体が分泌された培養液を分離して4で保管するか、あるいは即座に

50

集めて50mlないし300mlの培養液から、親和性カラム (Protein G agarose column, Pharmacia、米国) を装着したAKTA精製機器 (GE Health) を利用して、抗体を精製した後、タンパク質濃縮用フィルター (Amicon) を使用して、PBSで上澄み液を取り替え、精製された抗体を保管し、その後の実験に使用した。

【0061】

実施例2：c-Metに対するキメラ抗体chAbF46の作製

一般的に、マウス抗体は、治療目的で人間に注入されたとき、免疫拒否反応 (immunogenicity) を示す可能性が高いため、それを解決するために、前記実施例1で作製されたマウス抗体AbF46から、抗原結合に係わる変異領域 (variable region) を除外した不変領域 (constant region) を、ヒトIgG1抗体の配列で置換するキメラ抗体chAbF46を作製した。

10

【0062】

重鎖に該当する塩基配列は、「EcoRI - シグナル配列 - VH - NheI - CH - TGA - XhoI」 (配列番号12) から、軽鎖に該当する塩基配列は、「EcoRI - シグナル配列 - VL - BsiWI - CL - TGA - XhoI」 (配列番号13) から構成されるように、それぞれデザインして遺伝子を合成した。その後、インヴィトロジェン (Invitrogen) 社のOptiCHOTM 抗体発現キット (Antibody Express Kit) (Cat no. 12762-019) に含まれているpOptiVECTM - TOPO TAクローニングキット (Cloning Kit) に、前記重鎖に該当する塩基配列を有するDNA断片 (配列番号12) を、pCDNATM 3.3 - TOPO TAクローニングキット (Cloning Kit) (Cat no. 8300-01) に、前記軽鎖に該当する塩基配列を有するDNA断片 (配列番号13) を、それぞれEcoRI (NEB, R0101S) 制限酵素とXhoI (NEB, R0146S) 制限酵素とを使用してクローニングすることにより、キメラ抗体の発現のためのベクターを作製した。

20

【0063】

前記作製されたベクターは、それぞれキアゲン マキシプレップキット (Qiagen Maxiprep kit) (Cat no. 12662) を利用して増幅し、前記重鎖を含むベクター及び軽鎖を含むベクターは、4:1の比率 (80µg:20µg) で293T細胞 (2.5x10⁷) に、2M CaCl₂ を360µl添加し、形質移入 (トランスフェクション、transfection) した。その後、10% FBSが添加されたDMEM培地で、37、5% CO₂ 条件下で5時間培養した後、FBSが添加されていないDMEM培地で、48時間37、5% CO₂ 条件下で培養した。

30

【0064】

前記培養された細胞を遠心分離し、上澄み液それぞれ100mlを取り、AKTA Prime (GEヘルスケア社製) を利用して精製した。AKTA Primeに、Protein Aカラム (GEヘルスケア社製, 17-0405-03) を設け、培養液を5ml/minの流速で流した後、IgG溶出緩衝液 (サーモサイエンティフィック社製, 21004) で溶出した。それに対して、PBS緩衝液で交換し、最終的に、キメラ抗体AbF46 (以下、chAbF46と命名) を精製した。

【0065】

実施例3：キメラ抗体chAbF46からのヒト化抗体huAbF46の作製

(1) 重鎖のヒト化 (heavy chain humanization)

H1 - 重鎖及びH3 - 重鎖のデザインをするために、まず、NCBIのIgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) を介して、マウス抗体AbF46のVH遺伝子と、最も相同性が高いヒト生殖細胞系 (germline) 遺伝子を分析した。その結果、VH3-71が、アミノ酸レベルで、83%の相同性を有するということを確認し、マウス抗体AbF46のCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3を、カバットのナンバリング (Kabat numbering) で定義し、マウス抗体AbF46のCDR部分が、VH3-71のフレームワーク (framework) に導入されるようにデザインした。このとき、30番 (S T), 48番 (V L), 73番 (D N), 78番 (T L) アミノ酸は、本来

40

50

マウス A b F 4 6 抗体のアミノ酸配列に復帰変異 (back - mutation) した。その後、H 1 については、追加して 8 3 番 (R K) と 8 4 番 (A T) とのアミノ酸に変異を与え、最終的に H 1 - 重鎖 (配列番号 1 4) と H 3 - 重鎖 (配列番号 1 5) とを作製した。

【 0 0 6 6 】

H 4 - 重鎖のデザインのために、ヒト抗体のフレームワーク配列を調査した。その結果、マウス抗体 A b F 4 6 のフレームワーク配列と、配列相同性がかなり高く、最も安定していると知られた既存の V H 3 サブタイプ (subtype) を用いて、カバットのナンバリング (Kabat numbering) によって定義された配列を有するマウス抗体 A b F 4 6 の C D R - H 1、C D R - H 2、C D R - H 3 を確認し、H 4 - 重鎖 (配列番号 1 6) を作製するために作製使用した。

10

【 0 0 6 7 】

(2) 軽鎖のヒト化 (light chain humanization)

H 1 - 軽鎖 (配列番号 1 7) 及び H 2 - 軽鎖 (配列番号 1 8) のデザインのために、マウス抗体 A b F 4 6 の V L 遺伝子と最も相同性が高いヒト生殖細胞系遺伝子を、N C B I の I g Blast を介して分析した。その結果、V K 4 - 1 がアミノ酸レベルにおいて、7 5 % の相同性を有するということを確認し、マウス抗体 A b F 4 6 の C D R - L 1、C D R - L 2、C D R - L 3 をカバットのナンバリング (Kabat numbering) で定義し、マウス抗体 A b F 4 6 の C D R が、V K 4 - 1 遺伝子のフレームワークに導入された。このとき、H 1 軽鎖において、3 6 番、4 6 番、4 9 番のアミノ酸を、マウス抗体 A b F 4 6 の最初アミノ酸配列に復帰変異 (back - mutation) し (すなわち、それぞれ (Y H)、(L M) 及び (Y I))、H 2 重鎖において、4 9 番アミノ酸のみを復帰変異し (すなわち、(Y I))、H 1 軽鎖、H 2 重鎖のコンストラクションを完成した。

20

【 0 0 6 8 】

H 3 軽鎖 (配列番号 1 9) をデザインするために、マウス抗体 A b F 4 6 の V L 遺伝子と最も相同性が高いヒト生殖細胞系遺伝子を、N C B I Blast を介して分析した。その結果、前記 V K 4 - 1 以外に V K 2 - 4 0 を確認した。V K 2 - 4 0 は、マウス抗体 A b F 4 6 V L と、アミノ酸レベルで、6 1 % の相同性を有するということを確認し、マウス抗体 A b F 4 6 の C D R - L 1、C D R - L 2、C D R - L 3 をカバットのナンバリング (Kabat numbering) で定義し、マウス抗体 A b F 4 6 の C D R 領域を、V K 4 - 1 のフレームワークに導入した。H 3 軽鎖において、3 6 番、4 6 番及び 4 9 番アミノ酸を復帰変異させた (すなわち、それぞれ Y H、L M 及び Y I)。

30

【 0 0 6 9 】

H 4 軽鎖 (配列番号 2 0) をデザインするために、ヒト抗体のフレームワーク配列を調査した。その結果、最も安定していると知られた既存の V k 1 のサブタイプ (subtype) を使用して、カバットのナンバリング (Kabat numbering) で定義されたマウス抗体 A b F 4 6 の C D R - L 1、C D R - L 2、C D R - L 3 を導入した。このとき、H 4 軽鎖は、3 6 番、4 6 番及び 4 9 番のアミノ酸を追加して復帰変異して作製した (すなわち、それぞれ Y H、L M 及び Y I)。

【 0 0 7 0 】

その後、前記重鎖に該当する塩基配列を有する DNA 断片 (H 1 軽鎖 : 配列番号 2 1、H 3 重鎖 : 配列番号 2 2、H 4 重鎖 : 配列番号 2 3) を、インヴィトロジェン社の O p t i C H O ^{T M} 抗体発現キット (C a t n o . 1 2 7 6 2 - 0 1 9) に含まれた p O p t i V E C ^{T M} - T O P O T A クローニングキットに、制限酵素 E c o R I (N E B , R 0 1 0 1 S) を使用してクローニングし、前記軽鎖に該当する塩基配列を有する DNA 断片 (H 1 - 軽鎖 : 配列番号 2 4、H 2 - 軽鎖 : 配列番号 2 5、H 3 - 軽鎖 : 配列番号 2 6、H 4 - 軽鎖 : 配列番号 2 7) を、インヴィトロジェン社の O p t i C H O ^{T M} 抗体発現キット (C a t n o . 1 2 7 6 2 - 0 1 9) に含まれた p c D N A ^{T M} 3 . 3 - T O P O T A クローニングキットに、制限酵素 X h o I (N E B , R 0 1 4 6 S) を使用してクローニングすることにより、ヒト化抗体の発現のためのベクターを作製した。

40

【 0 0 7 1 】

50

前記構築されたベクターを、それぞれキアゲン マキシプレップキット (Cat no . 12662) を利用して増幅した。前記重鎖を含むベクター及び軽鎖を含むベクターは、4 : 1 の比率 (80 μ g : 20 μ g) で、 2.5×10^7 個の 293T 細胞に、360 μ l の 2M CaCl₂ を添加して形質移入 (transfection) させた。その後、形質移入された細胞を、37^o、5% CO₂ で、10% FBS が添加された DMEM 培地で 5 時間培養した後、37^o、5% CO₂ で、FBS が添加されていない DMEM 培地で 48 時間培養した。

【0072】

前記培養された細胞を遠心分離し、上澄み液それぞれ 100 ml を取得し、AKTAPrime (GEヘルスケア社製) を利用して精製した。Protein A カラム (GEヘルスケア社製, 17-0405-03) を AKTA Prime に設け、培養液を 5 ml/min の流速で流した後、IgG 溶出緩衝液 (サーモサイエンティフィック社製、21004) で溶出した。それを PBS 緩衝液で交換することにより、最終的に、ヒト化抗体 AbF46 (以下、huAbF46 と命名) を得た。このとき、後続実施例で使用したヒト化抗体 huAbF46 は、H4 重鎖及び H4 軽鎖を含んでいる。huAbF46 の重鎖可変領域 (VH) は、「EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFTDYMSWVRQAPGKGLLEWLGFI RNKANGY TTEYSASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC ARDNWFAYWGQGT LVTVSS」(配列番号 83) のアミノ酸配列を有し、huAbF46 の軽鎖可変領域 (VL) は、「DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKSSQSLLASGNQNNYLAWHQKPKGKAPKMLIIWASTRVSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSAPLTFGQGTKVEIKR」(配列番号 84) のアミノ酸配列を有する。

【0073】

実施例 4 : huAbF46 抗体からの親和性成熟された抗体の選別及びその結合親和力の同定

(1) huAbF46 抗体の scFv ライブラリーの作製

huAbF46 抗体の scFv を作製するための遺伝子を、huAbF46 抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を利用してデザインした。それぞれの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を、「VH-リンカー-VL」の形態を有するようにデザインし、前記リンカーは、「GLGGLGGGSGGGSGGGSSGVGS」(配列番号 28) のアミノ酸配列を有するようにデザインした。かようにデザインされた huAbF46 抗体の scFv をコードするポリヌクレオチド (配列番号 29) を合成し (バイオニア社製)、ポリペプチドを発現するためのベクターを配列番号 30 として示した。その後、前記ベクターから発現された結果物を分析し、c-Met 特異的な結合を確認した。

【0074】

(2) 親和性成熟 (affinity maturation) のためのライブラリー遺伝子の作製

1) 標的 CDR の選定及びプライマー作製

huAbF46 抗体の親和性成熟 (affinity maturation) のために、6 個の相補性決定領域 (CDR : complementary determining region) を、前記作製したマウス抗体 AbF46 から、カバットのナンバリング (Kabat numbering) によって定義した。それぞれの CDR を表 1 に示した。

【0075】

10

20

30

40

【表 1】

| | CDR1 | CDR2 | CDR3 |
|----------------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| AbF46重鎖CDR アミノ酸配列 | DYYMS (配列番号4) | FIRNKANGYTTEY SASVKG(配列番号5) | DNWFAY (配列番号6) |
| AbF46軽鎖CDR アミノ酸配列 | KSSQSLLASG NQNNYLA(配列 番号7) | WASTRVS (配列番号8) | QQSYSAPLT (配列番号9) |

【0076】

10

抗体CDRのランダムな配列導入のために、次のようにプライマーを作製した。既存のランダムな配列導入方式によれば、突然変異を与える部位に、同一比率の塩基(25% A、25% G、25% C、25% T)が導入されるようにNコドンを利用した。しかし、本実施例によれば、huAbF46抗体のCDRに無作為塩基を導入するために、各CDRのアミノ酸をコーディングする3個の野生型(wild-type)ヌクレオチドのうち、最初と2番目のヌクレオチドの85%は、そのまま保存し、残りの3個の塩基をそれぞれ5%ずつ導入した。また、三種の塩基が3番目のヌクレオチドに導入されるように(33% G、33% C、33% T)、プライマーをデザインした。

【0077】

20

2) huAbF46抗体のライブラリー作製及びc-Metに対する結合力の確認

CDRの無作為配列導入を介した抗体ライブラリー遺伝子の構築は、前記(1)に記載の方法で作製されたプライマーを利用して行った。テンプレートとして、huAbF46抗体のscFvを含むポリヌクレオチドを利用した。図1に示した方法のように、2個のPCR断片を作製し、6個のCDRそれぞれに係わるライブラリーをオーバーラップ・エクステンションPCR(overlap extension PCR)を利用して作製した。

【0078】

野生型抗体(huAbF46のscFv)と、ライブラリー抗体とのc-Metに対する結合力を確認した。ほとんどのライブラリー抗体のc-Metに対する結合力は、野生型抗体の結合力より低かったが、c-Metに対する結合力が低下していない突然変異を確認した。

30

【0079】

(3) ライブラリーからの改善された親和性を有する抗体の選別

向上したc-Met結合力を有するライブラリー抗体を配列決定した。得られた配列を、下記表2に示し、IgGに変換した。下記クローンのうち、L3-1、L3-2、L3-3及びL3-5から生産された4種の抗体を選別し、後続実験を行った。L3-1から生産された抗体の軽鎖可変領域(VL)は、「DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKSSQSLLASGNQNNYLAWHQKPKGKAPKMLIIWASTRVSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYSRPYTFGQGTKVEIKR」(配列番号85)のアミノ酸配列を有する。

【0080】

40

【表 2】

| クローン名 | ライブラリー | CDR配列 |
|-------|--------|------------------------------|
| H11-4 | CDR-H1 | PEYYMS (配列番号31) |
| YC151 | CDR-H1 | PDYYMS (配列番号32) |
| YC193 | CDR-H1 | SDYYMS (配列番号33) |
| YC244 | CDR-H2 | RNNANGNT (配列番号34) |
| YC321 | CDR-H2 | RNKVNGYT (配列番号35) |
| YC354 | CDR-H3 | DNWLSY (配列番号36) |
| YC374 | CDR-H3 | DNWLTY (配列番号37) |
| L1-1 | CDR-L1 | KSSHLLASGNQNNYLA (配列番号38) |
| L1-3 | CDR-L1 | KSSRLLSSGNHKNYLA (配列番号39) |
| L1-4 | CDR-L1 | KSSKLLASGNQNNYLA (配列番号40) |
| L1-12 | CDR-L1 | KSSRLLASGNQNNYLA (配列番号41) |
| L1-22 | CDR-L1 | KSSHLLASGNQNNYLA (配列番号42) |
| L2-9 | CDR-L2 | WASKRVS (配列番号43) |
| L2-12 | CDR-L2 | WGSTRVS (配列番号44) |
| L2-16 | CDR-L2 | WGSTRVP (配列番号45) |
| L3-1 | CDR-L3 | QQSYSRPYT (配列番号46) |
| L3-2 | CDR-L3 | GQSYSRPLT (配列番号47) |
| L3-3 | CDR-L3 | AQSYSHPFSS (配列番号48) |
| L3-5 | CDR-L3 | QQSYSRPFT (配列番号49) |
| L3-32 | CDR-L3 | QQSYSKPFT (配列番号50) |

10

20

30

【0081】

(4) 選別された抗体のIgGへの変換

40

選別された4種の抗体の重鎖をコードするポリヌクレオチドは、「EcoRI-シグナル配列-VH-NheI-CH-XhoI」(配列番号51)からなり、重鎖の場合、親和性成熟後に、抗体のアミノ酸が変更されず、従って、huAbF46抗体の重鎖をそのまま使用した。ただし、ヒンジ領域(hinge region)は、ヒトIgG1のヒンジではない、U6-HC7ヒンジ(配列番号52)で置換した。軽鎖の遺伝子は、「EcoRI-シグナル配列-VL-BsiWI-CL-XhoI」を有するようにデザインされ、親和性成熟後に、選別された前記4種抗体の軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド(配列番号53ないし配列番号56)を、バイオニア社によって合成した。次に、向上した親和性を有する抗体発現のためのベクターを、インヴィトロジェン社のOptiCHOTM抗体発現キット(Cat no. 12762-019)に含まれているpOptiVECT

50

M - T O P O T A クローニングキットに、重鎖に該当する配列を有する DNA 断片（配列番号 5 1）を、制限酵素 X h o I（N E B，R 0 1 4 6 S）を使用してクローニングして作製し、軽鎖に相応する DNA 断片（L 3 - 1 由来 C D R - L 3 を含む DNA 断片（配列番号 5 3）、L 3 - 2 由来 C D R - L 3 を含む DNA 断片（配列番号 5 4）、L 3 - 3 由来 C D R - L 3 を含む DNA 断片（配列番号 5 5）、及び L 3 - 5 由来 C D R - L 3 を含む DNA 断片（配列番号 5 6））を、p c D N A^{T M} 3 . 3 - T O P O T A クローニングキット（C a t n o . 8 3 0 0 - 0 1）に、制限酵素 E c o R I（N E B，R 0 1 0 1 S）を使用してクローニングした。

【 0 0 8 2 】

前記作製されたベクターを、それぞれキアゲン マキシプレップキット（C a t n o . 1 2 6 6 2）を利用して増幅し、前記重鎖を含むベクター及び軽鎖を含むベクターは、4 : 1 の比率（8 0 μ g : 2 0 μ g）で、2 9 3 T 細胞（ 2.5×10^7 ）に、2 M C a C l₂ を 3 6 0 μ l 添加して形質移入させた。その後、混合物を、3 7 °C、5 % C O₂ 条件で、1 0 % F B S が添加された D M E M 培地で 5 時間培養した後、3 7 °C、5 % C O₂ 条件で、F B S のない D M E M 培地で 4 8 時間培養した。

【 0 0 8 3 】

前記培養された細胞を遠心分離し、1 0 0 m l の各上澄み液を、A K T A Prime（G E ヘルスケア社製）を利用して精製した。Protein A カラム（G E ヘルスケア社製，1 7 - 0 4 0 5 - 0 3）を A K T A Prime に設け、培養液を 5 m l / m i n の流速で流した後、I g G 溶出緩衝液（サーモサイエンティフィック社製，2 1 0 0 4）で溶出した。それを P B S 緩衝液で交換し、最終的に、親和性成熟された 4 種の抗体（以下、h u A b F 4 6 - H 4 - A 1、h u A b F 4 6 - H 4 - A 2、h u A b F 4 6 - H 4 - A 3、h u A b F 4 6 - H 4 - A 5 と命名）を精製した。

【 0 0 8 4 】

（ 5 ）選別された抗体の結合親和力分析

前記作製された 4 種抗体の c - M e t 抗原に対する親和力を、ピアコア（G E ヘルスケア社製）を使用して測定した。C M 5 チップ上に、それぞれの抗体を、およそ 8 0 ~ 1 1 0 R U で固定させ、抗原として、ヒト c - M e t タンパク質を、1 0 0 n M から 0 . 3 9 n M までの濃度範囲内で、互いに異なる 9 つの濃度で、3 0 μ l / m i n の速度で注入し、表 3 に示したように、k_{on} 値及び k_{off} 値を収得した。それにより、K_D 値を計算した。c - M e t 抗原に対する h u A b F 4 6 の結合力は、約 2 . 1 9 n M であり、改善した親和性を有する 4 種の抗体の結合力は、0 . 0 6 n M ~ 0 . 5 0 n M 範囲であった（表 3）。これは、s c F v 形態で親和性が改善した抗体の親和性が、I g G に変換された後、約 5 倍 ~ 約 3 7 倍ほどまで向上したということを示す。

【 0 0 8 5 】

【表 3】

| 抗体 | k _{on} (1/Ms) | k _{off} (1/s) | KD(nM) |
|---------------|------------------------|------------------------|--------|
| huAbF46 | 3.29×10^5 | 7.23×10^{-4} | 2.19 |
| huAbF46-H4-A1 | 7.39×10^5 | 4.53×10^{-5} | 0.06 |
| huAbF46-H4-A2 | 5.02×10^5 | 2.53×10^{-4} | 0.50 |
| huAbF46-H4-A3 | 4.19×10^5 | 1.43×10^{-4} | 0.34 |
| huAbF46-H4-A5 | 5.72×10^5 | 2.40×10^{-4} | 0.42 |

【 0 0 8 6 】

実施例 5 : マウス抗体 A b F 4 6 の c - M e t に対する認識能力の確認

（ 1 ）全長 c - M e t に対するマウス抗体 A b F 4 6 の認識能力確認

c - M e t の細胞外ドメイン（extracellular domain）を含むタンパク質に対するマウ

10

20

30

40

50

ス抗体 A b F 4 6 の認識能力を確認するために、c - M e t を発現させるためのポリヌクレオチド（配列番号 5 7）を、p c D N A 5 ベクター（インヴィトロジェン）にクローニングし、in vitro 転写 / 翻訳（transcription and translation）キット（T n T t kit, プロメガ社, マディソン, 米国）を使用して、2 9 3 T 細胞（韓国細胞株銀行）で発現させた。その後、マウス抗体 A b F 4 6 を、プロテイン - 結合アガロースビーズ（protein G - conjugated agarose bead）（インヴィトロジェン）と混合し、合成された c - M e t タンパク質を含む 2 9 3 T 細胞溶解物、または in vitro 転写 / 翻訳キットからの反応によって作られた c - M e t を添加し、免疫沈降法（immunoprecipitation）を遂行した。前記免疫沈降された結果物を、S D S - P A G E を介して電気泳動した後、ウエスタンブロット法を使用して分析した。

10

【 0 0 8 7 】

図 2 から分かるように、マウス抗体 A b F 4 6 は、全長 c - M e t 抗原を正確に認識するということを確認した。

【 0 0 8 8 】

（ 2 ）マウス抗体 A b F 4 6 の S E M A ドメインに対する認識能力の確認

マウス抗体 A b F 4 6 が、c - M e t の細胞外ドメインのうち、いずれの部位に結合するかということを確認するために、まず、c - M e t の細胞外ドメインを 3 つの部分に分け、それぞれの部分をコーディングする D N A 断片を、p c D N A 5 ベクターにクローニングした。前記 3 つの部分は、それぞれ S E M A ドメイン（配列番号 5 8）、P S I - I P T ドメイン（配列番号 5 9）、T y r K c ドメイン（配列番号 6 0）であり、p c D N A 5 ベクターにクローニングするためのそれぞれのドメインをコードする D N A 断片を、それぞれ配列番号 6 1、配列番号 6 2、配列番号 6 3 で示した。

20

【 0 0 8 9 】

前記ベクターにクローニングした後、それぞれを in vitro 転写 / 翻訳キット（T n T t kit, プロメガ社, マディソン, 米国）を使用して、2 9 3 T 細胞（韓国細胞株銀行）で発現させた。その後、マウス抗体 A b F 4 6 を、プロテイン G - 結合アガロースビーズ（インヴィトロジェン）と混合し、合成された c - M e t タンパク質を含む 2 9 3 T 細胞溶解物、または in vitro 転写 / 翻訳キットからの反応によって作製した c - M e t を添加し、免疫沈降法を遂行した。前記免疫沈降された結果物を、S D S - P A G E を介して電気泳動した後、ウエスタンブロット法を使用して分析した。

30

【 0 0 9 0 】

図 3 から分かるように、マウス A b F 4 6 抗体は、c - M e t の S E M A ドメインに結合されるということを確認することができた。マウス I g G を陰性対照群として使用し、5 D 5 抗体（A T C C C a t . # H B 1 1 8 9 5 ハイブリドーマ細胞で分離精製）を陽性対照群として使用した。一方、図 3 で、「Input」は、ゲルにローディングした免疫沈降を行わない、合成された全ての結果物をいう。結果から、すべての合成された c - M e t が抗体の結合いかんに関係なく、完全であるということを確認した。

【 0 0 9 1 】

実施例 6 : h u A b F 4 6 抗体のエピトープ分析

（ 1 ）エピトープ・マッピング

40

1) h u A b F 4 6 のエピトープ・マッピングのためのペプチド作製

c - M e t の S E M A ドメインを含む 5 4 3 個のアミノ酸配列及びその構造は、P D B（protein database）I D : 1 U Z Y に示されており、それらアミノ酸配列を基にして、C L I P S（chemically linked peptides on scaffolds）技術を利用して、構造エピトープ（conformational epitope）と、不連続なエピトープ（discontinuous epitope）とを作ることができる 6 , 0 6 3 個の他の配列がデザインされて合成された（Timmerman e t a l . , 2 0 0 7 Functional reconstruction and synthetic mimicry of a conformational epitope using C L I P S ^{T M} technology, J . M o l . R e c o g n i t . 2 0 : 2 8 3 - 0 0）。ここでペプチドアレイ作製過程について詳細に説明する。C L I P S 技術は、P e p S c a n 社によって開発され、既存の典型的な方法である約 1 5 個の

50

アミノ酸長を有する線形ペプチド以外に、CLIPSと呼ばれる固有の構造を有するペプチドの作製に用いられる。huAbF46抗体と、これら線形ペプチド及びCLIPSペプチドとの結合親和力を測定した。CLIPSペプチドのうち、T2 CLIPSペプチドはペプチドが人工的な構造を有するように、ループ構造を形成するために2つのシステイン残基が結合して作製し、T3 CLIPSペプチドはペプチドが人工的な構造を有するように、ループ構造を形成するために3つのシステイン残基が結合して作製した。また、T2T3またはT2T2のような結合型ペプチドを制作することもできる。

【0092】

エピトープ・マッピングのために、全6,063個のペプチドを作製した(ペプチドアレイ作製は、PepScanに依頼する)。1番~529番のペプチドは、典型的な線形ペプチドであって、15個のアミノ酸を有し、特定の領域間でオーバーラッピング(overlapping)されるように作製した。530番~1058番のペプチドは、T2 CLIPSペプチドに、1番ないし529番のペプチドを導入して作製した。1059番~2014番のペプチドは、T3 CLIPSペプチドに、15個のアミノ酸を有するペプチド2個を連結し、全956個を作製した。2015番~6063番のペプチドは、8個~35個のアミノ酸残基を有するペプチドグループ間の結合を介して、線形的及び非線形的な構造を有するエピトープを探索するためのペプチドであって、全4,048個が作製された。

【0093】

例えば、T2 CLIPSペプチドを含むペプチドアレイは、次のような方法で作製した。0.5mMのT2 CLIPSペプチドが含まれた1,3-ビス(プロモメチル)ベンゼン溶液を、アンモニウムピカルボネート(20mM、pH7.9)/アセトンニトリル(1:1(v/v))に溶解させ、前記結果物溶液をペプチドアレイに添加した。テンプレートとしてのT2 CLIPSペプチドは、ペプチドアレイ(3 μ lのウェルを有する455個のウェルプレート)の固相结合されたペプチド内に存在する2個のシステイン側鎖に結合させた。前記溶液で完全に覆われるように、30分間~60分間、前記溶液内でペプチドアレイを徐々に振り動かした。最後に、前記ペプチドアレイを過量の水で十分に洗浄し、PBS(pH7.2)内で、1%SDS/0.1%ベータ-メルカプトエタノールが含まれた破碎緩衝液で、30分間70の温度条件で超音波粉碎した後、45分間水中で超音波粉碎を行った。T3 CLIPSペプチドは、テンプレートとしてのT3 CLIPSペプチドは3個のシステイン側鎖に結合させたこと以外は前記と同様の方法を用いて作製した。

【0094】

前記ペプチドを使用して、ELISAを介して、エピトープ・マッピングを行った結果、huAbF46のコアエピトープ(core epitope)は、c-Metタンパク質の、168番アミノ酸~171番アミノ酸からなるペプチドであるEESPQ(配列番号3)であることを確認した。

【0095】

2) huAbF46抗体のエピトープ・マッピングのためのELISA分析

エピトープ・マッピングのために、全529個の線形ペプチド及びCLIPSペプチドを使用して、PEPSCANに基づくELISA分析を行った。前記ペプチドは、5%ブロッキング溶液(4%オボアルブミン(ovalbumin)、5%ウマ血清(horse serum)及び1%トゥイーン(Tween)80)を利用して、30分間常温で反応させた。その後、1%トゥイーン80が添加されたPBSで、4で一晩中反応させた1~100 μ g/ml範囲のhuAbF46抗体を、前記ペプチドに反応させた後で洗浄した。その後、ウサギ抗ヒツジ抗体(rabbit-anti-sheep antibody)(シグマ(SIGMA)社製)を処理し、PBSで洗浄した後、ペルオキシダーゼを付加したブタ抗ウサギ抗体(swine-anti-rabbit antibody)(シグマ社製)を処理し、PBSで洗浄した。その後、結果物を3%H₂O₂中、2 μ l/mlのペルオキシダーゼ2,2'-アジノ-ジ-3-エチルベンズチアゾリンスルフェート(ABTS)(シグマ社製)で処理し、1時間後に発色反応を測定した。

10

20

30

40

50

【0096】

その結果、図4から分かるように、線形ペプチド及びCLIPSペプチドにおいて、いずれも「E E P S Q」配列（配列番号3）を含むペプチドでのみ特異的なELISA陽性反応を示し、それにより、前記huAbF46は、c-Metの線形エピトープ及び構造エピトープをいずれも認知する抗体であるということを確認した。

【0097】

また、前記「E E P S Q」（配列番号4）を含むペプチドを含むエピトープうち、一部の肺癌患者または卵巣癌患者で観られることが知られているc-Metの代表的なSEMAドメインの突然変異であるE168D変異を有するポリペプチドを使用し、上述と同様の方法でELISAを遂行した。その結果を下記表4に示した。

10

【0098】

【表4】

| コアペプチド配列 | 合成されたペプチド配列 | ELISA値 (huAbF46の抗体結合) |
|-----------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| E E P S Q (配列番号3) | FAPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVL (配列番号64) | 2063 |
| | CSPQIEEPSQC(配列番号65) | 1306 |
| | CPQIEEPSQAC(配列番号66) | 2157 |
| | CQIEEPSQAPC(配列番号67) | 2744 |
| | CIEEPSQAPDC(配列番号68) | 2239 |
| | CEEPSQAPDAC(配列番号69) | 2829 |
| E D P S Q (配列番号70) | FSPQIEDPSQCPDCVVSALGAKVL (配列番号71) | 172 |
| | CSPQIEDPSQC(配列番号72) | 121 |
| | CPQIEDPSQAC(配列番号73) | 138 |
| | CQIEDPSQAPC(配列番号74) | 172 |
| | CIEDPSQAPDC(配列番号75) | 128 |
| | CEDPSQAPDAC(配列番号76) | 132 |

20

30

【0099】

前記結果から、huAbF46抗体は、E168D変異を有したc-MetSEMAドメインには、結合されないということを確認した。それは、前記抗体ががん発生情報を提供するための診断方法に利用可能であるということを示す。

【0100】

3) huAbF46抗体のエピトープ・マッピング結果分析

40

前記結果から、huAbF46抗体は、c-Metタンパク質の168番アミノ酸～171番アミノ酸からなるペプチドである「E E P S Q」配列を含む線形ペプチド及びCLIPSペプチドのいずれにおいても、非特異的の反応なしに、特異的な結合反応を示した。それは、huAbF46抗体が、c-Metタンパク質のうち、線形エピトープ及び構造エピトープのいずれにも結合するということを示す。分子構造(PyMOL 1.4.1 (www.pymol.org)、Cn3D4.1 (NCBI))に関して、図5に示したように、huAbF46抗体のエピトープは、SEMAドメインに位置するということを確認した。また、HGFの結合部位が、直接的な結合部位の近傍のループに相当する位置であるということを確認した。

【0101】

50

(2) フルポジションスキニング (full positional scanning) 結果の分析

EEPSQ配列の各アミノ酸部位を、本来のアミノ酸ではない、他の20種のアミノ酸で置換し、それらそれぞれのペプチドが、huAbF46抗体との結合力に、いかなる変化を生じさせるかということ、7種のペプチドアレイを介して詳細に分析した。

【0102】

分析結果、EEPSQ(配列番号3)のアミノ酸配列のうちどのアミノ酸が、前記抗体の結合に重要であるかということを確認した。特に、EEPSQ(配列番号3)のEEP配列が、抗体との結合に非常に重要な役割を果たしていることが確認された。

【0103】

実施例7:SEMAドメインの突然変異によるhuAbF46抗体の結合親和力分析

EEPSQ配列の各アミノ酸部位、または5個アミノ酸全体を、本来のアミノ酸ではないアラニンで置換し、それぞれのペプチド(「AAAAA」(配列番号77)、「AEPSQ」(配列番号78)、「EAPSQ」(配列番号79)、「EEASQ」(配列番号80)、「EEPSQ」(配列番号81)、「EEPSA」(配列番号82))と、huAbF46抗体との結合親和力を、ピアコア(GEヘルスケア社製)を使用して測定した。CM5チップ上に、80~110RUほどのhuAbF46抗体を固定させ、配列番号77ないし配列番号82のアミノ酸配列を有する100nM~0.39nMのペプチドを、9つの互いに異なる濃度で、30μl/minの速度で注入することにより、下記表5に示したように、k_{on}値及びk_{off}値を収得し、それによりK_D値を計算した。その結果、huAbF46抗体は、アミノ酸が置換されたペプチドに結合することがないことを確認した。その結果から、「EEPSQ」(配列番号3)配列が、huAbF46抗体の必須なエピトープであるということを確認した。

10

20

【0104】

【表5】

| 抗体 | 抗原 | k _{off} (1/Ms) | k _{on} (1/s) | KD(nM) |
|---------|---------------|-------------------------|-----------------------|--------|
| huAbF46 | EEPSQ(配列番号3) | 4.30x10 ⁵ | 7.05x10 ⁻⁴ | 1.64 |
| huAbF46 | AAAAA(配列番号77) | 結合せず | | |
| huAbF46 | AEPSQ(配列番号78) | 結合せず | | |
| huAbF46 | EAPSQ(配列番号79) | 結合せず | | |
| huAbF46 | EEASQ(配列番号80) | 結合せず | | |
| huAbF46 | EEPAQ(配列番号81) | 4.32x10 ⁵ | 6.16x10 ⁻⁴ | 1.43 |
| huAbF46 | EEPSA(配列番号82) | 結合せず | | |

30

【0105】

実施例8:huAbF46抗体のアゴニズム(agonism)機能障害の程度(dysfunction degree)の比較

40

(1) BrdU分析

huAbF46抗体に対するアゴニズム(agonism)の程度を比較するために、NCI-H441細胞を使用して、BrdU分析を行った。ヒト肺癌細胞であるNCI-H441を、RPMI1640培地(Gibco(商標登録))に、2x10⁵細胞/mlで懸濁し、懸濁液を100μlずつ96ウェル組織培養プレート(tissue culture plate)(コーニング,ローウェル,MA)に分注した。24時間37℃で、5%CO₂の条件で培養し、培地を完全に除去した後、抗体を希釈したRPMI1640培地で置換した。21時間37℃で、5%CO₂の条件で培養した後、5-ブromo-2'-デオキシウリジン(5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)を添加し、3時間培養した後、Br

50

d U 分析 (ロ シ ュ , イ ン デ ィ ア ナ ポ リ ス , I N) を 行 っ た 。 細 胞 を 、 プ レ ー ト 上 で 、 変 性 / 固 定 (d e n a t u r a t i o n / f i x a t i o n) し た 後 、 抗 B r d U 抗 体 を 入 れ 、 1 時 間 後 に 基 質 を 添 加 し 、 3 7 0 n m で 、 E L I S A ス ペ ク ト ラ マ ッ ク ス リ ー ダ ー (s p e c t r a M a x r e a d e r) (モ レ キ ュ ラ ー デ バ イ ス , サ ニ ー ベ ー ル , C A) で 発 色 反 応 を 測 定 し た 。 比 較 対 象 は 、 マ ウ ス A b F 4 6 抗 体 の 作 用 性 を 基 準 に し た 。 マ ウ ス の I g G を 陰 性 対 照 群 と し て 使 用 し 、 ア ゴ ニ ス ト (a g o n i s t) と し て 知 ら れ た 5 D 5 抗 体 を 陽 性 対 照 群 と し て 使 用 し た 。

【 0 1 0 6 】

図 6 A から 分 か る よ う に 、 h u A b F 4 6 抗 体 は 、 5 D 5 抗 体 と 類 似 し た 程 度 の ア ゴ ニ ズ ム (a g o n i s m) 機 能 障 害 (d y s f u n c t i o n) を 低 減 さ せ る と い う こ と を 確 認 し た 。 ま た 、 図 6 B から 分 か る よ う に 、 4 種 の 親 和 性 改 善 抗 体 の う ち の 3 種 で 、 ア ゴ ニ ズ ム (a g o n i s m) 機 能 障 害 が 低 減 す る と い う こ と が 分 っ た 。 従 っ て 、 そ の 安 全 性 が 、 1 0 μ g / m l の 処 理 濃 度 で 、 そ れ ぞ れ 2 5 % (h u A b F 4 6 - H 4 - A 1) 、 2 8 % (h u A b F 4 6 - H 4 - A 2) 、 1 3 % (h u A b F 4 6 - H 4 - A 3) 及 び 2 1 % (h u A b F 4 6 - H 4 - A 5) ま で 向 上 し た と い う こ と を 確 認 さ れ た 。

【 0 1 0 7 】

(2) i n v i t r o で の 細 胞 増 殖 分 析 法

親 和 性 を 改 善 し た 4 種 の 抗 体 の が ん 細 胞 増 殖 抑 制 に よ る 抗 が ん 効 果 を 確 認 す る た め に 、 c - M e t 分 子 を 、 細 胞 表 面 に 発 現 す る M K N 4 5 胃 癌 細 胞 (日 本 が ん 研 究 細 胞 株 銀 行 (J C R B : J a p a n e s e C a n c e r R e s e a r c h B a n k , 東 京) を 利 用 し た i n v i t r o で の 細 胞 増 殖 分 析 法 を 遂 行 し た 。

【 0 1 0 8 】

9 6 ウ ェ ル プ レ ー ト に 、 ウ ェ ル 当 た り 1×10^4 個 の M K N 4 5 細 胞 を 、 5 0 μ l の 5 % F B S / D M E M 培 養 液 と 分 注 し た 。 そ の 後 、 前 記 細 胞 を 、 処 理 な し 、 ま た は 0 . 0 0 8 , 0 . 0 4 , 0 . 2 ま た は 1 μ g / m l の 濃 度 の 前 記 作 製 さ れ た 4 種 の 抗 体 5 0 μ l で 処 理 し た 後 、 7 2 時 間 培 養 し 、 C e l l T i t e r - G l o (商 標 登 録) L u m i n e s c e n t C e l l V i a b i l i t y A s s a y K i t (プ ロ メ ガ 社 製 , G 7 5 7 0) を 使 用 し て 、 ル ミ ノ メ ー タ ー (l e u m i n o m e t e r) (パ ー キ ン エ ル マ ー , 2 1 0 4 マ ル チ ラ ベ ル リ ー ダ ー) で 細 胞 数 を 定 量 し た 。

【 0 1 0 9 】

図 7 から 分 か る よ う に 、 実 験 濃 度 の う ち 、 最 低 濃 度 で あ る 0 . 0 0 8 μ g / m l で 、 親 和 性 改 善 前 の 抗 体 (h u A b F 4 6) の 相 対 的 細 胞 生 存 率 が 7 7 % で あ り 、 親 和 性 を 改 善 し た 抗 体 h u A b F 4 6 - H 4 - A 1 、 h u A b F 4 6 - H 4 - A 2 及 び h u A b F 4 6 - H 4 - A 5 は 、 そ れ ぞ れ 7 4 % 、 7 3 % 、 7 2 % と 効 果 が 類 似 し て お り 、 h u A b F 4 6 - H 4 - A 3 は 、 6 6 % と 、 効 果 が 確 実 に 上 昇 し て い る と い う こ と を 観 察 さ れ た 。 ま た 、 最 大 効 果 を 示 す 0 . 0 4 μ g / m l 濃 度 で は 、 前 記 抗 体 4 種 が い ず れ も 5 D 5 抗 体 の 生 存 率 で あ る 5 3 % 以 下 の 数 値 を 示 す と い う こ と を 確 認 す る こ と が で き た 。 従 っ て 、 親 和 性 改 善 の 結 果 、 対 照 群 に 比 べ て 、 親 和 性 、 効 果 及 び 安 全 性 に お い て 、 有 意 に 改 善 さ れ た と い う こ と を 確 認 し た 。

【 0 1 1 0 】

(3) A k t リ ン 酸 化

h u A b F 4 6 抗 体 に 対 す る ア ゴ ニ ズ ム 程 度 を 比 較 す る た め に 、 C a k i - 1 細 胞 (韓 国 細 胞 株 銀 行) を 使 用 し て 、 c - M e t の 下 流 シ グ ナ ル 伝 達 及 び 細 胞 増 殖 に 係 わ る 指 標 で あ る A k t タ ン パ ク 質 の リ ン 酸 化 程 度 を 確 認 し た 。 マ ウ ス の I g G を 陰 性 対 照 群 と し て 使 用 し 、 ア ゴ ニ ス ト と し て 周 知 で あ る 5 D 5 抗 体 を 陽 性 対 照 群 と し て 使 用 し た 。

【 0 1 1 1 】

2×10^5 細 胞 / m l の C a k i - 1 細 胞 を 、 9 6 ウ ェ ル プ レ ー ト に 分 注 し た 後 、 2 4 時 間 後 に 、 無 血 清 状 態 で 、 そ れ ぞ れ 5 μ g / m l の 抗 体 で 、 3 0 分 間 処 理 し た 。 抗 体 で 処 理 し た 細 胞 を 溶 解 (l y s i s) し 、 P a t h S c a n (商 標 登 録) p h o s p h o - A K T 1 (S e r 4 7 3) 、 c h e m i l u m i n e s c e n t S a n d w i c h E L I S A k i t (C e l l S i g n a l i n g 社 , c a t . n o

10

20

30

40

50

7 1 3 4 S) を利用して、A k t タンパク質のリン酸化の程度を測定し、分析した。

【 0 1 1 2 】

図 8 A 及び図 8 B から分かるように、h u A b F 4 6 抗体処理した場合、A k t タンパク質のリン酸化程度が 3 0 % 未満であるということが分かった。この結果から、h u A b F 4 6 抗体は、低減されたアゴニズム機能障害を有するということを確認した。

【 0 1 1 3 】

(4) c - M e t の分解程度の同定

4 種の親和性を改善した抗体の抗がん効果を同定するために、抗体と結合した c - M e t タンパク質の分解程度を評価した。相対的な全 c - M e t 量は、抗体が内在化を介して、c - M e t を分解 (d e g r a d a t i o n) 分解するために c - M e t に結合した後の c - M e t の全量変化を測定することによって得た。この様に、抗体の効果は評価した。

10

【 0 1 1 4 】

M K N 4 5 細胞 (2×10^5 セル / m l) と、4 種の抗体 ($5 \mu g / m l$) のそれぞれとを、9 6 ウェルプレートに同時に導入し、2 4 時間培養した。その後、抗体処理した細胞を溶解し、ヒト全 (H u m a n t o t a l) H G F R / c - M E T E L I S A キット (R & D システムズ , D Y C 3 5 8) を利用して、全 c - M e t 量の変化を測定し、分析した。

【 0 1 1 5 】

その結果、図 9 から分かるように、4 種の親和性を改善した抗体は、いずれも h u A b F 4 6 抗体に比べて、c - M e t 分解程度が上昇することが確認された。h u A b F 4 6 - H 4 - A 1 は、h u A b F 4 6 に比べて、3 7 % ほど c - M e t 分解程度が上昇し、h u A b F 4 6 - H 4 - A 2、h u A b F 4 6 - H 4 - A 3 及び h u A b F 4 6 - H 4 - A 5 は、2 8 % ほど c - M e t 分解程度が上昇したということを確認した。

20

【 0 1 1 6 】

実施例 9 : h u A b F 4 6 抗体の i n v i t r o での抗がん効果分析

h u A b F 4 6 抗体のがん細胞増殖抑制による抗がん効果を確認するために、c - M e t 分子を、細胞表面に発現する M K N 4 5 胃癌細胞 (日本がん研究細胞株銀行 (J C R B : Japanese Cancer Research Bank) , 東京) を利用した i n v i t r o での細胞増殖分析法を遂行した。

30

【 0 1 1 7 】

9 6 ウェルプレートにウェル当たり、 1×10^4 個の M K N 4 5 細胞を、 $50 \mu l$ の 5 % F B S / D M E M 培養液と分注した。その後、前記細胞を、処理なし、または 0 . 0 0 8 , 0 . 0 4 , 0 . 2 または $1 \mu g / m l$ の濃度の h u A b F 4 6 抗体で処理した後、7 2 時間培養し、CellTiter - Glo (商標登録) Luminescent Cell Viability Assay Kit (プロメガ , G 7 5 7 0) を使用して、ルミノメーター (パーキンエルマー社製 , 2 1 0 4 マルチラベルリーダー) で、細胞数を定量した。

【 0 1 1 8 】

図 1 0 から分かるように、陰性対照群として使用されたマウス I g G は、がん細胞の増殖を抑制する効果が全くない一方、h u A b F 4 6 抗体は、がん細胞の増殖を抑制する効果があることが確認された。

40

【 0 1 1 9 】

実施例 1 0 : マウス抗体 A b F 4 6、c h A b F 4 6 及び h u A b F 4 6 の i n v i v o での抗がん効果の確認

前記実施例で作製された A b F 4 6 のマウス抗体、キメラ抗体及びヒト化抗体の抗がん効果を確認するために、U 8 7 M G 脳癌細胞 (韓国細胞株銀行)、胃癌細胞株 M K N 4 5 細胞 (日本がん研究細胞株銀行 (J C R B : Japanese Cancer Research Bank) , 東京) または肺癌細胞株 N C I - H 4 4 1 細胞 (A T C C C a t . # H T B - 1 7 4) を投与した異種移植マウス動物モデルを対象にして、i n v i v o で、これらの抗体の投与によって、腫瘍サイズが減少するか否かを確認した。前記 3 種の抗体は、いずれも同様の C

50

D R (complimentarity determining region) を有しており、c - M e t の同一のエピトープに結合されると予想される抗体である。

【0120】

マウス動物モデルは、50 μ l の U 8 7 M G 脳癌細胞、胃癌細胞株 M K N 4 5 細胞または肺癌細胞株 N C I - H 4 4 1 細胞 (3×10^6 個) を、6 週齢の雄性 B A L B / C ノードマウス (オリエントバイオ株式会社から得た) に皮下注射し、1 週間経過後にがんが発生するマウスを、各グループ当たり 1 2 匹ずつランダムに選別し、実験に使用した。前記 3 種の抗体は、がん細胞の形成後、週 1 回、静脈注射によって、10 mg / kg の濃度でマウスに投与した。また、対照群として、マウス A b F 4 6 抗体は、腹腔注射によって、10 mg / kg と 20 mg / kg との濃度で週 2 回投与した。

10

【0121】

図 1 1 A ~ 図 1 1 C から分かるように、異種移植マウスグループ (U 8 7 M G 脳癌細胞、胃癌細胞株 M K N 4 5) で、経時的な腫瘍サイズの測定を行った結果、マウス抗体 A b F 4 6 及び c h A b F 4 6 抗体は、著しい抗がん効果があるということが確認された。実験群 (マウス抗体 A b F 4 6 及び c h A b F 4 6) と対照群 (v e h i c l e) との各グループ当たりマウスは、1 2 匹であり、各グループの平均と S E M とを表示した。図 1 1 A ~ 図 1 1 C で、反復測定分散分析 (Repeated measures ANOVA) を用いて、2 つの実験群と対照群とを比較した p - V a l u e を星印 (*) で表示した (* : p < 0 . 0 5 、 * * : p < 0 . 0 1 、 * * * * : p < 0 . 0 0 0 1) 。

【0122】

また、図 1 2 から分かるように、肺癌細胞株 N C I - H 4 4 1 異種移植マウスグループにおいて、経時的な腫瘍サイズを測定した結果、マウス抗体 A b F 4 6 及び h u A b F 4 6 抗体は、著しい抗がん効果があるということが確認された。実験群 (マウス抗体 A b F 4 6 及び h u A b F 4 6) と対照群との各グループ当たりマウスは、1 5 匹であり、各グループの平均と S E M とを示した。図 1 2 において反復測定分散分析で、2 つの実験群と対照群とを比較した p - V a l u e を星印 (*) で表示した (* : p < 0 . 0 5 、 * * * * : p < 0 . 0 0 0 1) 。

20

【0123】

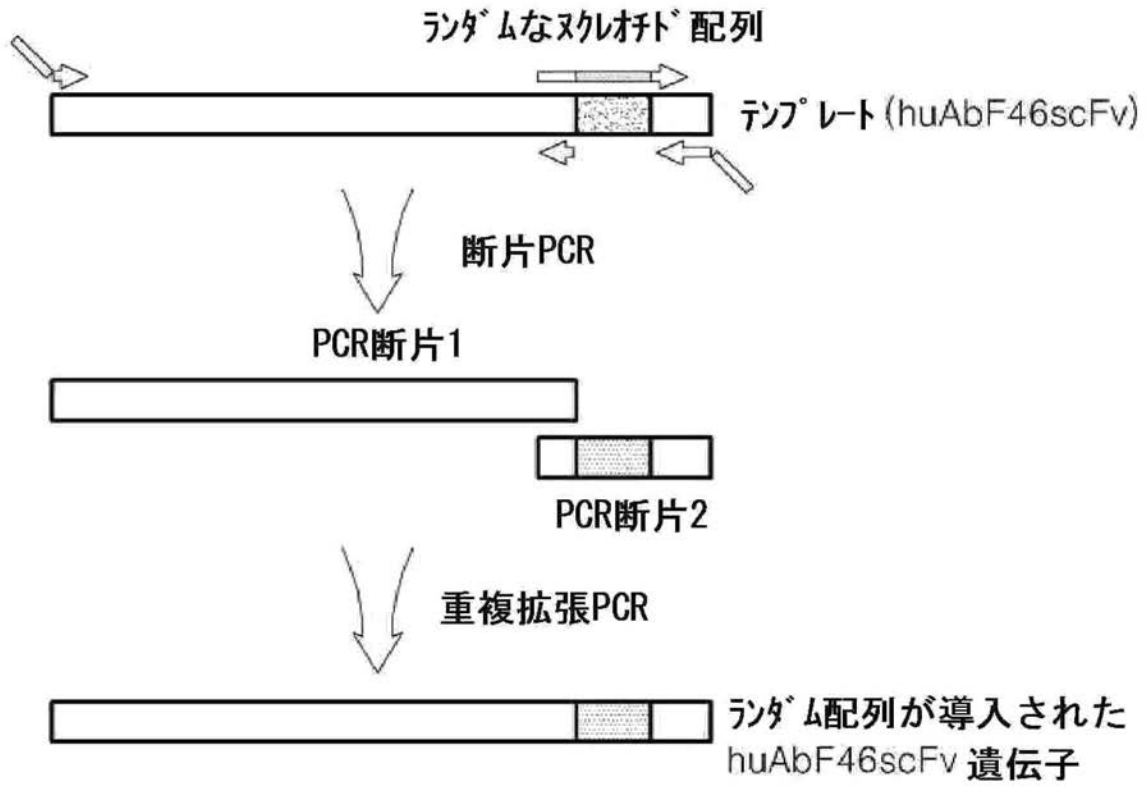
上述のように、この発明に係る上述の 1 以上の実施形態によると、C - M e t の S E M A ドメインにおけるエピトープに特異的に結合する抗体、および抗体を含んだがんの予防および治療のための医薬組成物が提供され、がんは効果的に予防および治療することが可能となる。

30

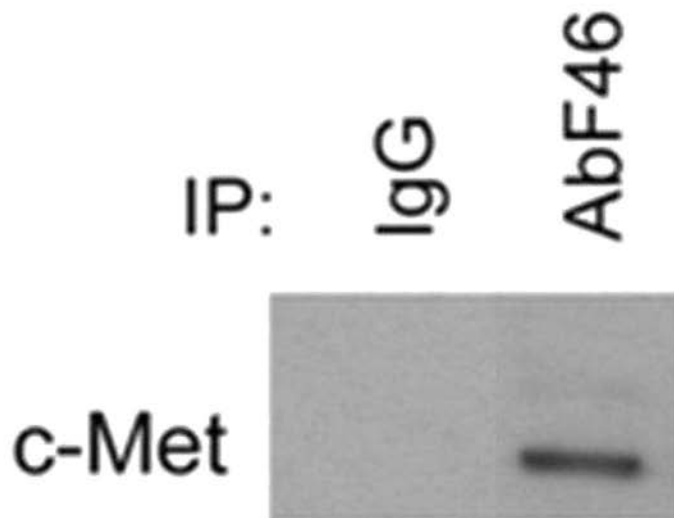
【0124】

ここに記述した代表的な実施形態は、記述的な意味としてのみ考えられるべきであり、限定を目的とするものではない。それぞれの実施形態の特徴または側面の記述は、典型的に、他の実施形態における他の同様な特徴または側面のために利用できるものとして考えられるべきである。

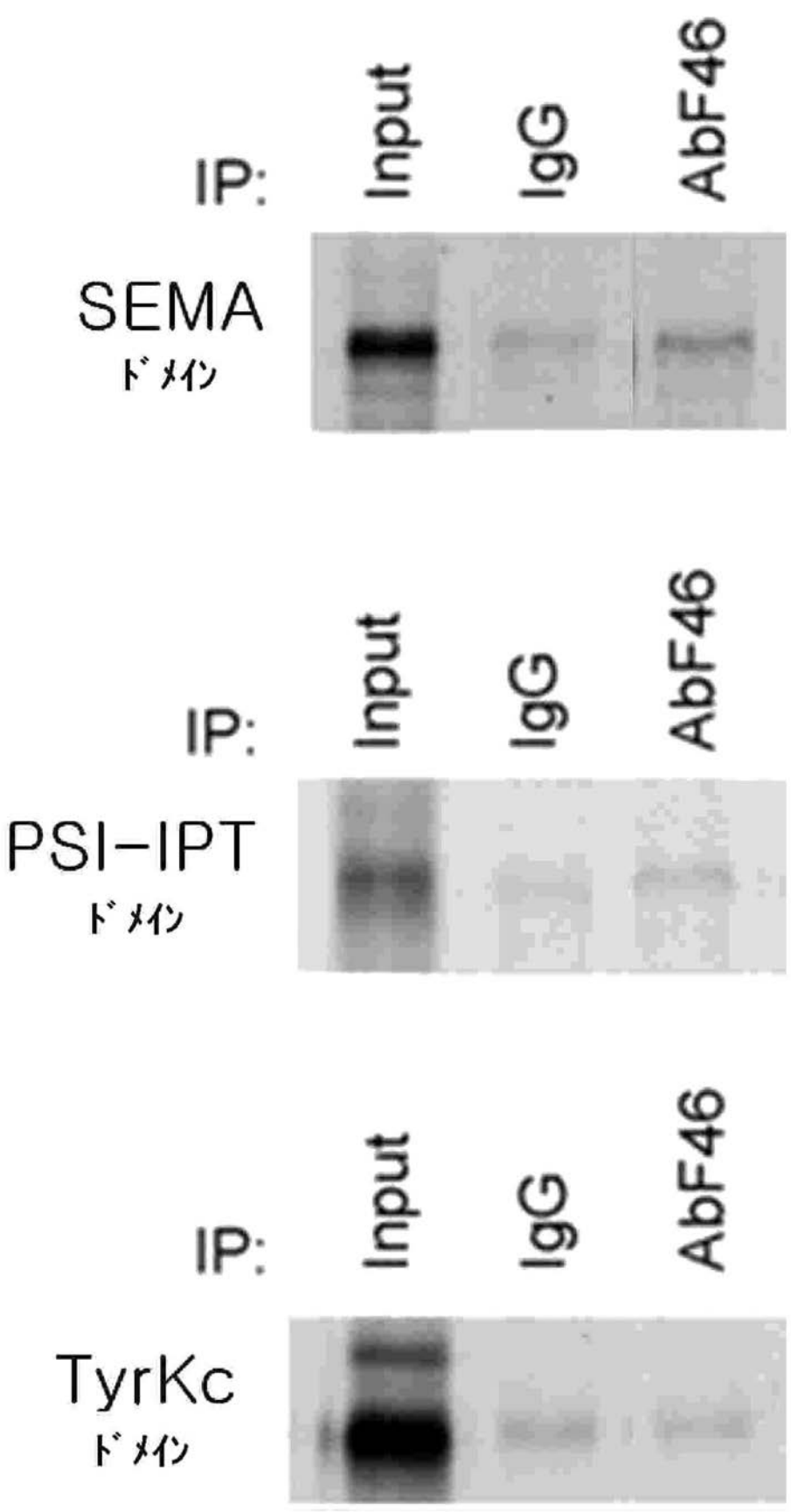
【 図 1 】



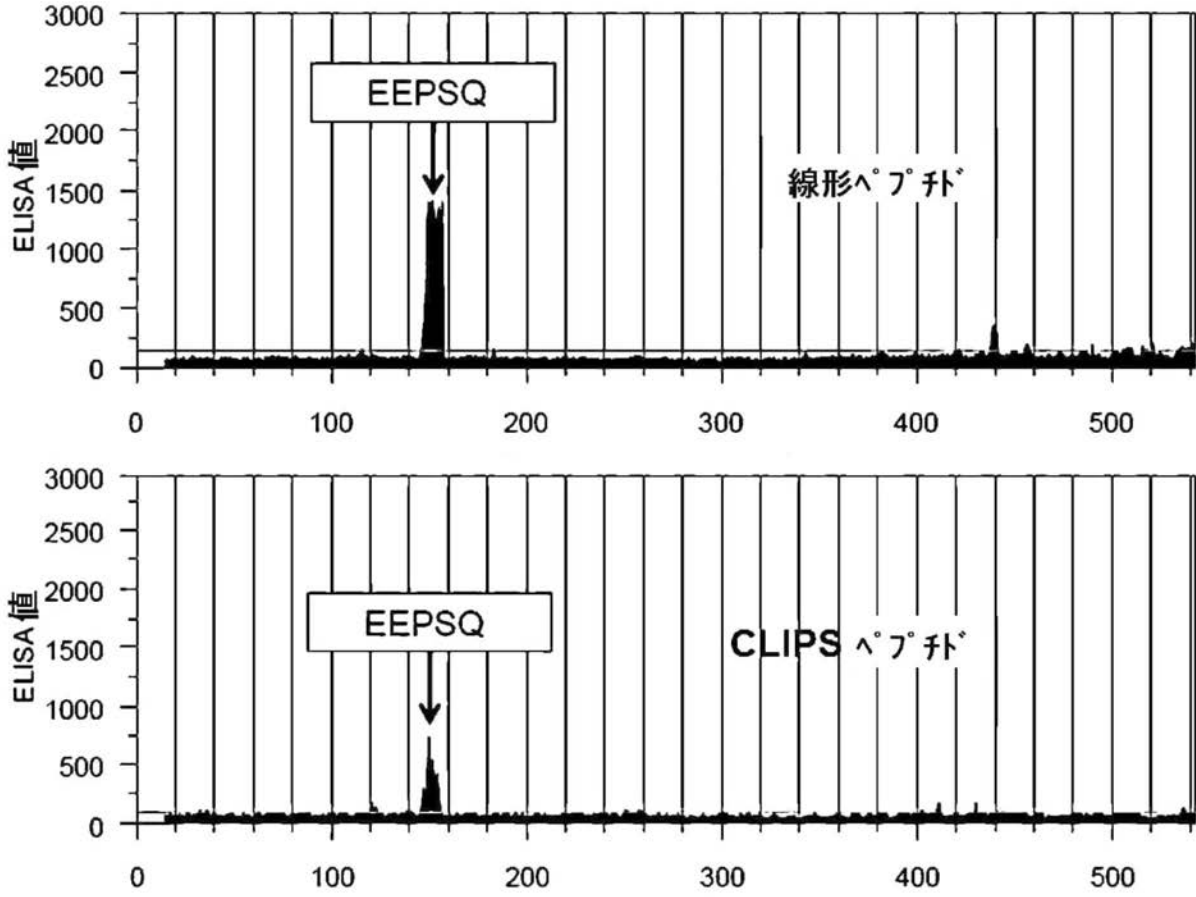
【 図 2 】



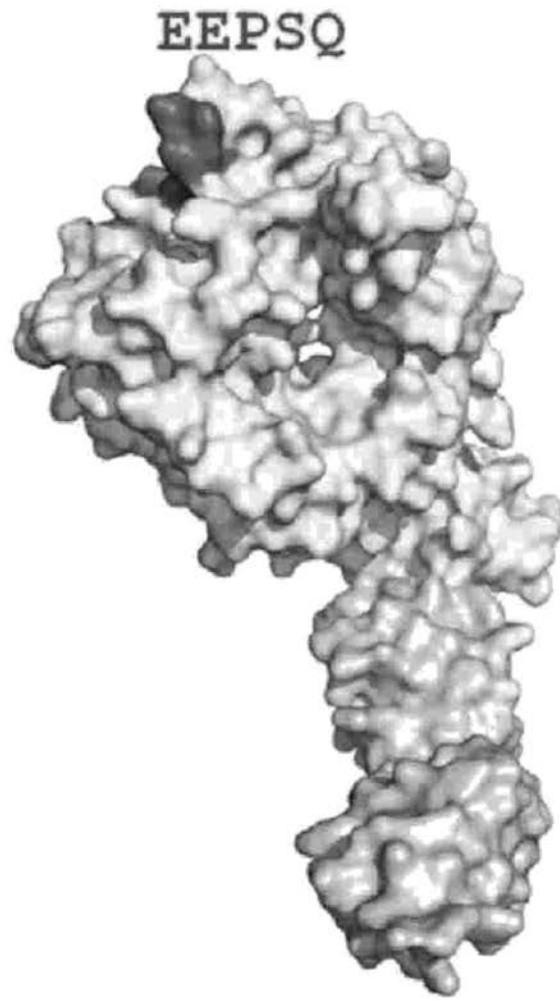
【 図 3 】



【 図 4 】



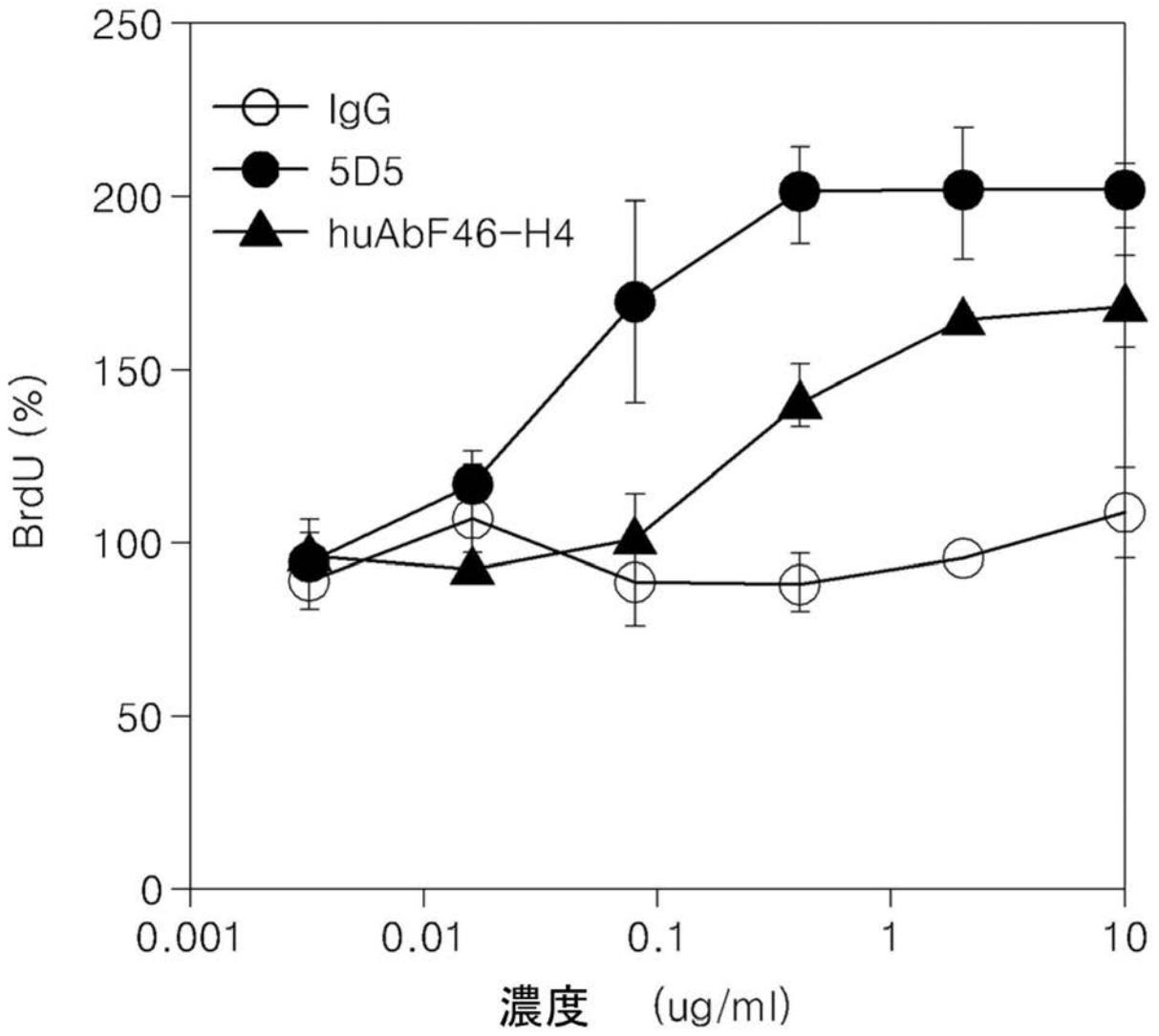
【 図 5 A 】



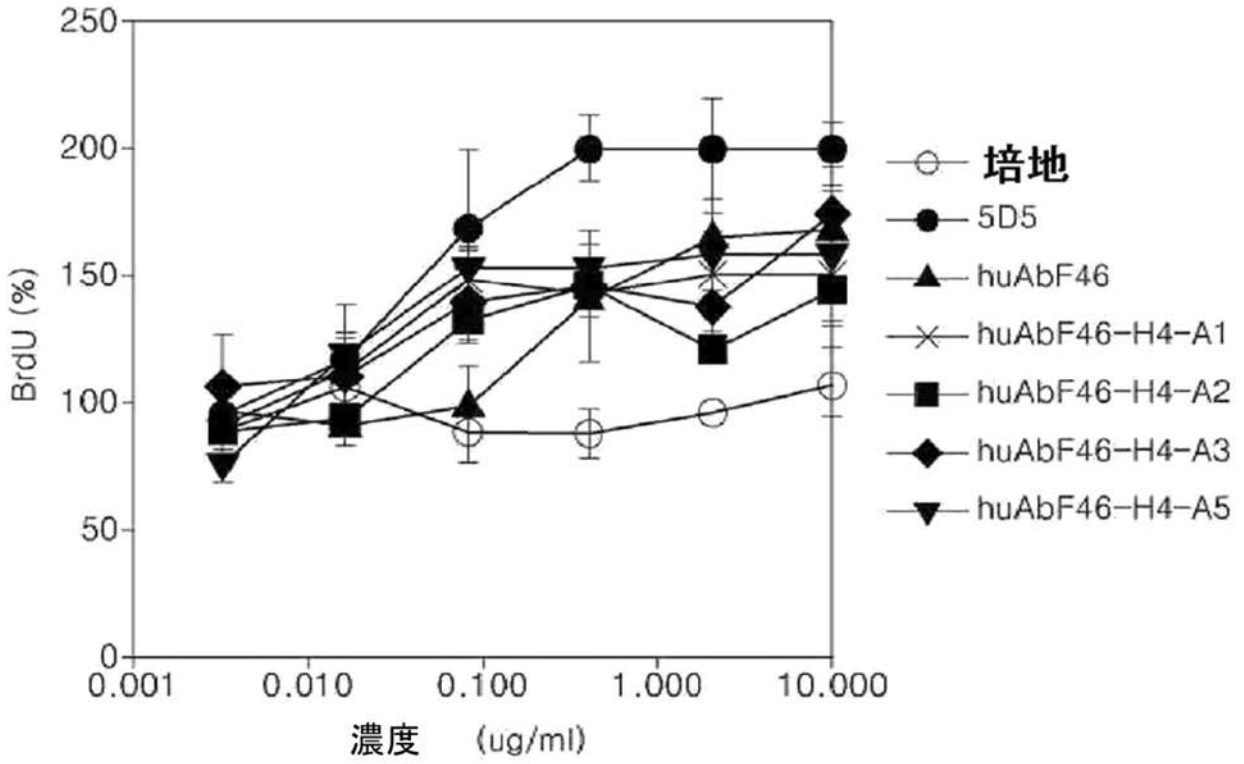
【 図 5 B 】



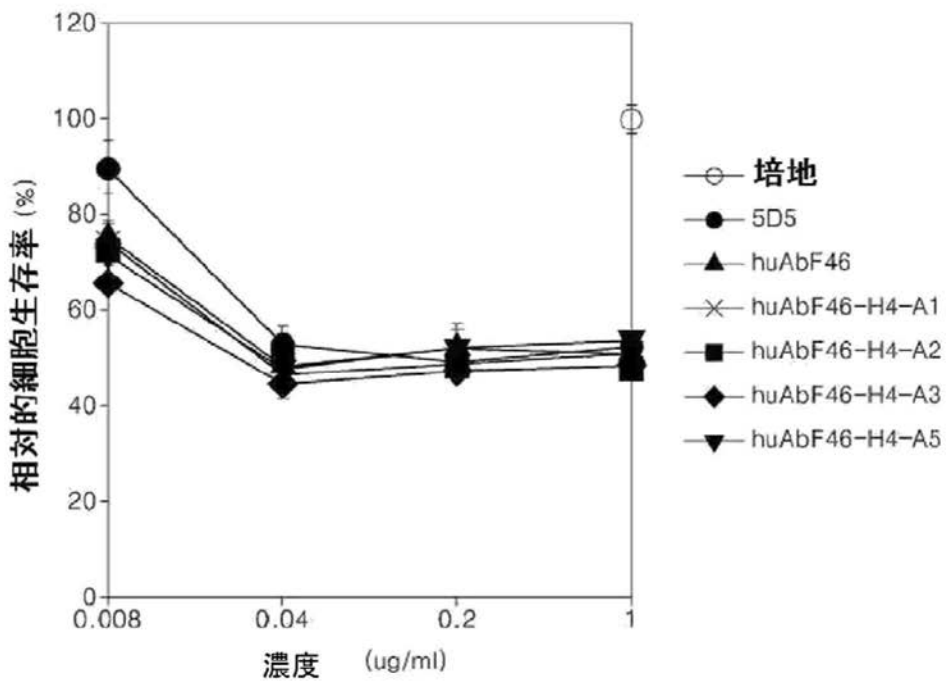
【図 6 A】



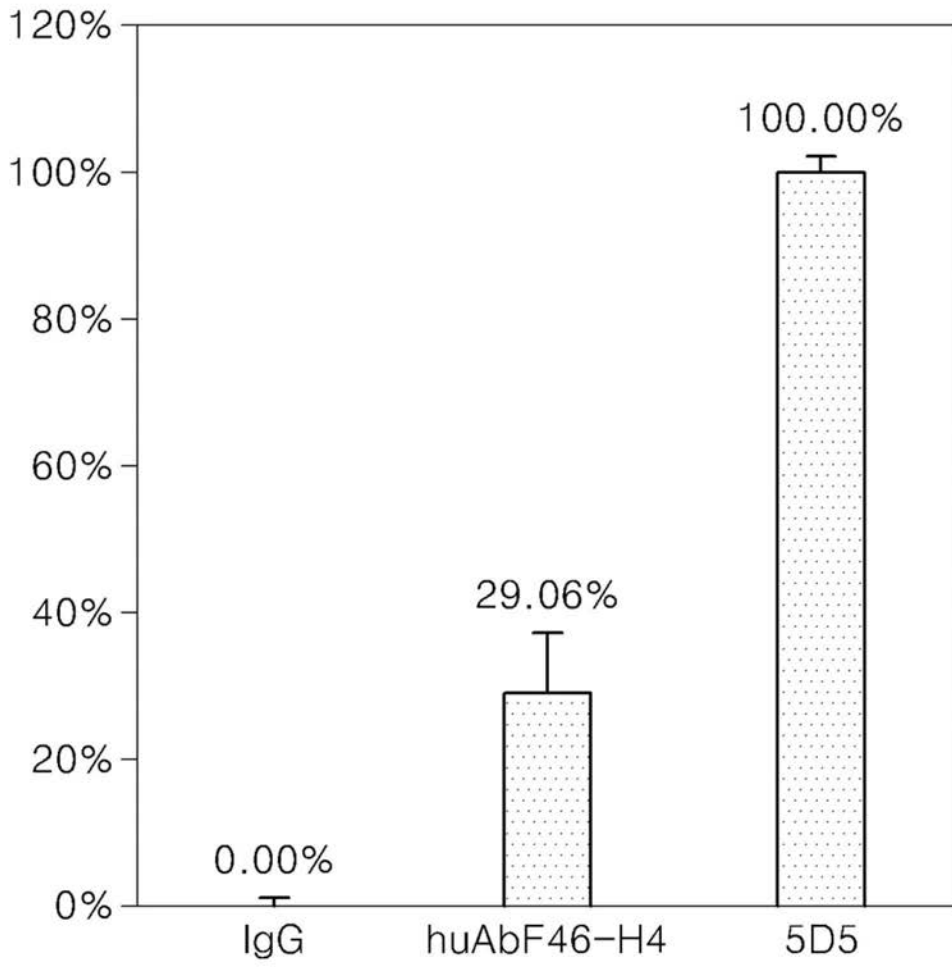
【 图 6 B 】



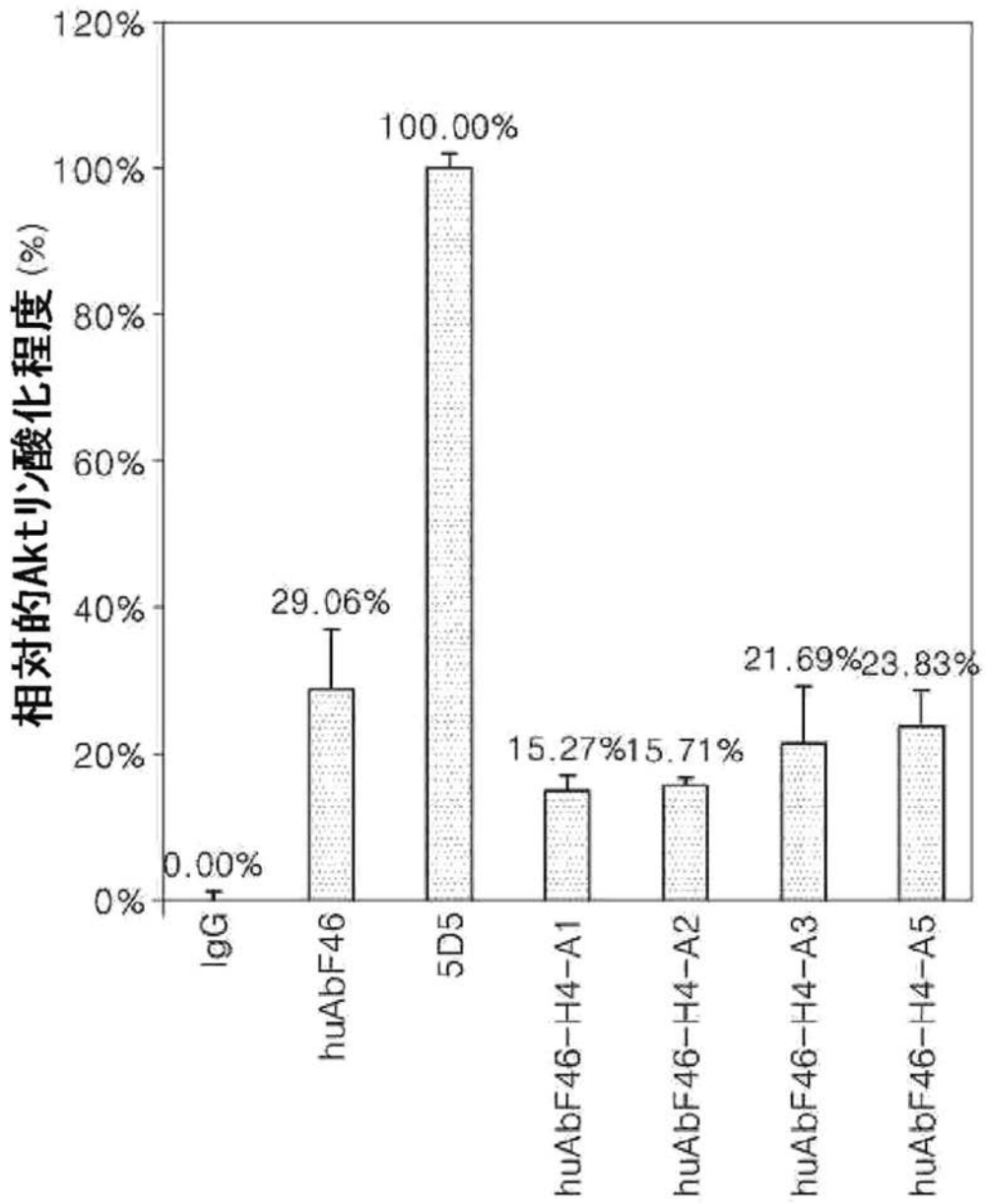
【 图 7 】



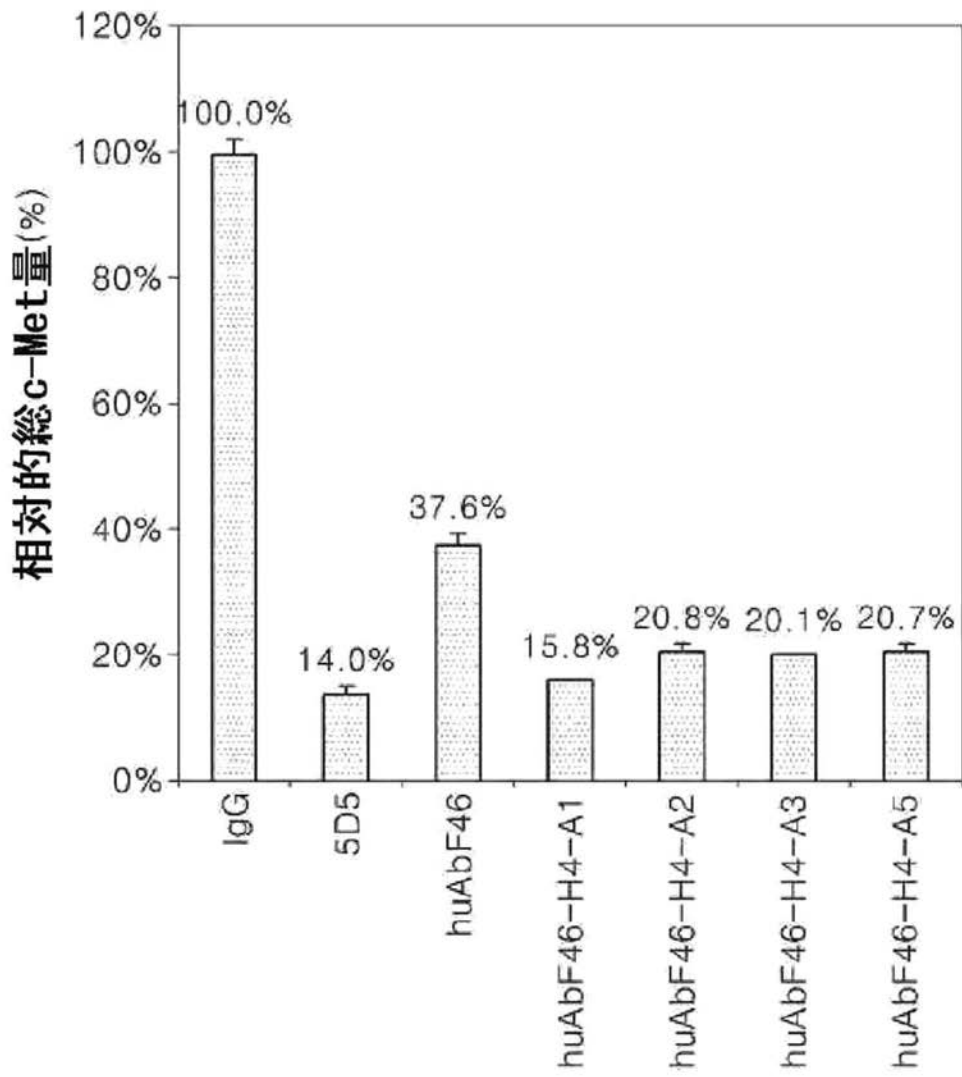
【 図 8 A 】



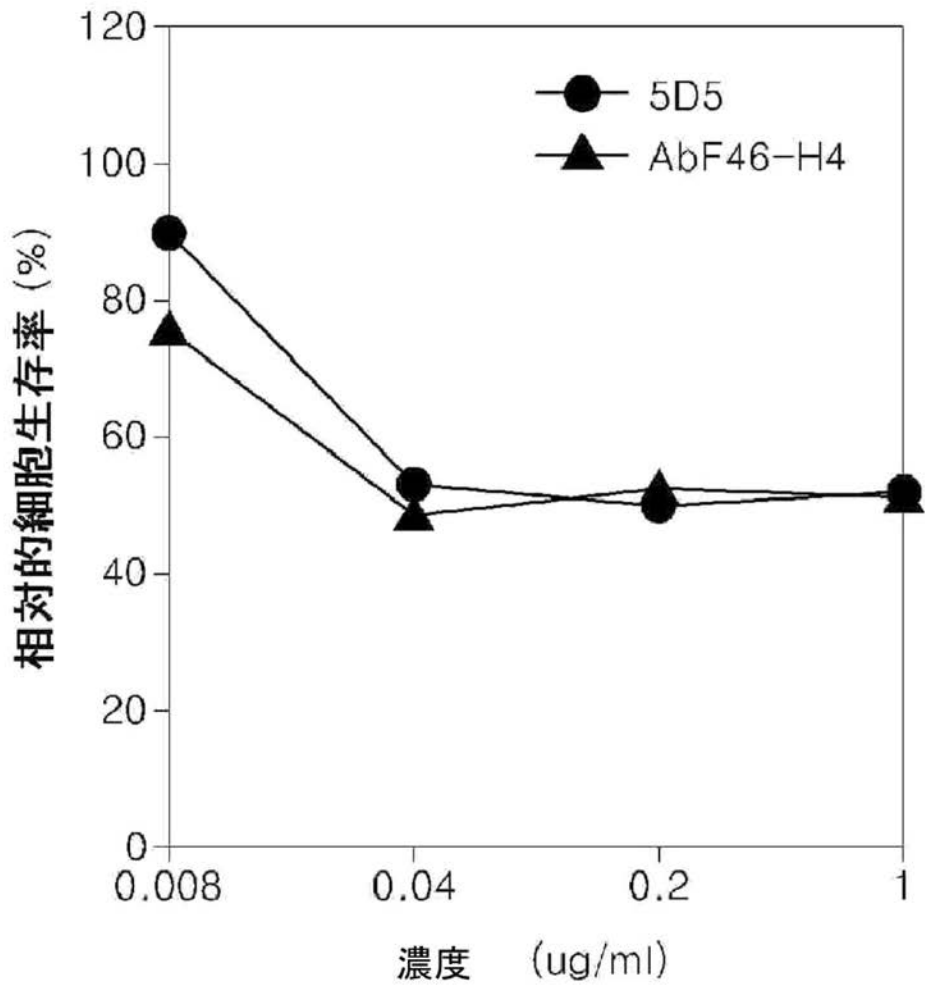
【 図 8 B 】



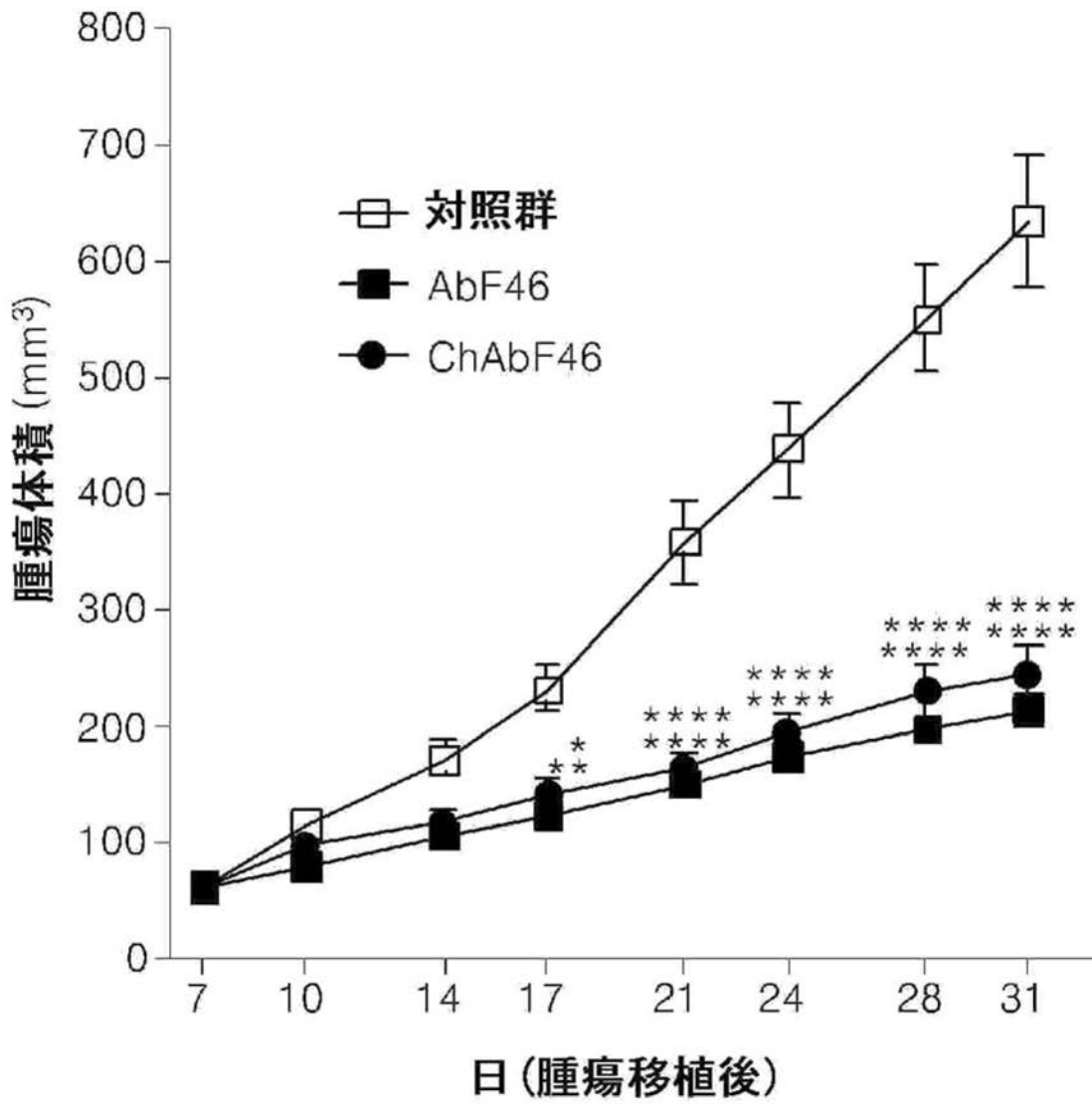
【 図 9 】



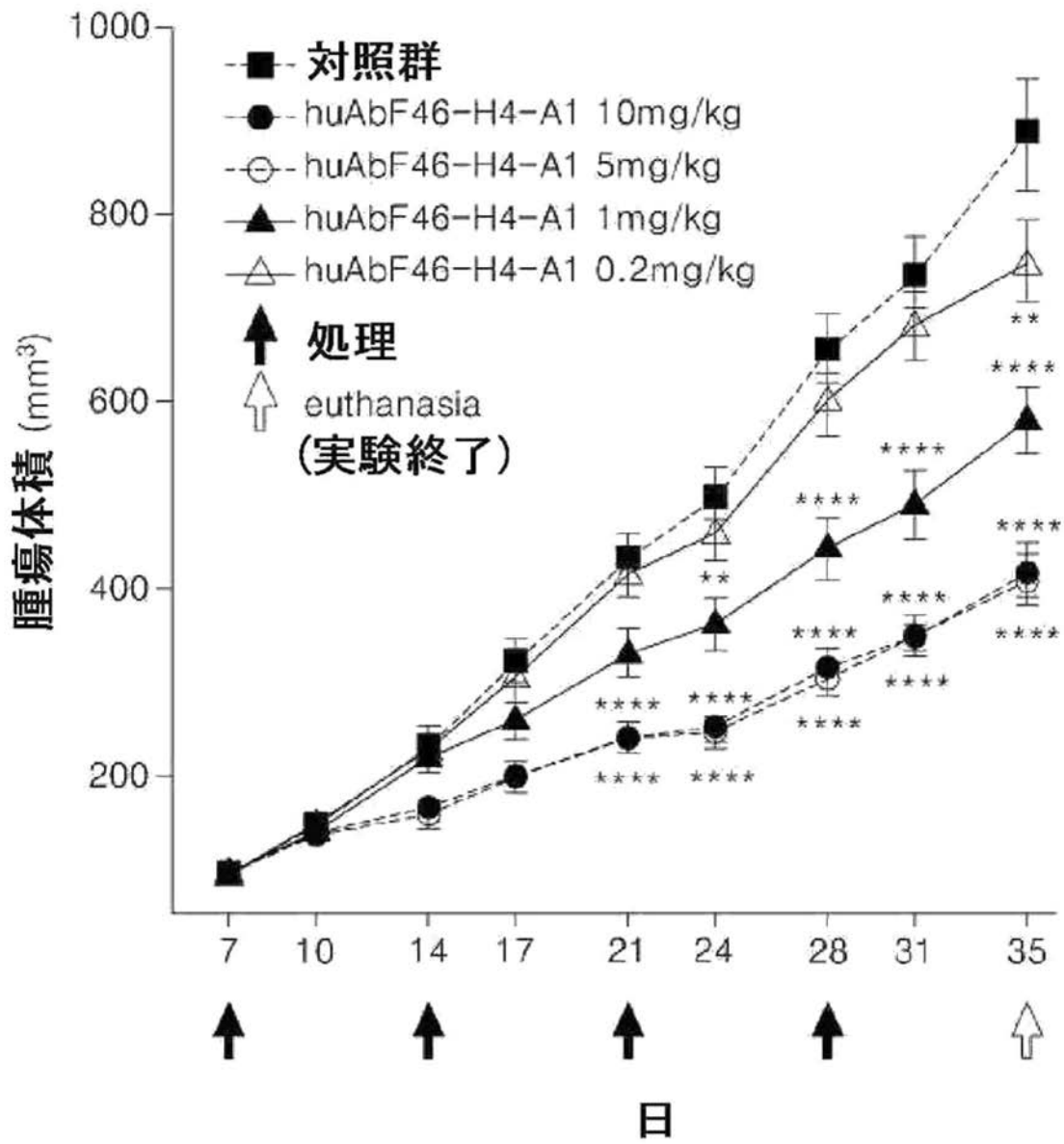
【 図 1 0 】



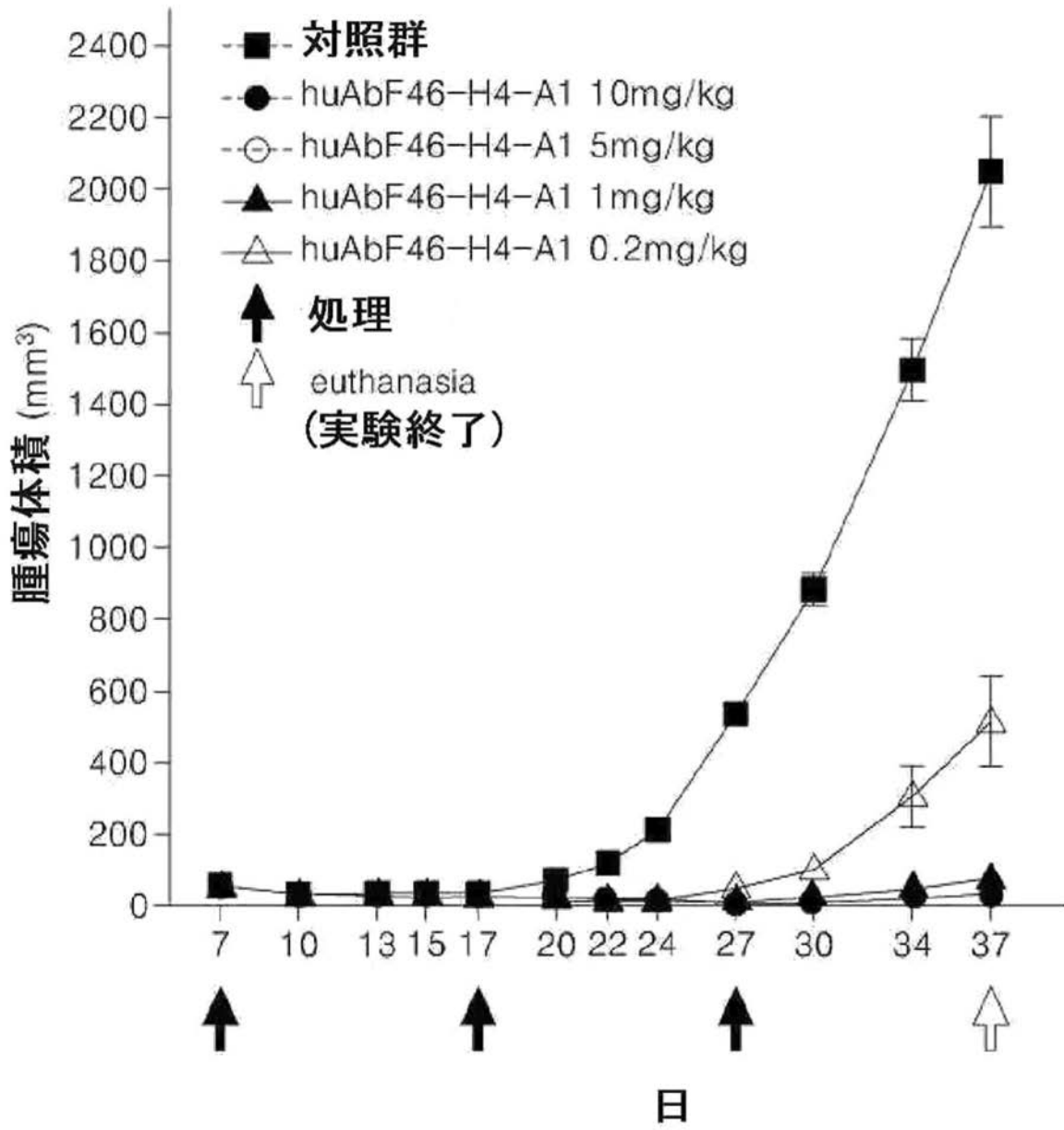
【図 1 1 A】



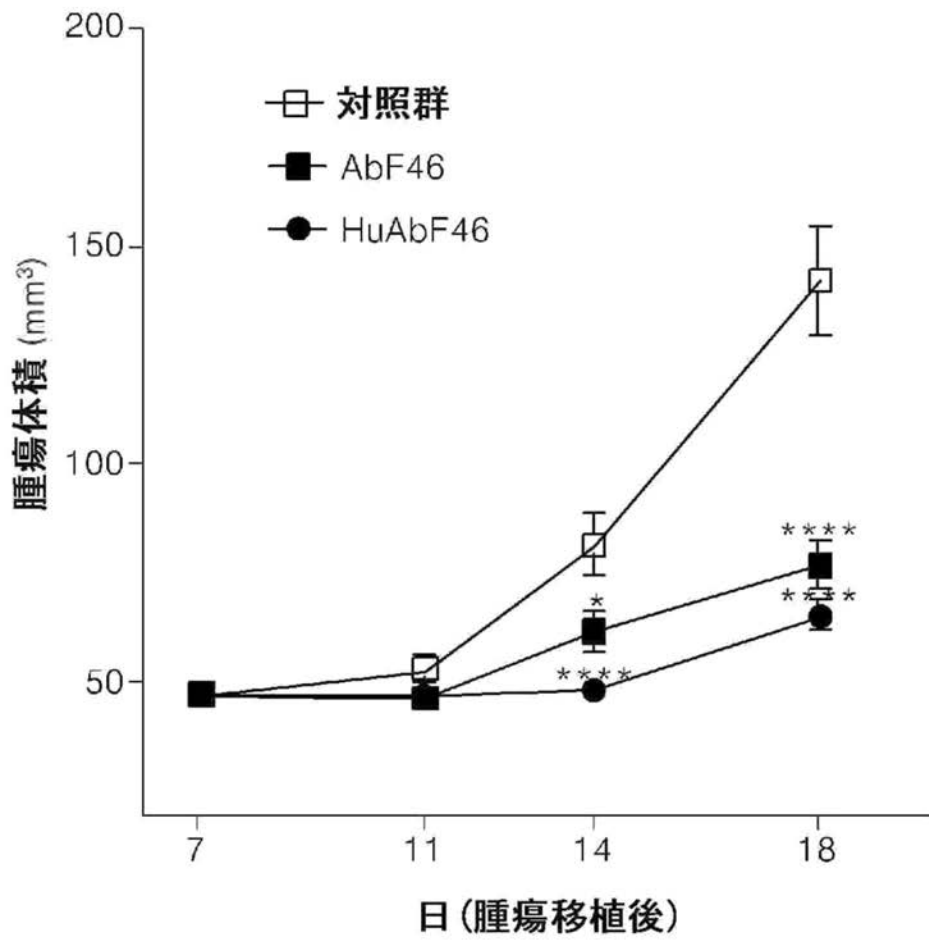
【図 1 1 B】



【図 1 1 C】





【 図 1 2 】



【 配列表 】

2014531217000001.app

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/KR2012/008069 |
|--|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| <i>C07K 16/30(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61P 35/00(2006.01)</i> | | |
| 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 16/30; A61K 39/395; C07K 16/18 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) cKOMPASS(KIPO internal) & keywords: antibody, SEMA domain of c-Met, c-Met antagonist | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | TIRAN, ZOHAR et al., 'A novel recombinant soluble splice variant of met is a potent antagonist of the hepatocyte growth factor/scatter factor-met pathway', Clinical Cancer Research, 15 July 2008, Vol.14, No.14, pp.4612-4621, ISSN 1078-0432. See p. 4613, paragraphs 1 and 2; Materials and Methods; fig. 1. | 1-4,11-14 |
| A | US 2009-0324603 A1 (CAO, BOLJANG) 31 December 2009 See abstract; claims 1, 11, and 12. | 1-4,11-14 |
| A | BURGESS TERESA et al., 'Fully human monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor with therapeutic potential against hepatocyte growth factor/c-Met-dependent human tumors', Cancer research, 1 February 2006, Vol.66, No.3, pp.1721-1729, ISSN 0008-5472. See abstract. | 1-4,11-14 |
| A | MARTENS, TOBIAS et al., 'novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo', Clinical cancer research, 15 October 2006, Vol.12, No.20, pp.6144-6152, ISSN 1078-0432. See abstract. | 1-4,11-14 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 27 March 2013 (27.03.2013) | | Date of mailing of the international search report 28 March 2013 (28.03.2013) |
| Name and mailing address of the ISA/KR  Facsimile No. 82-42-472-7140 | | Authorized officer HEO, Joo Hyung Telephone No. 82-42-481-8150  |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/008069

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | JIAO, YONGJUN. et al., 'Construction of human naive Fab library and characterization of anti-Met Fab fragment generated from the library', September 2005, Vol.31, No.1, pp.41-54, ISSN 1073-6085. See abstract. | 1-4,11-14 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/008069

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

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

1. Claims Nos.: 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 10 pertains to methods for treatment of the human body by therapy, and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. Claims Nos.: 9, 16, 18, 19
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 9, 16, 18, and 19 are unclear since they refer to claims which are not searchable due to not being drafted in accordance with the second and third sentence of Rule 6.4(a).
3. Claims Nos.: 5-8, 10, 15, 17
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/008069

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 2009-0324603 A1 | 31. 12. 2009 | US 8039598 B2 | 18. 10. 2011 |

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------|--------------------|-------------|
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/00 1 0 1 | 4 H 0 4 5 |
| C 1 2 P 21/08 (2006.01) | C 1 2 P 21/08 | |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 D | |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 N | |
| G 0 1 N 33/15 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | |
| G 0 1 N 33/50 (2006.01) | G 0 1 N 33/15 Z | |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01) | G 0 1 N 33/50 Z | |
| | G 0 1 N 33/53 N | |

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), 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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

- (72) 発明者 キム, ギョン - ア
大韓民国, 4 4 3 - 8 0 3 キョンギ - ド, スウォン - シ, ヨントン - ク, サムスン - ロ, 1 3 0
, シーノオー サムスン アドバンスド インスティテュート オブ テクノロジー
- (72) 発明者 リー, スン - ヒョン
大韓民国, 4 4 3 - 8 0 3 キョンギ - ド, スウォン - シ, ヨントン - ク, サムスン - ロ, 1 3 0
, シーノオー サムスン アドバンスド インスティテュート オブ テクノロジー
- (72) 発明者 ソン, ホ - ヨン
大韓民国, 4 4 3 - 8 0 3 キョンギ - ド, スウォン - シ, ヨントン - ク, サムスン - ロ, 1 3 0
, シーノオー サムスン アドバンスド インスティテュート オブ テクノロジー
- (72) 発明者 ソン, ユン - ジョン
大韓民国, 4 4 3 - 8 0 3 キョンギ - ド, スウォン - シ, ヨントン - ク, サムスン - ロ, 1 3 0
, シーノオー サムスン アドバンスド インスティテュート オブ テクノロジー
- (72) 発明者 オー, ユン - ミ
大韓民国, 4 4 3 - 8 0 3 キョンギ - ド, スウォン - シ, ヨントン - ク, サムスン - ロ, 1 3 0
, シーノオー サムスン アドバンスド インスティテュート オブ テクノロジー
- (72) 発明者 ジュン, スー - ヨン
大韓民国, 4 4 3 - 8 0 3 キョンギ - ド, スウォン - シ, ヨントン - ク, サムスン - ロ, 1 3 0
, シーノオー サムスン アドバンスド インスティテュート オブ テクノロジー
- (72) 発明者 チョ, ミ - ヨン
大韓民国, 4 4 3 - 8 0 3 キョンギ - ド, スウォン - シ, ヨントン - ク, サムスン - ロ, 1 3 0
, シーノオー サムスン アドバンスド インスティテュート オブ テクノロジー

F ターム(参考) 2G045 FB03

4B024 AA01 AA12 BA43 CA01 GA11 HA01 HA15
4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
4C085 AA13 AA14 BB31 EE01
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA28 FA74

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 特异性结合c-Met的SEMA结构域内的表位的抗体 | | |
| 公开(公告)号 | JP2014531217A | 公开(公告)日 | 2014-11-27 |
| 申请号 | JP2014534477 | 申请日 | 2012-10-05 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 三星电子株式会社 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 三星电子有限公司 | | |
| [标]发明人 | チョンカンホ キムギョンア リースンヒョン ソンホヨン ソンユンジョン オーユンミ ジュンスーヨン チョミヨン | | |
| 发明人 | チョン,カン-ホ キム,ギョン-ア リー,スン-ヒョン ソン,ホ-ヨン ソン,ユン-ジョン オー,ユン-ミ ジュン,スー-ヨン チョ,ミ-ヨン | | |
| IPC分类号 | C12N15/09 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61K39/395 A61P35/00 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | A61K2039/505 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 C07K16/2863 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/565 C07K2317/73 C07K2317/92 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/08 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.N | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA43 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/FA74 | | |
| 优先权 | 1020110101292 2011-10-05 KR | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

特异性结合c-Met蛋白的SEMA结构域中的表位的抗体或其抗原结合片段，以及与其相关的药物组合物，方法，试剂盒，核酸和细胞。

