



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년02월01일
(11) 등록번호 10-1701685
(24) 등록일자 2017년01월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01) GOIN 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2863 (2013.01)
A61K 39/39541 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7002898(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2008년07월10일
심사청구일자 2016년02월02일
- (85) 번역문제출일자 2016년02월02일
- (65) 공개번호 10-2016-0019974
- (43) 공개일자 2016년02월22일
- (62) 원출원 특허 10-2015-7015922
원출원일자(국제) 2008년07월10일
심사청구일자 2015년06월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2008/059026
- (87) 국제공개번호 WO 2009/007427
국제공개일자 2009년01월15일
- (30) 우선권주장
07301231.2 2007년07월12일
유럽특허청(EPO)(EP)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
US20050233960 A1

- (73) 특허권자
피에르 파브르 메디카먼트
프랑스, 에프-92100 볼로뉴-빌랑꾸르, 벨라스 아
벨-강스, 45
- (72) 발명자
고에뜨쉬, 릴리앙
프랑스, 에프-74130 아이즈, 루뜨 드 꼬뤼쎌 15
- (74) 대리인
한인열

전체 청구항 수 : 총 31 항

심사관 : 김정태

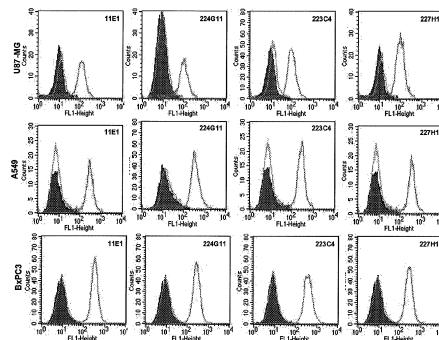
(54) 발명의 명칭 새로운 c-Met 이중항을 저해하는 항체들 및 그들의 용도들

(57) 요약

본 발명은 인간 c-Met 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 새로운 항체들 및/또는 상기 수용체의 타이로신 키나제 (tyrosine kinase) 활성을 특이적으로 저해할 수 있는 새로운 항체들, 특히 마우스, 조합 (chimeric) 및 인간화 기원의 모노클론 항체 (monoclonal antibody)들 그리고 이들 항체들을 코딩하는 아미노산 및 핵산 서열들에

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명에 따른 항체들은 c-Met 이중합 (dimerization)을 저해할 수 있다. 본 발명은 마찬가지로 이들 항체들의 암들 또는 상기 수용체의 과다 발현 (overexpression)과 연관된 모든 병리학의 예방적 및/또는 치료적 처치 (therapeutic treatment)를 위한 약제 (medicament)로서의 용도들, 또한 c-Met의 과다 발현과 연관된 질병들의 진단 방법들 또는 키트들로 이루어진다. 본 발명은 궁극적으로 종양의 경과 (tumor progression) 또는 전이 (metastasis)에 관여하는 기타 성장인자들에 대항하는 다른 항체들 및/또는 화학적 화합물들 및/또는 항암제 (anti-cancer agent)들 또는 독신 (toxin)들과 결합하는 (conjugated) 약제들과 조합된 이러한 항체들로 이루어진 산물들 및/또는 조성물들 그리고 그들의 특정 암들의 예방 및/또는 치료에 사용하는 용도로 이루어진다.

(52) CPC특허분류

- C07K 16/30* (2013.01)
- C07K 16/32* (2013.01)
- C07K 16/40* (2013.01)
- G01N 33/57492* (2013.01)
- C07K 2317/24* (2013.01)
- C07K 2317/73* (2013.01)
- C07K 2317/75* (2013.01)
- C07K 2317/76* (2013.01)
- C07K 2317/92* (2013.01)

(30) 우선권주장

- 60/929,789 2007년07월12일 미국(US)
- 61/020,639 2008년01월11일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

c-Met에 특이적으로 결합할 수 있는 항체에 있어서, 항체는 각각 서열번호 4, 5 및 6의 아미노산 서열을 가지는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3로 이루어진 중사슬; 및 각각 서열번호 13, 11 및 14의 아미노산 서열을 가지는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로 이루어진 경사슬로 구성되는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 항체는 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어진 중사슬 및 서열번호 22의 아미노산 서열로 이루어진 경사슬로 구성되는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 3

파리 파스퇴르 연구소 CNCM에 2007년 3월 14일자, 수탁번호 제 I-3732호로 기탁된 것을 특징으로 하는 제2항에서 청구한 항체를 분비할 수 있는 마우스 하이브리도마.

청구항 4

제1항에 있어서, 항체는 모노클론 항체로 구성되는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 항체는 조합 항체 (chimeric antibody)이고 경사슬 및 중사슬 불변 부위 (constant region)들은 마우스와 상이한 (heterologous) 종의 항체로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 상이한 종은 인간인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 7

제6항에 있어서,

인간 항체로부터 유래한 경사슬 및 중사슬 불변 부위들은 각각 경사슬 카파 부위 및 중사슬 감마-1, 감마-2 또는 감마-4 부위에 해당하거나;

경사슬 가변 도메인 인간 구조들은 배아 IGKV3-7*01 및 IGKJ4*01에서 유래되고, 이들 인간 구조들은 M4에서 L, S40에서 Y, F87에서 Y 및 P96에서 T로의 돌연변이에서 선택되는 인간 잔기에서 마우스 잔기로의 적어도 하나의 돌연변이를 포함하거나; 또는

중사슬 가변 도메인 구조들은 인간 배아 IGHV1-46*01 및 IGHJ4*01에서 유래되고, 이들 인간 구조들은 H40에서 N, I55에서 Y, S66에서 D, R80에서 A 및 T82에서 K로의 돌연변이에서 선택되는 인간 잔기에서 마우스 잔기로의 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는, 항체.

청구항 8

제1항, 제2항, 제4항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 있어서, 항체는 c-Met에 특이적으로 결합할 수 있는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 9

제8항에 있어서, 항체는 c-Met의 리간드-의존성 및 리간드-비의존성 활성화를 저해할 수 있는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, 항체는 c-Met 이중합을 저해할 수 있거나 적어도 하나의 종양 타입에 대해 적어도 50%의 종양 세포 증식을 저해할 수 있는 것을 특징으로 하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 11

- (a) 제1항에서 청구한 항체를 코딩하는 핵산, DNA 또는 RNA;
- (b) 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29의 서열들 그리고 서열번호 36, 서열번호 34 및 서열번호 37의 서열들로 이루어진 DNA 서열로 구성되는 핵산;
- (c) 서열번호 42 및 서열번호 45의 서열들로 이루어진 DNA 서열로 구성되는 핵산;
- (d) b) 또는 c)에 정의한 핵산들에 해당하는 RNA 핵산들; 및
- (e) a), b) 또는 c)에 정의한 핵산들에 상보적인 핵산들; 로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산.

청구항 12

제11항에서 청구한 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 13

제12항에서 청구한 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 14

제12항에서 청구한 벡터에 의해 형질전환된 적어도 하나의 세포로 이루어진 인간을 제외한 형질전환 동물.

청구항 15

a) 제13항에서 청구한 세포를 배지 내에서 배양하고; 및 b) 배양 배지 또는 상기 배양된 세포들로부터 시작하여 생산된 항체를 회수하는; 단계로 이루어진 것을 특징으로 하는 제1항, 제2항, 제4항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 의한 항체를 생산하는 방법.

청구항 16

약제로서 제1항, 제2항, 제4항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 의한 또는 제3항의 하이브리도마에 의해 생산된 항체.

청구항 17

활성 성분으로서 제1항, 제2항, 제4항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 의한 또는 제3항의 하이브리도마에 의해 생산된 항체로 이루어진 화합물을 포함하는 암 치료용 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 조성물은 동시적, 별도의 또는 연속적인 사용을 위한 조합 산물 (combination product)로서 항-종양 항체를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.

청구항 19

제17항에 있어서, 조성물은 동시적, 별도의 또는 연속적인 사용을 위한 조합 산물 (combination product)로서 세포 독성 또는 세포 증식억제성 (cytotoxic or cytostatic) 약제를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 세포 독성 또는 세포 증식억제성 약제는 상기 항체와 화학적으로 조합되는 (coupled chemically) 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 세포 독성 약제는 알킬화제 (alkylating agent)들, 항-대사물질 (anti-metabolite)들,

항-종양 항생제 (anti-tumor antibiotic)들, 세포분열 저해제 (mitotic inhibitor)들, 크로마틴 기능 저해제 (chromatin function inhibitor)들, 항-혈관형성제 (anti-angiogenesis agent)들, 항-에스트로겐 (anti-estrogen)들, 항-안드로겐 (anti-androgen)들 또는 면역조절제 (immunomodulator)들로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 세포 독성 약제는 세포분열 저해제인 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.

청구항 23

제17항에 있어서, 상기 항체들의 적어도 하나는 세포 독신 (toxin) 또는 방사성 요소 (radioelement)와 결합한 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 독신 또는 방사성 요소가 동시적 사용을 위해 상기 조성물의 요소들의 적어도 하나와 화학적으로 조합된 (coupled chemically) 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.

청구항 25

약제로서의 제17항에서 청구한 암 치료용 조성물.

청구항 26

종양 세포들의 성장 또는 증식을 억제시키는 약제의 제조를 위한 제1항, 제2항, 제4항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 의한 또는 제3항의 하이브리도마에 의해 생산된 항체.

청구항 27

암 치료용 약제의 제조를 위한 제1항, 제2항, 제4항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 의한 또는 제3항의 하이브리도마에 의해 생산된 항체.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 암은 전립선암 (prostate cancer), 골육종 (osteosarcoma), 폐암 (lung cancer), 유방암 (breast cancer), 자궁내막 암 (endometrial cancer), 신경교아세포종 (glioblastoma) 또는 결장암 (colon cancer)으로부터 선택된 암인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 암은 HGF 의존성 및 비의존성 Met-활성화와 관련된 암인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 30

c-Met 수용체의 비정상적인 존재 (abnormal presence)가 의심되는 생물학적 시료로부터 시작하여 c-Met 수용체의 과다 발현 또는 과소 발현을 분석하는 생체의 분석 방법으로서, 제1항, 제2항, 제4항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 의한 또는 제3항의 하이브리도마에 의해 생산된 항체를 상기 생물학적 시료와 접촉시키는 (contact) 단계를 포함하는, 분석 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 항체는 표지될 수 있는 것을 특징으로 하는, 분석방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 인간 c-Met 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 새로운 항체들 및/또는 상기 수용체의 타이로신 키나제 (tyrosine kinase) 활성을 특이적으로 저해할 수 있는 새로운 항체들, 특히 마우스, 조합 (chimeric) 및 인간화 기원의 모노클론 항체 (monoclonal antibody)들 그리고 이들 항체들을 코딩하는 아미노산 및 핵산 서열들

[0001]

에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명에 따른 항체들은 c-Met 이중합 (dimerization)를 저해할 수 있다. 본 발명은 마찬가지로 이들 항체들의 암들 또는 상기 수용체의 과다 발현 (overexpression)과 연관된 모든 병리학의 예방적 및/또는 치료적 처치 (therapeutic treatment)를 위한 약제 (medicament)로서의 용도들, 또한 c-Met의 과다 발현과 연관된 질병들의 진단 방법들 또는 키트들로 이루어진다. 본 발명은 궁극적으로 종양의 경과 (tumor progression) 또는 전이 (metastasis)에 관여하는 기타 성장인자들에 대항하는 다른 항체들 및/또는 화학적 화합물들 및/또는 항암제 (anti-cancer agent)들 또는 독신 (toxin)들과 결합하는 (conjugated) 약제들과 조합된 이러한 항체들로 이루어진 산물들 및/또는 조성물들 그리고 그들의 특정 암들의 예방 및/또는 치료에 사용하는 용도로 이루어진다.

배경 기술

- [0002] 트라스투주 mab (trastuzumab), 세투시 mab (cetuximab), 베박시주 mab (bevacizumab), 이마티닙 (imatinib) 및 제피티닙 (gefitinib) 저해제들과 같은 수용체 타이로신 키나제 (receptor tyrosine kinase, RTK)를 표적하는 약제들은 선택된 암들의 치료를 위해 이 단백질 클래스를 표적하는 장점을 기술하였다.
- [0003] c-Met은 RON 및 SEA도 포함하는 RTKs 서브패밀리의 프로토타입 구성원이다. c-Met RTK 패밀리는 구조적으로 다른 RTK 패밀리와 다르고, 또한 스캐터 인자 (scatter factor, SF)라고도 불리는 간세포 성장인자 (hepatocyte growth factor, HGF)에 대해 친화성이 높은 것으로 알려진 유일한 수용체이다 [D.P. Bottaro et al., Science 1991, 251: 802-804; L. Naldini et al., Eur. Mol. Biol. Org. J. 1991, 10:2867-2878]. c-Met 및 HGF는 다양한 조직에서 널리 발현되지만, 정상적으로 이들의 발현이 표피 (epithelial) 및 중간엽 (mesenchymal) 기원의 세포들에 각각 제한된다 [M.F. Di Renzo et al., Oncogene 1991, 6:1997-2003; E. Sonnenberg et al., J. Cell. Biol. 1993, 123:223-235]. 그들 모두는 정상적인 포유동물 발생에 필요하고, 성장 및 혈관형성 (angiogenesis) 뿐만 아니라 세포 이동 (cell migration), 형태적 분화 (morphogenic differentiation), 및 삼차원적 튜브 구조(tubular structure)의 구성에 특히 중요한 것으로 관찰되어 왔다 [F. Baldt et al., Nature 1995, 376:768-771; C. Schmidt et al., Nature, 1995, 373:699-702; Tsarfaty et al., Science, 1994, 263:98-101]. c-Met 및 HGF의 통제된 조절이 포유동물 발생, 조직 유지 (tissue maintenance) 및 복원 (repair)에서 중요한 것으로 보여지는 한편 [Nagayama T, Nagayama M, Kohara S, Kamiguchi H, Shibuya M, Katoh Y, Itoh J, Shinohara Y., Brain Res. 2004, 5;999(2):155-66; Tahara Y, Ido A, Yamamoto S, Miyata Y, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H., J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003, 307(1):146-51], 그들의 이상 조절 (dysregulation)은 암들의 경과와 관련이 있다.
- [0004] c-Met의 부적절한 (inappropriate) 활성화에 의해 유발되는 비정상적 신호 전달 (aberrant signalling)은 인간 암들에서 관찰되는 가장 흔한 이상 중 하나이고, 종양 생성 (tumorigenesis) 및 전이 (metastasis)에 결정적인 역할을 한다 [Birchmeier et al., Nat. Mol. Cell Biol. 2003, 4:915-925; L. Trusolino and Comoglio P.M., Nat. Rev. Cancer, 2002, 2(4):289-300].
- [0005] 부적절한 c-Met 활성화가 c-Met의 과다 발현 (overexpression) 및/또는 타가 (paracrine) 또는 자가 (autocrine) 활성화를 포함하는 리간드-의존성 및 비의존성 기작들에 의해 또는 기능 돌연변이 (function mutation)의 획득을 통해 유발될 수 있다 [J.G. Christensen, Burrows J. and Salgia R., Cancer Letters, 2005, 226:1-26]. 그러나, c-Met 수용체의 올리고머화 (oligomerization)는, 리간드가 있거나 또는 없는 경우, ATP 및 타이로신-포함하는 펩타이드 기질들에 대한 키나제의 결합 친화도 (binding affinity) 및 결합 역학 (binding kinetics)을 조절하는 데 필요하다 [Hays JL, Watowich SJ, Biochemistry, 2004 Aug 17, 43: 10570-8]. 활성화된 c-Met은 세포질 도메인 (cytoplasm domain)에 위치하는 다중도킹 부위 (multidocking site)에 신호전달 효과기 (signalling effector)들을 채용하여, Ras-MAPK, PI3K, Src 및 Stat3를 포함하는 수 개의 중요한 신호전달 경로들의 활성화를 유발한다 [Gao CF, Vande Woude GF, Cell Res. 2005, 15(1):49-51; Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, Oncogene, 2000,19(49):5582-9]. 이들 경로들은 종양 세포 증식, 침습 (invasion) 및 혈관형성 그리고 회피성 세포사멸 (evading apoptosis)에 필수적이다 [Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, Oncogene, 2000, 19(49): 5582-9; Gu H, Neel BG, Trends Cell Biol. 2003 Mar 13(3):122-30; Fan S, Ma YX, Wang JA, Yuan RQ, Meng Q, Cao Y, Laterra JJ, Goldberg ID, Rosen EM, Oncogene, 2000 Apr 27, 19(18):2212-23]. 또한, 다른 RTK에 상대적인 c-Met 신호전달의 독특한 면은 $\alpha 6\beta 4$ 인테그린 (integrin)들 [Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM, Cell, 2001, 107:643-54], CD44v6 [Van der Voort R, Taher TE, Weilenga VJ, Spaargaren M, Prevo R, Smit L, David G, Hartmann G, Gherardi E, Pals ST, J. Biol. Chem.1999, 274(10):6499-506], 플렉신 B1 (plexin B1) 또는 세마포린 (semaphorin)들 [Giordano S, Corso S,

Conrotto P, Artigiani S, Gilestro G, Barberis D, Tamagnone L, Comoglio PM, Nat Cell Biol. 2002, 4(9):720-4; Conrotto P, Valdembrì D, Corso S, Serini G, Tamagnone L, Comoglio PM, Bussilino F, Giordano S, Blood, 2005, 105(11):4321-9; Conrotto P, Corso S, Gamberini S, Comoglio PM, Giordano S, Oncogene, 2004, 23:5131-7]과 같은 병소 부착 복합체 (focal adhesion complex) 들 및 비-키나제 결합 파트너 들과의 알려져 있는 상호작용이다. 이것은 더 나아가 이 수용체에 의한 세포 기능의 조절에서 복잡미묘한 점을 추가로 부여시킬 수 있다. 마지막으로, 최근 데이터는 EGFR 및 c-Met 양쪽에 표적하는 화합물의 조합은 상당한 장점이 될 수 있다고 제시하면서, c-Met 이 제피티닙 (gefitinib) 또는 에르로티닙 (erlotinib)에 대한 중양 저항성에 관여하는 것을 기술한다 [Engelman JA et al., Science, 2007, 316:1039-43].

[0006] 지난 몇 년 동안, 많은 서로 다른 전략들이 암 세포주들에서 c-Met 신호전달 (c-Met signalling)을 지연시키기 위해 개발되어 왔다. 이들 전략에는 i) c-Met 또는 HGF/SF [Cao B, Su Y, Oskarsson M, Zhao P, Kort EJ, Fisher RJ, Wang LM, Vande Woude GF, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001, 98(13):7443-8; Martens T, Schmidt NO, Eckerich C, Fillbrandt R, Merchant M, Schwall R, Westphal M, Lamszus K, Clin. Cancer Res. 2006, 12(20):6144-52]에 대한 중화 항체들의 사용 또는 c-Met에 결합하는 리간드 [Kuba K, Matsumoto K, Data K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T, Cancer Res., 2000, 60:6737-43]를 방해하는 HGF/SF 길항제 (antagonist) NK4의 사용, ii) 키나제 활성을 방해하는 c-Met에 대한 작은 ATP 결합 부위 저해제들 [Christensen JG, Schreck R, Burrows J, Kuruganti P, Chan E, Le P, Chen J, Wang X, Ruslim L, Blake R, Lipson KE, Ramphal J, Do S, Cui JJ, Cherrington JM, Mendel DB, Cancer Res. 2003, 63:7345-55], iii) 수용체 또는 리간드 발현을 감소시키는 다중도킹 부위 및 RNAi 또는 리보자임에 대한 접근을 방해하는 조작된 SH2 도메인 폴리펩타이드가 포함된다. 이들 접근법의 대부분은 중양 억제제를 유도하는 c-Met의 선택적인 억제제를 나타내고, c-Met이 암의 치료에 개입되는 것이 유리하다는 것을 보여준다.

[0007] c-Met 표적화 (c-Met targeting)를 위해 생산된 분자들 중에서 일부는 항체들이다.

[0008] 제넨테크사 [WO96/38557]에서 생산된 항-c-Met 5D5 항체가 가장 많이 기술되어 있다. 이는 다양한 모델들에서 단독으로 첨가될 때도 강력한 작동제 (agonist)로서 작용하고, Fab 단편으로 사용될 때는 길항제 (antagonist)로서 작용한다. 하나의 팔을 가진 (one armed) 5D5 (OA5D5)로 기재되고 있고 대장균에서 재조합 단백질 형태로 생산되는 이 항체의 단가 조작된 (monovalent engineered) 형태도 역시 제넨테크사가 제출한 특허 출원 [WO2006/015371]의 주제이다. 그러나, 이 분자는 특정한 스캐폴드 (scaffold) 때문에 항체로는 생각될 수 없지만, 인간에게 면역원성을 가질 수 있는 돌연변이들을 보여준다. 활성의 측면에서, 이 당화되지 않은 분자 (unglycosylated molecule)는 효과기 기능들이 결핍되어 있다. 결과적으로, OA5D5가 c-Met의 이중합을 억제하는 것을 명확한 데이터로 보여주지는 못한다. 더욱이, 생체내 (in vivo) 모델에서 G55로 테스트한 경우, 신경교 아세포종 (glioblastoma) 세포주가 c-Met은 발현하지만 HGF mRNA 단백질은 발현하지 못하고 하나의 팔을 가진 항-c-Met 리간드와 독립적으로 성장하여, G55 중양 성장에 중요한 영향을 미치지 못한다. 또한, OA5D5가 주로 HGF 결합을 블로킹하여 작용하고 HGF와 독립적으로 활성화된 중양들을 표적할 수 없는 것을 제시해준다 [Martens T. et al., Clin. Cancer Res., 2006, 12(20):6144-6152].

[0009] c-Met을 표적하는 또 다른 항체로는 “암도적으로 c-Met 길항제로 또한 일부의 사례에서 c-Met 작동제로서” 작용하는 항체를 파이저사 (Pfizer)가 기술하고 있다 [WO2005/016382]. 파이저사 항체는 c-Met 이중합에 미치는 효과가 해당 출원서에 데이터로 전혀 나타나 있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 혁신적인 측면은 본질적인 작동제 활성 (intrinsic agonist activity)이 없는 c-Met 이중합을 저해하는 마우스 모노클론 항체를 생산한 것이다. 리간드-의존성 중양들을 표적하는 것과 더불어, 이 접근법은 또한 신호전달을 위한 올리고머화에 대해 여전히 의존적인 세포내 도메인들의 과다 발현 또는 돌연변이들로 인해 c-Met의 리간드-비의존성 활성화를 손상시킬 수 있다. 이러한 항체들의 활성의 또 다른 측면은 c-Met 기능들의 손상을 유발할 수 있는 파트너들과 c-Met 상호반응에 대항하는 입체적 장애 (steric hindrance)일 수 있다. 이들 항체들은 c-Met 수용체의 특이 방해와 연관된 기능들과 더불어 ADCC 및 CDC와 같은 효과기 기능들을 가지도록 인간 IgG1로 인간화되거나 바람직하게 조작될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0011] 놀랍게도, 맨 처음에, 본 발명자들은 c-Met에 부착하면서 c-Met 이중합도 저해할 수 있는 항체를 생산하였다. 이것이 선행 기술에서 진실이라면, c-Met의 이중합을 그의 파트너들을 사용하여 저해할 수 있는 항체가 흥미로

운 것이라고 제시하는 것이다. 이렇게 작용할 수 있는 항체는 전혀 기재되어 있지 않거나 명확히 제시되지 못했다. 게다가, 항체 특이성 (antibody specificity)과 관련하여, 이러한 활성 항체의 생산에 성공하는 것은 전혀 예측할 수 없었다.

과제의 해결 수단

- [0012] 첫 번째 측면에서, 본 발명의 주제는 본 발명에 따른 항체들의 생산 및 선별 방법이다.
- [0013] 보다 상세하게는, 본 발명은
- [0014] (i) 생성된 항체들을 검색하여 c-Met에 특이적으로 결합할 수 있는 항체들을 선별하고;
- [0015] (ii) 단계 (i)의 선별된 항체들을 생체외 (in vitro) 평가하여 적어도 하나의 종양 타입에 대해 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%, 70% 또는 80%의 종양 세포 증식을 저해할 수 있는 항체들을 선별한 다음;
- [0016] (iii) 단계 (ii)의 선별된 항체들을 시험하여 c-Met 이중합을 저해할 수 있는 항체들을 선택하는;
- [0017] 단계들로 이루어지는 것을 특징으로 하는 항 c-Met 항체, 또는 c-Met의 리간드-의존성 및 리간드-비의존성 활성화 모두 저해할 수 있는 기능적 단편들 (divalent fragments) 또는 유도체들의 하나를 선별하는 방법에 관한 것이다.
- [0018] 앞서 설명한 바와 같이, c-Met 이중합의 저해는 이러한 항체들이 더 큰 환자들 집단에게 진정한 이익을 줄 수 있기 때문에 본 발명의 주요한 측면이다. 본 발명 이전에 있던 사례와 같이 리간드-의존성 활성화된 c-Met 암뿐만 아니라 리간드-비의존성 활성화된 c-Met 암은 본 발명의 방법에 의해 생산된 항체들을 사용하여 치료될 수 있다.
- [0019] 항체의 생산은 당업자라면 숙지하고 있는 어떤 방법에 의해서라도, 예를 들어 면역화된 마우스 또는 선택된 마이엘로마 세포들에 적합한 (compatible) 다른 종으로부터 나온 비장세포들과 마이엘로마 세포 (myeloma cell)를 융합하여 구현될 수 있다 [Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497]. 면역화된 동물들은 바로 인간 항체들을 생산하는 인간 면역글로불린 유전자좌를 가진 형질전환된 마우스를 포함할 수 있다. 또 다른 가능한 구현에는 파지 디스플레이 기술 (phage display technique)들을 사용하여 라이브러리들을 검색하는 것을 포함한다.
- [0020] 단계 i) 검색은 당업자라면 잘 숙지하고 있는 어떤 방법 또는 과정에 의해서라도 구현될 수 있다. 제한되지 않는 (non limitative) 예들로서, ELISA, BIAcore, 면역조직화학 (immunohistochemistry), FACS 분석법 및 기능적 검색 (functional screen)들을 들 수 있다. 바람직한 방법은 c-Met 재조합 단백질을 ELISA에 의해 검색하고, 그 다음은 적어도 하나의 종양 세포주를 FACS 분석법으로 검색하여 생산된 항체들이 종양 세포주 상의 본래 수용체 (native receptor)도 인식할 수 있는지 확인하는 것이다. 이 방법은 하기 실시예들에서 보다 상세하게 기술될 것이다.
- [0021] 동일한 방식으로, 단계 ii)도 역시 잘 알려진 방법 또는 과정에 의해, 예를 들어 3H-티미딘 또는 기타 DNA 염색제, MTT, ATP 측정 등을 사용하여 고전적으로 구현될 수 있다. 본 발명에서 바람직한 종양세포 모델은 BxPC3 모델을 들 수 있다.
- [0022] c-Met 이중합의 억제제는 바람직하게 c-Met 호모이중합 (homodimerization)으로 이해되어야 한다.
- [0023] 본 발명의 선택 방법의 단계 iii)의 바람직한 구현예에서, 단계 (iii)은 c-Met-RLuc/c-Met-YFP 모두를 발현하는 세포들에서 BRET 분석법에 의해 항체들을 평가하여, BRET 신호의 적어도 30%, 바람직하게는 35%, 40%, 45%, 50%, 55% 및 가장 바람직하게는 60%를 저해할 수 있는 항체들을 선별하는 과정으로 이루어진다.
- [0024] BRET 기술은 단백질 이중합의 대표적인 기술로 알려져 있는 것이다 [Angers et al., PNAS, 2000, 97:3684-89].
- [0025] 상기 방법의 단계 iii)에서 사용되는 BRET 기술은 당업자라면 잘 숙지하고 있고 하기 실시예들에서 상세히 기술될 것이다. 보다 상세하게는, BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)은 생물발광 공여자 (레닐라루시페라제 (RLuc))와 형광 수여자, GFP (green fluorescent protein) 또는 YFP (yellow fluorescent protein)의 돌연변이체 간에 일어나는 비-방사성 에너지 전이이다. 본 실시예에서는 EYFP (enhanced yellow fluorescent protein)를 사용하였다. 전이의 효능 (efficacy of transfer)은 공여자와 수여자 간의 방향 (orientation)과 거리에 의존한다. 또한, 에너지 전이는 두 개 분자들이 매우 근접하는 경우 (1-10 nm)에만 일어날 수 있다. 이 특성은 단백질-단백질 상호작용 분석법을 개발하는 데 사용된다. 따라서, 두 개 파트너들 간

상호반응을 연구하기 위해, 첫 번째 것은 레닐라 루시퍼라제 (renilla luciferase)에 유전적으로 융합되고 두 번째 것은 GFP 돌연변이에 융합된다. 융합 단백질들은 반드시는 아니더라도 포유동물 세포들에서 유전적으로 발현된다. 막 투과성 기질 (실렌터라진 (coelenterazine))이 존재하는 경우, Rluc은 푸른색 빛을 발산한다. GFP 돌연변이가 Rluc로부터 10 nm 보다 더 근접하는 경우, 에너지 전이가 일어날 수 있고 추가적인 노란색 신호가 감지될 수 있다. BRET 신호는 수여자에 의해 발산되는 빛과 공여자에 의해 발산되는 빛 간의 비율로 측정된다. 따라서 BRET 신호는 두 개의 융합 단백질들이 근접하거나 구조적인 (conformational) 변화가 Rluc와 GFP 돌연변이를 보다 근접시킬수록 증가한다.

[0026] BRET 분석법이 바람직한 구현예가 되는 경우, 당업자라면 잘 숙지하고 있는 어떤 방법이라도 c-Met 이중합을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 이에 제한되지는 않지만, 하기 기술들: FRET (fluorescence resonance energy transfer), HTRF (homologous time resolved fluorescence), FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy) 또는 SW-FCCS (single wavelength fluorescence cross-correction spectroscopy)을 들 수 있다.

[0027] 또한, Co-면역침전, 알파 검색 (alpha screen), 화학적 교차-연결 (chemical cross-linking), 더블-하이브리드 (double-hybrid), 친화 크로마토그래피 (affinity chromatography), ELISA 또는 파 웨스턴 블롯 (Far western blot)과 같은 다른 고전적인 기술들도 사용될 수 있다.

[0028] 두 번째 측면에서, 본 발명의 주제는 상기 방법에 의해 얻어질 수 있는 분리된 항체 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나이다. 상기 항체 또는 그의 상기 단편들 또는 유도체들의 하나는 인간 c-Met에 특이적으로 결합할 수 있고, 또한 필요한 경우 바람직하게는 리간드 HGF의 자연적인 부착을 특이적으로 저해할 수 있고/있거나 상기 c-Met의 타이로신 키나제 활성을 특이적으로 저해할 수 있고, 상기 항체들도 역시 c-Met 이중합을 저해할 수 있다. 보다 상세하게, 상기 항체들은 리간드-의존성 및 리간드-비의존성 c-Met 활성화를 저해할 수 있을 것이다.

[0029] "기능적 단편들 또는 유도체들"이라는 표현은 하기 본 명세서에서 상세히 정의될 것이다.

[0030] 발명은 자연 상태 (natural form)의 항체들에 관한 것은 아니라고 이해되어야 한다. 다시 말하면, 이것은 자연 환경에 존재하지 않지만 자연적인 출처들로부터 분리되거나 순수 분리 (purification)에 의해 얻어지거나 그 외 유전적 재조합 (genetic recombination), 또는 화학적 합성 (chemical synthesis)에 의해 획득될 수 있었고, 또한 하기에 기술될 바와 같이 비자연적인 아미노산 (unnatural amino acids)들을 포함할 수 있다고 이해되어야 한다.

[0031] 보다 상세하게는, 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 항체가 서열번호 1 내지 17 및 56 내지 61의 아미노산 서열들로 이루어진 상보적 결정 부위 CDRs (complementary determining region)로부터 선택된 적어도 하나의 CDR로 이루어진 것을 특징으로 하는 항체 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나가 청구된다.

[0032] 서열이 서열번호 1 내지 17 및 56 내지 61의 서열들로의 최적의 정렬 (optimum alignment)에 따라 80% 일치도 (identity), 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 일치도를 가지는 적어도 하나의 CDR를 가지는 항체 또는 단편들 또는 유도체들이라면 동등한 것으로 이해되어야 하고, 결론적으로, 본 발명의 일부분으로 이해되어야 한다.

[0033] CDR 부위들 또는 CDR(s)은 IMGT에 의해 정의되는 바와 같이, 면역글로불린들의 중사슬 (heavy chain) 및 경사슬 (light chain)의 과다 가변 부위 (hypervariable region)들을 나타내려고 한다.

[0034] IMGT의 독특한 번호법 (numbering)은 항원 수용체, 사슬 타입 또는 종이 무엇이든지 가변 도메인 (variable domain)들을 비교하기 위해 정의되었다 [Lefranc M-P., Immunology Today 18, 509 (1997)/ Lefranc M-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999)/ Lefranc, M-P., Pommie, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. IMGT의 독특한 번호법에서, 보존되는 아미노산들은 항상 동일한 위치 (position), 예를 들어 시스테인 23 (1st-CYS), 트립토판 41 (보존되는-TRP), 소수성 아미노산 89, 시스테인 104 (2nd-CYS), 페닐알라닌 또는 트립토판 118 (J-PHE 또는 J-TRP)를 유지한다. IMGT 독특한 번호법은 구조틀 부위 (framework region)들 (FRI-IMGT: 1 내지 26 위치들, FR2-IMGT: 39 내지 55, FR3-IMGT: 66 내지 104 및 FR4-IMGT: 118 내지 128) 및 상보성 결정 부위 (complementarity determining region)들 (CDR1-IMGT: 27 내지 38, CDR2-IMGT: 56 내지 65 및 CDR3-IMGT: 105 내지 117)의 표준화된 경계를 제공한다. 간격 (gap)들은 채워지지 않은 위치들을 나타내기 때문에, CDR-IMGT 길 이들은 중요한 정보가 된다 (칸 (bracket)들 사이에 있고 점 (dot)들로 분리됨. 예로 [8.8.13]). IMGT 독특한 번호법은 IMGT 콜리어 드 펄스 (IMGT Collier de Perles)라고 칭하는 2차원 (2D) 그래픽 표현 (representation)들 [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and

Lefranc, M.-P., *Current Bioinformatics*, 2, 21-30 (2007)]에 사용되고 또한 IMGT/3D 구조-DB 에 있는 3차원 (3D) 구조에 사용된다 [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data, *Nucl. Acids Res.*, 32, D208-D210 (2004)].

- [0035] 3개의 중사슬 CDSs 및 3개의 경사슬 CDSs가 존재한다. CDR 또는 CDRs 라는 용어는 여기서 각 사례에 따라 이들 부위들의 하나 또는 항원에 대한 항체 또는 그들이 인지하는 에피토프의 친화성에 의해 결합할 수 있는 아미노산 잔기들 대부분을 포함하는 이들 부위들의 수 개 또는 전부를 나타내기 위해 사용된다.
- [0036] 본 발명의 용어에서 핵산 또는 아미노산 서열들 간의 "일치도 퍼센트 (percentage of identity)"는 비교되는 두 개 서열들 간에 일치하는 뉴클레오타이드들 또는 아미노산 잔기들의 퍼센트를 나타내려는 것이다. 이것은 최상의 정렬 (최적의 정렬)에서 획득되고 이 비율은 전적으로 통계적이며, 두 개 서열들 간의 차이는 무작위로 또한 전체 길이를 통해 존재하게 된다. 두 개 핵산 또는 아미노산 서열들 간의 서열들의 비교는 전통적으로 이들을 최적의 방식으로 정렬한 후에 이들 서열들을 비교하여 시행되고, 상기 비교는 부분 (segment)으로 또는 비교 창 (comparison window)에 의해 시행될 수 있다. 비교를 위한 서열들의 최적의 정렬은 수동적으로 뿐만 아니라 스미스 및 워터만 (1981)의 국소 상동성 알고리즘 (local homology algorithm)이라는 수단 [Smith and Waterman, *Ad. App. Math.* 2:482], 니들만 및 운쉬 (1970)의 국소 상동성 알고리즘 [Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443], 피어슨 및 립만 (1998)의 유사성 조사법 (similarity search method)[Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444], 이들 알고리즘들을 이용하는 컴퓨터 소프트웨어 수단에 의해 (위스콘신 유전학 소프트웨어 패키지에서의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA, 유전학 컴퓨터 그룹, 575 Science Dr., 매디슨, WI, 또는 그 외 BLAST N 또는 BLAST P 비교 소프트웨어에 의해) 수행될 수 있다.
- [0037] 두 개 핵산 또는 아미노산 서열들 간의 일치도 퍼센트는 최적의 방식으로 정렬된 두 개 서열들을 비교하여 결정되고, 여기서 비교되는 핵산 또는 아미노산 서열들은 이들 두 서열들 간 최적의 정렬을 가진 기준 서열 (reference sequence)과 비교하여 부가 (addition)들 또는 결실 (deletion)들을 포함한다. 일치도 퍼센트는 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기가 두 서열들 간에 일치하는 일치 부위 (identical position)들의 수를 결정하고, 일치 부위들의 수를 비교 창에서 전체 부위들의 수로 나누며 또한 이들 두 서열들 간의 일치도 퍼센트를 얻기 위해 결과를 100으로 환산하여 계산된다.
- [0038] 예를 들어, BLAST 프로그램, "BLAST 2 서열들 (BLAST 2 sequences)"을 사용하는 것이 가능하다 (Tasusova et al., *BLAST 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences*, *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-250). 이는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, 사이트에서 사용 가능하고, 사용되는 매개변수 (parameter)들은 디폴트에 의해 주어지고 (구체적으로, 오픈 갭 벌점 (open gap penalty) 매개변수들: 5, 및 연장 갭 벌점 (extension gap penalty): 2; 예를 들어 선택된 매트릭스는 프로그램에 의해 제안된 블로섬 62 (BLOSUM 62) 매트릭스이다), 비교되는 두 서열들 간 일치도 퍼센트는 프로그램에 의해 직접적으로 계산된다.
- [0039] 적어도 80%, 90% 95% 및 98% 일치도를 가지는 아미노산 서열은 기준 서열에 대하여 어떤 변형 (modification)들, 구체적으로 적어도 하나의 아미노산의 결실 (deletion), 부가 (addition) 또는 치환 (substitution), 삭제 (truncation) 또는 연장 (elongation)을 가지는 것이 바람직하다. 하나 이상의 연속된 (consecutive) 또는 비연속된 (nonconsecutive) 아미노산(들) 치환의 경우, 치환된 아미노산들이 동등한 (equivalent) 아미노산들로 바뀌는 것이 바람직하다. 여기 동등한 아미노산들이라는 표현은 해당되는 항체 (corresponding antibody)들의 생물학적 활성들을 필수적으로 변형 (essentially modifying)시키지는 않는 염기 구조를 가지는 아미노산들 중 하나로 치환될 수 있는 아미노산 모두를 표시하려는 것이고, 구체적으로 하기 실시예들에서 정의될 것이다. 이들 동등한 아미노산들은 그들이 대체되는 아미노산들과 구조적 상동성에 의존하거나 서로 다른 항체들 간의 생물학적 활성의 비교 시험들의 결과에 의존하여 결정될 수 있다.
- [0040] 실시예에 의하여, 해당되는 변형된 항체는 생물학적 활성이 심각하게 변형되지 않고도 치환될 수 있는 치환 가능성이 언급된다.
- [0041] 이에 한정되지 않는 실시예로서, 하기 표 1은 변형된 항체의 생물학적 활성이 보존 (conservation)될 것으로 예상되는 치환 가능성들을 제시한다. 또한 역치환 (reverse substitution)들도 물론 동일한 조건들 하에서 가능하다.

표 1

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

[0042]

[0043]

여기서 본 발명은 자연 상태 (natural form)의 항체들에 관한 것은 아니라고 이해되어야 한다. 다시 말하면, 이것은 자연 환경에 존재하지 않지만 자연적 출처들로부터 분리되거나 순수 분리에 의해 획득되거나 그 외 유전적 재조합, 또는 화학적 합성에 의해 획득될 수 있고, 또한 하기에 기술될 바와 같이 비자연적인 아미노산들을 포함할 수 있다고 이해되어야 한다.

[0044]

첫 번째 접근법에 따라, 항체는 그의 중사슬 서열에 의해 정의될 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나는 서열번호 1 내지 9 및 56 내지 58의 아미노산 서열들로 이루어진 상보적 결정 부위 CDRs로부터 선택된 적어도 하나의 CDR로 이루어진 중사슬로 이루어진 것을 특징으로 한다.

[0045]

언급된 서열들은 하기와 같다:

[0046]

서열번호 1: **GYIFTAYT**

[0047]

서열번호 2: **IKPNNGLA**

[0048]

서열번호 3: **ARSEITTEFDY**

[0049]

서열번호 4: **GYSFIDYT**

[0050]

서열번호 5: **INPYNGGT**

[0051]

서열번호 6: **AREEITKDFDF**

[0052]

서열번호 7: **GYTFIDYN**

[0053]

서열번호 8: **INPNNGGT**

[0054]

서열번호 9: **ARGRYVGYYYAMDY**

[0055]

서열번호 56: **GYTFTSYW**

[0056]

서열번호 57: **INPTTGST**

[0057]

서열번호 58: **AIGGYGSWFAY**

[0058]

중사슬의 CDRs는 상기 기술된 서열들, 예로 서열번호 1 내지 9 및 56 내지 58 에서 무작위로 선택될 수 있다.

[0059]

바람직한 측면에 따라, 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나는 CDR-H1, CDR-H2 및

CDR-H3로부터 선택된 적어도 하나의 CDR로 이루어진 중사슬로 이루어지고:

- [0060] CDR-H1은 서열번호 1, 4, 7 또는 56의 아미노산 서열들로 이루지고, CDR-H2는 서열번호 2, 5, 8 또는 57의 아미노산 서열들로 이루어지며, CDR-H3은 서열번호 3, 6, 9 또는 58의 아미노산 서열들로 이루어진다.
- [0061] 상기 측면의 첫 번째 구현예에 따라, 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3로 이루어진 중사슬로 이루어지고:
- [0062] CDR-H1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루지고, CDR-H2는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지며, CDR-H3은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0063] 보다 상세하게는, 본 발명의 첫 번째 구현예에 따라 상기 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어진 서열의 중사슬로 이루어진다
- [0064] 서열번호 18:
**SEQ ID No. 18: EVQIQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYIFTAYTMHWVRQSLG
ESLDWIGGIKPNNGLANYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMDLRSLSLSEDSAVVY
CARSEITTEFDYWGQGTALTVSS**
- [0065] 상기 측면의 두 번째 구현예에 따라, 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3로 이루어진 중사슬로 이루어지고:
- [0067] CDR-H1은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루지고, CDR-H2는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지며, CDR-H3은 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0068] 상기 두 번째 구현예에 따라, 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어진 서열의 중사슬로 이루어진 것이 바람직할 것이다.
- [0069] 서열번호 19:
**SEQ ID No. 19: EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTDYTLNWVKQSH
GKLTLEWIGLINPYNGGTITYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLSEDSAVY
YCAREEITKDFDFWGQGTTLTVSS**
- [0070] 상기 측면의 세 번째 구현예에 따라, 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3로 이루어진 중사슬로 이루어지고:
- [0072] CDR-H1은 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루지고, CDR-H2는 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어지며, CDR-H3는 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0073] 상기 세 번째 구현예에 따라, 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어진 서열의 중사슬로 이루어진 것이 바람직할 것이다.
- [0074] 서열번호 20:
**SEQ ID No. 20: EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFDYNMDWVKQSH
GMSLEWIGDINPNNGGTIFNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLSLSEDTAVVY
CARGRYVGYYYAMDYWGQGTSVTVSS**
- [0075] 상기 측면의 네 번째 구현예에 따라, 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3로 이루어진 중사슬로 이루어지고:
- [0077] CDR-H1은 서열번호 56의 아미노산 서열로 이루지고, CDR-H2는 서열번호 57의 아미노산 서열로 이루어지며, CDR-H3은 서열번호 58의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0078] 상기 네 번째 구현예에 따라, 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 서열번호 62의 아미노산 서열로 이루어진 서열의 중사슬로 이루어진 것이 바람직할 것이다.

- [0079] 서열번호 62:
**QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPQGLEWIGYI
 NPPTTGSTDYNNQKLKDKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVVYCAIGGYGSW
 FAYWGQGTLVTVSA**
- [0080]
- [0081] 두 번째 접근법에서, 항체는 지금 경사슬 서열에 의해 정의될 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명의 두 번째 상세한 측면에 따라, 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 서열번호 10 내지 17 및 59 내지 61의 아미노산 서열들로 이루어진 상보적 결정 부위 CDRs로부터 선택된 적어도 하나의 CDR로 이루어진 경사슬(light chain)로 이루어진 것을 특징으로 한다.
- [0082] 언급된 서열들은 하기와 같다:
- [0083] 서열번호 10: **ESVDSYANSF**
- [0084] 서열번호 11: **RAS**
- [0086] *서열번호 12: **QQSKEDPLT**
- [0087] 서열번호 13: **ESIDTYGNSF**
- [0088] 서열번호 14: **QQSNEDPFT**
- [0089] 서열번호 15: **ENIYSN**
- [0090] 서열번호 16: **AAT**
- [0091] 서열번호 17: **QHEWGPPLYT**
- [0092] 서열번호 59: **SSVSSTY**
- [0093] 서열번호 60: **ITS**
- [0094] 서열번호 61: **HQWSSYPFT**
- [0095] 경사슬의 CDRs는 상기 기술된 서열들, 예로 서열번호 10 내지 17 및 59 내지 61에서 무작위로 선택될 수 있다.
- [0096] 또 다른 바람직한 측면에 따라, 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로부터 선택된 적어도 하나의 CDR로 이루어진 경사슬로 이루어지고:
- [0097] CDR-L1은 서열번호 10, 13, 15 또는 59의 아미노산 서열들로 이루지고, CDR-L2는 서열번호 11, 16 또는 60의 아미노산 서열들로 이루어지며, CDR-L3는 서열번호 12, 14, 17 또는 61의 아미노산 서열들로 이루어진다.
- [0098] 상기 또 다른 측면의 첫 번째 구현예에 따라, 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로 이루어진 경사슬로 이루어지고:
- [0099] CDR-L1은 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루지고, CDR-L2는 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어지며, CDR-L3은 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0100] 보다 상세하게는, 상기 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 이 첫 번째 구현예에 따라 서열번호 21의 아미노산 서열로 이루어진 서열의 경사슬로 이루어진다.
- [0101] 서열번호 21:
**SEQ ID No. 21: DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYANSFMHWYQQ
 KPGQPPKLLIYRASNLGIPARFSGSGSRDTFTLTINPVEADDVATYYCQQSKE
 DPLTFGSGTKLEMK**
- [0102]
- [0103] 상기 또 다른 측면의 두 번째 구현예에 따라, 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,

나,는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로 이루어진 경사슬로 이루어지고:

- [0104] CDR-L1은 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루지고, CDR-L2는 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어지며, CDR-L3은 서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0105] 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 상기 두 번째 구현예에 따라, 서열번호 22의 아미노산 서열로 이루어진 서열의 경사슬로 이루어지는 것이 바람직할 것이다.
- [0106] 서열번호 22:
**SEQ ID No. 22: GIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRVSESIDTYGNSFIHWYQQKP
 GQPPKLLIYRASNI.FSGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDSATYYCQQSNEDPF
 TFGSGTKLEMK**
- [0107] **TFGSGTKLEMK**
- [0108] 상기 또 다른 측면의 세 번째 구현예에 따라, 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로 이루어진 경사슬로 이루어지고:
- [0109] CDR-L1은 서열번호 15의 아미노산 서열로 이루지고, CDR-L2는 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어지며, CDR-L3는 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0110] 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 상기 세 번째 구현예에 따라, 서열번호 23의 아미노산 서열로 이루어진 서열의 경사슬로 이루어지는 것이 바람직할 것이다.
- [0111] 서열번호 23:
**SEQ ID No. 23: DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWYQQKQKSP
 QLLVYAAATNLVDGVPSPRFSGSGSGTQYSLKINLSQSEDFGSVYCFHWGPPYTF
 GGGTKLEIK**
- [0112] **GGGTKLEIK**
- [0113] 상기 또 다른 측면의 네 번째 구현예에 따라, 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로 이루어진 경사슬로 이루어지고:
- [0114] CDR-L1은 서열번호 59의 아미노산 서열로 이루지고, CDR-L2는 서열번호 60의 아미노산 서열로 이루어지며, CDR-L3는 서열번호 61의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0115] 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 상기 세 번째 구현예에 따라, 서열번호 63의 아미노산 서열로 이루어진 서열의 경사슬로 이루어지는 것이 바람직할 것이다.
- [0116] 서열번호 63:
**QIVLTQSPAIMASAPGKVTLTCSASSSVSSTYLYWYQQKPGSSPKLWIYTTTSL
 ASGVPARFSGSGSGTYSYSLTISMETEDAASYFCHQWSSYPFTFGSGTKJ.DIK**
- [0117] **ASGVPARFSGSGSGTYSYSLTISMETEDAASYFCHQWSSYPFTFGSGTKJ.DIK**
- [0118] 세 번째 접근법에 따라, 항체는 지금 그의 경사슬 서열 및 그의 중사슬 서열 모두에 의해 정의될 것이다. 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 서열번호 18, 19, 20 또는 62의 아미노산 서열로 이루어진 중사슬 및 서열번호 21, 22, 23 또는 63의 아미노산 서열로 이루어진 경사슬로 구성되는 것을 특징으로 한다.
- [0119] 보다 상세하게는, 본 발명에 따라 바람직한 항체, 또는 그의 기능적 2가 단편들 또는 유도체들의 하나,는 224G11이라고 명명되고, 각각 서열번호 1, 2 및 3의 아미노산 서열을 가지는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3로 이루어진 중사슬; 및 각각 서열번호 10, 11 및 12의 아미노산 서열을 가지는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로 이루어진 경사슬로 구성된다.
- [0120] 또 다른 측면에서, 항체 224G11은 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어진 중사슬 및 서열번호 21의 아미노산 서열로 이루어진 경사슬로 구성된다.
- [0121] 본 발명에 따라 또 다른 바람직한 항체, 또는 그의 기능적 2가 단편들 또는 유도체들의 하나,는 227H1이라고 명명되고, 각각 서열번호 4, 5 및 6의 아미노산 서열을 가지는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3로 이루어진 중사슬; 및 각각 서열번호 13, 11 및 14의 아미노산 서열을 가지는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로 이루어진 경사슬로 구성된다.

- [0122] 또 다른 측면에서, 항체 227H1은 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어진 중사슬 및 서열번호 22의 아미노산 서열로 이루어진 경사슬로 구성된다.
- [0123] 보다 또 다른 바람직한 항체, 또는 그의 기능적 2가 단편들 또는 유도체들의 하나,는 223C4라고 명명되고, 각각 서열번호 7, 8 및 9의 아미노산 서열을 가지는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3로 이루어진 중사슬; 및 각각 서열번호 15, 16 및 17의 아미노산 서열을 가지는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로 이루어진 경사슬로 구성된다.
- [0124] 또 다른 측면에서, 항체 223C4는 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어진 중사슬 및 서열번호 23의 아미노산 서열로 이루어진 경사슬로 구성된다.
- [0125] 또 다른 측면에서, 항체 224G11은 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어진 중사슬 및 서열번호 21의 아미노산 서열로 이루어진 경사슬로 구성된다.
- [0126] 보다 또 다른 바람직한 항체, 또는 그의 기능적 2가 단편들 또는 유도체들의 하나,는 11E1이라고 명명되고, 각각 서열번호 56, 57 및 58의 아미노산 서열을 가지는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3로 이루어진 중사슬; 및 각각 서열번호 59, 60 및 61의 아미노산 서열을 가지는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로 이루어진 경사슬로 구성된다.
- [0127] 또 다른 측면에서, 항체 11E1은 서열번호 62의 아미노산 서열로 이루어진 중사슬 및 서열번호 63의 아미노산 서열로 이루어진 경사슬로 구성된다.
- [0128] 또 다른 측면에 따라, 본 발명은 본 발명에 따른 항체를 분비할 수 있는 마우스 하이브리도마 (murine hybridoma), 구체적으로 미생물 배양의 국가기탁기관 (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, National Collection of Microorganism Cultures)) (프랑스 파리 파스퇴르 연구소)에 기탁되어 있는 마우스 기원의 하이브리도마에 관한 것이다.
- [0129] 본 발명에 따른 모노클론 항체들, 또는 그들의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나,는 상기 항체들이 파리 파스퇴르 연구소 CNCM에 2007년 03월 14일자, 수탁번호 제 CNCM I-3731호 (11E1에 해당하는), 제 I-3731호 (224G11에 해당하는), 제 I-3732호 (227H1에 해당하는) 그리고 2007년 07월 06일자, 수탁번호 제 I-3786호 (223C4에 해당하는)로 기탁된 하이브리도마에 의해 분비된 것을 특징으로 한다. 이들 하이브리도마는 면역화된 마우스 비장세포 (splenocyte)들을 마이엘로마 세포주 (Sp20 Ag14)와 세포 융합시킨 마우스 하이브리도마를 포함한다.
- [0130] 하기 표 2는 바람직한 항체들과 관련된 요소 (element)들을 재그룹화 한다.

표 2

	224G11		227H1		223C4		11E1	
	I-3731		I-3732		I-3786		I-3724	
	Prot. SEQ ID	Nucl. SEQ ID	Prot. SEQ ID	Nucl. SEQ ID	Prot. SEQ ID	Nucl. SEQ ID	Prot. SEQ ID	Nucl. SEQ ID
CDR-H1	1	24	4	27	7	30	56	64
CDR-H2	2	25	5	28	8	31	57	65
CDR-H3	3	26	6	29	9	32	58	66
H. chain	18	41	19	42	20	43	62	70
CDR-L1	10	33	13	36	15	38	59	67
CDR-L2	11	34	11	34	16	39	60	68
CDR-L3	12	35	14	37	17	40	61	69
L. chain	21	44	22	45	23	46	63	71

- [0131]
- [0132] 표 2로부터, 227H1 및 224G11 항체들의 CDR-L2는 유사한 것이 분명히 나타난다. 이 예는 기재된 CDR 서열들을 통해 무작위로 선택된 적어도 하나의 CDR로 이루어진 항체들로 이루어진 본 출원서의 청구항들을 확실히 지지한다.
- [0133] 바람직한 구현예에 따라, 본 발명은 모노클론 항체에 관한 것이다.
- [0134] <모노클론 항체 (monoclonal antibody)>라는 용어는 일반적인 의미에 따라 실질적으로 균질한 (substantially homogeneous) 항체들의 집단으로부터 획득되는 항체를 나타내는 데 사용된다. 즉, 이 집단을 이루는 개별 항체

들은 적은 양으로 존재하고 자연적으로 발생될 수 있는 돌연변이들을 제외하고는 동일하다. 다시 말하면, 모노클론 항체는 모노클론 세포 (예로, 하이브리도마 세포들, 균질한 항체를 인코딩하는 DNA로 형질전환된 진핵 숙주세포들, 균질한 항체를 인코딩하는 DNA로 형질전환된 원핵 숙주세포들 등)들의 증식으로부터 유래한 균질한 항체로 구성되고 또한 일반적으로 단일 클래스 (class)와 서브클래스 (subclass)의 중사슬 및 단일 타입의 경사슬들에 의한 특징을 가진다. 모노클론 항체들은 매우 특이적이고 단일 항원에 대해 반응한다 (directed against). 또한, 전형적으로 서로 다른 결정기 (determinant)들 또는 에피토프에 대해 반응하는 서로 다른 항체들을 포함하는 폴리클론 항체들과는 대조적으로, 각 모노클론 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해 반응한다.

[0135] 본 발명의 기재에서, 항체 화합물들에 또는 그들의 서열에 부착하는 폴리펩타이드들, 폴리펩타이드 서열들, 아미노산 서열들, 펩타이드들 및 단백질들이라는 용어들은 상호 교환하여 사용할 수 있다.

[0136] 마찬가지로 상세한 측면에 따라, 본 발명은 조합 항체 (chimeric antibody), 또는 본 발명에 따른 그의 기능적 단편들에 관한 것이고, 상기 항체는 상기에 더하여 마우스와 상이한 (heterologous) 종, 구체적으로 사람의 항체로부터 유래한 경사슬 및 중사슬 불변 부위 (constant region)들을 포함하는 것을 특징으로 한다. 또한 바람직한 방식으로, 인간 항체로부터 유래한 경사슬 및 중사슬 불변 부위들은 각각 경사슬 카파 부위 및 중사슬 감마-1, 감마-2 또는 감마-4 부위에 해당하는 것을 특징으로 한다.

[0137] 본 출원서에서, IgG1이 효과기 기능 (effector function)들을 가지기에 바람직하고, ADCC 및 CDC는 가장 바람직하다.

[0138] 당업자라면 효과기 기능들이, 예를 들어, Clq 결합 (Clq binding); 보체 의존성 세포 독성 (complement dependent cytotoxicity, CDC); Fc 수용체 결합 (Fc receptor binding); 항체-의존성 세포-매개 세포 독성 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC); 식작용 (phagocytosis); 및 세포 표면 수용체들의 감소 조절 (down regulation) (예로, B 세포 수용체 (B cell receptor, BCR))를 포하는 것을 숙지하고 있을 것이다.

[0139] 본 발명에 따른 항체들은 특이 모노클론 항체들, 구체적으로 마우스 (murine), 조합 (chimeric) 또는 인간화 (humanized) 기원의 항체들인 것이 바람직하고, 이것은 당업자라면 잘 숙지하고 있는 표준 방법들에 따라 획득될 수 있다.

[0140] 일반적으로, 모노클론 항체들 또는 그들의 기능적 단편들 또는 유도체들, 특히 마우스 기원의 항체 등을 제조하기 위해서는, 상세하게는 "항체들 (Antibodies)"이라는 매뉴얼 (Harlow and Lane, Antibodies: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988)에 설명되어 있는 기술들 또는 코홀러 및 밀스타인이 기재한 (Kohler and Milstein, Nature, 256:495-497, 1975) 하이브리도마로부터의 제조 기술을 참고하는 것이 가능하다.

[0141] 본 발명에 따른 모노클론 항체들은, 예를 들어 본 발명에 따른 상기 모노클론 항체들에 의해 특이적으로 인지되는 에피토프를 포함하는 c-Met, 또는 그의 단편들의 하나에 대해 면역화된 동물 세포로부터 획득될 수 있다. 상기 c-Met, 또는 그의 상기 단편들의 하나는 일반적인 작동 방법들에 따라, c-Met에 대해 코딩하는 cDNA에 포함되는 핵산 서열로 시작하는 유전자 재조합에 의해 또는 c-Met의 펩타이드 서열을 구성하는 아미노산들의 서열로부터 시작하는 펩타이드 합성에 의해 특별히 생산될 수 있다.

[0142] 본 발명에 따른 모노클론 항체들은, 예를 들어 상기 모노클론 항체에 의해 특이적으로 인지되는 에피토프를 포함하는 c-Met 또는 그의 단편들의 하나가 본 발명에 따라 미리 고정되어 있는 (immobilized) 친화 칼럼을 이용하여 순수 분리될 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 모노클론 항체들은 단백질 A 및/또는 G를 이용한 크로마토그래피에 의해 순수 분리될 수 있다. 이 과정은 DNA 및 LPS 뿐만 아니라 단백질 오염물들을 제거하는 목적을 가진 이온-교환 크로마토그래피 (ion-exchange chromatography)로, 또는 그대로 이중머 (dimer)들 또는 기타 다중머 (multimer)들의 존재로 인한 잠재적인 응집물들을 제거하기 위하여 세파로스 젤을 이용한 배제 크로마토그래피 (exclusion chromatography)로 이어질 수 있다. 훨씬 더 바람직한 방식에서, 이들 기술들은 모두 동시적으로 또는 연속적으로 사용될 수 있다.

[0143] 조합된 또는 인간화된 항체들은 마찬가지로 본 발명에 따른 항체들에 포함된다.

[0144] 조합 항체 (chimeric antibody)는 주어진 종 (예로, 마우스, 말, 토끼, 개, 소, 닭 등)과 상이한 종의 항체 경사슬 및 중사슬 불변 부위들을 조합하여 주어진 종의 항체로부터 유래한 자연적인 가변 (경사슬 및 중사슬) 부위를 포함하는 항체를 나타내려는 것이다.

- [0145] 본 발명에 따른 조합 타입의 항체들 또는 그들의 단편들은 유전적 재조합 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 조합 항체는 특히 본 발명에 따른 마우스 모노클론 항체는 프로모터와 비-인간의 가변 부위를 코딩하는 서열을 포함하는 재조합 DNA를 클로닝하여 생산될 수 있다. 이러한 재조합 유전자에 의해 인코딩되는 본 발명의 조합 항체는, 예를 들어 마우스-인간 키메라(chimera)는 마우스 DNA로부터 유래한 가변 부위에 의해 결정되는 이 항체의 특이성 및 인간 DNA로부터 유래한 불변 부위에 의해 결정되는 그의 이소타입의 특이성을 가질 수 있다. 조합 항체들의 제조 방법을 참고하기 위하여, 예를 들어 베르호인 등 (Verhoeyn et al., BioEssays, 8:74, 1988)의 문헌들, 모리슨 등 (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6851-6855, 1984)의 US 4,816,567 서류를 참고하는 것이 가능하다.
- [0146] 인간화된 항체는 비인간 기원의 항체로부터 유래한 CDR 부위들과 하나 (또는 여러 개)의 인간 항체들로부터 유래한 항체 분자의 다른 부분들을 포함하는 항체를 나타내려는 것이다. 또한, 골격(FR이라고 불리는)의 단편(segment)들의 일부 잔기들은 결합 친화도(affinity of binding)를 보존하기 위해 변형될 수 있다 (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988).
- [0147] 본 발명에 따른 인간화된 항체들 또는 그들의 단편들은 당업자라면 잘 숙지하고 있는 기술들 (예를 들어, Singer et al., J. Immun. 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992; 또는 Bebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992 문헌들에 기술된 기술들과 같은)에 의해 제조될 수 있다.
- [0148] 다른 인간화 방법도 당업자라면 잘 숙지하고 있고, 예를 들어, 단백질 디자인 연구소 (Protein Design Lab., PDL)가 특허출원서들 EP 0451261, EP 0 682 040, EP 0 9127, EP 0 566 647 또는 US 5,530,101, US 6,180,370, US 5,585,089 및 US 5,693,761에서 기술한 "CDR 이식 (CDR grafting)" 방법을 들 수 있다. 하기 특허 출원서들도 역시 언급될 수 있다: US 5,639,641; US 6,054,297; US 5,886,152 및 US 5,877,293.
- [0149] 본 발명에 따른 항체의 "기능적 단편 (functional fragment)"은 상세하게는 Fv, scFv (sc는 단일 사슬 (single chain)), Fab, F(ab')₂, scFv-Fc 단편들 또는 다이아바디 (diabody)들과 같은 항체 단편 또는 폴리(에틸렌)글리콜 ("PEG화 (PEGylation)") (Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, (Fab')₂-PEG 또는 Fab'-PEG라고 불리는 PEG화된 단편들)과 같은 폴리(알킬렌)글리콜의 부가와 같은 화학적 변형에 의해 또는 리포솜 삽입에 의해 반감기 (half-life time)가 증가되었던 단편 모두를 말하려는 것이다. 상기 단편들은 본 발명에 따른 서열번호 1 내지 17 및 56 내지 61의 서열을 특징으로 하는 적어도 하나의 CDRs을 포함하고, 특히, 일반적인 방식으로 c-Met을 인지하거나 결합하고 필요한 경우 c-Met의 활성을 저해하는 능력과 같은 이 항체가 나온 항체의 부분적 활성을 나타낼 수 있다.
- [0150] 바람직하게, 상기 기능적 단편들은 이것이 유래한 항체의 중 또는 경 가변 사슬의 일부 서열로 구성되거나 이루어질 수 있고, 상기 일부 서열은 이것이 나온 항체와 동일한 결합 특이성을 유지하기에 충분하며, 충분한 친화도는 바람직하게는 항체 단편이 나온 항체와 c-Met에 대해 적어도 1/100 정도, 더욱 바람직한 방식으로는 적어도 1/10 정도이다. 이러한 기능적 단편은 이것이 나온 항체의 서열의 최소 5개 아미노산들, 바람직하게는 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 50 및 100개의 연속적 아미노산들을 포함될 수 있다.
- [0151] 바람직하게는, 이들 기능적 단편들은 Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, F(ab'), scFv-Fc 타입 또는 다이아바디 (diabody)들의 단편들이 될 것이고, 이것은 일반적으로 항체가 나온 원래 항체와 동일한 결합 특이성을 갖는다. 본 발명의 더욱 바람직한 구현예에서, 이들 단편들은 F(ab')₂ 단편들과 같은 2가 단편 (divalent fragment)들 중에서 선택된다. 본 발명에 따라, 본 발명의 항체 단편들은 상기에 언급된 바와 같은 항체들로부터 시작하여 펩신 (pepsin) 또는 파파인 (papain)과 같은 효소들에 의한 소화 및 또는 화학적 환원에 의한 디설파이드 브리지 (disulfide bridge)의 절단과 같은 방법들에 의해 획득될 수 있다. 또 다른 방식에서, 본 발명에 포함되는 항체 단편들은 마찬가지로 당업자가 잘 숙지하고 있는 유전자 재조합 기술들에 의해 또는 그 외 예를 들어 어플라이드 바이로시스템 (Applied Biosystems)사 등이 공급하는 기기와 같은 자동 펩타이드 합성기 (automatic peptide synthesizer)들을 이용한 펩타이드 합성에 의해 획득될 수 있다.
- [0152] "2가 단편 (divalent fragment)"은 2개 팔 (arm)들, 구체적으로 F(ab')₂ 단편들을 포함하는 항체 단편들 모두라고 이해되어야 한다.
- [0153] 보다 상세하게는, 본 발명은 항체들 또는 그들의 기능적 단편들, 본 발명에 따라 특히 유전적 재조합에 의해 또

는 화학적 합성에 의해 획득된 조합된 또는 인간화된 항체들을 포함한다.

- [0154] 본 발명에 따라 항체의 <유도체 (derivative)들>은 결합 능력을 유지하기 위해 단백질 스캐폴드 (scaffold) 및 원래 항체로부터 선택되는 적어도 하나의 CDRs 를 포함하는 결합 단백질 (binding protein)을 의미하는 것이다. 이러한 화합물들은 당업자라면 잘 숙지하고 있고 하기 명세서에서 보다 상세하게 기술될 것이다.
- [0155] 보다 상세하게는, 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나는 상기 유도체가 적어도 하나의 CDR이 원래 (original) 항체의 파라토프 인지 (paratopic recognizing) 특성을 유지하기 위해 이식되어진 (grfted) 스캐폴드를 포함하는 결합 단백질로 구성되는 것을 특징으로 한다.
- [0156] 하나 또는 여러 개의 서열들이 본 발명에서 기술된 6개 CDR 서열들을 통해 단백질 스캐폴드 상에 표현될 수 있다. 이 경우, 단백질 스캐폴드는 이식된 CDR(s)의 적절한 접힘 (folding)을 가지는 단백질 골격 (protein backbone)을 재생시키고, 따라서 이것 (또는 이것들)이 항원 파라토프 인지 특성을 유지하게 한다.
- [0157] 당업자라면 원래 항체로부터 선택된 적어도 하나의 CDR에 이식될 수 있는 단백질 스캐폴드를 선택하는 방법을 잘 숙지하고 있다. 구체적으로는 이러한 스캐폴드는 선택되기 위해 하기와 같은 여러 가지 특징들을 나타내야 한다고 알려져 있다 (Skerra A., J. Mol. Recogn., 13, 2000, 167-187).
- [0158] - 계통유전학적으로 (phylogenetically) 좋은 보존
- [0159] - 잘 알려진 삼차원 분자 구조를 가진 건강한 골격 (예를 들어, 결정학 (crystallography) 또는 NMR과 같은)
- [0160] - 작은 크기
- [0161] - 없거나 매우 낮은 정도의 해독후 (post-translational) 변형들
- [0162] - 생산, 발현 및 순수 분리의 용이성
- [0163] 이러한 단백질 스캐폴드는, 이에 제한되지는 않지만, 피브로넥틴 (fibronectin) 및 바람직하게는 10번째 피브로넥틴 타입 III 도메인 (FNfn10), 리포칼린 (lipocalin), 안티칼린 (anticalin) (Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74(4):257-75), 스태필로코커스 단백질 (staphylococcal protein) A의 B 도메인으로부터 나온 단백질 Z 유도체, 티오레독신 A (thioredoxin A) 또는 안킬린 반복 (ankyrin repeat) (Kohl et al., PNAS, 2003, Vol. 100, No. 4, 1700-1705), 아마딜로 반복 (amadillo repeat), 루이신-풍부 반복 (leucin-rich repeat) 또는 테트라트릭로펩타이드 반복 (tetratricopeptide repeat)과 같은 반복되는 도메인 (repeated domain)을 가지는 단백질 모두로 이루어진 그룹으로부터 선택된 구조일 수 있다.
- [0164] 또한, 독신들 (예를 들어, 전갈, 곤충, 식물 또는 연체류 독신들과 같은) 또는 신경성 (neuronal) 니트릭 옥사이드 합성효소 (PIN)의 단백질 저해제들로부터 나온 스캐폴드 유도체도 언급될 수 있다.
- [0165] 이러한 하이브리드 제작들의 제한되지 않는 예로서, 항-CD4 항체의 CDR-H1 (중사슬), 예로 13B8.2 항체를 PIN의 노출된 루프 하나 내로 삽입하는 것이 언급될 수 있다. 획득된 결합 단백질의 결합 특성들은 원래 항체와 그대로 유사하다 (Bes et al., BBRC 343, 2006, 334-344). 또한, 항-리소자임 (lysozyme) V8H 항체의 CDR-H3 (중사슬)을 네오카지노스타틴 (neocarzinostatin) 루프 내로 이식하는 것이 언급될 수 있다 (Nicaise et al., 2004).
- [0166] 본 발명의 경우에, 보존되는 관심 CDR은 제한되지는 않지만, 본 발명의 2개의 확인된 항체들, 예로 227H1 및 224G11에서 보존되는 것과 같이 CDR-L2일 수 있다.
- [0167] 상기에 언급된 바와 같이, 이러한 단백질 스캐폴드는 원래 항체로부터 나온 1 내지 6개의 CDR(s)을 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 이에 제한되지는 않지만, 당업자라면 중사슬, 특히 항체 특이성과 연관된 것으로 알려져 있는 중사슬로부터 적어도 하나의 CDR을 선택할 수 있을 것이다. 관심 CDR(s) (CDR of interest)은 당업자라면 기지의 방법을 사용하여 명백히 선택될 수 있다 (BES et al., FEBS Letters 508, 2001, 67-74).
- [0168] 이들 실시예들은 제한되지 않고 그 외 다른 알려진 또는 기재된 스캐폴드가 본 발명의 명세서에 포함되는 것이 명백하다.
- [0170] *새로운 측면에 따라, 본 발명은 하기 핵산들로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산에 관한 것이다:
- [0171] a) 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 2가 단편들 또는 유도체들의 하나를 코딩하는 핵산, DNA 또는 RNA;
- [0172] b) 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26의 서열들 그리고 서열번호 33, 서열번호 34 및 서열번호 35의 서열

들로 이루어진 핵산 서열; 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29의 서열들 그리고 서열번호 36, 서열번호 34 및 서열번호 37의 서열들로 이루어진 핵산 서열; 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32의 서열들 그리고 서열번호 38, 서열번호 39 및 서열번호 40의 서열들로 이루어진 핵산 서열; 및 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66의 서열들 그리고 서열번호 67, 서열번호 68 및 서열번호 69의 서열들로 이루어진 핵산 서열;로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 DNA 서열로 이루어진 핵산;

[0173] c) 서열번호 41 및 서열번호 44의 서열들로 이루어진 핵산 서열; 서열번호 42 및 서열번호 45의 서열들로 이루어진 핵산 서열; 서열번호 43 및 서열번호 46의 서열들로 이루어진 핵산 서열; 및 서열번호 70 및 서열번호 71의 서열들로 이루어진 핵산 서열;로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 DNA 서열로 이루어진 핵산;

[0174] d) b) 또는 c)에 정의한 핵산들에 해당하는 RNA 핵산들;

[0175] e) a), b) 및 c)에 정의한 핵산들에 상보적인 핵산들; 및

[0176] f) 서열번호 24 내지 40 및 64 내지 69의 서열들을 가지는 적어도 하나의 CDRs와 높은 엄격도 (high stringency) 조건 하에서 융합할 수 있는 적어도 18개 뉴클레오타이드들의 핵산.

[0177] 본 발명에서 무관심하게 사용되는 용어들, 핵산, 핵의 (nucleic) 또는 핵산 서열 (nucleic acid sequence), 폴리뉴클레오타이드 (polynucleotide), 올리고뉴클레오타이드 (oligonucleotide), 폴리뉴클레오타이드 서열, 뉴클레오타이드 서열은, 변형되거나 변형되지 않고 핵산의 단편 또는 부위가 정의되게 하며, 비자연적인 (unnatural) 뉴클레오타이드들을 포함하거나 포함하지 않고 그리고 이중가닥 DNA에, 상기 DNAs의 전사 산물들에 대해서는 단일가닥 DNA에만 해당할 수 있는, 뉴클레오타이드들의 정확한 연결을 나타내려는 것이다.

[0178] 또한, 여기서 본 발명은 자연 염색체 (natural chromosome) 환경 하, 다시 말하면 자연 상태의 뉴클레오타이드 서열들에 관한 것이 아니라고 이해되어야 한다. 이것은 분리되어진 및/또는 순수 분리된, 다시 말하면 직접적으로 또는 간접적으로, 예를 들어 환경이 적어도 부분적으로 변형된 복사에 의해 선택되어진 서열들에 관한 것이다. 높은 엄격도 조건들 하의 하이브리디제이션은 온도 조건들 및 이온 강도 (ion strength) 조건들이 상보적인 DNA의 두 개 단편 간 융합을 유지하게 하는 방식으로 선택되어야 하는 것을 보여준다. 기재에 의하면, 상기 기술된 폴리뉴클레오타이드 단편들을 정의할 목적으로의 하이브리디제이션 단계의 높은 엄격도의 조건은 하기 내용이 유리하다.

[0179] DNA-DNA 또는 DNA-RNA 하이브리디제이션은 두 단계들로 수행된다: (1) 5x SSC (1x SSC는 0.15 M NaCl + 0.015 M 소듐 시트레이트 용액에 해당), 50%의 포름아마이드, 7%의 소듐 도데실 설페이트 (SDS), 10x 덴하르트 용액 (Denhardt's), 5%의 텍스트란 설페이트 및 1%의 연어 정자 DNA를 포함하는 인산 완충용액 (phosphate buffer, 20 mM, pH 7.5)를 사용하여 42°C에서 3시간 동안 전하이브리디제이션 (prehybridization); (2) 프로브의 크기에 따른 온도에서 실제 하이브리디제이션 (예로, 프로브 크기 > 100개 뉴클레오타이드들인 경우 42°C)하고 나서, 2x SSC + 2%의 SDS를 사용하여 20°C에서 20분 동안 두 번 세척하고 0.1x SSC + 0.1%의 SDS를 사용하여 20°C에서 20분 동안 한 번 세척. 마지막 세척 과정은 0.1x SSC + 0.1%의 SDS를 사용하여 프로브 크기 > 100개 뉴클레오타이드들의 경우 60°C에서 30분 동안 수행된다. 상기에 기술된 정해진 크기의 폴리뉴클레오타이드에 대한 높은 엄격도의 하이브리디제이션 조건들은 당업자라면 샘플링 등의 지침에 따라 (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor), 더 크거나 더 작은 올리고뉴클레오타이드들에 적용할 수 있다.

[0180] 본 발명은 마찬가지로 본 발명에 따른 핵산으로 이루어진 벡터에 관한 것이다.

[0181] 본 발명은 본 발명에 따른 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 클로닝 및/또는 발현 벡터들을 특별히 목적으로 한다.

[0182] 본 발명에 따른 벡터들은 정해진 숙주세포에서 뉴클레오타이드 서열들의 발현 및/또는 분비를 가능하게 하는 요소들을 포함하는 것이 바람직하다. 따라서, 벡터는 전사 조절을 위한 적절한 부위들뿐만 아니라 프로모터, 해독의 시작 및 종결 신호 (signal of initiation and termination)들을 포함해야 한다. 이것은 숙주세포에서 안정적으로 유지될 수 있어야 하고 선택 사항으로 (optionally) 해독된 단백질의 분비를 특별히 결정하는 특정한 신호들을 가질 수 있다. 이들 서로 다른 요소들은 사용되는 숙주세포의 기능으로서 당업자라면 선택하고 최적화할 수 있다. 이 효과를 내기 위해, 본 발명에 따른 뉴클레오타이드 서열들은 선택된 숙주에서 자가 복제 벡터 (autonomous replication vector)들 내로 삽입되거나 선택된 숙주의 삽입 벡터 (integrative vector)들이 될 수 있다.

- [0183] 이러한 벡터들은 당업자가 최근에 사용하는 방법들을 이용하여 제조되고, 이로부터 얻은 클론들은 리포펙션 (lipofection), 전기천공 (electroporation), 열쇼크 (thermal shock), 또는 화학적 방법들과 같은 표준 방법들에 의해 적절한 숙주 내로 도입될 수 있다.
- [0184] 본 발명에 따른 벡터들은 예를 들어 플라스미드 또는 바이러스 기원의 벡터들이다. 그들은 본 발명에 따른 뉴클레오타이드 서열들을 클론하거나 발현시키기 위해 숙주세포들을 형질전환 하는 데 유용하다.
- [0185] 본 발명은 마찬가지로 본 발명에 따른 벡터에 의해 형질전환 되거나 이를 포함하는 숙주세포들로 이루어진다.
- [0186] 숙주세포는 원핵 또는 진핵세포 시스템, 예를 들어 박테리아 세포들, 이스트 세포들 또는 동물 세포들, 특히 포유동물 세포들로부터 선택될 수 있다.
- [0187] 본 발명은 마찬가지로 본 발명에 따라 형질전환된 적어도 하나의 세포를 포함하는 인간을 제외한 동물들에 관한 것이다.
- [0188] 또 다른 측면에 따라, 본 발명의 주제는 하기 단계로 이루어지는 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 단편들의 하나를 생산하는 방법이다.
- [0189] a) 본 발명에 따른 숙주세포의 배지 내에서 및 적절한 배양 조건들에서 배양; 및
- [0191] *b) 배양 배지 또는 상기 배양된 세포들로부터 시작하여 이로부터 생산된 항체들 또는 그들의 기능적 단편들의 회수.
- [0192] 본 발명에 따라 형질전환된 세포들은 본 발명에 따른 재조합 폴리펩타이드들을 제조하는 방법에 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 폴리펩타이드들을 재조합 형태로 제조하는 방법들은 본 발명에 따른 벡터 및/또는 벡터에 의해 형질전환된 세포를 사용하는 것을 특징으로 하고, 본 발명에 이들이 포함된다.
- [0193] 바람직하게는, 본 발명에 따른 벡터에 의해 형질전환된 세포는 상기 폴리펩타이드와 상기 재조합 펩타이드를 회수 가능하게 하는 조건들 하에서 배양된다.
- [0194] 상기에서 말한 바와 같이, 숙주세포는 원핵 또는 진핵 시스템으로부터 선택될 수 있다. 구체적으로는, 이러한 원핵 또는 진핵 시스템에서 분비를 용이하게 하는 본 발명에 따른 뉴클레오타이드 서열들을 확인하는 것이 가능하다. 이러한 서열을 가지는 본 발명의 벡터는 분비되어야 하는 재조합 단백질들의 생산에 유리하게 사용될 수 있다. 효과 면에서, 이들 관심 재조합 단백질 (recombinant protein of interest)들의 순수 분리는 그들이 숙주세포들 내부가 아닌 세포 배양 상청액에 존재하는 사실만으로 용이해질 수 있다.
- [0196] *마찬가지로, 본 발명에 따른 폴리펩타이드들을 화학적 합성에 의해 제조하는 것이 가능하다. 이러한 제조 방법도 마찬가지로 본 발명의 주제이다. 당업자라면 화학적 합성 방법들, 예를 들어 단편들의 응축 (condensation)에 의해 또는 용액에서의 고전적인 합성에 의해 고체상 (solid phase)들을 채용하는 기술 [Steward et al., 1984, Solid phase peptide synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd ed., (1984)]들 또는 부분적인 고체상들을 사용하는 기술들을 잘 숙지하고 있다. 화학적 합성에 의해 얻어지고 일치하는 (corresponding) 비자연적인 아미노산들을 포함할 수 있는 폴리펩타이드들은 마찬가지로 본 발명에 포함된다.
- [0197] 본 발명의 제조방법에 의해 획득될 수 있는 항체들 또는 그들의 기능적 단편들 또는 유도체들은 마찬가지로 본 발명에 포함된다.
- [0198] 또한, 본 발명은 약제로서의 본 발명의 항체에 관한 것이다.
- [0199] 본 발명은 마찬가지로 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 단편들의 하나로 구성되는 화합물의 활성 성분들에 의해 이루어지고, 바람직하게는 부형제 및/또는 약학적으로 허용 가능한 담체와 혼합된 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0200] 본 발명의 또 다른 보완적인 구현에는 상기에서 기술된 바와 같이 상기에 더하여 동시적 (simutaneous), 별도의 (separate) 또는 연속적인 (sequential) 사용을 위한 조합 산물 (combination product)로서의 항-종양 항체로 이루어진 조성물을 포함한다.
- [0201] 더욱 바람직하게는, 상기 두 번째 항-종양 항체는 항-IGF-IR, 항-EGFR, 항-HER2/neu, 항-VEGFR, 항-VEGF 등, 당업자가 숙지하고 있는 항체들 또는 그 외 다른 항-종양 항체들로부터 선택될 수 있다. 두 번째 항체로서 상기에 언급된 항체들의 기능적 단편들 또는 유도체들의 사용도 분명히 본 발명의 일부분이다.

- [0202] 가장 바람직한 항체로서 예를 들어 항체 C225 (Erbix)와 같은 항-EGFR 항체들이 선택될 수 있다.
- [0203] "동시적 사용 (simutaneous use)"은 본 발명에 따른 조성물의 두 개 화합물들을 단독 및 동일한 약학적 형태로 투여하는 것을 의미한다고 해석된다.
- [0204] "별도의 사용 (separate use)"은 본 발명에 따른 조성물의 두 개 화합물들을 별개의 약학적 형태들로 동시적으로 투여하는 것을 의미한다고 해석된다.
- [0205] "연속적인 사용 (sequential sue)"은 본 발명에 따른 조성물의 두 개 화합물들을 각각의 약학적 형태로 연속적으로 투여하는 것을 의미한다고 해석된다.
- [0206] 일반적인 경향에서, 본 발명에 따른 조성물은 암 치료의 효능 (efficacy)을 상당히 증가시킨다. 다시 말하면, 본 발명에 따른 항-c-Met 항체들의 치료 효과는 세포 독성제 (cytotoxic agent)의 투여에 의해 예상되지 못한 방식으로 강화된다. 본 발명에 따른 조성물에 의해 생성되는 또 다른 주요한 연결 장점 (subsequent advantage)은 활성 성분의 유효량 (efficacious dose)들이 더 낮은 점이다. 이것은 이차적인 효과들, 특히 세포 독성제의 효과들이 나타내는 위험성을 피하거나 감소시키도록 한다.
- [0207] 또한, 본 발명에 따른 이 조성물은 예상되는 치료 효과가 더욱 신속하게 나타나도록 할 수 있다.
- [0208] 본 발명의 조성물은 또한 상기에 더하여 동시적, 별도의 또는 연속적인 사용을 위한 조합 산물 (combination product)로서 세포 독성/세포 증식억제성 (cytotoxic/cytostatic) 약제를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0209] "항암 치료제 (anti-cancer therapeutic agent)들" 또는 "세포 독성/세포 증식억제성 약제 (cytotoxic/cytostatic agent)들"은 환자에게 투여될 경우, 환자의 몸에서 암의 발달을 치료하거나 예방하는 물질을 말하려는 것이다. 이러한 약제들의 제한되지 않는 예로서, 알킬화제 (alkylating agent)들, 항-대사물질 (anti-metabolite)들, 항-종양 항생제 (anti-tumor antibiotic)들, 세포분열 저해제 (mitotic inhibitor)들, 크로마틴 기능 저해제 (chromatin function inhibitor)들, 항-혈관형성제 (anti-angiogenesis agent)들, 항-에스트로겐 (anti-estrogen)들, 항-안드로겐 (anti-androgen)들 또는 면역조절제 (immunomodulator)들이 언급될 수 있다.
- [0210] 이러한 약제들은, 예를 들어, 비달 (VIDAL)의 2001판에 암학 (cancerology) 및 혈액학 (hematology) 컬럼 세포 독성학 (cytogenetics)에 첨부된 화합물들에 할애된 페이지에서 인용되고, 이 문헌에서 참고로 인용되는 이들 세포 독성 화합물들은 여기서 바람직한 세포 독성제로 인용된다.
- [0211] 구체적으로, 본 발명에 따라 하기 약제들이 바람직하다.
- [0212] "알킬화제 (alkylating agent)"는 어떤 분자, 바람직하게는 핵산 (예로, DNA)을 세포 내에서 교차-연결 (corss-link)하거나 알킬화할 수 있는 물질 모두를 말한다. 알킬화제들의 예로는 메크롤에타민 (mechlorethamine), 클로암부콜 (chlorambucol), 멜팔렌 (melphalen), 클로리드레이트 (chlorydrate), 피포브로멘 (pipobromen), 프레드니무스틴 (prednimustin), 디소딕-포스페이트 (disodic-phosphate) 또는 에스트라무스틴 (estramustin)과 같은 질소 독 (nitrogen mustard); 사이클로포스파마이드 (cyclophosphamide), 알트레타민 (altretamine), 트로포스파마이드 (trofosfamide), 설포포스파마이드 (sulfofosfamide) 또는 이포스파마이드 (ifosfamide)와 같은 옥사조포린 (oxazophorin)들; 티오테파 (thiotepa), 트리에틸렌아민 (triethylenamine) 또는 알테트라민 (altetramine)과 같은 아지리딘 (aziridine)들 또는 이민-에틸렌 (imine-ethylene)들; 카무스틴 (carmustine), 스트렙토조신 (streptozocin), 포테무스틴 (fotemustin) 또는 로무스틴 (lomustin)과 같은 나이트로소우레아 (nitrosourea); 부설판 (busulfan), 트레오설판 (treosulfan) 또는 임프로설판 (improsulfan)과 같은 알킬-설포네이트 (alkyle-sulfonate)들; 다카바진 (dacarbazine)과 같은 트리아젠 (triazene)들; 또는 시스-백금 (cis-platinum), 옥사리플라틴 (oxaliplatin) 및 카보플라틴 (carboplatin)과 같은 백금 복합체 (platinum complex)들이 포함된다.
- [0213] "항-대사물 (anti-metabolite)"들은 어떤 활성들, 보통 DNA 합성을 방해하여 세포 성장 (cell growth) 및/또는 대사를 막는 물질들을 말한다. 항-대사물들의 예들로는 메토크렉세이트 (methotrexate), 5-플루오르우라실 (5-fluorouracil), 플록소우리딘 (floxuridine), 5-플루오르데옥시우리딘 (5-fluorodeoxyuridine), 카페시타빈 (capecitabine), 사이타라빈 (cytarabine), 플루다라빈 (fludarabine), 사이토신 아라비노사이드 (cytosine arabinoside), 6-머캅토퓨린 (6-mercaptapurine, 6-MP), 6-티오구아닌 (6-thioguanine), 클로로데스옥시아데노신 (chlorodesoxyadenosine), 5-아자사이티딘 (5-azacytidine), 겐시타빈 (gemcitabine), 클라드리빈 (cladribine), 데옥시코포르마이신 (deoxycoformycin) 및 펜토스타틴 (pentostatin)을 들 수 있다.

- [0214] "항-종양 항생제 (anti-tumor antibiotic)들"은 DNA, RNA 및/또는 단백질 합성을 방해하거나 저해할 수 있는 화합물들을 말한다. 항-종양 항생제들의 예들로는 독소루비신 (doxorubicin), 다우노루비신 (daunorubicin), 이다루비신 (idarubicin), 발루비신 (valrubicin), 미토크산트론 (mitoxanthrone), 닥티노마이신 (dactinomycin), 미트라마이신 (mithramycin), 플리카마이신 (plicmycin), 미토마이신 C (mitomycin C), 블레오마이신 (bleomycin), 및 프로카바진 (procarbazine)을 들 수 있다.
- [0215] "세포분열 저해제 (mitotic inhibitor)들"은 세포 주기 (cell cycle) 및 세포 분열 (mitosis)의 정상적인 진행을 방해한다. 일반적으로, 마이크로튜블 (microtubule) 저해제들 또는 파크리탁셀 (paclitaxel) 및 도세탁셀 (docetaxel)과 같은 택소이드 (taxoide)들은 세포 분열을 저해할 수 있다. 빈블라스틴 (vinblastine), 빈크리스틴 (vincristine), 빈데신 (vindesine) 및 비노렐빈 (vinorelbine)도 역시 세포 분열을 저해할 수 있다.
- [0216] "크로마틴 기능 저해제 (chromatic function inhibitor)들"은 토포이소머라제 (topoisomerase) I 또는 토포이소머라제 II와 같은 크로마틴 모델링 단백질들의 정상적인 기능을 저해하는 물질을 말한다. 크로마틴 기능 저해제들의 예들로는 토포이소머라제 I의 경우 토포테칸 (topotecan) 또는 이리노테칸 (irinotecan)과 같은 캄프토테신 (camptothecine) 및 그의 유도체들 그리고 토포이소머라제 II의 경우, 에토포사이드 포스페이트 (etoposide phosphate) 및 테니포사이드 (teniposide)를 들 수 있다.
- [0217] "항-혈관형성제 (anti-angiogenesis agent)"는 혈관의 성장을 저해하는 약물 (drug), 화합물 (compound), 물질 (substance) 또는 약제 (agent) 모두를 말한다. 대표적인 항-혈관형성제들로는 이에 제한되지는 않지만, 라조신 (razoxin), 매리마스태드 (marimastat), 바티마스태드 (batimastat), 프리노마스태드 (prinomastat), 테노마스태드 (tanomastat), 일로마스태드 (ilomastat), CGS-27023A, 할로푸지논 (halofuginon), COL-3, 네오바스태드 (neovastat), BMS-275291, 탈리도마이드 (talidomide), CDC 501, DMXAA, L-651582, 스켈라민 (squalamine), SU5416, SU6668, 인터페론-알파, EMD121974, 인터루킨-12, IM862, 엔지오스타틴 (angiostatin) 및 비탁신 (vitaxin)를 들 수 있다.
- [0218] "항-에스트로겐 (anti-estrogen)들" 또는 "항-에스트로겐 약제 (anti-estrogen agent)들"는 에스트로겐의 작용을 감소시키거나 길항하거나 저해하는 물질 모두를 말한다. 항-에스트로겐 약제들의 예들로는 탐옥시펜 (tamoxifen), 토레미펜 (toremifene), 랄옥시펜 (raloxifene), 드롤옥시펜 (droloxifene), 이오도옥시펜 (iodoxifene), 아나스트로졸 (anastrozole), 레트로졸 (letrozole), 및 엑제메스탄 (exemestane)을 들 수 있다.
- [0219] "항-안드로겐 (anti-androgen)들" 또는 "항-에스트로겐 약제 (anti-androgen agent)들"은 안드로겐의 작용을 감소시키거나 길항하거나 저해하는 물질 모두를 말한다. 항-안드로겐들의 예들로는 플루타마이드 (flutamide), 닐루타마이드 (nilutamide), 비칼루타마이드 (bicalutamide), 스프리로노락톤 (spironolactone), 사이프로테론 아세테이트 (cyproterone acetate), 피나스테라이드 (finasteride) 및 시미티딘 (cimitidine)을 들 수 있다.
- [0220] "면역조절제 (immunomodulator)들"은 면역 시스템을 자극하는 물질들이다.
- [0221] 면역조절제들의 예들로는 인터페론, 알데스루킨 (aldesleukine), OCT-43, 데니루킨 디플리톡스 (denileukine difflitox) 및 인터루킨-2와 같은 인터루킨, 태소너민 (tasonermine)과 같은 종양 괴사인자들 또는 렌티난 (lentinan), 시조피란 (sizofiran), 로퀴니멕스 (roquinimex), 피도티모드 (pidotimod), 페가데마스 (pegademase), 티모펜틴 (thymopentine), 폴리 I:C 또는 5-플루오르우라실과 결합한 레바미졸 (levamisole)과 같은 기타 면역조절제들을 들 수 있다.
- [0222] 상세한 설명을 위해, 당업자라면 "프랑스 화학 치료제 교육협회 (Association Francaise des Enseignants de Chimie Therapeutique)"가 편집하고 "화학 치료제의 특성, Vol. 6, 항종양 치료제 및 암 치료에 대한 전망 (medicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers), TEC & DOC 판, 2003"이라는 제목을 가진 메뉴얼을 참고할 수 있을 것이다.
- [0223] 또한, 화학적 약제들 또는 세포 독성 약제들로서, 예를 들어, 제피티닙 또는 에르로티닙과 같은 모든 키나제 저해제 (kinase inhibitor)들이 언급될 수 있다.
- [0224] 구체적인 바람직한 구현예에서, 상기 조성물은 본 발명에 따른 조합 산물로서 상기 세포 독성 약제가 동시적 사용을 위해 상기 항체와 조합되어 (coupled) 있는 것을 특징으로 한다.
- [0225] 본 발명에 따른 상기 세포 독성 약제 및 상기 항체 간의 조합 (coupling)을 용이하게 하기 위해, 조합되는 두

화합물들 간에 폴리에틸렌글리콜과 같은 폴리(알킬렌)글리콜, 또는 그 외 아미노산들과 같은 공간 (spacer) 분자들을 도입하는 것이 특히 가능하다. 또 다른 구현예에서, 내부에 본 발명에 따른 상기 항체와 반응할 수 있는 기능들을 도입할 수 있는 상기 세포 독성 약제들의 활성화 유도체들을 사용하는 것이 가능하다. 이들 조합 기술들은 당업자가 잘 숙지하고 있고 본 발명의 기재를 벗어나지 않을 것이다.

- [0226] 본 발명은 또 다른 측면에서, 상기 항체들의 적어도 하나 또는 그들의 기능적 단편들 또는 유도체들이 세포 특신 및/또는 방사성요소 (radioelement)와 결합한 것을 특징으로 하는 조성물에 관한 것이다.
- [0227] 바람직하게는, 상기 특신 또는 상기 방사성요소는 c-MET 을 발현하는 세포들의 세포 활성화의 적어도 하나를 저해할 수 있고, 더욱 바람직한 방식으로, 상기 세포의 성장 또는 증식을 억제할 수 있고 특히 상기 세포를 완전히 불활성화할 수 있다.
- [0228] 또한, 상기 특신은 엔테로박테리아 특신 (enterobacterial toxin), 특히 슈도모나스 (Pseudomonas) 엑소특신 A (exotoxin A)인 것이 바람직하다.
- [0229] 치료에 사용되는 항체들과 결합한 방사성요소들 (또는 방사성 동위원소 (radioisotope)들)은 감마 선들을 방출하는 방사성 동위원소들인 것이 바람직하고 요오드 (iodine)¹³¹, 이트륨 (yttrium)⁹⁰, 골드 (gold)¹⁹⁹, 팔라듐 (palladium)¹⁰⁰, 구리 (copper)⁶⁷, 비스무스 (bismuth)²¹⁷ 및 안티몬 (antimony)²¹¹인 것은 더욱 바람직하다. 베타선 및 알파선들을 방출하는 방사성 동위원소들도 마찬가지로 치료 (therapy)에 사용될 수 있다.
- [0230] 본 발명에 따른 적어도 하나의 항체 또는 그의 기능적 단편들의 하나와 결합하는 특신 또는 방사성요소는, 특히 두 화합물들 간 공유 커플링에 의해 연결 분자의 도입이 있거나 없이 상기 특신 또는 상기 방사성요소가 상기 적어도 하나의 항체에 결합 가능하게 하는 수단 모두를 말하려는 것이다.
- [0231] 결합체의 구성성분들의 모두 또는 일부분의 화학적 (공유적), 정전기적 또는 비공유적 방식으로 결합하게 하는 약제들 중에는, 상세하게 벤조퀴논 (benzoquinone), 카보디이미드 (carbodiimide), 또한 보다 상세하게는 EDC (1-에틸-3-[3-디메틸-아미노프로필]-카보디이미드 하이드로클로라이드), 디말레이미드, 디티오비스니크로벤조산 (DTNB), N-숙시니미딜 S-아세틸 티오-아세테이트 (SATA), 자외선 (UV)와 반응하는 하나 이상의 페닐아자이드 그룹들을 가지는 연결제 (bridging agent)들이 언급될 수 있고, 바람직하게는 N-[4-(아지도살리실아미노)부틸]-3'-(2'-피리디티오)-프로피온아마이드 (APDP), N-숙시니미딜-일 3-(2-피리디티오)프로피오네이트 (SPDP), 6-하이드라지노-니코틴아마이드 (HYNIC)이다.
- [0232] 특히 방사성요소들을 위한 커플링의 또 다른 형태로는 이중기능적 (bifunctional) 이온 킬레이터 (ion chelator)의 사용을 포함할 수 있다.
- [0233] 이러한 킬레이터들 중에는 EDTA (에틸렌디아미노테트라아세트산)으로부터 또는 DTPA (디에틸렌트리아민펜타아세트산)로부터 유래한 킬레이터들이 언급될 수 있다. 이것은 금속들, 구체적으로 방사성 금속들 및 면역글로불린을 결합시키기 위해 개발되었다. 따라서, DTPA 및 그의 유도체들은 리간드-금속 복합체의 안정성 (stability) 및 강성을 (rigidity)를 증가시키기 위해 탄소 사슬 상에서 서로 다른 그룹들로 치환될 수 있다 (Krejcarek et al., (1977); Brechbiel et al., (1991); Gansow (1991); US 특허 4,831,175).
- [0234] 예를 들어 디에틸렌트리아미노펜타아세트산 (DTPA) 및 그의 유도체는 의약에서 또 생물학에서 오랫동안 자유 형태로 또는 금속 이온과의 복합체 형태로 널리 사용되어 왔고, 금속 이온들과 안정한 킬레이터를 형성하고 또한 암 치료에서의 방사성 면역결합체 (radioimmunoconjugate)들의 개발에 사용되는 항체들과 같은 치료적 또는 진단적 이익이 있는 단백질들과 결합하는 탁월한 특성을 가진다. (Meases et al., (1984); Gansow et al. (1990)).
- [0235] 마찬가지로, 본 발명에 따른 상기 결합체를 형성하는 상기 적어도 하나의 항체는 그의 기능적 단편들, 구체적으로 scFv 단편들과 같이 그들의 Fc 성분이 변화된 단편들로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [0236] 이미 언급한 바와 같이, 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 세포독성/세포 증식억제성 약제 또는 상기 약제 및/또는 방사성요소는 동시적 사용을 위해 상기 조성물의 적어도 하나의 요소들과 화학적으로 조합된다.
- [0237] 본 발명은 의약품으로서의 상기 기술된 조성물을 포함한다.
- [0238] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 의약품이 제조에 사용되는 조성물의 용도를 포함한다.
- [0239] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기술한 바와 같이 종양 세포들의 성장 및/또는 증식을 저해하려는 의약품의

제조에 사용되는 항체 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나, 및/또는 조성물의 용도를 다룬다.

- [0240] 본 발명이 또 다른 측면은, 상기 언급한 바 또는 상기 용도와 같이, 암을 예방 또는 치료하려는 약제를 제조하는 데 사용하는 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 용도 및/또는 조성물의 용도를 포함한다.
- [0241] 또한, 본 발명은 본 발명에 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들, 본 발명에 따른 하이브리도마가 생산하는 항체 또는 본 발명에 따른 조성물을 그의 필요가 있는 환자에게 투여하는 것으로 이루어진 환자에서 종양 세포들의 성장 및/또는 증식을 저해하려는 방법을 포함한다.
- [0242] 본 발명은 상기에 더하여 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들, 본 발명에 따른 하이브리도마가 생산하는 항체 또는 본 발명에 따른 조성물을 그의 필요가 있는 환자에게 투여하는 것으로 이루어진 환자에서 암을 예방 또는 치료하는 방법을 포함한다.
- [0243] 구체적인 바람직한 측면에서, 상기 암은 전립선암 (prostate cancer), 골육종 (osteosarcoma), 폐암 (lung cancer), 유방암 (breast cancer), 자궁내막 암 (endometrial cancer), 신경교아세포종 (glioblastoma) 또는 결장암 (colon cancer)으로부터 선택된다.
- [0244] 상기에서 설명된 바와 같이, 본 발명의 장점은 HGF 의존성 및 비의존성 Met-활성화와 관련된 암들을 치료 가능하게 하는 것이다.
- [0245] 본 발명은 보다 또 다른 측면에서 c-Met 수용체의 비정상적인 존재 (abnormal presence)가 의심되는 생물학적 시료 (biological sample)로부터 시작하여 c-Met 수용체의 과다 발현 또는 과소 발현에 의해 유도되는 질병을 진단하는 *생체의* 진단 방법을 포함한다. 여기서는 본 발명의 항체를 상기 생물학적 시료와 접촉시키는 단계가 포함되고, 상기 항체는 필요한 경우 표지될 수 있다.
- [0246] 바람직하게는, 상기 진단 방법에서 c-Met 수용체의 비정상적인 존재와 관련 있는 상기 질병은 암이 될 것이다.
- [0247] 상기 항체 또는 그의 기능적 단편들은 감지될 수 있는 (detectable) 및/또는 정량될 수 있는 (quantifiable) 신호를 얻기 위해 면역결합체 (immunoconjugate)들 또는 표지된 항체의 형태로 존재할 수 있다.
- [0248] 본 발명에 따라 표지되는 항체들 또는 그들의 기능적 단편들은, 예를 들어 퍼옥시다제 (peroxidase), 알칼라인 포스파타제 (alkaline phosphatase), 베타-D-갈락토시다제 (beta-D-galactosidae), 글루코스 옥시다제 (glucose oxydase), 글루코스 아밀라제 (glucose amylase), 카보닉 안하이드라제 (carbonic anhydrase), 아세틸콜린에스터라제 (acetylcholinesterase), 라이소자임 (lysozyme), 말레이트 디하이드로게나제 (malate dehydrogenase) 또는 글루코스-6-포스페이트 디하이드로게나제 (glucose 6-phosphate dehydrogenase와 같은 효소들을 사용하여, 또는 바이오틴 (biotin), 디옥시게닌 (dioxygenin) 또는 5-브로모데옥시우리딘 (5-bromodeoxyuridine)과 같은 분자에 의해 결합할 수 있는 면역결합체 (immunoconjugate)들이라고 불리는 항체들을 포함한다. 형광 표지 (fluorescent label)들은 마찬가지로 본 발명에 따른 항체들 또는 그들의 기능적 단편들에 결합할 수 있고, 구체적으로 이는 플루오레신 (fluorescein) 및 그의 유도체들, 플루오르크롬 (fluorochrome), 로다민 (rhodamine) 및 그의 유도체들, GFP ("녹색 형광 단백질 (green fluorescent protein)"), 단실 (dansyl), 엄벨리페론 (umbelliferone) 등이 포함된다. 이러한 결합체들에서, 본 발명의 항체들 또는 그들의 기능적 단편들은 당업자가 숙지하고 있는 방법에 의해 제조될 수 있다. 그들은 효소 또는 형광 표지들에 직접적으로 또는 공간 그룹 (spacer group) 또는 글루타르알데하이드 (glutaraldehyde)와 같은 폴레알데하이드, 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA), 디에틸렌-트리아민펜타아세트산 (DPTA)와 같은 연결 그룹의 매개에 의해, 또는 치료적 결합체들에 사용되는 상기에 언급된 바와 같은 결합체 (coupling agent)의 존재 하에 조합될 수 있다. 플루오레신 타입의 표지들을 포함하는 결합체들은 이소티오시아네이트와 반응시켜 제조될 수 있다.
- [0249] 다른 결합체들로는 마찬가지로 루미놀 (luminol)과 디옥세탄 (dioxetane)들과 같은 화학발광 표지들, 루시페라제 (luciferase) 및 루시페린 (luciferin)과 같은 생물-발광 (bio-luminescent) 표지들 또는 요오드 (iodine)¹²³, 요오드¹²⁵, 요오드¹²⁶, 요오드¹³³, 브로민 (bromine)⁷⁷, 테크네튬 (technetium)^{99m}, 인듐 (indium)¹¹¹, 인듐^{113m}, 갈륨 (gallium)⁶⁷, 갈륨⁶⁸, 루테튬 (ruthenium)⁹⁵, 루테튬⁹⁷, 루테튬¹⁰³, 루테튬¹⁰⁵, 수은 (mercury)¹⁰⁷, 수은²⁰³, 루테튬^{99m}, 루테튬¹⁰¹, 루테튬¹⁰⁵, 스칸듐 (scandium)⁴⁷, 텔리움 (tellium)^{121m}, 텔리움^{122m}, 텔리움^{125m}, 툴리움 (thulium)¹⁶⁵, 툴리움¹⁶⁷, 툴리움¹⁶⁸, 플루린 (fluorine)¹⁸, 이트리움¹⁹⁹, 요오드¹³¹와 같은 그 외 방사성 표지들을 들 수 있다. 치료적 방사성 동위원소들을 직접적으로 또는 상기 언급

급된 EDTA, DTPA와 같은 킬레이팅제를 사용하여 항체들에 조합하는 데 사용하는 당업자가 숙지하고 있는 방법들은 진단에 사용될 수 있는 방사성요소들에도 사용될 수 있다. 마찬가지로, 클로라민 T 방법에 의한 $\text{Na}[\text{I}^{125}]$ 를 사용한 표지 (labelling) [Hunter W. M. and Greenwood F.C. (1962) Nature 194:495] 또는 크록포드 등의 기술에 의한 테크네티움을 사용한 표지 (Crockford et al. US 특허 4,424,200) 또는 히나토위치에 의해 기술된 DTPA를 통한 부착 (Hnatowich, US 특허 4,479,930)이 언급될 수 있다.

- [0250] 따라서, 본 발명에 따른 항체들 또는 그의 기능적 단편들은 생물학적 시료 내 c-Met 수용체의 과다 발현 또는 과소 발현, 바람직하게는 과다 발현을 검색하고 및/또는 정량하는, 하기 단계들로 이루어지는 특징을 가진 방법에 사용될 수 있다:
- [0251] a) 본 발명의 항체 또는 그의 기능적 단편들과 생물학적 시료의 접촉; 및
- [0252] b) 형성 가능한 c-Met/항체 복합체의 전시.
- [0253] 상세한 구현예에서, 본 발명에 따른 항체들 또는 그들의 기능적 단편들은 생물학적 시료 내 c-Met 수용체를 검색하고 및/또는 정량하는 방법으로 c-Met-의존성 암의 예방적 및/또는 치료적 처치의 효능을 감시하기 위해 사용될 수 있다.
- [0254] 보다 일반적으로, 본 발명에 따른 항체들 또는 그들의 기능적 단편들은 c-Met 수용체의 발현이 정성적 및/정량적 방식으로 관찰되어야 하는 상황 모두에 유리하게 사용될 수 있다.
- [0255] 바람직하게는, 생물학적 시료는 혈청 (serum), 혈액 전체 (whole blood)와 같은 생물학적 액체 (biological fluid), 세포들, 조직 시료 또는 인간 기원의 생검 (biopsy)들로 구성된다.
- [0256] 이러한 탐색 (detection) 및/또는 용량 (dosage)을 수행하기 위해 모든 절차 (procedure) 또는 전통적인 테스트가 적용될 수 있다. 상기 테스트는 경쟁 (competition) 또는 샌드위치 테스트 (sandwich test), 또는 항체-항원 타입의 면역 복합체의 형성에 의존하는 당업자가 숙지하고 있는 시험들 모두일 수 있다. 본 발명에 따른 출원서들을 참고하여, 항체 또는 그의 기능적 단편들이 고정되거나 (immobilized) 또는 표지될 수 있다. 이 고정 과정은 당업자가 숙지하고 있는 여러 가지 지지체 (support)들 상에서 수행될 수 있다. 이들 지지체들은 특히 유리 (glass), 폴리스티렌 (polystyrene), 폴리프로필렌 (polypropylene), 폴리에틸렌 (polyethylene), 덱스트란 (dextran), 나일론 (nylon) 또는 자연의 또는 변형된 세포들 (natural or modified cells)을 포함한다. 이들 지지체들은 수용성 또는 불용성일 수 있다.
- [0257] 실시예를 통해, 바람직한 방법으로는 면역형광 또는 방사선 면역분석법 (RIA) 기술 또는 그의 동등물에 의해 ELISA 기술에 따른 면역효소적 방법을 시행하도록 도입한다.
- [0258] 따라서, 본 발명은 c-Met 수용체의 과다 발현 또는 과소 발현에 의해 유도되는 질병들을 진단하는 방법을 수행하거나 생물학적 시료에서 c-Met 수용체의 과다 발현 또는 과소 발현, 바람직하게는 상기 수용체의 과다 발현을 검색하고 및/또는 정량하는 방법을 수행하는 데 필요한 키트들 또는 세트들을 포함한다. 상기 키트 또는 세트는 하기 요소들로 이루어진다.
- [0259] a) 본 발명에 따른 항체, 또는 그의 기능적 단편들의 하나;
- [0260] b) 선택 사항으로, 면역학적 반응에 호의적인 배지를 제조하기 위한 시약 (reagent)들;
- [0261] c) 선택 사항으로, 면역학적 반응에 의해 생산되는 c-Met/항체 복합체들의 전시를 가능하게 하는 시약들.
- [0262] 본 발명의 주제는 마찬가지로 본 발명에 따른 항체 또는 조성물을 생물학적 활성을 가지는 화합물을 c-Met 수용체를 발현하거나 과다 발현하는 세포들에 특이적으로 표적하는 약제의 제조에 사용하는 용도이다.
- [0263] 생물학적 활성을 가진 화합물은 여기서 세포 활성, 특히 세포 성장, 증식, 전사 또는 유전자 해독을 조절하는, 구체적으로 저해할 수 있는 화합물 모두를 말하려는 것이다.
- [0264] 또한, 본 발명의 주제는 본 발명에 따른 항체 또는 그의 기능적 단편들, 바람직하게는 표지된, 구체적으로 방사성 표지된 것으로 이루어진 생체 내 진단 시약 및 그의 의학적 영상에 사용하는 용도, 구체적으로는 c-Met 수용체의 세포에 의한 발현 또는 과다 발현과 관련된 암을 검색하기 위해 사용하는 용도이다.
- [0265] 본 발명은 마찬가지로 조합 산물로서의 조성물 또는 본 발명에 따른 약제로서의 항-c-Met 결합체 또는 방사성요소에 관한 것이다.

[0266] 바람직하게는, 조합 산물로서의 상기 조성물 또는 본 발명에 따른 상기 결합체는 부형제 및/또는 약학적으로 허용 가능한 담체와 혼합될 수 있다.

[0267] 본 발명의 기술에서, 약학적으로 허용 가능한 담체는 이차적인 반응들을 유발하지 않는 약학적 조성물이 되려는 화합물 또는 화합물들의 조합을 말하려는 것이다. 이것은 예를 들어, 활성 화합물(들)의 투여를 용이하게 하고 그의 반감기 및/또는 효능을 증가시키며, 용액에서 수용성을 증가시키거나 그 외 보존 (conservation)을 개선시킨다. 이들 약학적으로 허용 가능한 담체들은 당업자가 잘 숙지하고 있고 성질 및 선택된 활성 화합물(들)의 투여 방식의 함수로서 당업자에 의해 적용될 수 있다.

[0268] 바람직하게는, 이들 화합물들은 시스템 경로 (systemic route)에 의해 구체적으로 정맥내 (intravenous) 경로, 근육내 (intramuscular), 피부내 (intradermal), 복강내 (intraperitoneal) 또는 피하 (subcutaneous) 경로에 의해 투여될 것이다. 더욱 바람직한 방식에서, 본 발명에 따른 항체들로 이루어진 조성물은 여러 번 연속적인 방식으로 투여될 것이다.

발명의 효과

[0269] 이들 투여, 용량 및 최적의 약학적 형태들은 환자들에게 적용되는 치료법을 확립하는 데 일반적으로 고려되는 평가 기준들, 예를 들어 환자의 연령 또는 체중, 환자 조건의 증증도, 치료에 대한 내성 및 주목할만한 이차적 효과들에 따라 결정될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0270] 이하, 본 발명의 기타 특징들 및 장점들은 실시예들 및 도면들을 참고하여 상세히 기술될 것이다.

도 1은 선택된 항-c-Met 항체들의 FACS 프로파일의 예들이다.

도 2A 및 2B는 c-Met 표적하는 항체들에 의한 BXP3 증식의 *생체외* 저해(*in vitro* inhibition)를 나타낸 것이다.

도 3은 c-Met 이중합의 저해를 나타낸 것이다.

도 4는 항-c-Met 항체들에 의한 단백질 인지를 나타낸 것이다.

도 5A 및 5B는 B1Acore 분석법에 의한 11E1 및 5D5의 "에피토프 맵핑 (epitope mapping)"을 나타낸 것이다.

도 6A 및 6B는 c-Met 인산화에 미치는 MAbs 효과를 나타낸 것이다.

도 7A 및 7B는 항-c-Met 항체들에 의한 방사성 표지된 HGF의 치환 (displacement)을 나타낸 것이다.

도 8은 항-c-Met 항체들에 의한 침습의 저해를 나타낸 것이다.

도 9는 상처 치료에 미치는 항 c-Met 항체들의 효과를 나타낸 것이다.

도 10A 및 10B는 스캐터 분석 (scatter assay)을 나타낸 것이다.

도 11은 삼차원적 세관형성 분석 (tubulogenesis assay)을 나타낸 것이다.

도 12A 및 12b는 구형체 (spheroid) 형성에 미치는 항체들의 효과를 나타낸 것이다.

도 13은 U87MG 이종이식 (xenograft) 모델에서 항-c-Met MAbs의 *생체내* 활성을 나타낸 것이다.

도 14는 종양 세포주들의 세트에 의한 HGF 발현을 나타낸 것이다.

도 15A 및 15b는 NCI-H441 세포주의 특징 분석을 나타낸 것이다. 도 15A는 정량적 RT-PCR에 해당하고 도 15B는 FACS 분석에 해당한다.

도 16은 NCI-H441 이종이식 모델에 미치는 항-c-Met 항체들의 *생체외* 활성을 나타낸 것이다.

도 17A는 마우스 IGKV3-5*01 배아 유전자 (germline gene)에 대한 224G11 VL의 정렬을 나타낸 것이다.

도 17B는 마우스 IGKJ4*01 배아 유전자에 대한 224G11 VL의 정렬을 나타낸 것이다.

도 18A는 인간 IGKV3-11*01 및 IGKV4-1*01 배아 유전자에 대한 224G11 VL의 정렬을 나타낸 것이다.

도 18B는 인간 IGKJ4*02 배아 유전자에 대한 224G11 VL의 정렬을 나타낸 것이다.

- 도 19A는 언급된 돌연변이들을 가진 IGKV3-11*01 기초한 224G11의 인간화된 버전을 나타낸 것이다.
- 도 19B는 언급된 돌연변이들을 가진 IGKV4-1*01 기초한 224G11의 인간화된 버전을 나타낸 것이다.
- 도 20A는 마우스 IGHV1-18*01 배아 유전자에 대한 224G11 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 20B는 마우스 IGHD2-4*01 배아 유전자에 대한 224G11 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 20C는 마우스 IGHJ2*01 배아 유전자에 대한 224G11 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 21A는 인간 IGHV1-2*02 배아 유전자에 대한 224G11 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 21B는 인간 IGHJ4*01 배아 유전자에 대한 224G11 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 22는 언급된 돌연변이들을 가진 인간화된 224G11 VH를 나타낸 것이다.
- 도 23A는 마우스 IGKV3-5*01 배아 유전자에 대한 227H1 VL의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 23B는 마우스 IGKJ4*01 배아 유전자에 대한 227H1 VL의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 24A는 인간 IGKV3-11*01 및 IGKV4-1*01 배아 유전자에 대한 227H1 VL의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 24B는 인간 IGKJ4*02 배아 유전자에 대한 227H1 VL의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 25A는 언급된 돌연변이들을 가진 IGKV3-11*01 기초한 227H1 VL의 인간화된 버전을 나타낸 것이다.
- 도 25B는 언급된 돌연변이들을 가진 IGKV4-1*01 기초한 227H1 VL의 인간화된 버전을 나타낸 것이다.
- 도 26A는 마우스 IGHV1-18*01 배아 유전자에 대한 227H1 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 26B는 마우스 IGHD1-1*02 배아 유전자에 대한 227H1 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 26C는 마우스 IGHJ2*01 배아 유전자에 대한 227H1 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 27A는 인간 IGHV1-2*02 배아 유전자에 대한 227H1 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 27B는 인간 IGHJ4*01 배아 유전자에 대한 227H1 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 28은 언급된 돌연변이들을 가진 인간화된 227H1 VH를 나타낸 것이다.
- 도 29A는 마우스 IGKV12-46*01 배아 유전자에 대한 223C4 VL의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 29B는 마우스 IGKJ2*01 배아 유전자에 대한 223C4 VL의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 30A는 인간 IGKV1-NL1*01 배아 유전자에 대한 223C4 VL의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 30B는 인간 IGKJ2*01 배아 유전자에 대한 223C4 VL의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 31은 언급된 돌연변이들을 가진 인간화된 223C4 VL을 나타낸 것이다.
- 도 32A는 마우스 IGKV1-18*01 배아 유전자에 대한 223C4 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 32B는 마우스 IGHD6-3*01 배아 유전자에 대한 223C4 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 32C는 마우스 IGHJ4*01 배아 유전자에 대한 223C4 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 33A는 인간 IGHV1-2*02 배아 유전자에 대한 223C4 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 33B는 인간 IGHD1-26*02 배아 유전자에 대한 223C4 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 33C는 인간 IGHJ6*01 배아 유전자에 대한 223C4 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 34은 언급된 돌연변이들을 가진 인간화된 223C4 VH를 나타낸 것이다.
- 도 35는 마우스 224G11 Mab 단독 또는 나벨빈 (Navelbine)[®] 과의 조합이 확립된 이중이식 NCI-H441 종양 모델에 미치는 항-종양 활성을 나타낸 것이다.
- 도 36은 HUVEC 증식에 대한 항-c-Met Mabs의 평가를 나타낸 것이다.
- 도 37은 HUVEC 세관 형성 (tube formation)에 대한 항-c-Met Mabs의 평가를 나타낸 것이다.

- 도 38A는 마우스 IGKV4-79*01 배아 유전자에 대한 11E1 VL의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 38B는 마우스 IGKJ4*01 배아 유전자에 대한 11E1 VL의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 39A는 인간 IGKV3D-7*01 배아 유전자에 대한 11E1 VL의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 39B는 인간 IGKJ4*02 배아 유전자에 대한 11E1 VL의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 40은 언급된 돌연변이들을 가진 11E1의 인간화된 버전을 나타낸 것이다.
- 도 41A는 마우스 IGHV1-7*01 배아 유전자에 대한 11E1 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 41B는 마우스 IGHD4-1*01 배아 유전자에 대한 11E1 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 41C는 마우스 IGHJ3*01 배아 유전자에 대한 11E1 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 42A는 인간 IGHV1-2*02 및 IGHV1-46*01 배아 유전자들에 대한 11E1 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 42B는 인간 IGHJ4*03 배아 유전자에 대한 11E1 VH의 정렬을 나타낸 것이다.
- 도 43은 언급된 돌연변이들을 가진 인간화된 11E1 VH를 나타낸 것이다.
- 도 44A 및 도 44B는 A549 세포에 대한 c-Met 인산화 분석법을 나타낸 것이다. EC₅₀ 값을 결정하기 위해 (도 44B) HGF가 존재하거나 존재하지 않는 경우 30 μ g/ml (도 44A)에서 또는 0.015 내지 30 μ g/ml 용량 범위 이내에서 순수 분리된 11E1 및 224G11 Mabs의 평가.
- 도 45는 NSCLC NCI-H441 이종이식 모델에서 나벨빈 (navelbine)[®]과 224G11의 생체내 조합 (*in vitro* combination)을 나타낸 것이다.
- 도 46은 NSCLC NCI-H441 이종이식 모델에서 독소루비신 (doxorubicin)과 224G11의 생체내 조합을 나타낸 것이다.
- 도 47은 NSCLC NCI-H441 이종이식 모델에서 도세탁셀 (docetaxel)과 224G11의 생체내 조합을 나타낸 것이다.
- 도 48은 NSCLC NCI-H441 이종이식 모델에서 테모졸로마이드 (temozolomide)와 224G11의 생체내 조합을 나타낸 것이다.
- 도 49A, 49B, 49C 및 49D는 U87-MG 구형체 성장에 미치는 항-c-Met Mabs의 효과를 나타낸 것이다.
- 도 50A 및 50B는 포스포-c-Met 분석 (phospho-c-Met assay)에서 224G11의 조합된 및 인간화된 형태의 생체외 활성을 나타낸 것이다.
- 도 51은 바이오코어 분석법 (Biocore analysis)의 세팅을 나타낸 것이다.
- 도 52는 어티믹 누드 (athymic nude) 마우스에 대한 인간 HGF 출처로서의 MRC5 세포들로 공-이식된 (co-implanted) MDA-MB-231 세포들에 미치는 224G11의 생체내 활성을 나타낸 것이다.
- 도 53은 Fc-c-Met에 대한 ELISA 기초한 결합 분석법 (ELISA based binding assay)을 나타낸 것이다. 항-Fc-c-Met 결합 활성은 항-마우스 Fc 결합체 (conjugate)가 순수 분리된 마우스 모노클론 항체들 11E1, 224G11 및 227H1를 검출하는 데 사용되는 ELISA-기초한 분석법에서 측정되었다. 플라스틱-코팅된 재조합 Fc-c-Met 상에서의 용량-의존성 결합 활성들은 450 nm에서 측정되었다.
- 도 54는 HGF-cMet 경쟁 분석법 (competition assay)을 나타낸 것이다. 이 ELISA-기초한 분석법에서, 플라스틱 코팅된 HGF에 대한 재조합 Fc-cMet 의 잔량 결합은 순수 분리된 마우스 모노클론 항체들 11E1, 224G11 및 227H1의 존재 하에 항-마우스 Fc 결합체를 사용하여 검출되고 450 nm에서 측정되었다.
- 도 55는 227H1-유래 재조합 VH 도메인들의 아미노산 서열들의 정렬을 나타낸 것이다. 227H1 VH 아미노산 서열은 마우스 227H1 VH 서열과 서로 다른 것으로 보이는 언급된 아미노산 서열들과 함께 선택된 인간 구조틀 서열 (human receiving framework sequence)로 정렬된다. 227H1 HZ1, HZ2 및 HZ3 VH 서열들은 굵게 표시된 마우스 잔기들을 가지는 227H1 마우스 VH 도메인의 조작된 인간화된 버전에 해당한다. HZ3에서, 10개 잔기들 (*)은 자동적으로 상대편 인간 잔기들로 변화된다. HZ2에서, 세 번째 그룹 (3)으로부터 나온 7개 잔기들이 연구되었다. HZ1VH에서, 두 번째 그룹 (2)으로부터 나온 9개 잔기들이 상대 인간 잔기들로 돌연변이 되었고, 첫

번째 그룹 (1)으로부터 나온 6개 잔기들만이 마우스의 것으로 남는다.

도 56은 재조합 227H1 항체들의 Fc-c-Met에 대한 ELISA 기초한 결합 분석법을 나타낸 것이다. 항-Fc-c-Met 결합 활성은 항-마우스 Fc 결합체 (conjugate)들이 조합된 및 인간화된 227H1-유래 재조합 항체들을 검출하는 데 사용되는 ELISA-기초한 분석법에서 측정되었다. 플라스틱-코팅된 인간화된 VH 도메인들-유래 227H1 항체들의 재조합 Fc-c-Met 상에서 용량-의존성 결합 활성들은 450 nm에서 측정된 다음 부모/기준 (parental/reference) 조합 항체의 활성들과 비교되었다.

도 57은 재조합 227H1-유래 항체들의 Fc-c-Met에 대한 ELISA 기초한 결합 분석법을 나타낸 것이다. 항-Fc-c-Met 결합 활성은 항-인간 Fc 결합체 (conjugate)들이 조합된 및 인간화된 227H1-유래 재조합 항체들을 검출하는 데 사용되는 ELISA-기초한 분석법에서 측정되었다. 플라스틱-코팅된 인간화된 HZ4VH-유래 227H1 항체의 재조합 Fc-c-Met 상에서 용량-의존성 결합 활성이 450 nm에서 측정된 다음 부모/기준 (parental/reference) 조합 항체의 활성들과 비교되었다.

도 58는 227H1 마우스 및 재조합 항체들의 HGF-cMet 경쟁 분석법 (competition assay)을 나타낸 것이다. 이 ELISA-기초한 분석법에서, 227H1 항체의 서로 다른 형태들의 존재 하에 플라스틱 코팅된 HGF에 대한 재조합 Fc-c-Met의 잔량 결합은 바이오틴 처리된 관련없는 항-c-Met 항체와 함께 검출된다. 순수 분리된 마우스 227H1 모노클론 항체, 조합 및 HZ4VH-유래 인간화된 227H1-유래 재조합 항체들은 조사되고 450 nm에서 측정되어 HGF-cMet 결합과 경쟁하는 능력들에 대해 비교되었다.

도 59는 227H1-HZ 인간화된 가변 도메인 서열을 나타낸 것이다. *,은 상대편 인간의 것들로 변화된 아미노산들에 해당하고; !,는 HZ3 내지 HZ1 처리하는 동안 인간화된 아미노산들에 해당하며; §는 최종 227H1-Hz 서열에서 인간화된 아미노산들에 해당한다.

도 60은 11E1-유래 재조합 VH 도메인들의 아미노산 서열들의 정렬을 나타낸 것이다. 11E1 VH 아미노산 서열은 마우스 11E1 VH 서열과 서로 다른 것으로 보이는 언급만 된 아미노산 서열들과 함께 선택된 인간 구조틀 서열 (human receiving framework sequence)로 정렬된다. 11E1 HZ VH1, VH2 및 VH3 서열들은 굵게 표시된 마우스 잔기들을 가지는 227H1 마우스 VH 도메인의 조각된 인간화된 버전들에 해당한다. HZ VH3에서, 7개 잔기들 (*)은 자동적으로 상대편 인간 잔기들로 변화된다. HZ VH2에서, 세 번째 그룹 (3)으로부터 나온 7개 잔기들이 연구되었다. HZ VH1에서, 두 번째 그룹 (2)으로부터 나온 5개 잔기들이 상대 인간 잔기들로 돌연변이 되었고, 첫 번째 그룹 (1)으로부터 나온 5개 잔기들만이 마우스의 것으로 남는다.

도 61은 재조합 11E1-유래 항체들의 Fc-c-Met에 대한 ELISA 기초한 결합 분석법을 나타낸 것이다. 항-Fc-c-Met 결합 활성은 항-인간 Fc 결합체 (conjugate)들이 조합된 및 인간화된 11E1-유래 재조합 항체들을 검출하는 데 사용되는 ELISA-기초한 분석법에서 측정되었다. 플라스틱-코팅된 인간화된 VH-유래 11E1 항체의 재조합 Fc-c-Met 상에서 용량-의존성 결합 활성이 450 nm에서 측정된 다음 부모/기준 조합 항체의 활성들과 비교되었다.

도 62는 11E1-유래 재조합 VL 도메인들의 아미노산 서열들의 정렬을 나타낸 것이다. 11E1 VL 아미노산 서열은 마우스 11E1 VH 서열과 서로 다른 것으로 보이는 언급만 된 아미노산 서열들과 함께 선택된 인간 구조틀 서열로 정렬된다. 11E1 HZ VL1, VL2 및 VL3 서열들은 굵게 표시된 마우스 잔기들을 가지는 11E1 마우스 VL 도메인의 조각된 인간화된 버전들에 해당한다. HZ VL3에서, 10개 잔기들 (*)은 자동적으로 상대편 인간 잔기들로 변화된다. HZ VL2에서, 세 번째 그룹 (3)으로부터 나온 8개 잔기들이 연구되었다. HZ VL1에서, 두 번째 그룹 (2)으로부터 나온 8개 잔기들이 상대 인간 잔기들로 돌연변이 되었고, 첫 번째 그룹 (1)으로부터 나온 4개 잔기들만이 마우스의 것으로 남는다.

도 63은 재조합 11E1-유래 항체들의 Fc-c-Met에 대한 ELISA 기초한 결합 분석법을 나타낸 것이다. 항-Fc-c-Met 결합 활성은 항-인간 Fc 결합체 (conjugate)들이 조합된 및 인간화된 11E1-유래 재조합 항체들을 검출하는 데 사용되는 ELISA-기초한 분석법에서 측정되었다. 플라스틱-코팅된 인간화된 VL-유래 11E1 항체의 재조합 Fc-c-Met 상에서 용량-의존성 결합 활성이 450 nm에서 측정된 다음 부모/기준 조합 항체의 활성들과 비교되었다.

도 64는 재조합 11E1-유래 항체들의 Fc-c-Met에 대한 ELISA 기초한 결합 분석법을 나타낸 것이다. 항-Fc-c-Met 결합 활성은 항-인간 Fc 결합체들이 조합된 및 인간화된 11E1-유래 재조합 항체들을 검출하는 데 사용되는 ELISA-기초한 분석법에서 측정되었다. 플라스틱-코팅된 인간화된 단일 또는 이중 인간화된 도메인들-유래 11E1 항체의 재조합 Fc-c-Met 상에서 용량-의존성 결합 활성이 450 nm에서 측정된 다음 부모/기준 조합 항체의 활성들과 비교되었다.

도 65는 224G11 VH 도메인의 아미노산 서열들의 정렬을 나타낸 것이다. 224G11 VH 아미노산 서열은 마우스

224G11 VH 서열과 서로 다른 것으로 보이는 언급만 된 아미노산 서열들과 함께 227H1 VH 서열 (밀줄은 비-상동성 잔기들이다)로 그리고 선택된 인간 구조틀 서열로 정렬된다. 224G11 VH0 서열은 마우스 VH 도메인의 인간화된 버전 227H1-기초한/전체-IMGT 224G11에 해당한다. 외부-IMGT-CDRs 잔기들이 없는 이 서열은 마우스의 것으로 남는다.

도 66은 재조합 224G11 항체들의 Fc-c-Met에 대한 ELISA 기초한 결합 분석법을 나타낸 것이다. 항-Fc-c-Met 결합 활성은 항-인간 Fc 결합체들이 조합된 및 HZVH0-유래 인간화된 224G11-유래 재조합 항체들을 검출하는 데 사용되는 ELISA-기초한 분석법에서 측정되었다. 플라스틱-코팅된 HXVH0 전-IMGT 인간화된 VH 도메인-유래 224G11 항체의 재조합 Fc-c-Met 상에서 용량-의존성 결합 활성이 450 nm에서 측정된 다음 부모/기준 조합 항체의 활성들과 비교되었다.

도 67은 224G11 마우스 및 재조합 항체들의 HGF-cMet 경쟁 분석법을 나타낸 것이다. 이 ELISA-기초한 분석법에서, 224G11 항체의 서로 다른 형태들의 존재 하에 플라스틱 코팅된 HGF에 대한 재조합 Fc-c-Met의 잔량 결합은 바이오틴 처리된 관련없는 항-c-Met 항체와 함께 검출된다. 순수 분리된 마우스 224G11 모노클론 항체, 조합 및 HZVH0-유래 인간화된 224G11-유래 재조합 항체들은 조사되고 450 nm에서 측정되어 HGF-cMet 결합과 경쟁하는 능력들에 대해 비교되었다.

도 68은 224G11 VL 도메인의 아미노산 서열들의 정렬을 나타낸 것이다. 224G11 VL 아미노산 서열은 마우스 224G11 VL 서열과 서로 다른 것으로 보이는 언급만 된 아미노산 서열들과 함께 선택된 인간 구조틀 서열로 정렬된다. 224G11 HZ VL3 서열은 224G11 마우스 VH 도메인의 보다 짧은 CDR1 인간화된 버전에 해당하는 한편, HZ VL6은 굵게 표시된 남아있는 마우스 잔기들을 가지는 더 긴 CDR1 버전에 해당한다. 기본적인 인간화된 버전들 모두에서, 남아있는 마우스 잔기들은 인간화 과정에 따라 순위가 매겨진다. 여기서 *은 기본 버전들에서 인간화된 아미노산들에 해당하고, 3, 2 및 1은 처리된 인간화된 버전들의 디자인에 사용되는 잔기 그룹들에 해당한다.

도 69는 재조합 224G11 항체들의 Fc-c-Met에 대한 ELISA 기초한 결합 분석법을 나타낸 것이다. 항-Fc-c-Met 결합 활성은 항-인간 Fc 결합체들이 조합된 및 인간화된 224G11-유래 재조합 항체들을 검출하는 데 사용되는 ELISA-기초한 분석법에서 측정되었다. 플라스틱-코팅된 인간화된 VL3 및 VL6 도메인들-유래 224G11 항체들의 재조합 Fc-c-Met 상에서 용량-의존성 결합 활성이 450 nm에서 측정된 다음 부모/기준 조합 항체의 활성들과 비교되었다.

도 70은 재조합 224G11 항체들의 Fc-c-Met에 대한 ELISA 기초한 결합 분석법을 나타낸 것이다. 항-Fc-c-Met 결합 활성은 항-인간 Fc 결합체들이 조합된 및 인간화된 224G11-유래 재조합 항체들을 검출하는 데 사용되는 ELISA-기초한 분석법에서 측정되었다. 플라스틱-코팅된 인간화된 VL 도메인들-유래 224G11 항체들의 재조합 Fc-c-Met 상에서 용량-의존성 결합 활성이 450 nm에서 측정된 다음 부모/기준 조합 항체의 활성들과 비교되었다.

도 71은 224G11 마우스 및 재조합 항체들의 HGF-cMet 경쟁 분석법을 나타낸 것이다. 이 ELISA-기초한 분석법에서, 224G11 항체의 서로 다른 형태들의 존재 하에 플라스틱 코팅된 HGF에 대한 재조합 Fc-c-Met의 잔량 결합은 바이오틴 처리된 관련없는 항-c-Met 항체와 함께 검출된다. 순수 분리된 마우스 224G11 모노클론 항체, 조합된 및 HZ VL4-유래 인간화된 224G11-유래 재조합 항체들은 조사되고 450 nm에서 측정되어 HGF-cMet 결합과 경쟁하는 능력들에 대해 비교되었다.

도 72는 VL4 인간화된 224G11 VL 도메인 서열의 아미노산 서열을 나타낸 것이다. *,은 기본 HZ VL6 버전에서 상대편 인간의 것들로 변화된 아미노산들에 해당하고; !,는 HZ VL6 내지 HZ VL4 처리하는 동안 인간화된 아미노산들에 해당하며; §는 224G11-HZ VL4 서열에서 남아있는 마우스의 아미노산들에 해당한다.

도 73은 재조합 224G11 항체들의 Fc-c-Met에 대한 ELISA 기초한 결합 분석법을 나타낸 것이다. 항-Fc-c-Met 결합 활성은 항-인간 Fc 결합체들이 조합된 및 인간화된 224G11-유래 재조합 항체들을 검출하는 데 사용되는 ELISA-기초한 분석법에서 측정되었다. 플라스틱-코팅된 단일- 또는 이중-인간화된 도메인들-유래 224G11 항체들의 재조합 Fc-c-Met 상에서 용량-의존성 결합 활성이 450 nm에서 측정된 다음 부모/기준 조합 항체의 활성들과 비교되었다.

도 74는 224G11 마우스 및 재조합 항체들의 HGF-cMet 경쟁 분석법을 나타낸 것이다. 이 ELISA-기초한 분석법에서, 224G11 항체의 서로 다른 형태들의 존재 하에 플라스틱 코팅된 HGF에 대한 재조합 Fc-c-Met의 잔량 결합은 바이오틴 처리된 관련없는 항-c-Met 항체와 함께 검출된다. 순수 분리된 마우스 224G11 모노클론 항체, 조합된 및 전체 인간화된 224G11-유래 재조합 항체들은 조사되고 450 nm에서 측정되어 HGF-cMet 결합과 경쟁하는 능력들에 대해 비교되었다.

도 75는 재조합 224G11 항체들의 Fc-c-Met에 대한 ELISA 기초한 결합 분석법을 나타낸 것이다. 항-Fc-c-Met 결합 활성은 항-인간 Fc 결합체들이 조합된 및 인간화된 224G11-유래 재조합 항체들을 검출하는 데 사용되는 ELISA-기초한 분석법에서 측정되었다. 플라스틱-코팅된 VL4-유래 전체 인간화된 224G11 항체들의 단일 돌연변이들의 재조합 Fc-c-Met 상에서 용량-의존성 결합 활성이 450 nm에서 측정된 다음 부모/기준 조합 항체의 활성들과 비교되었다.

도 76은 재조합 224G11 항체들의 Fc-c-Met에 대한 ELISA 기초한 결합 분석법을 나타낸 것이다. 항-Fc-c-Met 결합 활성은 항-인간 Fc 결합체들이 조합된 및 인간화된 224G11-유래 재조합 항체들을 검출하는 데 사용되는 ELISA-기초한 분석법에서 측정되었다. 플라스틱-코팅된 VL4-유래 전체 인간화된 224G11 항체들의 단일 및 다중 돌연변이들의 재조합 Fc-c-Met 상에서 용량-의존성 결합 활성이 450 nm에서 측정된 다음 부모/기준 조합 항체의 활성들과 비교되었다.

도 77은 224G11 마우스 및 재조합 항체들의 HGF-cMet 경쟁 분석법을 나타낸 것이다. 이 ELISA-기초한 분석법에서, 224G11 항체의 서로 다른 형태들의 존재 하에 플라스틱 코팅된 HGF에 대한 재조합 Fc-c-Met의 잔량 결합은 바이오틴 처리된 관련없는 항-c-Met 항체와 함께 검출된다. 순수 분리된 마우스 224G11 모노클론 항체, 조합된 항체 및 VL4-유래 전체 인간화된 224G11 재조합 항체들의 단일 또는 다중 돌연변이들이 조사되고 450 nm에서 측정되어 HGF-cMet 결합과 경쟁하는 능력들에 대해 비교되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0271] 실시예 1: c-Met에 대한 항체들의 생산
- [0272] 항-c-Met 항체들을 생산하기 위해, 8주 된 BALB/c 마우스가 c-Met을 세포질 막 (plasma membrane) 상에 발현하는 형질전환된 CHO 세포주를 사용하여 (20 x 10⁶ 세포/용량/마우스) 3 내지 5회 면역화되고, c-Met 세포의 도메인 융합 단백질 (10-15 μg/용량/마우스) (R & D 시스템사, 카탈로그 번호 358MT) 또는 이 재조합 단백질의 단편들이 첫 번째 면역화를 위한 완전 프렌드 아주반트 (complete Freund adjuvant) 그리고 이후 면역화를 위한 비완전 프렌드 아주반트와 혼합되어 2 내지 3회 피하로 면역화되었다. 마우스가 CHO-c-Met 세포들 및 재조합 단백질들을 수여하게 되는 혼합된 프로토콜들도 역시 수행되었다. 세포 융합 3일 전에 마우스는 재조합 단백질 또는 단편들을 사용하여 i.p. 또는 i.v. 추가 자극 (boost)되었다. 그 다음 마우스의 비장들이 채취되고 SP2/0-Ag14 마이엘로마 세포들에 융합되어 HAT 선별이 착수되었다. 4번 융합들이 시행되었다. 일반적으로, 모노클론 항체들 또는 그들의 기능적 단편들을 제조하기 위해, 구체적으로 마우스 기원의 경우 "항체들 (Antibodies)" 매뉴얼에 상세히 기술되어 있는 기술들 (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp.726, 1988) 또는 코흘러 및 밀스타인이 기술한 하이브리도마의 제조 기술 (Kohler and Milstein, Nature, 256:495-497, 1975)을 참고하는 것이 가능하다.
- [0273] 생산된 항체들이 종양 세포주들에서 그대로의 (native) 수용체도 인식할 수 있는 것을 확인하기 위해, 획득된 하이브리도마는 처음에 c-Met 재조합 단백질을 사용한 ELISA에 의해 검색된 다음 A549 NSCLC, BxPC3 이자 (pancreatic) 세포주와 U-87-MG 신경교아세포종 (glioblastoma) 세포주를 사용하여 FACS 분석에 의해 조사되었다 (대표적인 프로파일들이 도 1에 나타나있다). 이들 2 시험들에서 양성 반응물들은 증폭되고 클론되었으며, 또한 하이브리도마 세트가 회수되어 순수 분리되고 BxPC3 모델을 사용하여 *생체외* 세포 증식을 저해하는 능력이 검색되었다.
- [0274] 이 목적을 위해, 50000 BxPC3 세포들이 SVF가 없는 2 mM L. 글루타민을 포함하는 RPMI 배지를 사용하여 96-웰 플레이트에 접종되었다. 접종 24시간 후에, 조사될 항체들이 최종 농도 0.0097 내지 40 μg/ml 범위로 100 ng/ml의 hHGF를 첨가하기 60분 전에 첨가되었다. 3일 후에, 세포들은 0.5 μCi [³H]티미딘을 사용하여 16시간 동안 표지되었다 (pulse labelled). 트리클로로아세트산-불용성 DNA에 삽입된 [³H]티미딘은 액체 신틸레이션 측정법 (liquid scintillation counting)에 의해 정량되었다. 결과들은 정돈되지 않은 그대로, 각 Mab의 본질적인 길항 효과 (agonistic effect)를 실제로 평가하기 위해 정리되었다 (도 2A 및 2B).
- [0275] 그 다음 적어도 50%의 세포 증식을 저해하는 항체들은 c-Met 형질전환된 세포들을 사용하여 상청액 상태로 BRET 분석법에 의해 평가되었다. 이 목적을 위해, c-Met-Rluc 또는 c-Met-Rluc 및 c-Met-K1100A-YFP를 발현하는 안정한 CHO 세포주들이 제작되었다. 세포들은 DMEM-F12/5% FBS 배양 배지를 사용하여 화이트 96-웰 마이크로플레이트들 상에 BRET 실험들 하루 또는 이틀 전 접종되었다. 세포가 플레이트 위에 부착되게 하기 위해 세포들은 먼저 37° C에서 5% CO₂ 조건에서 배양되었다. 그 다음 세포들은 200 μl DMEM/웰 배지를 사용하여 하룻밤 동안

끓였다. 실험 직전에 바로 DMEM을 제거하고 세포를 PBS를 사용하여 신속히 세척하였다. 세포들은 시험될 항체들 또는 기준 화합물 (reference compound)들이 존재하거나 존재하지 않는 조건에서 PBS를 사용하여 HGF가 있거나 없이 최종 부피 50 µl의 실렌타라진 (coelenterazine)을 첨가하기 전 37° C에서 10분 배양되었다. 10분 더 37° C에서 배양한 후에, 485 nm 및 530 nm에서 빛-방출 획득 (light-emission acquisition)이 미스라스 루미노미터 (Mithras luminometer)(베르틀드사)를 사용하여 시행되었다 (1s/과장/웰이 15회 반복됨).

[0276] BRET 비율은 이전에 하기와 같이 정의되었다 (Angers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:3684-3689): $[(530 \text{ nm에서 방출}) - (485 \text{ nm에서 방출}) \times Cf] / (485 \text{ nm에서 방출})$, 여기서 Cf는 동일한 시험 조건들 하 Rluc 융합 단백질을 단독으로 발현하는 세포들에서의 (530nm에서 방출) / (485 nm에서 방출)에 해당한다. 이 수학적식을 단순화하면, BRET 비율은 두 개 파트너들이 존재할 때 얻어지는 530/485 nm 비율에 해당하고, R. 레니포르미스 루시페라제 (R. reniformis luciferase)와 융합한 하나 파트너만이 분석법에 존재할 때 동일한 실험 조건들 하 530/485 nm 비율에 의해 수정된다. 해독되기 위해, 결과들은 밀리 BRET 유닛 (milliBRET Uits, mBU)으로 표현되고; mBU는 1000을 곱한 BRET 비율에 해당한다.

[0277] 이 두 번째 생체외 테스트 이후에, 4개 항체들이 i) 증식의 기능 시험에서 분자 전체의 본질적인 활성 (intrinsic activity)이 없고, ii) BxPC3 증식을 상당히 저해하며 (도 2A 및 2B), 그리고 iii) c-Met 이중합을 저해하는 것으로서 선택되었다. 이들 IgG1 카파 이소타입의 3가지 항체들은 11E1, 224G11, 223C4 및 227H1이다. 이 실험들에서 제넨테크사에서 생산하고 ATCC로부터 입수 가능한 5D5 Mab이 본질적인 길항 활성을 가지는 대조군으로서 추가되었다.

[0278] 도 2A 및 2B는 11E1, 224G11, 223C4 및 227H1이 작동제 활성 (agonist activity)이 전혀 없는 것을 세포 증식을 리간드가 없이 용량 의존적으로 자극하는 5D5와 비교하여 나타낸다. 4가지 선택된 항체들은 세포 증식을 상당히 저해하는 것이 관찰되었다. 5D5는 이 시험에서 HGF-유도성 세포 증식에 효과를 미치지 않는다.

[0279] 이중합의 차단을 측정할 때, 224G11, 223C4, 11E1 및 227H1은 각각 32, 55, 69 및 52%에 이르도록 이중합을 저해하는 유의한 효과를 나타내었다. 실험들 각각에서 기본 신호 (basal signal)들과 비교하여, 5D5 항체는 이 이중합 모델에서 효과를 나타내지 않는다.

[0281] 실시예 2: 항-c-Met 항체들에 의한 단백질 인지

[0282] 3가지 선택된 항체들의 인지 (recognition) 양상을 분석하기 위하여, 3가지 ELISA가 재조합 c-Met 단백질, 그의 모노머 단편 (재조합 c-Met-Fc 단백질 및 재조합 SEMA 도메인의 절단으로 획득되는)을 사용하여 확립 (set up) 되었다.

[0283] 도 4에 나타난 결과들은 4가지 항체들이 다이머 (dimeric) 및 모노머 (monomeric) 단백질 모두를 인지하는 것을 보여주었다. ELISA를 수행하기 위해 인간 다이머 c-Met 단백질 (R & D 시스템사, 카탈로그 번호 385MT)이 PBS를 사용하여 4°C에서 하룻밤 동안 0.7 µg/ml 농도로 코팅된다. 플레이트들을 0.5% 젤라틴 용액을 사용하여 37°C에서 2시간 포화시킨 다음, 하이브리도마 상청액들을 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 일단 PBS로 린스하고 나서, 항-마우스 HRP-항체 (잭슨 이뮤노리서치사, 카탈로그 번호 115-035-164)는 각 웰에 ELISA 완충용액 (0.1% 젤라틴/0.05% 트윈 20이 포함된 PBS)으로 1/5000 희석하여 첨가하고 그 결과 얻은 플레이트들을 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 3번 세척한 다음, TMB 기질 (옵티마 (Uptima)사) 50 µl를 첨가하여 퍼옥시다제 활성이 나타나도록 한다. 이 반응이 상온에서 5분 동안 진행되도록 방지한다. 이 반응은 1 M H₂SO₄ 용액을 50 µl/웰로 첨가하여 정지시키고, 450 nm 플레이트 리더를 사용하여 결과를 읽는다. 동일한 종류의 프로토콜이 모노머 c-MET 및 SEMA 도메인을 사용하여 시행되었고 이 때 단백질들은 각각 5 및 3 µg/ml 농도로 코팅되었다.

[0284] 양성 대조군으로서 도입한 5D5 Mab는 예상한 바와 같이 SEMA 단백질을 인지하였다. 224G11, 227H1 및 223C4는 SEMA 도메인과 결합하지 않았고 11E1은 SEMA와 결합할 수 있었다.

[0285] 모두가 SEMA 도메인을 인지하는 11E1 및 5D5는 겹치는 (overlapping) 에피토프들에 대해 서로 경쟁하는지 여부를 결정하기 위하여, BIAcore 분석법으로 조사되었다. 표면 플라즈몬 공명 현상 (surface plasmon resonance phenomenon)에 기초한 BIAcore 시스템은 실시간으로 결합 반응들을 감시하여 데이터를 제공한다. 이 때 소위 "에피토프 맵핑 (epitope mapping)"이라고 불리는 시험에서 항체들을 그룹화하는 것이 유용하다. 항원 분자에 동시에 결합할 수 없는 항체들 쌍은 동일한 그룹으로 분류된다 (일치하는 또는 이웃하는 결합 부위들). 반대로 이들 각각의 결합 부위들이 양쪽 항체들이 동시에 결합할 정도로 충분히 거리가 먼 경우, 이들은 이후 2개의 서로 다른 그룹들로 분류된다. 이러한 실험들에서, 항원은 리간드 (센서 칩 (sensorchip)에 고정된)로 공통적으로 사

용되고 항체들은 분석체 (analyte)로서 (용액상) 어떠한 표지 (labelling)도 없이 사용된다.

[0286] 기술되어 있는 모든 실험들은 BIAcore X 기기 (GE 헬스케어 유럽 GmbH)를 사용하여 수행되었다. 마우스 항-Tag-6His Mab (R & D 시스템사 참고번호 MAB050)로 활성화된 CM5 센서칩 (BIAcore사)은 아민 커플링 키트 (BIA사)를 사용하여 제조자 지침들에 따라 제조되었다. 작동 완충용액 (HBS-EP) 및 재생 완충용액 (글리신, HCl)이 BIAcore사로부터 제공된다. 조합된 분자 c-Met-Fc-Tag His로서 생산된 인간 HGF 수용체의 재조합 수용성 버전이 R & D 시스템사로부터 제공되었다 (참고번호 358-MT-CF). 실험들은 25°C에서 30 µl/분 유속 (flow rate) 하에서 수행되었다. 작동 완충용액을 사용한 c-Met 10 µg/ml 용액이 1분 동안 플로우웰2 (fc2) 상에 주입되었고, 전형적으로 c-Met의 수용성 형태 270RU가 포획되었다. 플로우웰1 (fc1)이 센서칩 매트릭스에서 항체들의 비특이 결합을 조사하는 기준으로서 사용되었다.

[0287] 시험될 항체들이 순서적으로 주입되었다. 항체는 2분 동안 플로우웰 양쪽에 주입되었다. 그 다음 두 번째 항체 (또는 동일한)가 동일한 조건들 하에 주입되었다. 유의한 결합이 관찰되지 않는다면, 세 번째로 또 다른 항체가 주입된다. 그 다음 센서칩은 재생 완충용액을 단회 30초 주입하여 재생되었다. 항체들 또는 c-Met-Fc가 이 단계에서 제거되었다.

[0289] 결과들의 분석:

[0290] "A" 항체가 항체 "B"의 결합을 억제하는 능력은 $BIA/C = (R2A/B/R1B) \times 100$ 비율에 의해 계산된다: 여기서 R2A/B는 Mab "B"가 Mab "A" 이후에 주입되는 경우 그의 결합에 해당하고, R1B는 Mab "B"가 먼저 주입될 때 그의 결합에 해당한다. 20% 미만의 BIA/C 값은 A가 B의 결합을 억제할 수 있고 A와 B는 이웃하는 결합 부위들을 가지는 것을 의미한다.

[0291] 에피토프 맵핑은 2개 Mabs, 11E1 및 5D5를 사용하여 수행되었다.

표 3

2 nd Ab (B)	11E1	5D5
1 st Ab (A)		
11E1	<u>6.5%</u>	84.2%
5D5	98.4%	<u>11.0%</u>

[0292]

[0293] Mabs 5D5 (첫 번째), 5D5 (두 번째) 및 11E1 (세 번째)를 10 µg/ml 농도로 2분 연속 주입하여 약 270RU의 포획된 c-Met-Fv 결합을 관찰하였다. 5D5 및 11E1은 두 개 서로 떨어진 부위에 명확히 결합하는 것을 알 수 있었다 (도 5A). 이 결과는 항체의 상호 서열 (reciprocal sequence)에 의해 입증되었다 (도 5B).

[0294] 표 3은 이들 2개 항체들의 서로 다른 서열들을 사용하여 획득된 계산도 비율 (calculation ratio)을 정리하였다. 검은색 값들은 (75% 초과)는 Mab A가 Mab B 결합을 방해하지 못하는 것을 의미한다. 굵은/이탤릭 값들은 (20% 미만) 양쪽 항체의 결합 부위들 (A 및 B)이 일치하거나 동시에 결합할 수 없을 정도로 충분히 가까운 것을 의미한다.

[0296] 실시예 3: c-Met 인산화에 미치는 Mabs의 효과

[0297] c-Met 인산화에 미치는 항-c-Met 항체들의 활성을 결정하기 위하여, 포스포 c-Met ELISA 분석법이 수립되었다. 간략히 500 000 A549 세포들이 F12K 배지 + 10% FCS를 사용하여 6-웰 플레이트들의 각 웰에 접종되었다. HGF (100 ng/ml) 첨가 16시간 전에, 세포들을 굽기고 시험될 각 항체가 최종 농도 30 µg/ml로 리간드 자극 15분 전에 첨가되었다. HGF 첨가하고 15분 후에, 차가운 용해 완충용액 (lysis buffer)이 첨가되었고, 세포들은 긁어내어 세포 용출물이 수확되었다. 이를 4°C에서 10분 동안 13000 rpm으로 원심분리하였다. 상청액들이 BCA 키트 (피어스사)를 사용하여 정량되고 -20°C에 보관되었다. ELISA 분석법을 위해, 염소 항-c-Met 항체 (R & D 참고번호 AF276)이 포획 항체 (4°C에서 하룻밤 코팅된)로서 사용되고, TBS-BSA 5% 완충용액을 사용하는 포화 단계

(saturation step) 이후 (상온에서 1시간), 서로 다른 세포 용출액들로부터 나온 25 µg 단백질이 96-웰 플레이트의 각 웰에 첨가되었다. 상온에서 90분 동안 배양한 다음 플레이트들은 4번 세척되었고 항-포스포-c-Met 항체 (토끼 항-pY1230-1234-1235 c-Met)가 첨가되었다. 추가로 1시간 배양하고 4번 세척한 다음, 항-토끼-HRP (바이오소스사)가 상온에서 1시간 동안 첨가되고 루미놀 (luminol) 기질이 첨가되어 미스라스 기기를 사용하여 발광을 측정하였다. 도 6B에 나타난 결과들은 11E1, 224G11, 223C4 및 227H1가 5D5 Mab와 비교하여 더 약하게 c-Met 인산화를 저해 (42%)하고, 이 때 c-Met 인산화를 각각 68, 54, 80 및 65% 저해하는 것을 보여주었다. 이 시험에서, 기본 효과 (20% 이하)가 약한 것을 4가지 후보 항체들을 사용하여 관찰하였다 (도 6A). 이 특허에서 나타난 다양한 실시예들에 기술된 바와 같이, 이 약한 기본 효과는 다른 생체외 및 생체내 시험들에서 항체들의 활성 결과들이라고 생각되지 않는다. 대조군으로 사용된 5D5는 이 시험에서 유의한 기본 효과를 나타내었다.

[0298]

[0299]

실시예 4: 항-c-Met 항체들에 의한 방사성-표지된 HGF의 치환

[0300]

항-c-Met 항체들이 HGF를 치환할 수 있는지 여부를 확인하기 위해, 결합 실험이 시행되었다. 간략히, 단백질 A 플래쉬플레이트 (FlashPlate) 96-웰 마이크로플레이트들 (피진엘머사)이 0.5% 젤라틴을 첨가한 PBS를 사용하여 코팅 단백질로서 재조합 c-Met-Fc (R & D 시스템사)를 첨가하기 전 포화되었다 (200 µg/웰, 상온에서 2시간). PBS를 사용한 1 µg/ml c-Met-Fc 용액 2천 µl가 각 웰에 첨가되었다. 그 다음 플레이트들은 4°C에서 하룻밤 동안 배양되었다. 자유로이 남아있는 단백질 A 부위들은 상기에 더하여 적절하지 못한 (non relevant) hlgG (PBS를 사용하여 0.5 µg/웰)로 상온에서 2시간 동안 포화되었다. 플레이트들은 각 단계 이후에 PBS 용액으로 세척되었다.

[0301]

경쟁 분석법을 위해, 고정된 c-Met를 사용한 200 pM에서의 [¹²⁵I]-HGF (특이 활성 ~ 2,000 Ci/mmol) 결합이 항-c-Met 모노클론 항체들, 11E1, 224G11, 223C4, 227H1 또는 HGF (R & D 시스템사)의 농도들을 0.1 pM 내지 1 µM의 범위로 PBS pH 7.4 에서 변화시키면서 측정되었다. 플레이트들은 상온에서 6시간 동안 반응시킨 다음 팩커드 탑 카운트 (Packard Top Count) 마이크로플레이트 신티레이션 측정기를 사용하여 측정되었다. 비특이 결합이 1 µM HGF 존재 하에서 결정되었다. 모노클론 항체 9G4는 c-Met에 반응하지 않지만, 대장균 단백질을 특이적으로 인지하여 마우스 IgG1이소타입 대조군으로 사용되었다.

[0302]

전체 특이 [¹²⁵I]-HGF 결합은 세미로그 그래프들에 리간드 농도 함수로서 표현되었다. 방사성 리간드 결합을 50% 저해하는 데 필요한 다양한 저해제들의 농도 (IC₅₀)들이 만족 경쟁 곡선들로부터 결정되었다 (도 7A 및 7B). 모노클론 항-c-Met 항체들인 11E1, 224G11, 223C4 및 227H1은 고정된 c-Met에 대한 [¹²⁵I]-HGF 결합을 각각 IC₅₀ 값 20 nM, 3 nM, 2.7 nM 및 5.8 nM에서 저해할 수 있었다. 항체들 224G11, 223c4 및 227H1에 대해 결정된 IC₅₀ 값은 비방사성 표지된 HGF에 대해 결정된 IC₅₀ 값과 비교되었고 이는 3 및 5 nM 사이인 반면, 항체 11E는 더 높은 IC₅₀ 값을 가지는 것을 알 수 있었다.

[0304]

실시예 5: 항-c-Met 항체들에 의한 침습 저해

[0305]

항-c-Met 항체들이 침습 과정에 미치는 저해 효과를 측정하기 위하여, A549 세포들이 BD 바이오코트TM 매트리지겔TM (BD BiocoatTM MatrigelTM) 침습 체임버 (8 µm 공극 크기의 폴리카보네이트 막들을 가진 반경 6.5 mm의 웰들)의 윗 칸에 접종되었다. A549 세포들은 침습 분석을 실시하기 전 24시간 동안 굶졌다. 그 다음 500 000 A549 세포들이 화학주성 완충용액 (chemotaxis buffer)을 사용하여 각 체임버의 상위 웰에 시험된 항체가 있거나 없이 (최종 Mab 농도 10 µg/ml) 매트리지겔 코팅 상에 접종되었다. 37°C 5% CO₂에서 플레이트들을 1시간 배양한 다음, 더 낮은 체임버들은 400 ng/ml rhHGF를 포함하는 성장 배지 또는 성장 배지만으로 채워졌다. 체임버들은 추가로 48시간 동안 37°C 5% CO₂에서 배양되었다. 이 배양의 마지막에, 필터의 상위 표면에 남아있는 세포들은 면봉을 사용하여 조심스럽게 제거되고, 필터의 하위 표면으로 이동한 세포들은 용해되어 CyQuantGR 염색 완충용액 (인비트로젠사)으로 염색되었으며 형광 리더 베르톨드 미스라스 LB940을 사용하여 측정되었다. 모든 조건들은 3번 반복 (triplicates) 시험되었다.

[0306]

예상한 바와 같이, HGF는 종양 세포들의 침습을 양성 대조군으로 도입된 10% FCS를 사용하여 관찰된 것과 비교하여 유의하게 유도하였다 (도 8). 이소타입 대조군으로서 도입된 마우스 IgG1 9G4는 IgG가 없이 접종된 세포들과 비교하여 기본 침습 또는 HGF-유도성 침습에 유의한 효과가 없다. 11E1, 224G11, 223C4 및 227H1는 단독으로

첨가될 때 작동제 효과가 관찰되지 않았고, HGF-유도성 침습의 유의하고 비교될만한 저해가 3개 Mabs를 사용하여 관찰되었다.

- [0308] 실시예 6: 항-c-Met 항체들에 의한 상처 치유 저해
- [0309] HGF는 이동 (mobility)을 자극한다. 항-HGF 항체들이 이동을 저해할 수 있는지 여부를 결정하기 위해, NCI-H441 세포들이 높은 농도로 배양되고 P200 피펫 팁을 사용하여 간격 (gap)이 도입되었다. 그 다음 세포들은 HGF (100 ng/ml)를 처리하여 11E1의 존재 또는 부재 하에서 간격을 통과하여 이동하도록 자극되었다. 11E1만을 가지는 웰들도 역시 평가되었다. 각 시험 조건은 6번 반복 시행되었고 3번의 독립적인 실험들이 수행되었다. 하룻밤 배양한 후, 세포들은 액시오 비전 (Axio Vision) 카메라를 사용하여 관찰되었다 (objective x4).
- [0310] HGF는 이동을 유의하게 유도하였고 하룻밤 내에 간격이 완전히 닫히게 하였다 (도 9). 이소타입 대조군으로 사용되는 9G4 부적절 IgG1은 세포 이동에 어떠한 효과도 미치지 않는다. 예상한 바와 같이, 작동제 (agonist) 효과는 5D5가 단독으로 첨가될 때 관찰되지만 HGF가 존재하는 경우 이 항체로 간격이 열려진 부분에서 세포 이동의 저해가 유의하게 관찰된다. 5D5의 Fab 단편은 단독으로 첨가될 때 작동제 효과가 전혀 없었다. 이소타입 대조군 9G4를 사용하여 관찰되는 바, MAb 11E1은 단독으로 첨가될 때 작동제 효과가 없고 HGF 존재 하에서 완전한 길항제 (antagonist)로서 행동한다.
- [0312] 실시예 7: 스캐터 분석
- [0313] SK-HEP-1 세포들이 24-웰 플레이트 상에 10% FCS를 가진 DMEM을 사용하여 낮은 밀도 (1.10^4 세포/웰)로 접종되고, HGF (100 ng/ml)와 시험될 항체들 ($10 \mu\text{g/ml}$)을 동시에 첨가하기 전 24시간 동안 성장시켰다. 배양 72시간 후에, 콜로니들이 고정되고 메탄올에 첨가된 0.2% 크리스탈 바이올렛을 사용하여 염색되었으며 스캐터 정도가 시각적으로 평가되었다. 각 시험 조건이 3회 반복 조사되었고 3개 독립적인 실험들이 수행되었다.
- [0314] SK-HEP-1 세포들에 HGF를 첨가하여 세포 분산을 유의하게 유도하였다 (도 10A 및 10B). 이소타입 대조군으로서 도입된 9G4 항체는 단독으로 또는 HGF 존재 하에서 효과가 없다. 예상한 바대로 5D5 항체는 단독으로 유의한 작동 효과를 나타내었고 5D5가 HGF와 함께 첨가되는 경우에 저해 효과가 관찰되지 않았다. 11E1 (도 10A) 또는 224G11 (도 10B)를 단독으로 함께 첨가한 경우에도 작동 효과는 전혀 관찰되지 않았다. 이들 항체들의 유의한 저해 효과는 HGF 존재 하에 나타났다 (도 10A 및 10B).
- [0316] 실시예 8: 삼차원 세관형성 분석
- [0317] SK-HEP-1 세포들이 24-웰 플레이트 상에 10% FCS/매트리젤 (50/50)를 가진 DMEM을 사용하여 1.10^4 세포/웰 농도로 접종되고, HGF (100 ng/ml)와 시험될 항체들 ($10 \mu\text{g/ml}$)을 동시에 첨가하기 전 24시간 동안 성장시켰다. 배양 7일 후에, 콜로니들이 세포들은 세관 형성에 대해 시각적으로 평가되었다. 각 시험 조건이 3회 반복 조사되었고 3개 독립적인 실험들이 수행되었다.
- [0318] HGF 첨가는 SK-HEP-1 세관 형성을 유의하게 유도하였다 (도 11). 이소타입 대조군으로 도입된 항체 9G4는 단독으로 또는 HGF 존재 하에서 효과가 없었다. 예상한 바대로 5D5 항체는 단독으로 유의한 작동 효과를 나타내었고, 5D5가 HGF와 함께 첨가되는 경우 저해 효과가 관찰되지 않았다. 11E1, 223C4 및 224G11을 단독으로 함께 첨가한 경우에도 작동 효과는 전혀 관찰되지 않았고, HGF가 존재할 때 11E1 및 223C4 양쪽 모두를 첨가하여 완전한 저해 효과를 관찰할 수 있었다. 224G11 Mab를 사용하여 부분적이지만 유의한 저해가 관찰되었다.
- [0320] 실시예 9: 구형체 형성
- [0321] 항-c-Met 항체들이 *생체외* 종양 성장을 저해하는 능력을 *생체내* 상황과 유사한 모델에서 평가하기 위해, U-87MG 인간 신경교아세포종 세포들 (ATCC 제 HTB-14호)의 구형체들이 생성되었다. 단일층으로 자란 세포들은 트립신-EDTA로 탈착시키고 10% FBS를 보충한 완전한 세포 배양배지 (DMEM)를 사용하여 재현탁 되었다. DMEM-10% FCS를 사용하여 둥근 바닥 96 플레이트의 단일 웰들 내로 625 세포들을 접종하여 구형체들이 형성되도록 촉발시켰다. 기질 상에 세포 부착을 방해하기 위해, 플레이트는 95% 에탄올에서 폴리HEMA로 미리 코팅되었고 상온에서 공기 건조시켰다. 플레이트들은 37°C 5% CO₂ 표준 세포 배양 조건들 하에 습윤 인큐베이터들에서 배양되었다. 순수 분리된 모노클론 항체들 ($10 \mu\text{g/ml}$)이 구형체 배양 3 및 7일 후에 첨가되었다. HGF (400 ng/ml)이 배양 4일 후에 한 번 첨가되었다. 구형체들은 적어도 10일 동안 배양이 유지되었다. 그 다음 구형체 성장은 액시오비전 소프트웨어의 자동측정 모듈 (suto-measure module)을 사용하여 구형체들의 면적을 측정하여 감시하였다. 면적은 μm^2 단위로 표시하였다. 8-16개의 구형체들이 각 조건에서 조사되었다.

- [0322] 도 12A 및 12B는 10% FCS 존재 하에 HGF가 완전 배지 내로 첨가될 때 자극이 관찰되지 않는 것을 보여주었다. 예상된 바대로, 9G4 이소타입 대조군은 구형체 성장에 효과가 없다. 11E1 및 223C4는 HGF가 존재하거나 부재하는 경우 모두에서 구형체 성장을 유의하게 감소시켰다. 5D5 Fab 단편에서는 효과가 전혀 관찰되지 않았다.
- [0324] 실시예 10: U87MG 이종이식 모델에서 항-c-Met Mabs의 생체내 활성
- [0325] 6 내지 8주 된 어티믹 마우스는 멸균된 필터가 덮힌 사육상자에 두어 무균 조건들 하에서 유지시키고 프랑스 및 유럽 가이드라인들에 따라 조작되었다. c-Met을 발현하고 리간드 HGF에 대해 자가적인 (autocrine) U87-MG 신경교아세포종 세포주가 생체내 평가들을 위해 선택되었다. 마우스에 5×10^6 세포들이 피하로 주입되었다. 그 다음 세포 이식 (cell implantation) 6일 후에, 종양들이 관찰되면 (대략 100 mm^3) 동물들은 종양 크기에 따라 6마리 마우스 그룹들로 나누고 시험할 각 항체를 1 mg/용량으로 주당 2회 처리하였다. 마우스는 이종이식 성장 (xenograft growth) 비율 및 체중 변화들을 측정하기 위해 계속 관찰되었다. 종양 부피는 수확식에 의해 계산되었다: $\pi(\text{Pi})/6 \times \text{길이} \times \text{너비} \times \text{높이}$.
- [0326] 얻어진 결과들은 도 13에 정리되었고, 시험된 모든 항체들은 U87-MG 세포들의 생체내 성장을 유의하게 저해하는 것을 나타내었다. 패널 A에서 중화하는 항-IGF-1R 항체 (IgG1)의 사용은 관찰된 생체내 저해가 HGF-c-Met 축 조 결과 특이적으로 관련이 있는 것을 보여준다.
- [0328] 실시예 11: NCI-H441 이종이식 모델에서 항-c-Met Mabs의 생체내 활성
- [0329] NCI-H441은 유두상 폐 선암 (papillary lung adenocarcinoma)으로부터 유래하고 c-Met을 높은 수준으로 발현하며 c-Met RTK를 전신 인산화 (constitutive phosphorylation)하는 것을 보여준다.
- [0330] 이 세포주가 c-Met을 높은 수준으로 발현하는지 또한 HGF를 생산할 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 정량적 RT-PCRs 및 FACS 또는 ELISA (퀀티카인 HGF; R & D 시스템사)가 수행되었다. 정량적 RT-PCRs를 위해, 세포주들에서 전체 HGF 또는 cMet 전사체 발현 수준들이 표준 TaqMan™ 기술을 이용하여 정량적 PCR에 의해 평가되었다. HGF 또는 c-Met 전사체 수준들이 하우스키핑 유전자인 리보솜 단백질 라지 P0 (RPL0)에 따라 정상화되었고, 결과들은 정상화된 발현 값들로 표시되었다 (2-ddCT 방법).
- [0331] RPL0에 대한 프라이머/프로브 세트들은 정방향, 5'-gaaactctgc attctcgctt cctg-3' (서열번호 47); 역방향, 5'-tgcagattgg ctaccaact gttgca-3'(서열번호 48); 및 프로브, 5'-(FAM)-tgcagattgg ctaccaact gttgca-(TAMRA)-3'(서열번호 49)이었다. HGF에 대한 프라이머/프로브 세트들은 정방향 5'-aacaatgcct ctggttcc-3' (서열번호 50); 역방향, 5'-ctgttagctg cgtcctttac-3' (서열번호 51); 및 프로브, 5'-(FAM)-ccttcaatag catgtcaagt ggagtga-(TAMRA)-3' (서열번호 52)이었다. c-Met에 대한 프라이머/프로브 세트들은 정방향, 5'-cattaaagga gacccacca tagcta-3' (서열번호 53); 역방향, 5'-cctgatcgag aaaccacaac ct-3' (서열번호 54); 및 프로브, 5'-(FAM)-catgaagcga ccctctgatg tcca-(TAMRA)-3' (서열번호 55)이었다. 열 순환 (thermocycling) 프로토콜은 50°C에서 2분 동안, 95°C에서 10분, 이후 95°C에서 15초 40회 그리고 62°C에서 1분으로 이루어진다.
- [0332] HGF에 대한 mRNA는 NCI-H441에서 발견되지 않았고 (도 14) HGF는 NCI-H441 상청액들에서 ELISA를 실시하여 감지되지 않는다. 이들 실험들에서 HGF에 대해 자가적이라고 알려진 신경교아세포종 세포주 U87-MG는 양성 대조군으로 도입되었다. RT-PCR 분석법은 U87-MG에서 HGF mRNA의 유의한 수준을 보여주었고 1.9 ng HGF/백만 세포들이 U87-MG 세포 상청액에서 측정되었다. 정량적 RT-PCRs 및 FACS 분석 모두에서 도 15A 및 도 15B에서 예상한 바와 같이 NCI-H441 세포들이 c-Met을 과다 발현하고 이 발현이 U87-MG 세포들에서 관찰되는 것보다 극적으로 더 높은 것을 보여주었다. 이 실험에서, MCF-7 세포주는 음성 대조군으로 도입되었다. 종합적으로 고려할 때, NCI-H441은 비 자가적 전신 활성화된 세포주로서 HGF 리간드와 독립적으로 성장할 수 있다. 여기서는 c-Met의 리간드-비의존성 이중합이 수용체의 과다 발현의 결과로 일어났다.
- [0333] 비 자가적 세포주의 생체내 활성에 미치는 항-c-Met 항체들의 평가는 c-Met 이중합에 영향을 미치는 잠재성에 대해 몇 가지 정보들을 제공할 수 있다.
- [0334] 도 16은 리간드 의존성 저해에 더하여 이중합을 저해할 수 있는 이들 항체들이 역시 c-Met의 리간드-비의존성 저해를 표적할 수 있는 점을 제시하면서 224G11, 11E1 및 227H1이 NCI-H441의 생체내 성장을 유의하게 저해하는 것을 보여준다. 본 명세서에서 상기 언급된 바와 같이, 이 최종 특성으로 인해 224G11, 11E1 및 227H1은 이 하나의 팔을 가진 5D5 항-c-Met 항체 (OA-5D5)와 서로 다른 것을 알 수 있다.
- [0336] 실시예 12: 224G11 항체의 CDR-이식에 의한 인간화 방법

- [0337] I-경사슬 가변 도메인의 인간화
- [0338] *마우스 배아 유전자들과 224G11VL 뉴클레오타이드 서열의 비교*
- [0339] 예비적인 단계로서, 224G11 VL의 뉴클레오타이드 서열이 IMGT 데이터베이스의 마우스 배아 유전자 서열들과 비교되었다 (<http://imgt.cines.fr>).
- [0340] V 부위와 99.31% 및 J 부위와 94.28%의 서열 일치도 (sequence identity)를 각각 가지는 마우스 IGKV3-5*01 및 IGKJ4*01 배아 유전자가 확인되었다. 획득된 일치도를 고려하여, 224G11VL 서열들을 직접적으로 사용하여 인간 상동성 (human homology)들을 찾기로 결정되었다.
- [0341] 이들 정렬들을 V 유전자에 대해서 도 17A 그리고 J 유전자에 대해서는 도 17B에 나타내었다.
- [0342] *인간 배아 (germline) 유전자들과 224G11VL 뉴클레오타이드 서열의 비교*
- [0343] CDR 이식을 위한 최상의 인간 후보를 확인하기 위해, 224G11VL과 최상의 일치도를 나타내는 인간 배아 유전자가 검색되었다. 이를 위해, 224G11VL의 뉴클레오타이드 서열이 IMGT 데이터베이스의 인간 배아 유전자 서열들 부분과 함께 정렬되었다. 최적화 선택을 위해, 단백질 서열들 간 정렬들이 더 나은 상동성들을 찾기 위해 시행되었다.
- [0344] 이들 두 보완적인 방법들을 사용하여 마우스 224G11 VL CDRs에 대한 가능한 인간 V 서열들을 확인하였다. 뉴클레오타이드 정렬로 75.99%의 서열 일치도를 가진 인간 IGKV3-11*01 배아 유전자를 얻은 한편, 단백질 정렬로 67.30%의 서열 일치도를 가진 인간 IGKV4-1*01 배아 유전자를 얻는다. 양쪽 사례들에서, 가장 가까운 두 배아 유전자들 및 분석된 서열들은 서로 다른 CDR1 아미노산 길이들을 보여준다 (224G11 VL의 경우 10개 아미노산들; IGKV3-11*01의 경우 6개 아미노산들; IGKV4-1*01의 경우 12개 아미노산들).
- [0345] J 부위의 경우, 최상의 상동성 스코어 (best homology score)가 인간과 80%의 서열 일치도를 나타내는 인간 IGKJ3*01에서 획득된다. 그러나 많은 수의 연속된 동일한 (consecutive identical) 뉴클레오타이드들 및 더 나은 아미노산 일치 (fitting)는 인간 IGKJ4*01 배아 유전자와의 정렬에서 발견된다 (77.14%의 서열 일치도). 따라서 IGKJ4*02 배아 유전자가 마우스 11E1 VL CDRs에 대한 수여 (receiving) 인간 J 부위로서 선택되었다.
- [0346] 이들 정렬들을 V 유전자에 대해서 도 18A 그리고 J 유전자에 대해서는 도 18B에 나타내었다.
- [0348] *224G11VL의 인간화된 버전*
- [0349] 마우스 224G11 VL CDR에 대한 두 개 수여 인간 V 부위들의 가능성이 주어지고 224G11 VL 도메인의 두 개 인간화된 버전들이 기술될 것이다. 첫 번째는 더 짧은 CDR1 길이를 가지는 인간 구조들의 초기 시험 (initial trial)에 해당하고 (IGKV3-11*01), 두 번째는 더 긴 CDR1 길이를 가지는 것에 해당한다 (IGKV4-1*01).
- [0350] a) 224G11 VL의 IGKV3-11*01 기초한 인간화된 버전
- [0351] 하기 인간화 방법의 단계들은 선택된 배아 유전자 서열들 IGKV3-11*01 및 IGKJ4*02, 또한 마우스 224G11 VL CDRs을 이들 배아 유전자 서열들의 구조들로 연결하는 것으로 이루어진다.
- [0352] 도 19A에 나타난 바와 같이, 224G11 VL 서열에서 굵게 표시된 잔기들은 224G11 VL 도메인 및 선택된 인간 구조들 간에 서로 다른 것으로 관찰된 25개 아미노산들에 해당한다 (인간 FR, 예로 IGKV3-11*01 및 IGKJ4*02).
- [0353] VH/VL 경계 부분 (interface), 항원 결합 또는 CDR 구조, 마우스 및 인간 잔기들 간 아미노산 클래스 변화들, 가변 도메인의 3D 구조에서 잔기의 정착 위치 (localization)에서 기지의 부가 (participation)로서 몇 가지 기준들을 고려하여, 25개 서로 다른 잔기들 중 3개가 궁극적으로 돌연변이된 것이 확인되었다. 인간 상대방에 대해 가장 중요하게 정해진 이들 3개 잔기들 및 돌연변이들은 인간 L에서 마우스 M36, A에서 H40, 그리고 G에서 R84이다. 이들 랭크된 잔기들은 224G11 HZ1VL 서열에서 마우스에 남아있는 잔기가 굵게 표시되어 도 19A에 나타낸다.
- [0354] 상기 언급된 시험된 잔기들은 당연히 제한되지 않지만, 바람직한 돌연변이들로서 고려되어야 한다.
- [0355] 분자 모델의 도움을 받아서, 다른 돌연변이들이 조사될 수 있다. 하기 랭크된 2개 잔기들이, 예로 15(L/P), 49(P/A), 67(L/R), 68(E/A), 93 (P/S) 및 99 (V/F) 잔기들이 또 다른 바람직한 구현예에서 돌연변이들이 예상될 수 있는 것으로 언급될 수 있다.
- [0356] 상기 언급된 궁극적으로 시험된 잔기들이 당연히 제한되지 않지만, 바람직한 돌연변이들로서 고려되어야 한다.

또 다른 바람직한 구현예에서, 25개 서로 다른 아미노산들 중에서 3개 잔기들을 가지는 모두 16개 다른 잔기들이 재고될 수 있다.

- [0357] 상기 언급된 모든 돌연변이들은 개별적으로 또는 다양한 조합들에 따라 시험될 것이다.
- [0358] 도 19A는 분명히 확인된 상기 언급된 돌연변이들을 가지는 조작된 (implemented) IGKV3-11*01 기초한 인간화된 224G11 VL을 나타낸 것이다. 각 제안된 돌연변이 아래 숫자는 상기 돌연변이가 매겨질 랭크에 해당한다.
- [0359] b) 224G11 VL의 IGKV4-1*01 기초한 인간화된 버전
- [0360] 하기 인간화 방법의 단계들은 선택된 배아 유전자 서열들 IGKV4-1*01 및 IGKJ4*02, 또한 마우스 224G11 VL CDRs을 이들 배아 유전자 서열들의 구조틀들로 연결하는 것으로 이루어진다.
- [0361] 도 19B에 나타난 바와 같이, 224G11 VL 서열에서 굵게 표시된 잔기들은 224G11 VL 도메인 및 선택된 인간 구조틀들 간에 서로 다른 것으로 관찰된 22개 아미노산들에 해당한다 (Human FR, 예로 IGKV4-1*01 및 IGKJ4*02).
- [0362] VH/VL 경계 부분에서, 항원 결합에서 또는 CDR 구조, 마우스 및 인간 잔기들 간 아미노산 클래스 변화들, 가변 도메인의 3D 구조에서 잔기들의 정착 위치 (localization)에서 기지의 부가 (participation)로서 몇 가지 기준들을 고려하여, 22개 서로 다른 잔기들 중 4개가 결국 돌연변이 되는 것이 확인되었다. 인간 상대방에 대해 가장 중요하게 정해진 이들 4개 잔기들 및 돌연변이들은 인간 M에서 마우스 L4, L에서 M39, A에서 H40 그리고 G에서 R84이다. 이들 랭크된 잔기들은 224G11 HZ2VL 서열에서 마우스에 남은 것이 굵게 표시되어 도 19B에 나타난다.
- [0363] 상기 언급된 시험된 잔기들은 당연히 제한되지 않지만, 바람직한 돌연변이들로서 고려되어야 한다.
- [0364] 분자 모델의 도움을 받아서, 다른 돌연변이들이 조사될 수 있다. 하기 랭크된 2개 잔기들이, 예로 25 (A/S), 66 (N/T), 67 (L/R), 및 93 (P/S) 잔기들이 또 다른 바람직한 구현예에서 돌연변이들이 예상될 수 있는 것으로 언급될 수 있다.
- [0365] 상기 언급된 궁극적으로 시험된 잔기들이 당연히 제한되지 않지만, 바람직한 돌연변이들로서 고려되어야 한다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 22개 서로 다른 아미노산들 중에서 3개 잔기들을 가지는 모두 14개 다른 잔기들이 재고될 수 있다.
- [0366] 상기 언급된 모든 돌연변이들은 개별적으로 또는 다양한 조합들에 따라 시험될 것이다.
- [0367] 도 19B는 분명히 확인된 상기 언급된 돌연변이들을 가지는 조작된 (implemented) IGKV4-1*01 기초한 인간화된 224G11 VL을 나타낸 것이다. 각 제안된 돌연변이 아래 숫자는 상기 돌연변이가 매겨질 랭크에 해당한다.
- [0368] II-중사슬 가변 도메인의 인간화
- [0369] *마우스 배아 유전자들과 224G11VH 뉴클레오타이드 서열의 비교*
- [0370] 예비적인 단계로서, 224G11 VH의 뉴클레오타이드 서열이 IMGT 데이터베이스의 마우스 배아 유전자 서열들 부분과 비교되었다 (<http://imgt.cines.fr>).
- [0371] V 부위와 92.70% 및 J 부위와 75.00%의 서열 일치도 (sequence identity)를 각각 가지는 마우스 IGHV1-18*01, IGHD2-4*01 및 IGJ2*01 배아 유전자가 확인되었다. 획득된 일치도를 고려하여, 224G11VH 서열들을 직접적으로 사용하여 인간 상동성들을 찾기로 결정하였다.
- [0372] 이들 정렬들을 V 유전자에 대해서 도 20A, D 유전자에 대해서 도 20B 그리고 J 유전자에 대해서는 도 20C에 나타내었다.
- [0373] *인간 배아 유전자들과 224G11VH 뉴클레오타이드 서열의 비교*
- [0374] CDR 이식을 위한 최상의 인간 후보를 확인하기 위해, 224G11VH와 최상의 일치도를 나타내는 인간 배아 유전자가 검색되었다. 이를 위해, 224G11VH의 뉴클레오타이드 서열이 IMGT 데이터베이스의 인간 배아 유전자 서열들 부분과 함께 정렬되었다. 선택의 최적화를 위해, 단백질 서열들 간 정렬들이 시행되어 더 나은 상동성들을 찾고자 하였다.
- [0375] 이들 두 보완적인 방법들을 사용하여, 뉴클레오타이드 수준에서 75.00%, 단백질 수준에서 64.30%의 서열 일치도를 가지는 마우스 224G11 VH CDRs에 대한 동일한 수여 인간 IGHV1-2*02 V 서열들을 확인하였다.

- [0376] D 부위가 엄격히 VH 도메인에서 CDR3 부위에 속하는 점은 주목할 만하다. 인간화 방법은 CDR-이식 접근법에 기초한다. 가장 근접한 (closest) 인간 D-유전자들의 분석은 이 전략에서 유용하지 않다.
- [0377] J 부위에 대한 상동성들을 검색한 결과 78.72%의 서열 일치도를 가지는 인간 IGHV4*04 배아 유전자를 확인하였다.
- [0378] 인간 IGHV1-2*02 V 배아 유전자 및 인간 IGHV4*01 J 배아 유전자가 따라서 마우스 224G11 VH CDRs에 대한 인간 수여 서열들로 선택되었다.
- [0379] 이들 정렬들을 V 유전자에 대해서 도 21A 그리고 J 유전자에 대해서는 도 21B에 나타내었다.
- [0380] *224G11VH의 인간화된 버전*
- [0381] 하기 인간화 방법의 단계들은 선택된 배아 유전자 서열들 IGHV1-2*02 및 IGHV4*01, 또한 마우스 224G11 VH CDRs을 이들 배아 유전자 서열들의 구조물들에 연결하는 것으로 이루어진다.
- [0382] 도 22에 나타난 바와 같이, 224G11 VH 서열에서 굵게 표시된 잔기들은 224G11 VH 도메인 및 선택된 인간 구조물들 간에 서로 다른 것으로 관찰된 30개 아미노산들에 해당한다 (인간 FR, 예로 IGHV1-2*02 및 IGHV4*01).
- [0383] VH/VL 경계 부분에서, 항원 결합에서 또는 CDR 구조, 마우스 및 인간 잔기들 간 아미노산 클래스 변화들, 가변 도메인의 3D 구조에서 잔기들의 정착 위치 에서 기지의 부가로서 몇 가지 기준들을 고려하여, 30개 서로 다른 잔기들 중 4개가 결국 돌연변이 되는 것이 확인되었다. 인간 상대방에 대해 가장 중요하게 정해진 이들 4개 잔기들 및 돌연변이들은 인간 E에서 마우스 D51, W에서 G55, R에서 V80 그리고 T에서 K82이다. 이들 랭크된 잔기들은 224G11 HZVH 서열에서 마우스에 남은 것이 굵게 표시되어 도 22에 나타낸다.
- [0384] 상기 언급된 시험된 잔기들은 당연히 제한되지 않지만, 바람직한 돌연변이들로서 고려되어야 한다.
- [0385] 분자 모델의 도움을 받아서, 다른 돌연변이들이 조사될 수 있다. 하기 랭크된 2개 잔기들이, 예로 25(T/A), 48(E/Q), 49(S/G), 53(I/M), 76(A/V), 78(L/M) 및 90(D/E) 잔기들이 또 다른 바람직한 구현예에서 돌연변이들이 고려될 수 있는 것으로 언급될 수 있다.
- [0386] 상기 언급된 궁극적으로 시험된 잔기들이 당연히 제한되지 않지만, 바람직한 돌연변이들로서 고려되어야 한다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 30개 서로 다른 아미노산들 중에서 3개 잔기들을 가지는 모두 19개 다른 잔기들이 재고될 수 있다.
- [0387] 상기 언급된 모든 돌연변이들은 개별적으로 또는 다양한 조합들에 따라 시험될 것이다.
- [0388] 도 22는 분명히 확인된 상기 언급된 돌연변이들을 가지는 인간화된 224G11 VH를 나타낸 것이다. 각 제안된 돌연변이 아래 숫자는 상기 돌연변이가 매겨질 랭크에 해당한다.
- [0390] 실시예 13: 227H1 항체의 CDR-이식에 의한 인간화 방법
- [0391] I-경사슬 가변 도메인의 인간화
- [0392] *마우스 배아 유전자들과 227H1 VL 뉴클레오타이드 서열의 비교*
- [0393] 예비적인 단계로서, 227H1 VL의 뉴클레오타이드 서열이 IMGT 데이터베이스의 마우스 배아 유전자 서열들 부분과 비교되었다 (<http://imgt.cines.fr>).
- [0394] V 부위와 96.90% 및 J 부위와 97.29%의 서열 일치도 (sequence identity)를 각각 가지는 마우스 IGKV3-5*01 및 IGKJ4*01 배아 유전자가 확인되었다. 획득된 일치도를 고려하여, 227H1 VL 서열들을 직접적으로 사용하여 인간 상동성들을 찾기로 결정되었다.
- [0395] 이들 정렬들을 V 유전자에 대해서 도 23A 그리고 J 유전자에 대해서는 도 23B에 나타내었다.
- [0396] *인간 배아 유전자들과 227H1 VL 뉴클레오타이드 서열의 비교*
- [0397] CDR 이식을 위한 최상의 인간 후보를 확인하기 위해, 227H1 VL과 최상의 일치도를 나타내는 인간 배아 유전자가 검색되었다. 이를 위해, 227H1 VL의 뉴클레오타이드 서열이 IMGT 데이터베이스의 인간 배아 유전자 서열들 부분과 함께 정렬되었다. 최적화 선택을 위해, 단백질 서열들 간 정렬들이 더 나은 상동성들을 찾기 위해 시행되었다.
- [0398] 이들 두 보완적인 방법들을 사용하여 마우스 227H1 VL CDRs에 대한 가능한 인간 V 서열들의 확인하였다. 뉴클레

오타이드 정렬로 74.91%의 서열 일치도를 가진 인간 IGKV3-11*01 배아 유전자를 얻은 한편, 단백질 정렬로 64.00%의 서열 일치도를 가진 인간 IGKV4-1*01 배아 유전자를 얻는다. 양쪽 사례들에서, 두 가장 가까운 배아 유전자들 및 분석된 서열들은 서로 다른 CDR1 아미노산 길이들을 보여준다 (227H1 VL의 경우 10개 아미노산들; IGKV3-11*01의 경우 6개 아미노산들; IGKV4-1*01의 경우 12개 아미노산들).

- [0399] J 부위의 경우, 최상의 상동성 스코어가 인간과 78.38%의 서열 일치도를 나타내는 인간 IGKJ3*01에서 획득된다. 그러나 많은 수의 연속된 동일한 (consecutive identical) 뉴클레오타이드들 및 더 나은 아미노산 일치 (fitting)는 인간 IGKJ4*02 배아 유전자와의 정렬에서 발견된다 (75.68%의 서열 일치도). 따라서 IGKJ4*02 배아 유전자가 마우스 227H1 VL CDRs에 대한 수여 인간 J 부위로서 선택되었다.
- [0400] 이들 정렬들을 V 유전자에 대해서 도 24A 그리고 J 유전자에 대해서는 도 24B에 나타내었다.
- [0401] 227H1 VL의 인간화된 버전
- [0402] 마우스 227H1 VL CDR에 대한 두 개 인간 수여 V 부위들의 가능성이 주어지고, 227H1 VL 도메인의 두 개 인간화된 버전들이 기술될 것이다. 첫 번째는 더 짧은 CDR1 길이를 가지는 인간 구조들의 초기 시험 (initial trial)에 해당하고 (IGKV3-11*01), 두 번째는 더 긴 CDR1 길이를 가지는 것에 해당한다 (IGKV4-1*01).
- [0403] a) 227H1 VL의 IGKV3-11*01 기초한 인간화된 버전
- [0404] 하기 인간화 방법의 단계들은 선택된 배아 유전자 서열들 IGKV3-11*01 및 IGKJ4*02, 또한 마우스 227H1 VL CDRs을 이들 배아 유전자 서열들의 구조들로 연결하는 것으로 이루어진다.
- [0405] 도 25A에 나타난 바와 같이, 227H1 VL 서열에서 굵게 표시된 잔기들은 227H1 VL 도메인 및 선택된 인간 구조들 간에 서로 다른 것으로 관찰된 26개 아미노산들에 해당한다 (인간 FR, 예로 IGKV3-11*01 및 IGKJ4*02).
- [0406] VH/VL 경계 부분에서, 항원 결합에서 또는 CDR 구조, 마우스 및 인간 잔기들 간 아미노산 클래스 변화들, 가변 도메인의 3D 구조에서 잔기들의 정착 위치 에서 기지의 부가로서 몇 가지 기준들을 고려하여, 26개 서로 다른 잔기들 중 3개가 결국 돌연변이된 것이 확인되었다. 인간 상대방에 대해 가장 중요하게 정해진 이들 3개 잔기들 및 돌연변이들은 인간 L에서 마우스 I39, A에서 H40, 그리고 G에서 R84이다. 이들 랭크된 잔기들은 227H1 HZ1VL 서열에서 굵게 표시되어 마우스로 남아있는 잔기로서 도 25A에 나타낸다.
- [0407] 상기 언급된 시험된 잔기들은 당연히 제한되지 않지만, 바람직한 돌연변이들로서 고려되어야 한다.
- [0408] 분자 모델의 도움을 받아서, 다른 돌연변이들이 조사될 수 있다. 하기 랭크된 2개 잔기들이, 예로 15(L/P), 25(V/A), 49(P/A), 67(L/R), 68(E/A), 93 (P/S) 및 99 (S/F) 잔기들이 또 다른 바람직한 구현예에서 돌연변이들이 예상될 수 있는 것으로 언급될 수 있다.
- [0409] 상기 언급된 궁극적으로 시험된 잔기들이 당연히 제한되지 않지만, 바람직한 돌연변이들로서 고려되어야 한다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 25개 서로 다른 아미노산들 중에서 3개 잔기들을 가지는 모두 16개 다른 잔기들이 재고될 수 있다.
- [0410] 상기 언급된 모든 돌연변이들은 개별적으로 또는 다양한 조합들에 따라 시험될 것이다.
- [0411] 도 25A는 분명히 확인된 상기 언급된 돌연변이들을 가지는 조작된 IGKV3-11*01 기초한 인간화된 227H1 VL을 나타낸 것이다. 각 제안된 돌연변이 아래 숫자는 상기 돌연변이가 매겨질 랭크에 해당한다.
- [0412] b) 227H1 VL의 IGKV4-1*01 기초한 인간화된 버전
- [0413] 하기 인간화 방법의 단계들은 선택된 배아 유전자 서열들 IGKV4-1*01 및 IGKJ4*02, 또한 마우스 227H1 VL CDRs을 이들 배아 유전자 서열들의 구조들들로 연결하는 것으로 이루어진다.
- [0414] 도 25B에 나타난 바와 같이, 227H1 VL 서열에서 굵게 표시된 잔기들은 227H1 VL 도메인 및 선택된 인간 구조들 간에 서로 다른 것으로 관찰된 24개 아미노산들에 해당한다 (인간 FR, 예로 IGKV4-1*01 및 IGKJ4*02).
- [0415] VH/VL 경계 부분에서, 항원 결합에서 또는 CDR 구조, 마우스 및 인간 잔기들 간 아미노산 클래스 변화들, 가변 도메인의 3D 구조에서 잔기들의 정착 위치 에서 기지의 부가로서 몇 가지 기준들을 고려하여, 24개 서로 다른 잔기들 중 4개가 결국 돌연변이 되는 것이 확인되었다. 인간 상대방에 대해 가장 중요하게 정해진 이들 4개 잔기들 및 돌연변이들은 인간 M에서 마우스 L4, L에서 I39, A에서 H40 그리고 G에서 R84이다. 이들 랭크된 잔기들은 227H1 HZ2VL 서열에서 마우스에 남은 것이 굵게 표시되어 도 25B에 나타낸다.

- [0416] 상기 언급된 시험된 잔기들은 당연히 제한되지 않지만, 바람직한 돌연변이들로서 고려되어야 한다.
- [0417] 분자 모델의 도움을 받아서, 다른 돌연변이들이 조사될 수 있다. 하기 랭크된 2개 잔기들이, 예로 25 (V/S), 66 (N/T), 67 (L/R), 및 93 (P/S) 잔기들이 또 다른 바람직한 구현예에서 돌연변이들이 예상될 수 있는 것으로 언급될 수 있다.
- [0418] 상기 언급된 궁극적으로 시험된 잔기들이 당연히 제한되지 않지만, 바람직한 돌연변이들로서 고려되어야 한다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 22개 서로 다른 아미노산들 중에서 3개 잔기들을 가지는 모두 16개 다른 잔기들이 재고될 수 있다.
- [0419] 상기 언급된 모든 돌연변이들은 개별적으로 또는 다양한 조합들에 따라 시험될 것이다.
- [0420] 도 25B는 분명히 확인된 상기 언급된 돌연변이들을 가지는 조작된 IGKV4-1*01 기초한 인간화된 227H1 VL을 나타낸 것이다. 각 제안된 돌연변이 아래 숫자는 상기 돌연변이가 매겨질 랭크에 해당한다.
- [0421] II-중사슬 가변 도메인의 인간화
- [0422] *마우스 배아 유전자들과 227H1 VH 뉴클레오타이드 서열의 비교*
- [0423] 예비적인 단계로서, 227H1 VH의 뉴클레오타이드 서열이 IMGT 데이터베이스의 마우스 배아 유전자 서열들 부분과 비교되었다 (<http://imgt.cines.fr>).
- [0424] V 부위와 92.70%, D 부위와 63.63% 및 J 부위와 91.48%의 서열 일치도를 각각 가지는 마우스 IGHV1-18*01, IGHD1-1*02 및 IGHJ2*01 배아 유전자가 확인되었다. 획득된 일치도를 고려하여, 227H1 VH 서열들을 직접적으로 사용하여 인간 상동성들을 찾기로 결정하였다.
- [0425] 이들 정렬들을 V 유전자에 대해서 도 26A, J 유전자에 대해서는 도 26B 그리고 D 유전자에 대해서는 도 26C에 나타내었다.
- [0426] *인간 배아 유전자들과 227H1 VH 뉴클레오타이드 서열의 비교*
- [0427] CDR 이식을 위한 최상의 인간 후보를 확인하기 위해, 227H1 VH와 최상의 일치도를 나타내는 인간 배아 유전자가 검색되었다. 이를 위해, 227H1 VH의 뉴클레오타이드 서열이 IMGT 데이터베이스의 인간 배아 유전자 서열들 부분과 함께 정렬되었다. 따라서 마우스 224G11 VH CDRs 에 대해 72.92%의 서열 일치도를 가지는 수여 인간 IGHV1-2*02 서열을 확인하였다.
- [0428] D 부위가 엄격히 VH 도메인에서 CDR3 부위에 속하는 점은 주목할만하다. 인간화 방법은 CDR-이식 접근법에 기초한다. 가장 근접한 (closest) 인간 D-유전자들의 분석은 이 전략에서 유용하지 않다.
- [0429] J 부위에 대한 상동성들을 검색한 결과 78.72%의 서열 일치도를 가지는 인간 IGHJ4*01 배아 유전자를 확인하였다.
- [0430] 인간 IGHV1-2*02 V 배아 유전자 및 인간 IGHJ4*01 J 배아 유전자가 따라서 마우스 227H1 VH CDRs에 대한 인간 수여 서열들로 선택되었다.
- [0431] 이들 정렬들을 V 유전자에 대해서 도 27A 그리고 J 유전자에 대해서는 도 27B에 나타내었다.
- [0432] *227H1 VH의 인간화된 버전*
- [0433] 하기 인간화 방법의 단계들은 선택된 배아 유전자 서열들 IGHV1-2*02 및 IGHJ4*01, 또한 마우스 227H1 VH CDRs 을 이들 배아 유전자 서열들의 구조물들에 연결하는 것으로 이루어진다.
- [0434] 도 28에 나타난 바와 같이, 227H1 VH 서열에서 굵게 표시된 잔기들은 227H1 VH 도메인 및 선택된 인간 구조물들 간에 서로 다른 것으로 관찰된 32개 아미노산들에 해당한다 (인간 FR, 예로 IGHV1-2*02 및 IGHJ4*01).
- [0435] VH/VL 경계 부분에서, 항원 결합에서 또는 CDR 구조, 마우스 및 인간 잔기들 간 아미노산 클래스 변화들, 가변 도메인의 3D 구조에서 잔기들의 정작 위치 에서 기지의 부가로서 몇 가지 기준들을 고려하여, 32개 서로 다른 잔기들 중 6개가 결국 돌연변이 되는 것이 확인되었다. 인간 상대편에 대해 가장 중요하게 정해진 이들 6개 잔기들 및 돌연변이들은 인간 M에서 마우스 L39, H에서 N40, W에서 L55, N에서 T66, R에서 V80 그리고 T에서 K82 이다. 이들 랭크된 잔기들은 227H1 HZVH 서열에서 마우스에 남은 것이 굵게 표시되어 도 28에 나타낸다.
- [0436] 상기 언급된 시험된 잔기들은 당연히 제한되지 않지만, 바람직한 돌연변이들로서 고려되어야 한다.

- [0437] 분자 모델의 도움을 받아서, 다른 돌연변이들이 조사될 수 있다. 하기 랭크된 2개 잔기들이, 예로 48 (K/Q), 49(T/G), 53(I/M), 76(A/V) 및 78(L/M) 잔기들이 또 다른 바람직한 구현예에서 돌연변이들이 고려될 수 있는 것으로 언급될 수 있다.
- [0438] 상기 언급된 궁극적으로 시험된 잔기들이 당연히 제한되지 않지만, 바람직한 돌연변이들로서 고려되어야 한다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 30개 서로 다른 아미노산들 중에서 3개 잔기들을 가지는 모두 21개 다른 잔기들이 재고될 수 있다.
- [0439] 상기 언급된 모든 돌연변이들은 개별적으로 또는 다양한 조합들에 따라 시험될 것이다.
- [0440] 도 28은 분명히 확인된 상기 언급된 돌연변이들을 가지는 인간화된 227H1 VH를 나타낸 것이다. 각 제안된 돌연변이 아래 숫자는 상기 돌연변이가 매겨질 랭크에 해당한다.
- [0441]
- [0442] 실시예 14: 223C4 항체의 CDR-이식에 의한 인간화 방법
- [0443] I-경사슬 가변 도메인의 인간화
- [0444] *마우스 배아 유전자들과 223C4 VL 뉴클레오타이드 서열의 비교*
- [0445] 예비적인 단계로서, 223C4 VL의 뉴클레오타이드 서열이 IMGT 데이터베이스의 마우스 배아 유전자 서열들 부분과 비교되었다 (<http://imgt.cines.fr>).
- [0446] V 부위와 99.64% 및 J 부위와 94.59%의 서열 일치도 (sequence identity)를 각각 가지는 마우스 IGKV12-46*01 및 IGKJ2*01 배아 유전자가 확인되었다. 획득된 일치도를 고려하여, 223C4 VL 서열들을 직접적으로 사용하여 인간 상동성들을 찾기로 결정되었다.
- [0447] 이들 정렬들을 V 유전자에 대해서 도 29A 그리고 J 유전자에 대해서는 도 29B에 나타내었다.
- [0448] *인간 배아 유전자들과 223C4 VL 뉴클레오타이드 서열의 비교*
- [0449] CDR 이식을 위한 최상의 인간 후보를 확인하기 위해, 223C4 VL과 최상의 일치도를 나타내는 인간 배아 유전자가 검색되었다. 이를 위해, 223C4 VL의 뉴클레오타이드 서열이 IMGT 데이터베이스의 인간 배아 유전자 서열들 부분과 함께 정렬되었다.
- [0451] *V 부위의 경우 78.49%, J 부위의 경우 81.08%의 서열 일치도를 가진 인간 IGKV1-NL1*01 및 IGKJ2*01 배아 유전자들이 각각 확인되었다. 따라서 V 부위에 대해 IGKV1-VL1*01, J 부위에 대해 IGKJ2*01 배아 유전자들이 마우스 223C4 VL CDRs에 대한 수여 인간 서열들로서 선택되었다.
- [0452] 이들 정렬들을 V 유전자에 대해서 도 30A 그리고 J 유전자에 대해서는 도 30B에 나타내었다.
- [0453] 선택의 최적화를 위해, 당업자라면 역시 단백질 서열들 간 정렬들을 선택을 돕기 위해 수행할 수 있다.
- [0454] *223V4 VL의 인간화된 버전*
- [0455] 하기 인간화 방법의 단계들은 선택된 배아 유전자 서열들 IGKV1-NL1*01 및 IGKJ2*01, 또한 마우스 223C4 VL CDRs을 이들 배아 유전자 서열들의 구조틀로 연결하는 것으로 이루어진다.
- [0456] 이 방법의 이 단계에서, 223C4 마우스 Fv 도메인들의 분자 모델이 개발되어, 분자의 삼차원 구조를 유지하거나 항원 결합 부위 및 기능에서의 역할들로 인해 보존되는 마우스 잔기들을 선택하는 데 유용할 수 있다. 구체적으로는, 궁극적으로 돌연변이 되는 9개 잔기들을 확인하였다.
- [0457] 첫 번째 단계에서, CDR 고정체 또는 구조에 관여하는 잔기들이 조사될 것이다. 이러한 잔기들은 66 (R/N) 잔기 및 68 (E/V) 잔기이다.
- [0458] 두 번째 단계에서, 용매에 노출되어 면역유전성 (immunogenicity)에 관여하는 잔기도 역시 조사될 것이다. 이들은 49(A/S), 51(K/Q), 69(S/D), 86(D/Q) 및 92(S/N) 잔기들이다.
- [0459] 상기 언급된 시험된 잔기들은 당연히 제한되지 않지만, 바람직한 돌연변이들로서 고려되어야 한다.
- [0460] 분자 모델의 도움을 받아서, 다른 돌연변이들이 조사될 수 있다. 하기 잔기들이, 예로 9(S/A), 13(A/V), 17(D/E), 19(R/T), 54(L/V), 88(T/S), 90(T/K), 100(A/G) 및 101(T/S) 잔기들이 또 다른 바람직한 구현예에서

돌연변이들이 예상될 수 있는 것으로 언급될 수 있다.

- [0461] 상기 언급된 모든 돌연변이들은 개별적으로 또는 다양한 조합들에 따라 조사될 것이다.
- [0462] 도 31은 분명히 확인된 상기 언급된 돌연변이들을 가진 인간화된 223C4 VL을 나타낸 것이다. 각 제안된 돌연변이 아래 숫자는 상기 돌연변이가 매겨질 랭크에 해당한다.
- [0463] II-중사슬 가변 도메인의 인간화
- [0464] *마우스 배아 유전자들과 223C4 VH 뉴클레오타이드 서열의 비교*
- [0465] 예비적인 단계로서, 223C4 VH의 뉴클레오타이드 서열이 IMGT 데이터베이스의 마우스 배아 유전자 서열들 부분과 비교되었다 (<http://imgt.cines.fr>).
- [0466] V 부위와 98.95%, D 부위와 72.72% 및 J 부위와 98.11%의 서열 일치도를 각각 가지는 마우스 IGHV1-18*01, IGHD6-3*01 및 IGJ4*01 배아 유전자가 확인되었다. 획득된 일치도를 고려하여, 223C4 VH 서열들을 직접적으로 사용하여 인간 상동성들을 찾기로 결정하였다.
- [0467] 이들 정렬들을 V 유전자에 대해서 도 32A, D 유전자에 대해서는 도 32B 그리고 J 유전자에 대해서는 도 32C에 나타내었다.
- [0468] *인간 배아 유전자들과 223C4 VH 뉴클레오타이드 서열의 비교*
- [0469] CDR 이식을 위한 최상의 인간 후보를 확인하기 위해, 223C4 VH와 최상의 일치도를 나타내는 인간 배아 유전자가 검색되었다. 이를 위해, 223C4 VH의 뉴클레오타이드 서열이 IMGT 데이터베이스의 인간 배아 유전자 서열들 부분과 함께 정렬되었다.
- [0470] V 부위와 76.38%, D 부위와 75.00% 및 J 부위와 77.41%의 서열 일치도를 각각 가지는 인간 IGHV1-2*01, IGHD1-26*01 및 IGJ6*01 배아 유전자들이 확인되었다. 따라서 V 부위에 대해 IGHV1-2*02 및 J 부위에 대해 IGJ6*01 배아 유전자들이 마우스 223C4 VH CDRs 에 대한 수여 인간 서열들로서 선택되었다.
- [0471] 이들 정렬들을 V 유전자에 대해서 도 33A 그리고 J 유전자에 대해서는 도 33B에 나타내었다.
- [0472] 선택의 최적화를 위해, 당업자라면 역시 단백질 서열들 간 정렬들을 선택을 돕기 위해 수행할 수 있다.
- [0473] *223C4 VH의 인간화된 버전*
- [0474] 하기 인간화 방법의 단계들은 선택된 배아 유전자 서열들 IGHV1-2*02 및 IGJ6*01, 또한 마우스 223C4 VH CDRs 을 이들 배아 유전자 서열들의 구조들들에 연결하는 것으로 이루어진다.
- [0475] 이 방법의 이 단계에서, 223C4 마우스 Fv 도메인들의 분자 모델이 개발되어, 분자의 삼차원 구조를 유지하거나 항원 결합 부위 및 기능에서의 역할들로 인해 보존되는 마우스 잔기들을 선택하는 데 유용할 수 있다. 보다 상세하게는, 궁극적으로 돌연변이 되는 14개 잔기들을 확인하였다.
- [0476] 첫 번째 단계에서, CDR 고정체 (anchors) 또는 구조에 관여하는 잔기들이 조사될 것이다. 이러한 잔기들은 40(H/D), 45(A/S), 55(W/D), 66(N/I) 및 67(Y/F) 잔기들이다.
- [0477] 두 번째 단계에서, 용매에 노출되어 면역유전성에 관여하는 잔기도 역시 조사될 것이다. 이들은 1(Q/E), 3(Q/L), 5(V/Q), 48(Q/M) 및 80(R/V) 잔기들이다.
- [0478] 그 다음, 세 번째 단계에서, 가변 도메인의 구조/접힘에 관여하는 잔기들도 역시 돌연변이 될 수 있다. 이들은 9(A/P), 13 (K/V), 22(S/P) 및 46 (P/H) 잔기들이다.
- [0479] 상기 언급된 시험된 잔기들은 당연히 제한되지 않지만, 바람직한 돌연변이들로서 고려되어야 한다.
- [0480] 분자 모델의 도움을 받아서, 다른 돌연변이들이 조사될 수 있다. 하기 랭크된 잔기들이, 예로 12(V/L), 21(V/I), 43(R/K), 49(G/S), 53(M/I), 68(A/N), 72 (Q/K), 75(R/K), 76(V/A), 78(M/L), 82(T/K), 92(S/R), 93(R/S), 95(R/T) 및 97(D/E) 잔기들이 또 다른 바람직한 구현예에서 돌연변이들이 고려될 수 있는 것으로 언급될 수 있다.
- [0481] 상기 언급된 모든 돌연변이들은 개별적으로 또는 다양한 조합들에 따라 시험될 것이다.
- [0482] 도 34는 분명히 확인된 상기 언급된 돌연변이들을 가지는 인간화된 223C4 VH를 나타낸 것이다. 각 제안된 돌연

변이 아래 숫자는 상기 돌연변이가 매겨질 랭크에 해당한다.

[0483]

[0484]

실시예 15: 확립된 이종이식 NCI-H441 종양 모델에서 단독 또는 화학치료제 나벨빈[®]과 조합된 마우스 224G11 Mab의 항-종양 활성

[0485]

화학치료법들은 부분적으로 세포 사멸 유도체들에 대한 세포 반응과 세포 내에서 친- 및 항-세포사멸 경로들 간 균형에 성공 여부가 달려있다. 활성화된 c-Met이 세포 생존에 미치는 보호 효과는 보고되어 왔다. 이것은 주로 항-세포사멸 Bcl-x1 및 Bcl-2 단백질의 발현이 PI3-K-매개성 신호전달의 결과로서 (캐스파제 9 (caspase 9)) 증가되기 때문에 가능하다. 이 신호전달은 미토콘드리아-의존성 세포 사멸을 저해한다. 따라서, 세포 사멸 과정에서 조절 효과를 현저히 나타내는 HGF/c-Met 시스템도 역시 암 세포들의 화학감수성 (chemosensitivity)에 영향을 미칠 수 있다고 생각할 수 있다. 이 가설은 판매되는 폐암 치료에 사용되는 화학치료제인 나벨빈[®]을 사용하여 테스트되었다 (Aspro et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2001, 40:251-263; Curran et al., Drugs Aging, 2002, 19:695-697). 이종이식 NCI-H441 NSCLC 모델은 이 세포주가 나벨빈 (Kraus-Berthier et al., Clin. Cancer Res., 2000, 6:297-304) 및 치료 표적하는 c-Met (Zou T. et al., Cancer Res. 2007, 67:4408-4417)에 민감한 것으로 이미 기술되어 있기 때문에 사용되었다.

[0486]

간략히 설명하면, ATCC로부터 나온 NCI-H441은 일상적으로 10% FCS, 1% L-글루타민을 포함하는 RPMI 1640 배지에서 배양되었다. 세포들은 이식하기 2일 전 지수적 성장기에 분리되었다. 10백만 개의 NCI-H441 세포들이 7주 된 스위스 누드 마우스에 PBS를 사용하여 이식되었다. 이식하고 3일 후에, 종양들이 측정될 수 있었고 동물들은 종양 크기에 따라 6마리 마우스 그룹들로 나누었다. 마우스는 2 mg 224G11 항체/마우스 용량으로 i.p. 처리된 다음 43일이 경과할 때까지 한 주에 두 번씩 1 mg 항체/마우스로 처리되었다. 9G4 Mab가 이소타입 대조군으로 사용되었다.

[0487]

나벨빈[®]을 8 mg/kg 용량으로 세포 주입 후 5, 12, 19일에 i.p. 주입하였다. 224G11 및 나벨빈[®] 모두를 조합 치료에 사용하는 경우, 두 화합물들은 별도로 투여되었다. 이 실험에서 두 화합물들은 최적의 용량으로 사용되었다. 종양 부피는 한 주에 두 번 측정되었고 수확식에 의해 계산되었다: $\pi/6 \times \text{길이} \times \text{너비} \times \text{높이}$.

[0488]

도 35는 224G11이 단일 약제 치료 (single agent therapy)로서 단독으로 사용될 때 나벨빈[®] 정도로 효과적인 것을 보여준다. 양쪽 치료법을 조합하는 것은 63일째 6마리 마우스 중 3마리에서 완전한 종양 치료 (regression)들이 관찰되어 유의한 장점인 것을 확인할 수 있었다.

[0490]

실시예 16: c-Met 저해제들 및 혈관형성

[0491]

c-Met의 활성화는 다양한 종양세포 기능들의 조절에 직접적으로 작용하는 것 이외에도, 종양 혈관형성에도 관여하였다. 내피 세포 (endothelial cell)들은 c-Met을 발현하고 HGF는 내피세포 성장, 침습 및 이동 (motility)을 촉진한다 (Nakamura Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995, 215:483-488; Bussolino F. et al., J. Cell Biol. 1992, 119:629-641). 혈관 내피세포에서 HGF/c-Met에 의한 성장, 침습 및 이동을 조화롭게 조절하여 (coordinate regulation) 생체의 3D 모세 내피 세관 (capillary endothelial tube)의 형성을 유도하는 것이 기술되었다 (Rosen E. M. et al., Supplementum to Experientia 1991, 59:76-88).

[0492]

HGF-유도성 혈관형성을 이용한 항-c-Met의 잠재적인 간섭을 확인하기 위해, i) HUVEC 증식에 미치는 MAb 효과 평가 그리고 ii) HUVEC 세관 형성에 대한 MAb 테스트를 포함하는 두 세트의 실험들이 수행되었다.

[0493]

증식 실험들을 위해, 7500 HUVEC이 미리 라미닌이 코팅된 96-웰 플레이트의 각 웰에 접종되었다. 세포들은 0.5% FBS와 헤파린이 첨가된 EMB-2 분석 배지를 사용하여 24시간 동안 배양되었다. 그 다음, 시험될 Mabs (0.15 내지 40 $\mu\text{g/ml}$)가 20 ng/ml HGF를 첨가하기 전 1시간 동안 첨가되었다. 추가 24시간 후에 세포들은 [³H]티미딘 0.5 μCi 로 표지되었다. 삽입된 [³H]티미딘의 양은 액체 신타레이션 측정법으로 정량되었다. 이 실험에서 9G4 Mab는 IgG1 이소타입 대조군으로 사용하기에 부적절한 항체이다.

[0494]

도 36에 제시된 그대로의 데이터는 예상한 바와 같이 HGF가 HUVEC 세포 성장에 강력한 유도제 (potent inducer)인 것을 보여준다. HGF 부재 시 평가된 항체들은 시험된 용량과는 상관없이 HUVEC에 대해 작용제 증식 활성을 전혀 나타내지 못하였다. HGF 존재 시 11E1 및 224G11 MAb 모두에서 극적인 용량 의존성 저해가 관찰되었다.

[0495]

HUVEC 세관 형성을 측정하기 위해, 25000 세포들이 항체들과 30분 동안 반응되고 매트릭셀이 코팅된 48-웰 플레

이트 상에 접종되었다. 그 다음 HGF 50 ng/ml 이 첨가되고 플레이트들은 37°C에서 배양되었다. 그 다음 배지는 수확되고 현미경으로 관찰하기 전 5 µg/ml CMFDA가 15분 동안 첨가되었다.

- [0496] 도 37에서 나타난 결과들에서 예상한 대로 HGF가 세관 형성을 유의하게 유도하는 것을 보여준다. 9G4 항체는 IgG1 이소타입 대조군으로 도입되어 HGF-유도성 세관 형성에 효과를 미치지 않는 반면, 11E1 및 224G11 MAbs 모두는 세관 형성을 극적으로 저해한다.
- [0497]
- [0498] 실시예 17: 11E1 항체의 CDR-이식에 의한 인간화 방법
- [0499] I-경사슬 가변 도메인의 인간화
- [0500] *마우스 배아 유전자들과 11E1 VL 뉴클레오타이드 서열의 비교*
- [0501] 예비적인 단계로서, 11E1 VL의 뉴클레오타이드 서열이 IMGT 데이터베이스의 마우스 배아 유전자 서열들 부분과 비교되었다 (<http://imgt.cines.fr>).
- [0502] V 부위와 98.58% 및 J 부위와 97.22%의 서열 일치도 (sequence identity)를 각각 가지는 마우스 IGKV4-7901 및 IGKJ4*01 배아 유전자가 확인되었다. 획득된 일치도를 고려하여, 11E1 VL 서열들을 직접적으로 사용하여 인간 상동성들을 찾기로 결정되었다.
- [0503] 이들 정렬들을 V 유전자에 대해서 도 38A 그리고 J 유전자에 대해서는 도 38B에 나타내었다.
- [0504] *인간 배아 유전자들과 11E1 VL 뉴클레오타이드 서열의 비교*
- [0505] CDR 이식을 위한 최상의 인간 후보를 확인하기 위해, 11E1 VL과 최상의 일치도를 나타내는 인간 배아 유전자가 검색되었다. 이를 위해, 11E1 VL의 뉴클레오타이드 서열이 IMGT 데이터베이스의 인간 배아 유전자 서열들 부분과 함께 정렬되었다.
- [0506] V 부위에서 양쪽 배아 유전자들에 대해 69.86%의 서열 일치도를 가지는 인간 IGKV3-7*02 및 IGKV3D-7*01이 확인되었다. IGKV3-7*01 인간 배아 유전자는 IMGT 데이터베이스에서 ORF로 알려져 있다. 이것은 이 서열이 인간 게놈에서 발견은 되지만 기능적 IGKV3-7*02 유래 자연 항체들을 만들지는 못하는 어떤 재조합 문제점들을 나타낼 수 있다. 따라서 IGKV3D-7*01 배아 유전자가 마우스 11E1 VL CDRs에 대한 수여 인간 V 부위로서 선택되었다.
- [0507] 이들 정렬들을 V 유전자에 대해서 도 39A 그리고 J 유전자에 대해서는 도 39B에 나타내었다.
- [0508] 선택의 최적화를 위해, 당업자라면 역시 단백질 서열들 간 정렬들을 선택을 돕기 위해 수행할 수 있다.
- [0509] *11E1 VL의 인간화된 버전*
- [0510] 하기 인간화 방법의 단계들은 선택된 배아 유전자 서열들 IGKV3D-7*01 및 IGKJ4*02, 또한 마우스 11E1 VL CDRs를 이들 배아 유전자 서열들의 구조들로 연결하는 것으로 이루어진다.
- [0511] 도 40에 나타난 바와 같이, 11E1 VL 서열에서 굵게 표시된 잔기들은 11E1 VL 도메인 및 선택된 인간 구조들 간에 서로 다른 것으로 관찰된 30개 아미노산들에 해당한다 (인간 FR, 예로 IGKV3D-7*01 및 IGKJ4*02).
- [0512] VH/VL 경계 부분에서, 항원 결합에서 또는 CDR 구조, 마우스 및 인간 잔기들 간 아미노산 클래스 변화들, 가변 도메인의 3D 구조에서 잔기들의 정착 위치에서 기지의 부가로서 몇 가지 기준들을 고려하여, 30개 서로 다른 잔기들 중 4개가 결국 돌연변이된 것이 확인되었다. 인간 상대편에 대해 가장 중요하게 정해진 이들 3개 잔기들 및 돌연변이들은 인간 M에서 마우스 L4, S에서 Y40, F에서 Y87 그리고 P에서 T96이다. 이들 랭크된 잔기들은 11E1 HZVL 서열에서 굵게 표시되어 마우스로 남아있는 잔기로서 도 40에 나타낸다.
- [0513] 상기 언급된 시험된 잔기들은 당연히 제한되지 않지만, 바람직한 돌연변이들로서 고려되어야 한다.
- [0514] 분자 모델의 도움을 받아서, 다른 돌연변이들이 조사될 수 있다. 하기 랭크된 2개 잔기들이, 예로 24(S/R), 53(W/L), 66(I/T), 67(L/R), 86(S/D), 95(Q/E), 99(A/F) 또는 121 (E/D) 잔기들이 또 다른 바람직한 구현예에서 돌연변이들이 예상될 수 있는 것으로 언급될 수 있다.
- [0515] 상기 언급된 궁극적으로 시험된 잔기들이 당연히 제한되지 않지만, 바람직한 돌연변이들로서 고려되어야 한다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 30개 서로 다른 아미노산들 중에서 3개 잔기들을 가지는 모두 8개 다른 잔기들이 재고될 수 있다.

- [0516] 상기 언급된 모든 돌연변이들은 개별적으로 또는 다양한 조합들에 따라 조사될 것이다.
- [0517] 도 40은 분명히 확인된 상기 언급된 돌연변이들을 가진 인간화된 11E1 VL을 나타낸 것이다. 각 제안된 돌연변이 아래 숫자는 상기 돌연변이가 매겨질 랭크에 해당한다.
- [0518] II-중사슬 가변 도메인의 인간화
- [0519] *마우스 배아 유전자들과 11E1 VH 뉴클레오타이드 서열의 비교*
- [0520] 예비적인 단계로서, 11E1 VH의 뉴클레오타이드 서열이 IMGT 데이터베이스의 마우스 배아 유전자 서열들 부분과 비교되었다 (<http://imgt.cines.fr>).
- [0521] V 부위와 94.10%, D 부위와 66.67% 및 J 부위와 100%의 서열 일치도를 각각 가지는 마우스 IGHV1-7*01, IGHD4-1*01 및 IGHJ3*01 배아 유전자들이 확인되었다. 획득된 일치도를 고려하여, 11E1 VH 서열들을 직접적으로 사용하여 인간 상동성들을 찾기로 결정하였다.
- [0522] 이들 정렬들을 V 유전자에 대해서 도 41A, D 유전자에 대해서는 도 41B 그리고 J 유전자에 대해서는 도 41C에 나타내었다.
- [0523] *인간 배아 유전자들과 11E1 VH 뉴클레오타이드 서열의 비교*
- [0524] CDR 이식을 위한 최상의 인간 후보를 확인하기 위해, 11E1 VH와 최상의 일치도를 나타내는 인간 배아 유전자가 검색되었다. 이를 위해, 11E1 VH의 뉴클레오타이드 서열이 IMGT 데이터베이스의 인간 배아 유전자 서열들 부분과 함께 정렬되었다. 선택의 최적화를 위해, 단백질 서열들 간 정렬들이 시행되어 더 나은 상동성들을 찾고자 하였다.
- [0525] 이들 두 보완적인 방법들을 사용하여, 마우스 11E1 VH CDRs에 대한 두 개 가능한 인간 수여 V 서열들을 확인하였다. 이를 위해, 뉴클레오타이드 정렬로 75.69%의 서열 일치도를 가진 인간 IGKV1-2*02 배아 유전자를 얻은 한편, 단백질 정렬로 71.10%의 서열 일치도를 가진 인간 IGHV1-46*01 배아 유전자를 얻는다.
- [0526] D 부위가 엄격히 VH 도메인에서 CDR3 부위에 속하는 점은 주목할만하다. 인간화 방법은 CDR-이식 접근법에 기초한다. 가장 근접한 (closest) 인간 D-유전자들의 분석은 이 전략에서 유용하지 않다.
- [0527] J 부위에 대한 상동성들을 검색한 결과 80.85%의 서열 일치도를 가지는 인간 IGHJ4*03 배아 유전자를 확인하였다.
- [0528] 전체 유사도 (similarity)들 및 서열 정렬들을 조사하기 위해, 인간 IGHV1-46*01 배아 유전자 및 인간 IGHJ4*01 J 배아 유전자가 따라서 마우스 11E1 VH CDRs에 대한 수여 인간 서열들로 선택되었다.
- [0529] 이들 정렬들을 V 유전자에 대해서 도 42A 그리고 J 유전자에 대해서는 도 42B에 나타내었다.
- [0530] *11E1 VH의 인간화된 버전*
- [0531] 하기 인간화 방법의 단계들은 선택된 배아 유전자 서열들 IGHV1-46*01 및 IGHJ4*03, 또한 마우스 11E1 VH CDRs을 이들 배아 유전자 서열들의 구조들들에 연결하는 것으로 이루어진다.
- [0532] 도 43에 나타난 바와 같이, 11E1 VH 서열에서 굵게 표시된 잔기들은 11E1 VH 도메인 및 선택된 인간 구조들들 간에 서로 다른 것으로 관찰된 26개 아미노산들에 해당한다 (인간 FR, 예로 IGHV1-46*01 및 IGKJ4*03).
- [0533] VH/VL 경계 부분에서, 항원 결합에서 또는 CDR 구조, 마우스 및 인간 잔기들 간 아미노산 클래스 변화들, 가변 도메인의 3D 구조에서 잔기들의 정착 위치에서 기지의 부가로서 몇 가지 기준들을 고려하여, 26개 서로 다른 잔기들 중 5개가 결국 돌연변이된 것이 확인되었다. 인간 상대방에 대해 가장 중요하게 정해진 이들 5개 잔기들 및 돌연변이들은 인간 H에서 마우스 N40, I에서 Y55, S에서 D66, R에서 A80 그리고 T에서 K82이다. 이들 랭크된 잔기들은 11E1 HZVH 서열에서 굵게 표시되어 마우스로 남아있는 잔기로서 도 43에 나타낸다.
- [0534] 상기 언급된 시험된 잔기들은 당연히 제한되지 않지만, 바람직한 돌연변이들로서 고려되어야 한다.
- [0535] 분자 모델의 도움을 받아서, 다른 돌연변이들이 조사될 수 있다. 하기 랭크된 2 잔기들이, 예로 53(I/M), 71(L/F), 76(A/V), 78(L/M) 및 87(A/V) 잔기들이 또 다른 바람직한 구현예에서 돌연변이들이 고려될 수 있는 것으로 언급될 수 있다.
- [0536] 상기 언급된 궁극적으로 시험된 잔기들이 당연히 제한되지 않지만, 바람직한 돌연변이들로서 고려되어야 한다.

또 다른 바람직한 구현예에서, 26개 서로 다른 아미노산들 중에서 3개 잔기들을 가지는 모두 16개 다른 잔기들이 재고될 수 있다.

- [0537] 상기 언급된 모든 돌연변이들은 개별적으로 또는 다양한 조합들에 따라 시험될 것이다.
- [0538] 도 43은 분명히 확인된 상기 언급된 돌연변이들을 가지는 인간화된 11H1 VH를 나타낸 것이다. 각 제안된 돌연변이 아래 숫자는 상기 돌연변이가 매겨질 랭크에 해당한다.
- [0540] 실시예 18: c-Met 인산화에 미치는 순수 분리된 Mabs의 효과
- [0541] 실시예 3에서, 항-c-Met-Mabs가 인산화에 미치는 효과가 측정된 각 하이브리도마로부터 나온 처리된 상청액들을 사용하여 평가되었다. 이 테스트는 순수 분리된 11E1 및 224G11을 사용하여 다시 수행되었다. 이는 30 µg/ml (200 nm)의 최종 농도에서 또는 0.0015 내지 30 µg/ml (0.01 - 200 nM) 용량 범위에서 측정되어 각 항체의 IC⁵⁰이 결정되었다. 사용된 프로토콜은 실시예에 3에 기술된 것과 동일하다.
- [0542] 3개 독립적 실험들의 결과들이 도 44에 나타나고 순수 분리된 11E1 및 224G11은 A549 세포들에 단독으로 첨가될 때 작동 효과를 보이지 않고 HGF 존재 시 각각 87 및 75% DML 길항 효과를 보여주었다. 예상한 바대로 5d5 Mab는 작동제 양성 대조군으로서 단독으로 첨가될 때 유의한 작동제 효과를 보여주었고 HGF 존재 하에 단지 중간 정도의 길항 효과 (39%)를 나타냈다. EC₅₀ 값을 계산하면, 11E1 및 224G11 모두는 나노몰 수준의 IC₅₀을 가진다.
- [0544] 실시예 19: NCI-H441 이종이식 모델에서의 224G11 및 나벨빈[®]의 생체내 조합
- [0545] ATCC로부터 나온 NCI-H441은 일상적으로 10% FCS, 1% L-글루타민을 포함하는 RPMI 1640 배지에서 배양되었다. 세포들은 이식하기 2일 전 지수적 성장기에 분리되었다. 10백만 개의 NCI-H441 세포들이 어티믹 누드 마우스에 이식되었다. 이식하고 5일 후에, 종양들이 측정될 수 있었고 동물들은 종양 크기에 따라 6마리 마우스 그룹들로 나누었다. 마우스는 2 mg의 224G11 Mab /마우스 용량 (loading dose)으로 i.p. 처리된 다음 38일이 경과할 때 까지 한 주에 두 번씩 1 mg의 항체/마우스로 처리되거나 나벨빈[®] (D5, D12, D19)를 8 mg/kg으로 3번 주입하였다. 조합된 처리로 투여된 세 번째 그룹도 역시 포함되었다. 나벨빈[®] i.p. 주입들로 주어졌다. 종양 부피는 한 주에 두 번 측정되었고 수학적식에 의해 계산되었다: $\pi/6 \times \text{길이} \times \text{너비} \times \text{높이}$. 동물의 체중도 나벨빈[®] 처리 기간 동안 매일 감시되었다. 통계적인 분석이 각 측정된 시간에 t-테스트 또는 맨-윌트니 테스트 (Mann-Whitney test)를 사용하여 수행되었다. 이 실험에서, 단일 형식으로 처리된 그룹들의 평균 종양 부피는 처음 주입하고 41일째에 224G1, 나벨빈[®] 및 나벨빈[®] + 224G11 각각의 경우 72%, 76% 및 99.8%가 감소된다. 41일째에 조합된 치료법은 단일 치료 처리들과 비교하여 종양 성장을 유의하게 개선시키고 (41일째 나벨빈[®] 단독과 비교하여 $p \leq 0.041$ 그리고 224G11 단독과 비교하여 $p \leq 0.002$), 6마리 마우스 중 4마리가 조합된 치료 그룹에서 종양들이 발견되지 않았다. 결과들은 도 45에 나타났다.
- [0546] 이들 결과들은 조합 치료를 받은 마우스 66%가 종양이 없었던 마지막 처리들 (D88) 이후 50일 동안 확인되었다.
- [0548] 실시예 20: NCI-H441 이종이식 모델에서의 224G11 및 독소루비신의 생체내 조합
- [0549] ATCC로부터 나온 NCI-H441은 일상적으로 10% FCS, 1% L-글루타민을 포함하는 RPMI 1640 배지에서 배양되었다. 세포들은 이식하기 2일 전 지수적 성장기에 분리되었다. 10백만 개의 NCI-H441 세포들이 어티믹 누드 마우스에 이식되었다. 이식하고 5일 후에, 종양들이 측정될 수 있었고 동물들은 종양 크기에 따라 6마리 마우스 그룹들로 나누었다. 마우스는 2 mg의 224G11 Mab /마우스 용량 (loading dose)으로 i.p. 처리된 다음 한 주에 두 번씩 1 mg의 항체/마우스 용량으로 처리되거나 독소루비신 (D5, D12, D19, D26)을 5 mg/kg으로 4번 주입하였다. 조합 처리로 투여된 세 번째 그룹도 역시 포함되었다. 독소루비신은 i.v. 주입들로 주어졌다. 종양 부피는 한 주에 두 번 측정되었고 수학적식에 의해 계산되었다: $\pi/6 \times \text{길이} \times \text{너비} \times \text{높이}$. 동물의 체중도 독소루비신 처리 기간 동안 매일 감시되었다. 통계적인 분석이 각 측정된 시간에 t-테스트 또는 맨-윌트니 테스트 (Mann-Whitney test)를 사용하여 수행되었다. 단일 치료들 및 조합된 치료는 모두 대조군과 비교하여 유의한 항-종양 활성을 나타냈다 (D11로부터 D39까지 $p \leq 0.002$) 결과들은 도 46에 나타났다.
- [0550] 조합된 처리도 역시 D11 내지 D39의 단일 처리와 비교하여 유의한 항-종양 성장 활성을 나타냈고 독소루비신을 항-c-Met 처리에 조합하는 이득이 있는 것을 보여주었다.
- [0552] 실시예 21: NCI-H441 이종이식 모델에서의 224G11 및 도세탁셀의 생체내 조합

- [0553] ATCC로부터 나온 NCI-H441은 일상적으로 10% FCS, 1% L-글루타민을 포함하는 RPMI 1640 배지에서 배양되었다. 세포들은 이식하기 2일 전 지수적 성장기에 분리되었다. 9백만 개의 NCI-H441 세포들이 어티믹 누드 마우스에 이식되었다. 이식하고 5일 후에, 종양들이 측정될 수 있었고 동물들은 종양 크기에 따라 6마리 마우스 그룹들로 나누었다. 마우스는 2 mg의 224G11 Mab /마우스 용량으로 i.p. 처리된 다음 한 주에 두 번씩 1 mg의 항체/마우스 용량으로 처리되거나 도세탁셀 (D5, D12, D19, D26)을 7.5 mg/kg으로 4번 주입하였다. 조합 치료로 투여된 세 번째 그룹도 역시 포함되었다. 독소루비신은 i.v. 주입들로 주어졌다. 종양 부피는 한 주에 두 번 측정되었고 수확식에 의해 계산되었다: $\pi/6 \times \text{길이} \times \text{너비} \times \text{높이}$. 동물의 체중도 독소루비신 처리 기간 동안 매일 감시되었다. 통계적인 분석이 각 측정된 시간에 t-테스트 또는 맨-윌트니 테스트 (Mann-Whitney test)를 사용하여 수행되었다. 단일 치료들 및 조합된 치료는 모두 대조군과 비교하여 유의한 항-종양 활성을 나타냈다 (D11로부터 D35까지 $p \leq 0.002$) 결과들은 도 47에 나타났다.
- [0554] 조합된 치료도 역시 D18 내지 D35의 단일 형식 처리와 비교하여 유의한 항-종양 성장 활성을 나타냈고 도세탁셀을 항-c-Met 처리에 조합하는 이득이 있는 것을 보여주었다.
- [0556] 실시예 22: U87MG 이종이식 모델에서의 224G11 및 테모졸로마이드의 생체내 조합
- [0557] ATCC로부터 나온 U87-MG 은 일상적으로 10% FCS, 1% L-글루타민을 포함하는 RPMI 1640 배지에서 배양되었다. 세포들은 이식하기 2일 전 지수적 성장기에 분리되었다. 5백만 개의 U87-MG 세포들이 어티믹 누드 마우스에 이식되었다. 이식하고 9일 후에, 종양들이 측정될 수 있었고 동물들은 종양 크기에 따라 6마리 마우스 그룹들로 나누었다. 마우스는 2 mg의 224G11 Mab /마우스 용량으로 i.p. 처리된 다음 한 주에 두 번씩 1 mg의 항체/마우스 용량으로 처리되거나 테모졸로마이드 (D19, D26, D33)을 5 mg/kg으로 3번 주입하였다. 조합 치료로 투여된 세 번째 그룹도 역시 포함되었다. 테모졸로마이드는 i.p. 주입들로 주어졌다. 종양 부피는 한 주에 두 번 측정되었고 수확식에 의해 계산되었다: $\pi/6 \times \text{길이} \times \text{너비} \times \text{높이}$. 동물의 체중도 독소루비신 처리 기간 동안 매일 감시되었다. 통계적인 분석이 각 측정된 시간에 t-테스트 또는 맨-윌트니 테스트를 사용하여 수행되었다. 단일 치료들 및 조합된 치료는 모두 대조군과 비교하여 유의한 항-종양 활성을 나타냈다 (D22로부터 D32까지 $p \leq 0.002$) (여기서 대조군 마우스는 윤리적 이유로 안락사되었다). 결과들은 도 47에 나타났다.
- [0558] 조합된 치료도 역시 테모졸로마이드의 경우 22일부터 43일까지 (여기서 대조군 마우스는 윤리적 이유로 안락사되었다) 그리고 224G11의 경우 29일부터 53일까지의 단일 형식 처리와 비교하여 유의한 항-종양 성장 활성 ($p \leq 0.002$)을 나타냈다. 종합해보면 이들 데이터는 테모졸로마이드를 항-c-Met 처리에 조합하는 이득이 있는 것을 보여준다.
- [0560] 실시예 23: 구형체 형성
- [0561] 다른 Mabs에 대해 실시예 9에서 이미 기술된 바와 같이, U87-MG 구형체 모델에서 224G11의 생체의 종양 성장을 저해하는 능력이 평가된다. 이 목적을 위해, 단일층으로 자란 7-MG 세포들이 트립신-EDTA를 사용하여 탈착되고 완전 세포 배양 배지에 재현탁되었다. 구형체들은 DMEM-2.5% FCS를 사용하여 둥근 바닥 96 플레이트의 단일 웰들 내로 625 세포들을 접종하여 형성되기 시작되었다. 기질에 세포 부착을 방해하기 위해, 플레이트는 95% 에탄올에서 폴리HEMA로 미리 코팅되었고 상온에서 공기 건조시켰다. 플레이트들은 37°C 5% CO₂ 표준 세포 배양 조건들 하에 습윤 인큐베이터들에서 배양되었다. 순수 분리된 모노클론 항체들 (10 µg/ml)이 구형체 배양 4 및 10일 후에 첨가되었다. 구형체들은 17일 동안 배양이 유지되었다. 그 다음 구형체 성장은 엑시오비전 소프트웨어의 자동측정 모듈을 사용하여 구형체들의 면적을 측정하여 감시하였다. 면적은 µm² 단위로 표현되었다. 8-16개의 구형체들이 각 조건에서 조사되었다. 구형체 크기는 항체들을 첨가하기 전 배양 10일 경과 후 및 배양 17일 경과 후에 측정되었다.
- [0562] 이들 조건들에서 균질한 구형체들이 획득되었고 항체들의 첨가 전에 통계적인 차이가 전혀 관찰되지 않았다 (도 49A).
- [0563] 도 49B-49D에서 나타난 바와 같이, 이소타입 대조군 9G4는 배양 10일 경과 후 및 배양 17일 경과 후에 구형체들의 성장에 영향을 주지않았다. 5D5 첨가가 구형체 크기에 주요한 효과를 미치지 않은 반면, 224G11 및 11E1 어느 것을 첨가하더라도 종양 성장은 현저하게 저해되었다.
- [0565] 실시예 24: 포스포-c-Met 분석에서 조합 및 인간화 형태의 224G11의 생체의 활성
- [0566] 마우스, 조합된 및 인간화된 형태들의 생체의 효능을 기능적 분석에서 비교하기 위해, 224G11 하이브리도마로부터 나온 배양 상청액들 및 형질전환된 HEK293 세포들이 처리되고 실시예 3에서 기술한 바와 같이 조사되었다.

도 50에 정리된 데이터는 도 6B에 이미 나타난 바와 같이, 순수 분리되지 않은 마우스 항체의 경우에 예상된 결과들을 보여주었다. 조합된 및 인간화된 순수 분리되지 않은 항체들 모두는 단독으로 첨가될 때 (도 50A) 또는 HGF 존재 하에 반응시킬 때 (도 50B) 비교될 수 있는 활성을 나타냈다.

[0568] 실시예 25: BIA코아 분석에 의해 항-c-Met 항체들의 친화 상수 (KD) 결정

[0569] 순수 분리된 11E1 및 224G11 항체들의 결합 친화도가 인간 IgG1 Fc 도메인 (R & D 시스템사)에 융합된 재조합 c-Met-Extra-세포 도메인 (ECD)을 항원 (분자량 129 kDa)으로 사용한 BIAcore X에 의해 조사되었다. c-Met-Fc 융합 단백질 및 항체들 모두가 2가 화합물들이기 때문에, mAbs 11E1 및 224G11의 Fc 단편들 (분자량 50 kDa) 이 파파인 절단에 의해 생산되고 결합력 매개변수에 의한 방해를 피하기 위해 순수 분리되어 이 분석에 사용되었다. 이 분석을 위해, 항-Tag 히스티딘 포획 항체가 CM5 센서칩 상에 코팅되었고 (대략 270 RU), 시험될 항체들이 분석체로서 용액 상태로 사용되었다. 센서칩은 글리신, HCl pH 1.5 완충용액을 사용하여 30초 동안 플로우 웰상에서 재생되었다.

[0570] 도 51은 이 분석의 기본 원칙을 설명한다. 그 결과 얻은 역학 매개변수가 하기 표 4에 정리되었다. 이들은 11E1 및 224G11 항-c-Met 항체들이 재조합 c-Met-Fc 융합 단백질과 약 40 pM 범위의 비교 친화도들을 가지고 반응하는 것을 나타낸다.

표 4

	K_{on1} $\times 10^{-6}$ [1/M.s]	K_{off1} $\times 10^{-6}$ [1/M.s]	Half-Life [h]	K [pM]
11E1 Fab	1.13 ± 0.01	4.68 ± 0.001	4.1	41.4 ± 0.5
224G11 Fab	2.04 ± 0.01	7.79 ± 0.40	2.5	34.8 ± 1.9

[0571]

[0572] 실시예 26: 어티믹 누드 마우스에서 인간 HGF 출처로서 MRC5 세포들로 공-이식된 MDA-MB-231 세포들에 미치는 224G11의 생체내 활성

[0573] ATCC에서 나온 MDA-MB-213 및 MRC5 세포들은 일상적으로 10% FCS, 1% L-글루타민을 포함하는 RPMI 1640 배지에서 배양되었다. 세포들은 이식하기 2일 전 지수적 성장기에 분리되었다. 5백만 개의 MDA-MB-231 세포들 및 500 000 MRC5 세포들이 어티믹 누드 마우스에 s.s. 공이식되었다. 이식하고 12일 후에, 종양들이 측정될 수 있었고 동물들은 종양 크기에 따라 6마리 마우스 그룹들로 나누었다. 마우스는 2 mg의 224G11 Mab /마우스 용량으로 i.p. 처리된 다음 한 주에 두 번씩 1 mg의 항체/마우스 용량으로 처리되었다. 종양 부피는 한 주에 두 번 측정되었고 수확식에 의해 계산되었다: $\pi/6 \times \text{길이} \times \text{너비} \times \text{높이}$.

[0574] 도 52에 나타난 결과들은 대조군과 비교하여 224G11으로 처리된 마우스의 메디안 종양 성장에서 유의한 차이를 보여주었다.

[0576] 실시예 27: 227H1, 11E1 및 224G11 항체들의 인간화에 대한 보완 요소들

[0577] 일반적인 방법

[0578] 항-c-Met 항체들의 인간화는 각 가변 도메인에서 분석된 아미노산들을 고려하여 각 사슬에서 독립적으로 및 연속해서 수행되었다. 인간화 방법은 재조합 Fc-c-Met에 대한 ELISA-기초한 결합 분석을 사용하여 첫 번째 시도에서 평가되었다; 결합 활성들이 인간화된 항체들과 재조합 조합 항체와 비교된다. 두 번째 시도에서, 항-c-Met 인간화된 항체들은 플라스틱-코팅된 재조합 HGF 상에서 Fc-c-Met 결합을 치환하는 그들의 능력으로 평가되었다; 이 경쟁 분석은 항-c-Met 항체들의 마우스, 조합 및 인간화된 버전들의 직접적인 비교를 가능하게 한다.

[0579] 도 53 및 54에서 전형적인 227H1, 11E1 및 224G11 마우스 모노클론 항체들의 항-c-Met 결합 활성들을 예로 들었다.

[0580] 도 53은 감지된 순수 분리된 항체들의 항-c-Met 직접적인 결합 활성들을 보여준다. 이 분석법에서, 마우스 모노클론 항-c-Met 항체들은 서로 다르지만 여전히 용량-의존적인 항-c-Met 결합 활성들을 나타낸다.

- [0581] 도 54는 순수 분리된 마우스 항체들의 HGF-cMet 결합 경쟁 활성들을 나타낸다. 경쟁 분석법은 이들 항-c-Met 모노클론 항체들 간 신뢰할만한 차이들을 보여주는 데, 11E1 모노클론 항체의 경우는 전부는 아니지만 신뢰할만한 적당한 경쟁 활성을 나타내는 반면 마우스 224G11 및 227H1의 경우는 높은 항체 농도에서 최대 100% HGF 결합으로 유사한 양상의 경쟁 활성들을 나타낸다. 224G11 모노클론 항체는 최상의 IC₅₀ 값을 갖는다.
- [0582] 마우스 항체들의 직접적인 결합 활성들이 본질적인 HGF- 결합 경쟁적 특성들을 반영하지 못하는 것은 주목해야 한다.
- [0583] 이들 두 분석법들은 마우스의 항-c-Met 항체들의 재조합 조합된 및 인간화된 버전들을 특성 조사하는 데 사용되었다. 결론적으로, 마우스 또는 인간화된 항-c-Met 가변 도메인들은 론자 (LONZA)의 pCONplus 발현 벡터들 시리즈 내에 클론되었고, 재조합 IgG1/ κ -유래 항체들이 CHO 세포들에서 발현되었다. 발현 배양 상청액들은 농축되었고 PBS를 사용하여 강력하게 투석된 다음 발현된 항체들 농도들로 처리되고 직접 해당되는 항-c-Met 결합 활성을 평가하는 데 사용되었다. 직접적인 결합 및 HGF-경쟁 분석법들은 재조합 조합 또는 인간화된 버전들의 특성을 조사하는 데 유용한 것으로 평가되었다.
- [0585] 실시예 27-1: 227H1 중사슬 가변 도메인의 인간화
- [0586] CDR 이식을 위한 최상의 인간 후보를 확인하기 위하여, 마우스 227H1 VH 서열과 최상의 일치도를 가지는 인간 배아 유전자가 탐색되었다. IMGT 데이터베이스의 도움을 받아서, 인간 IGHV1-2*02 V 배아 유전자와 인간 IGHJ4*01 J 배아 유전자가 마우스 227H1 VH CDRs에 대한 수여 인간 서열들로서 선택되었다.
- [0587] 도 55는 선택된 인간 구조들로 마우스 227H1 VH 도메인의 아미노산 정렬을 나타낸 것이다. 인간 FR 라인에서 마우스 227H1 VH 도메인과 서로 다른 아미노산만이 표시된다. HZ3VH, HZ2VH 및 HZ1VH 라인들은 분명히 확인된 상기 언급된 ("변화된" 라인) 돌연변이들을 가진 227H1 VH 도메인의 인간화된 버전들에 해당한다. 각 각 제안된 돌연변이 아래 숫자는 상기 돌연변이가 매겨질 랭크에 해당한다.
- [0588] 첫 번째 실험 시리즈에서, 본 발명자는 제작하여 227H1 조합 경사슬과 조합하여 발현될 때 3개 마우스 227H1 VH 도메인의 인간화된 버전들의 항-c-Met 결합 활성들을 분석하였다. 항-c-Met 직접 결합 분석으로부터 얻은 결과들은 도 56에 나타낸다. 이 실험에서, 조사된 227H1-유래 조합된 또는 부분적으로 인간화된 재조합 항체들의 결합 능력들에서 차이들은 관찰되지 않았다. 여기서 마우스 227H1 VH 도메인과 선택된 인간 구조들 간에 서로 다른 36 아미노산들 중 26개가 분석되었고 이들은 조합 경사슬과 조합될 때 227H1 인간화된 VH 도메인의 항-c-Met 결합 활성에는 적절하지 못한 것으로 확인되었다.
- [0589] 227H1 VH 도메인의 HZ1VH 인간화된 버전에서 마지막 6개 마우스 잔기들을 부위-유도 돌연변이화 (site-directed mutagenesis)로 분석하여, 원래 HZ4VH <인간화된 전체-IMGT> 버전을 제작하고 그의 항-c-Met 결합 특성들을 조사하였다. 결과들은 직접 결합 분석에 대해서는 도 57에 HGF 결합 경쟁 분석에 대해서는 도 58에 나타낸다. 재조합 조합 및 인간화된 227H1 버전들이 마우스 부모 항체보다 더 나은 경쟁 활성을 나타내는 것은 주목할만하다.
- [0590] 그럼에도 불구하고, "전체-IMGT" 인간화된 227H1 VH 도메인의 항-c-Met 결합 특성들에 관한 실험 데이터가 주어져서, 그 결과 얻은 도 59에 나타난 아미노산 서열이 선택되었고 소위 227H1-HZ VH 인간화된 가변 도메인의 <인간도 (humanness)>를 측정하기 위해 생물정보 분석 (bioinformatic analysis)이 수행되었다.
- [0591] 결론적으로, IMGT 수단들을 사용하여 구조들 서열들을 인간 데이터베이스와 단순히 비교하였다. 이 과정에서 구조들 잔기들에 해당하는 89개 분석된 아미노산들로 인간화 수준이 결정되어서, 89개는 인간 기원이라고 믿을만하다. CDRs로부터 나온 잔기들만이 서로 다르지만, 그렇다면 해당하는 인간 배아 유전자가 서로 다르고 분명히 과다가변 위치 (hypervariable position)들에 존재한다. IMGT 번호법 시스템 및 상동성 분석 수단들에 기초하여, 먼저 마우스 기원의 항체 가변 도메인을 전체적으로 인간화하였다.
- [0593] 실시예 27-2: 11E1 모노클론 항체 인간화
- [0594] I-11E1 중사슬 가변 도메인의 인간화
- [0595] CDR 이식을 위한 최상의 인간 후보를 확인하기 위하여, 마우스 11E1 VH 서열과 최상의 일치도를 가지는 인간 배아 유전자가 탐색되었다. IMGT 데이터베이스의 도움을 받아서, 인간 IGHV1-46*02 V 배아 유전자와 인간 IGHJ4*03 J 배아 유전자가 마우스 11E1 VH CDRs에 대한 수여 인간 서열들로서 선택되었다.
- [0596] 도 60는 선택된 인간 구조들로 마우스 11E1 VH 도메인의 아미노산 정렬을 나타낸 것이다. 인간 FR 라인에서 마

우스 11E1 VH 도메인과 서로 다른 아미노산만이 표시된다. HZ VH3, HZ VH2 및 HZ VH1 레인들은 분명히 확인된 상기 언급된 ("변화된" 레인) 돌연변이들을 가진 11E1 VH 도메인의 인간화된 버전들에 해당한다. 각 각 제안된 돌연변이 아래 숫자는 상기 돌연변이가 매겨질 랭크에 해당한다.

[0597] 첫 번째 실험 시리즈에서, 본 발명자는 제작하여 11E1 조합 경사슬과 조합하여 발현될 때 3개 마우스 11E1 VH 도메인의 인간화된 버전들의 항-c-Met 결합 활성들을 분석하였다. 항-c-Met 직접 결합 분석으로부터 얻은 결과들은 도 61에 나타낸다. 이 실험에서, 조사된 11E1-유래 조합된 또는 부분적으로 인간화된 재조합 항체들의 결합 능력들에서 차이들은 관찰되지 않았다. 여기서 마우스 11E1 VH 도메인과 선택된 인간 구조들 간에 서로 다른 24 아미노산들 중 19개가 분석되었고 이들은 조합 경사슬과 조합될 때 11E1 인간화된 VH 도메인의 항-c-Met 결합 활성에는 적절하지 못한 것으로 확인되었다.

[0598] II-11E1 경사슬 가변 도메인의 인간화

[0599] CDR 이식을 위한 최상의 인간 후보를 확인하기 위하여, 마우스 11E1 VL 서열과 최상의 일치도를 가지는 인간 배아 유전자가 탐색되었다. IMGT 데이터베이스의 도움을 받아서, 인간 IGKV3D-7*01 V 배아 유전자와 인간IGHJ4*01 J 배아 유전자가 마우스 11E1 VL CDRs에 대한 수여 인간 서열들로서 선택되었다.

[0600] 도 62는 선택된 인간 구조들로 마우스 11E1 VL 도메인의 아미노산 정렬을 나타낸 것이다. 인간 FR 레인에서 마우스 11E1 VL 도메인과 서로 다른 아미노산만이 표시된다. HZ VL3, HZ VL2 및 HZ VL1 레인들은 분명히 확인된 상기 언급된 ("변화된" 레인) 돌연변이들을 가진 11E1 VL 도메인의 인간화된 버전들에 해당한다. 각 제안된 돌연변이 아래 숫자는 상기 돌연변이가 매겨질 랭크에 해당한다.

[0601] 첫 번째 실험 시리즈에서, 본 발명자는 제작하여 11E1 조합 경사슬과 조합하여 발현될 때 3개 마우스 11E1 VH 도메인의 인간화된 버전들의 항-c-Met 결합 활성들을 분석하였다. 항-c-Met 직접 결합 분석으로부터 얻은 결과들은 도 63에 나타낸다. 이 실험에서, 조사된 11E1-유래 조합된 또는 부분적으로 인간화된 재조합 항체들의 결합 능력들에서 차이들은 관찰되지 않았다. 여기서 마우스 11E1 VL 도메인과 선택된 인간 구조들 간에 서로 다른 30 아미노산들 중 26개가 분석되었고 이들은 조합 경사슬과 조합될 때 11E1 인간화된 VL 도메인의 항-c-Met 결합 활성에는 적절하지 못한 것으로 확인되었다.

[0602] III-11E1 항체의 인간화

[0603] 11E1 단일클론 항체 인간화의 이 단계에서, 이론적인 인간화된 항체 서열은 마우스 부모 VH 도메인으로부터 나온 단지 5개 외부-CDRs 잔기들 및 마우스 부모 VL 서열로부터 나온 4개 외부-CDRs 잔기들을 포함한다 (도 60, 레인 HZ VH1 및 도 62, 레인 VL1). 그 다음 이로부터 얻은 11E1 항체의 조합된 중사슬 및 경사슬 인간화 버전이 바로 특성 분석되었다. 항-c-Met 직접 결합 분에 대한 결과들은 도 64에 주어진다.

[0604] 이 실험에서 조사된 11E1-유래 조합 또는 인간화 재조합 항체들의 유사한 결합 능력들이 관찰되었다. 11E1 모노클론 항체의 선택된 VH1/VL1 "전-인간화된 (pre-humanized)" 버전에서, HGF-결합 경쟁 특성들의 분석 및 부위-유도 돌연변이화 분석이 9개 마우스 잔기들에 대해 독립적으로 또는 조합하여 수행되었다.

[0606] 실시예 27-3: 224G11 모노클론 항체 인간화

[0607] I-224G11 중사슬 가변 도메인의 인간화

[0608] CDR 이식을 위한 최상의 인간 후보를 확인하기 위하여, 마우스 224G11 VH 서열과 최상의 일치도를 가지는 인간 배아 유전자가 탐색되었다.

[0609] 224G11 및 227H1 VH 도메인 서열들 간의 높은 서열 상동성을 고려하고 또한 IMGT 데이터베이스 수단들을 사용하여 확인한 바와 같이, 인간 IGHV1-2*02 V 배아 유전자 및 인간 IGHJ4*01 J 배아 유전자가 마우스 224G11 VH CDRs에 대한 수여 인간 서열들로서 선택되었다. 높은 상동성에 기초하여, 227H1 VH 도메인 인간화로부터 얻어진 인간화 정보들을 직접 전달하기로 결정하였고 그 다음 "전체-IMGT" 인간화된 버전을 도 65에 나타난 바와 같이 디자인하였다. 여기서는 선택된 인간 구조들을 사용한 마우스 227H1 및 224G11 VH 도메인들의 아미노산 정렬을 보여준다. 인간 FR 레인에서, 마우스 224G11 VH 도메인과 다른 아미노산만이 표시된다. HZVH0 레인은 "전체-IMGT" 227H1-HZVH 도메인을 위해 얻어진 바와 같이 224G11 VH 도메인의 <전체-IMGT> 인간화 버전에 해당한다.

[0610] 마우스 224G11 VH 도메인의 <전체-IMGT> 인간화 버전이 제작되고 224G11 조합 경사슬과 조합하여 발현될 때 그의 항-c-Met 결합 활성들이 분석되었다. 항-c-Met 직접 결합 분석으로부터 얻은 결과들은 도 66에 나타난 반면, 도 67은 HGF 결합 경쟁 분석을 나타낸다.

- [0611] "전체-IMGT" 인간화된 224G1 VH 도메인의 항-c-Met 결합 특성들에 관한 실험 데이터가 주어져서, 그 결과 얻은 도 65에 나타난 아미노산 서열이 선택되었고 소위 224G11-HZ VH0 인간화된 가변 도메인의 <인간도>를 측정하기 위해 생물정보 분석이 수행되었다.
- [0612] 여기서 사용한 인간화 전략은, 224G11 HZ VH0 서열의 인간도 분석을 위해 실시예 27을 참고해야 한다. 227H1 VH 도메인 인간화에 관해 기술된 바와 같이, IMGT 번호법 시스템 및 상동성 분석 수단들의 신뢰성을 입증하고 또한 본질적인 상동성 제한들 하에 항체들 간 인간화 전략을 전달하는 가능성을 보여준다.
- [0613] II-224G11 경사슬 가변 도메인의 인간화
- [0614] CDR 이식을 위한 최상의 인간 후보를 확인하기 위하여, 마우스 224G11 VL 서열과 최상의 일치도를 가지는 인간 배아 유전자가 탐색되었다. IMGT 데이터베이스의 도움을 받아서, 2개 가능성 있는 마우스 224G11 VL CDRs에 대한 수여 인간 서열들이 확인되었다. 따라서 2가지 인간화 전략이 224G11 VL 도메인에서 만들어졌다. 첫 번째는 더 짧은 CDR1 길이 (IGKV3-11*01)를 가진 인간 구조들에 대한 초기 시도에 해당하고 두 번째는 더 긴 CDR1 길이를 가진 것 (IGKV4-1*01)에 해당한다.
- [0615] 도 68은 선택된 인간 구조들로 마우스 224G11 VL 도메인의 아미노산 정렬을 나타낸 것이다. 더 짧고 및 더 긴 Hu-FR FR 레인들 모두에서, 마우스 224G11 VL 도메인과 서로 다른 아미노산만이 나타난다. HZ VL3 및 HZ VL6 레인들은 분명히 확인된 상기 언급된 ("랭크" 레인) 돌연변이들을 가진 224G11 VL 도메인의 기본적인 인간화 버전들에 해당한다. 각 제한된 돌연변이 아래 숫자는 기본적인 "더 짧은" 또는 "더 긴" CDR1 구조들이 선택될 때 상기 돌연변이가 매겨질 랭크에 해당한다.
- [0616] 첫 번째 실험 시리즈에서, 마우스 224G11 VL 도메인의 두 개 기본 인간화된 버전들이 제작되고 224G11 조합 중사슬과 조합하여 발현될 때 항-c-Met 결합 활성들을 분석하였다. 항-c-Met 직접 결합 분석으로부터 얻은 결과들은 도 69에 나타난다. 이 실험에서, 유사한 항-c-Met 결합 활성이 조합 및 HZ VL6 (<더 긴 CDR1>) 버전에서 관찰된 반면, HZ VL3 (<더 짧은 CDR1>) 재조합 224G11-유래 항체에서는 결합이 거의 관찰되지 않았다.
- [0617] 두 번째 실험 세트에서, 본 발명자는 제작하여 224G11 조합 중사슬과 조합하여 발현될 때 HZ VL-6-유래 224G11 VH 도메인의 인간화된 버전들의 항-c-Met 결합 활성들을 분석하였다.
- [0618] HZ VL5 버전에서 세 번째 그룹으로부터 (랭크 3) 7개 잔기들이 인간화되고, HZ VL4 버전에서 첫 번째 그룹으로부터 (랭크 1 잔기들) 4개 왼쪽 잔기들이 마우스 상태로 남았다. 항-c-Met 직접 결합 분석으로부터 얻은 결과들은 도 70에 나타난다. 이 실험에서, 조사된 224G11-유래 조합된 또는 부분적으로 인간화된 재조합 항체들의 결합 능력들에서 차이들은 관찰되지 않았다. 여기서 마우스 224G11 VL 도메인과 선택된 <더 긴 CDR1> 인간 구조들 간에 서로 다른 22 아미노산들 중 18개가 분석되었고 이들은 조합 중사슬과 조합될 때 224G11 인간화된 VL 도메인의 항-c-Met 결합 활성에는 적절하지 못한 것으로 확인되었다.
- [0619] 그 다음 HGF 결합 경쟁 분석에서 224G11 VL 도메인의 HZ VL4 인간화된 버전이 조사되었다. 도 71에 나타난 바와 같이 결과들은 마우스 및 재조합 조합 및 인간화된 HZ VL4 224G11-유래 항체들이 유사한 경쟁 활성을 보여준다.
- [0620] 224G11 VL 도메인 인간화의 이 단계에서, 이로부터 나온 서열은 마우스 부모 서열로부터 나온 단지 4개 외부-CDRs 잔기들을 포함한다. 도 72에 나타난 바와 같이, 이들 4개 §-표지된 잔기들은 L4, M39, H40 및 R84이다.
- [0621] IMGT 번호법 시스템 및 상동성 분석 수단들에 기초하여, CDR 길이에서 구조적인 차이들을 보여주는 인간 구조들이 여전히 인간화 방법에 적합할 수 있는 것을 제시한다. 그 다음 224G11 항체의 중사슬 및 경사슬 인간화된 버전의 특성을 밝히기로 결정되었다. 중사슬의 VH0 인간화된 버전과 조합하여 발현될 때 남아있는 4개 마우스 잔기들의 기여 정도를 부위-유도 돌연변이화로 분석한다.
- [0622] III-224G11 항체의 인간화
- [0623] 첫 번째 실험 시리즈에서, 제작하여 마우스 224G11 항체의 전체 인간화된 버전들의 항-c-Met 결합 활성들을 분석하였다. 이 재조합 버전은 VH0 및 VH4 인간화된 VH 및 VL 도메인들을 각각 포함한다. 항-c-Met 직접 결합 분석으로부터 얻은 결과들은 도 73에 나타난다. 이 실험에서, 전체 인간 224G11 항-c-Met 결합 활성이 <단일 사슬> 인간화된 및 조합된 재조합 224G11 버전들의 활성과 유사한 것이 관찰되었다.
- [0624] 그 다음 224G11 VL 도메인의 전체 인간화된 버전이 HGF 결합 경쟁 분석으로 조사되었다. 도 74에 나타난 바와 같이 얻어진 결과들은 마우스 부모 및 재조합 조합 및 전체 인간화된 224G11-유래 항체들에서 유사한 경쟁 활성을 보여준다.

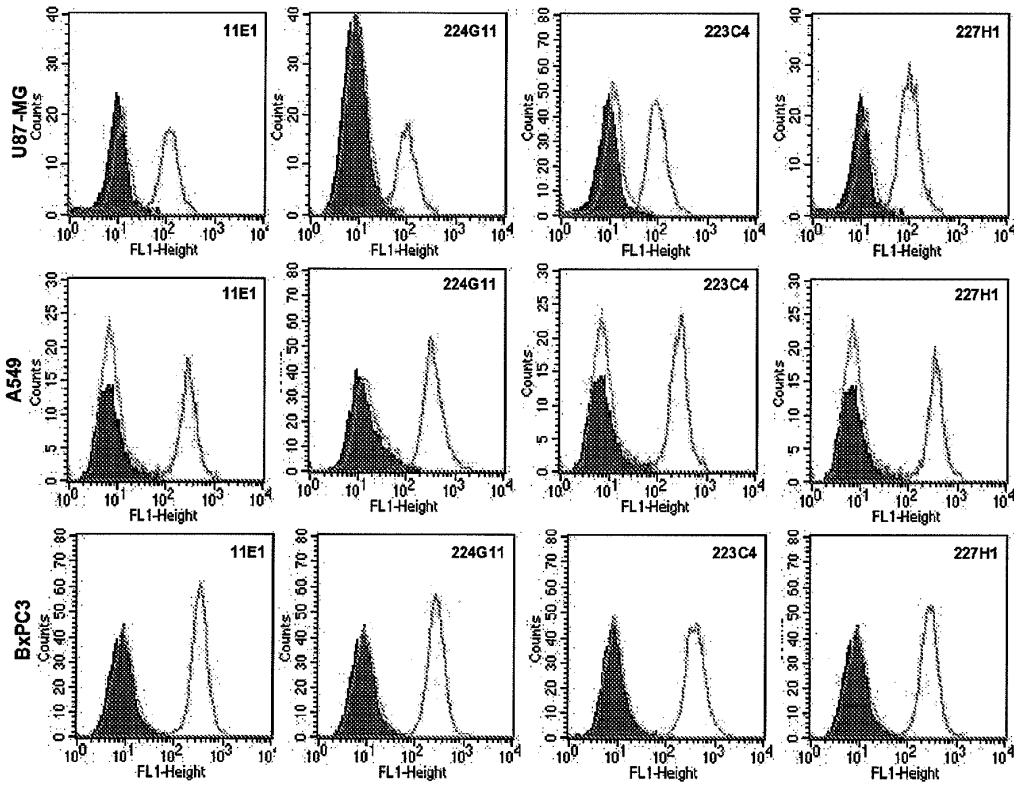
- [0625] 224G11 항체 인간화의 이 단계에서, 이로부터 나온 서열은 마우스 부모 경사슬 가변 도메인 서열로부터 나온 단지 4개 외부-CDRs 잔기들을 포함한다. 그 다음 증사슬의 VH0 인간화된 버전과 조합하여 발현될 때 VL4 인간화된 VL 도메인의 단일 변형체들을 부위-유도 돌연변이화로 분석하였다. 도 75에 나타난 바와 같이, 직접 결합 분석에서 4개 조사된 것들 중에서 잠재적으로 적절한 잔기들로 M39 및 H40을 확인하였다.
- [0626] HZ VL4 인간화된 224G11 VL 도메인의 다중 돌연변이체들이 HZ VH0 인간화된 224G11 VH 도메인과 조합되어 발현될 때 분석되었다. 직접 결합 분석에 대해 도 76 그리고 HGF 결합 경쟁 분석에 대해 도 77에서 나타난 바와 같이, VL4 도메인의 다중 아미노산 돌연변이체들이 최상의 인간화된 조합을 확인하기 위해 분석되었다. 단일 돌연변이체 분석에 기초하여, 최상의 항-cMet 활성들을 나타낼 수 있는 이중 및 삼중 돌연변이에 집중하였다. VH0/VL4-2x 돌연변이는 L4M/M39L/R84G 삼중 돌연변이를 가진 HZ VL4 224G11 인간화된 VL 도메인과 함께 발현되는 HZ VL4 224G11 인간화된 VH 도메인에 해당한다.
- [0627] 전체 인간화된 224G11 항체의 항-c-Met 결합 특성들에 관한 시험적 데이터가 주어져 있어서, 증사슬 및 경사슬 가변 도메인들 서열들의 생물정보학적 분석이 수행되고 VH0/VL4-2x 및 VH0/VL4-3x 최상의 인간화 버전들의 <인간도> 수준을 평가하였다. VH0 224G11 VH 도메인의 "전체-IMGT" 인간화는 이전에 조사되었다. VL4-2x 및 -3x 224G11 인간화 VL 도메인 버전들의 인간도 수준을 고려하여, 그들은 단지 마우스 M39 및/또는 H40 잔기들을 포함한다. 이들 두 잠재적으로 중요한 잔기들은 CDR1 말단에 위치하고 M39는 CDR 고정 위치의 N-말단이 된다. 224G11 VL 도메인 인간화 동안 접하게 되는 CDR 길이 문제가 있고 이들 위치들을 VL CDR1의 카바트 정의 (Kabat definition) 부분으로 고려하여, 전체 인간화된 224G11 항체의 인간도 수준은 최소의 보존된 마우스 잔기들로 인해 매우 감소된 면역원성을 나타내야 한다.

수탁번호

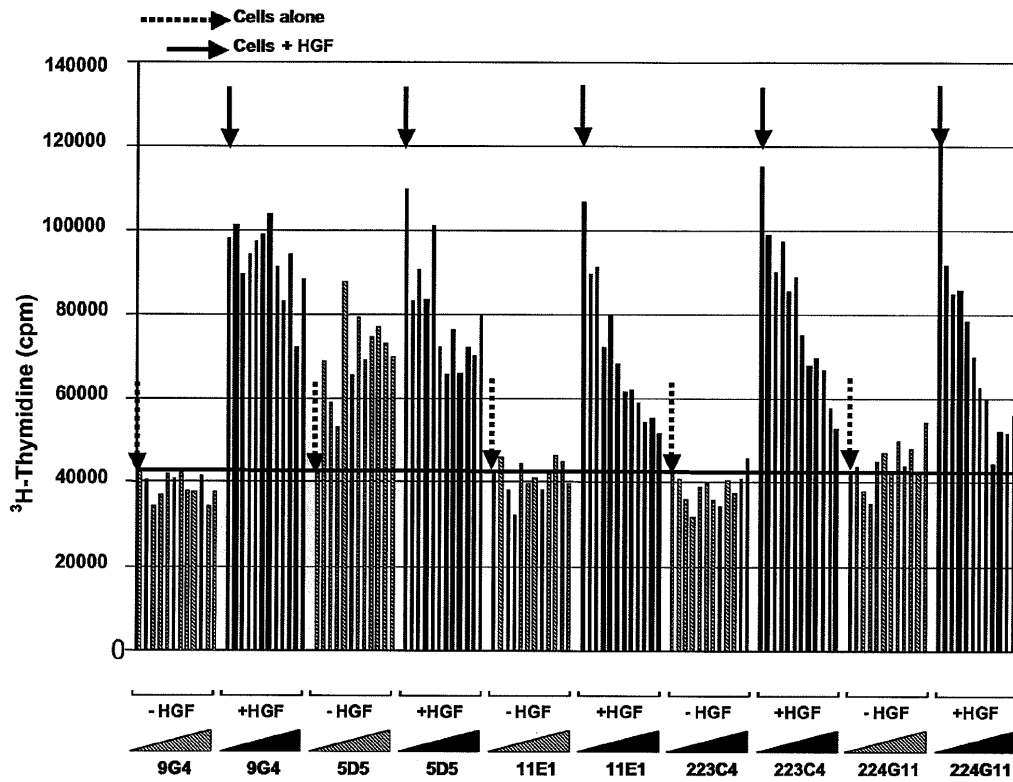
- [0628]
- 기탁기관명 : CNCM
 수탁번호 : CNCMI-3724
 수탁일자 : 20070314
- 기탁기관명 : CNCM
 수탁번호 : CNCMI-3731
 수탁일자 : 20070314
- 기탁기관명 : CNCM
 수탁번호 : CNCMI-3732
 수탁일자 : 20070314
- 기탁기관명 : CNCM
 수탁번호 : CNCMI-3786
 수탁일자 : 20070706

도면

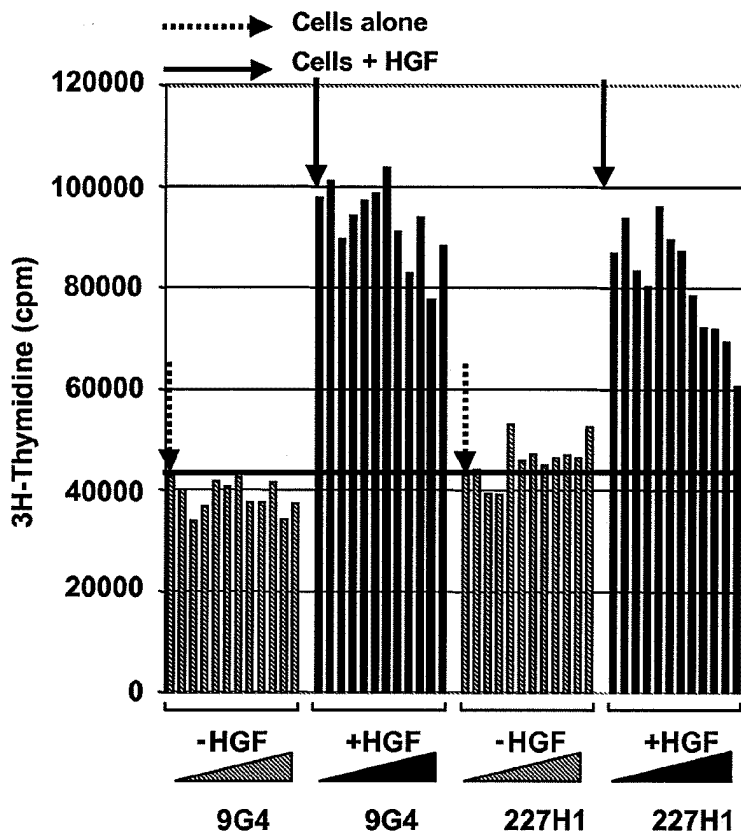
도면1



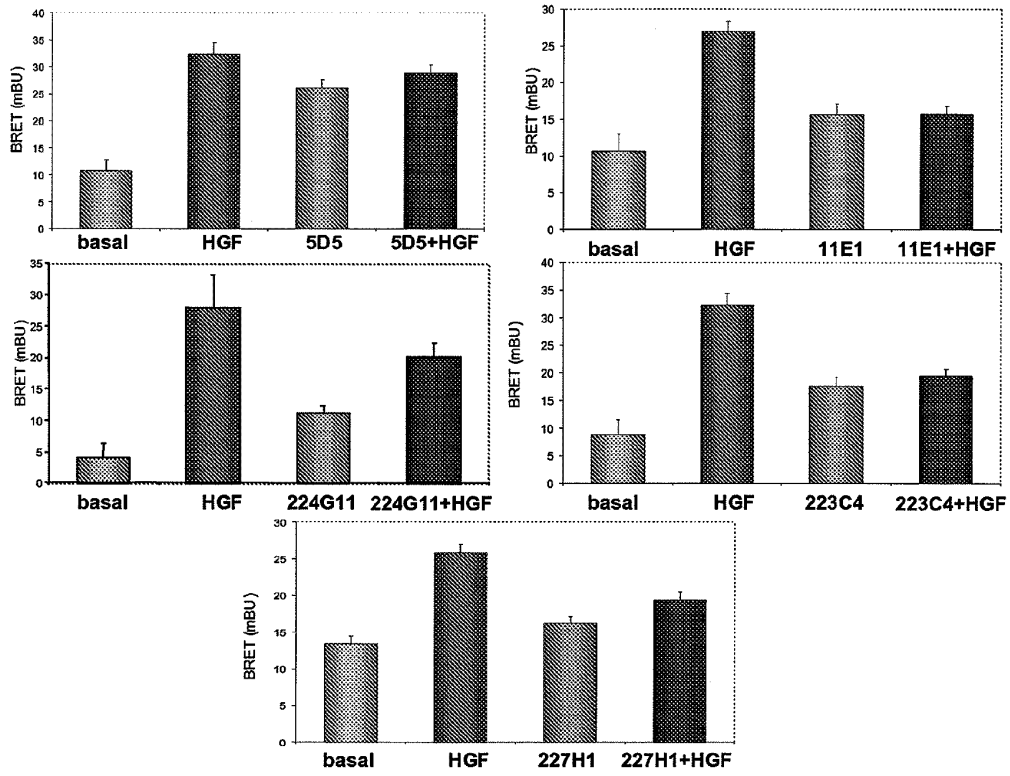
도면2a



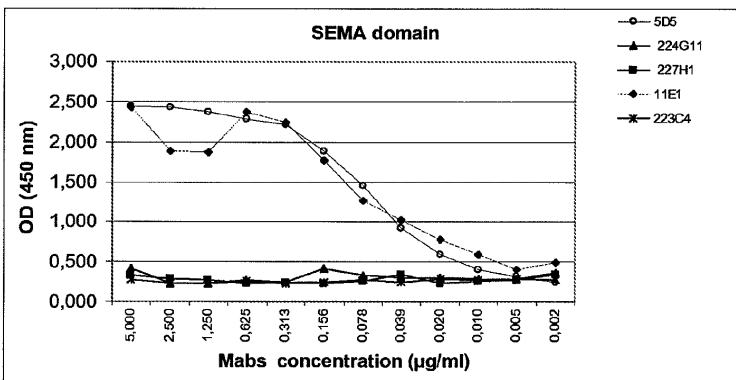
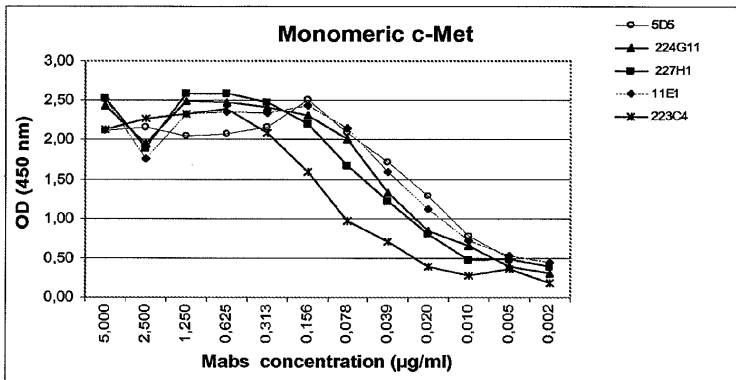
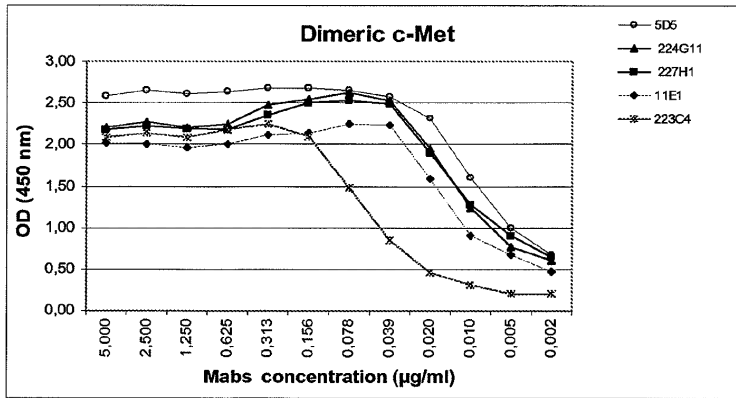
도면2b



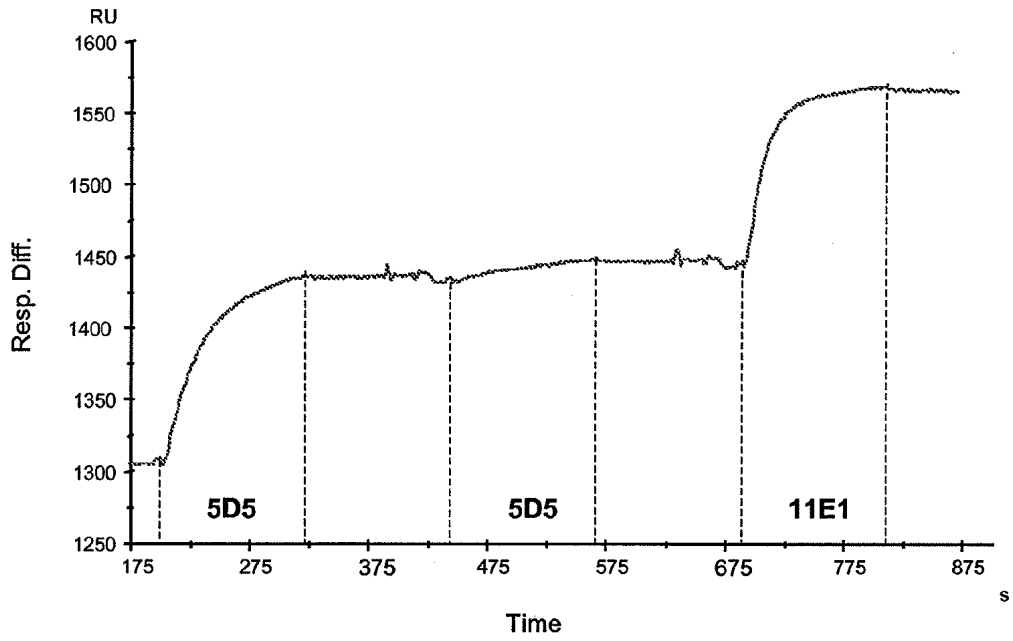
도면3



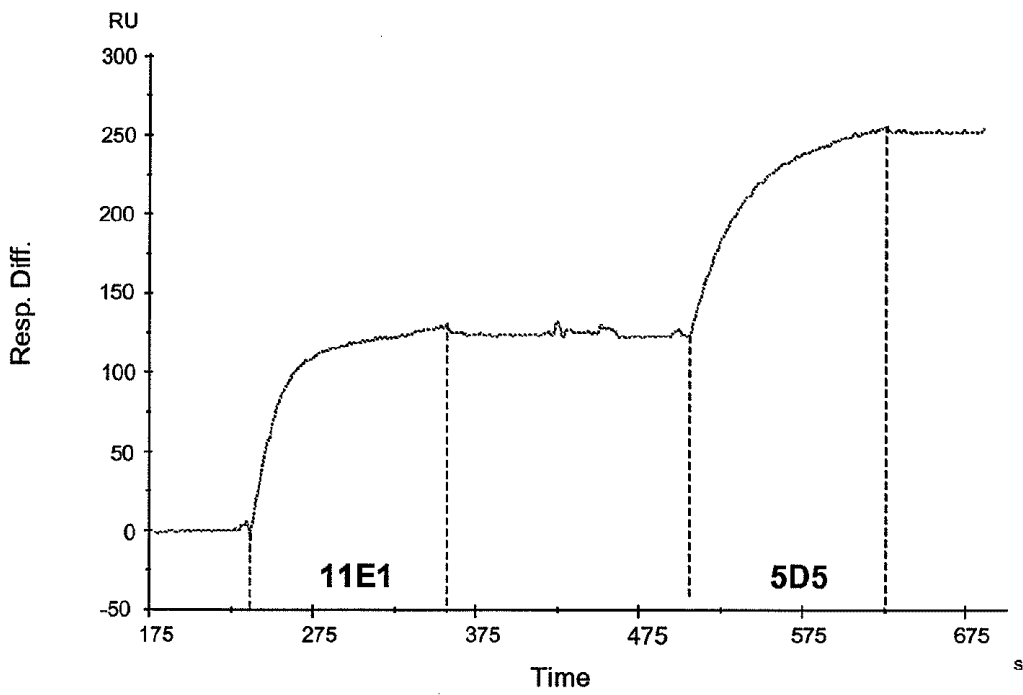
도면4



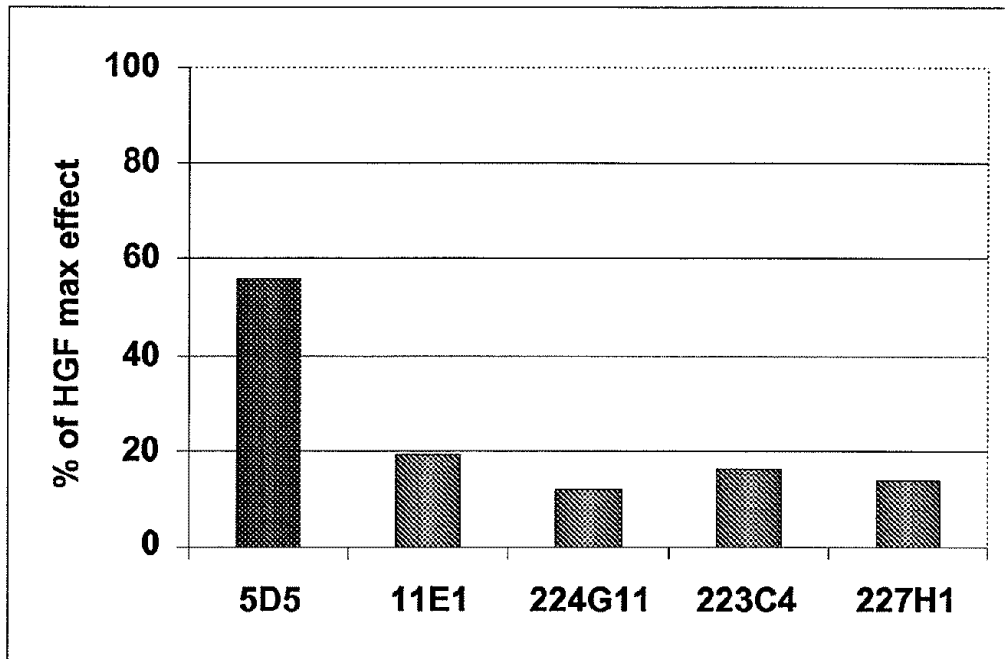
도면5a



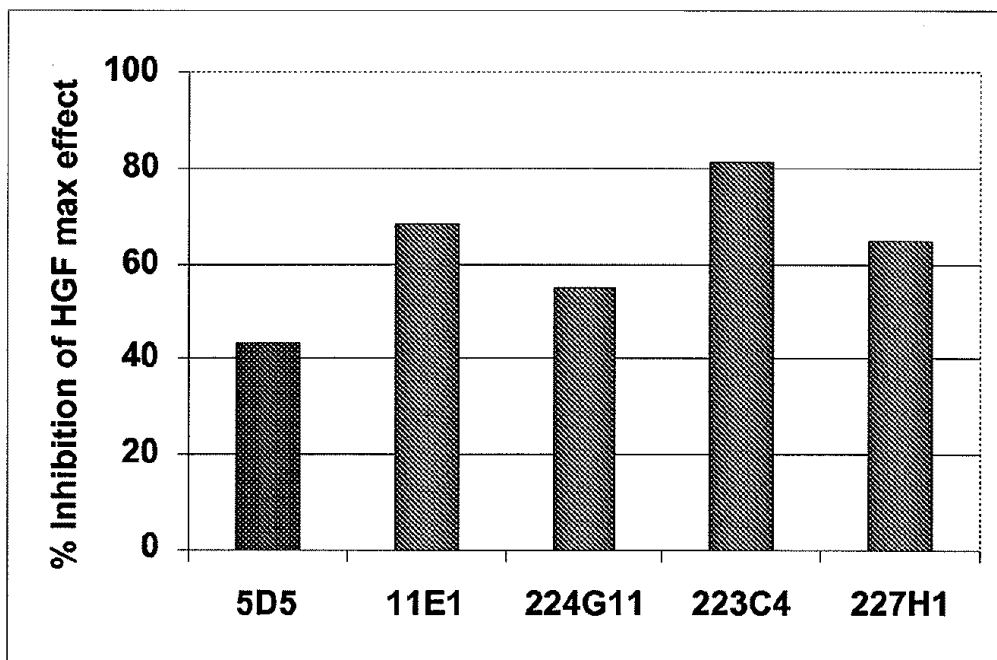
도면5b



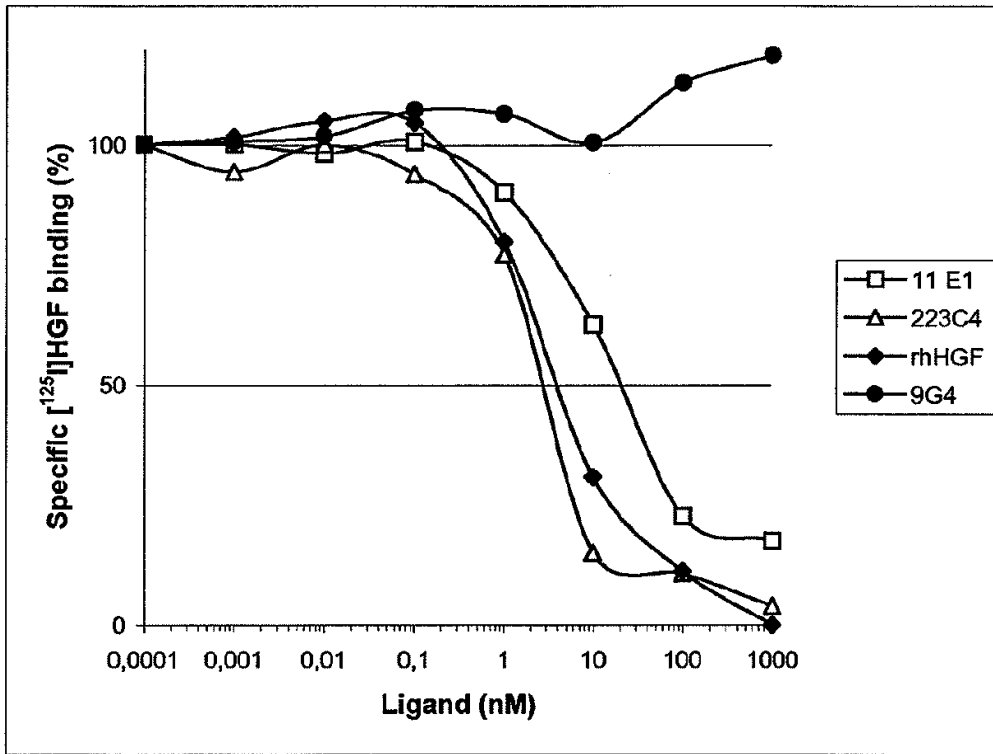
도면6a



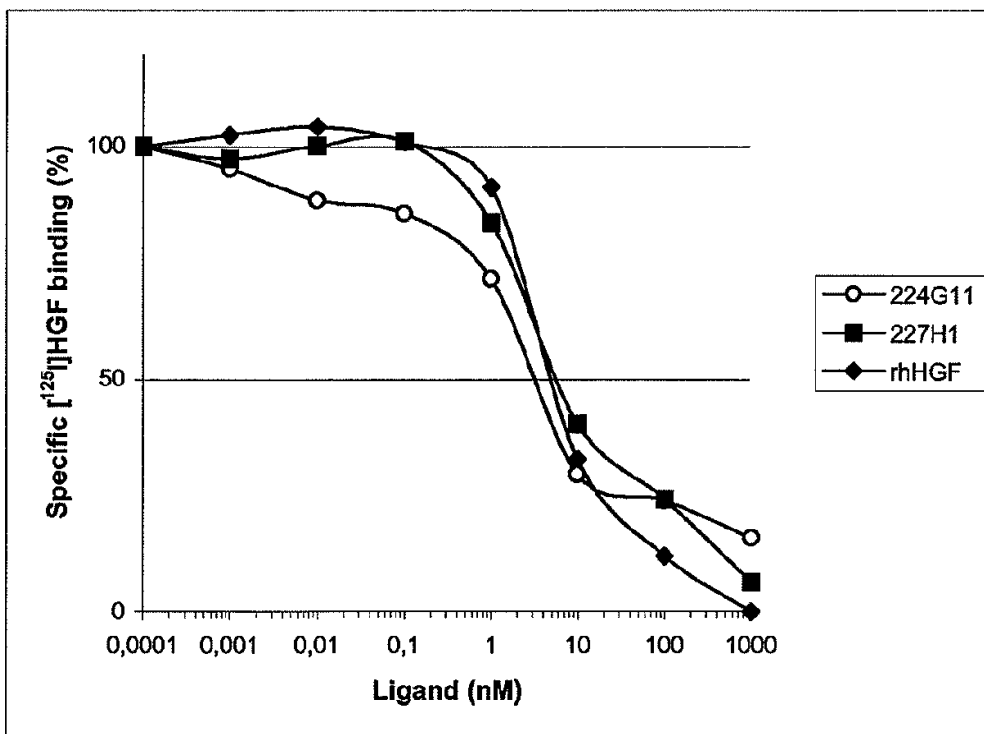
도면6b



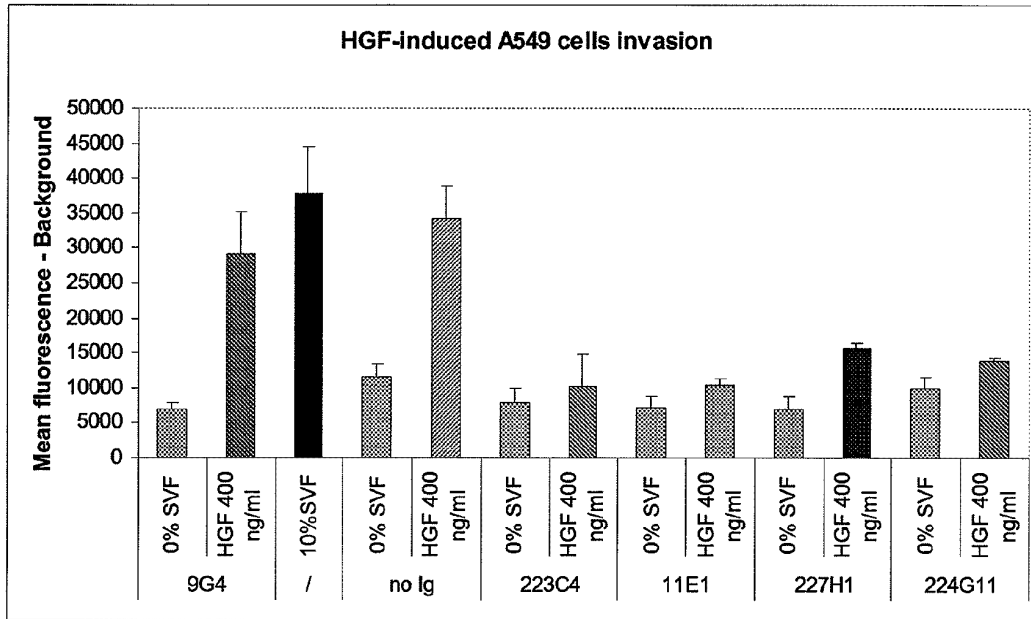
도면7a



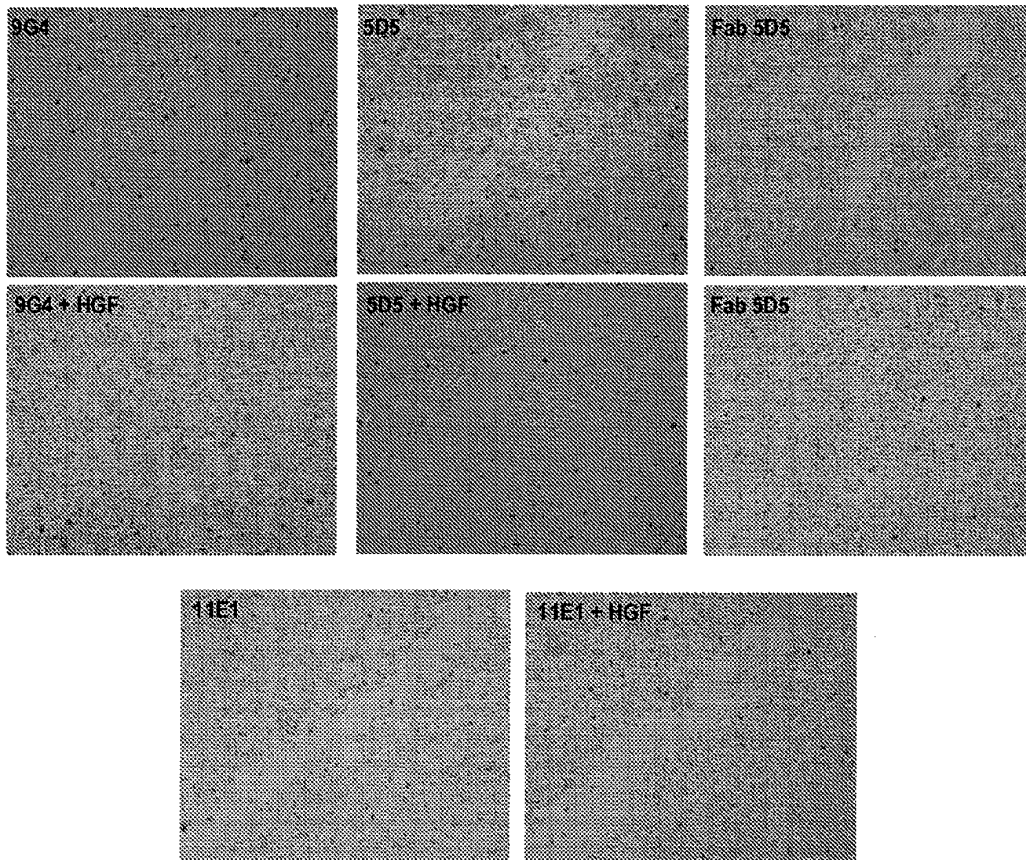
도면7b



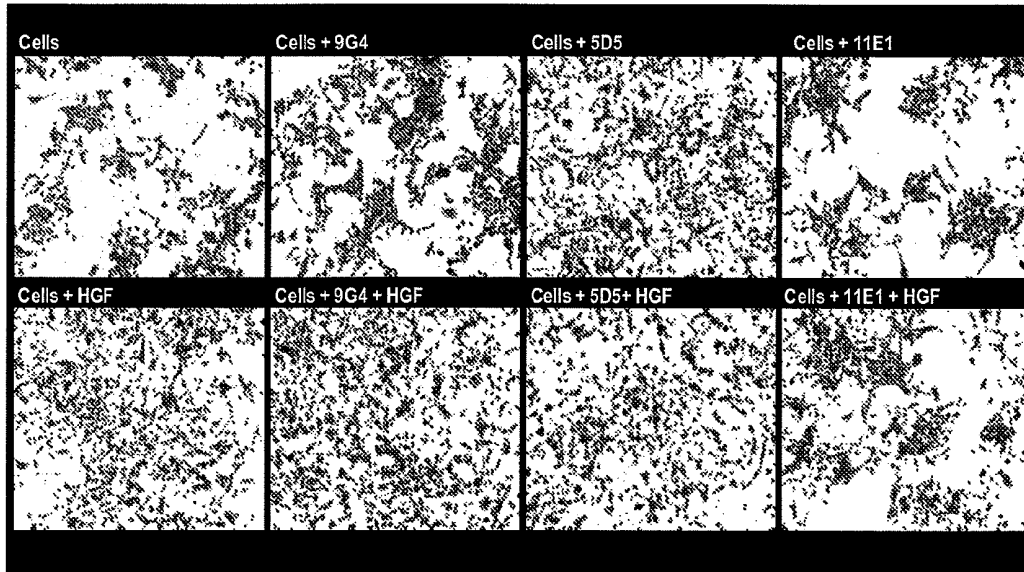
도면8



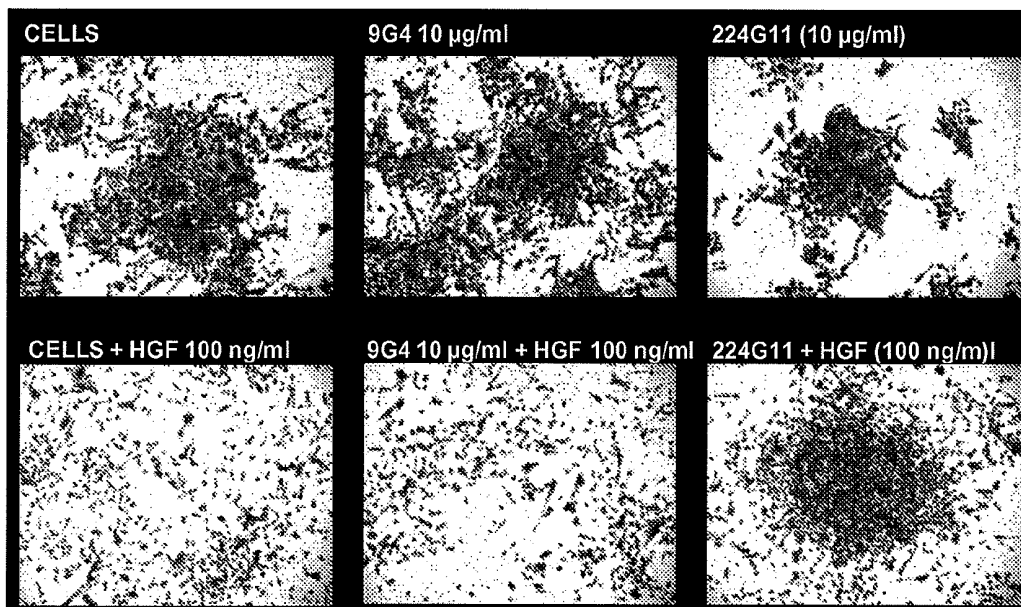
도면9



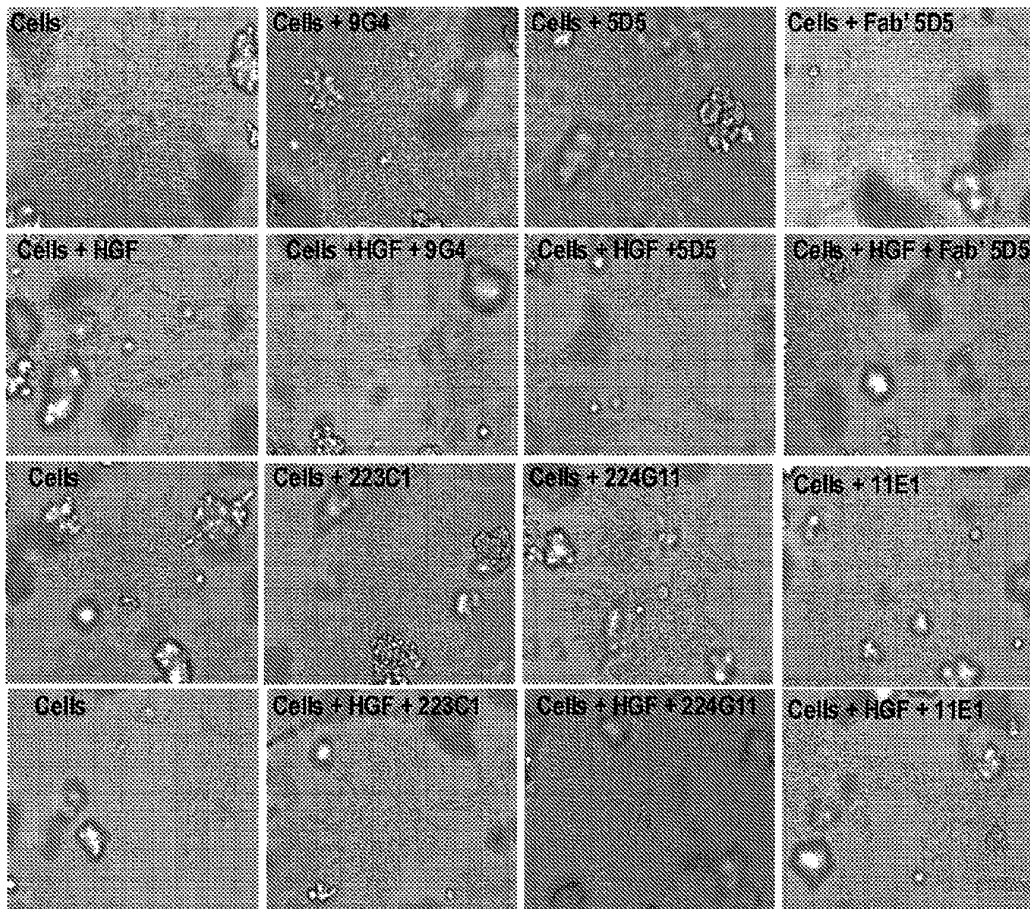
도면10a



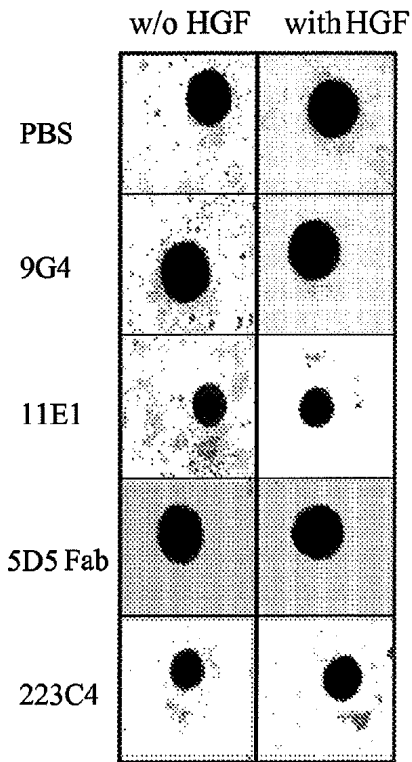
도면10b



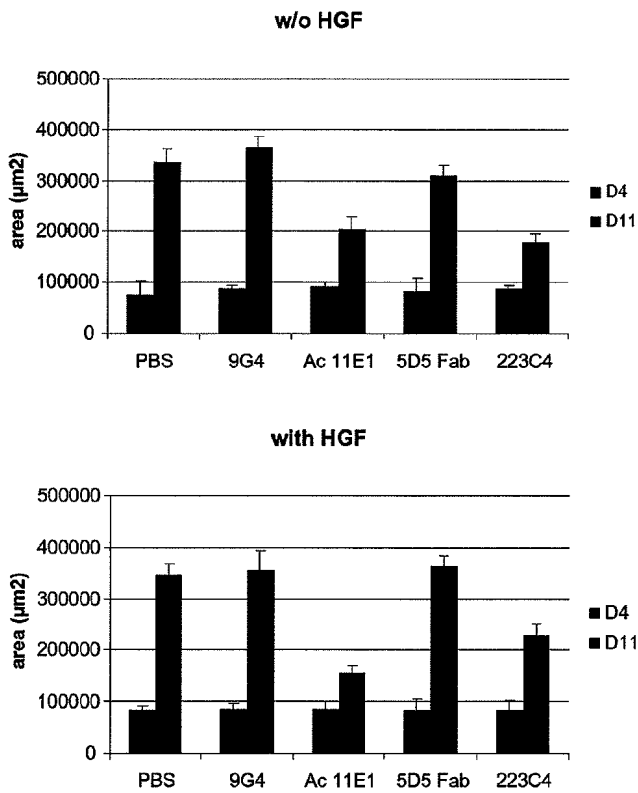
도면11



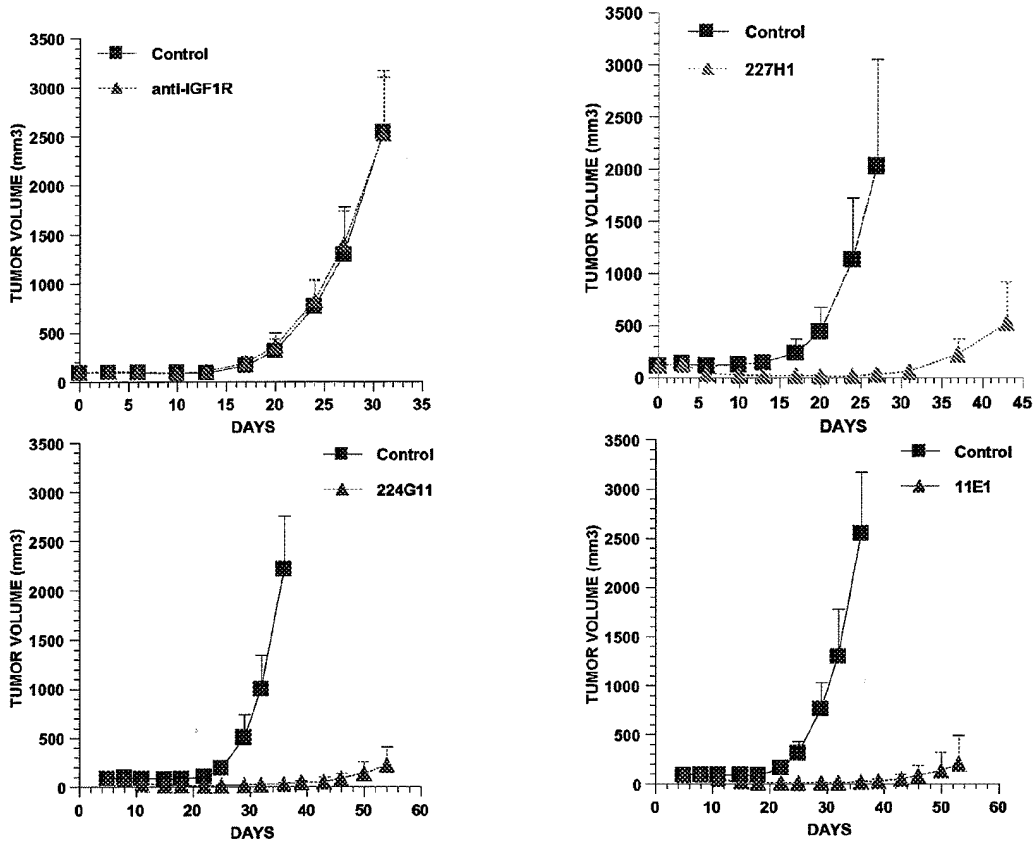
도면12a



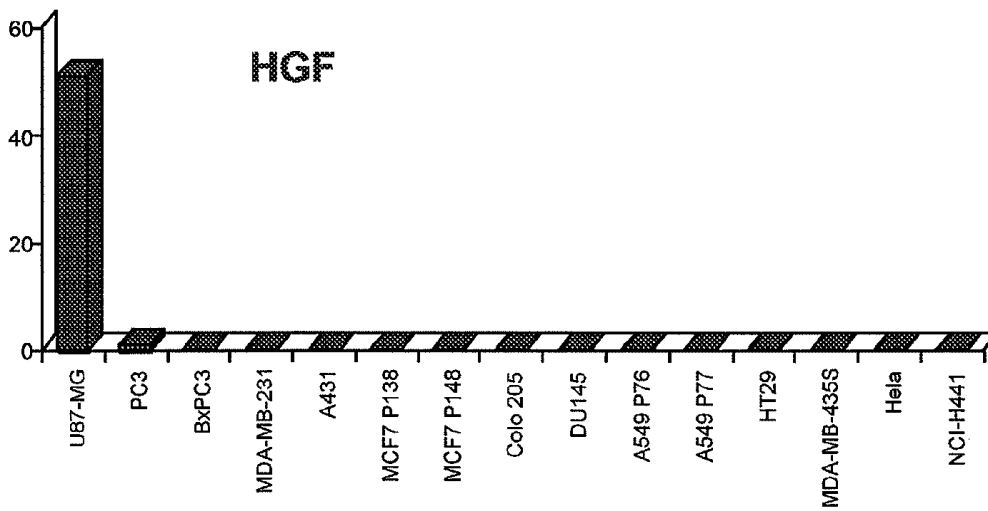
도면12b



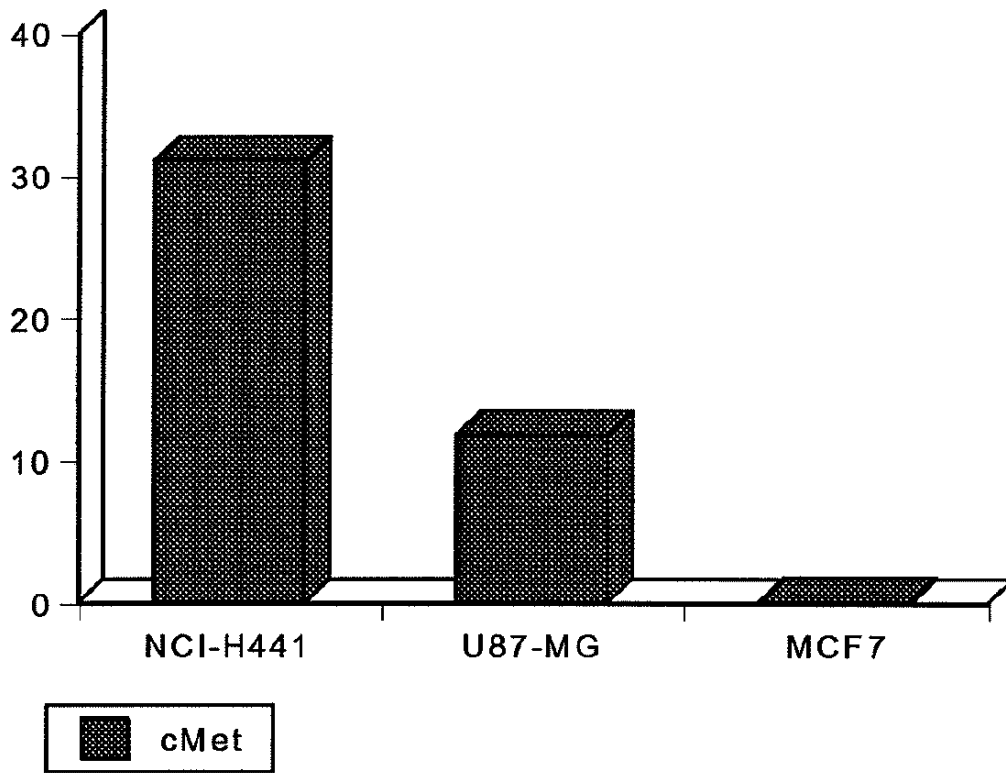
도면13



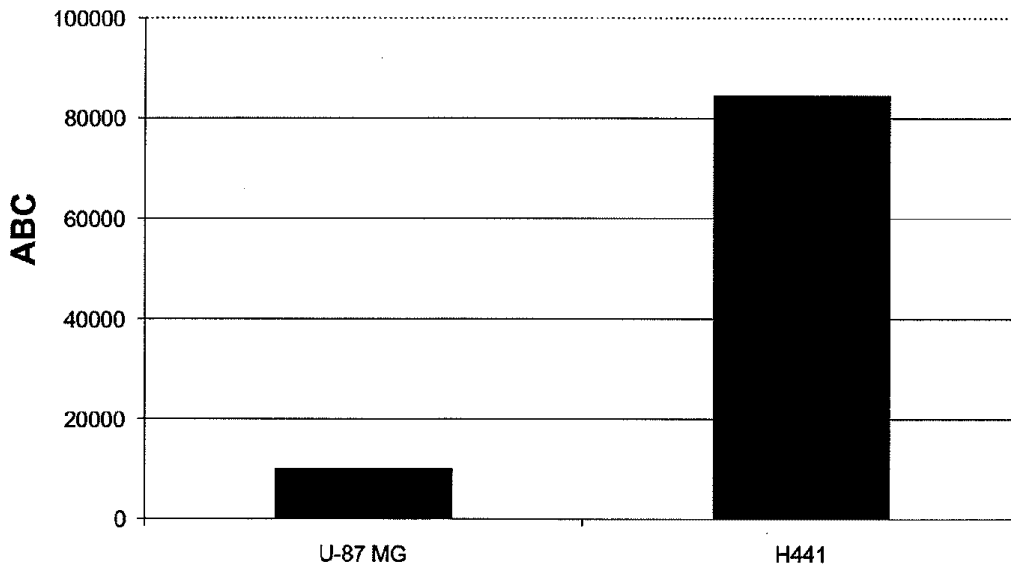
도면14



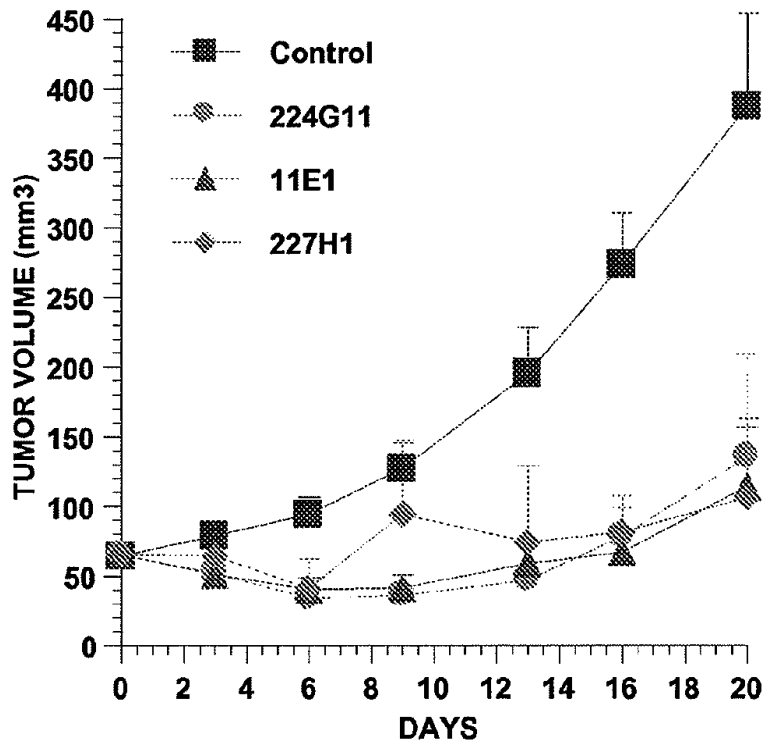
도면15a



도면15b



도면16



도면17a

```

----- FR1 - IMGT
1          5          10          15
D I V L T Q S P A S L A V S L
224G11 VL gac att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta
K02161 IGKV3-5*01 -----

----->
          20          25          30
G Q R A T I S C R A S E S V D
224G11 VL ggg cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gaa agt gtt gat
K02161 IGKV3-5*01 -----

CDR1 - IMGT -----<-----
          35          40          45
S Y A N S F M H W Y Q Q K
224G11 VL agt tat gcc aat agt ttt ... .. atg cac tgg tac cag cag aaa
K02161 IGKV3-5*01 -----
          G
          -g- -----

FR2 - IMGT -----> CDR2
          50          55          60
P G Q P P K L L I Y R A S
224G11 VL cca gga cag cca ccc aaa ctc ctc atc tat cgt gca tcc ... ..
K02161 IGKV3-5*01 -----

- IMGT -----<-----
          65          70          75
          N L E S G I P A R
224G11 VL ... .. aac cta gaa tct ggg atc cct ... gcc agg
K02161 IGKV3-5*01 -----

FR3 - IMGT -----
          80          85          90
F S G S G S R T D F T L T
224G11 VL ttc agt ggc agt ggg ... .. tct agg aca gac ttc acc ctc acc
K02161 IGKV3-5*01 -----

----->
          95          100          105
I N P V E A D D V A T Y Y C Q
224G11 VL att aat cot gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt cag
K02161 IGKV3-5*01 -----

CDR3 - IMGT -----<----- FR4 - IMGT
          110          115          120
Q S K E D P L T F G S G T K L
224G11 VL caa agt aag gag gat cct ctc acg ttc ggc tgc ggg aca aaa ttg
K02161 IGKV3-5*01 -----
          N
          -t --- -c

----->
          123
E M K
224G11 VL gaa atg aaa

```

도면17b

```

CDR3 - IMGT -----<----- FR4 - IMGT
          110          115          120
Q S K E D P L T F G S G T K L
224G11 VL caa agt aag gag gat cct ctc acg ttc ggc tgc ggg aca aaa ttg
V00777 IGKJ4*01 -----g ---

----->
          123
E M K
224G11 VL gaa atg aaa
V00777 IGKJ4*01 -----a --- c

```


도면19a

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)			CDR2-IMGT (56-65)		
	1	10	20	30	40	50	60					
224G11 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS			ESVDSYANSF..			MHWYQQKPGQPPKLLIY RAS.....					
Human FR	E-----T-SL-P-E---L----					LA-----A-R-----				
224G11 HZ1VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS			ESVDSYANSF..			MHWYQQKPGQAPRLLIY RAS.....					
	FR3-IMGT (66-104)			CDR3-IMGT (105-113)			FR4-IMGT (114-123)					
	70	80	90	100	110	120						
224G11 VL	NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEADDVATYYC			QQSKEDPLT			FGSGTKLEMK					
rank	223 1 323 33 2 3						3 3 3					
Human FR	-RAT---.-----G-----SSL-PE-F-V---						-G---V-I-					
224G11 HZ1VL	NRATGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTISLPEDFAVYYC			QQSKEDPLT			FGGGTKVEIK					

도면19b

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)			CDR2-IMGT (56-65)		
	1	10	20	30	40	50	60					
224G11 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS			ESVDSYANSF..			MHWYQQKPGQPPKLLIY RAS.....					
Human FR	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS			LAWYQQKPGQPPKLLIY							
224G11 HZ2VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSS			ESVDSYANSF..			MHWYQQKPGQPPKLLIY RAS.....					
	FR3-IMGT (66-104)			CDR3-IMGT (105-113)			FR4-IMGT (114-123)					
	70	80	90	100	110	120						
224G11 VL	NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEADDVATYYC			QQSKEDPLT			FGSGTKLEMK					
Human FR	TRESGVP.DRFSGSG..SGTDFTLTISLQAEDVAVYYC			FGGGTKVEIK							
224G11 HZ2VL	TRESGVP.DRFSGSG..SRTDFTLTISLQAEDVAVYYC			QQSKEDPLT			FGGGTKVEIK					

도면20a

```

<----- FRI - IMGT
1           5           10           15
E V Q L Q Q S G P E L V K P
gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct ... gag ctg gtg aag cct

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

----->
           20           25           30
G A S V K I S C K T S G Y I F
ggg gct tca gtg aag ata tcc tgc aag acg tct gga tac ata ttc
P A T
c-- g-- -c-

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

CDR1 - IMGT <-----
           35           40           45
T A Y T M H W V R Q S
act gca tac acc ... .. atg cac tgg gtg agg cag agc
D N D K
-a- -a- -a-

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

FR2 - IMGT -----> CDR2
           50           55           60
L G E S L D W I G G I K P N N
ctt gga gag agc ctt gac tgg att gga ggt att aaa cca aac aat
H K E D N
-a- a- -g- -a- -t -t -t

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

- IMGT ----->
           65           70           75
G L A N Y N Q K F K G K
ggt ctt gct ... .. aac tac aac cag aag ttc aag ... ggc aag
G T I
gg- a- -t-

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

----- FR3 - IMGT -----
           80           85           90
A T L T V D K S S S T A Y M D
gcc aca ttg act gta gac aag tcc tcc agc aca gcc tac atg gac
E
--g

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

----->
           95           100           105
L R S L T S E D S A V Y Y C A
ctc cgc agc ctg aca tct gag gat tct gca gtc tat tac tgt gca
T

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

CDR3 - IMGT <-----
           110           115           120
R S E I T T E F D Y W G Q G T
aga tct gag att acg acg gaa ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

FR4 - IMGT ----->
           126
A L T V S S
gct ctc aca gtc tcc tca

224G11 VH

```

도면20b

```

CDR3 - IMGT
105           110           115
A R S E I T T E F D Y
gca aga tct gag att acg acg gaa ttt gac tac
a-- at- --- ---
224G11 VH
J00431 IGHD2-4*01

```

도면20c

```

                CDR3 - IMGT <-----
                110                115                120
R   S   E   I   T   T   E   F   D   Y   W   G   Q   G   T
224G11 VH   aga tct gag att acg acg gaa ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc
V00770 IGHJ2*01   ... .ac t-c -----
                FR4 - IMGT ----->
                126
A   L   T   V   S   S
224G11 VH   gct ctc aca gtc tcc tca
V00770 IGHJ2*01   T
a-- ----- g
    
```

도면21a

```

                FR1 - IMGT
1         5         10         15
E   V   Q   L   Q   Q   S   G   P   E   L   V   K   P
224G11 VH   gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct ... gag ctg gtg aag cct
X62106 IGHV1-2*02   Q         V         A         V   K
c-- --g --- --g --- --g --- --g --- --g --- aa- ---

                FR2 - IMGT ----->
                20         25         30
G   A   S   V   K   I   S   C   K   T   S   G   Y   I   F
224G11 VH   ggg gct tca gtg aag ata tcc tgc aag act tct gga tac ata ttc
X62106 IGHV1-2*02   V         A         T
--- --c --- --g-c --- --g- --- --- --cc ---

                CDR1 - IMGT <-----
                35         40         45
T   A   Y   T   M   H   W   V   R   Q   S
224G11 VH   act gca tac acc ... .. atg cac tgg gtg agg cag agc
X62106 IGHV1-2*02   G         Y         A
--c -gc --- --t --- .. --- --- --c-a --- gc-

                FR2 - IMGT ----->
                50         55         CDR2
                60
L   G   E   S   L   D   W   I   G   G   I   K   P   N   N
224G11 VH   ctt gga gag agc ctt gac tgg att gga ggt att aaa cca aac aat
X62106 IGHV1-2*02   P         Q   G         E         M         W         N         S
-c- --- c-a g-g --- --g --- --g --- t-g --c --c --t --- -g-

                FR3 - IMGT <-----
                65         70         75
G   L   A   N   Y   N   Q   K   F   K   G   K
224G11 VH   ggt ctt gct ... .. aac tac aac cag aag ttc aag ... ggc aag
X62106 IGHV1-2*02   G   T         A         Q         R
--- ggc a-a ... .. --t gca --- --t c- --- --g-

                FR3 - IMGT ----->
                80         85         90
A   T   L   T   V   D   K   S   S   S   T   A   Y   M   D
224G11 VH   gcc aca ttg act gta gac aag tcc tcc agc aca gcc tac atg gac
X62106 IGHV1-2*02   V         M         R         T         I         E
-t- --c a-- --c agg --- -c- --- at- --- --- --g-

                FR4 - IMGT ----->
                95         100         105
L   R   S   L   T   S   E   D   S   A   V   Y   Y   C   A
224G11 VH   ctc cgc agc ctg aca tct gag gat tct gca gtc tat tac tgt gca
X62106 IGHV1-2*02   S   R         R         D         T
--g a-- --g --- --g- --- --c --c a-g --c --g --- --- --g-

                CDR3 - IMGT <-----
                110                115                120
R   S   E   I   T   T   E   F   D   Y   W   G   Q   G   T
224G11 VH   aga tct gag att acg acg gaa ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc
X62106 IGHV1-2*02   --- ga

                FR4 - IMGT ----->
                126
A   L   T   V   S   S
224G11 VH   gct ctc aca gtc tcc tca
    
```

도면21b

```

                CDR3 - IMGT                <----- FR4 - IMGT
                110                115                120
R   S   E   I   T   T   E   F   D   Y   W   G   Q   G   T
224G11 VH   aga tct gag att acg acg gaa ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc
J00256 IGHJ4*01   ... . . . . . .ac t-c --- --- --- --- --- --- --a ---

----->
                126
A   L   T   V   S   S
224G11 VH   gct ctc aca gtc tcc tca
J00256 IGHJ4*01   L   V
                ctg g-- --c --- --- --- --- g
    
```

도면22

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
	1 10 20	30	40 50	60
224G11 VH
rank	3 3 3 33 3 2		33 22 1 2 1	
Human FR	Q---V---A.-VK-----V---A-		-----AP-QG-E-M-W	
224G11 HZVH	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSC	KAS GYIFTAYT....	MHWVRQAPGQGLDWMGG	IKPNNGLA..

	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-115)	FR4-IMGT (116-126)
	70 80 90 100	110	120
224G11 VH
rank	3 3 32 2 1 1 3 2 33 3 3 3		33
Human FR	--A---Q.-RV-M-R-T-I-----E-SR-R-D-T-----		-----LV-----
224G11 HZVH	NYAQQFKQ.GRVTMTVDKSI	STAYMELSRLSDDTAVYYC	ARSEITTEFDY WGQGTALTVSS

도면23a

```

----- FRI - IMGT
1          5          10          15
G I V L T Q S P A S L A V S L
227H1 VL   ggc att gtg ttg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta
K02161 IGV3-5*01 -a-----c-----

----->
          20          25          30
G Q R A T I S C R V S E S I D
227H1 VL   gga cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gtc agt gaa agt att gat
K02161 IGV3-5*01 -g-----c-----g-----

----- CDR1 - IMGT -----<-----
          35          40          45
T Y G N S F          I H W Y Q Q K
227H1 VL   act tat ggc aat agt ttt ... .. ata cac tgg tac cag cag aaa
K02161 IGV3-5*01 -g-----M-----

FR2 - IMGT ----->----- CDR2
          50          55          60
P G Q P P K L L I Y R A S
227H1 VL   cca gga cag cca ccc aaa ctc ctc atc tat cgt gca tcc ... ..
K02161 IGV3-5*01 -----

- IMGT -----<-----
          65          70          75
          N L E S G I P A R
227H1 VL   ... .. aac cta gaa tct ggg atc cct ... gcc agg
K02161 IGV3-5*01 -----

----- FR3 - IMGT -----
          80          85          90
F S G S G          S R T D F T L T
227H1 VL   ttc agt ggc agt ggg ... .. tct agg aca gac ttc acc ctc acc
K02161 IGV3-5*01 -----

----->
          95          100          105
I N P V E A D D S A T Y Y C Q
227H1 VL   att aat cct gtg gag gct gat gat tct gca acc tat tac tgt cag
K02161 IGV3-5*01 -----v-----gt-----

----- CDR3 - IMGT -----<----- FR4 - IMGT
          110          115          120
Q S N E D P F T F G S G T K L
227H1 VL   caa agt aat gag gat cca ttc acg ttc ggc tgc ggg aca aag ttg
K02161 IGV3-5*01 -----t cc

----->
          123
E M K
227H1 VL   gaa atg aaa
K02161 IGV3-5*01 -----I-----a-----c

```

도면23b

```

----- CDR3 - IMGT -----<----- FR4 - IMGT
          110          115          120
Q S N E D P F T F G S G T K L
227H1 VL   caa agt aat gag gat cca ttc acg ttc ggc tgc ggg aca aag ttg
V00777 IGKJ4*01 -----

----->
          123
E M K
227H1 VL   gaa atg aaa
V00777 IGKJ4*01 -----I-----a-----c

```

도면24a

```

----- FR1 - IMGT
1          5          10          15
G I V L T Q S P A S L A V S L
227H1 VL ggc att gtg ttg acc caa tet cca gct tct ttg gct gtg tct cta
E          T          S          L          P
X01668 IGKV3-11*01 -aa ----- -a -g ----- -c a-c c-- t-- t-- -c-
Z00023 IGKV4-1*01 D          M          D
----->
          20          25          30
G Q R A T I S C R V S E S I D
227H1 VL gga cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gtc agt gaa agt att gat
E          L          A          Q          V          S
X01668 IGKV3-11*01 -g g-a --a ----- c-c ----- -g -c----- c-g --- g-- agc
Z00023 IGKV4-1*01 E          N          K          S          Q          V
-----
CDR1 - IMGT <-----
35          40          45
T Y G N S F I H W Y Q Q K
227H1 VL act tat ggc aat agt ttt ... .. ata cac tgg tac cag cag aaa
S          .          .          .          L          A
X01668 IGKV3-11*01 -gc --c ... .. t-- gc----- --a -----
Z00023 IGKV4-1*01 Y S S          N K N Y L A
----->
FR2 - IMGT ----- CDR2
50          55          60
P G Q P P K L L I Y R A S
227H1 VL cca gga cag cca ccc aaa ctc ctc atc tat cgt gca tcc ... ..
X01668 IGKV3-11*01 A          R          D
Z00023 IGKV4-1*01 --t --c --- g-t --- -gg ----- ga----- ... ..
W
-----
- IMGT -----<-----
65          70          75
N L E S G I P A R
227H1 VL ... .. . . . aac cta gaa tct ggg atc cct ... gcc agg
X01668 IGKV3-11*01 ... .. . . . R A T
Z00023 IGKV4-1*01 ... .. . . . T R          V          D
----->
FR3 - IMGT -----
80          85          90
F S G S G S R T D F T L T
227H1 VL ttc agt ggc agt ggg ... .. tct agg aca gac ttc acc ctc acc
X01668 IGKV3-11*01 ... .. . . . g----- -t -----
Z00023 IGKV4-1*01 G
----->
          95          100          105
I N P V E A D D S A T Y Y C Q
227H1 VL att aat cct gtg gag gct gat gat tct gca acc tat tac tgt cag
X01668 IGKV3-11*01 S S L P E F V
Z00023 IGKV4-1*01 --c -gc agc c-a --- c-- --a --- -t-- --- gtt --- ---
S S L Q E V V
-----
CDR3 - IMGT -----<----- FR4 - IMGT
110          115          120
Q S N E D P F T F G S G T K L
227H1 VL caa agt aat gag gat cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg
X01668 IGKV3-11*01 R S N W
Z00023 IGKV4-1*01 --g c-- -gc a-c tgg --t cc
----->
          123
E M K
227H1 VL gaa atg aaa
AF103571 IGXJ4*02 I
--g --c --- c

```

도면24b

```

----- CDR3 - IMGT -----<----- FR4 - IMGT
110          115          120
Q S N E D P F T F G S G T K L
227H1 VL caa agt aat gag gat cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg
AF103571 IGXJ4*02 L          G          V
g c-- --- --- --- gga --- -c --- g--
----->
          123
E M K
227H1 VL gaa atg aaa
AF103571 IGXJ4*02 I
--g --c --- c

```

도면25a

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)
	1	10	20	30	40	50	60
227H1 VL	GIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRVS			ESIDTYGNSF..	IHWYQQKPGQPPKLLIY	RAS.....	
Human FR	E-----T-SL-P-E---L---A-			LA-----A-R----	
227H1 HZ1VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS			ESIDTYGNSF..	IHWYQQKPGQAPRLLIY	RAS.....	
	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-113)	FR4-IMGT (114-123)	
	70	80	90	100	110	120	
227H1 VL	NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEADDSATYYC				QQSNEDPFT	FGSGTKLEMK	
Human FR	-RAT---.-----.-G-----SSL-PE-F-V---					--G---V-I-	
227H1 HZ1VL	NRATGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTISLLEPEDFAVYYC				QQSNEDPFT	FGGGTKVEIK	

도면25b

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)
	1	10	20	30	40	50	60
227H1 VL	GIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRVS			ESIDTYGNSF..	IHWYQQKPGQPPKLLIY	RAS.....	
Human FR	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS				LAWYQQKPGQPPKLLIY	
227H1 HZ2VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSS			ESIDTYGNSF..	IHWYQQKPGQPPKLLIY	RAS.....	
	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-113)	FR4-IMGT (114-123)	
	70	80	90	100	110	120	
227H1 VL	NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEADDSATYYC				QQSNEDPFT	FGSGTKLEMK	
Human FR	TRESGVP.DRFSGSG..SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC					FGGGTKVEIK	
227H1 HZ2VL	TRESGVP.DRFSGSG..SRTDFTLTISLLEPEDFAVYYC				QQSNEDPFT	FGGGTKVEIK	

도면26c

```

          CDR3 - IMGT <-----
          110          115          120
R E E I T K D F D F W G Q G T
227H1 VH   aga gag gaa att acg aag gac ttt gat ttc tgg ggc caa ggc acc
V00770 IGHJ2*01   ... .. . . . -c t- - -c -a- - - - -

          FR4 - IMGT ----->
          126
T L T V S S
227H1 VH   act ctc aca gtc tcc tca
V00770 IGHJ2*01   - - - - - g
    
```

도면27a

```

          FR1 - IMGT
          1          5          10          15
E V Q L Q Q S G P E L V K P
227H1 VH   gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct ... gaa ctg gtg aag cct
X62106 IGHV1-2*02   Q V A V K
c- --g --- -- gtg --- -- --g g-- ... --g g-- aa- --- --

          ----->
          20          25          30
G A S M K I S C K A S G Y S F
227H1 VH   gga gct tca atg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tat tca ttc
X62106 IGHV1-2*02   V V T
--g --c --- g-- --- g-c --- --- --- --a --c a-c ---

          CDR1 - IMGT <-----
          35          40          45
T D Y T L N W V K Q S
227H1 VH   act gac tac acc ... . . . . . ctg aac tgg gtg aag cag agc
X62106 IGHV1-2*02   G Y M H R A
--c -g- --- tat ... . . . . . a-- c- --- -- cga --- gc-

          FR2 - IMGT ----->          CDR2
          50          55          60
H G K T L E W I G L I N P Y N
227H1 VH   cat gga aag acc ctt gag tgg att gga ctt att aat cct tac aat
X62106 IGHV1-2*02   P Q G M W N
-c- --- c-a ggg --- --- --g --- tgg --c --c --- a-- -g-

          - IMGT <-----
          65          70          75
G G T T Y N Q K F K G K
227H1 VH   ggt ggt act ... . . . . . acc tac aac cag aag ttc aag ... ggc aag
X62106 IGHV1-2*02   N A Q
--- --c --a ... . . . -a- --t gca --- --- --t c-- ... --- -g-

          FR3 - IMGT -----
          80          85          90
A T L T V D K S S S T A Y M E
227H1 VH   gcc aca tta act gta gac aag tca tcc agc aca gcc tac atg gag
X62106 IGHV1-2*02   V M R T I
-t- --c a-g --c agg --- -c- --c at- --- --- --- ---

          ----->
          95          100          105
L L S L T S E D S A V Y Y C A
227H1 VH   ctc ctc agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt gca
X62106 IGHV1-2*02   S R R D T
--g ag- --g --- -g- --- -c --- a-g --c --g --- --- --g

          CDR3 - IMGT <-----
          110          115          120
R E E I T K D F D F W G Q G T
227H1 VH   aga gag gaa att acg aag gac ttt gat ttc tgg ggc caa ggc acc
X62106 IGHV1-2*02   --- --

          FR4 - IMGT ----->
          126
T L T V S S
227H1 VH   act ctc aca gtc tcc tca
    
```


도면27b

```

                CDR3 - IMGT <-----
                110                115                120
R   E   E   I   T   K   D   F   D   F   W   G   Q   G   T
227H1 VH   aga gag gaa att acg aag gac ttt gat ttc tgg ggc caa ggc acc
J00256 IGHJ4*01   ... ..-c t-- --- --c -a- --- --- --a ---

                FR4 - IMGT ----->
                126
T   L   T   V   S   S
227H1 VH   act ctc aca gtc tcc tca
J00256 IGHJ4*01   L   V
                ctg g-- --c --- --- --- g
    
```

도면28

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)	
	1 10 20	30	40 50	60	
227H1 VH	
rank	EVQLQDSGP	ELVKPGASMKISCKAS	GYSFTDYT....	LNWVKQSHGKTLIEWIGL	INPYNGGT..
Human FR	3 3 3 33 3 3			11 3 33 22 2 1	
227H1 HZVH	Q---V---A.-VK-----V-V-----			MH--R-AP-QG---M-W	
	QVQLVQSGA	EVKPKGASVKVSCAS	GYSFTDYT....	LNWVRQAPGQGLEWMGL	INPYNGGT..

	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-115)	FR4-IMGT (116-126)	
	70 80 90 100	110	120	
227H1 VH	
rank	TYNQKFK	GKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYC	AREEITKDFDF	WGQGTTLTVSS
Human FR	1 3 3 32 2 1 1 3 33 3 3 3			33
227H1 HZVH	N-A---Q.-RV-M-R-T-I-----SR-R-D-T-----			-----LV-----
	TYAQKFQ	GRVTMTVDKSSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYC	AREEITKDFDF	WGQGTTLTVSS

도면29a

```

<----- FR1 - IMGT
1           5           10           15
D I Q M T Q S P A S L S V S V
VL 223C4   gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gta tct gtg
AJ235956 IGKV12-46*01
----->
           20           25           30
G E T V T I T C R A S E N I Y
VL 223C4   gga gaa act gtc acc atc aca tgt cga gca agt gag aat att tac
AJ235956 IGKV12-46*01
----->
CDR1 - IMGT <-----
           35           40           45
S N           L A W Y Q Q K
VL 223C4   agt aat ... .. tta gca tgg tat cag cag aaa
AJ235956 IGKV12-46*01
----->
FR2 - IMGT <-----> CDR2
           50           55           60
Q G K S P Q L L V Y A A T
VL 223C4   cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc tat gct gca aca ... ..
AJ235956 IGKV12-46*01
----->
- IMGT <----->
           65           70           75
           N L V D G V P S R
VL 223C4   ... .. aac tta gta gat ggt gtg cca ... tca agg
AJ235956 IGKV12-46*01
           A
           -C-
----->
FR3 - IMGT <----->
           80           85           90
F S G S G S G T Q Y S L K
VL 223C4   ttc agt ggc agt gga ... .. tca ggc aca cag tat tcc ctc aag
AJ235956 IGKV12-46*01
----->
           95           100           105
I N S L Q S E D F G S Y Y C Q
VL 223C4   atc aac agc ctg cag tct gaa gat ttt ggg agt tat tac tgt caa
AJ235956 IGKV12-46*01
----->
CDR3 - IMGT <-----> FR4 - IMGT
           110           115           120           123
H F W G P P Y T F G G G T K L
VL 223C4   cat ttt tgg ggt cct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg
AJ235956 IGKV12-46*01
           T
           --t cc
           ---a ---a

```

도면29b

```

CDR3 - IMGT <-----> FR4 - IMGT <----->
           110           115           120           123
G P P Y T F G G G T K L E I K
VL 223C4   ggt cct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gag ata aag
V00777 IGKJ2*01
           ---a ---a

```


도면31

```

<----- FR1 - IMGT
1          5          10          15
Hz VL 223C4  D I Q M T Q S P S S L S A S V
----->
          20          25          30
Hz VL 223C4  G D R V T I T C R A S E N I Y
----->
CDR1 - IMGT
          35          40          45
Hz VL 223C4  S N L A W Y Q Q K
----->
FR2 - IMGT          CDR2
          50          55          60
Hz VL 223C4  P G K A P K L L L Y A A T
Back-mutation Q S Q
                3 2 2
----->
- IMGT          65          70          75
Hz VL 223C4  R L E S G V P S R
Back-mutation N V D
                1 1 2
----->
          80          85          90
Hz VL 223C4  F S G S G S G T D Y T L T
Back-mutation Q
                2
----->
          95          100          105
Hz VL 223C4  I S S L Q P E D F A T Y Y C Q
Back-mutation N S
                2 3
----->
CDR3 - IMGT          FR4 - IMGT
          110          115          120
Hz VL 223C4  H F W G P P Y T F G Q G T K L
----->
          123
Hz VL 223C4  E I K

```

도면32a

```

<----- FR1 - IMGT -----
1           5           10           15
E V L L Q Q S G P ... E L V K P
gag gtc ctg ctg caa cag tct gga cct ... gag ctg gtg aag cct
Q
AC090843 IGHV1-18*01  --- -a- --- --- --- --- --- --- --- ---

----->
           20           25           30
G A S V K I P C K A S G Y T F
ggg gct tca gtg aag ata ccc tgc aag gct tct gga tac aca ttc
AC090843 IGHV1-18*01  --- --- --- --- --- --- --- --- ---

--- CDR1 - IMGT -----<-----
           35           40           45
T D Y N ... .. M D W V K Q S
act gac tac aac ... .. atg gac tgg gtg aag cag agc
AC090843 IGHV1-18*01  --- --- --- --- --- --- --- --- ---

FR2 - IMGT -----> ----- CDR2
           50           55           60
H G M S L E W I G D I N P N N
cat gga atg agc ctt gag tgg att gga gat att aat cct aac aat
K
AC090843 IGHV1-18*01  --- -a- --- --- --- --- --- --- ---

- IMGT -----<-----
           65           70           75
G G T ... .. I F N Q K F K G K
ggt ggt act ... .. atc ttc aac cag aag ttc aag ... ggc aag
Y
AC090843 IGHV1-18*01  --- ... -a- --- --- --- --- --- ---

----- FR3 - IMGT -----
           80           85           90
A T L T V D K S S S T A Y M E
gcc aca ttg act gta gac aag tcc tcc agc aca gcc tac atg gag
AC090843 IGHV1-18*01  --- --- --- --- --- --- --- --- ---

----->
           95           100           105
L R S L T S E D T A V Y Y C A
ctc cgc agc ctg aca tct gag gac act gca gtc tat tac tgt gca
AC090843 IGHV1-18*01  --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```

도면32b

```

----- CDR3 - IMGT -----
           110           115
R G R Y V G Y Y Y A M D Y
aga ggg agg tat gtt ggt tac tac tat gct atg gac tac
D
D13199 IGHV1-18*01  ... .tc --- -a- --- --- ---

```

도면32c

```

----- CDR3 - IMGT -----<----- FR4 - IMGT ----->
           115           120           125           129
G Y Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S
ggt tac tac tat gct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tea
V00770 IGHJ4*01  -t --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```


도면33c

```

          CDR3 - IMGT          <----- FR4 - IMGT
          110          115          120          125
VH 223C4   R   Y   V   G   Y   Y   Y   A   M   D   Y   W   G   Q   G   T   S   V
          agg tat gtt ggt tac tac tat gct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc
          Y   Y          G   V          T
J00256 IGHJ6*01   -- tac tac --- --- -c -g- --- --- gt- --- -g --- -g --- a-g ---

          <----->
          129
VH 223C4   T   V   S   S
          acc gtc tcc tca
J00256 IGHJ6*01   --- --- --- ---
    
```

도면34

```

          <----- FR1 - IMGT
          1          5          10          15
Hz VH 223C4   Q   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   P
Back-mutation E   L   Q          P   V
          2   2   2          3   3

          <----->
          20          25          30
Hz VH 223C4   G   A   S   V   K   V   S   C   K   A   S   G   Y   T   F
Back-mutation P
          3

          CDR1 - IMGT          <-----
          35          40          45
Hz VH 223C4   T   D   Y   N          M   H   W   V   R   Q   A
Back-mutation D   S
          1   1

          FR2 - IMGT          <----->          CDR2
          50          55          60
Hz VH 223C4   P   G   Q   G   L   E   W   M   G   W   I   N   P   N   N
Back-mutation H   M          D
          3   2          1

          - IMGT          <----->
          65          70          75
Hz VH 223C4   G   G   T          N   Y   A   Q   K   F   Q   G   R
Back-mutation I   P
          1   1

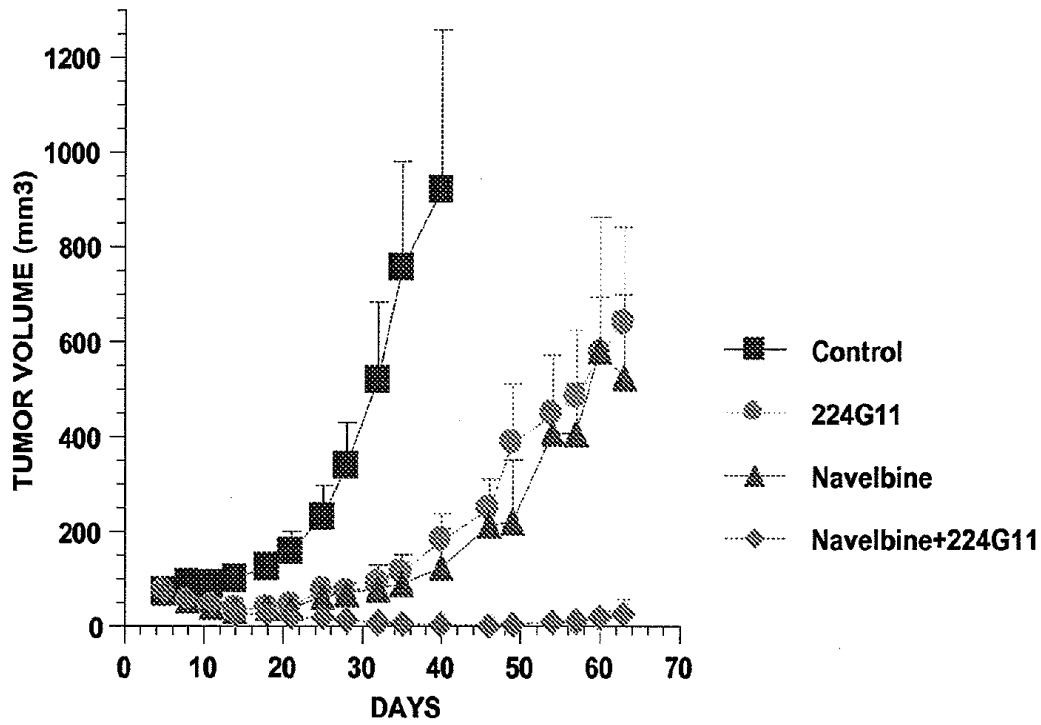
          <----- FR3 - IMGT          <----->
          80          85          90
Hz VH 223C4   V   T   M   T   R   D   T   S   I   S   T   A   Y   M   E
Back-mutation V
          2

          <----->
          95          100          105
Hz VH 223C4   L   S   R   L   R   S   D   D   T   A   V   Y   Y   C   A

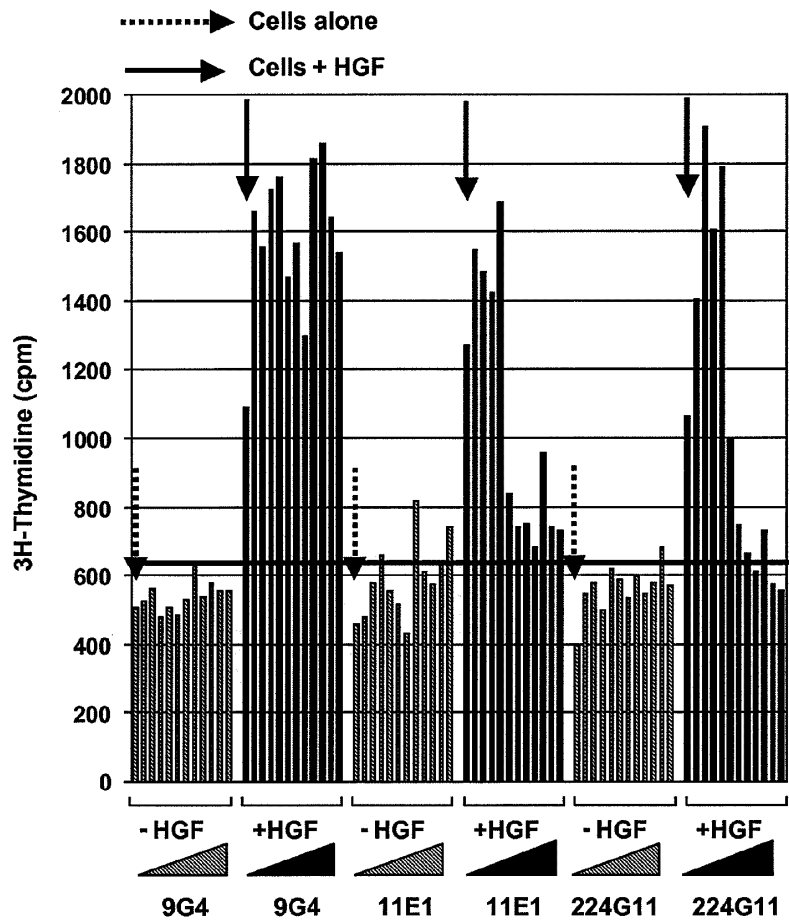
          CDR3 - IMGT          <----->
          110          115          120
Hz VH 223C4   R   G   R   Y   V   G   Y   Y   Y   A   M   D   Y   W   G

          <----- FR4 - IMGT          <----->
          125          129
Hz VH 223C4   Q   G   T   T   V   T   V   S   S
    
```

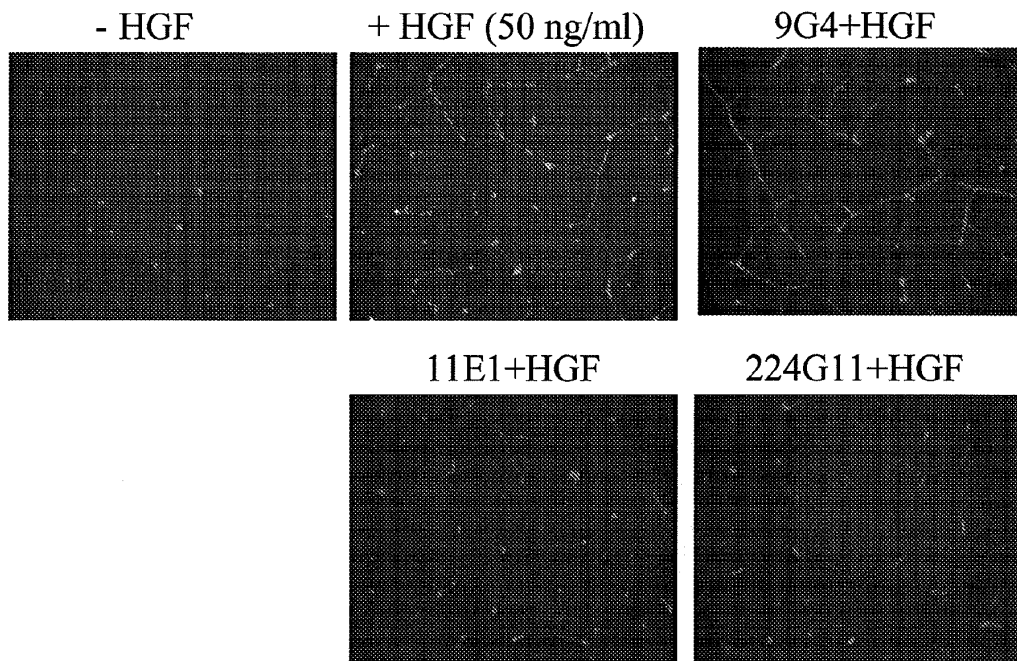
도면35



도면36



도면37



도면38a

```

----- FR1 - IMGT -----
11E1 VL          1   5   10   15
Q I V L T Q S P A I M S A S P
caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct cct
AJ231214 IGKV4-79*01 -----

-----> -----
11E1 VL          20   25   30
G E K V T L T C S A S S S V S
ggg gag aag gtc acc ttg acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt
AJ231214 IGKV4-79*01 -----

--- CDR1 - IMGT -----<-----
11E1 VL          35   40   45
S T Y S L Y W Y Q Q K
tcc acc tac ... .. ttg tac tgg tac cag cag aag
S
-g- ... ..
AJ231214 IGKV4-79*01 -----

FR2 - IMGT -----> ----- CDR2 -----
11E1 VL          50   55   60
P G S S P K L W I Y T T S
cca gga tcc tcc ccc aaa ctc tgg att tat acc aca tcc ... ..
S
-g- ... ..
AJ231214 IGKV4-79*01 -----

- IMGT -----<-----
11E1 VL          65   70   75
I L A S G V P A R
... .. atc ctg gct tct gga gtc oct ... get cgc
N
-a- ... ..
AJ231214 IGKV4-79*01 -----

----- FR3 - IMGT -----
11E1 VL          80   85   90
F S G S G S G T S Y S L T
ttc agt ggc agt ggg ... .. tct ggg acc tct tac tct ctc aca
AJ231214 IGKV4-79*01 -----

-----> -----
11E1 VL          95   100  105
I S S M E T B D A A S Y F C H
atc agc agc atg gag act gaa gat gct gcc tct tat ttc tgc cat
A
-g- ... ..
AJ231214 IGKV4-79*01 -----

----- CDR3 - IMGT -----<----- FR4 - IMGT -----
11E1 VL          110  115  120
Q W S S Y P F T F G S G T K L
cag tgg agt agt tac cca ttc acg ttc ggc tgg ggg aca aag ttg
P
cc- c
AJ231214 IGKV4-79*01 -----

-----> -----
11E1 VL          123
D I K
gac ata aaa
E
--a --- --- c

```

도면38b

```

----- CDR3 - IMGT -----<----- FR4 - IMGT -----
11E1 VL          110  115  120
Q W S S Y P F T F G S G T K L
cag tgg agt agt tac cca ttc acg ttc ggc tgg ggg aca aag ttg
AJ231214 IGKV4-79*01 -----

-----> -----
11E1 VL          123
D I K
gac ata aaa
E
--a --- --- c
V00777 IGKJ4*01

```

도면39a

```

----- FR1 - IMGT -----
1         5         10         15
Q I V L T Q S P A I M S A S P
caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct cct
E         M         T L L
g- - - -a a-g -a - - - -c -c- c- - - - ttg - - -a

----->
20         25         30
G E K V T L T C S A S S S V S
ggg gag aag gtc acc ttg acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt
R A S R Q
- - -a -ga -c- - - -c t- - - -g - - -t cag - - -t -c-

--- CDR1 - IMGT --- <----->
35         40         45
S T Y L Y W Y Q Q K
tcc acc tac ... .. . . . ttg tac tgg tac cag cag aag
S S
ag- -g- - - - - - - -a -c- - - - - -a

FR2 - IMGT -----> CDR2 -----
50         55         60
P G S S P K L W I Y T T S
cca gga tcc tcc ccc aaa ctc tgg att tat acc aca tcc ... ..
Q A R L G A
- -t -g cag g-t - - -gg - - -ctc - -c - - -ggt g- - - - - -

- IMGT ----->
65         70         75
... .. . . . I L A S G V P A R
... .. . . . atc ctg gct tct gga gtc cct ... gct cgc
T R T I
... .. . . . -c- ag- -c a- -c a- -a ... -c a-g

----- FR3 - IMGT -----
80         85         90
F S G S G S G T S Y S L T
ttc agt ggc agt ggg ... . . . tct ggg acc tct tac tct ctc aca
D F T
- - - - - - - - - - - - - - -a gac -t- a- - - -c

----->
95         100         105
I S S M E T E D A A S Y F C H
atc agc agc atg gag act gaa gat gct gcc tct tat ttc tgc cat
L Q P F V Y Q
- - - - -c- c- -c- - - - - - - - - -a - - -g

--- CDR3 - IMGT --- <----- FR4 - IMGT ----->
110         115         120
Q W S S Y P F T F G S G T K L
cag tgg agt agt tac cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg
D Y N L
- - - gat ta- -ac -ta - -t cc

----->
123
D I K
gac ata aaa
    
```

도면39b

```

CDR3 - IMGT --- <----- FR4 - IMGT ----->
110         115         120         123
Y P F T F G S G T K L D I K
tac cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gac ata aaa
G V E
.....g c- - - - - - - - - - - - - - -g- -g- -c- - -
    
```


도면40

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)			CDR2-IMGT (56-65)		
	1	10	20	30	40	50	60					
11E1 VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSAS			SSVSSTY....			LYWYQQKPGSSPKLWIY			TTS.....		
rank	3	1	33 3	33 3 2		1	33 3 2					
Human FR	E--M-----TL-L----RA--S-R--						-S-----QA-R-L--					
11E1 HZVL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS			SSVSSTY....			LYWYQQKPGQAPRLLIY			TTS.....		
	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-113)			FR4-IMGT (114-123)				
	70	80	90	100	110	120						
11E1 VL	ILASGVP.ARFSGSG..SGTSYSLTISMETEDAASYFC				HQWSSYPFT			FGSGTKLDIK				
rank	22	3 3	213	321 2 3 3		3 32						
Human FR	TR-T-I-.-----DFT-----LQP--F-V-Y-							--G---VE---				
11E1 HZVL	TRATGIP.ARFSGSG..SGTDYTLTISLQTEDFAVYYC				HQWSSYPFT			FGGGTKVEIK				

도면41a

11E1 VH	<pre> <-----FR1 - IMGT 1 5 10 15 Q V Q L Q Q S G A E L A K P cag gtc cag ctt cag cag tct ggg gct ... gaa ctg gca aaa cct -----g----- -----> 20 25 30 G A S V K M S C K A S G Y T F ggg gcc tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac act ttt L c-----c----- </pre>											
AC090843 IGHV1-7*01												
11E1 VH	<pre> -----CDR1 - IMGT-----<----- T S Y W M N W V K Q R act tcc tac tgg atg aac tgg gtg aaa cag agg H c-----a----- </pre>											
AC090843 IGHV1-7*01												
11E1 VH	<pre> -----FR2 - IMGT----->-----CDR2 50 55 60 P G Q G L E W I G Y I N P T T cct gga cag ggt ctg gaa tgg att gga tac att aac cct acc act S S S -g- -g- </pre>											
AC090843 IGHV1-7*01												
11E1 VH	<pre> -----IMGT-----<----- 65 70 75 G S T D Y N Q K L K D K ggt tct act gac tac aat cag aag tta aag ... gac aag Y K F -a- a-g-----c----- </pre>											
AC090843 IGHV1-7*01												
11E1 VH	<pre> -----FR3 - IMGT----- 80 85 90 A T L T A D K S S N T A Y M Q gcc aca ttg act gca gac aaa tcc tcc aac aca gcc tac atg caa S -g- </pre>											
AC090843 IGHV1-7*01												
11E1 VH	<pre> ----->----- 95 100 105 L S S L T S E D S A V Y Y C A ctg agc agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt gca Y -a----- </pre>											
AC090843 IGHV1-7*01												
11E1 VH	<pre> -----CDR3 - IMGT-----<----- 110 115 120 I G G Y G S W F A Y W G Q G T ata gga gga tat ggg tcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act R -g- </pre>											
AC090843 IGHV1-7*01												
11E1 VH	<pre> -----FR4 - IMGT-----> 126 L V T V S A ctg gtc act gtc tct gca </pre>											

도면41b

```

                                CDR3 -  IMGT
                                110
105 _____ 115
A   I   G   G   Y   G   S   W   F   A   Y
gca ata gga gga tat ggg tcc tgg ttt gct tac
      -g  --- c
    
```

11E1 VH
L32868 IGHD4-1*01

도면41c

```

                                CDR3 -  IMGT
                                110          115          120
I   G   G   Y   G   S   W   F   A   Y   W   G   Q   G   T
ata gga gga tat ggg tcc tgg ttt gct tac tgg ggc oaa ggg act
.. ... ..
FR4 - IMGT ----->
                                126
L   V   T   V   S   A
ctg gtc act gtc tct gca
----- g
    
```

11E1 VH
V00770 IGHJ3*01

11E1 VH
V00770 IGHJ3*01

도면42a

```

<----- FR1 - IMGT
1 5 10 15
Q V Q L Q Q S G A E L A K P
cag gtc cag ctt cag cag tct ggg gct ... gaa ctg gca aaa cct
V V K
--- -g --- -g gt- --- --- --- ... -g g- aag -g ---
V V K

----->
20 25 30
G A S V K M S C K A S G Y T F
ggg gcc tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac act ttt
V V
--- --- --- -g-c --- --- --- -a --- -c ---
V

--- CDR1 - IMGT <-----
35 40 45
T S Y W M N W V K Q R
act tcc tac tgg ... .. atg aac tgg gtg aaa cag agg
G Y H R A
-c gg- -at ... .. -c- - -cg- - -gcc
Y ... .. H R A

FR2 - IMGT -----> CDR2
50 55 60
P G Q G L E W I G Y I N P T T
cct gga cag ggt ctg gaa tgg att gga tac att aac cct acc act
M W N S
--- -a -g -t -g -g -g -c -a -g-
M I S G

- IMGT <-----
65 70 75
G S T D Y N Q K L K D K
ggt tct act ... .. gac tac aat cag aag tta aag ... gac aag
G N A F Q G R
--- ggc -a ... .. a- -t gca -t c- - -g- -g-
... .. S A F Q ... G R

----- FR3 - IMGT -----
80 85 90
A T L T A D K S S N T A Y M Q
gcc aca ttg act gca gac aaa tcc tcc aac aca gcc tac atg caa
V M R T I S E
-t- -c a- -c agg - -cg - -at- -g- - - -g- -g-
V M R T S V E

----->
95 100 105
L S S L T S E D S A V Y Y C A
ctg agc agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt gca
R R D T
--- --- -g --- -g- --- -c --- a-g -c -g --- --- -g
R T

--- CDR3 - IMGT <----- FR4 - IMGT
110 115 120 126
I G G Y G S W F A Y W G Q G T L V T V S A
ata gga gga tat ggg tcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act
R
-g- -a

----->
126
L V T V S A
ctg gtc act gtc tct gca

```

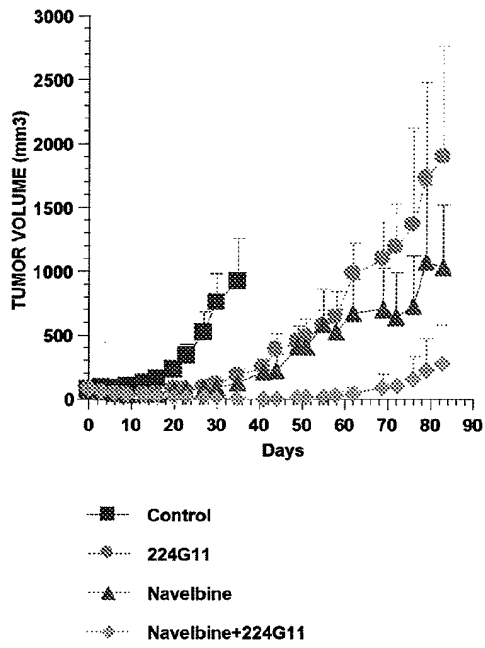
도면42b

```

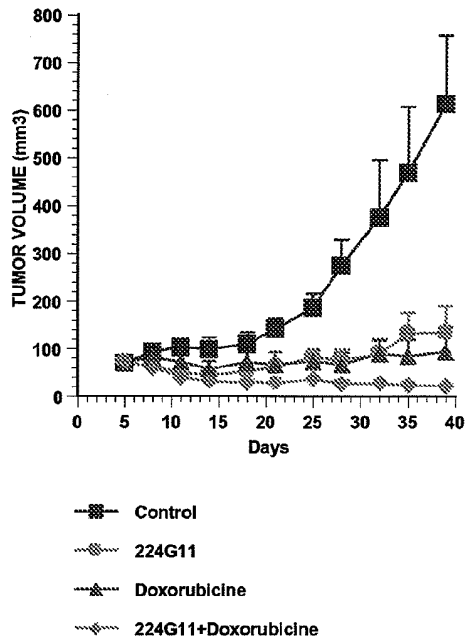
CDR3 - IMGT <----- FR4 - IMGT ----->
110 115 120 126
G S W F A Y W G Q G T L V T V S A
ggg tcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca
S
... .g- -ac --- -ac --- --- --- -c --- --- -c --- -c t-- g

```

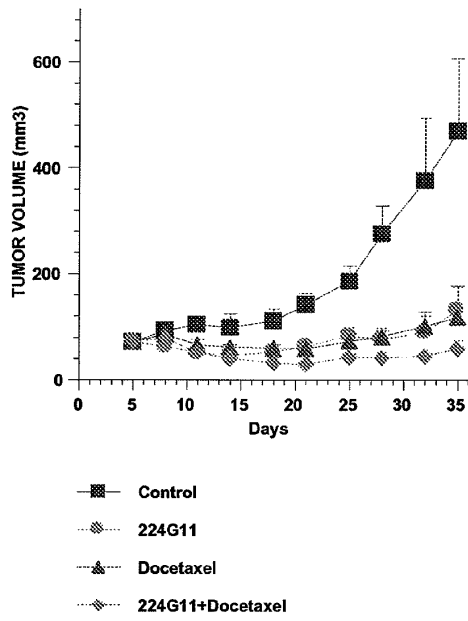

도면45



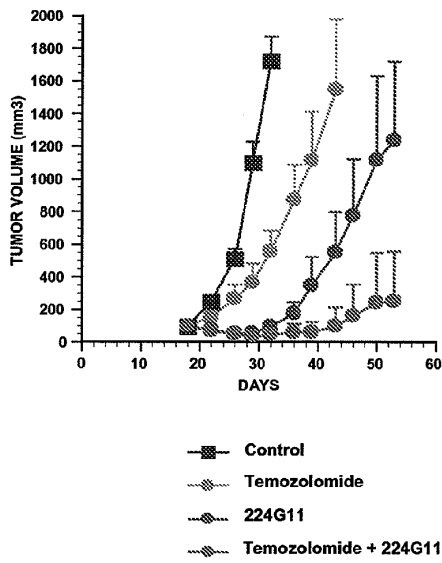
도면46



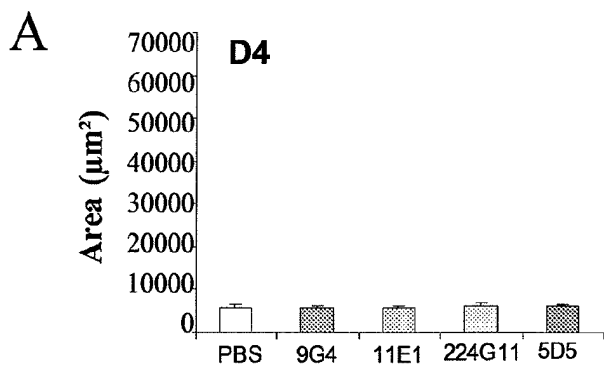
도면47



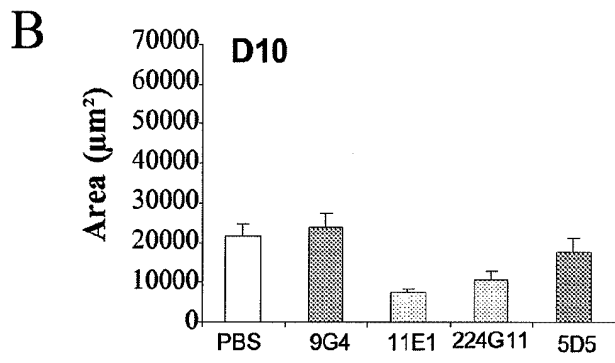
도면48



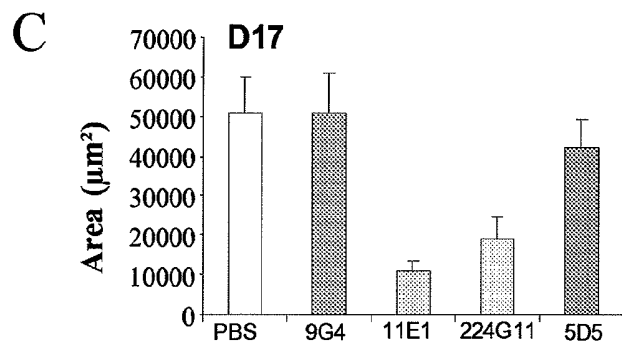
도면49a



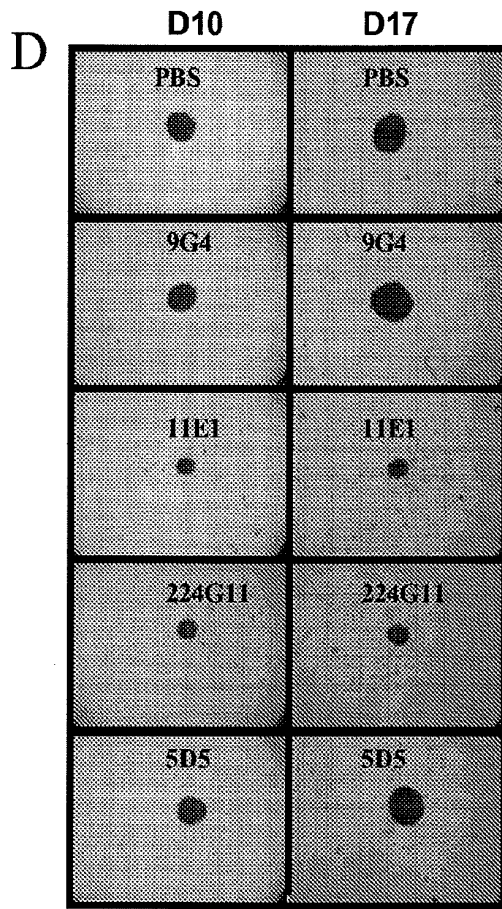
도면49b



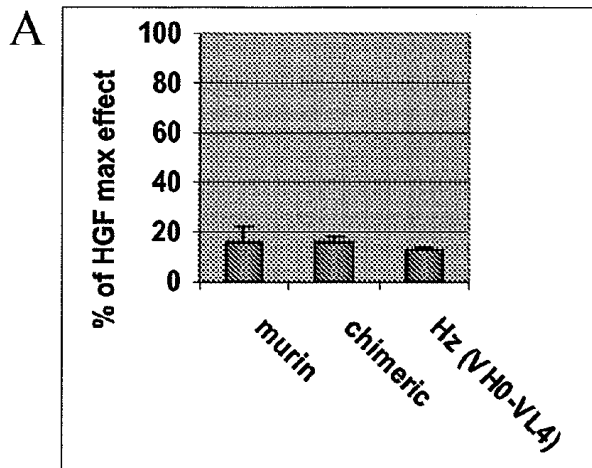
도면49c



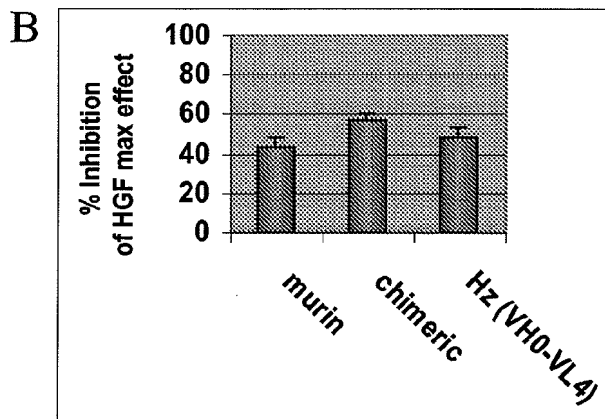
도면49d



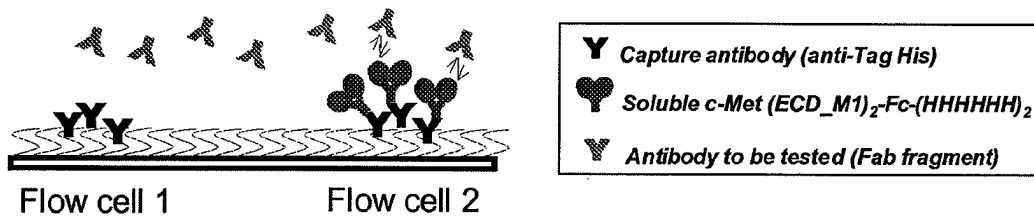
도면50a



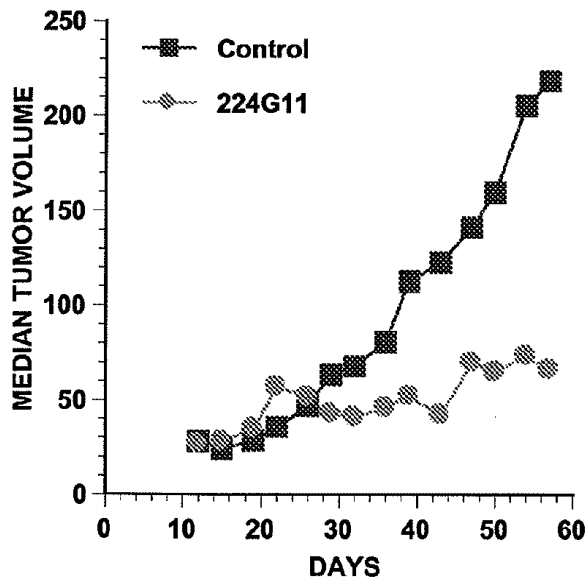
도면50b



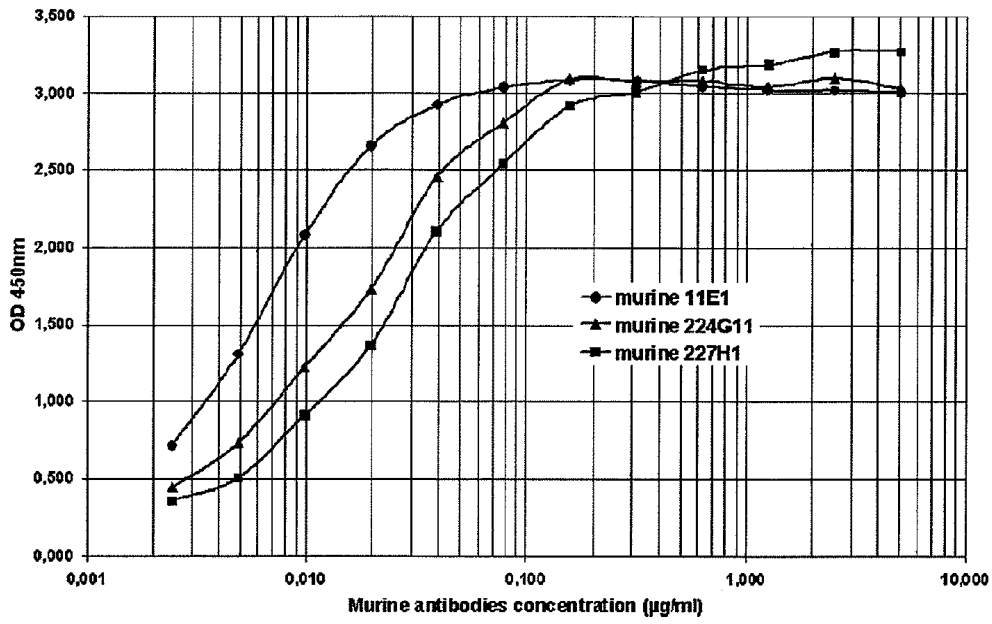
도면51



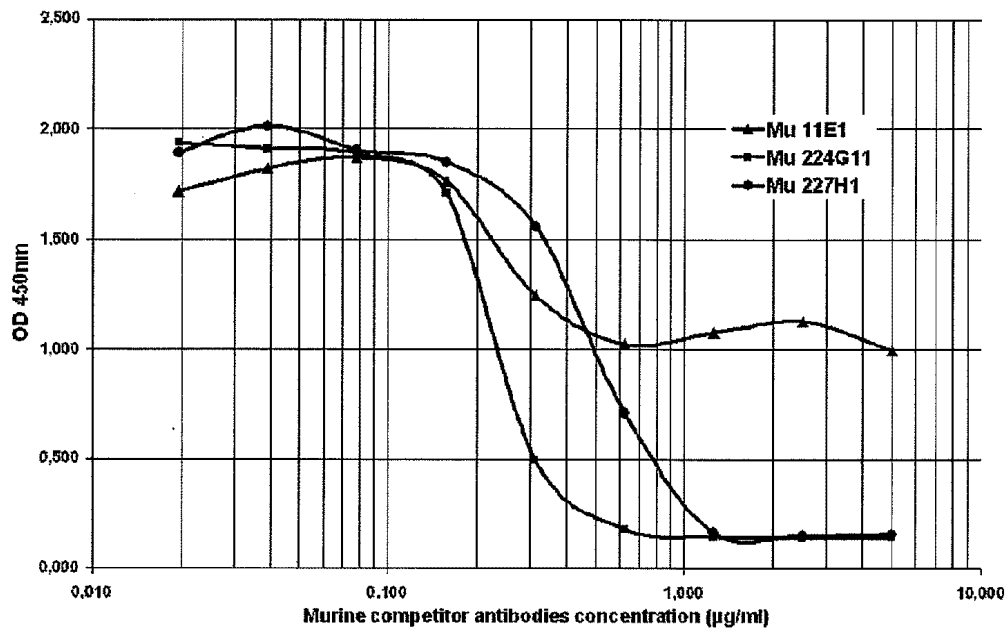
도면52



도면53



도면54

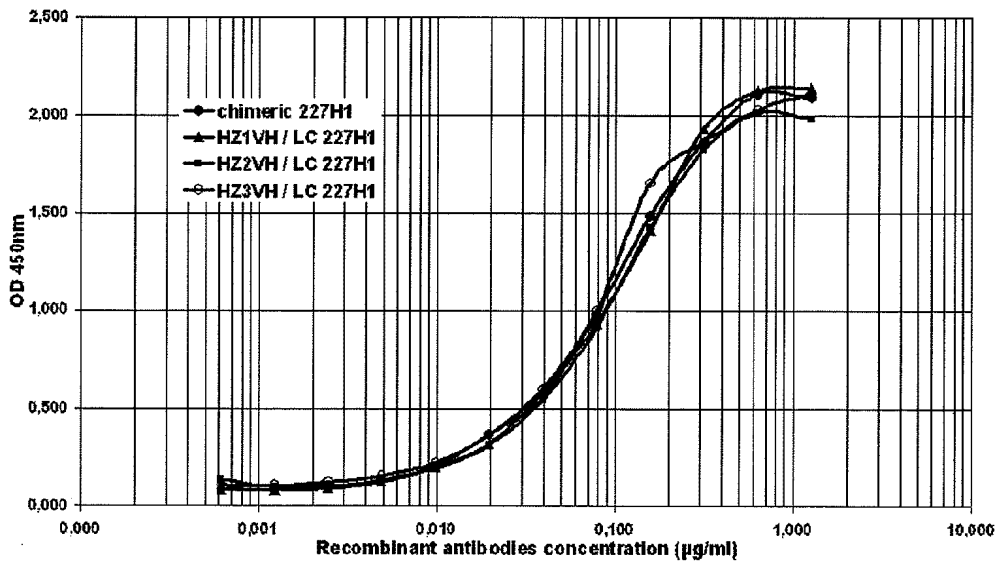


도면55

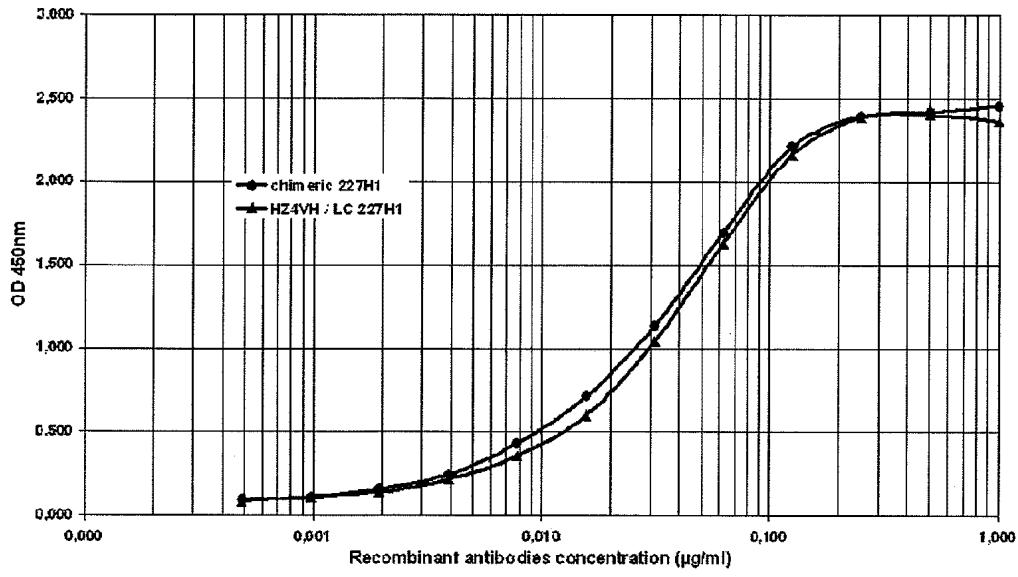
	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
	1	10	20	30	40	50	60			
227H1 VH	EVQLQSSGP	ELVKPGASMKISCKAS	GYSFTDYT	LNWVKQSHGKTLEWIGL	INPYNGGT					
Human FR	Q---V---A	-VK-----V-V-----			MH--R-AP-QG--M-W					
Changed in	*	* 2 *2	3 *		11 *	33 22	2 1			
227H1 HZ3VH	QVQLVQSGP	EVVVKPGASMKVSCAS	GYSFTDYT	LNWVRQSHGKTLEWIGL	INPYNGGT					
227H1 HZ2VH	QVQLVQSGA	EVKKPGASVKVSCAS	GYSFTDYT	LNWVRQAPGKTLEWIGL	INPYNGGT					
227H1 HZ1VH	QVQLVQSGA	EVKKPGASVKVSCAS	GYSFTDYT	LNWVRQAPQGLEWIMGL	INPYNGGT					

	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-115)		FR4-IMGT (116-126)	
	70	80	90	100	110	120		
227H1 VH	TYNQKFK	GKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYC	AREEITKDFDF	WGQGTTLTVSS				
Human FR	N-A---Q	-RV-M-R-T-I-----SR-R-D-T-----						
Changed in	1 *	3 *2 2 1 1 3	** 3 3 *			22		
227H1 HZ3VH	TYAQKFK	GRATLTVDKSSSTAYMELSRITSEDTAVYYC	AREEITKDFDF	WGQGTTLTVSS				
227H1 HZ2VH	TYAQKFK	GRATLTVDKSSSTAYMELSRITSEDTAVYYC	AREEITKDFDF	WGQGTTLTVSS				
227H1 HZ1VH	TYAQKFK	GRVTMTVDKSSSTAYMELSRITSEDTAVYYC	AREEITKDFDF	WGQGTTLTVSS				

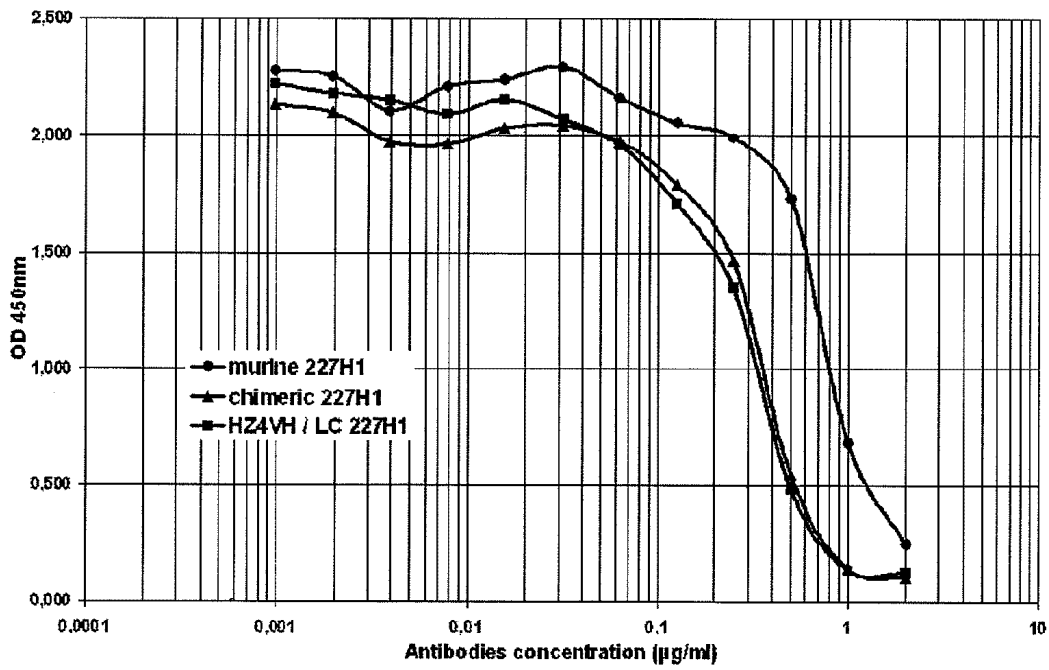
도면56



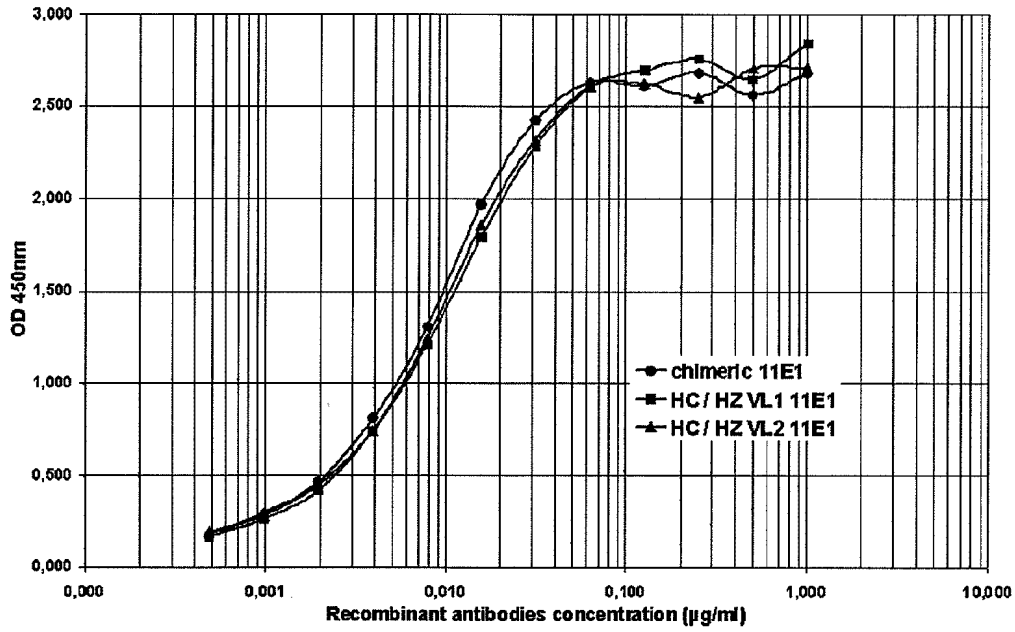
도면57



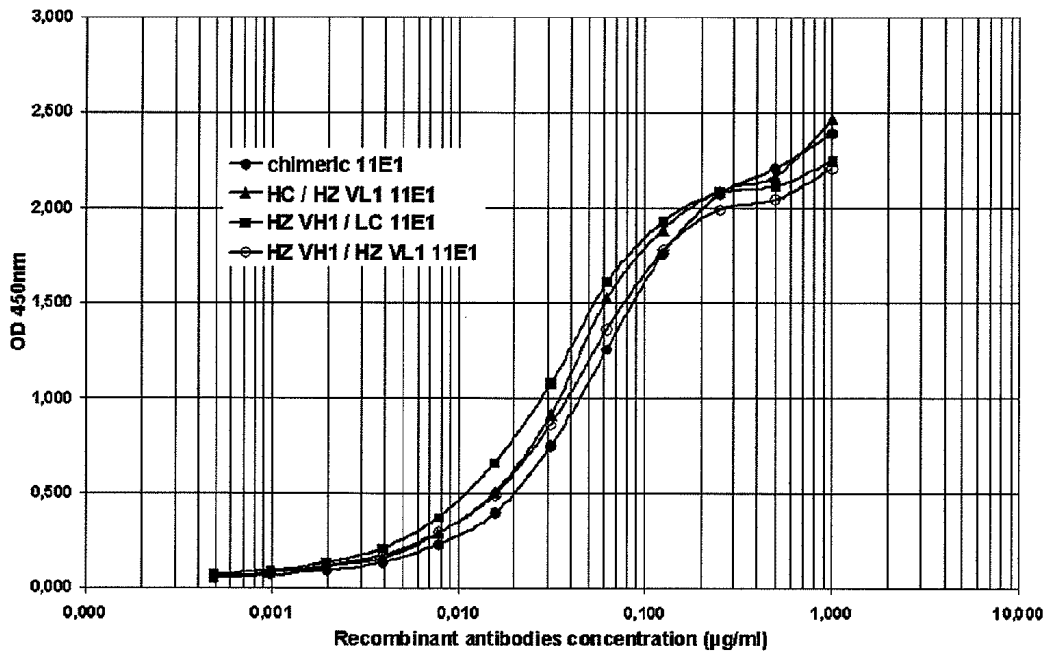
도면58



도면63



도면64

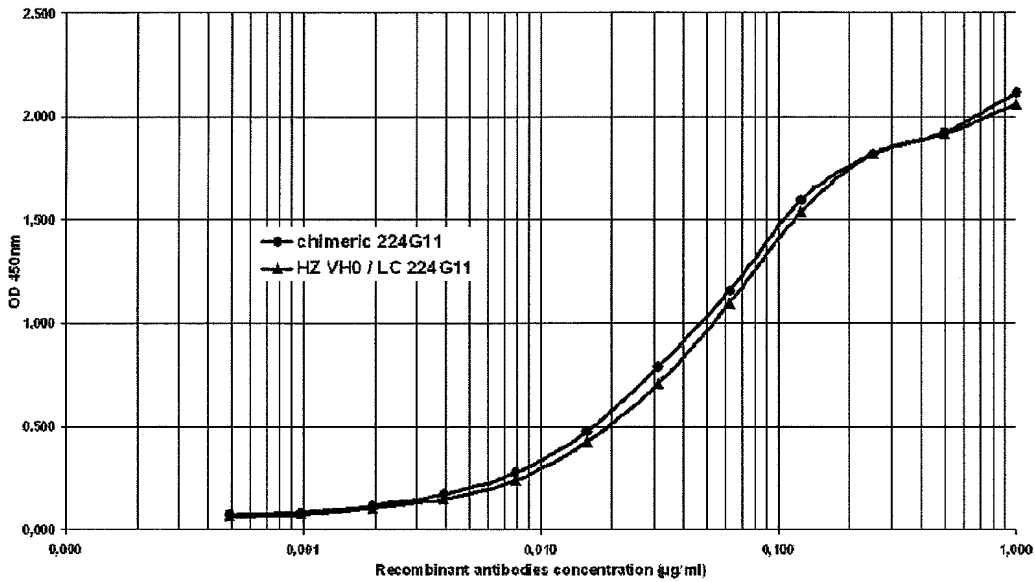


도면65

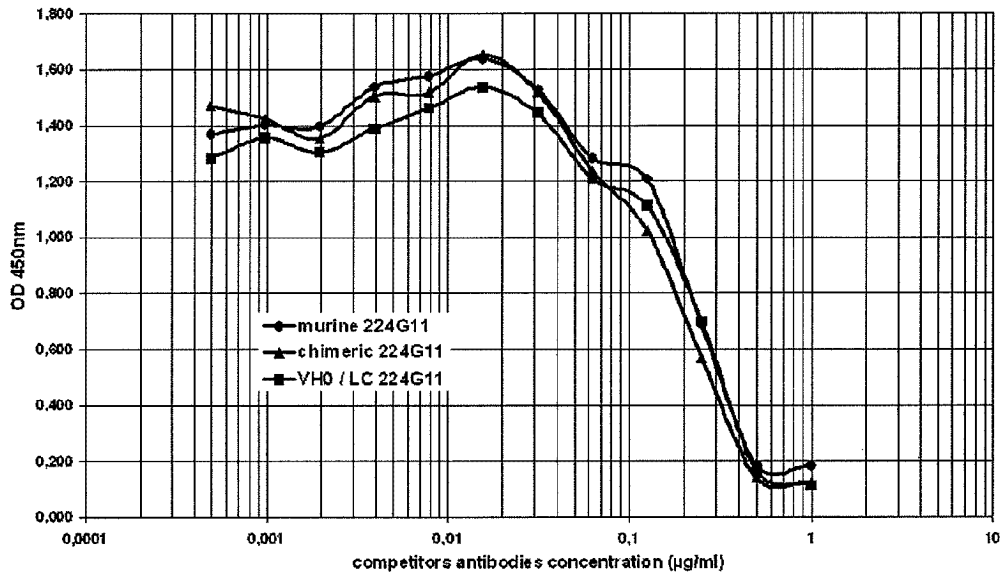
	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
	1	10	20	30	40	50	60		
224G11 VH	EVQLQ	QSGP	ELVKPGASVKISCKTS	GYIFTAYT	MHWVRQSLGESLDWIGG	IKPNNGLA..		
227H1 VH	EVQLQ	QSGP	ELVKPGASMKISCKAS	GYSFTD	LNWVKQSHGKTEWIGL	INPYNGGT..		
Human FR	Q---	V---A	--VK-----V---A-			-----AP-QG-E-M-W			
224G11 HZ VH0	QVQLV	QSGA	EVKKPGASVKVSCKAS	GYIFTAYT	MHWVRQAPQGLEWMGW	IKPNNGLA..		

	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-115)		FR4-IMGT (116-126)	
	70	80	90	100	110	120		
224G11 VH	NYNQKFK	.GKATLTVDKSSSTAYMDLRSLS	TSSEDSAVYYC		ARSEITTEFDY	WGQGTALT	VSS	
227H1 VH	TYNQKFK	.GKATLTVDKSSSTAYMELLSLS	TSSEDSAVYYC		AREEITKDFD	WGQGTTLT	VSS	
Human FR	--A---	Q.-RV-M-R-T-I-----E-SR-R-D-T-----				-----IV-----		
224G11 HZ VH0	NYAQKFQ	.GRVTMTRDTSISTAYMELSRLSRSD	DTAVYYC		ARSEITTEFDY	WGQGTTLT	VSS	

도면66



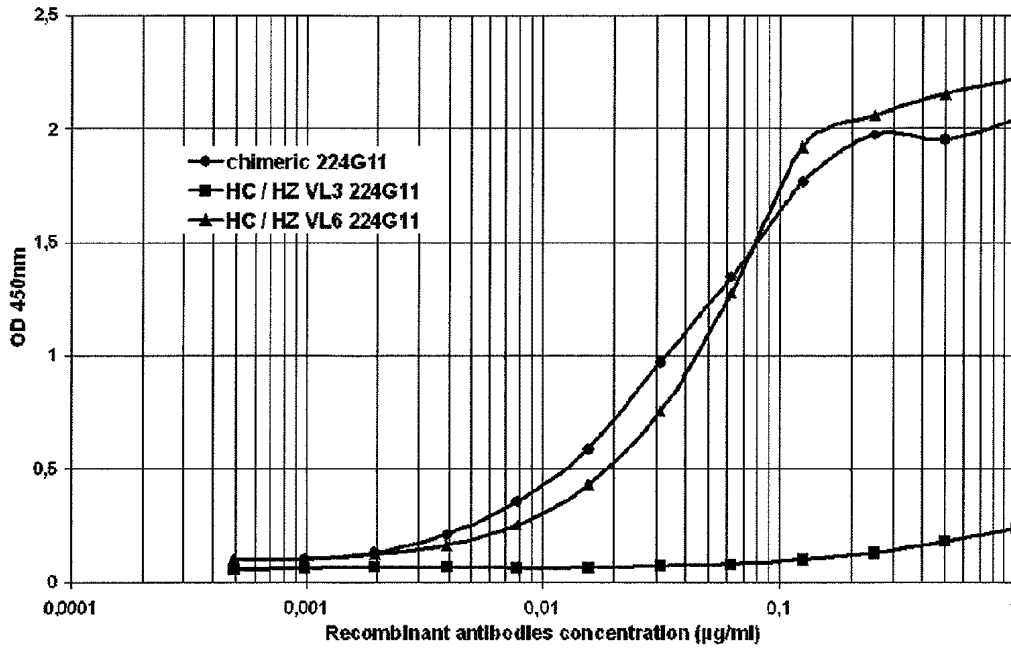
도면67



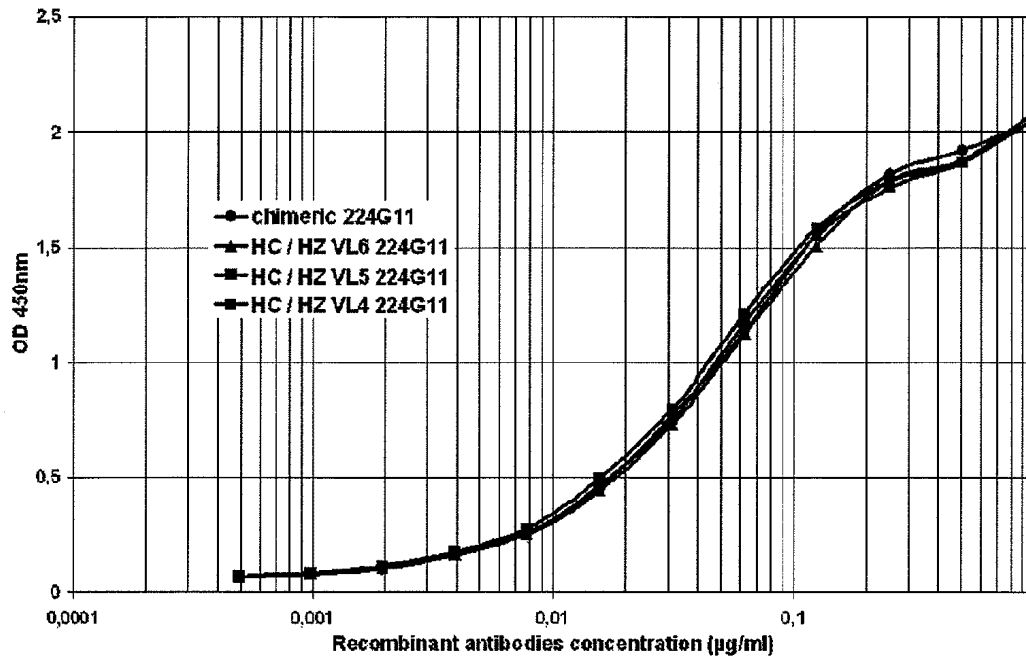
도면68

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
	1	10	20	30	40	50	60		
224G11 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS			ESVDSYANSF..		MHWYQQKPGQPPLLIY		RAS.....	
Shorter Hu-FR	E-----T-SL-P-E---L-----				LA-----A-R----		
Rank	*	* 3*	2 3 *			11	2 3		
224G11 HZ VL3	EIVLTQSPATLALSLGQRATLSCRAS			ESVDSYANSF..		MHWYQQKPGQPPLLIY		RAS.....	
Longer Hu-FR	---M---D-----E---N-KS-				LA-----		
Rank	1	*	3 * 32			11			
224G11 HZ VL6	DIVLTQSPDSLAVSLGQRATINCRAS			ESVDSYANSF..		MHWYQQKPGQPPLLIY		RAS.....	
	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-113)		FR4-IMGT (114-123)		
	70 80 90 100				110		120		
224G11 VL	NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEADDVATYYC				QQSKEDPLT		FGSGTKLEMK		
Shorter Hu-FR	-RAT---.-----.-G-----SSL-PE-F-V---					--G---V-I-		
Rank	22*				1 32* 33 2 3		3 * *		
224G11 HZ VL3	NLETGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPLEADDVATYYC				QQSKEDPLT		FGSGTKVEIK		
Longer Hu-FR	TR---V-.D-----.-G-----SSLQ-E---V---					--G---V-I-		
Rank	22 * *				1 32*3 3 3		3 * *		
224G11 HZ VL6	NLESGVP.DRFSGSG..SRTDFTLTINPLEADDVATYYC				QQSKEDPLT		FGSGTKVEIK		

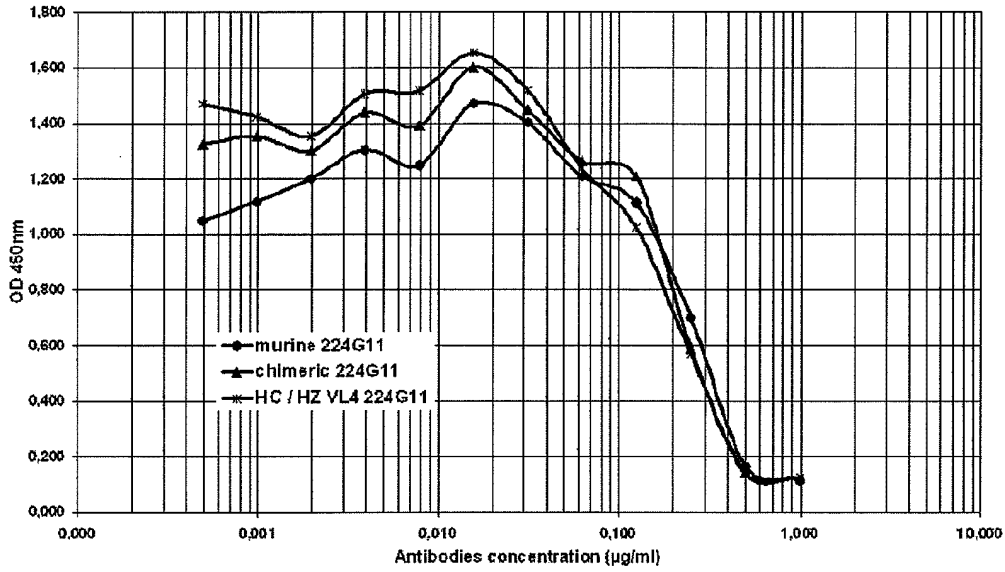
도면69



도면70



도면71

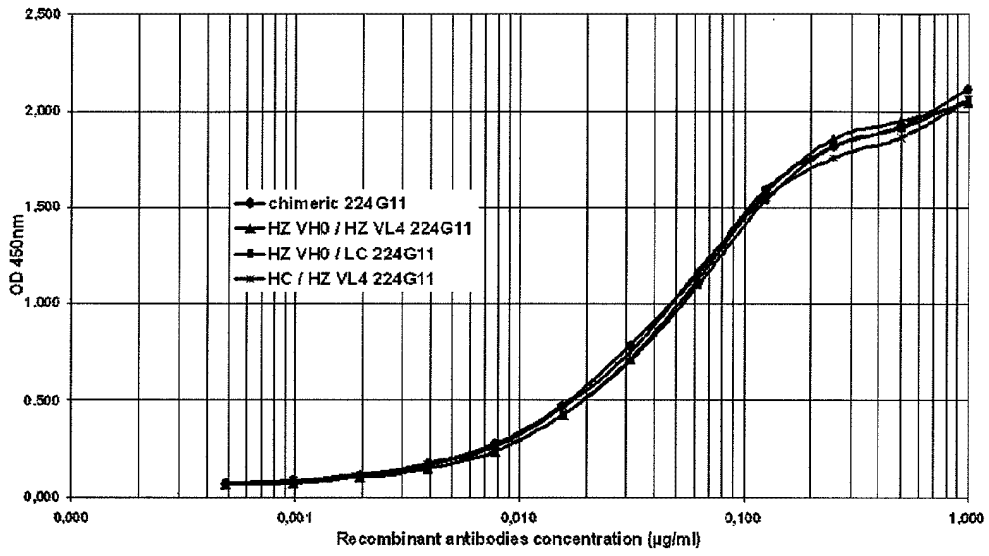


도면72

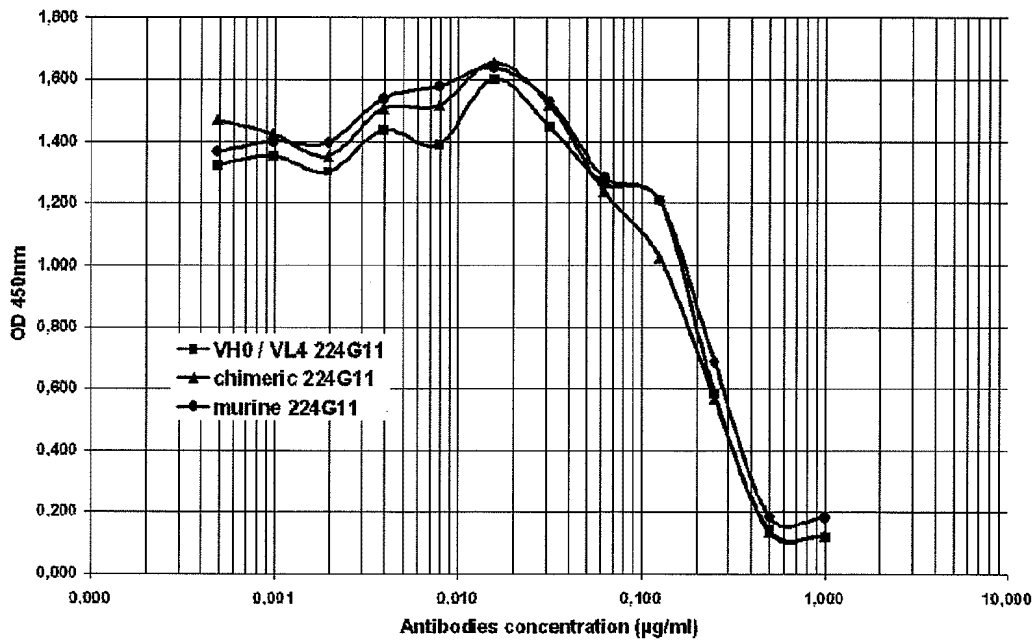
	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
	1	10	20	30	40	50	60		
224G11 HZ VL4	DIV	LTQSPD	SLAVSLGER	ATINCKSS	ESVDSYANSF	..	MHWYQKPGQP	PKLLIY	RAS
humanization	S	*	!	* !!			SS		

	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-113)		FR4-IMGT (114-123)										
	70	80	90	100	110	120											
224G11 HZ VL4	TRE	SGVP	DRFSGSG	..SRTD	FTLT	ISSLQ	AEDVAVYYC	Q	SKEDPLT	F	GGG	T	K	V	E	I	K
humanization	!!	*	*	S	!!*!!	!				!	*	*					

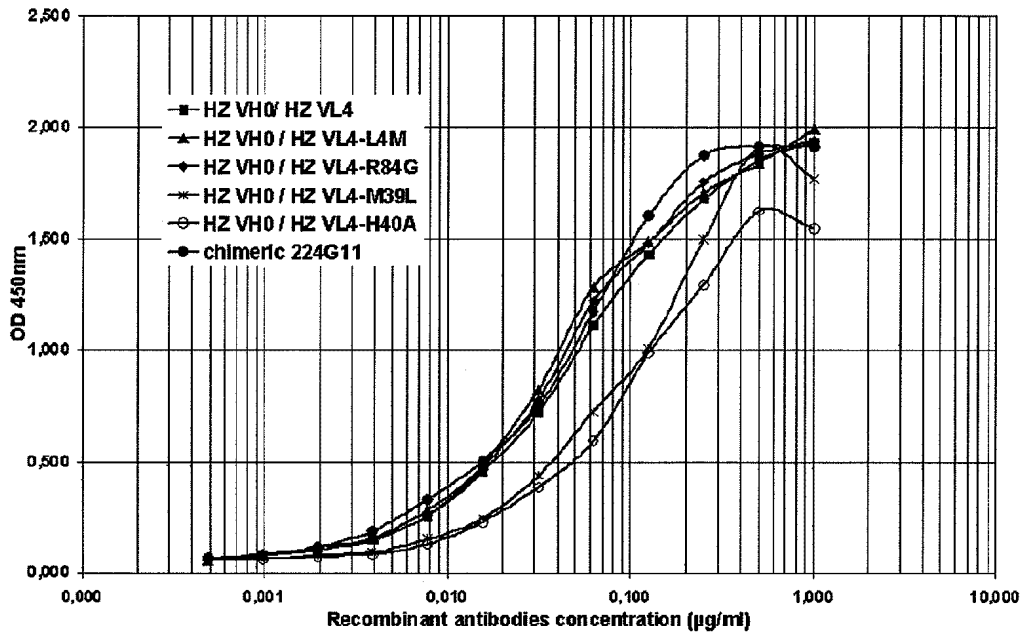
도면73



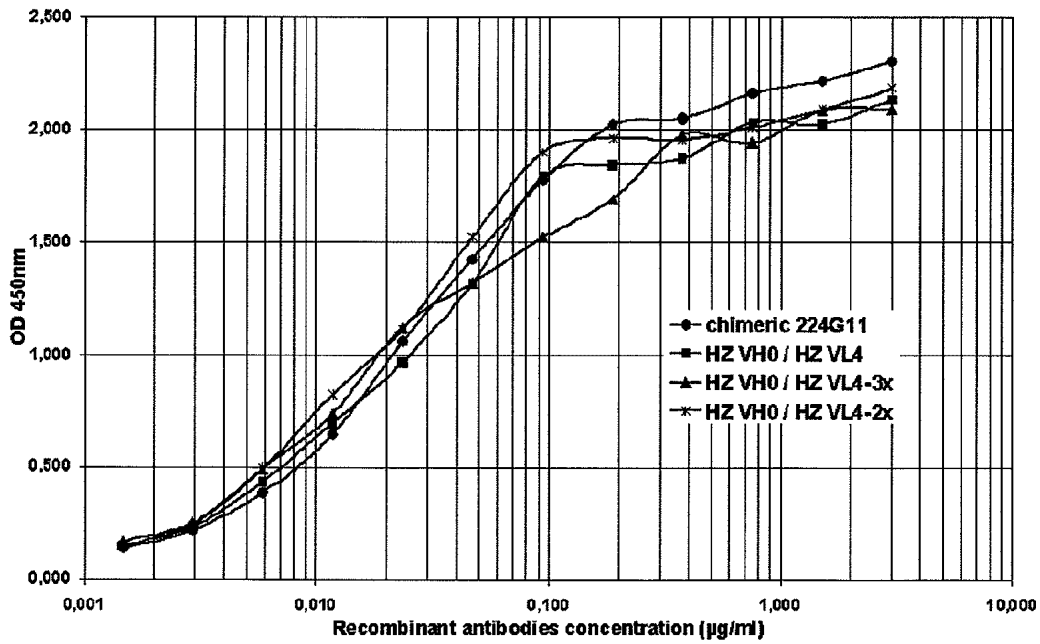
도면74



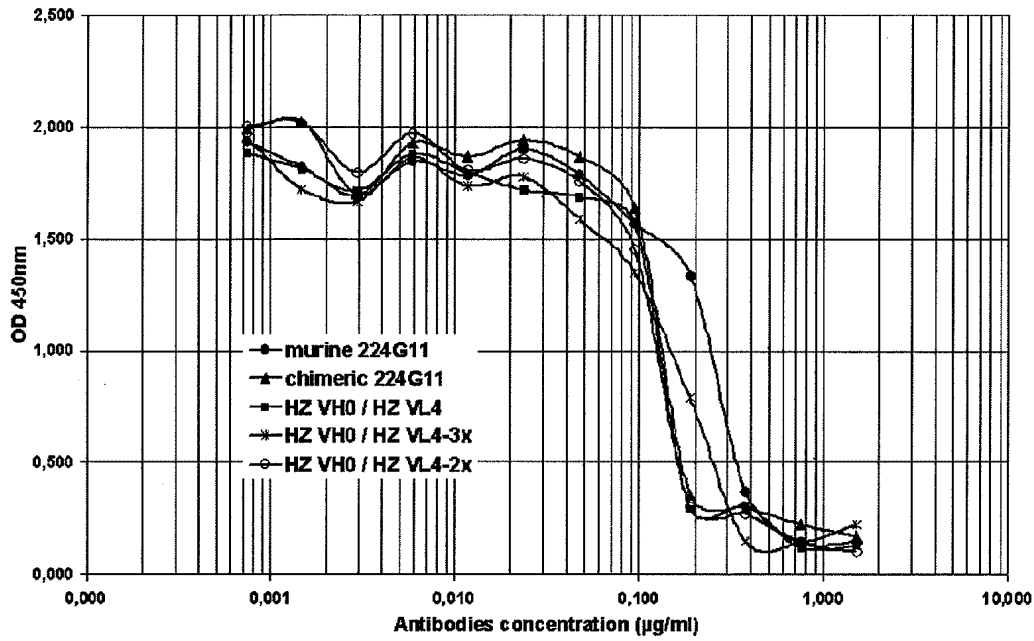
도면75



도면76



도면77



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> PIERRE FABRE MEDICAMENT
- <120> Novel antibodies inhibiting c-Met dimerization, and uses thereof
- <130> D25728
- <140> PCT/EP2008/059026
- <141> 2008-07-10
- <150> EP 07301231.2
- <151> 2007-07-12
- <150> US 60/929,789
- <151> 2007-07-12
- <150> US 61/020,639
- <151> 2008-01-11
- <160> 71
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> mus musculus
- <400> 1

Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr Thr

1 5

<210> 2

<211> 8

<212>

> PRT

<213> mus musculus

<400> 2

Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala

1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 3

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 4

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Thr

1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 5

Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr

1 5

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 6

Ala Arg Glu Glu Ile Thr Lys Asp Phe Asp Phe

1 5 10

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 8

Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr

1 5

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 9

Ala Arg Gly Arg Tyr Val Gly Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 10

Glu Ser Val Asp Ser Tyr Ala Asn Ser Phe

1 5 10

<210> 11

<211> 3

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 11

Arg Ala Ser

1

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 12

Gln Gln Ser Lys Glu Asp Pro Leu Thr

1 5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 13

Glu Ser Ile Asp Thr Tyr Gly Asn Ser Phe

1 5 10

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 14

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr

1 5

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 15

Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

1 5

<210> 16

<211> 3

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 16

Ala Ala Thr

1

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 17

Gln His Phe Trp Gly Pro Pro Tyr Thr

1 5

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 18

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr

20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 19

<211> 118

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 19

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

 20 25 30

Thr Leu Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Thr Leu Glu Trp Ile

 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95

Ala Arg Glu Glu Ile Thr Lys Asp Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr

 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 20

<211> 121

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 20

Glu Val Leu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

 20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Met Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45
 Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Phe Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Arg Tyr Val Gly Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 21

<211> 111

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 21

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
 100 105 110

<210> 22

<211> 111

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 22

Gly Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Val Ser Glu Ser Ile Asp Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
 100 105 110

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser

65	70	75	80	
Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Pro Pro Tyr				
	85	90	95	
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys				
	100	105		
<210> 24				
<211> 24				
<212> DNA				
<213> mus musculus				
<400> 24				
ggatacatat tcaactgcata cacc				24
<210> 25				
<211> 24				
<212> DNA				
<213> mus musculus				
<400> 25				
attaaaccaa acaatggtct tgct				24
<210> 26				
<211> 33				
<212> DNA				
<213> mus musculus				
<400> 26				
gcaagatctg agattacgac ggaattgac tac				33
<210> 27				
<211> 24				
<212> DNA				
<213> mus musculus				
<400> 27				
ggttattcat tcaactgacta cacc				24
<210> 28				
<211> 24				
<212> DNA				
<213> mus musculus				
<400> 28				

attaatcctt acaatggtgg tact	24
<210> 29	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> mus musculus	
<400> 29	
gcaagagagg aaattacgaa ggactttgat ttc	33
<210> 30	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> mus musculus	
<400> 30	
ggatacacat tcaactgacta caac	24
<210> 31	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> mus musculus	
<400> 31	
attaatccta acaatggtgg tact	24
<210> 32	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> mus musculus	
<400> 32	
gcaagagggga ggtatgttgg ttactactat gctatggact ac	42
<210> 33	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> mus musculus	
<400> 33	
gaaagtgttg atagttatgc caatagtttt	30
<210> 34	
<211> 9	

<212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 34
 cgtgcatcc 9
 <210> 35
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 35
 cagcaaagta aggaggatcc tctcacg 27
 <210> 36
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 36
 gaaagtattg atacttatgg caatagttt 30
 <210> 37
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 37
 cagcaaagta atgaggatcc attcacg 27

 <210> 38
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 38
 gagaatattt acagtaat 18
 <210> 39
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 39
 gctgcaaca 9

<210> 40
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 40
 caacatTTTT ggggtcctcc gtacaag 27
 <210> 41
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 41
 gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgcaaga ctctggata catattcact gcatacacca tgcactgggt gaggcagagc 120
 ctggagaga gccttgactg gattggaggt attaaaccaa acaatggtct tgctaactac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
 atggacctcc gcagcctgac atctgaggat tctgcagtct attactgtgc aagatctgag 300
 attacgacgg aatttgacta ctggggccaa ggcaccgctc tcacagtctc ctca 354
 <210> 42
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 42
 gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagatt 60
 tcctgcaagg ctctgggta ttattcact gactacacc tgaactgggt gaagcagagc 120
 catggaaga cccttgagtg gattggactt attaatcctt acaatggtgg tactacctac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcatccag cacagcctac 240
 atggagctcc tcagtctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagaggaa 300
 attacgaagg actttgattt ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354
 <210> 43
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 43

gaggtcctgc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

ccctgcaagg ctcttgata cacattcact gactacaaca tggactgggt gaagcagagc 120

catggaatga gccttgagtg gattggagat attaatecta acaatggtgg tactatcttc 180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagagggagg 300

tatgttggtt actactatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 44

<211> 333

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 44

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggca gagggccacc 60

atatctgca gagccagtga aagtgtgat agttatgcca atagttttat gcaactgtac 120

cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatcaa cctagaatct 180

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcacct caccattaat 240

cctgtggagg ctgatgatg tgcaacctat tactgtcage aaagtaagga ggatcctctc 300

acgttcggct cggggacaaa attggaatg aaa 333

<210> 45

<211> 333

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 45

ggcattgtgt tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggca gagggccacc 60

atatctgca gactcagtga aagtattgat acttatggca atagttttat acaactgtac 120

cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatcaa cctagaatct 180

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcacct caccattaat 240

cctgtggagg ctgatgattc tgcaacctat tactgtcage aaagtaatga ggatccattc 300

acgttcggct cggggacaaa gttggaatg aaa 333

<210> 46

<211> 321

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 46

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc 60
 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacag 120
 ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgct gcaacaaact tagtagatgg tgtgccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct 240
 gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttggggtc ctccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggagataaa g 321

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<

<220><223> Primer for housekeeping gene Ribosomal protein, large, PO (RPL0)

<400> 47

gaaactctgc attctcgctt cctg 24

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> Primer for housekeeping gene Ribosomal protein, large, PO (RPL0)

<400> 48

aggactcgtt tgtaccggtt ga 22

<210> 49

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> Primer for housekeeping gene Ribosomal protein, large, PO (RPL0)

<400> 49

tgcagattgg ctaccaact gttgca 26

<210> 50

<211> 18

<212> DNA

<213> artificial sequence
 <220><223> Primer for HGF
 <400> 50
 aacaatgcct ctggttcc 18
 <210> 51
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> Primer for HGF
 <400> 51
 cttgtagctg cgtcctttac 20
 <210> 52
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> Probe for HGF
 <400> 52
 ccttcaatag catgtcaagt ggagtga 27
 <210> 53
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> Primer for c-Met
 <400> 53
 cattaagga gacctacca tagctaat 28
 <210> 54
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> Primer for c-Met
 <400> 54
 cctgatcgag aaaccacaac ct 22
 <210> 55
 <211> 25

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223

> Probe for c-Met

<400> 55

catgaagcga ccctctgatg tccca

25

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 56

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 57

Ile Asn Pro Thr Thr Gly Ser Thr

1 5

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 58

Ala Ile Gly Gly Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 59

Ser Ser Val Ser Ser Thr Tyr

1 5

<210> 60

<211> 3

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 60

Thr Thr Ser

1

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 61

His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 62

<211> 118

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 62

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Thr Thr Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Leu

 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95

Ala Ile Gly Gly Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 63

<211> 108

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 63

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Thr

20 25 30

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp

35 40 45

Ile Tyr Thr Thr Ser Ile Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu

65 70 75 80

Thr Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys

100 105

<210> 64

<211> 24

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 64

ggctacactt ttacttccta ctgg

24

<210> 65

<211> 24

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 65

attaacccta ccaactggttc tact	24
<210> 66	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> mus musculus	
<400> 66	
gcaataggag gatatgggtc ctggtttgct tac	33
<210> 67	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> mus musculus	
<400> 67	
tcaagtgtaa gttccaccta c	21
<210> 68	
<211> 9	
<212> DNA	
<213> mus musculus	
<400> 68	
accacatcc	9
<210> 69	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> mus musculus	
<400> 69	
catcagtgga gtagttaccc attcaag	27
<210> 70	
<211> 354	
<212> DNA	
<213> mus musculus	
<400> 70	
caggtccage ttcagcagtc tggggctgaa ctggcaaac ctggggcctc agtgaagatg	60
tctctgaagg ctcttggtca cacttttact tctactgga tgaactgggt gaaacagagg	120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaacccta ccaactggttc tactgactac	180

aatcagaagt taaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccaa cacagcctac 240
 atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aataggagga 300
 tatgggtcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca 354

<210> 71

<211> 324

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 71

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctctgggga gaaggtcacc 60
 ttgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tccacctact tgtactgta ccagcagaag 120
 ccaggatcct cccccaaact ctggatttat accacatcca tcttggttc tggagtcct 180
 gctcgttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagcatggag 240
 actgaagatg ctgcctctta tttctgcat cagtggagta gttaccatt cacgttcggc 300
 tcggggacaa agttggacat aaaa 324