



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0126748
(43) 공개일자 2011년11월23일

(51) Int. Cl.

C07K 16/46 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7023688

(22) 출원일자(국제출원일자) 2010년03월30일

심사청구일자 2011년10월07일

(85) 번역문제출일자 2011년10월07일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2010/002003

(87) 국제공개번호 WO 2010/115551

국제공개일자 2010년10월14일

(30) 우선권주장

09005109.5 2009년04월07일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인

로슈 글리카트 아게

스위스 솔리겐-취리히 체하-8952 바기슈트라체 18

(72) 발명자

보첸마이어 비르기트

독일 82229 제펠트 호르슈트-볼프람-가이슬러-백 10

브링크만 올리히

독일 82362 바일하임 파이히틀슈트라체 12

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인코리아나

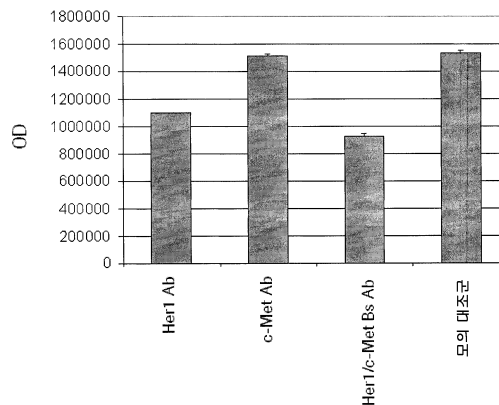
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 이중특이적 항-E R B B-1/항-C-M E T 항체

(57) 요약

본 발명은 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 대한 이중특이적 항체, 그의 제조 방법, 상기 항체를 포함하는 약학 조성물, 및 그의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도8a



(72) 발명자

클라인 크리스티안

스위스 체하-8906 본슈테텐 호뤼차허백 41

니데르펠너 게르하르트

독일 82386 오베르하우젠 도르프슈트라쎄 36베

세퍼 볼프강

독일 68199 만하임 탄헤우저링 190

샬치 위르겐 미하엘

독일 83278 트라운슈타인 노이링 10

주츠만 클라우디오

독일 81373 뮌헨 펜츠베르거 슈트라쎄 3

우마나 파블로

스위스 체하-8032 취리히 프라이슈트라쎄 159

특허청구의 범위

청구항 1

OVCAR-8 세포 상에서 흐름 세포측정 검정으로 2 시간 후 측정되는 경우, 이중특이적 항체의 부재 하에서의 c-Met 의 내재화에 비해 15 % 이하의 c-Met 의 내재화를 보이는 것을 특징으로 하는, 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 제 1 항원-결합 자리 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 제 2 항원-결합 자리를 포함하는 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 1 개 또는 2 개의 항원-결합 자리 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 제 3 항원-결합 자리를 포함하는, 2가 또는 3가인 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체:

a) 2 개의 항체 중쇄 및 2 개의 항체 경쇄로 이루어지는, 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 전장 항체; 및

b) 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 1 개의 단일쇄 Fab 단편,

상기 b) 에서의 상기 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 중 또는 경쇄의 C- 또는 N- 말단에서 펩티드 연결기를 통해 a) 에서의 상기 전장 항체에 융합됨.

청구항 4

하기를 특징으로 하는, 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 제 1 항원-결합 자리 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 제 2 항원-결합 자리를 포함하는 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체:

i) 상기 제 1 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인 내에 SEQ ID NO: 17 의 CDR3H 영역, SEQ ID NO: 18 의 CDR2H 영역, 및 SEQ ID NO:19 의 CDR1H 영역, 및 경쇄 가변 도메인 내에 SEQ ID NO: 20 의 CDR3L 영역, SEQ ID NO:21 의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:58 의 CDR1L 영역 또는 SEQ ID NO:22 의 CDR1L 영역을 포함하고;

상기 제 2 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인 내에 SEQ ID NO: 30 의 CDR3H 영역, SEQ ID NO: 31 의 CDR2H 영역, 및 SEQ ID NO: 32 의 CDR1H 영역, 및 경쇄 가변 도메인 내에 SEQ ID NO: 33 의 CDR3L 영역, SEQ ID NO: 34 의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO: 35 의 CDR1L 영역을 포함함, 또는

ii) 상기 제 1 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인 내에 SEQ ID NO: 23 의 CDR3H 영역, SEQ ID NO: 24 의 CDR2H 영역, 및 SEQ ID NO:25 의 CDR1H 영역, 및 경쇄 가변 도메인 내에 SEQ ID NO: 26 의 CDR3L 영역, SEQ ID NO:27 의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:28 의 CDR1L 영역 또는 SEQ ID NO:29 의 CDR1L 영역을 포함하고;

상기 제 2 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인 내에 SEQ ID NO: 30 의 CDR3H 영역, SEQ ID NO: 31 의 CDR2H 영역, 및 SEQ ID NO: 32 의 CDR1H 영역, 및 경쇄 가변 도메인 내에 SEQ ID NO: 33 의 CDR3L 영역, SEQ ID NO: 34 의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO: 35 의 CDR1L 영역을 포함함.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 하기를 특징으로 하는 이중특이적 항체:

i) ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 상기 제 1 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 1 의 서열, 및 경쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 2 의 서열을 포함하고;

c-Met 에 특이적으로 결합하는 상기 제 2 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 5 의 서열, 및 경쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 6 의 서열을 포함함; 또는

ii) ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 상기 제 1 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 3 의 서열, 및 경쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 4 의 서열을 포함하고;

c-Met 에 특이적으로 결합하는 상기 제 2 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 5 의 서열, 및 경쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 6 의 서열을 포함함.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, IgG1 또는 IgG3 서브클래스의 불변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, Asn297 에서 당쇄로 글리코실화되어 상기 당쇄 내의 푸코오스의 양이 65 % 이하인 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체를 인코딩하는 핵산.

청구항 9

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 암 치료를 위한 약학 조성물.

청구항 11

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 암 치료를 위한 이중특이적 항체.

청구항 12

암 치료용 약제의 제조를 위한, 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체의 용도.

청구항 13

치료를 필요로 하는 환자에게 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체를 투여하는 것에 의한 암 환자의 치료 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 대한 이중특이적 항체, 그의 제조 방법, 상기 항체를 함유하는 약학 조성물, 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] ErbB 패밀리의 단백질

[0003] ErbB 단백질 패밀리는 4 개의 일원 ErbB-1 (표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 로도 호칭됨), ErbB-2 (인간에서 HER2 로, 설치류에서 neu 로도 호칭됨), ErbB-3 (HER3 으로도 호칭됨) 및 ErbB-4 (HER4 로도 호칭됨) 로 이루어진다. ErbB 패밀리의 단백질은 수용체 티로신 키나아제이고 세포 성장, 분화 및 생존의 중요한 매개체에 해당한다.

[0004] ErbB-1 및 항-ErbB-1 항체

[0005] ErbB-1 (ERBB1, 인간 표피 성장 인자 수용체, EGFR, HER-1 또는 조류 적혈모구 백혈병 바이러스 (v-erb-b) 종양유전자 상동체로도 알려짐; SEQ ID NO:16) 은 c-erbB 원종양유전자에 의해 인코딩되는 170 kDa 막횡단 수용체이며, 고유의 티로신 키나아제 활성을 나타낸다 (Modjtahedi, H., et al., Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235; Herbst, R.S., and Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611). EGFR 의 아이소형 및 변이체 (예를 들

어, 대안적 RNA 전사물, 끝이 잘린 형태, 다형, 등)가 또한 존재하며, 예를 들어 Swissprot 데이터베이스 엔트리 번호 P00533-1, P00533-2, P00533-3, 및 P00533-4에 의해 확인되는 것들이 있으나 이에 제한되지 않는다.

EGFR은 리간드 예컨대 표피 성장 인자 (EGF), 전환 성장 α , 암피레굴린, 헤파린-결합 EGF (hb-EGF), 베타 셀룰린, 인자- α (TGF- 및 에피레굴린에 결합하는 것으로 알려져 있다 (Herbst, R.S., and Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611; Mendelsohn, J., and Baselga, J., Oncogene 19 (2000) 6550-6565). EGFR은, 이에 제한되는 것은 아니나, 세포 증식, 분화, 세포 생존, 세포자멸사, 혈관생성, 유사분열유도, 및 전이를 제어하는 신호 전달 경로의 활성화를 포함하여, 티로신-키나아제 매개 신호 전달 경로를 통해 수많은 세포 과정을 조절한다 (Atalay, G., et al., Ann. Oncology 14 (2003) 1346-1363; Tsao, A.S., and Herbst, R.S., Signal 4 (2003) 4-9; Herbst, R.S., and Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611; Modjtahedi, H., et al., Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235).

[0006] 항-ErbB-1 항체는 EGFR의 세포외 부분을 표적으로 하여, 리간드 결합의 차단을 초래함으로써 후속 사건 예컨대 세포 증식을 저해한다 (Tsao, A.S., and Herbst, R.S., Signal 4 (2003) 4-9). 2 이상의 상이한 종 (예를 들어, 마우스 및 인간) 으로부터의 항체의 부분을 포함하는 키메라 항-ErbB-1 항체가 개발되었다. 참조, 예를 들어, US 5,891,996 (마우스/인간 키메라 항체, R3), 또는 US 5,558,864 (쥐과 항-EGFR MAb 425의 키메라 및 인간화 형태). 또한, IMC-C225 (세투시맙, Erbitux®; ImClone)는 다양한 인간 이종이식 모델에서 항종양 효능을 나타낸 것으로 보고된 키메라 마우스/인간 항-EGFR 모노클로날 항체 (마우스 M225 모노클로날 항체에 기초함, 인간 임상 시험에서 HAMA 반응을 초래했음)이다 (Herbst, R.S., and Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611). IMC-C225의 효능은 아마도 증가된 항체-의존적 세포 독성 (ADCC) 활성화에 의해, EGFR 신호전달 경로에 의해 조절되는 세포 사건의 저해를 비롯한 여러 메커니즘의 원인이 된다 (Herbst, R.S., and Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611). IMC-C225도, 방사선요법 및 화학요법과 조합된 경우를 포함하여, 임상 시험에서 사용되었다 (Herbst, R.S., and Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611). 최근에, Abgenix, Inc. (Fremont, CA)는 암 치료용 ABX-EGF를 개발했다. ABX-EGF는 완전 인간 항-EGFR 모노클로날 항체이다 (Yang, X.D., et al., Crit. Rev. Oncol./Hematol. 38 (2001) 17-23).

[0007] WO 2006/082515는 랫트 모노클로날 항체 ICR62에서 유래된 인간화 항-EGFR 모노클로날 항체 및 그의 암 치료를 위한 당조작된 (glycoengineered) 형태를 언급한다.

[0008] c-Met 및 항-c-Met 항체

[0009] MET (중간엽-상피 전이 인자)는 단백질 MET (c-Met; 간세포 성장 인자 수용체 HGFR; HGF 수용체; 산란 인자 수용체; SF 수용체로도 알려짐; SEQ ID NO:15)를 인코딩하는 원종양유전자이다 (Dean, M., et al., Nature 318 (1985) 385-8; Chan, A.M., et al., Oncogene 1 (1987) 229-33; Bottaro, D.P., et al., Science 251 (1991) 802-4; Naldini, L., et al., EMBO J. 10 (1991) 2867-78; Maulik, G., et al., Cytokine Growth Factor Rev. 13 (2002) 41-59). MET는 배아 발달 및 상처 치유에 필수적인 막 수용체이다. 간세포 성장 인자 (HGF)는 MET 수용체의 유일하게 알려진 리간드이다. MET는 상피 기원의 세포에 의해 정상적으로 발현되는 한편, HGF의 발현은 중간엽 기원의 세포에 국한된다. HGF 자극시, MET는 침습적 성장으로 알려진 과정을 집합적으로 야기하는 여러 생물학적 반응들을 유도한다. 암에서 비정상적인 MET 활성화는 나쁜 예후와 연관되며, 비정상적으로 활성화된 MET는 종양 성장, 종양에 영양분을 공급하는 새로운 혈관의 형성 (혈관생성), 및 다른 기관으로의 암 전파 (전이)를 유발한다. MET는 간, 신장, 위, 유방, 및 뇌의 암을 비롯한 많은 유형의 인간 악성종양에서 탈조절된다. 정상적으로는, 줄기 세포 및 조상 세포만이 MET를 발현하며, MET는 이들 세포가 침습적으로 성장할 수 있게 하여 배아에서 새로운 조직을 생성하거나 성체에서 손상된 조직을 재생시킨다. 그러나, 암 줄기 세포는 정상적 줄기 세포가 MET를 발현하는 능력을 강탈하여, 암 존속 및 신체 내 다른 자리로의 전파의 원인이 되는 것으로 여겨진다.

[0010] 원종양유전자 MET 산물은 간세포 성장 인자 수용체이며, 티로신-키나아제 활성을 인코딩한다. 1차 단일쇄 전구체 단백질은 번역 후에 절단되어 알파 및 베타 서브유닛을 생성하며, 이들은 이항 연결되어 성숙한 수용체를 형성한다. MET 유전자 내의 다양한 돌연변이는 유두모양 신장 암종과 연관된다.

[0011] 항-c-Met 항체는 예를 들어 US 5,686,292, US 7,476,724, WO 2004/072117, WO 2004/108766, WO 2005/016382, WO 2005/063816, WO 2006/015371, WO 2006/104911, WO 2007/126799, 또는 WO 2009/007427에서 알려졌다.

[0012] C-Met 결합 펩티드는 예를 들어 [Matzke, A., et al., Cancer Res 65 (14) (2005) 6105-10] 및 [Tam, Eric,

M., et al., J. Mol. Biol. 385 (2009)79-90] 에서 알려졌다.

[0013] 다중특이적 항체

[0014] 매우 다양한 재조합 항체 포맷이 최근 개발되었고, 예를 들어 IgG 항체 포맷 및 단일쇄 도메인의 융합에 의한 4가 이중특이적 항체가 있다 (참조, 예를 들어 Coloma, M.J., et al., Nature Biotech 15 (1997) 159-163; WO 2001/077342; 및 Morrison, S.L., Nature Biotech 25 (2007) 1233-1234).

[0015] 또한 2 이상의 항원에 결합할 수 있는, 항체 핵심 구조 (IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM) 가 더이상 유지되지 않는 여러 다른 새로운 포맷 예컨대 다이아- (dia-), 트리아- (tria-) 또는 테트라바디 (tetra-body), 미니바디 (minibody), 여러 단일쇄 포맷 (scFv, Bis-scFv) 이 개발되었다 (Holliger, P., et al., Nature Biotech 23 (2005) 1126-1136; Fischer, N., Leger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14; Shen, J., et al., Journal of Immunological Methods 318 (2007) 65-74; Wu, C., et al., Nature Biotech. 25 (2007) 1290-1297).

[0016] 모든 상기 포맷은 링커를 사용하여 항체 핵심 (IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM) 을 추가의 결합 단백질 (예를 들어, scFv) 에 융합시키거나 예를 들어 2 개의 Fab 단편 또는 scFv 를 융합시킨다 (Fischer, N., Leger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14). 자연 항체와 높은 정도의 유사성을 유지함으로써, 예를 들어 Fc 수용체 결합을 통해 매개되는, 보체-의존적 세포독성 (CDC) 또는 항체 의존적 세포 세포독성 (ADCC) 과 같은 효과기 기능의 유지가 요구될 수 있다는 점에 유의해야 한다.

[0017] WO 2007/024715 에서 조작된 다가 및 다중특이적 결합 단백질로서 이중 가변 도메인 면역글로불린이 보고되어 있다. 생물학적으로 활성인 항체 이합체의 제조 과정이 US 6,897,044 에 보고되어 있다. 펩티드 링커를 통해 서로 연결되어 있는 4 개 이상의 가변 도메인을 갖는 다가 Fv 항체 구축물이 US 7,129,330 에 보고되어 있다. 이합체성 및 다합체성 항원 결합 구조가 US 2005/0079170 에 보고되어 있다. 자연적 면역글로불린이 아닌, 연결 구조에 의해 서로 공유 결합된 3 또는 4 개의 Fab 단편을 포함하는 3- 또는 4-가 단일특이적 항원-결합 단백질이 US 6,511,663 에 보고되어 있다. WO 2006/020258 에서 원핵 및 진핵 세포에서 효율적으로 발현될 수 있고, 치료 및 진단 방법에서 유용한 4가 이중특이적 항체가 보고되어 있다. 2 가지 유형의 폴리펩티드 이합체를 포함하는 혼합물에서 하나 이상의 사슬간 이황 연결을 통해 연결되어 있는 이합체를 하나 이상의 사슬간 이황 연결을 통해 연결되어 있지 않은 이합체로부터 분리하거나 우선적으로 합성하는 방법이 US 2005/0163782 에 보고되어 있다. 이중특이적 4가 수용체가 US 5,959,083 에 보고되어 있다. 3 개 이상의 기능적 항원 결합 자리가 있는 조작된 항체가 WO 2001/077342 에 보고되어 있다.

[0018] 다중특이적 및 다가 항원-결합 폴리펩티드가 WO 1997/001580 에 보고되어 있다. WO 1992/004053 은 동일한 항원 결정인자에 결합하는 IgG 클래스의 모노클로날 항체로부터 전형적으로 제조되는 동종접합체가 합성 교차-연결을 통해 공유적으로 연결됨을 보고한다. 항원에 대한 결합활성이 높은 올리고머성 모노클로날 항체가 WO 1991/06305 에 보고되어 있고, 여기서 2 이상의 면역글로불린 단량체가 함께 연합되어 4가 또는 6가 IgG 분자를 형성함으로써, 전형적으로 IgG 클래스인 올리고머가 분비된다. 인터페론 감마 활성이 병원성인 질환을 치료하는데 사용될 수 있는 양-유래 항체 및 조작된 항체 구축물이 US 6,350,860 에 보고되어 있다. US 2005/0100543 에서 이중특이적 항체의 다가 담체인 표적화가능 구축물, 즉 표적화가능 구축물의 각각의 분자가 2 이상의 이중특이적 항체의 담체로서의 역할을 할 수 있는 표적화가능 구축물이 보고되어 있다. 유전자 조작된 이중특이적 4가 항체가 WO 1995/009917 에 보고되어 있다. WO 2007/109254 에서 안정화된 scFv 로 이루어지거나 포함하는 안정화된 결합 분자가 보고되어 있다. US 2007/0274985 는 단일쇄 Fab (scFab) 단편을 포함하는 항체 포맷에 관한 것이다.

[0019] WO 2008/140493 은 항-ErbB 패밀리 일원 항체 및 하나 이상의 항-ErbB 패밀리 일원 항체를 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이다. US 2004/0071696 은 ErbB 단백질 패밀리의 일원에 결합하는 이중특이적 항체 분자에 관한 것이다.

[0020] WO2009111707(A1) 은 Met 및 HER 대항체에 의한 조합 요법에 관한 것이다. WO2009111691(A2A3) 은 Met 및 EGFR 대항체에 의한 조합 요법에 관한 것이다.

[0021] WO2004072117 은 c-Met 하향조절/내재화를 유도하는 c-Met 항체 및, 이중특이적 항체 특히 ErbB-1 이 체 2 항원인 이중특이적 항체에 있어서의 c-Met 항체의 잠재적 용도에 관한 것이다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

발명의 요약

- [0022] **발명의 요약**
- [0023] 본 발명의 첫번째 양상은 OVCAR-8 세포 상에서 흐름 세포측정 검정으로 2 시간 후 측정되는 경우, 항체의 부재 하에서의 c-Met 의 내재화에 비해 15 % 이하의 c-Met 의 내재화를 보이는 것을 특징으로 하는, 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 제 1 항원-결합 자리 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 제 2 항원-결합 자리를 포함하는 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체이다.
- [0024] 본 발명의 하나의 구현예에서 상기 항체는 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 1 또는 2 개의 항원-결합 자리 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 1 개의 항원-결합 자리를 포함하는, 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 2가 또는 3가, 이중특이적 항체이다.
- [0025] 본 발명의 하나의 구현예에서 상기 항체는 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 2 개의 항원-결합 자리 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 제 3 항원-결합 자리를 포함하는, 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 3가, 이중특이적 항체이다.
- [0026] 본 발명의 하나의 구현예에서 상기 항체는 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 1 개의 항원-결합 자리 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 1 개의 항원-결합 자리를 포함하는 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 2가, 이중특이적 항체이다.
- [0027] 본 발명의 하나의 양상은 하기를 특징으로 하는, 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 제 1 항원-결합 자리 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 제 2 항원-결합 자리를 포함하는 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체이다:
- [0028] i) 상기 제 1 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인 내에 SEQ ID NO: 17 의 CDR3H 영역, SEQ ID NO: 18 의 CDR2H 영역, 및 SEQ ID NO:19 의 CDR1H 영역, 및 경쇄 가변 도메인 내에 SEQ ID NO: 20 의 CDR3L 영역, SEQ ID NO:21 의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:22 의 CDR1L 영역을 포함하고;
- [0029] 상기 제 2 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인 내에 SEQ ID NO: 29 의 CDR3H 영역, SEQ ID NO: 30 의 CDR2H 영역, 및 SEQ ID NO: 31 의 CDR1H 영역, 및 경쇄 가변 도메인 내에 SEQ ID NO: 32 의 CDR3L 영역, SEQ ID NO: 33 의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO: 34 의 CDR1L 영역을 포함함; 또는
- [0030] ii) 상기 제 1 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인 내에 SEQ ID NO: 23 의 CDR3H 영역, SEQ ID NO: 24 의 CDR2H 영역, 및 SEQ ID NO:25 의 CDR1H 영역, 및 경쇄 가변 도메인 내에 SEQ ID NO: 26 의 CDR3L 영역, SEQ ID NO:27 의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:28 의 CDR1L 영역을 포함하고;
- [0031] 상기 제 2 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인 내에 SEQ ID NO: 29 의 CDR3H 영역, SEQ ID NO: 30 의 CDR2H 영역, 및 SEQ ID NO: 31 의 CDR1H 영역, 및 경쇄 가변 도메인 내에 SEQ ID NO: 32 의 CDR3L 영역, SEQ ID NO: 33 의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO: 34 의 CDR1L 영역을 포함함.
- [0032] 상기 이중특이적 항체는 바람직하게는 하기를 특징으로 한다:
- [0033] i) ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 상기 제 1 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 1 의 서열, 및 경쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 2 의 서열을 포함하고;
- [0034] c-Met 에 특이적으로 결합하는 상기 제 2 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 5 의 서열, 및 경쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 6 의 서열을 포함함; 또는
- [0035] ii) ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 상기 제 1 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 3 의 서열, 및 경쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 4 의 서열을 포함하고;
- [0036] c-Met 에 특이적으로 결합하는 상기 제 2 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 5 의 서열, 및 경쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 6 의 서열을 포함함.
- [0037] 본 발명의 추가의 양상은 IgG1 또는 IgG3 서브클래스의 불변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 본 발명에 따른 이중특이적 항체이다.
- [0038] 하나의 구현예에서 본 발명에 따른 상기 이중특이적 항체는 Asn297 에서 당쇄로 글리코실화되어 상기 당쇄 내의 푸코오스의 양이 65 % 이하인 것을 특징으로 한다.

- [0039] 본 발명의 추가의 양상은 상기 이중특이적 항체의 사슬을 인코딩하는 핵산 분자이다.
- [0040] 본 발명의 추가의 양상은 상기 이중특이적 항체를 포함하는 약학 조성물, 암 치료용 상기 약학 조성물, 암 치료용 약제의 제조를 위한 상기 이중특이적 항체의 용도, 치료를 필요로 하는 환자에게 상기 이중특이적 항체를 투여하는 것에 의하는 암 환자의 치료 방법이다.
- [0041] EGFR, 및 c-Met 는 수용체 크로스-토크 (cross-talk) 의 일부로서 인산화 및 하류 신호전달 캐스케이드의 활성화를 초래하므로, 그리고 종양 조직 세포 표면 상의 이들 수용체의 상향조절로 인해 (Bachleitner-Hofmann et al., Mol. Canc. Ther. (2009) 3499-3508), 본 발명에 따른 이중특이적 <ErbB-1-c-Met> 항체는 항종양 효능 및 암 세포 저해와 같은 값진 특성을 갖는다.
- [0042] 본 발명에 따른 항체는 매우 값진 특성, 예를 들어 그 중에서도, 수용체 ErbB1 및 c-Met 를 둘다 발현하는 암 세포의 성장 저해, 암 환자에게 유익을 야기하는 항종양 효능을 보인다. 본 발명에 따른 이중특이적 <ErbB1-c-Met> 항체는 수용체 ErbB1 및 c-Met 를 둘다 발현하는 암 세포 상에서 그들의 부모 단일특이적, 2가 <c-Met> 항체에 비해 감소된 c-Met 수용체의 내재화를 보인다.
- [0043] **발명의 상세한 설명**
- [0044] 본 발명의 첫번째 양상은 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 제 1 항원-결합 자리 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 제 2 항원-결합 자리를 포함하는 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체로서, OVCAR-8 세포 상에서 흐름 세포측정 검정으로 2 시간 후 측정되는 경우, 상기 이중특이적 항체의 부재 하에서의 c-Met 의 내재화에 비해 15 % 이하의 c-Met 의 내재화를 보이는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체이다.
- [0045] 따라서 본 발명은 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 제 1 항원-결합 자리 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 제 2 항원-결합 자리를 포함하는 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체로서, 흐름 세포측정 검정에 의해 1 시간의 OVCAR-8 세포-항체 인큐베이션 후 측정되는 경우, 항체의 부재 하에서의 OVCAR-8 세포 상에서의 c-Met 의 내재화에 비해 15 % 이하의 OVCAR-8 세포 상에서의 c-Met 의 내재화의 증가를 야기하는 이중특이적 항체를 지향한다.
- [0046] 하나의 구현예에서 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 제 1 항원-결합 자리 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 제 2 항원-결합 자리를 포함하는 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 상기 이중특이적 항체는 OVCAR-8 세포 상에서 흐름 세포측정 검정으로 2 시간 후 측정되는 경우, 상기 이중특이적 항체의 부재 하에서의 c-Met 의 내재화에 비해 10 % 이하의 c-Met 의 내재화를 보이는 것을 특징으로 한다.
- [0047] 하나의 구현예에서 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 제 1 항원-결합 자리 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 제 2 항원-결합 자리를 포함하는 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 상기 이중특이적 항체는 OVCAR-8 세포 상에서 흐름 세포측정 검정으로 2 시간 후 측정되는 경우, 상기 이중특이적 항체의 부재 하에서의 c-Met 의 내재화에 비해 7 % 이하의 c-Met 의 내재화를 보이는 것을 특징으로 한다.
- [0048] 하나의 구현예에서 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 제 1 항원-결합 자리 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 제 2 항원-결합 자리를 포함하는 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 상기 이중특이적 항체는 OVCAR-8 세포 상에서 흐름 세포측정 검정으로 2 시간 후 측정되는 경우, 상기 이중특이적 항체의 부재 하에서의 c-Met 의 내재화에 비해 5 % 이하의 c-Met 의 내재화를 보이는 것을 특징으로 한다.
- [0049] 용어 "c-Met 의 내재화" 는 항체의 부재 하에서의 c-Met 의 내재화와 비교되는 OVCAR-8 세포 (NCI Cell Line 명칭; NCI (National Cancer Institute) 로부터 구매 OVCAR-8-NCI; Schilder, R.J. et al., Int. J. Cancer 45 (1990) 416-422; Ikediobi, O.N. et al., Mol. Cancer. Ther. 5 (2006) 2606-2012; Lorenzi, P.L., et al., Mol. Cancer Ther. 8 (2009) 713-24) 상에서의 항체-유도성 c-Met 수용체 내재화를 언급한다. c-Met 수용체의 내재화는 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 의해 유도되고, 실시예 9 에서 기술된 바와 같이 흐름 세포측정 검정으로 (FACS) 2 시간 후 측정된다. 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 2 시간의 항체 노출 후 항체의 부재 하에서의 c-Met 의 내재화에 비해 OVCAR-8 세포 상에서 15 % 이하의 c-Met 의 내재화를 보인다. 하나의 구현예에서 상기 항체는 10 % 이하의 c-Met 의 내재화를 보인다. 하나의 구현예에서 상기 항체는 7 % 이하의 c-Met 의 내재화를 보인다. 하나의 구현예에서 상기 항체는 5 % 이하의 c-Met 의 내재화를 보인다.
- [0050] 본 발명의 또다른 양상은 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 제 1 항원-결합 자리 및 인간 c-Met 에 특이적으

로 결합하는 제 2 항원-결합 자리를 포함하는 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체로서, OVCAR-8 세포 상에서 흐름 세포측정 검정으로 2 시간 후 측정되는 경우, (상응하는) 단일특이적, 2가 부모 c-Met 항체에 의해 유도되는 c-Met 의 내재화에 비해 c-Met 의 내재화를 50 % 이상 (하나의 구현예에서 60 % 이상; 또다른 구현예에서 70 % 이상, 하나의 구현예에서 80 % 이상) 감소시키는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체이다. OVCAR-8 세포 상에서 흐름 세포측정 검정으로 2 시간 후 측정되는 % 내재화 값을 사용하고, 한편 0 미만의 % 내재화 값은 0% 내재화로 설정하고, 예를 들어 BsAB01 의 경우에 -14% 내재화는 0% 내재화로 설정하여, c-Met 의 내재화의 감소는 하기와 같이 계산된다: $100 \times (\% \text{ 단일특이적, 2가 부모 c-Met 항체에 의해 유도된 c-Met 의 내재화} - \% \text{ 이중특이적 ErbB-1/cMet 항체에 의해 유도된 c-Met 의 내재화}) / \% \text{ 단일특이적, 2가 부모 c-Met 항체에 의해 유도된 c-Met 의 내재화}$. 예를 들어, 이중특이적 ErbB-1/cMet 항체 BsAB01 은 -14 % 의 c-Met 의 내재화를 보이며 이는 0 % 로 설정되고, 단일특이적, 2가 부모 c-Met 항체 Mab 5D5 는 44 % 의 c-Met 의 내재화를 보인다. 따라서 이중특이적 ErbB-1/cMet 항체 BsAB01 은 $100 \times (40-0)/40 \% = 100 \%$ 의 c-Met 의 내재화의 감소를 보인다 (실시예 9 에서 OVCAR-8 세포 상에서 흐름 세포측정 검정으로 2 시간 후 측정된 내재화 값 참조).

[0051] 본원에서 사용되는, "항체" 는 항원-결합 자리를 포함하는 결합 단백질을 언급한다. 본원에서 사용되는 용어 "결합 자리" 또는 "항원-결합 자리" 는 리간드가 실제로 결합하는 항체 분자의 영역(들)을 의미하며 항체에서 유래된다. 용어 "항원-결합 자리" 는 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및/또는 항체 경쇄 가변 도메인 (VL), 또는 VH/VL 의 쌍을 포함하며, 전체 항체 또는 항체 단편 예컨대 단일쇄 Fv, VH 도메인 및/또는 VL 도메인, Fab, 또는 (Fab)₂ 에서 유래될 수 있다. 본 발명의 하나의 구현예에서 각각의 항원-결합 자리는 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및/또는 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 을 포함하고, 바람직하게는 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 으로 이루어지는 한 쌍에 의해 형성된다.

[0052] 항체 유래 항원-결합 자리에 더하여 예를 들어 [Matzke, A., et al., Cancer Res. 65 (14) (2005) 6105-10] 에 기술된 바와 같은 결합 펩티드도 항원 (예를 들어, c-Met) 에 특이적으로 결합할 수 있다. 따라서 본 발명의 추가의 양상은 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 항원-결합 자리 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 결합 펩티드를 포함하는 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 이중특이적 결합 분자이다. 따라서 본 발명의 추가의 양상은 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 항원-결합 자리 및 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 결합 펩티드를 포함하는 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 이중특이적 결합 분자이다.

[0053] ErbB-1 (ERBB1, 인간 표피 성장 인자 수용체, EGFR, HER-1 또는 조류 적혈모구 백혈병 바이러스 (v-erb-b) 중양유전자 상동체로도 알려짐; SEQ ID NO:16) 은 c-erbB 원종양유전자에 의해 인코딩되는 170 kDa 막횡단 수용체이며, 고유의 티로신 키나아제 활성을 나타낸다 (Modjtahedi, H., et al., Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235; Herbst, R.S., and Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611). EGFR 의 아이소형 및 변이체 (예를 들어, 대안적 RNA 전사물, 끝이 잘린 형태, 다형, 등) 가 또한 존재하며, 예를 들어 Swissprot 데이터베이스 엔트리 번호 P00533-1, P00533-2, P00533-3, 및 P00533-4 에 의해 확인되는 것들이 있으나 이에 제한되지 않는다. EGFR 은 리간드 예컨대 표피 성장 인자 (EGF), 전환 성장 α), 암피레굴린, 헤파린-결합 EGF (hb-EGF), 베타 셀룰린, 인자-α (TGF- 및 에피레굴린에 결합하는 것으로 알려져 있다 (Herbst, R.S., and Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611; Mendelsohn, J., and Baselga, J., Oncogene 19 (2000) 6550-6565). EGFR 은, 이에 제한되는 것은 아니나, 세포 증식, 분화, 세포 생존, 세포자멸사, 혈관생성, 유사분열유도, 및 전이를 제어하는 신호 전달 경로의 활성화를 포함하여, 티로신-키나아제 매개 신호 전달 경로를 통해 수많은 세포 과정을 조절한다 (Atalay, G., et al., Ann. Oncology 14 (2003) 1346-1363; Tsao, A.S., and Herbst, R.S., Signal 4 (2003) 4-9; Herbst, R.S., and Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611; Modjtahedi, H., et al., Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235).

[0054] 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 항원-결합 자리, 특히 중쇄 가변 도메인 (VH) 및/또는 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 은 a) 알려진 항-ErbB-1 항체 예컨대 예를 들어 IMC-C225 (세투시맙, Erbitux®; ImClone) (Herbst, R.S., and Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611), ABX-EGF (Abgenix) (Yang, X.D., et al., Crit. Rev. Oncol./Hematol. 38 (2001) 17-23), 인간화 ICR62 (WO 2006/082515) 또는 예를 들어 US 5,891,996, US 5,558,864 에 기술된 기타 항체로부터; 또는 b) 그 중에서도 인간 ErbB-1 단백질 또는 그의 핵산 또는 단편을 사용하는 새로운 면역화 방법에 의해 또는 파지 디스플레이에 의해 획득되는 신규한 항-ErbB-1 항체에서 유래될 수 있다.

- [0055] MET (중간엽-상피 전이 인자)는 단백질 MET (c-Met; 간세포 성장 인자 수용체 HGFR; HGF 수용체; 산란 인자 수용체; SF 수용체로도 알려짐; SEQ ID NO:15)를 인코딩하는 원종양유전자이다 (Dean, M., et al., Nature 318 (1985) 385-8; Chan, A.M., et al., Oncogene 1 (1987) 229-33; Bottaro, D.P., et al., Science 251 (1991) 802-4; Naldini, L., et al., EMBO J. 10 (1991) 2867-78; Maulik, G., et al., Cytokine Growth Factor Rev. 13 (2002) 41-59). MET는 배아 발달 및 상처 치유에 필수적인 막 수용체이다. 간세포 성장 인자 (HGF)는 MET 수용체의 유일하게 알려진 리간드이다. MET는 상피 기원의 세포에 의해 정상적으로 발현되는 한편, HGF는 중간엽 기원의 세포에 국한된다. HGF 자극시, MET는 침습적 성장으로 알려진 과정을 집합적으로 야기하는 여러 생물학적 반응들을 유도한다. 암에서 비정상적인 MET 활성화는 나쁜 예후와 연관되며, 비정상적으로 활성화된 MET는 종양 성장, 종양에 영양분을 공급하는 새로운 혈관의 형성 (혈관생성), 및 다른 기관으로의 암 전파 (전이)를 유발한다. MET는 간, 신장, 위, 유방, 및 뇌의 암을 비롯한 많은 유형의 인간 악성종양에서 탈조절된다. 정상적으로는, 줄기 세포 및 조상 세포만이 MET를 발현하며, MET는 이들 세포가 침습적으로 성장할 수 있게 하여 배아에서 새로운 조직을 생성하거나 성체에서 손상된 조직을 재생시킨다. 그러나, 암 줄기 세포는 정상적 줄기 세포가 MET를 발현하는 능력을 강탈하여, 암 존속 및 신체 내 다른 자리로의 전파의 원인이 되는 것으로 여겨진다.
- [0056] 인간 c-Met에 특이적으로 결합하는 항원-결합 자리, 특히 중쇄 가변 도메인 (VH) 및/또는 항체 경쇄 가변 도메인 (VL)은 a) 예를 들어 US 5,686,292, US 7,476,724, WO 2004/072117, WO 2004/108766, WO 2005/016382, WO 2005/063816, WO 2006/015371, WO 2006/104911, WO 2007/126799, 또는 WO 2009/007427에서 기술된 알려진 항-c-Met 항체에서 b) 예를 들어 그 중에서도 인간 항-c-Met 단백질 또는 그의 핵산 또는 단편을 사용하는 새로운 면역화 방법에 의해 또는 파지 디스플레이에 의해 획득되는 신규한 항-c-Met 항체에서 유래될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 추가의 양상은 하기를 특징으로 하는, 인간 ErbB-1에 특이적으로 결합하는 제 1 항원-결합 자리 및 인간 c-Met에 특이적으로 결합하는 제 2 항원-결합 자리를 포함하는 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체이다:
- [0058] i) ErbB-1에 특이적으로 결합하는 상기 제 1 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 1의 서열, 및 경쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 2의 서열을 포함하고;
- [0059] c-Met에 특이적으로 결합하는 상기 제 2 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 5의 서열, 및 경쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 6의 서열을 포함함; 또는
- [0060] ii) ErbB-1에 특이적으로 결합하는 상기 제 1 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 3의 서열, 및 경쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 4의 서열을 포함하고;
- [0061] c-Met에 특이적으로 결합하는 상기 제 2 항원-결합 자리는 중쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 5의 서열, 및 경쇄 가변 도메인으로서 SEQ ID NO: 6의 서열을 포함함.
- [0062] 항체 특이성은 항원의 특정 에피토프에 대한 항체의 선별적 인지를 언급한다. 예를 들어, 자연적 항체는 단일특이적이다. 본 발명에 따른 "이중특이적 항체"는 2개의 상이한 항원-결합 특이성을 갖는 항체이다. 항체가 하나 이상의 특이성을 갖는 경우, 인지되는 에피토프는 단일 항원 또는 하나 이상의 항원과 연관될 수 있다. 본 발명의 항체는 2개의 상이한 항원, 즉 제 1 항원으로서의 ErbB-1 및 제 2 항원으로서의 c-Met에 특이적이다.
- [0063] 본원에서 사용되는 용어 "단일특이적" 항체는 각각 동일한 항원의 동일한 에피토프에 결합하는 하나 이상의 결합 자리를 갖는 항체를 의미한다.
- [0064] 본 출원에서 사용되는 용어 "가"는 항체 분자 중 명시된 수의 결합 자리의 존재를 의미한다. 따라서, 용어 "2가", "4가", 및 "6가"는 각각 항체 분자 중 2개의 결합 자리, 4개의 결합 자리, 및 6개의 결합 자리의 존재를 의미한다. 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 "2가" 이상이고, "3가" 또는 "다가" (예를 들어, "4가" 또는 "6가")일 수 있다.
- [0065] 본 발명의 항체의 항원-결합 자리는 항원에 대한 결합 자리의 친화도에 다른 정도로 기여하는 6개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 함유할 수 있다. 3개의 중쇄 가변 도메인 CDR (CDRH1, CDRH2 및 CDRH3) 및 3개의 경쇄 가변 도메인 CDR (CDRL1, CDRL2 및 CDRL3)이 존재한다. CDR 및 골격 영역 (FR)의 범위는 이들 영역이 서열 중 변이성에 따라 규정된 아미노산 서열의 종합 데이터베이스와 비교함으로써 확인된다. 또한 본 발명의

범주에 포함되는 것은 더 적은 CDR 로 구성되는 (즉, 결합 특이성이 3, 4 또는 5 개의 CDR 로 결정되는) 기능적 항원 결합 자리이다. 예를 들어, 6 개의 CDR 의 하나의 완전한 세트 미만이 결합에 충분할 수 있다. 일부의 경우에, VH 또는 VL 도메인이 충분할 수 있다.

[0066] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체는 인간 기원의 하나 이상의 면역글로불린 클래스의 면역글로불린 불변 영역을 추가로 포함한다. 면역글로불린 클래스는 IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 아이소형 및, IgG 및 IgA 의 경우에, 그들의 서브유형을 포함한다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체는 IgG 유형 항체의 불변 도메인 구조를 갖지만, 4 개의 항원 결합 자리를 갖는다. 이는 예를 들어 c-Met 에 특이적으로 결합하는 1 개 (또는 2 개) 의 완전한 항원 결합 자리 (예를 들어, 단일쇄 Fab 단편 또는 단일쇄 Fv) 를 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 전체 항체의 N- 또는 C-말단 중 또는 경쇄에 연결시켜서 3가 이중특이적 항체 (또는 4가 이중특이적 항체) 를 산출함으로써 달성된다. 대안적으로 예를 들어 EP 07024867.9, EP 07024864.6, EP 07024865.3 또는 [Ridgway, J.B., Protein Eng. 9 (1996) 617-621]; WO 96/027011; [Merchant, A.M., et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681]; [Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35] 및 EP 1870459A1 에 기술된 바와 같이, IgG 예컨대 면역글로불린 불변 영역을 포함하는 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 대한 이중특이적, 2가 항체가 사용될 수 있다.

[0067] 본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조성물" 은 단일 아미노산 조성의 항체 분자의 제제를 언급한다.

[0068] 용어 "키메라 항체" 는 통상적으로 재조합 DNA 기술에 의해 제조되는, 하나의 공급원 또는 종으로부터의 가변 영역, 즉 결합 영역 및, 상이한 공급원 또는 종에서 유래된 불변 영역의 일부 이상을 포함하는 항체를 언급한다. 쥐와 가변 영역 및 인간 불변 영역을 포함하는 키메라 항체가 바람직하다. 본 발명에 포함되는 "키메라 항체" 의 다른 바람직한 형태는, 특히 C1q 결합 및/또는 Fc 수용체 (FcR) 결합에 관하여, 본 발명에 따른 특성을 생성하도록, 불변 영역이 원래의 항체로부터 개질 또는 변화된 것이다. 그러한 키메라 항체는 또한 "클래스-전환된 항체" 로도 언급된다. 키메라 항체는 면역글로불린 가변 영역을 인코딩하는 DNA 분절 및 면역글로불린 불변 영역을 인코딩하는 DNA 분절을 포함하는 발현된 면역글로불린 유전자의 산물이다. 키메라 항체의 제조 방법은 당업계에 잘 알려진 종래의 재조합 DNA 및 유전자 트랜스펙션 기술을 수반한다. 참조, 예를 들어, [Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855]; US 5,202,238 및 US 5,204,244.

[0069] 용어 "인간화 항체" 는 그 안의 골격 또는 "상보성 결정 영역" (CDR) 이 부모 면역글로불린과 비교할 때 상이한 특이성의 면역글로불린의 CDR 을 포함하도록 개질된 항체를 언급한다. 바람직한 구현예에서, 쥐와 CDR 이 인간 항체의 골격 영역에 이식되어 "인간화 항체" 를 제조한다. 참조, 예를 들어, [Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327]; 및 [Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270]. 특히 바람직한 CDR 은 키메라 항체에 대해 상이 언급된 항원을 인지하는 서열을 나타내는 것에 상응한다. 본 발명에 포함되는 "인간화 항체" 의 다른 형태는 특히 C1q 결합 및/또는 Fc 수용체 (FcR) 결합에 관하여, 본 발명에 따른 특성을 생성하도록, 불변 영역이 원래의 항체로부터 추가로 개질 또는 변화된 것이다.

[0070] 본원에서 사용되는 용어 "인간 항체" 는 인간 생식 계열 면역글로불린 서열에서 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 인간 항체는 당업계에 잘 알려져 있다 (van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). 인간 항체는 또한 면역화시 내인성 면역글로불린 생산의 부재 하에 인간 항체의 전체 목록 또는 선별물을 생성할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스) 에서 생산될 수 있다. 그러한 생식-계열 돌연변이체 마우스 중 인간 생식-계열 면역글로불린 유전자 배열의 전달은 항원 공격시 인간 항체의 생산을 초래할 수 있다 (참조, 예를 들어, Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40). 인간 항체는 또한 파지 디스플레이 라이브러리에서 생산될 수 있다 (Hoogenboom, H.R., and Winter, G.J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). 또한 Cole, S.P.C. 등 및 Boerner, P. 등의 기술이 인간 모노클로날 항체의 제조에 이용가능하다 (Cole, S.P.C., et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Liss, A.L., (1985) 77-96; 및 Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). 본 발명에 따른 키메라 및 인간화 항체에 대해 이미 언급된 바와 같이 본원에서 사용되는 용어 "인간 항체" 는 또한, 예를 들어 "클래스 전환" 즉 Fc 부분의 변화 또는 돌연변이 (예를 들어, IgG1 로부터 IgG4 로 및/또는 IgG1/IgG4 돌연변이) 에 의해, 특히 C1q 결합 및/또는 FcR 결합에 관하여 본 발명에 따른 특성을 생성하도록 불변 영역이 개질된 항체를

포함한다.

- [0071] 본원에서 사용되는 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 창출 또는 단리되는 모든 인간 항체, 예컨대 인간 면역글로불린 유전자에 대해 트랜스제닉인 동물 (예를 들어, 마우스)로부터 또는 숙주 세포 예컨대 NSO 또는 CHO 세포로부터 단리된 항체, 또는 숙주 세포에 트랜스펙션된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현되는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 그러한 재조합 인간 항체는 재배열된 형태의 가변 및 불변 영역을 갖는다. 본 발명에 따른 재조합 인간 항체는 생체내 체세포 초돌연변이에 적용되었다. 따라서, 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 인간 생식 계열 VH 및 VL 서열에서 유래하고 이와 관련되지만, 생체내의 인간 항체 생식 계열 목록 안에는 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.
- [0072] 본원에서 사용되는 "가변 도메인" (경쇄 (VL)의 가변 도메인, 중쇄 (VH)의 가변 영역)은 항체를 항원에 결합 시키는데 직접 관여하는 경 및 중쇄의 각각의 쌍을 의미한다. 가변 인간 경 및 중쇄의 도메인은 동일한 일반적 구조를 갖고, 각각의 도메인은 3 개의 "과가변 영역" (또는 상보성 결정 영역, CDR)에 의해 연결된, 서열이 광범위하게 보존된 4 개의 골격 (FR) 영역을 포함한다. 골격 영역은 β -병풍 구조를 취하고, CDR은 루프를 형성하여 β -병풍 구조를 연결할 수 있다. 각 사슬 내의 CDR은 골격 영역에 의해 3 차원 구조가 유지되고, 다른 사슬로부터의 CDR과 함께 항원 결합 자리를 형성한다. 항체 중 및 경쇄 CDR3 영역은 본 발명에 따른 항체의 결합 특이성/친화도에서 특히 중요한 역할을 하므로, 본 발명의 추가의 목적을 제공한다.
- [0073] 본원에서 사용되는 용어 "과가변 영역" 또는 "항체의 항원 결합 부분 또는 항원 결합 자리"는 항원-결합을 책임지는 항체의 아미노산 잔기를 언급한다. 과가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기를 포함한다. "골격" 또는 "FR" 영역은 본원에서 정의된 과가변 영역 잔기를 제외한 가변 도메인 영역이다. 그러므로, 항체의 경 및 중쇄는 N-에서 C-말단까지 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 포함한다. 각각의 사슬 상의 CDR은 그러한 골격 아미노산에 의해 분리된다. 특히, 중쇄의 CDR3은 항원 결합에 가장 많이 기여하는 영역이다. CDR 및 FR 영역은 [Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]의 표준 정의에 따라 결정된다.
- [0074] 본원에서 사용되는 용어 "결합" 또는 "특이적으로 결합"은 시험관내 검정에서, 바람직하게는 정제된 야생형 항원에 의한 플라스몬 공명 검정 (BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Sweden)에서 항원의 에피토프 (인간 ErbB-1 또는 인간 c-Met)에 대한 항체의 결합을 언급한다. 결합의 친화도는 용어 k_a (항체/항원 복합체로부터 항체의 연합에 대한 속도 상수), k_D (해리 상수), 및 K_D (k_D/k_a)에 의해 정의된다. 결합 또는 특이적 결합은 10^{-8} mol/l 이하, 바람직하게는 10^{-9} M 내지 10^{-13} mol/l의 결합 친화도 (K_D)를 의미한다. 따라서, 본 발명에 따른 이중특이적 <ErbB1-c-Met> 항체는 각각의 항원에 특이적으로 결합하고 항원에 대해 결합 친화도 (K_D) 10^{-8} mol/l 이하, 바람직하게는 10^{-9} M 내지 10^{-13} mol/l로 특이적이다.
- [0075] Fc γ RIII에 대한 항체의 결합은 BIAcore 검정 (GE-Healthcare Uppsala, Sweden)에 의해 조사될 수 있다. 결합의 친화도는 용어 k_a (항체/항원 복합체로부터 항체의 연합에 대한 속도 상수), k_D (해리 상수), 및 K_D (k_D/k_a)에 의해 정의된다.
- [0076] 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 폴리펩티드 결정인자를 포함한다. 특정 구현예에서, 에피토프 결정인자는 분자의 화학적 활성 표면기 예컨대 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴, 또는 술포닐을 포함하고, 특정 구현예에서, 특이적 3차원 구조 특성, 및 또는 특이적 전하 특성을 가질 수 있다. 에피토프는 항체에 의해 결합되는 항원의 영역이다.
- [0077] 특정 구현예에서, 항체가 단백질 및/또는 거대분자의 복합 혼합물 중 그것의 표적 항원을 우선적으로 인지하는 경우에 항체가 항원에 특이적으로 결합하는 것으로 여겨진다.
- [0078] 본 출원에서 사용되는 용어 "불변 영역"은 가변 영역을 제외한 항체의 도메인의 합을 의미한다. 불변 영역은 항원의 결합에 직접 관여하지는 않지만, 다양한 효과기 기능을 나타낸다. 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에 따라, 항체는 클래스 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 분류되고, 이중 다수는 서브클래스, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가로 분류될 수 있다. 항체의 상이한 클래스에 해당하는 중쇄 불변 영역은 각각 α , δ , ϵ , γ , 및 μ 로 호칭된다. 모든 5 개의 항체 클래스에서 발견될 수 있는 경쇄 불변 영역은 κ (갑파) 및 λ (람다)로 호칭된다. 불변 영역은 바람직하게는 인간 기원에서 유래된다.

- [0079] 본 출원에서 사용되는 용어 "인간 기원에서 유래된 불변 영역" 은 서브클래스 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 의 인간 항체의 불변 중쇄 영역 및/또는 불변 경쇄 캡과 또는 램다 영역을 의미한다. 그러한 불변 영역은 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어 Kabat, E.A. 에 의해 기술되어 있다 (참조, 예를 들어 Johnson, G. and Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2785-2788).
- [0080] 하나의 구현예에서 본 발명에 따른 이종특이적 항체는 바람직하게는 인간 기원에서 유래된 IgG1 또는 IgG3 서브클래스의 (바람직하게는 IgG1 서브클래스의) 불변 영역을 포함한다. 하나의 구현예에서 본 발명에 따른 이종특이적 항체는 바람직하게는 인간 기원에서 유래된 IgG1 또는 IgG3 서브클래스의 (바람직하게는 IgG1 서브클래스의) Fc 부분을 포함한다.
- [0081] IgG4 서브클래스의 항체는 감소된 Fc 수용체 (FcγRIIIa) 결합을 보이는 한편, 다른 IgG 서브클래스의 항체는 강한 결합을 보인다. 그러나 Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (Fc 탄수화물의 상실), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434, 및 His435 는, 변경되는 경우, 또한 감소된 Fc 수용체 결합을 제공하는 잔기이다 (Shields, R.L., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., *FASEB J.* 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324; EP 0 307 434).
- [0082] 하나의 구현예에서 본 발명에 따른 항체는 IgG1 항체에 비해 감소된 FcR 결합을 갖고, 전장 부모 항체는 PVA236 돌연변이를 함유하고/거나, S228, L234, L235 및/또는 D265 에서 돌연변이가 있는 IgG1 또는 IgG2 서브클래스의 또는 IgG4 서브클래스의 FcR 결합에 관한 것이다. 하나의 구현예에서 전장 부모 항체 내의 돌연변이는 S228P, L234A, L235A, L235E 및/또는 PVA236 이다. 또다른 구현예에서 전장 부모 항체 내의 돌연변이는 IgG4 S228P 내에 및 IgG1 L234A 및 L235A 내에 있다.
- [0083] 항체의 불변 영역은 ADCC (항체-의존적 세포-매개 세포독성) 및 CDC (보체-의존적 세포독성) 에 직접 관여한다. 보체 활성화 (CDC) 는 대부분의 IgG 항체 서브클래스의 불변 영역에 대한 보체 인자 C1q 의 결합에 의해 개시된다. 항체에 대한 C1q 의 결합은 소위 결합 자리에서의 규정된 단백질-단백질 상호작용에 의해 야기된다. 그러한 불변 영역 결합 자리는 당업계에 알려져 있고, 예를 들어 [Lukas, T., J., et al., *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560]; [Brunhouse, R., and Cebra, J., J., *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917]; [Burton, D., R., et al., *Nature* 288 (1980) 338-344]; [Thommesen, J., E., et al., *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004]; [Idusogie, E., E., et al., *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184]; [Hezareh, M., et al., *J. Virol.* 75 (2001) 12161-12168]; [Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324]; 및 EP 0 307 434 에 기술되어 있다. 그러한 불변 영역 결합 자리는, 예를 들어, 아미노산 L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, 및 P329 (Kabat 의 EU 인덱스에 따라 넘버링함) 에 의해 특징화된다.
- [0084] 용어 "항체-의존적 세포 세포독성 (ADCC)" 은 효과기 세포의 존재 하에 본 발명에 따른 항체에 의한 인간 표적 세포의 용해를 언급한다. ADCC 는 바람직하게는 효과기 세포 예컨대 새롭게 단리된 PBMC 또는 연막으로부터 정제된 효과기 세포, 예컨대 단핵구 또는 자연 살해 (NK) 세포 또는 영구적으로 성장하는 NK 세포주의 존재 하에 Erb-1 및 c-Met 발현 세포의 제제를 본 발명에 따른 항체로 처리함으로써 측정된다.
- [0085] 용어 "보체-의존적 세포독성 (CDC)" 은 대부분의 IgG 항체 서브클래스의 Fc 부분에 대한 보체 인자 C1q 의 결합에 의해 개시되는 과정이다. 항체에 대한 C1q 의 결합은 소위 결합 자리에서 규정된 단백질-단백질 상호작용에 의해 야기된다. 그러한 Fc 부분 결합 자리는 당업계에 알려져 있다 (상기 참조). 그러한 Fc 부분 결합 자리는, 예를 들어, 아미노산 L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, 및 P329 (Kabat 의 EU 인덱스에 따라 넘버링함) 에 의해 특징화된다. 서브클래스 IgG1, IgG2, 및 IgG3 의 항체는 통상적으로 C1q 및 C3 결합을 포함하는 보체 활성화를 보이는 반면, IgG4 는 보체계를 활성화시키지 않고 C1q 및/또는 C3 에 결합하지 않는다.
- [0086] 모노클로날 항체의 세포-매개 효과기 기능은 [Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180], 및 US 6,602,684 에 기술된 바와 같이 그의 올리고당 성분을 조작함으로써 증강될 수 있다. 가장 흔히 사용되는 치료적 항체인 IgG1 유형 항체는 각각의 CH2 도메인 내에 Asn297 에서 보존된 N-연결된 글리코실화 자리를 갖는 당단백질이다. Asn297 에 부착된 2 개의 복합 이중안테나 (biantennary) 올리고당은 CH2 도메인 사이에 포함되어 있고, 폴리펩티드 백본과 광범위한 접촉을 이루고, 이의 존재는 항체가 효과기 기능 예컨대 항체 의존적 세포 세포독성 (ADCC) 을 매개하는데 필수적이다 (Lifely, M.R., et al., *Glycobiology* 5 (1995) 813-822; Jefferis, R., et al., *Immunol. Rev.* 163 (1998) 59-76; Wright, A., and Morrison, S.L., *Trends*

Biotechnol. 15 (1997) 26-32). [Umana, P., et al. Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180] 및 WO 99/54342 는 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 이등분된 올리고당의 형성을 촉매하는 글리코실트랜스퍼라아제인 $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 III ("GnTIII") 의 과발현이 시험관내에서 항체의 ADCC 활성을 상당히 증가시킴을 밝혔다. Asn297 탄수화물의 조성의 변경 또는 이의 제거가 또한 Fc γ R 및 C1q 에 대한 결합에 영향을 미친다 (Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; Davies, J., et al., Biotechnol. Bioeng. 74 (2001) 288-294; Mimura, Y., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 45539-45547; Radaev, S., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 16478-16483; Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 277 (2002) 26733-26740; Simmons, L.C., et al., J. Immunol. Methods 263 (2002) 133-147).

[0087] 푸코오스의 양을 감소시킴으로써 모노클로날 항체의 세포-매개 효과기 기능을 증강시키는 방법은 예를 들어 WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO 2004/065540, WO 2005/011735, WO 2005/027966, WO 1997/028267, US 2006/0134709, US 2005/0054048, US 2005/0152894, WO 2003/035835, WO 2000/061739, [Niwa, R., et al., J. Immunol. Methods 306 (2005) 151-160; Shinkawa, T., et al., J Biol Chem, 278 (2003) 3466-3473]; WO 03/055993 또는 US 2005/0249722 에 기술되어 있다.

[0088] 본 발명의 하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 이종특이적 항체는 Asn297 에서 당쇄로 글리코실화되어 (IgG1 또는 IgG3 서브클래스) 상기 당쇄 내의 푸코오스의 양이 65 % 이하가 된다 (Kabat 에 따라 넘버링함). 또다른 구현예에서 상기 당쇄 내의 푸코오스의 양은 5 % 내지 65 %, 바람직하게는 20 % 내지 40 % 이다. 본 발명에 따른 "Asn297" 은 Fc 영역 내의 위치 297 근처에 위치하는 아미노산 아스파라긴을 의미한다. 항체의 작은 서열 변이에 기초하여, Asn297 은 또한 위치 297 의 몇몇 아미노산 (통상적으로 ± 3 이하) 상류 또는 하류에, 즉 위치 294 와 300 사이 위치할 수 있다.

[0089] 인간 IgG1 또는 IgG3 의 글리코실화는 Asn297 에서 2 개 이하의 Gal 잔기로 끝나는 핵심 푸코실화된 이중안테나 복합 올리고당 글리코실화로서 일어날 수 있다. IgG1 또는 IgG3 서브클래스의 인간 불변 중쇄 영역이 [Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)], 및 [Bruggemann, M., et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361; Love, T.W., et al., Methods Enzymol. 178 (1989) 515-527] 에 의해 상세히 보고되어 있다. 이들 구조는 말단 Gal 잔기의 양에 따라 G0, G1 (α -1,6- 또는 α -1,3-), 또는 G2 글리칸 잔기로 표시된다 (Raju, T.S., Bioprocess Int. 1 (2003) 44-53). 항체 Fc 부분의 CHO 유형 글리코실화가 예를 들어 [Routier, F.H., Glycoconjugate J. 14 (1997) 201-207] 에 의해 기술되어 있다. 비-당개질된 CHO 숙주 세포에서 재조합적으로 발현되는 항체는 통상적으로 Asn297 에서 85 % 이상의 양으로 푸코실화된다. 전장 부모 항체의 개질된 올리고당은 하이브리드 또는 복합일 수 있다. 바람직하게는 이등분된, 환원된/비-푸코실화된 올리고당은 하이브리드이다. 또다른 구현예에서, 이등분된, 환원된/비-푸코실화된 올리고당은 복합이다.

[0090] 본 발명에 따르면 "푸코오스의 양" 은 MALDI-TOF 질량 분석법에 의해 측정되고 평균 값으로서 계산되는, Asn297 에 부착된 모든 당구조의 합 (예를 들어, 복합, 하이브리드 및 고 만노오스 구조) 과 관련되는, Asn297 에서 당쇄 내의 상기 당의 양을 의미한다. 푸코오스의 상대적 양은 MALDI-TOF 에 의해 N-글리코시다아제 F 처리된 샘플에서 동정되는 모든 당구조 (예를 들어, 각각, 복합, 하이브리드 및 올리고- 및 고-만노오스 구조) 와 관련되는 푸코오스-함유 구조의 백분율이다 (참조, 예를 들어, WO 2008/077546(A1)).

[0091] 하나의 구현예는 WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO2007/031875, [Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180], WO 99/154342, WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO 2005/011735, WO 2005/027966, WO 97/028267, US 2006/0134709, US 2005/0054048, US 2005/0152894, WO 2003/035835 또는 WO 2000/061739 에 기술된 절차를 사용하는, Asn297 에서 당쇄로 글리코실화되어 상기 당쇄 내의 푸코오스의 양이 65 % 이하인 IgG1 또는 IgG3 서브클래스의 이종특이적 항체의 제조 방법이다.

[0092] 하나의 구현예는 [Niwa, R., et al., J. Immunol. Methods 306 (2005) 151-160; Shinkawa, T. et al, J Biol Chem, 278 (2003) 3466-3473]; WO 03/055993 또는 US 2005/0249722 에 기술된 절차를 사용하는, Asn297 에서 당쇄로 글리코실화되어 상기 당쇄 내의 푸코오스의 양이 65 % 이하인 IgG1 또는 IgG3 서브클래스의 이종특이적 항체의 제조 방법이다.

[0093] **이종특이적 항체 포맷**

- [0094] 본 발명의 항체는 2 이상의 결합 자리를 갖고, 다중특이적, 바람직하게는 이중특이적이다. 즉, 2 초과와 결합 자리가 존재하는 (즉, 항체가 3가 또는 다가인) 경우에도 항체는 이중특이적일 수 있다. 본 발명의 이중특이적 항체는, 예를 들어, 다가 단일쇄 항체, 다이아바디 및 트리아바디 뿐만 아니라, 추가의 항원-결합 자리 (예를 들어, 단일쇄 Fv, VH 도메인 및/또는 VL 도메인, Fab, 또는 (Fab)₂,) 가 하나 이상의 캡트드-링커를 통해 연결되어 있는 전장 항체의 불변 도메인 구조를 갖는 항체를 포함한다. 항체는 단일 종으로부터의 전장이거나, 키메라화 또는 인간화될 수 있다. 2 초과와 항원 결합 자리를 갖는 항체의 경우, 단백질이 2 가지 상이한 항원에 대한 결합 자리를 갖는 한, 일부 결합 자리는 동일할 수 있다. 즉, 제 1 결합 자리는 ErbB-1 에 특이적인 반면, 제 2 결합 자리는 c-Met 에 특이적이고, 그 반대도 마찬가지이다.
- [0095] 바람직한 구현예에서 본 발명에 따른 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체는 (바람직하게는 IgG1 또는 IgG3 서브클래스의) 항체의 Fc 영역을 포함한다.
- [0096] **2가 이중특이적 포맷**
- [0097] 예를 들어 WO2009/080251, WO2009/080252, WO2009/080253 또는 [Ridgway, J.B., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; WO 96/027011]; [Merchant, A.M., et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681]; [Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35] 및 EP 1870459A1 에 기술된 바와 같이 번역글로불린 불변 영역을 포함하는 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 대한 이중특이적, 2가 항체가 사용될 수 있다.
- [0098] 따라서 본 발명의 하나의 구현예에서 본 발명에 따른 이중특이적 <ErbB-1-c-Met> 항체는 하기를 포함하는 2가, 이중특이적 항체이다:
- [0099] a) ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 전장 항체의 경쇄 및 중쇄; 및
- [0100] b) 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 전장 항체의 경쇄 및 중쇄,
- [0101] 상기 불변 도메인 CL 및 CH1, 및/또는 가변 도메인 VL 및 VH 는 서로 대체됨.
- [0102] 본 발명의 또다른 구현예에서 본 발명에 따른 이중특이적 <ErbB-1-c-Met> 항체는 하기를 포함하는 2가, 이중특이적 항체이다:
- [0103] a) 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 전장 항체의 경쇄 및 중쇄; 및
- [0104] b) ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 전장 항체의 경쇄 및 중쇄,
- [0105] 상기 불변 도메인 CL 및 CH1, 및/또는 가변 도메인 VL 및 VH 는 서로 대체됨.
- [0106] 하기 "놉-인투-홀 (Knob-into-holes)" 기술에 의한 예시적 도해적 구조에 대해 도 2a-c 참조.
- [0107] 그러한 이중이합체 2가, 이중특이적 항-ErbB-1/항-c-Met 항체의 수율을 향상시키기 위해, 예를 들어 WO 96/027011, [Ridgway, J., B., et al., Protein Eng 9 (1996) 617-621]; 및 [Merchant, A., M., et al., Nat Biotechnol 16 (1998) 677-681] 에서 여러 실시예로 상세히 기술되어 있는 놉-인투-홀 기술에 의해 상기 전장 항체의 CH3 도메인이 변경될 수 있다. 이러한 방법에서 2 개의 CH3 도메인의 상호작용 표면이 변경되어 이들 2 개의 CH3 도메인을 함유하는 2 개의 중쇄의 이중이합체화를 증가시킨다. (2 개의 중쇄의) 2 개의 CH3 도메인 중 하나는 "놉" 일 수 있고, 한편 다른 하나는 "홀" 이다. 이항 다리의 도입은 이중이합체를 안정화시키고 (Merchant, A., M., et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35), 수율을 증가시킨다.
- [0108] 따라서 본 발명의 하나의 양상에서 상기 2가, 이중특이적 항체는 추가로 하기에 의해 특징화된다:
- [0109] 하나의 중쇄의 CH3 도메인 및 다른 중쇄의 CH3 도메인은 각각 항체 CH3 도메인들 사이의 원래의 경계면을 포함하는 경계면에서 만나고;
- [0110] 상기 상기 경계면은 2가, 이중특이적 항체의 형성을 촉진하도록 변경되고, 상기 변경은 하기로 특징화되고:
- [0111] a) 하나의 중쇄의 CH3 도메인이 변경되어,
- [0112] 2가, 이중특이적 항체 내의 다른 중쇄의 CH3 도메인의 원래의 경계면과 만나는 하나의 중쇄의 CH3 도메인의 원래의 경계면 내에서,
- [0113] 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체되어, 하나의 중쇄의 CH3 도메인의 경계면 내에

다른 중쇄의 CH3 도메인의 경계면 내의 공동에 위치가능한 돌기를 생성하고,

- [0114] b) 다른 중쇄의 CH3 도메인이 변경되어,
- [0115] 2가, 이중특이적 항체 내에서 제 1 CH3 도메인의 원래의 경계면과 만나는 제 2 CH3 도메인의 원래의 경계면 내에서
- [0116] 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체되어, 제 2 CH3 도메인의 경계면 내에 제 1 CH3 도메인의 경계면 내의 돌기가 위치가능한 공동을 생성함.
- [0117] 바람직하게는 더 큰 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 아르기닌 (R), 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W) 으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0118] 바람직하게는 더 작은 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 알라닌 (A), 세린 (S), 트레오닌 (T), 발린 (V) 으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0119] 본 발명의 하나의 양상에서 2 개의 CH3 도메인 사이에 이황 다리가 형성될 수 있도록 2 개의 CH3 도메인은 각각의 CH3 도메인의 상응하는 위치에서 아미노산으로서 시스테인 (C) 의 도입에 의해 추가로 변경된다.
- [0120] 바람직한 구현예에서, 상기 2가, 이중특이적 항체는 "늑 사슬" 의 CH3 도메인 내에 T366W 돌연변이 및 "홀 사슬" 의 CH3 도메인 내에 T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함한다. 예를 들어 "늑 사슬" 의 CH3 도메인 내로 Y349C 돌연변이를 그리고 "홀 사슬" 의 CH3 도메인 내로 E356C 돌연변이 또는 S354C 돌연변이를 도입함으로써 CH3 도메인 사이에 부가적인 사슬간 이황 다리가 또한 사용될 수 있다 (Merchant, A.M, et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681). 따라서 또다른 바람직한 구현예에서, 상기 2가, 이중특이적 항체는 2 개의 CH3 도메인 중 하나 내에 Y349C, T366W 돌연변이 및 2 개의 CH3 도메인 중 다른 하나 내에 E356C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함하거나, 상기 2가, 이중특이적 항체는 2 개의 CH3 도메인 중 하나 내에 Y349C, T366W 돌연변이 및 2 개의 CH3 도메인 중 다른 하나 내에 S354C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함한다 (하나의 CH3 도메인 내의 부가적 Y349C 돌연변이 및 다른 CH3 도메인 내의 부가적 E356C 또는 S354C 돌연변이가 사슬간 이황 다리를 형성함) (항상 Kabat 의 EU 인덱스에 따라 넘버링함). 그러나 또한 EP 1870459A1 에 의해 기술된 바와 같은 다른 늑-인-홀 기술이 대안적으로 또는 부가적으로 사용될 수 있다. 상기 2가, 이중특이적 항체에 대한 바람직한 예는 R409D; "늑 사슬" 의 CH3 도메인 내의 K370E 돌연변이 및 D399K; "홀 사슬" 의 CH3 도메인 내의 E357K 돌연변이이다 (항상 Kabat 의 EU 인덱스에 따라 넘버링함).
- [0121] 또다른 바람직한 구현예에서 상기 2가, 이중특이적 항체는 "늑 사슬" 의 CH3 도메인 내에 T366W 돌연변이 및 "홀 사슬" 의 CH3 도메인 내에 T366S, L368A, Y407V 돌연변이 및 부가적으로 R409D; "늑 사슬" 의 CH3 도메인 내에 K370E 돌연변이 및 D399K; "홀 사슬" 의 CH3 도메인 내에 E357K 돌연변이를 포함한다.
- [0122] 또다른 바람직한 구현예에서 상기 2가, 이중특이적 항체는 2 개의 CH3 도메인 중 하나 내에 Y349C, T366W 돌연변이 및 2 개의 CH3 도메인 중 다른 하나 내에 S354C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함하거나, 상기 2가, 이중특이적 항체는 2 개의 CH3 도메인 중 하나 내에 Y349C, T366W 돌연변이 및 2 개의 CH3 도메인 중 다른 하나 내에 S354C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이 및 부가적으로 R409D; "늑 사슬" 의 CH3 도메인 내에 K370E 돌연변이 및 D399K; "홀 사슬" 의 CH3 도메인 내에 E357K 돌연변이를 포함한다.
- [0123] **3가 이중특이적 포맷**
- [0124] 본 발명의 또다른 바람직한 양상은 하기를 포함하는 3가, 이중특이적 항체이다:
- [0125] a) 2 개의 항체 중쇄 및 2 개의 항체 경쇄로 이루어지는 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 전장 항체; 및
- [0126] b) 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 1 개의 단일쇄 Fab 단편,
- [0127] 상기 b) 에서의 상기 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 중 또는 경쇄의 C- 또는 N- 말단에서 펩티드 연결기를 통해 a) 에서의 상기 전장 항체에 융합됨.
- [0128] 하기 "늑-인투-홀" 기술에 의한 예시적 도해적 구조에 대해 도 5a 참조.
- [0129] 본 발명의 또다른 바람직한 양상은 하기를 포함하는 3가, 이중특이적 항체이다:
- [0130] a) 2 개의 항체 중쇄 및 2 개의 항체 경쇄로 이루어지는 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 전장 항체; 및
- [0131] b) 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 1 개의 단일쇄 Fv 단편,

- [0132] 여기서 b) 에서의 상기 단일쇄 Fv 단편은 상기 전장 항체의 중 또는 경쇄의 C- 또는 N- 말단에서 펩티드 연결기를 통해 a) 에서의 상기 전장 항체에 융합됨.
- [0133] 하기 "늑-인트루-홀" 기술에 의한 예시적 도해적 구조에 대해 도 5b 참조.
- [0134] 하나의 바람직한 구현예에서 인간 c-Met 에 결합하는 상기 단일쇄 Fab 또는 Fv 단편은 상기 전장 항체의 중쇄의 C-말단에서 펩티드 연결기를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.
- [0135] 본 발명의 또다른 바람직한 양상은 하기를 포함하는 3가, 이중특이적 항체이다:
- [0136] a) 2 개의 항체 중쇄 및 2 개의 항체 경쇄로 이루어지는 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 전장 항체;
- [0137] b) 하기로 이루어지는 폴리펩티드
- [0138] ba) 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 또는
- [0139] bb) 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 항체 불변 도메인 1 (CH1),
- [0140] 상기 상기 폴리펩티드는 VH 도메인의 N-말단이 상기 전장 항체의 2 개의 중쇄 중 하나의 C-말단에 펩티드 연결기를 통해 융합됨;
- [0141] c) 하기로 이루어지는 폴리펩티드
- [0142] ca) 항체 경쇄 가변 도메인 (VL), 또는
- [0143] cb) 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인 (CL);
- [0144] 여기서 상기 폴리펩티드는 VL 도메인의 N-말단이 펩티드 연결기를 통해 상기 전장 항체의 2 개의 중쇄 중 다른 하나의 C-말단에 융합됨;
- [0145] 여기서 b) 에서의 폴리펩티드의 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 c) 에서의 폴리펩티드의 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 은 함께 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 항원-결합 자리를 형성함.
- [0146] 바람직하게는 b) 및 c) 에서의 상기 펩티드 연결기는 동일하고, 25 개 이상의 아미노산, 바람직하게는 30 내지 50 개의 아미노산의 펩티드이다.
- [0147] 예시적 도해적 구조에 대해 도 3a-c 참조.
- [0148] 임의로 b) 에서의 폴리펩티드의 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 c) 에서의 폴리펩티드의 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 은 하기 위치 사이에 이황 결합의 도입에 의해 사슬간 이황 다리를 통해 연결되고 안정화된다:
- [0149] i) 중쇄 가변 도메인 위치 44 와 경쇄 가변 도메인 위치 100 사이,
- [0150] ii) 중쇄 가변 도메인 위치 105 와 경쇄 가변 도메인 위치 43 사이, 또는
- [0151] iii) 중쇄 가변 도메인 위치 101 과 경쇄 가변 도메인 위치 100 사이 (항상 Kabat 의 EU 인덱스에 따라 넘버링 함).
- [0152] 안정화를 위한 비자연적 이황 다리를 도입하는 기술은 예를 들어 WO 94/029350, [Rajagopal, et al., Prot. Engin. 10 (1997) 1453-59; Kobayashi, H., et al., Nuclear Medicine & Biology 25 (1998) 387-393]; 또는 [Schmidt, M., et al., Oncogene 18 (1999) 1711-1721] 에 기술되어 있다. 하나의 구현예에서 b) 및 c) 에서의 폴리펩티드의 가변 도메인 사이의 임의적 이황 결합은 중쇄 가변 도메인 위치 44 와 경쇄 가변 도메인 위치 100 사이이다. 하나의 구현예에서 b) 및 c) 에서의 폴리펩티드의 가변 도메인 사이의 임의적 이황 결합은 중쇄 가변 도메인 위치 105 와 경쇄 가변 도메인 위치 43 사이이다 (항상 Kabat 의 EU 인덱스에 따라 넘버링 함). 하나의 구현예에서 단일쇄 Fab 단편의 가변 도메인 VH 와 VL 사이에 상기 임의적 이황 안정화가 없는 3가, 이중특이적 항체가 바람직하다.
- [0153] 단일쇄 Fab, Fv 단편의 중쇄 중 하나로의 융합에 의해 (도 5a 또는 5b) 또는 상이한 폴리펩티드의 전장 항체의 2 개의 중쇄로의 융합에 의해 (도 3a-c) 이중이합체, 3가 이중특이적 항체가 생성된다. 그러한 이중이합체 3가, 이중특이적 항-ErbB-1/항-c-Met 항체의 수율을 향상시키기 위해, 예를 들어 WO 96/027011, [Ridgway, J.B., et al., Protein Eng 9 (1996) 617-621]; 및 [Merchant, A.M., et al., Nat Biotechnol 16 (1998) 677-681] 에서 여러 실시예로 상세히 기술되어 있는 "늑-인트루-홀" 기술에 의해 상기 전장 항체의 CH3 도메인이 변경 될 수 있다. 이러한 방법에서 2 개의 CH3 도메인의 상호작용 표면이 변경되어 이들 2 개의 CH3 도메인을 함

유하는 2 개의 중쇄의 이중이합체화를 증가시킨다. (2 개의 중쇄의) 2 개의 CH3 도메인 각각은 "늪" 일 수 있고, 한편 다른 하나는 "홀" 이다. 이황 다리의 도입은 이중이합체를 안정화시키고 (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al. J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35), 수율을 증가시킨다.

- [0154] 따라서 본 발명의 하나의 양상에서 상기 3가, 이중특이적 항체는 추가로 하기를 특징으로 한다:
- [0155] 전장 항체의 하나의 중쇄의 CH3 도메인 및 전장 항체의 다른 중쇄의 CH3 도메인은 각각 항체 CH3 도메인 사이의 원래의 경계면을 포함하는 경계면에서 만나고;
- [0156] 상기 경계면은 2가, 이중특이적 항체의 형성을 촉진하도록 변경되고, 상기 변경은 하기를 특징으로 하고:
- [0157] a) 하나의 중쇄의 CH3 도메인이 변경되어,
- [0158] 2가, 이중특이적 항체 내의 다른 중쇄의 CH3 도메인의 원래의 경계면과 만나는 하나의 중쇄의 CH3 도메인의 원래의 경계면 내에서,
- [0159] 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체되어, 하나의 중쇄의 CH3 도메인 내에 다른 중쇄의 CH3 도메인의 경계면 내의 공동에 위치가능한 돌기를 생성하고
- [0160] b) 다른 중쇄의 CH3 도메인이 변경되어,
- [0161] 3가, 이중특이적 항체 내의 제 1 CH3 도메인의 원래의 경계면과 만나는 제 2 CH3 도메인의 원래의 경계면 내에서
- [0162] 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체되어, 제 2 CH3 도메인의 경계면 내에 제 1 CH3 도메인의 경계면 내의 돌기가 위치가능한 공동을 생성함.
- [0163] 바람직하게는, 더 큰 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 아르기닌 (R), 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W) 으로 이루어지는 군에서 선택된다.
- [0164] 바람직하게는, 더 작은 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 알라닌 (A), 세린 (S), 트레오닌 (T), 발린 (V) 으로 이루어지는 군에서 선택된다.
- [0165] 본 발명의 하나의 양상에서 2 개의 CH3 도메인은 두 CH3 도메인 사이에 이황 다리가 형성될 수 있도록 각각의 CH3 도메인의 상응하는 위치에서 시스테인 (C) 을 아미노산으로서 도입함으로써 추가로 변경된다.
- [0166] 바람직한 구현예에서, 상기 3가, 이중특이적 항체는 "늪 사슬" 의 CH3 도메인 내에 T366W 돌연변이, 및 "홀 사슬" 의 CH3 도메인 내에 T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함한다. 예를 들어 "늪 사슬" 의 CH3 도메인 내로 Y349C 돌연변이를, "홀 사슬" 의 CH3 도메인 내로 E356C 돌연변이 또는 S354C 돌연변이를 도입함으로써 CH3 도메인 사이의 추가적인 사슬간 이황 다리를 또한 사용할 수 있다 (Merchant, A.M, et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681). 따라서 또다른 바람직한 구현예에서, 상기 3가, 이중특이적 항체는 2 개의 CH3 도메인 중 하나 내에 Y349C, T366W 돌연변이, 2 개의 CH3 도메인 중 다른 하나 내에 E356C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함하거나, 상기 3가, 이중특이적 항체는 2 개의 CH3 도메인 중 하나 내에 Y349C, T366W 돌연변이, 2 개의 CH3 도메인 중 다른 하나 내에 S354C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함한다 (하나의 CH3 도메인 내의 추가적인 Y349C 돌연변이 및 다른 CH3 도메인 내의 추가적인 E356C 또는 S354C 돌연변이는 사슬간 이황 다리를 형성함) (항상 Kabat 의 EU 인덱스에 따라 넘버링함). 그러나, EP 1870459A1 에 의해 기재된 바와 같은 다른 늪-인-홀 기술이 대안적으로 또는 추가적으로 사용될 수 있다. 상기 3가, 이중특이적 항체에 대한 바람직한 예는 R409D; "늪 사슬" 의 CH3 도메인 내의 K370E 돌연변이 및 D399K; "홀 사슬" 의 CH3 도메인 내의 E357K 돌연변이이다 (항상 Kabat 의 EU 인덱스에 따라 넘버링함).
- [0167] 또다른 바람직한 구현예에서 상기 3가, 이중특이적 항체는 "늪 사슬" 의 CH3 도메인 내에 T366W 돌연변이, "홀 사슬" 의 CH3 도메인 내에 T366S, L368A, Y407V 돌연변이, 및 추가적으로 R409D; "늪 사슬" 의 CH3 도메인 내에 K370E 돌연변이 및 D399K; "홀 사슬" 의 CH3 도메인 내에 E357K 돌연변이를 포함한다.
- [0168] 또다른 바람직한 구현예에서 상기 3가, 이중특이적 항체는 2 개의 CH3 도메인 중 하나 내에 Y349C, T366W 돌연변이, 및 2 개의 CH3 도메인 중 다른 하나 내에 S354C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함하거나, 상기 3가, 이중특이적 항체는 2 개의 CH3 도메인 중 하나 내에 Y349C, T366W 돌연변이, 및 2 개의 CH3 도메인 중 다른 하나 내에 S354C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이, 및 추가적으로 R409D; "늪 사슬" 의 CH3 도메인 내에

K370E 돌연변이 및 D399K; "홀 사슬" 의 CH3 도메인 내에 E357K 돌연변이를 포함한다.

[0169] 본 발명의 또다른 구현예는 하기를 포함하는 3가, 이중특이적 항체이다:

[0170] a) 하기로 이루어지는, 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 전장 항체:

[0171] aa) N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 항체 불변 중쇄 도메인 1 (CH1), 항체 힌지 영역 (HR), 항체 중쇄 불변 도메인 2 (CH2) 및 항체 중쇄 불변 도메인 3 (CH3) 으로 이루어지는 2 개의 항체 중쇄; 및

[0172] ab) N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인 (CL) (VL-CL) 으로 이루어지는 2 개의 항체 경쇄; 및

[0173] b) 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 하나의 단일쇄 Fab 단편,

[0174] 상기 단일쇄 Fab 단편은 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 항체 불변 도메인 1 (CH1), 항체 경쇄 가변 도메인 (VL), 항체 경쇄 불변 도메인 (CL) 및 링커로 이루어지며, 상기 항체 도메인 및 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 하기 순서 중 하나를 가짐:

[0175] ba) VH-CH1-링커-VL-CL, 또는 bb) VL-CL-링커-VH-CH1;

[0176] (상기 링커는 30 개 이상의 아미노산, 바람직하게는 32 개 내지 50 개 아미노산의 펩티드임);

[0177] 상기 b) 의 상기 단일쇄 Fab 단편은 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C- 또는 N-말단 (바람직하게는 중쇄의 C-말단) 에서 펩티드 연결기를 통해 a) 의 상기 전장 항체에 융합됨 (상기 펩티드 연결기는 5 개 이상의 아미노산, 바람직하게는 10 개 내지 50 개 아미노산의 펩티드임).

[0178] 상기 구현예에서, 바람직하게는 3가, 이중특이적 항체는 2 개의 CH3 도메인 중 하나 내에 T366W 돌연변이, 및 2 개의 CH3 도메인 중 다른 하나 내에 T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함하며, 더욱 바람직하게는 3가, 이중특이적 항체는 2 개의 CH3 도메인 중 하나 내에 Y349C, T366W 돌연변이, 및 2 개의 CH3 도메인 중 다른 하나 내에 S354C (또는 E356C), T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함한다. 임의로는 상기 구현예에서 3가, 이중특이적 항체는 R409D; "늑 사슬" 의 CH3 도메인 내에 K370E 돌연변이 및 D399K; "홀 사슬" 의 CH3 도메인 내에 E357K 돌연변이를 포함한다.

[0179] 본 발명의 또다른 구현예는 하기를 포함하는 3가, 이중특이적 항체이다:

[0180] a) 하기로 이루어지는, 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 전장 항체:

[0181] aa) N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 항체 불변 중쇄 도메인 1 (CH1), 항체 힌지 영역 (HR), 항체 중쇄 불변 도메인 2 (CH2) 및 항체 중쇄 불변 도메인 3 (CH3) 으로 이루어지는 2 개의 항체 중쇄; 및

[0182] ab) N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인 (CL) (VL-CL) 으로 이루어지는 2 개의 항체 경쇄; 및

[0183] b) 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 하나의 단일쇄 Fv 단편,

[0184] 상기 b) 의 상기 단일쇄 Fv 단편은 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C- 또는 N-말단 (바람직하게는 중쇄의 C-말단) 에서 펩티드 연결기를 통해 a) 의 상기 전장 항체에 융합되고,

[0185] 상기 펩티드 연결기는 5 개 이상의 아미노산, 바람직하게는 10 개 내지 50 개 아미노산의 펩티드임.

[0186] 상기 구현예에서, 바람직하게는 3가, 이중특이적 항체는 2 개의 CH3 도메인 중 하나 내에 T366W 돌연변이, 및 2 개의 CH3 도메인 중 다른 하나 내에 T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함하며, 더욱 바람직하게는 3가, 이중특이적 항체는 2 개의 CH3 도메인 중 하나 내에 Y349C, T366W 돌연변이, 및 2 개의 CH3 도메인 중 다른 하나 내에 S354C (또는 E356C), T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함한다. 임의로는 상기 구현예에서 3가, 이중특이적 항체는 R409D; "늑 사슬" 의 CH3 도메인 내에 K370E 돌연변이 및 D399K; "홀 사슬" 의 CH3 도메인 내에 E357K 돌연변이를 포함한다.

[0187] 따라서 바람직한 구현예는 하기를 포함하는 3가, 이중특이적 항체이다:

[0188] a) 하기로 이루어지는, 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 전장 항체:

- [0189] aa) N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 항체 불변 중쇄 도메인 1 (CH1), 항체 힌지 영역 (HR), 항체 중쇄 불변 도메인 2 (CH2) 및 항체 중쇄 불변 도메인 3 (CH3) 으로 이루어지는 2 개의 항체 중쇄; 및
- [0190] ab) N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인 (CL) (VL-CL) 으로 이루어지는 2 개의 항체 경쇄; 및
- [0191] b) 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 하나의 단일쇄 Fv 단편,
- [0192] 상기 b) 의 상기 단일쇄 Fv 단편은 전장 항체의 중쇄의 C-말단에서 펩티드 연결기를 통해 a) 의 상기 전장 항체에 융합되고 (2 개의 항체 중쇄-단일쇄 Fv 융합 펩티드를 야기함),
- [0193] 상기 펩티드 연결기는 5 개 이상 아미노산의 펩티드임.
- [0194] 본 발명의 또다른 구현에는 하기를 포함하는 3가, 이중특이적 항체이다:
- [0195] a) 하기로 이루어지는, 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 전장 항체:
- [0196] aa) N-말단에서 C-말단 방향의 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 항체 불변 중쇄 도메인 1 (CH1), 항체 힌지 영역 (HR), 항체 중쇄 불변 도메인 2 (CH2) 및 항체 중쇄 불변 도메인 3 (CH3) 으로 이루어지는 2 개의 항체 중쇄; 및
- [0197] ab) N-말단에서 C-말단 방향의 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인 (CL) 으로 이루어지는 2 개의 항체 경쇄; 및
- [0198] b) 하기로 이루어지는 폴리펩티드:
- [0199] ba) 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 또는
- [0200] bb) 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 항체 불변 도메인 1 (CH1),
- [0201] 상기 폴리펩티드는 VH 도메인의 N-말단이 펩티드 연결기를 통해 상기 전장 항체의 2 개의 중쇄 중 하나의 C-말단에 융합되고 (항체 중쇄-VH 융합 펩티드를 야기함), 상기 펩티드 연결기는 5 개 이상의 아미노산, 바람직하게는 25 내지 50 개 아미노산의 펩티드임,
- [0202] c) 하기로 이루어지는 폴리펩티드:
- [0203] ca) 항체 경쇄 가변 도메인 (VL), 또는
- [0204] cb) 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인 (CL);
- [0205] 상기 폴리펩티드는 VL 도메인의 N-말단이 펩티드 연결기를 통해 상기 전장 항체의 2 개 중쇄 중 다른 하나의 C-말단에 융합되고 (항체 중쇄-VL 융합 펩티드를 야기함);
- [0206] 상기 펩티드 연결기는 b) 의 펩티드 연결기와 동일함;
- [0207] 상기 b) 의 폴리펩티드의 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 c) 의 폴리펩티드의 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 은 함께 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 항원-결합 자리를 형성함.
- [0208] 상기 구현예에서, 바람직하게는 3가, 이중특이적 항체는 2 개의 CH3 도메인 중 하나 내에 T366W 돌연변이, 및 2 개의 CH3 도메인 중 다른 하나 내에 T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함하며, 더욱 바람직하게는 3가, 이중특이적 항체는 2 개의 CH3 도메인 중 하나 내에 Y349C, T366W 돌연변이, 및 2 개의 CH3 도메인 중 다른 하나 내에 S354C (또는 E356C), T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함한다. 임의로는 상기 구현예에서 3가, 이중특이적 항체는 R409D; "늑 사슬" 의 CH3 도메인 내에 K370E 돌연변이 및 D399K; "홀 사슬" 의 CH3 도메인 내에 E357K 돌연변이를 포함한다.
- [0209] 본 발명의 또다른 양상에서 본 발명에 따른 3가, 이중특이적 항체는 하기를 포함한다:
- [0210] a) 2 개의 항체 중쇄 VH-CH1-HR-CH2-CH3 및 2 개의 항체 경쇄 VL-CL 로 이루어지는 인간 ErbB-1 에 결합하는 전장 항체;
- [0211] (바람직하게는 2 개의 CH3 도메인 중 하나는 Y349C, T366W 돌연변이, 및 2 개의 CH3 도메인 중 다른 하나는 S354C (또는 E356C), T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함함);

- [0212] b) 하기로 이루어지는 폴리펩티드:
- [0213] ba) 항체 중쇄 가변 도메인 (VH); 또는
- [0214] bb) 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 항체 불변 도메인 1 (CH1),
- [0215] 상기 폴리펩티드는 VH 도메인의 N-말단이 펩티드 연결기를 통해 상기 전장 항체의 2 개 중쇄 중 하나의 C-말단에 융합됨,
- [0216] c) 하기로 이루어지는 폴리펩티드
- [0217] ca) 항체 경쇄 가변 도메인 (VL), 또는
- [0218] cb) 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인 (CL);
- [0219] 상기 폴리펩티드는 VL 도메인의 N-말단이 펩티드 연결기를 통해 상기 전장 항체의 2 개 중쇄 중 다른 하나의 C-말단에 융합됨;
- [0220] 상기 b) 의 폴리펩티드의 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 c) 의 폴리펩티드의 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 은 함께 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 항원-결합 자리를 형성함.
- [0221] **4가 이중특이적 포맷**
- [0222] 하나의 구현예에서 본 발명에 따른 다중특이적 항체는 4가이며, 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 항원-결합 자리(들)이 c-Met 이합체화를 저해한다 (예를 들어 WO 2009/007427 에 기재된 바와 같음).
- [0223] 본 발명의 하나의 구현예에서 상기 항체는 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 2 개의 항원-결합 자리, 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 2 개의 항원-결합 자리를 포함하는, 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 4가, 이중특이적 항체이고, 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 상기 항원-결합 자리는 c-Met 이합체화를 저해한다 (예를 들어 WO 2009/007427 에서 기재된 바와 같음).
- [0224] 따라서, 본 발명의 또다른 양상은 하기를 포함하는 4가, 이중특이적 항체이다:
- [0225] a) 2 개의 항체 중쇄 및 2 개의 항체 경쇄로 이루어지는 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 전장 항체; 및
- [0226] b) ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 2 개의 동일한 단일쇄 Fab 단편,
- [0227] 상기 b) 의 상기 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C- 또는 N-말단에서 펩티드 연결기를 통해 a) 의 상기 전장 항체에 융합됨.
- [0228] 따라서, 본 발명의 또다른 양상은 하기를 포함하는 4가, 이중특이적 항체이다:
- [0229] a) 2 개의 항체 중쇄 및 2 개의 항체 경쇄로 이루어지는 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 전장 항체; 및
- [0230] b) 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 2 개의 동일한 단일쇄 Fab 단편,
- [0231] 상기 b) 의 상기 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C- 또는 N-말단에서 펩티드 연결기를 통해 a) 의 상기 전장 항체에 융합됨.
- [0232] 예시적 도해적 구조에 대해 도 6a 참조.
- [0233] 따라서, 본 발명의 또다른 양상은 하기를 포함하는 4가, 이중특이적 항체이다:
- [0234] a) 2 개의 항체 중쇄 및 2 개의 항체 경쇄로 이루어지는 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 전장 항체; 및
- [0235] b) 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 2 개의 동일한 단일쇄 Fv 단편,
- [0236] 상기 b) 의 상기 단일쇄 Fv 단편은 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C- 또는 N-말단에서 펩티드 연결기를 통해 a) 의 상기 전장 항체에 융합됨).
- [0237] 따라서, 본 발명의 또다른 양상은 하기를 포함하는 4가, 이중특이적 항체이다:
- [0238] a) 2 개의 항체 중쇄 및 2 개의 항체 경쇄로 이루어지는 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 전장 항체; 및
- [0239] b) 인간 ErbBc-2 에 특이적으로 결합하는 2 개의 동일한 단일쇄 Fv 단편,
- [0240] 상기 b) 의 상기 단일쇄 Fv 단편은 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C- 또는 N-말단에서 펩티드 연결기를 통

해 a) 의 상기 전장 항체에 융합됨.

[0241] 예시적 도해적 구조에 대해 도 6b 참조.

[0242] 하나의 바람직한 구현예에서, 인간 c-Met 또는 인간 ErbB-1 에 결합하는 상기 단일쇄 Fab 또는 Fv 단편은 상기 전장 항체의 중쇄의 C-말단에서 펩티드 연결기를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.

[0243] 본 발명의 다른 구현예는 하기를 포함하는 4가, 이중특이적 항체이며:

[0244] a) 하기로 이루어지는, 인간 ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 전장 항체:

[0245] aa) N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 항체 중쇄 불변 도메인 1 (CH1), 항체 힌지 영역 (HR), 항체 중쇄 불변 도메인 2 (CH2) 및 항체 중쇄 불변 도메인 3 (CH3) 으로 이루어지는 2 개의 동일한 항체 중쇄; 및

[0246] ab) N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인 (CL) (VL-CL) 으로 이루어지는 2 개의 동일한 항체 경쇄; 및

[0247] b) 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 2 개의 단일쇄 Fab 단편,

[0248] 상기 단일쇄 Fab 단편은 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 항체 불변 도메인 1 (CH1), 항체 경쇄 가변 도메인 (VL), 항체 경쇄 불변 도메인 (CL) 및 링커로 이루어지고, 상기 항체 도메인 및 상기 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 하기 순서 중 하나를 가짐:

[0249] ba) VH-CH1-링커-VL-CL, 또는 bb) VL-CL-링커-VH-CH1;

[0250] 상기 링커는 30 개 이상의 아미노산 펩티드, 바람직하게는 32 내지 50 개의 아미노산 펩티드임;

[0251] 상기 b) 의 상기 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C- 또는 N-말단에서 펩티드 연결기를 통해 a) 의 전장 항체에 융합되고;

[0252] 상기 펩티드 연결기는 5 개 이상의 아미노산 펩티드, 바람직하게는 10 내지 50 개의 아미노산 펩티드임.

[0253] 3가 또는 4가 포맷에서 사용되는 용어 "전장 항체" 는 2 개의 "전장 항체 중쇄" 및 2 개의 "전장 항체 경쇄" 로 이루어지는 항체를 의미한다 (도 1 참조). "전장 항체 중쇄" 는 N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 항체 중쇄 불변 도메인 1 (CH1), 항체 힌지 영역 (HR), 항체 중쇄 불변 도메인 2 (CH2), 및 항체 중쇄 불변 도메인 3 (CH3) (약어: VH-CH1-HR-CH2-CH3); 및 임의로는 항체 중쇄 불변 도메인 4 (CH4) (IgE 서브클래스 항체의 경우) 로 이루어지는 폴리펩티드이다. 바람직하게는, "전장 항체 중쇄" 는 N-말단에서 C-말단 방향으로 VH, CH1, HR, CH2 및 CH3 로 이루어지는 폴리펩티드이다. "전장 항체 경쇄" 는 N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인 (CL) (약어: VL-CL) 으로 이루어지는 폴리펩티드이다. 항체 경쇄 불변 도메인 (CL) 은 κ (카파) 또는 λ (람다) 일 수 있다. 2 개의 전장 항체 사슬은 CL 도메인 및 CH1 도메인 사이 및 전장 항체 중쇄의 힌지 영역 사이의 폴리펩티드-간 이황 결합을 통해 함께 연결된다. 전형적인 전장 항체의 예로는 IgG (예를 들어 IgG1 및 IgG2), IgM, IgA, IgD 및 IgE 와 같은 자연적 항체가 있다. 본 발명에 따른 전장 항체는 단일 종 (예를 들어 인간) 으로부터의 것일 수 있거나, 또는 이들은 키메라화 또는 인간화 항체일 수 있다. 본 발명에 따른 전장 항체는 한쌍의 VH 및 VL 에 의해 각각 형성되는 2 개의 항원 결합 자리를 포함하고, 이는 둘 다 동일한 항원에 특이적으로 결합한다. 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단은 상기 중쇄 또는 경쇄의 C-말단에서의 마지막 아미노산을 의미한다. 상기 전장 항체 중쇄 또는 경쇄의 N-말단은 상기 중쇄 또는 경쇄의 N-말단에서의 마지막 아미노산을 의미한다.

[0254] 본원에 사용되는 용어 "펩티드 연결기" 는 바람직하게는 합성 기점의, 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 의미한다. 발명에 따른 이들 펩티드 연결기는 단일쇄 Fab 단편을 전장 항체의 C- 또는 N-말단에 융합시켜 본 발명에 따른 다중특이적 항체를 형성하기 위해 사용된다. 바람직하게는, b) 의 상기 펩티드 연결기는 5 개 이상의 아미노산 길이, 바람직하게는 5 내지 100 개의 아미노산 길이, 더욱 바람직하게는 10 내지 50 개의 아미노산 길이의 아미노산 서열을 갖는 펩티드이다. 하나의 구현예에서, 상기 펩티드 연결기는 (GxS)_n 또는 (GxS)_nGm 이며, 이때 G = 글리신, S = 세린, 및 (x = 3, n = 3, 4, 5 또는 6, 및 m = 0, 1, 2 또는 3) 또는 (x = 4, n = 2, 3, 4 또는 5 및 m = 0, 1, 2 또는 3), 바람직하게는 x = 4 및 n = 2 또는 3, 더욱 바람직하게는 x = 4, n = 2 이다. 바람직하게는, VH 또는 VH-CH1 폴리펩티드 및 VL 또는 VL-CL 폴리펩티드 (도 7a 내지 7c) 가 2 개의 동일한 펩티드 연결기를 통해 전장 항체의 C-말단에 융합되는 3가, 이중특이적 항체에서, 상기

펩티드 연결기는 25 개 이상의 아미노산 펩티드, 바람직하게는 30 내지 50 개의 아미노산 펩티드이며, 더욱 바람직하게는 상기 펩티드 연결기는 $(GxS)_n$ 또는 $(GxS)_nG_m$ 이고, 이때 G = 글리신, S = 세린, 및 $(x = 3, n = 6, 7$ 또는 $8, \text{ 및 } m = 0, 1, 2$ 또는 $3)$ 또는 $(x = 4, n = 5, 6, \text{ 또는 } 7 \text{ 및 } m = 0, 1, 2$ 또는 $3)$, 바람직하게는 $x = 4$ 및 $n = 5, 6, 7$ 이다.

[0255] "단일쇄 Fab 단편" (도 2a 참조) 은 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 항체 불변 도메인 1 (CH1), 항체 경쇄 가변 도메인 (VL), 항체 경쇄 불변 도메인 (CL) 및 링커로 이루어지는 폴리펩티드이고, 이때 상기 항체 도메인 및 상기 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 하기 순서 중 하나를 갖는다: a) VH-CH1-링커-VL-CL, b) VL-CL-링커-VH-CH1, c) VH-CL-링커-VL-CH1 또는 d) VL-CH1-링커-VH-CL; 이때 상기 링커는 30 개 이상의 아미노산, 바람직하게는 32 내지 50 개의 아미노산 폴리펩티드임. 상기 단일쇄 Fab 단편 [a) VH-CH1-링커-VL-CL, b) VL-CL-링커-VH-CH1, c) VH-CL-링커-VL-CH1 및 d) VL-CH1-링커-VH-CL] 은 CL 도메인과 CH1 도메인 사이의 자연적 이황 결합을 통해 안정화된다. 용어 "N-말단" 은 N-말단의 마지막 아미노산을 의미한다. 용어 "C-말단" 은 C-말단의 마지막 아미노산을 의미한다.

[0256] 용어 "링커" 는 본 발명 내에서 단일쇄 Fab 단편과 연계되어 사용되고, 바람직하게는 합성 기점의 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 의미한다. 본 발명에 따른 이들 펩티드는 a) VH-CH1 에서 VL-CL 로, b) VL-CL 에서 VH-CH1 로, c) VH-CL 에서 VL-CH1 로, 또는 d) VL-CH1 에서 VH-CL 로 연결시켜 본 발명에 따른 하기의 단일쇄 Fab 단편을 형성하는데 사용된다: a) VH-CH1-링커-VL-CL, b) VL-CL-링커-VH-CH1, c) VH-CL-링커-VL-CH1 또는 d) VL-CH1-링커-VH-CL. 단일쇄 Fab 단편 내의 상기 링커는 30 개 이상의 아미노산 길이, 바람직하게는 32 내지 50 개 아미노산 길이의 아미노산 서열을 갖는 펩티드이다. 하나의 구현예에서, 상기 링커는 $(GxS)_n$ (이때, G = 글리신, S = 세린, $(x = 3, n = 8, 9$ 또는 $10 \text{ 및 } m = 0, 1, 2$ 또는 $3)$ 또는 $(x = 4 \text{ 및 } n = 6, 7$ 또는 $8 \text{ 및 } m = 0, 1, 2$ 또는 $3)$, 바람직하게는 $x = 4, n = 6$ 또는 $7 \text{ 및 } m = 0, 1, 2$ 또는 3 , 더욱 바람직하게는 $x = 4, n = 7 \text{ 및 } m = 2$ 임) 이다. 하나의 구현예에서, 상기 링커는 $(G_4S)_6G_2$ 이다.

[0257] 바람직한 구현예에서, 상기 단일쇄 Fab 단편에서 상기 항체 도메인 및 상기 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 하기 순서 중 하나를 갖는다:

[0258] a) VH-CH1-링커-VL-CL, 또는 b) VL-CL-링커-VH-CH1, 더욱 바람직하게는 VL-CL-링커-VH-CH1.

[0259] 또다른 바람직한 구현예에서, 상기 단일쇄 Fab 단편에서 상기 항체 도메인 및 상기 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 하기 순서 중 하나를 갖는다:

[0260] a) VH-CL-링커-VL-CH1 또는 b) VL-CH1-링커-VH-CL.

[0261] 임의로는, 상기 단일쇄 Fab 단편에서, CL-도메인과 CH1 도메인 사이의 자연적 이황 결합 외에도, 항체 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 또한 하기 위치 사이의 이황 결합의 도입에 의해 이황 안정화된다:

[0262] i) 중쇄 가변 도메인 위치 44 와 경쇄 가변 도메인 위치 100 사이,

[0263] ii) 중쇄 가변 도메인 위치 105 와 경쇄 가변 도메인 위치 43 사이, 또는

[0264] iii) 중쇄 가변 도메인 위치 101 과 경쇄 가변 도메인 위치 100 사이 (항상 Kabat 의 EU 인덱스에 따라 넘버링 함).

[0265] 이러한 추가적인 단일쇄 Fab 단편의 이황 안정화는 단일쇄 Fab 단편의 가변 도메인 VH 와 VL 사이의 이황 결합의 도입에 의해 달성된다. 단일쇄 Fv 에 대한 안정화를 위한 비-자연적 이황 다리를 도입하는 기술은 예를 들어 WO 94/029350, [Rajagopal, V., et al., Prot. Engin. (1997) 1453-59]; [Kobayashi, H., et al., Nuclear Medicine & Biology, Vol. 25, (1998) 387-393]; 또는 [Schmidt, M., et al., Oncogene (1999) 18, 1711-1721] 에 기재되어 있다. 하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 항체에 포함되는 단일쇄 Fab 단편의 가변 도메인 사이의 임의의 이황 결합은 중쇄 가변 도메인 위치 44 와 경쇄 가변 도메인 위치 100 사이이다. 하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 항체에 포함되는 단일쇄 Fab 단편의 가변 도메인 사이의 임의의 이황 결합은 중쇄 가변 도메인 위치 105 와 경쇄 가변 도메인 위치 43 사이이다 (항상 Kabat 의 EU 인덱스에 따라 넘버링 함).

[0266] 하나의 구현예에서, 단일쇄 Fab 단편의 가변 도메인 VH 및 VL 사이의 상기 임의적 이황 안정화가 부재하는 단일쇄 Fab 단편이 바람직하다.

- [0267] "단일쇄 Fv 단편" (도 2b 참조) 은 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 항체 경쇄 가변 도메인 (VL), 및 단일-사슬-Fv-링커로 이루어지는 폴리펩티드이며, 이때 상기 항체 도메인 및 상기 단일-사슬-Fv-링커 중 하나는 N-말단에서 C-말단 방향으로 하기 순서 중 하나를 갖는다: a) VH-단일-사슬-Fv-링커-VL, b) VL-단일-사슬-Fv-링커-VH; 바람직하게는 a) VH-단일-사슬-Fv-링커-VL 이고, 이때 상기 단일-사슬-Fv-링커는 15 개 이상의 아미노산 길이, 하나의 구현예에서는 20 개 이상의 아미노산 길이의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이다. 용어 "N-말단" 은 N-말단의 마지막 아미노산을 나타내고, 용어 "C-말단" 은 C-말단의 마지막 아미노산을 나타낸다.
- [0268] 단일쇄 Fv 단편 내에 사용되는 용어 "단일-사슬-Fv-링커" 는 바람직하게는 합성 기점의 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 의미한다. 상기 단일-사슬-Fv-링커는 15 개 이상의 아미노산 길이, 하나의 구현예에서는 20 개 이상의 아미노산 길이, 바람직하게는 15 내지 30 개의 아미노산 길이의 아미노산 서열을 갖는 펩티드이다. 하나의 구현예에서, 상기 단일-사슬-링커는 (GxS)n (이때, G = 글리신, S = 세린, (x = 3 및 n = 4, 5 또는 6) 또는 (x = 4 및 n = 3, 4, 5 또는 6), 바람직하게는 x = 4, n = 3, 4 또는 5, 더욱 바람직하게는 x = 4, n = 3 또는 4 임) 이다. 하나의 구현예에서, 상기 단일-사슬-Fv-링커는 (G₄S)₃ 또는 (G₄S)₄ 이다.
- [0269] 더욱이, 상기 단일쇄 Fv 단편은 바람직하게는 이항 안정화된다. 단일쇄 항체의 이러한 추가적인 이항 안정화는 단일쇄 항체의 가변 도메인 사이의 이항 결합의 도입에 의해 달성되고, 예를 들어 WO 94/029350, [Rajagopal, V., et al., Prot. Engin. 10 (1997) 1453-59]; [Kobayashi, H., et al., Nuclear Medicine & Biology, Vol. 25 (1998) 387-393]; 또는 [Schmidt, M., et al., Oncogene 18 (1999) 1711 -1721] 에 기재되어 있다.
- [0270] 이항 안정화된 단일쇄 Fv 단편의 하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 항체에 포함되는 단일쇄 Fv 단편의 가변 도메인 사이의 이항 결합은 하기로부터 선택되는 각 단일쇄 Fv 에 대해 독립적이다:
- [0271] i) 중쇄 가변 도메인 위치 44 와 경쇄 가변 도메인 위치 100 사이,
- [0272] ii) 중쇄 가변 도메인 위치 105 와 경쇄 가변 도메인 위치 43 사이, 또는
- [0273] iii) 중쇄 가변 도메인 위치 101 과 경쇄 가변 도메인 위치 100 사이.
- [0274] 하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 항체에 포함되는 단일쇄 Fv 단편의 가변 도메인 사이의 이항 결합은 중쇄 가변 도메인 위치 44 와 경쇄 가변 도메인 위치 100 사이이다.
- [0275] 하나의 구현예에서 본 발명에 따른 이종특이적 Her1/c-Met 항체는 HGF 의 부재 하에 A431 (ATCC No. CRL-1555) 암 세포 증식을 30% 이상 저해한다 (48 시간 후 측정됨, 실시예 7a 참조).
- [0276] 하나의 구현예에서 본 발명에 따른 이종특이적 Her1/c-Met 항체는 HGF 의 부재 하에 A431 (ATCC No. CRL-1555) 암 세포 증식을 30% 이상 저해한다 (48 시간 후 측정됨, 실시예 7b 참조).
- [0277] 본 발명에 따른 항체는 재조합 수단에 의해 생성된다. 따라서, 본 발명의 한 양상은 본 발명에 따른 항체를 인코딩하는 핵산이고, 추가적인 양상은 본 발명에 따른 항체를 인코딩하는 상기 핵산을 포함하는 세포이다. 재조합 생산 방법은 당업계에 널리 알려져 있고, 항체가 후속적으로 단리되고 통상적으로는 약학적으로 허용가능한 순도로 정제되는 원핵 및 진핵 세포에서의 단백질 발현을 포함한다. 숙주 세포에서 상기 언급된 바와 같이 항체의 발현을 위해서는, 개질된 경쇄 및 중쇄 각각을 인코딩하는 핵산이 표준 방법으로 발현 벡터에 삽입된다. 발현은 CHO 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, HEK293 세포, COS 세포, PER.C6 세포, 효모 또는 대장균 (E. coli) 세포와 같은 적절한 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 수행되며, 항체는 세포로부터 회수된다 (용해 후 상청액 또는 세포). 항체의 재조합 생산의 일반적 방법은 당업계에 잘 알려져 있고 예를 들어 [Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202]; [Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282]; 및 [Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161]; [Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880] 에 기재되어 있다.
- [0278] 이종특이적 항체는 단백질 A-세파로오스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 통상적 면역글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지로부터 적합하게 분리된다. 단일클론 항체를 인코딩하는 DNA 및 RNA는 통상적 절차를 사용하여 용이하게 단리되고 서열결정화된다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA 및 RNA의 원천으로서 역할할 수 있다. 단리되고 나면, DNA는 발현 벡터에 삽입될 수 있고, 이는 이후 면역글로불린 단백질을 생성하지 않는 HEK 293 세포, CHO 세포 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포에 트랜스펙션되어, 숙주 세포에서 재조합 단일클론 항체가 합성된다.

- [0279] 적절한 뉴클레오티드 변화를 항체 DNA에 도입하거나, 또는 뉴클레오티드를 합성하여 이중특이적 항체의 아미노산 서열 변이체 (또는 돌연변이체)를 제조한다. 이러한 개질이 수행될 수 있으나, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이 오직 매우 한정된 범위에서만 수행될 수 있다. 예를 들어, 개질은 IgG 아이소형 및 항원 결합과 같은 상기 언급한 항체 특징을 변경시키지 않으나, 재조합 생성 수율, 단백질 안정성 또는 정제 촉진을 개선시킬 수 있다.
- [0280] 본 발명에 사용되는 용어 "숙주 세포"는 본 발명에 따른 항체를 생성하도록 조작될 수 있는 세포계의 임의의 종류를 나타낸다. 하나의 구현예에서, HEK 세포 또는 CHO 세포는 숙주 세포로서 사용된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 표현 "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"은 호환되게 사용되며 상기 모든 지정물은 자손을 포함한다. 따라서, 단어 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"는 1 차 대상 세포, 및 이동의 수를 고려하지 않고 그로부터 유래된 배양물을 포함한다. 또한, 계획적 또는 부주의 돌연변이로 인해 모든 자손이 DNA 함량에 있어서 정확히 동일하지 않을 수 있다는 것이 이해된다. 본래 형질전환된 세포에서 스크리닝되는 바와 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 변이체 자손이 포함된다.
- [0281] NS0 세포에서의 발현은, 예를 들어 [Barnes, L.M., et al., Cytotechnology 32 (2000) 109-123]; 및 [Barnes, L.M., et al., Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270] 에 의해 기재된다. 일시적 발현은, 예를 들어 [Durocher, Y., et al., Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9] 에 의해 기재된다. 가변 도메인의 클로닝은 [Orlandi, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837]; [Carter, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289]; 및 [Norderhaug, L., et al., J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87] 에 의해 기재된다. 바람직한 일시적 발현 시스템 (HEK 293) 은 [Schlaeger, E.-J., and Christensen, K., in Cytotechnology 30 (1999) 71-83] 및 [Schlaeger, E.-J., in J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199] 에 의해 기재된다.
- [0282] 원핵 생물에 적합한 조절 서열은 예를 들어 프로모터, 임의로는 오퍼레이터 서열, 및 리보솜 결합 자리를 포함한다. 진핵 생물 세포는 프로모터, 인핸서 및 폴리아데닐화 신호를 이용하는 것으로 알려져 있다.
- [0283] 핵산은 또 다른 핵산 서열과의 기능적 관계에 놓이는 경우 "작동적으로 연결된다". 예를 들어, 폴리펩티드의 분비에 참여하는 예비단백질로서 발현된다면 예비서열 또는 분비 리더에 대한 DNA 는 폴리펩티드에 대한 DNA 에 작동적으로 연결되고; 서열의 전사에 영향을 준다면 프로모터 또는 인핸서는 코딩 서열에 작동적으로 연결되거나; 또는 번역이 촉진되도록 배치된다면 리보솜 결합 자리는 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 일반적으로, "작동적으로 연결되는"은 연결되는 DNA 서열이 연속적이고, 분비 리더의 경우 연속적이고 판독 프레임 내에 있는 것을 의미한다. 그러나 인핸서는 연속적일 필요가 없다. 연결은 통상적 제한 자리에서의 라이게이션에 의해 성취된다. 이러한 위치가 존재하지 않는다면, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커가 통상적 실행에 따라 사용된다.
- [0284] 세포 성분 또는 기타 오염물 (예를 들어, 기타 세포 핵산 또는 단백질)을 제거하기 위해, 알칼리/SDS 처리, CsCl 밴딩, 컬럼 크로마토그래피, 아가로오스 겔 전기영동 및 기타 당업계에 잘 알려진 방법을 포함하는 표준 기술로써 항체 정제를 수행한다. 문헌 [Ausubel, F., et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)]을 참조한다. 상이한 방법이 수립되어 있고 예를 들어 하기에 널리 사용된다: 단백질 정제, 예컨대 미생물 단백질과의 친화성 크로마토그래피 (예를 들어, 단백질 A 또는 단백질 G 친화성 크로마토그래피), 이온 교환 크로마토그래피 (예를 들어, 양이온 교환 (카르복시메틸 수지), 이온 교환 (아미노 에틸 수지) 및 혼합-모드 교환), 친화성 흡착 (예를 들어, 베타-머캅토에탄올 및 기타 SH 리간드와), 소수성 상호작용 또는 방향족 흡착 크로마토그래피 (예를 들어, 페닐-세파로오스, 아자-아레노필릭 수지, 또는 m-아미노페닐보론산과), 금속 킬레이트 친화성 크로마토그래피 (예를 들어, Ni(II)- 및 Cu(II)-친화도 물질과), 크기 배제 크로마토그래피, 및 전기영동 방법 (예컨대 겔 전기영동, 모세관 전기영동) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).
- [0285] 본원에서 사용되는 바와 같이, 표현 "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"은 호환되게 사용되며 상기 모든 지정물은 자손을 포함한다. 따라서, 단어 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"는 1 차 대상 세포, 및 이동의 수를 고려하지 않고 그로부터 유래된 배양물을 포함한다. 또한, 계획적 또는 부주의 돌연변이로 인해 모든 자손이 DNA 함량에 있어서 정확히 동일하지 않을 수 있다는 것이 이해된다. 본래 형질전환된 세포에서 스크리닝되는 바와 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 변이체 자손이 포함된다. 별개의 지정물이 의도되는 경우, 이는 문맥으로부터 명백할 것이다.
- [0286] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "형질전환"은 벡터/핵산을 숙주 세포 내로 이동시키는 방법을 나타낸다.

강력한 세포 벽 방해물이 없는 세포가 숙주 세포로서 사용된다면, 예를 들어 [Graham, F.L., and van der Eb, A.J., Virology 52 (1973) 456-467] 에 기재된 바와 같이 인산 칼슘 침전법에 의해 트랜스펙션을 실행한다.

그러나 핵 주입, 또는 원형질체 융합에 의한 것과 같은, 세포 내로 DNA 를 도입하기 위한 다른 방법이 또한 사용될 수 있다. 원핵 세포 또는 실질적인 세포벽 구조를 포함하는 세포가 사용된다면, 예를 들어 트랜스펙션의 한 방법은 [Cohen, S. N, et al., PNAS. 69 (1972) 2110-2114] 에서 기재된 바와 같은 염화 칼슘을 사용하는 칼슘 처리법이다.

[0287] 본원에서 사용되는 바와 같은 "발현" 은, 핵산이 mRNA 로 전사되는 방법 및/또는 전사된 mRNA (또한 전사체로서 나타냄) 가 이후 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질로 번역되는 방법을 나타낸다. 전사체 및 인코딩된 폴리펩티드를 총체적으로 유전자 생성물로서 나타낸다. 폴리뉴클레오타드가 게놈 DNA 에서 유래한다면, 진핵 세포에서의 발현은 mRNA 의 스플라이싱 (splicing) 을 포함할 수 있다.

[0288] "벡터" 는 핵산 분자, 특히 삽입된 핵산 분자를 숙주 세포에 및/또는 숙주 세포 사이에 이동시키는 자체-스플라이싱하는 핵산 분자이다. 상기 용어는, 주로 DNA 또는 RNA 를 세포에 삽입 (예를 들어 염색체 통합) 하는 기능을 하는 벡터, 주로 DNA 또는 RNA 를 복제하는 기능을 하는 복제 벡터, 및 DNA 또는 RNA 의 전사 및/또는 번역을 위한 기능을 하는 발현 벡터를 포함한다. 기재한 바와 같은 기능 중 하나 이상을 제공하는 벡터가 또한 포함된다.

[0289] "발현 벡터" 는 적절한 숙주 세포에 도입되는 경우 폴리펩티드로 전사 및 번역될 수 있는 폴리뉴클레오타드이다. "발현 시스템" 은 통상 원하는 발현 생성물이 수득되도록 기능할 수 있는 발현 벡터를 포함하는 적합한 숙주 세포를 나타낸다.

[0290] 약학 조성물

[0291] 본 발명의 한 양상은 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약학 조성물이다. 본 발명의 또다른 양상은 약학 조성물을 제조하기 위한 본 발명에 따른 항체의 용도이다. 본 발명의 추가적인 양상은 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약학 조성물의 제조 방법이다. 또다른 양상에서, 본 발명은 약학 담체와 함께 제형화된, 본 발명에 따른 항체를 함유하는 조성물 (예를 들어, 약학 조성물) 을 제공한다.

[0292] 본 발명의 하나의 구현예는 암 치료를 위한 본 발명에 따른 이중특이적 항체이다.

[0293] 본 발명의 또다른 양상은 암 치료를 위한 상기 약학 조성물이다.

[0294] 본 발명의 또다른 양상은 암 치료를 위한 약제의 제조를 위한 본 발명에 따른 항체의 용도이다.

[0295] 본 발명의 또다른 양상은 치료를 필요로 하는 환자에게 본 발명에 따른 항체를 투여함으로써 암 환자를 치료하는 방법이다.

[0296] 본원에 사용된 바와 같이, "약학 담체" 는 생리적으로 용화가능한 용매, 분산 매질, 코팅제, 향균 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는, 담체는 정맥내, 근내, 피하, 비경구, 척추 또는 표피 투여 (예를 들어, 주사 또는 주입에 의함) 에 적합하다.

[0297] 본 발명의 조성물은 당업계에 알려진 다양한 방법으로 투여될 수 있다. 당업자에게 숙지된 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 다양할 것이다. 본 발명의 화합물을 특정 투여 경로로 투여하기 위해, 상기 화합물을 이의 불활성화를 방지하기 위한 물질과 공동 투여하거나, 상기 화합물을 이로 코팅하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들어, 화합물은 적절한 담체, 예를 들어 리포솜 또는 희석제 중에서 대상에게 투여될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 희석제는 염수 및 완충 수용액을 포함한다. 약학 담체는 무균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 무균 수용액 또는 분산액 및 무균 분말을 포함한다. 약학적으로 활성 물질에 대한 그러한 매질 및 작용제가 당업계에 알려져 있다.

[0298] 본원에서 사용되는 "비경구 투여" 및 "비경구적으로 투여되는" 이란 어구는 소화관내 투여 및 국소 투여 외의 투여 방식 (통상적으로는 주사에 의한 투여) 을 의미하는 것이고, 정맥내, 근내, 동맥내, 경맥내, 관절낭내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관내, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척추내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함하나, 이로써 한정되지 않는다.

[0299] 본원에 사용되는 용어 암은 증식성 질환을 지칭하고, 예컨대 림프종, 림프구 백혈병, 폐암, 비-소세포 폐 (NSCL) 암, 세기관지 폐포암, 뼈암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문 부위암, 위암 (stomach cancer, gastric cancer), 결장암, 유방암, 자궁암, 난관의 암종, 자궁내막

암종, 자궁경부 암종, 질암종, 음문암종, 호치킨병 (Hodgkin's Disease), 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상샘 암, 부갑상샘암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 방광암, 신장암 또는 요관암, 콩팥 세포암종, 신우 암종, 중피종, 간세포암, 담낭암, 중추신경계 (CNS) 신생물, 척추축 종양, 뇌간 교종, 다형교모 세포종, 별아교세포종, 신경집종, 뇌실막세포종, 수모세포종, 수막종, 편평세포암종, 뇌하수체샘종 및 유잉 (Ewings) 육종 (상기 암의 임의의 난치성 형태 또는 상기 암 하나 이상의 조합을 포함) 이 있다.

[0300] 본 발명의 다른 양상은 항-혈관형성제로서 본 발명에 따른 이중특이적 항체 또는 약학 조성물이다. 그러한 항-혈관형성제는 암, 특히 고형 종양 및 기타 혈관 질환의 치료를 위해 사용될 수 있다.

[0301] 본 발명의 하나의 구현에는 혈관 질환의 치료를 위한 본 발명에 따른 이중특이적 항체이다.

[0302] 본 발명의 또다른 양상은 혈관 질환 치료용 약제의 제조를 위한 본 발명에 따른 항체의 용도이다.

[0303] 본 발명의 또다른 양상은 치료를 필요로 하는 환자에게 본 발명에 따른 항체를 투여하는, 혈관 질환을 앓는 상기 환자의 치료 방법이다.

[0304] 용어 "혈관 질환" 은 암, 염증성 질환, 죽상경화증, 허혈, 외상, 폐혈증, COPD, 천식, 당뇨병, AMD, 망막병증, 뇌졸중, 비만증, 급성 폐 손상, 출혈, 혈관 누출 (예를 들어, 사이토카인 유도), 알레르기, 그레이브스병, 하시모토 자가면역 갑상선염, 특발저혈소판자색반병, 거세포(성) 동맥염, 류마티스관절염, 전신홍반루푸스 (SLE), 루푸스신장염, 크론병, 다발경화증, 폐양대장염, 특히 고형 종양, 안구내 혈관신생 증후군 예컨대 증식성 망막 증 또는 노년기황반변성 (AMD), 류마티스관절염, 및 건선을 포함한다 (Folkman, J., et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, et al., Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239; 및 Garner, A., Vascular diseases, In: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., and Klintworth, G.K., (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York (1994), pp 1625-1710).

[0305] 또한, 이들 조성물은 보강제, 예컨대 보존제, 습윤제, 에멀전화제 및 분산제를 함유할 수 있다. 미생물 존재의 방지는 상기 멸균 과정, 및 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산 등을 포함시키는 것 둘 다에 의해 보장될 수 있다. 또한, 등장화제, 예컨대 당, 염화 나트륨 등을 상기 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 주사 가능한 약학 형태의 흡수 지연은, 흡수를 지연시키는 작용제, 예컨대 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 포함에 의해 대략적으로 발생할 수 있다.

[0306] 선택되는 투여 경로에 관계없이, 적합한 수화 형태로 사용될 수 있는 본 발명의 화합물 및/또는 본 발명의 약학 조성물은, 당업계에 통상적으로 알려진 방법에 의해 약학적으로 허용가능한 투약 형태로 제형화된다.

[0307] 본 발명의 약학 조성물에서 활성 성분의 실제 투약 수준은, 환자에 대한 독성이 없으면서 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 원하는 치료학적 반응을 달성하기에 효과적인 활성 성분의 양이 수득되도록 가변적일 수 있다. 선택되는 투약 수준은 다양한 약물동태학 요소 (사용되는 본 발명의 특정 조성물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용될 특정 화합물의 분비 속도, 치료 지속기간 및/또는 사용되는 특정 조성물과 조합으로 사용되는 기타 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료받을 환자의 나이, 성별, 체중, 상태, 일반적 건강상태 및 이전 병력 등 의료계에 알려져 있는 요소들 포함) 에 의존적일 것이다.

[0308] 조성물은 무균이어야만 하고 조성물이 주사기에 의해 전달될 정도의 유동성이 있어야만 한다. 물 외에도, 담체는 바람직하게는 등장성의 완충된 염수 용액이다.

[0309] 적절한 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅을 사용함으로써, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기를 유지함으로써, 및 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다. 많은 경우에서, 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨 및 염화 나트륨을 조성물 중에서 포함하는 것이 바람직하다.

[0310] 본 발명에 따른 인간 ErbB-1 및 인간 c-Met 에 대한 이중특이적 항체는 생물학적 또는 약리학 활성과 같은 가치 있는 특징을 갖는 것으로 이제 밝혀졌다.

[0311] 하기 실시예, 서열 목록 및 도면은 본 발명의 이해 목적을 위해 제공하였으며, 본원의 범위는 첨부된 청구의 범위에서 제시된다. 본 발명의 취지에서 벗어나지 않는 변형이 과정 중에 이루어질 수 있는 것으로 이해된다.

[0312] 아미노산 서열의 설명

[0313] SEQ ID NO: 1 중쇄 가변 도메인 <ErbB-1> 세투시맵

[0314] SEQ ID NO: 2 경쇄 가변 도메인 <ErbB-1> 세투시맵

- [0315] SEQ ID NO: 3 중쇄 가변 도메인 <ErbB-1> 인간화 ICR62
- [0316] SEQ ID NO: 4 경쇄 가변 도메인 <ErbB-1> 인간화 ICR62
- [0317] SEQ ID NO: 5 중쇄 가변 도메인 <c-Met> Mab 5D5
- [0318] SEQ ID NO: 6 경쇄 가변 도메인 <c-Met> Mab 5D5
- [0319] SEQ ID NO: 7 중쇄 <c-Met> Mab 5D5
- [0320] SEQ ID NO: 8 경쇄 <c-Met> Mab 5D5
- [0321] SEQ ID NO: 9 중쇄 <c-Met> Fab 5D5
- [0322] SEQ ID NO: 10 경쇄 <c-Met> Fab 5D5
- [0323] SEQ ID NO: 11 인간 IgG1 의 중쇄 불변 영역
- [0324] SEQ ID NO: 12 인간 IgG3 의 중쇄 불변 영역
- [0325] SEQ ID NO: 13 인간 경쇄 kappa 불변 영역
- [0326] SEQ ID NO: 14 인간 경쇄 lambda 불변 영역
- [0327] SEQ ID NO: 15 인간 c-Met
- [0328] SEQ ID NO: 16 인간 ErbB-1
- [0329] SEQ ID NO: 17 중쇄 CDR3H, <ErbB-1> 세투시맵
- [0330] SEQ ID NO: 18 중쇄 CDR2H, <ErbB-1> 세투시맵
- [0331] SEQ ID NO: 19 중쇄 CDR1H, <ErbB-1> 세투시맵
- [0332] SEQ ID NO: 20 경쇄 CDR3L, <ErbB-1> 세투시맵
- [0333] SEQ ID NO: 21 경쇄 CDR2L, <ErbB-1> 세투시맵
- [0334] SEQ ID NO: 22 경쇄 CDR1L, <ErbB-1> 세투시맵
- [0335] SEQ ID NO: 23 중쇄 CDR3H, <ErbB-1> 인간화 ICR62
- [0336] SEQ ID NO: 24 중쇄 CDR2H, <ErbB-1> 인간화 ICR62
- [0337] SEQ ID NO: 25 중쇄 CDR1H, <ErbB-1> 인간화 ICR62
- [0338] SEQ ID NO: 26 경쇄 CDR3L, <ErbB-1> 인간화 ICR62
- [0339] SEQ ID NO: 27 경쇄 CDR2L, <ErbB-1> 인간화 ICR62
- [0340] SEQ ID NO: 28 경쇄 CDR1L, <ErbB-1> 인간화 ICR62
- [0341] SEQ ID NO: 29 중쇄 CDR3H, <c-Met> Mab 5D5
- [0342] SEQ ID NO: 30 중쇄 CDR2H, <c-Met> Mab 5D5
- [0343] SEQ ID NO: 31 중쇄 CDR1H, <c-Met> Mab 5D5
- [0344] SEQ ID NO: 32 경쇄 CDR3L, <c-Met> Mab 5D5
- [0345] SEQ ID NO: 33 경쇄 CDR2L, <c-Met> Mab 5D5
- [0346] SEQ ID NO: 34 경쇄 CDR1L, <c-Met> Mab 5D5

도면의 간단한 설명

- [0347] **도 1:** 통상적 순서로 가변 및 불변 도메인을 포함하는 2 쌍의 중쇄 및 경쇄를 갖는 제 1 항원 1 에 특이적으로 결합하는 CH4 도메인이 없는 전장 항체의 도해적 구조.
- 도 2a-c:** 하기를 포함하는 2 가, 이중특이적 <ErbB-1/c-Met> 항체의 도해적 구조: a) 인간 ErbB-1 에 특이적으

로 결합하는 전장 항체의 경쇄 및 중쇄; 및 b) 인간 c-Met 에 특이적으로 결합하는 전장 항체의 경쇄 및 중쇄 (불변 도메인 CL 및 CH1, 및/또는 가변 도메인 VL 및 VH 는 서로 대체되며, 이는 낱-인투 홀 (knobs-into hole) 기술로 개질됨).

도 3:

a) **도 3a:** 2 개의 폴리펩티드 VH 및 VL 이 융합되어 있고 (VH 및 VL 도메인 모두 함께 c-Met 에 특이적으로 결합하는 항원 결합 자리를 형성함);

b) **도 3b:** 2 개의 폴리펩티드 VH-CH1 및 VL-CL 이 융합되어 있는 (VH 및 VL 도메인 모두 함께 c-Met 에 특이적으로 결합하는 항원 결합 자리를 형성함),

ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 전장 항체를 포함하는 본 발명에 따른 3가, 이중특이적 <ErbB-1/c-Met> 항체의 도해적 표시.

도 3c: 2 개의 폴리펩티드 VH 및 VL 이 "낱과 홀" 과 융합되어 있는 (VH 및 VL 도메인 모두 함께 c-Met 에 특이적으로 결합하는 항원 결합 자리를 형성함) ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 전장 항체를 포함하는 본 발명에 따른 3가, 이중특이적 항체의 도해적 표시.

도 3d: 2 개의 폴리펩티드 VH 및 VL 이 "낱과 홀" 과 융합되어 있는 (VH 및 VL 도메인 모두 함께 c-Met 에 특이적으로 결합하는 항원 결합 자리를 형성하며, 이들 VH 및 VL 도메인은 위치 VH44 와 VL100 사이에 사슬간 이황화물 다리를 포함함) ErbB-1 에 특이적으로 결합하는 전장 항체를 포함하는 본 발명에 따른 3가, 이중특이적 항체의 도해적 표시.

도 4:

4a: 4 개의 가능한 단일쇄 Fab 단편의 도해적 구조

4b: 2 개의 단일쇄 Fv 단편의 도해적 구조

도 5: 전장 항체 및 하나의 단일쇄 Fab 단편 (**도 5a**) 또는 하나의 단일쇄 Fv 단편 (**도 5b**) 을 포함하는 3가, 이중특이적 <ErbB-1/c-Met> 항체의 도해적 구조 - 낱과 홀을 갖는 이중특이적 3가 예시물.

도 6: 전장 항체 및 2 개의 단일쇄 Fab 단편 (**도 6a**) 또는 2 개의 단일쇄 Fv 단편 (**도 6b**) 을 포함하는 4가, 이중특이적 <ErbB-1/c-Met> 항체의 도해적 구조 - c-Met 결합 자리는 c-Met 이량체화 저해 항체에서 유래함.

도 7a: 유표피 암 세포주 A431 에서의 ErbB1/2/3 및 c-Met 의 세포 표면 발현의 유세포측정 분석.

도 7b: 난소암 세포주 OVCAR-8 에서의 ErbB1/2/3 및 c-Met 의 세포 표면 발현의 유세포측정 분석.

도 8a: 암 세포주 A431 에서의 증식 검정 - 단일특이적 부모 <HER1> 및 <c-Met> 항체와 비교한 본 발명에 따른 이중특이적 <HER1/c-Met> 항체 BsAB01 (BsAb) 의 암 세포 증식의 저해.

도 8b: HGF 의 존재 하의 암 세포주 A431 에서의 증식 검정 - 단일특이적 부모 <HER1> 및 <c-Met> 항체와 비교한 본 발명에 따른 이중특이적 <HER1/c-Met> 항체 BsAB01 (BsAb) 의 암 세포 증식의 저해.

도 9: 0, 30, 60 및 120 분 (= 0, 0.5, 1 및 2 시간) 에 측정된 OVCAR-8 암 세포에서의 내재화 검정.

도 10a: OVCAR-8 암 세포에서의 증식 검정. 단일특이적 부모 <HER1> 및 <c-Met> 항체와 비교한 본 발명에 따른 이중특이적 <HER1/c-Met> 항체 BsAB01 (BsAb) 의 암 세포 증식의 저해.

도 10b: HGF 의 존재 하의 암 세포주 A431 에서의 증식 검정 - 단일특이적 부모 <HER1> 및 <c-Met> 항체와 비교한 본 발명에 따른 이중특이적 <HER1/c-Met> 항체 BsAB01 (BsAb) 의 암 세포 증식의 저해.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0348] 실험적 절차

[0349] 실시예

[0350] 재료 & 방법

[0351] 제조합 DNA 기술

- [0352] [Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989] 에 기재된 바와 같이 표준 방법을 사용하여 DNA 를 조작하였다. 제 조사의 지시사항에 따라 분자 생물학적 시약을 사용하였다.
- [0353] **DNA 및 단백질 서열 분석 및 서열 데이터 관리**
- [0354] 인간 면역글로불린 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오타이드 서열에 대한 일반적인 정보는 [Kabat, E.A., et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Ed., NIH 공개 번호 91-3242] 에 주어진다. 항 체 사슬의 아미노산은 EU 넘버링에 따라 넘버링된다 (Edelman, G.M., et al., PNAS 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Ed., NIH 공개 번호 91-3242). GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) 소프트웨어 패키지 version 10.2 및 Infomax's Vector NTI Advance suite version 8.0 을 서열 생성, 지도화, 분석, 주석달기 및 설명에 사용하였다.
- [0355] **DNA 서열결정화**
- [0356] SequiServe (Vaterstetten, Germany) 및 Geneart AG (Regensburg, Germany) 에서 수행한 이중 가닥 서열결정화에 의해 DNA 서열을 결정하였다.
- [0357] **유전자 합성**
- [0358] 자동화 유전자 합성에 의해 PCR 산물 및 합성 올리고뉴클레오타이드로부터 Geneart AG (Regensburg, Germany) 에 의해 원하는 유전자 분절을 제조하였다. 단일 제한 엔도뉴클레아제 절단 위치가 측면에 위치한 유전자 분절을 pGA18 (ampR) 플라스미드 내로 클로닝하였다. 플라스미드 DNA 를 형질전환된 세균으로부터 정제하고, UV 분광학에 의해 농도를 측정하였다. 서브클로닝된 유전자 단편의 DNA 서열을 DNA 서열결정화로 확인하였다. 유사한 방법으로, 펩티드 연결기에 의해 연결된 C-말단 <c-Met>5D5 scFab VH 부위를 갖거나/갖지 않는 CH3 도메인 내의 S354C 및 T366W 돌연변이를 수반하는 개질된 "늑-인투-홀" <ErbB-1> 항체 중쇄 뿐 아니라, 펩티드 연결기에 의해 연결된 C-말단 <c-Met>5D5 scFab VL 부위를 갖거나/갖지 않는 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이를 수반하는 "늑-인투-홀" <ErbB-1> 항체 중쇄를 코딩하는 DNA 서열을 측면에 위치하는 BamHI 및 XbaI 제한 위치로 유전자 합성에 의해 제조하였다. 마지막으로, <ErbB-1> 항체 및 <c-Met>5D5 항체의 비개질 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 DNA 서열을 측면에 위치하는 BamHI 및 XbaI 제한 위치로 합성하였다. 모든 구축물을, 진행 세포 내 분비를 위해 단백질을 표적화하는 리더 펩티드 (MGWSCIIILFLVATATGVHS) 를 코딩하는 5'-말단 DNA 서열로 설계하였다.
- [0359] **발현 플라스미드의 구축**
- [0360] Roche 발현 벡터를 모든 중쇄 및 경쇄 scFv 융합 단백질 인코딩 발현 플라스미드의 구축에 사용하였다. 상 기 벡터는 하기 요소로 구성된다:
- [0361] - 선택 마커로서의 히드로마이신 내성 유전자,
- [0362] - 엡스타인-바 (Epstein-Barr) 바이러스 (EBV) 의 복제 기점, oriP,
- [0363] - 대장균 (E. coli) 에서 상기 플라스미드의 복제를 가능하게 하는 벡터 pUC18 로부터의 복제 기점,
- [0364] - 대장균에 암피실린 내성을 부여하는 베타-락타마아제 유전자,
- [0365] - 인간 시토크로마 바이러스 (HCMV) 로부터의 급속 초기 인핸서 및 프로모터,
- [0366] - 인간 1-면역글로불린 폴리아데닐화 ("폴리 A") 신호 서열, 및
- [0367] - 고유한 BamHI 및 XbaI 제한 위치.
- [0368] 중쇄 또는 경쇄 구축물 뿐 아니라 C-말단 VH 및 VL 도메인을 갖는 "늑-인투-홀" 구축물을 포함하는 면역글로불린 융합 유전자를 유전자 합성에 의해 제조하고, 기재된 바와 같은 pGA18 (ampR) 플라스미드 내로 클로닝하였다. 합성 DNA 분절을 수반하는 pG18 (ampR) 플라스미드 및 Roche 발현 벡터를 BamHI 및 XbaI 제한 효소 (Roche Molecular Biochemicals) 로 소화시키고, 아가로오스 겔 전기영동하였다. 정제된 중쇄 및 경쇄 코딩 DNA 분절을 이후 단리된 Roche 발현 벡터 BamHI/XbaI 단편에 라이게이션하여 최종 발현 벡터를 야기시켰다. 최종 발현 벡터를 대장균 세포 내로 형질전환시키고, 발현 플라스미드 DNA 를 단리하고 (Miniprep), 제한 효소 분석 및 DNA 서열결정화를 수행하였다. 올바른 클론을 150 ml LB-Amp 배지에서 성장

시키고, 플라스미드 DNA 를 다시 분리하고 (Maxiprep), DNA 서열결정화에 의해 서열 완전성을 확인하였다.

[0369] **HEK293 세포에서의 면역글로불린 변이체의 일시적 발현**

[0370] 제조사의 지시사항에 따라 FreeStyle™ 293 Expression System (Invitrogen, USA) 을 사용하여 인간 태아 신장 293-F 세포의 일시적 트랜스펙션에 의해 재조합 면역글로불린 변이체를 발현시켰다. 간략하게는, 현탁액 FreeStyle™ 293-F 세포를 37℃/8% CO₂ 에서 FreeStyle™ 293 Expression 배지에서 배양하고, 트랜스펙션 일에 1-2x10⁶ 생육성 세포/ml 의 밀도에서 신선한 배지에 세포를 시딩하였다. 250 ml 최종 트랜스펙션 부피에 대해 1:1 몰비로 250 µg 의 중쇄 및 경쇄 플라스미드 DNA, 및 325 µl 의 293fectin™ (Invitrogen, Germany) 을 사용하여 Opti-MEM® I 배지 (Invitrogen, USA) 에서 DNA-293fectin™ 복합체를 제조하였다. 250 ml 최종 트랜스펙션 부피에 대해 1:1:2 몰비로 250 µg 의 "놈-인투-홀" 중쇄 1 및 2 및 경쇄 플라스미드 DNA, 및 325 µl 의 293fectin™ (Invitrogen, Germany) 을 사용하여 Opti-MEM® I 배지 (Invitrogen, USA) 에서 "놈-인투-홀" DNA-293fectin 복합체를 제조하였다. 항체 함유 세포 배양 상청액을 트랜스펙션 7 일 후 30 분 동안 14000 g 에서 원심분리에 의해 수확하고, 멸균 필터 (0.22 µm) 를 통해 여과하였다. 정제될 때까지 상청액을 -20℃ 에서 저장하였다.

[0371] **이중특이적 및 대조군 항체의 정제**

[0372] Protein A-Sepharose™ (GE Healthcare, Sweden) 을 사용하는 친화성 크로마토그래피 및 Superdex200 크기 배제 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상청액으로부터 3가 이중특이적 및 대조군 항체를 정제하였다. 간략하게는, 멸균 여과된 세포 배양 상청액을 PBS 완충액 (10 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl 및 2.7 mM KCl, pH 7.4) 으로 평형화된 HiTrap ProteinA HP (5 ml) 컬럼 상에 적용하였다. 미결합 단백질을 평형 완충액으로 세척하였다. 항체 및 항체 변이체를 0.1 M 시트레이트 완충액, pH 2.8 으로 용리하고, 단백질 함유 분획물을 0.1 ml 1 M Tris, pH 8.5 로 중화시켰다. 이후, 용리된 단백질 분획물을 풀링하고 (pooling), Amicon Ultra 원심분리 필터 장치 (MWCO: 30 K, Millipore) 로 3 ml 의 부피로 농축하고, 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0 으로 평형화된 Superdex200 HiLoad 120 ml 16/60 겔 여과 컬럼 (GE Healthcare, Sweden) 상에 로딩하였다. 5% 미만의 높은 분자량 응집물을 갖는 정제된 이중특이적 및 대조군 항체를 함유하는 분획물을 풀링하고, -80℃ 에서 1.0 mg/ml 분취액으로서 저장하였다. 정제된 5D5 단일클론 항체의 파파인 소화 및 단백질 A 크로마토그래피에 의한 오염 Fc 도메인의 후속적 제거에 의해 Fab 단편을 생성시켰다. 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0 으로 평형화된 Superdex200 HiLoad 120 ml 16/60 겔 여과 컬럼 (GE Healthcare, Sweden) 상에서 미결합 Fab 단편을 추가로 정제하고, 풀링하고, -80℃ 에서 1.0 mg/ml 분취액으로서 저장하였다.

[0373] **정제된 단백질의 분석**

[0374] 아미노산 서열을 기초로 계산한 몰 흡광 계수를 사용하여, 280 nm 에서 광학 밀도 (OD) 를 측정함으로써, 정제된 단백질 샘플의 단백질 농도를 측정하였다. 환원제 (5 mM 1,4-디티오프레이트) 의 존재 및 부재 하에, 및 쿠마시 브릴리언트 블루 (Coomassie brilliant blue) 로 염색하여 SDS-PAGE 에 의해 이중특이적 및 대조군 항체의 순도 및 분자량을 분석하였다. NuPAGE® Pre-Cast 겔 시스템 (Invitrogen, USA) 을 제조사의 지시사항에 따라 사용하였다 (4-20% Tris-글리신 겔). 25℃ 에서 200 mM KH₂PO₄, 250 mM KCl, pH 7.0 실행 완충액 중 Superdex 200 분석 크기-배제 컬럼 (GE Healthcare, Sweden) 을 사용하여 고성능 SEC 에 의해 이중특이적 및 대조군 항체 샘플의 응집물 함량을 분석하였다. 25 µg 단백질을 0.5 ml/분의 유속으로 컬럼에 주입하고, 50 분에 걸쳐 등용매 (isocratic) 용리하였다. 안정성 분석을 위해서, 1 mg/ml 농도의 정제된 단백질을 4℃ 및 40℃ 에서 7 일 동안 인큐베이션한 후 고성능 SEC 에 의해 평가하였다. 펩티드-N-글리코시다아제 F (Roche Molecular Biochemicals) 로의 효소적 처리에 의한 N-글리칸의 제거 후 나노전기분무 (NanoElectrospray) Q-TOF 질량분석에 의해, 환원된 이중특이적 항체 경쇄 및 중쇄의 아미노산 골격의 완전성을 확인하였다.

[0375] **c-Met 인산화 검증**

[0376] 0.5% FCS (송아지 태아 혈청) 를 갖는 RPMI 에서의 HGF 자극 전, 6-웰 플레이트의 웰 당 5x10⁵ A549 세포를 시딩하였다. 다음날, 성장 배지를 1 시간 동안 0.2% BSA (소 혈청 알부민) 함유 RPMI 로 대체하였다. 5

$\mu\text{g/ml}$ 의 이중특이적 항체를 이후 배지에 첨가하고, 세포를 10 분 동안 인큐베이션하고, 이에 50 ng/ml 의 최종 농도에서 HGF 를 추가 10 분 동안 첨가하였다. 세포를 1 mM 나트륨 바나테이트를 함유하는 얼음 냉각된 PBS 로 1 회 세척하고, 이를 얼음에 두고 100 μl 용해 완충액 (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% DOC, 아프로티닌, 0.5 mM PMSF, 1 mM 나트륨-바나테이트) 으로 세포 배양 플레이트 내에서 용해시켰다. 세포 용해물을 에펜도르프 (ependorf) 튜브에 옮기고 얼음에서 30 분 동안 용해가 진행되게 하였다. BCA 방법 (Pierce) 을 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 4-12% Bis-Tris NuPage 겔 (Invitrogen) 상에서 30-50 μg 의 용해물을 분리하고 겔 상의 단백질을 니트로셀룰로오스 멤브레인에 옮겼다. 멤브레인을 5% BSA 를 함유하는 TBS-T 로 1 시간 동안 블로킹하고, 제조사의 지시사항에 따라 Y1230,1234,1235 에 대해 유도된 포스포-특이적 (phospho-specific) c-Met 항체 (44-888, Biosource) 로 현상하였다. 면역블롯을 비인산화된 c-Met 에 결합하는 항체 (AF276, R&D) 로 리프로브 (reprobe) 하였다.

[0377] **ErbB1/HER1 인산화 검정**

[0378] 10% FCS (송아지 태아 혈청) 를 갖는 RPMI 에서의 항체 첨가 전날, 6-웰 플레이트의 웰 당 5x10e5 Sk-Br3 세포를 시딩하였다. 다음날, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 대조군 또는 이중특이적 항체를 배지에 첨가하고 세포를 추가 1 시간 인큐베이션하였다. 1 mM 나트륨 바나테이트를 함유하는 얼음 냉각된 PBS 로 세포를 1 회 세척하고, 이를 얼음에 두고 100 μl 용해 완충액 (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% DOC, 아프로티닌, 0.5 mM PMSF, 1 mM 나트륨-바나테이트) 으로 세포 배양 플레이트 내에서 용해시켰다. 세포 용해물을 에펜도르프 튜브에 옮기고, 얼음에서 30 분 동안 용해가 진행되게 하였다. BCA 방법 (Pierce) 을 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 30-50 μg 의 용해물을 4-12% Bis-Tris NuPage 겔 (Invitrogen) 상에서 분리하고, 겔 상의 단백질을 니트로셀룰로오스 멤브레인에 옮겼다. 5% BSA 를 함유하는 TBS-T 로 1 시간 동안 멤브레인을 블로킹하고, 제조사의 지시사항에 따라 Y1173 에 대해 유도된 포스포-특이적 EGFR 항체 (sc-12351, Santa Cruz) 로 현상하였다. 면역블롯을 비인산화된 EGFR 에 결합하는 항체 (06-847, Upstate) 로 리프로브하였다.

[0379] **AKT 인산화 검정**

[0380] 10% FCS (송아지 태아 혈청) 를 갖는 RPMI 에서의 항체 첨가 전날, 6-웰 플레이트의 웰 당 5x10e5 A431 세포를 시딩하였다. 다음날, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 대조군 또는 이중특이적 항체를 배지에 첨가하고, 세포를 추가 1 시간 인큐베이션하였다. 이후, 세포 아집합을 25 ng/ml HGF (R&D, 294-HGN) 로 추가 15 분 동안 자극하였다. 1 mM 나트륨 바나테이트를 함유하는 얼음 냉각된 PBS 로 세포를 1 회 세척하고, 이를 얼음에 두고 100 μl 용해 완충액 (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% DOC, 아프로티닌, 0.5 mM PMSF, 1 mM 나트륨-바나테이트) 으로 세포 배양 플레이트 내에서 용해시켰다. 세포 용해물을 에펜도르프 튜브에 옮기고, 얼음에서 30 분 동안 용해가 진행되게 하였다. BCA 방법 (Pierce) 을 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 30-50 μg 의 용해물을 4-12% Bis-Tris NuPage 겔 (Invitrogen) 상에서 분리하고, 겔 상의 단백질을 니트로셀룰로오스 멤브레인에 옮겼다. 5% BSA 를 함유하는 TBS-T 로 1 시간 동안 멤브레인을 블로킹하고, 제조사의 지시사항에 따라 Thr308 에 유도된 포스포-특이적 AKT 항체 (Cell Signaling, 9275) 로 현상하였다. 면역블롯을 액틴에 결합하는 항체 (Abcam, ab20272) 로 리프로브하였다.

[0381] **ERK1/2 인산화 검정**

[0382] 10% FCS (송아지 태아 혈청) 를 갖는 RPMI 에서의 항체 첨가 전날, 6-웰 플레이트의 웰 당 5x10e5 A431 세포를 시딩하였다. 다음날, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 대조군 또는 이중특이적 항체를 배지에 첨가하고, 세포를 추가 1 시간 인큐베이션하였다. 이후 세포 아집합을 25 ng/ml HGF (R&D, 294-HGN) 로 추가 15 분 동안 자극하였다. 1 mM 나트륨 바나테이트를 함유하는 얼음 냉각된 PBS 로 세포를 1 회 세척하고, 이를 얼음에 두고 100 μl 용해 완충액 (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% DOC, 아프로티닌, 0.5 mM PMSF, 1 mM 나트륨-바나테이트) 으로 세포 배양 플레이트 내에서 용해시켰다. 세포 용해물을 에펜도르프 튜브에 옮기고, 얼음에서 30 분 동안 용해가 진행되게 하였다. BCA 방법 (Pierce) 을 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 30-50 μg 의 용해물을 4-12% Bis-Tris NuPage 겔 (Invitrogen) 상에서 분리하고, 겔 상의 단백질을 니트로셀룰로오스 멤브레인에 옮겼다. 5% BSA 를 함유하는 TBS-T 로 1 시간 동안 멤브레인을 블로킹하고, 제조사의 지시사항에 따라 Thr202/Tyr204 에 대해 유도된 포스포-특이적 Erk1/2 항체 (CellSignaling, Nr.9106) 로 현상하였다. 면역블롯을 액틴에 결합하는 항체 (Abcam, ab20272) 로 리프로브하였다.

[0383] **세포-세포 파종 검정 (산란 검정)**

[0384] 0.5% FCS 를 갖는 RPMI 중 96-웰 E-플레이트 (Roche, 05232368001) 에서의 총 부피 200 μl 로의 화합물 처리

전날, A549 (웰 당 4000 개 세포) 또는 A431 (웰 당 8000 개 세포) 를 시딩하였다. 임피던스를 모니터링하는 15 분 마다 스위핑하여 실시간 세포 분석기 (Real Time Cell Analyzer machine) 로 부착 및 세포 성장을 밤새 모니터링하였다. 다음날, 15 분 마다 스위핑하여 PBS 중 각각의 항체 희석물 5 μ l 로 세포를 예비인큐베이션하였다. 30 분 후, 20 ng/ml 의 최종 농도를 산출시키는 2.5 μ l 의 HGF 용액을 첨가하고, 추가 72 시간 동안 실험이 진행되게 하였다. 180 분 동안 1 분 마다 스위핑한 후 남은 시간 동안 15 분 마다 스위핑하여 즉각적인 변화를 모니터링하였다.

[0385] 유세포측정 검정 (FACS)

[0386] a) 결합 검정

[0387] c-Met 및 ErbB-1 발현 세포를 분리시키고 계수하였다. 원주형 96-웰 플레이트의 웰 당 1.5x10⁵ 세포를 시딩하였다. 세포를 스핀 다운시키고 (1500 rpm, 4°C, 5 분), 2% FCS (송아지 태아 혈청) 를 갖는 PBS 중 각각의 이중특이적 항체의 연속 희석물 50 μ l 중 얼음에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 다시 스핀 다운시키고 2% FCS 를 함유하는 200 μ l PBS 로 1 회 세척한 후, 2% FCS 를 함유하는 PBS 중 희석된 인간 Fc 에 대해 유도된 피코에리트린-결합 항체 (Jackson ImmunoResearch, 109116098) 로 30 분 동안 2 차 인큐베이션하였다. 세포를 스핀 다운시켜 2% FCS 를 함유하는 200 μ l PBS 로 2 회 세척하고, BD CellFix 용액 (BD Biosciences) 에 재현탁시키고 얼음에서 10 분 이상 동안 인큐베이션하였다. 세포의 평균 형광 세기 (mfi) 를 유세포측정 (FACS Canto, BD) 으로 측정하였다. 두 독립적 염색의 적어도 이반복물에서 Mfi 를 측정하였다. FlowJo 소프트웨어 (TreeStar) 를 사용하여 유세포측정 스펙트럼을 추가 프로세싱하였다. XLFit 4.0 (IDBS) 및 용량 반응 1 위치 모델 205 (dose response one site model 205) 를 사용하여 절반-최대 결합 (half-maximal binding) 을 측정하였다.

[0388] b) 내재화 검정

[0389] 세포를 분리시키고 계수하였다. 5x10⁵ 세포를 에펜도르프 튜브 중 50 μ l 완전 배지에 넣고 37°C 에서 각각의 이중특이적 항체 5 μ g/ml 와 함께 인큐베이션하였다. 표시한 시간 지점 이후 시간 추이가 완료될 때까지 세포를 얼음에서 저장하였다. 이후, 세포를 FACS 튜브에 옮기고, 스핀 다운시키고 (1500 rpm, 4°C, 5 분), PBS + 2% FCS 로 세척하고, 2% FCS 를 함유하는 PBS 중 희석된 인간 Fc 에 대해 유도된 50 μ l 피코에리트린-결합 제 2 항체 (Jackson ImmunoResearch, 109116098) 중 30 분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 다시 스핀 다운시키고, PBS + 2% FCS 로 세척하고, 유세포측정 (FACS Canto, BD) 에 의해 형광 세기를 측정하였다.

[0390] 세포 역가 글로우 검정

[0391] 세포 역가 글로우 검정 (Promega) 을 사용하여 세포 생육성 및 증식을 정량화하였다. 제조사의 지시사항에 따라 검정을 수행하였다. 간략하게는, 원하는 시간 기간 동안 총 부피 100 μ l 로 96-웰 플레이트 내에서 세포를 배양하였다. 증식 검정을 위해서, 세포를 인큐베이터에서 제거하고 30 분 동안 실온에 두었다. 100 μ l 의 세포 역가 글로우 시약을 첨가하고 다중-웰 플레이트를 2 분 동안 궤도 진탕기에 두었다. 마이크로플레이트 판독기 (Tecan) 에서 15 분 후 발광을 정량화하였다.

[0392] Wst-1 검정

[0393] Wst-1 생육성 및 세포 증식 검정을 대사 활성 세포의 수를 검출하는 종말점 분석으로서 수행하였다. 간략하게는, 20 μ l 의 Wst-1 시약 (Roche, 11644807001) 을 200 μ l 의 배양 배지에 첨가하였다. 염료가 견고하게 (robust) 전개될 때까지 30 분 내지 1 시간 동안 96-웰 플레이트를 추가로 인큐베이션하였다. 450 nm 의 파장에서의 마이크로플레이트 판독기 (Tecan) 에서 염색 세기를 정량화하였다.

[0394] 이중특이적 <ErbB1-c-Met> 항체의 설계

[0395] 하기의 발현 및 정제된 이중특이적 <ErbB-1-c-Met> 항체 모두는 결국 하기에 나타난 바와 같이 개질된 불변 부위 또는 적어도 IgG1 서브클래스의 Fc 부분 (SEQ ID NO:11 의 인간 불변 IgG1 부위) 을 포함한다.

[0396] **표 1 예시:** 표 1 에 나타난 각각의 특징을 갖는 c-Met 항체 (cMet 5D5) 로부터의 하나의 단일쇄 Fab 단편 및 전장 ErbB-1 항체 (세투시맵 또는 인간화 ICR62) 를 기준으로 하는 3가, 이중특이적 <ErbB1-c-Met> 항체 (기본적 구조 도식에 대해서는 도 5a 참조) 는 상기 기재된 일반적인 방법에 따라 발현 및 정제되었거나 발현 및 정제될 수 있다. 인간화 ICR62 또는 세투시맵의 상응하는 VH 및 VL 을 서열 목록에 나타내었다.

표 1

[0397]

이중특이적 항체에 대한 분자 명칭 scFab-Ab-명명법	BsAB01	BsAB03
특징:		
높-인-홀 돌연변이	S354C: T366W/ Y349'C: T366'S: L368'A: Y407'V	S354C: T366W/ Y349'C: T366'S: L368'A: Y407'V
전장 항체 골격의 유래	세투시맵	인간화 ICR62
단일쇄 Fab 단편의 유래	cMet 5D5 (인간화)	cMet 5D5 (인간화)
항체에 부착된 scFab 의 위치	C-말단 노 중쇄	C-말단 노 중쇄
링커 (ScFab)	(G ₄ S) ₅ GG	(G ₄ S) ₅ GG
펩티드 연결기	(G ₄ S) ₂	(G ₄ S) ₂
ScFab 이항 VH44/ VL100 안정화	-	-

[0398] 실시예 1:

[0399] 이중특이적 항체의 ErbB-1 및 c-Met 에 대한 결합

[0400] (표면 플라즈몬 공명)

[0401] 25℃ 에서 표준 결합 검정, 예컨대 표면 플라즈몬 공명 기술 (BIAcore[®] GE-Healthcare Uppsala, Sweden) 로 결합 친화도를 측정하였다. 친화도 측정을 위해서, SPR 기기 (Biacore T100) 에서 표준 아민-결합 및 블로킹 화학 반응에 의해 30 µg/ml 의 항 Fcγ 항체 (염소로부터의 것, Jackson Immuno Research) 를 CM-5 센서 칩의 표면에 결합시켰다. 접합 후, 단일- 또는 이중특이적 ErbB1/cMet 항체를 유속 5 µl/분에서 25℃ 에서 주입한 후, 인간 ErbB1 또는 c-Met ECD 의 연속 희석물 (0 nM 에서 1000 nM) 을 30 µl/분에서 주입하였다. 결합 실험에 대한 실행 완충액으로서 PBS/0.1% BSA 를 사용하였다. 이후 10 mM 클리신-HCl, pH 2.0 용액의 60s 펄스로 칩을 재생시켰다.

표 2

[0402]

표면 플라즈몬 공명에 의해 측정되는 ErbB1/cMet 에 대한 이중특이적 항체의 결합 특성		
결합 특이성		BsAB01 [Mol]
c-Met	ka (1/Ms)	1.10E+04
	kd (1/s)	5.80E-05
	KD (M)	5.50E-09
ErbB-1	ka (1/Ms)	1.54E+06
	kd (1/s)	8.84E-04
	KD (M)	5.75E-10

[0403] 실시예 2:

[0404] 이중특이적 HER1/c-Met 항체 포맷에 의한 HGF-유도 c-Met 수용체 인산화의 저해

[0405] 이중특이적 Her1/c-Met 항체에서의 c-Met 부분의 기능성을 확인하기 위해서, c-Met 인산화 검정을 수행하였다.

상기 실험에서 A549 폐암 세포 또는 A431 결장 직장암 세포를 HGF 에 노출시키기 전 이중특이적 항체 또는 부모 대조군 항체로 처리하였다. 부모 또는 이중특이적 항체의 결합은 수용체 인산화의 저해를 일으킨다.

대안적으로, 예를 들어 오토크린 HGF 루프를 갖는 U87MG 세포를 또한 사용할 수 있으며, 부모 또는 이중특이적 항체의 부재 또는 존재 하에 c-Met 수용체 인산화를 평가할 수 있다.

[0406] 실시예 3:

[0407] HER1/cMet 이중특이적 항체로의 처리 후 HER1 수용체 인산화의 분석

[0408] 이중특이적 HER1/cMet 항체에서의 EGFR-결합 부분의 기능성을 확인하기 위해서, A431 을 부모 EGFR 항체 또는 이중특이적 HER1/cMet 항체로 인큐베이션하였다. 부모 또는 이중특이적 항체의 결합 (관련이 없는 IgG 대조군 항체의 결합은 아님) 은 수용체 인산화의 저해를 일으킨다. 대안적으로는, 부모 또는 이중특이적 항체의 존재 또는 부재 하에 ErbB1/HER1 수용체 인산화가 유도되도록 EGF 로 자극한 세포를 또한 사용할 수 있다.

[0409] 실시예 4:

[0410] HER1/cMet 이중특이적 항체로 처리한 후 PI3K 신호전달의 분석

[0411] EGFR 뿐 아니라 c-Met 수용체는 미토젠 신호를 전달하는 PI3K 통로를 통해 신호를 전달할 수 있다. AKT 의 EGFR 및 c-Met 수용체 인산화의 동시 표적화를 입증하기 위해서, PI3K 통로에서의 하류 표적을 모니터링할 수 있다. 이를 위해서, 미자극 세포, EGF 또는 HGF 로 처리한 세포, 또는 두 사이토카인 모두로 처리한 세포를 비특이적, 부모 대조군 또는 이중특이적 항체와 함께 병행하여 인큐베이션하였다. 대안적으로는, ErbB1/HER1 를 과발현하고/하거나 c-Met 신호전달을 활성화시키는 오토크린 HGF 루프를 갖는 세포를 또한 평가할 수 있다. AKT 는 PI3K 통로의 주요한 하류 신호전달 성분이며, 상기 단백질의 인산화는 상기 통로를 통한 신호전달의 핵심 표시자이다.

[0412] 실시예 5:

[0413] HER1/cMet 이중특이적 항체로의 처리 후 MAPK 신호전달의 분석

[0414] ErbB1/Her1 및 c-Met 수용체는 MAPK 통로를 통해 신호를 전달할 수 있다. ErbB1/Her1 및 c-Met 수용체의 표적화를 입증하기 위해서, MAPK 통로에서의 주요한 하류 표적, ERK1/2 의 인산화를 모니터링할 수 있다. 이를 위해서, 미자극 세포, EGF 또는 HGF 로 처리한 세포 또는 사이토카인 둘다로 처리한 세포를 비특이적, 부모 대조군 또는 이중특이적 항체와 함께 병행하여 인큐베이션하였다. 대안적으로는, ErbB1/Her1 을 과발현하고/거나 c-Met 신호전달을 활성화시키는 오토크린 HGF 루프를 갖는 세포를 또한 평가할 수 있다.

[0415] 실시예 6:

[0416] 이중특이적 HER1/c-Met 항체 포맷에 의한 HGF-유도 HUVEC 증식의 저해

[0417] HUVEC 증식 검정을 수행하여 HGF 의 혈관생성 및 미토젠 효과를 입증할 수 있다. HGF 를 HUVEC 에 첨가하는 것은 세포 증식에 있어서의 증가를 일으키는데, 이는 용량-의존적 방식으로 c-Met 결합 항체에 의해 저해될 수 있다.

[0418] 실시예 7:

[0419] 이중특이적 Her1/c-Met 항체에 의한 A431 증식의 저해.

[0420] a) A431 세포는 유세포측정에서 독립적으로 확인한 바와 같이 HER1 의 높은 표면 수준 및 c-Met 의 중간으로 높은 세포 표면 발현을 나타내었다. 이중특이적 HER1/c-Met 항체에 의한 A431 세포 증식의 저해를 48 시간 후 CellTiterGlow™ 검정에서 측정하였다. 결과를 도 8a 에 나타내었다. 대조군은 PBS 완충액이었다.

[0421] 두번째 측정은 EGFR 항체 세투시맵의 20% 의 저해를 나타내었다 (0% 저해로 설정한 완충액 대조군과 비교하여).

이중특이적 HER1/c-Met BsAB01 (BsAb) 항체는 암 세포 증식의 더욱 현저한 저해를 유발하였다 (38% 저해).

1 가 c-Met 항체 1-완 (one-armed) 5D5 (OA5D5) 는 증식에 대해 효과를 나타내지 않았다. EGFR 항체 세투시맵 및 1 가 c-Met 항체 1-완 5D5 (OA5D5) 의 조합은 덜 현저한 감소를 유발하였다 (20% 저해).

[0422] b) A431 은 주로 EGFR 신호전달에 의존적이다. 활성화 EGFR - c-Met-수용체 신호전달 네트워크가 발생하는 위치를 자극하기 위해, a) 에 기재한 바와 같으나 HGF-조건화 배지의 존재 하에 추가적인 증식 검정을 수행하였다 (48 시간 후 CellTiterGlow™ 검정). 결과를 도 8b 에 나타내었다.

[0423] 두번째 측정은 EGFR 항체 세투시법 (0% 저해) 및 1가 c-MET 항체 1-완 5D5 (0A5D5) (1% 저해) 의 저해 효과를 거의 나타내지 않았다. 이중특이적 HER1/c-Met BsAB01 (BsAb) 항체 (39% 저해) 는 A431 세포의 암 세포 증식의 현저한 저해를 보였다. EGFR 항체 세투시법 및 1 가 c-Met 항체 1-완 5D5 (0A5D5) 의 조합은 세포 증식의 덜 현저한 감소를 유발하였다 (20% 저해).

[0424] **실시예 8:**

[0425] **이중특이적 HER1/c-Met 항체 포맷에 의한 암 세포주 DU145 에서의 HGF-유도 세포-세포 파종 (산란) 저해의 분석**

[0426] HGF-유도 산란은 세포의 형태학적 변화를 유도하여, 세포의 원형화, 사상위축형 돌출, 스핀들형 구조 및 세포의 특정 운동성을 야기한다. 이중특이적 HER1/cMet 항체는 HGF-유도 세포-세포 파종을 억제하였다.

[0427] **실시예 9:**

[0428] **ErbB-1 및 c-Met 발현 암 세포주에서의 항체-매개 수용체 내재화의 분석**

[0429] HER1 또는 c-Met 에 특이적으로 결합하는 항체와 함께 세포를 인큐베이션하는 것은 수용체의 내재화를 촉발하는 것으로 나타났다. 이중특이적 항체의 내재화 능력을 평가하기 위해서, 실험 장치를 항체-유도 수용체 내재화를 연구하기 위해 설계하였다. 이러한 목적을 위하여, OVCAR-8 세포 ((NCI 세포주 호칭; NCI (국립 암 연구소) OVCAR-8-NCI로부터 구입; Schilder RJ, et al Int J Cancer. 1990 Mar 15;45(3):416-22; Ikediobi ON, et al., Mol Cancer Ther. 2006;5:2606-12; Lorenzi, P.L., et al Mol Cancer Ther 2009; 8(4):713-24)) (HER1 뿐 아니라 c-Met 를 발현하는 것을 유세포측정에 의해 확인함 - 도 7b 참조) 를 상이한 시간 기간 동안 (예를 들어 0, 30, 60, 120 분 = 0, 0.5, 1, 2 시간 (시)) 37°C 에서 각각의 제 1 항체와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 4°C 로 급속히 냉각시켜 세포 과정을 중단시켰다. 제 1 항체의 Fc 에 특이적으로 결합하는 제 2 형광물질 (fluorophor)-결합 항체를 사용하여 세포 표면에 결합하는 항체를 검출하였다. 항체-수용체 복합체의 내재화는 세포 표면 상의 항체-수용체 복합체를 고갈시키며, 감소된 평균 형광 세기를 야기한다. OvcAR-8 세포에서 내재화를 연구하였다. 하기 표 및 도 9 에서 결과를 나타내었다. 각 수용체의 내재화 % 를 각 항체의 내재화를 통해 측정하였다 (도 9 에서, 이중특이적 <ErbB1-cMet> 항체 BsAB01 는 cMet/HER1 로서 지정되고, 부모 단일특이적, 2 가 항체는 <HER1> 및 <cMet> 로서 지정됨).

표 3

[0430]

OVCAR-8 세포에서 2 시간 (2h) 후 FACS 검정으로 측정된, 부모 단일특이적, 2 가 c-Met 항체와 비교한 바와 같은 이중특이적 HER1/cMet 항체에 의한 c-Met 수용체의 내재화%. 0 시간에서의 (= 항체의 부재) 세포 표면 상의 c-Met 수용체의 측정% 는 세포 표면 상의 100% 의 c-Met 수용체로서 설정함.		
항체	OVCAR-8 세포 상에서 2 시간 후 측정된 c-Met 수용체 %	OVCAR-8 세포 (ATCC No. CRL-1555) 상에서 2 시간 후 c-Met 의 내재화 % (= 100- 세포 표면 상의 항체%)
A) 단일특이적 <c-Met> 부모 항체		
Mab 5D5	54	44
B) 이중특이적 <ErbB1-cMet > 항체		
BsAB01	114	-14

[0431] **실시예 10:**

[0432] **이중특이적 HER1/c-Met 항체의 당조작형의 제조**

[0433] 이중특이적 HER1/c-Met 항체의 DNA 서열을 합성 폴리A 위치의 상류 및 MPSV 프로모터의 제어 하 포유류 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다 (각각의 벡터는 EBV OriP 서열을 수반함).

[0434] 인산칼슘-트랜스펙션 접근법을 사용하여 HEK293-EBNA 세포를 포유류 이중특이적 항체 발현 벡터로 동시-트랜스펙션시켜 이중특이적 항체를 제조하였다. 지수 증식하는 HEK293-EBNA 세포를 인산칼슘 방법에 의해 트랜스펙션시켰다. 당조작 항체의 제조를 위해서, 세포를 2 개의 추가적인 플라스미드로 동시-트랜스펙션시켰는데, 각각 4:4:1:1 의 비에서, 하나는 융합 GnTIII 폴리펩티드 발현용 (GnT-III 발현

벡터) 이고 하나는 만노시다아제 II 발현용 (골지 (Golgi) 만노시다아제 II 발현 벡터) 이었다. 세포를 10% FCS 가 보충된 DMEM 배양 배지를 사용하여 T 플라스크에서 부착성 단일층 배양물로서 성장시키고, 이를 50 내지 80% 합류일 때 트랜스펙션시켰다. T150 플라스크의 트랜스펙션을 위해서, FCS 가 보충된 DMEM 배양 배지 25 ml (10% V/V 최종) 에서 트랜스펙션하기 24 시간 전에 1500 만 개의 세포를 시딩하고, 5% CO₂ 대기를 갖는 인큐베이터 내에 37°C 에서 세포를 밤새 두었다. 트랜스펙션할 각각의 T150 플라스크에 대해서, 경쇄 및 중쇄 발현 벡터 사이에 동등하게 분리된 94 µg 총 플라스미드 벡터 DNA, 최종 부피 469 µl 에 대한 물 및 469 µl 의 1M CaCl₂ 용액을 혼합하여 DNA, CaCl₂ 및 물의 용액을 제조하였다. 상기 용액에, 938 µl 의 50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄ 용액 (pH 7.05) 을 첨가하고, 즉시 10 초 동안 혼합하고, 20 초 동안 실온에서 정치시켰다. 현탁액을 2% FCS 가 보충된 10 ml 의 DMEM 으로 희석하고, 존재하는 배지 대신 T150 에 첨가하였다. 이후 추가적인 13 ml 의 트랜스펙션 배지를 첨가하였다. 세포를 약 17 내지 20 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 에서 인큐베이션한 후, 배지를 25 ml DMEM, 10% FCS 로 대체하였다. 조건화된 배양 배지를 트랜스펙션 7 일 후 210 x g 에서 15 분 동안 원심분리에 의해 수확하고, 용액을 멸균 여과 (0.22 µm 필터) 하고 최종 농도 0.01% w/v 의 나트륨 아자이드를 첨가하고, 4°C 에서 유지시켰다.

[0435] 분비된 이중특이적 아포큐슬레이션된 (afocusylated) 당조작 항체를 단백질 A 친화도 크로마토그래피, 이후 양이온 교환 크로마토그래피 및 Superdex 200 컬럼 (Amersham Pharmacia) 상의 최종 크기 배제 크로마토그래피 단계 (25 mM 인산칼륨, 125 mM 염화나트륨, 100 mM 글리신 용액 (pH 6.7) 으로 완충액을 교체하고 순수 단량체 IgG1 항체를 수집함) 에 의해 정제하였다. 280 nm 에서의 흡광도로부터 분광광도계를 사용하여 항체 농도를 추정하였다.

[0436] 항체의 Fc 부위에 부착된 올리고당을 기재된 바와 같이 MALDI/TOF-MS 에 의해 분석하였다. PVDF 멤브레인 상에서 또는 용액 내에서 고정되는 항체로, 올리고당을 PNGaseF 소화에 의해 항체로부터 효소적으로 방출시켰다. 방출된 올리고당을 함유하는 생성된 소화 용액을 MALDI/TOF-MS 분석을 위해 직접적으로 제조하거나, MALDI/TOF-MS 분석을 위한 샘플 제조 전에 EndoH 글리코시다아제로 추가 소화시켰다.

[0437] **실시예 11:**

[0438] **이중특이적 HER1/c-Met 항체의 당구조 분석**

[0439] 푸코오스- 및 비-푸코오스 (a-푸코오스) 함유 올리고당 구조의 상대비를 측정하기 위해서, 정제된 항체 물질의 방출된 글리칸을 MALDI-Tof-질량분석에 의해 분석하였다. 이를 위해, 항체 샘플 (약 50 µg) 을 0.1 M 인산 나트륨 완충액 (pH 6.0) 중 5 mU N-글리코시다아제 F (Prozyme# GKE-5010B) 와 함께 37°C 에서 밤새 인큐베이션하여, 단백질 골격으로부터 올리고당을 방출시켰다. 이후, NuTip-Carbon 피펫 팁 (Glygen 에서 입수: NuTip1-10 µl, 카탈로그 번호 NTICAR) 을 사용하여, 방출된 글리칸 구조를 단리하고 탈염하였다. 제 1 단계로서, 3 µl 1 M NaOH 이후 20 µl 순수 (예를 들어 Baker 사로부터의 HPLC-구배 등급, # 4218), 3 µl 30% v/v 아세트산 및 다시 20 µl 순수로 세척하여, NuTip-Carbon 피펫 팁을 올리고당 결합을 위해 제조하였다. 이를 위해, 각각의 용액을 NuTip-Carbon 피펫 팁 내 크로마토그래피 물질의 상부에 로딩하고 이를 통해 밀어넣었다. 이후, 상기 기재된 N-글리코시다아제 F 소화물을 4 내지 5 회 밀어올리고 내려, 10 µg 항체에 상응하는 글리칸 구조를 NuTip-Carbon 피펫 팁 내 물질에 결합시켰다. NuTip-Carbon 피펫 팁 내 물질에 결합한 글리칸을 상기 기재된 방법으로 20 µl 순수로 세척하고, 각각 0.5 µl 10% 및 2.0 µl 20% 아세트오니트릴로 점차적으로 용리하였다. 상기 단계에 대해서, 용리 용액을 0.5 ml 반응 바이알에 채우고, 각각 4 내지 5 회 밀어올리고 내렸다. MALDI-Tof 질량분석에 의한 분석을 위해, 용리물 모두를 조합하였다. 상기 측정을 위해, 0.4 µl 의 조합된 용리물을 MALDI 표적 상에서 1.6 µl SDHB 매트릭스 용액 (5 mg/ml 에서 20% 에탄올/5 mM NaCl 에 용해한 2,5-디히드록시벤조산/2-히드록시-5-메톡시벤조산 [Bruker Daltonics #209813]) 과 혼합하고, 적합하게 조정된 Bruker Ultraflex TOF/TOF 기기로 분석하였다. 일상적으로, 50-300 샷을 기록하고 단일 실험으로 요약하였다. 수득한 스펙트럼을 flex 분석 소프트웨어 (Bruker Daltonics) 에 의해 평가하고, 검출한 각각의 피크에 대해 질량을 측정하였다. 이후, 각각의 구조 (예를 들어, 각각 푸코오스를 갖고 푸코오스를 갖지 않는 복합체, 수소화물 및 올리고- 또는 고-만노오스) 에 대해 계산한 질량 및 이론적 예측 질량을 비교하여, 푸코오스 또는 a-푸코오스 (비-푸코오스) 함유 글리콜 구조에 대해 피크를 할당하였다.

[0440] 수소화물 구조의 비율 측정을 위해, 항체 샘플을 N-글리코시다아제 F 및 엔도-글리코시다아제 H 로 부수적으로 소화시켰다. N-글리코시다아제 F 는 단백질 골격으로부터 모든 N-연결 글리칸 구조 (복합체, 수소화물 및 올리고- 및 고 만노오스 구조) 를 방출하며, 엔도-글리코시다아제 H 는 글리칸의 환원 말단에서의 2 개의

GlcNAc-잔기 사이에서 추가적으로 모든 수산화물 유형 글리칸을 절단한다. 이러한 소화물을 이후 N-글리코시다아제 F 소화 샘플에 대해 상기 기재된 바와 동일한 방법으로 처리하고 MALDI-Tof 질량분석에 의해 분석하였다. N-글리코시다아제 F 소화물, 및 조합된 N-글리코시다아제 F / 엔도 H 소화물로부터의 패턴을 비교함으로써, 특이적 당 (glyco) 구조의 신호 감소 정도를 수산화물 구조의 상대적 함량을 추정하는데 사용하였다.

[0441] 각각의 당구조의 상대량을 개별적인 글리콜 구조의 피크 높이 및 검출된 모든 당 구조의 피크 높이 합치 비로부터 계산하였다. 푸코오스의 양은 N-글리코시다아제 F 처리된 샘플 (예를 들어, 각각 복합체, 수산화물 및 올리고- 및 고-만노오스 구조) 에서 확인된 모든 당 구조에 대한 푸코오스-함유 구조의 백분율이다. 아푸코실화량은 N-글리코시다아제 F 처리된 샘플 (예를 들어, 각각 복합체, 수산화물 및 올리고- 및 고-만노오스 구조) 에서 확인된 모든 당 구조에 대한 푸코오스-결핍 구조의 백분율이다.

[0442] **실시예 12:**

[0443] **HER1/cMet 이중특이적 항체로의 처리 후 세포 이동의 분석**

[0444] 활성 c-Met 신호전달의 한 중요한 양상은 이동성 및 침습성 프로그램의 유도이다. c-Met 저해 항체의 효능은 HGF-유도 세포 이동의 저해를 측정함으로써 측정될 수 있다. 이러한 목적을 위해, HGF-유도성 암 세포주 A431 을 이중특이적 항체 또는 IgG 대조군 항체의 부재 또는 존재 하에 HGF 로 처리하고, 임피던스 정보관독을 갖는 CIM-플레이트를 사용하여 Acea 실시간 세포 분석기 상에서 시간 의존적 방법으로 8 μ m 포어를 통과해 이동하는 세포 수를 측정하였다.

[0445] **실시예 13:**

[0446] **이중특이적 HER1/c-Met 항체의 시험관내 ADCC**

[0447] 본 발명에 따른 HER1/cMet 이중특이적 항체는 두 수용체 모두를 발현하는 세포 상에서 감소된 내재화를 나타낸다 (상응하는 단일특이적 부모 c-MET 항체와 비교할 때). 감소된 내재화는, 세포 표면 상 항체-수용체 복합체의 연장된 노출이 Nk 세포에 의해 인지되는 경우가 더 많다는 것으로서, 이들 항체를 당조작하기 위한 이론적 설명을 강력하게 지지한다. 감소된 내재화 및 당조작은 부모 항체에 비해 증강된 항체 의존적 세포 독성 (ADCC) 으로 환언된다. 세포 표면 상에서 HER1 및 cMet 를 모두 발현하는 암 세포, 예를 들어 A431, 및 Nk 세포주 또는 PBMC 와 같은 효과기 세포를 사용하여, 이러한 효과를 입증하기 위한 시험관내 실험 기구를 설계할 수 있다. 종양 세포를 부모 단일특이적 항체 또는 이중특이적 항체와 함께 24 시간까지 동안 예비인큐베이션한 후 효과기 세포주를 첨가하였다. 세포 용해를 정량화하고 단일- 및 이중특이적 항체를 판별하였다.

[0448] 표적 세포, 예를 들어 PC-3 (DSMZ #ACC 465, 전립선 샘암종, Ham's F12 영양 혼합물 + 2 mM L-알라닌-L-글루타민 + 10% FCS 에서 배양) 을 지수 증식상에서 트립신/EDTA (Gibco # 25300-054) 로 수집하였다. 세척 단계 및 세포 수 및 생육성 확인 후 필요한 분취액을 칼세인 (Invitrogen #C3100MP; 1 바이알을 5 ml 배지 중 5 Mio 세포에 대해 50 μ l DMSO 에 재현탁하였음) 과 함께 세포 인큐베이터에서 37°C 에서 30 분 동안 라벨링하였다. 이후, 세포를 AIM-V 배지로 3 회 세척하고, 세포 수 및 생육성을 확인하고 세포 수를 0.3 Mio/ml 으로 조정하였다.

[0449] 그 사이, 효과기 세포로서의 PBMC 를 제조사의 프로토콜에 따라 밀도 구배 원심분리 (Histopaque-1077, Sigma # H8889) 에 의해 제조하였다 (각각, 400g 에서 1x 및 350g 에서 2x 10 분 세척 단계). 세포 수 및 생육성을 확인하고 세포 수를 15 Mio/ml 로 조정하였다.

[0450] 100 μ l 칼세인-염색된 표적 세포를 둥근 바닥 96-웰 플레이트에 플레이팅하고, 50 μ l 희석 항체를 첨가하고 50 μ l 효과기 세포를 첨가하였다. 일부 실험에서 표적 세포를 10 mg/ml Redimune 의 농도에서 Redimune[®] NF 액체 (ZLB Behring) 와 혼합하였다.

[0451] 자연 발생적 용해를 제공하는 대조군으로서, 항체 없이 표적 및 효과기 세포를 동시-배양하여 측정하고, 최대 용해를 제공하는 대조군으로서, 표적 세포만의 1% Triton X-100 용해에 의해 측정하였다. 플레이트를 가습 세포 인큐베이터에서 37°C 에서 4 시간 동안 인큐베이션하였다.

[0452] 제조사의 지시사항에 따라 세포독성 검출 키트 (LDH 검출 키트, Roche # 1 644 793) 를 사용하여 손상된 세포로부터 LDH 방출을 측정함으로써 표적 세포의 사멸을 평가하였다. 간략하게는, 각 웰로부터의 100 μ l 상청액을 투명한 편평 바닥 96 웰 플레이트 내에서 키트로부터의 100 μ l 기질과 혼합하였다. 기질의 색 반응의

V_{max} 값을 10 분 이상 동안 490 nm 에서 ELISA 판독기에서 측정하였다. 특이적 항체-매개 사멸의 백분율을 하기와 같이 계산하였다: $((A - SR)/(MR - SR) \times 100$ [식 중, A 는 특이적 항체 농도에서의 V_{max} 의 평균이고, SR 은 자연 발생적 방출의 V_{max} 의 평균이고, MR 은 최대 방출의 V_{max} 의 평균임].

[0453] 실시예 14

[0454] 파라크린 HGF 루프를 갖는 피하 이종이식편 모델에서의 이중특이적 HER1 / cMet 항체의 생체내 효능

[0455] Mrc-5 세포와 동시주사한 피하 A549 모델은 c-Met 에 대한 파라크린 활성 루프를 모방한다. A549 는 c-Met 뿐 아니라 HER1 를 세포 표면 상에 발현한다. A549 및 Mrc-5 세포를 대수 생장상에서 표준 세포 배양 조건 하에 유지시켰다. A549 및 Mrc-5 세포를 천만개 A549 세포 및 백만개 Mrc-5 로 10:1 비로 주사하였다. 세포를 SCID 베이지 마우스에 이식하였다. 종양이 확립되고 100-150 mm³ 크기에 도달한 후 처리를 시작하였다. 마우스를 20 mg/kg 의 항체 / 마우스의 로딩 용량으로 처리한 후 10 mg/kg 의 항체 / 마우스로 1 주 1 회 처리하였다. 종양 부피를 1 주 2 회 측정하고 동물의 체중을 병행하여 모니터링하였다. 단일 처리 및 단일 항체의 조합을 이중특이적 항체로의 치료요법과 비교하였다.

[0456] 실시예 15

[0457] 파라크린 HGF 루프를 갖는 피하 이종이식편 모델에서의 이중특이적 HER1 / cMet 항체의 생체내 효능

[0458] Mrc-5 세포와 동시주사한 피하 A431 모델은 c-Met 에 대한 파라크린 활성 루프를 모방한다. A431 는 c-Met 뿐 아니라 HER1 를 세포 표면 상에 발현한다. A431 및 Mrc-5 세포를 대수 생장상에서 표준 세포 배양 조건 하에 유지시켰다. A431 및 Mrc-5 세포를 천만개 A431 세포 및 백만개 Mrc-5 로 10:1 비로 주사하였다. 세포를 SCID 베이지 마우스에 이식하였다. 종양이 확립되고 100-150 mm³ 크기에 도달한 후 처리를 시작하였다. 마우스를 20 mg/kg 의 항체 / 마우스의 로딩 용량으로 처리한 후 10 mg/kg 의 항체 / 마우스로 1 주 1 회 처리하였다. 종양 부피를 1 주 2 회 측정하고 동물의 체중을 병행하여 모니터링하였다. 단일 처리 및 단일 항체의 조합을 이중특이적 항체로의 치료요법과 비교하였다.

[0459] 실시예 16

[0460] 이중특이적 Her1/c-Met 항체에 의한 OVCAR-8 증식의 저해

[0461] a) OVCAR-8 세포는 유세포측정에서 독립적으로 확인한 바와 같이 HER1 의 높은 표면 수준 및 c-Met 의 중간으로 높은 세포 표면 발현을 나타내었다. 이중특이적 HER1/c-Met 항체에 의한 OVCAR-8 세포 증식의 저해를 48 시간 후 CellTiterGlowTM 검정에서 측정하였다. 결과를 도 10a 에 나타내었다. 대조군은 PBS 완충액이었다.

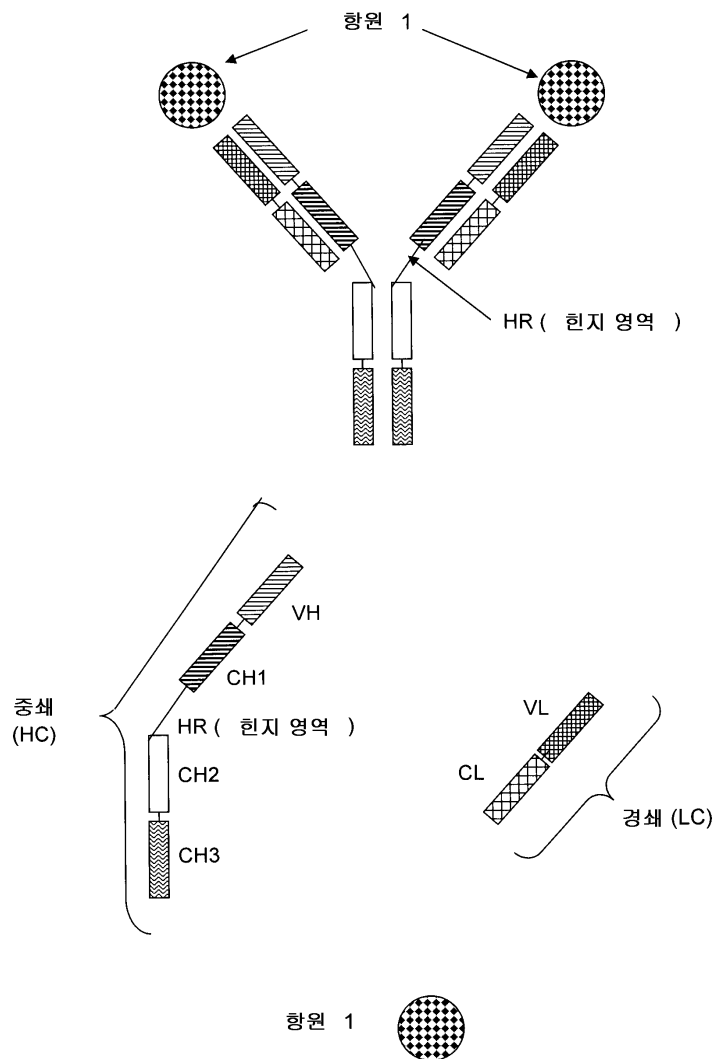
[0462] EGFR 항체 세투시맵은 저해를 나타내지 않았다 (0% 저해로 설정한 완충액 대조군과 비교하여). 이중특이적 HER1/c-Met BsAB01 (BsAb) 항체는 암 세포 증식의 작지만 유의한 저해를 유발하였다 (8% 저해). 1 가 c-Met 항체 1-완 5D5 (OA5D5) 는 증식에 대해 효과를 나타내지 않았다. EGFR 항체 세투시맵 및 1 가 c-Met 항체 1-완 5D5 (OA5D5) 의 조합은 증식의 감소를 거의 초래하지 않았다 (2% 저해).

[0463] b) OVCAR-8 는 HGF 로 추가로 자극될 수 있다. 활성 EGFR - c-Met-수용체 신호전달 네트워크가 발생하는 위치를 자극하기 위해, a) 에 기재한 바와 같으나 HGF-조건화 배지의 존재 하에 추가적인 증식 검정을 수행하였다 (48 시간 후 CellTiterGlowTM 검정). 결과를 도 10b 에 나타내었다.

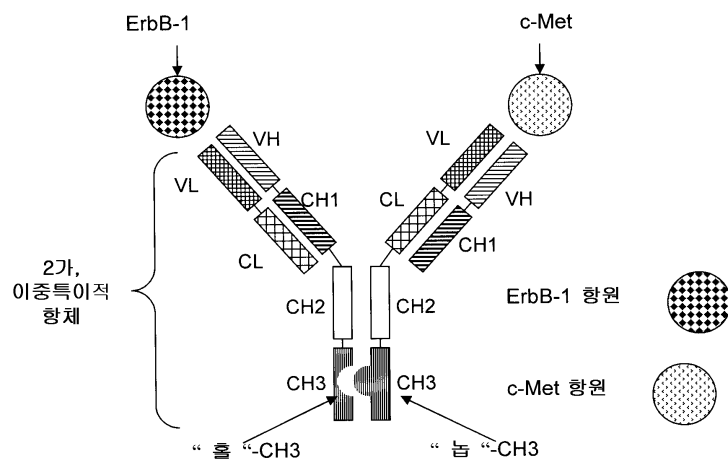
[0464] HGF 의 첨가는 증식의 증가 (10%) 를 초래했다. 0% 저해로 설정된 오직 HGF 만으로 처리된 세포와 비교할 때, EGFR 항체 세투시맵 뿐만 아니라 1가 c-MET 항체 1-완 5D5 (OA5D5) 은 증식에 오직 미미한 저해 효과 (2%, 7%) 를 나타냈다. 이중특이적 HER1/c-Met 항체 BsAB01 (BsAb) (15% 저해) 는 OvcAR-8 세포의 암 세포 증식의 현저한 저해를 나타내었다. EGFR 항체 세투시맵 및 1 가 c-Met 항체 1-완 5D5 (OA5D5) 의 조합은 세포 증식에 있어서 덜 현저한 감소를 유발하였다 (10% 저해).

도면

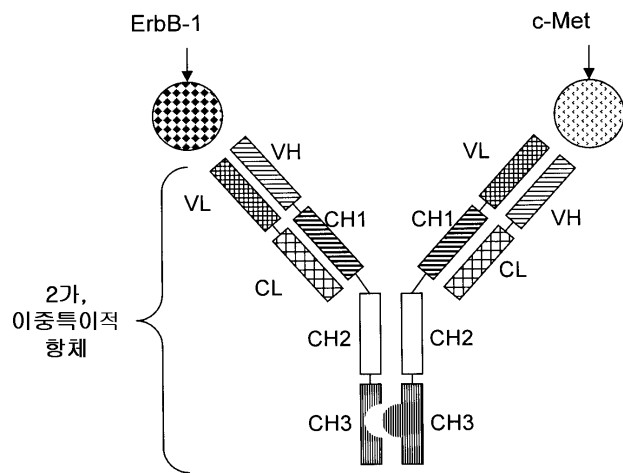
도면1



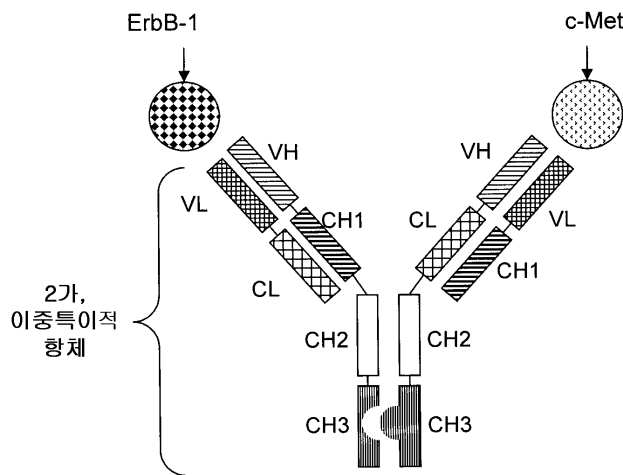
도면2a



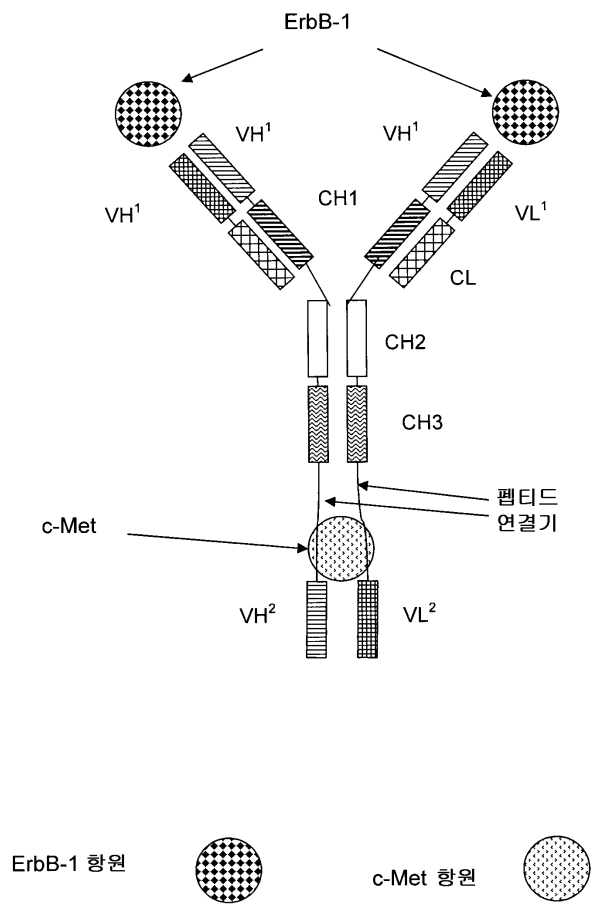
도면2b



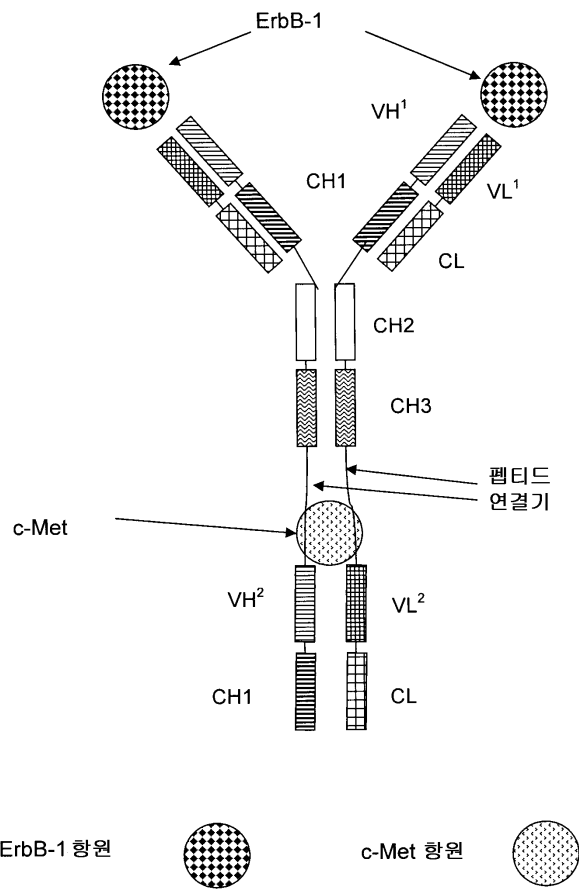
도면2c



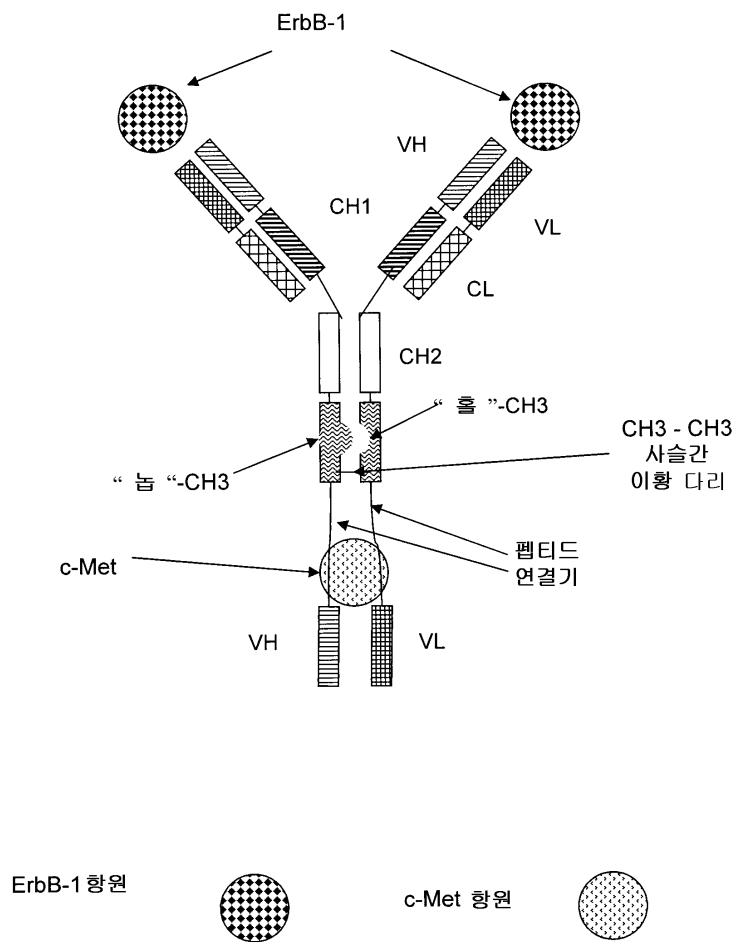
도면3a



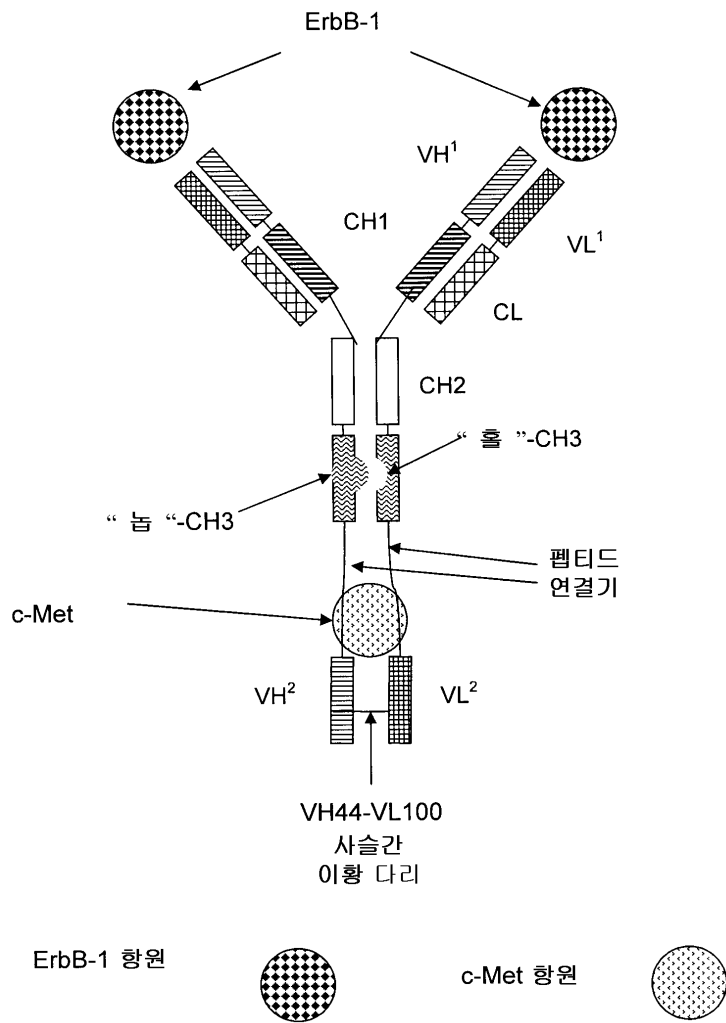
도면3b



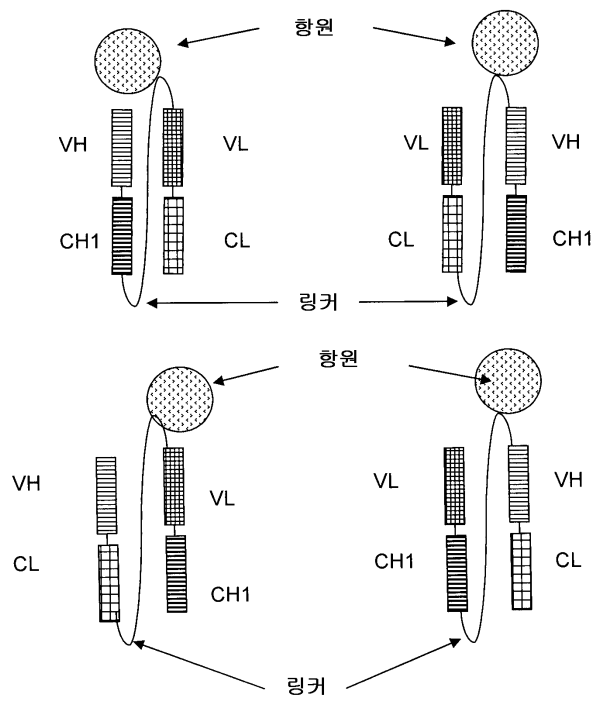
도면3c



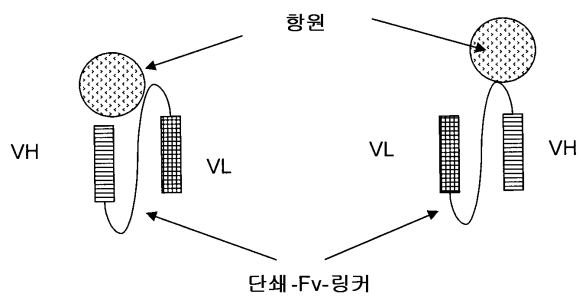
도면3d



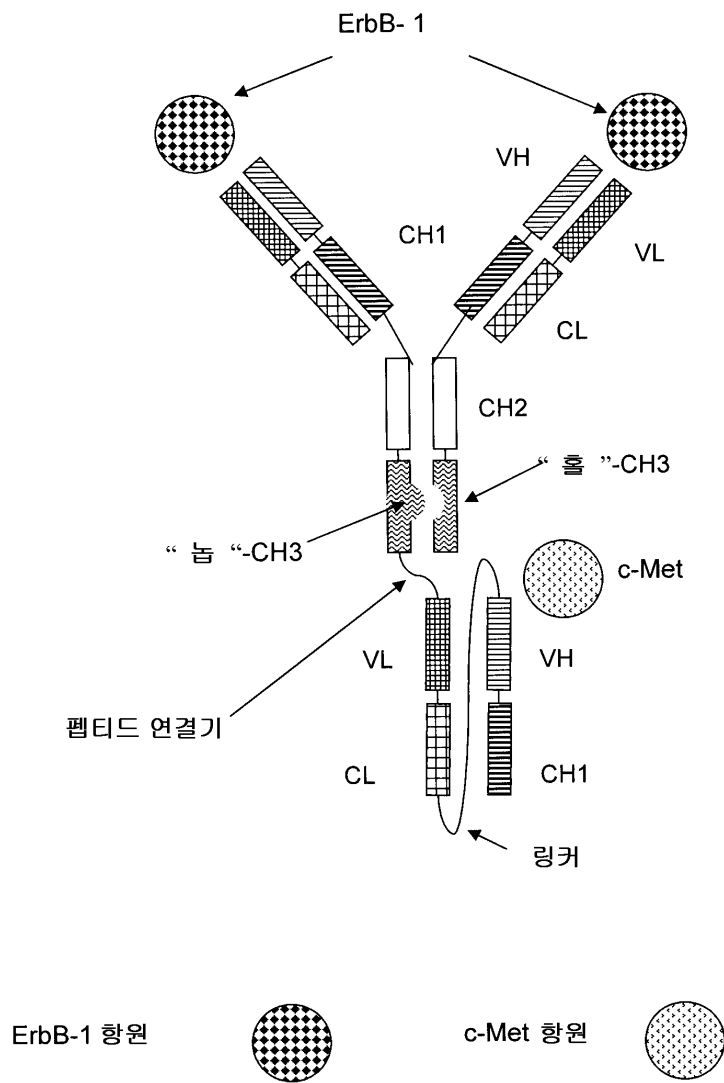
도면4a



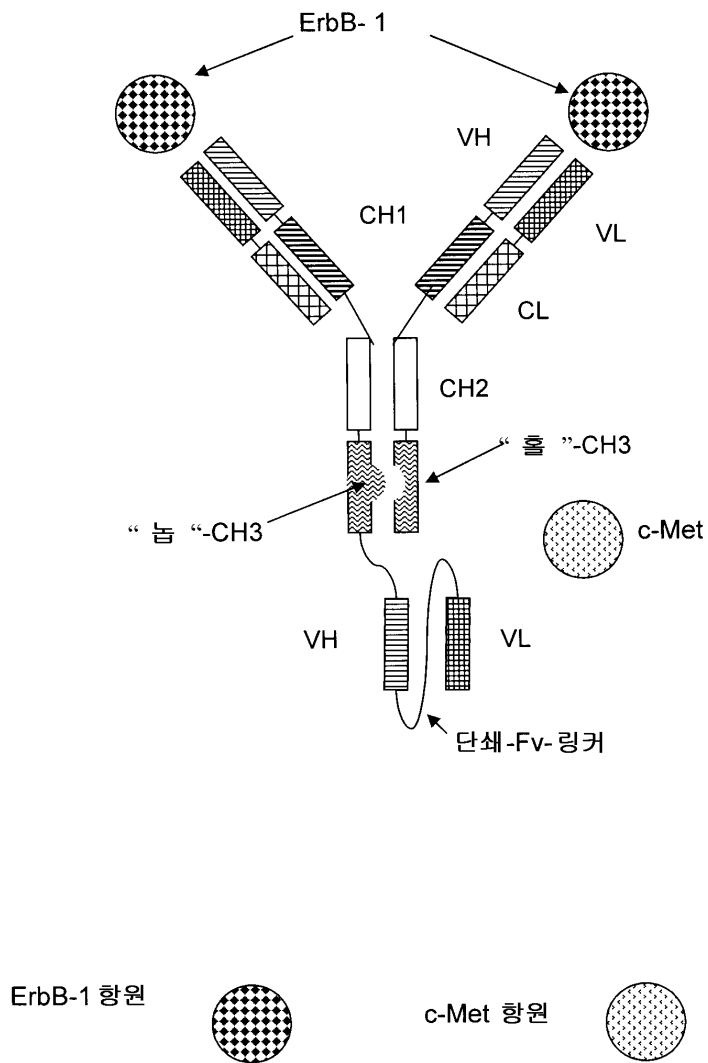
도면4b



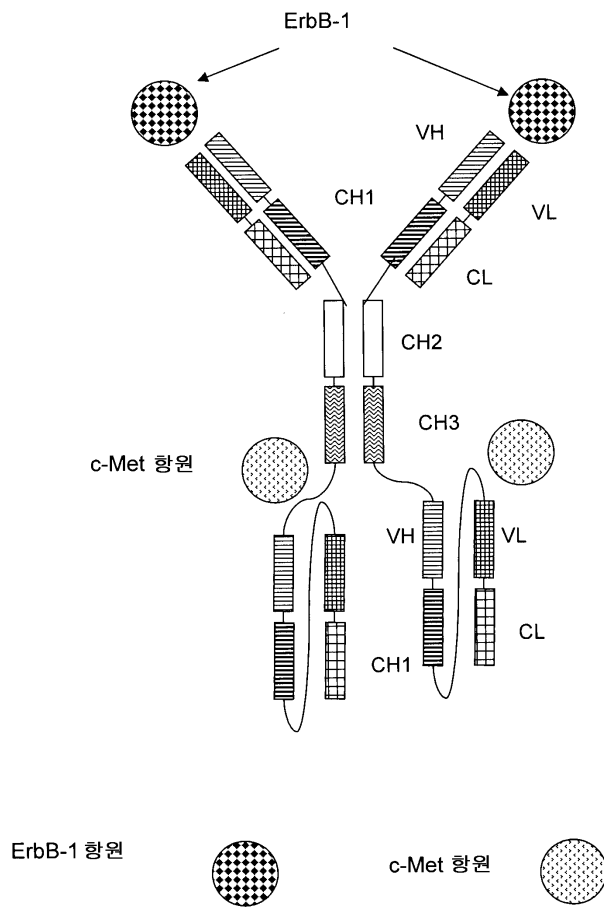
도면5a



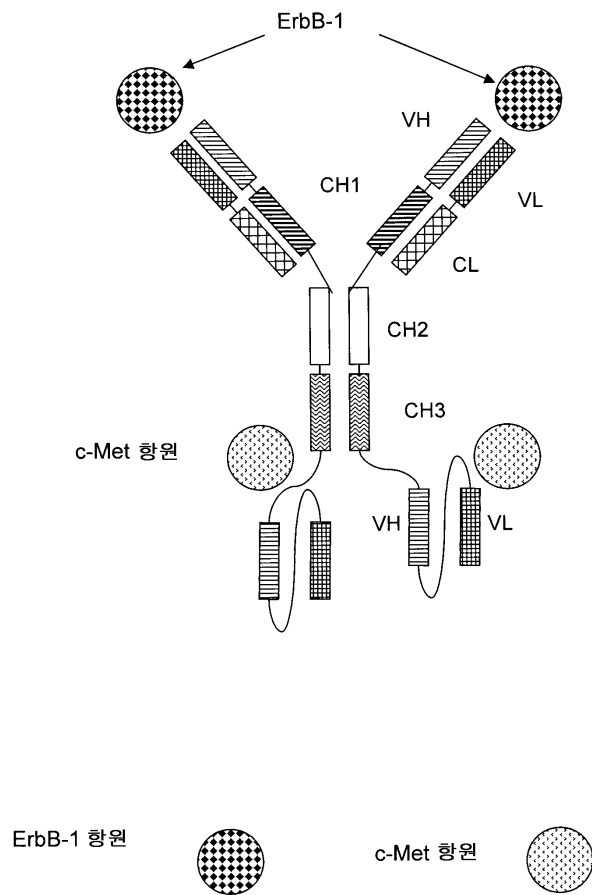
도면5b



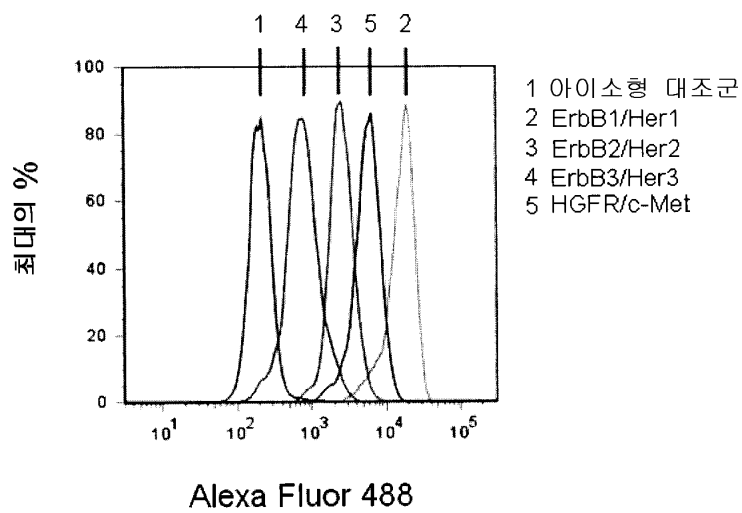
도면6a



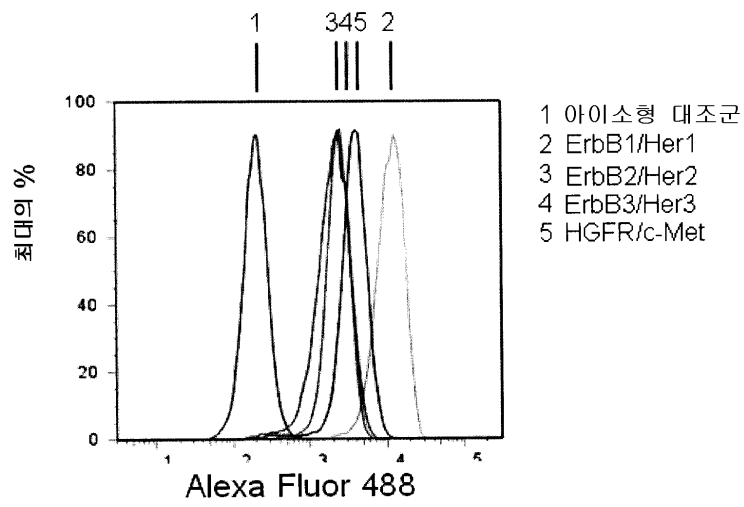
도면6b



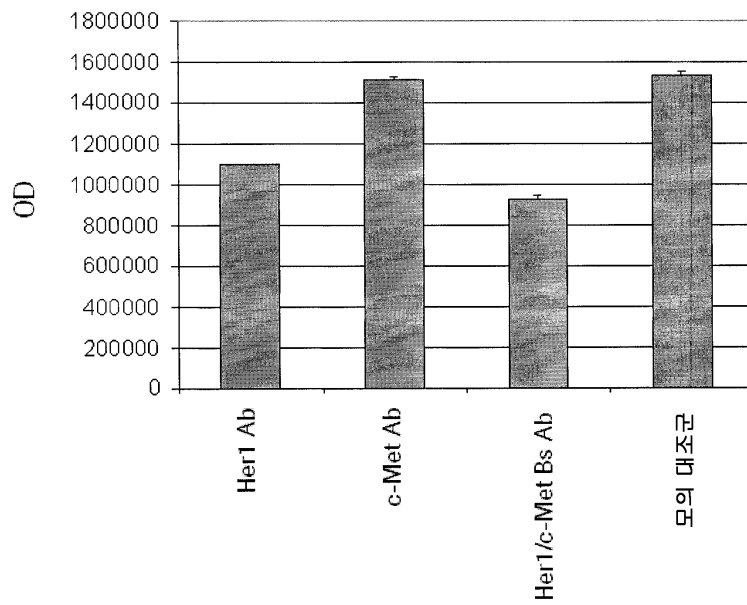
도면7a



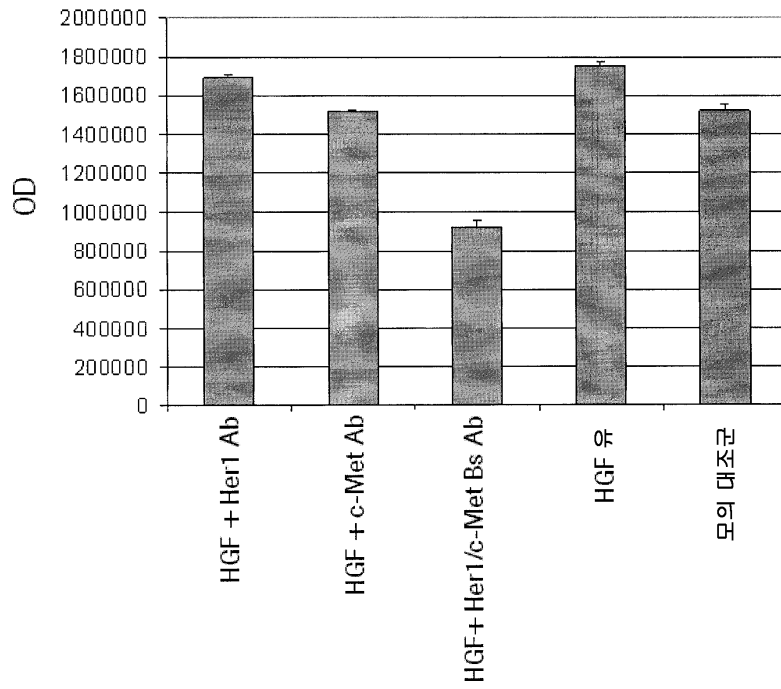
도면7b



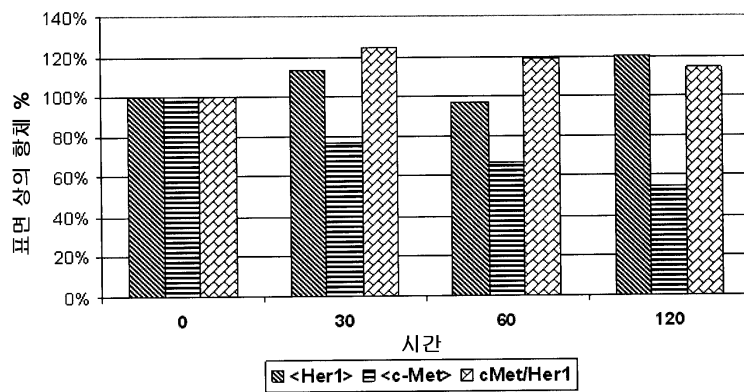
도면8a



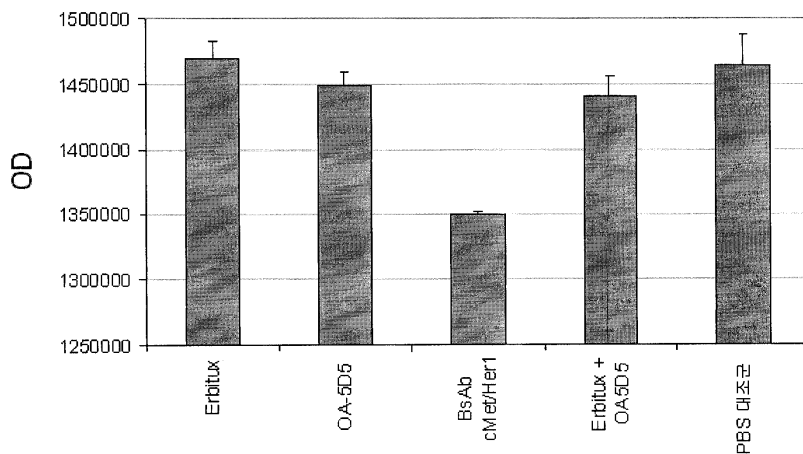
도면8b



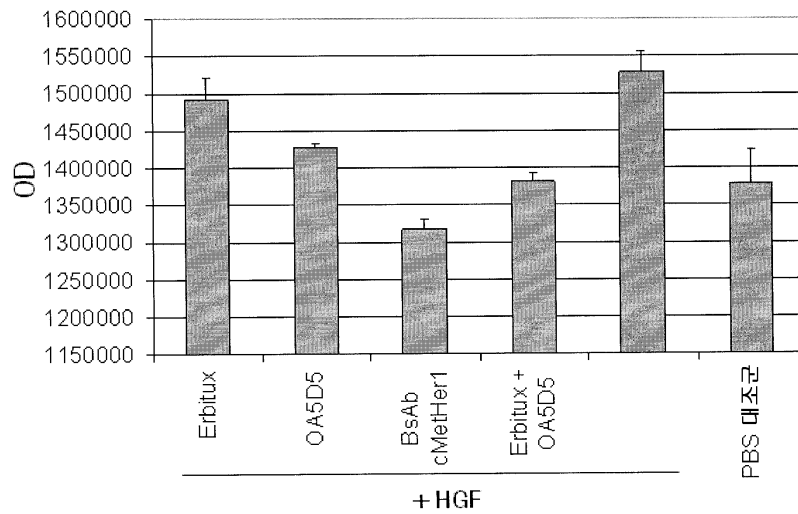
도면9



도면10a



도면10b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Roche Glycart AG

<120> Bispecific anti-ErbB-1/anti-c-Met antibodies

<130> 26066 WO

<150> EP 09005109.5

<151> 2009-04-07

<160> 34

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 1

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr

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

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115
 <210> 2
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 <400> 2

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 3
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain < ErbB-1> humanized ICR62

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain variable domain < ErbB-1> humanized ICR62

<400> 4

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile

35 40 45

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain <c-Met> Mab 5D5

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe

50 55 60
Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain variable domain <c-Met> Mab 5D5

<400> 6

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 7

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain cMet Mab 5D5

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe

50 55 60

Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr				
65					70					75					80				
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
					85					90					95				
Ala	Thr	Tyr	Arg	Ser	Tyr	Val	Thr	Pro	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly				
100					105					110									
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe				
115					120					125									
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu				
130					135					140									
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp				
145					150					155					160				
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu				
165					170					175									
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser				
180					185					190									
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro				
195					200					205									
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys				
210					215					220									
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro				
225					230					235					240				
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser				
245					250					255									
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp				
260					265					270									
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn				
275					280					285									
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val				
290					295					300									
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Gln				

305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
Lys

<210> 8

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain cMet Mab 5D5

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
 20 25 30
Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 9

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain cMet Fab 5D5

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe

50

55

60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115

120

125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130

135

140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145

150

155

160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165

170

175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180

185

190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195

200

205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210

215

220

Thr His

225

<210> 10

<211> 220

<

212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain cMet Fab 5D5

<400> 10

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

165 170 175

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

180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220

<210> 11

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

 <210> 12
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

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

 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125
Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140
Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220
Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320
Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln

355 360 365
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375
 <210> 13
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

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

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

<210> 14
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 1 5 10 15
 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 20 25 30
 Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys

35 40 45
Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
50 55 60
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
65 70 75 80
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys

85 90 95
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100

<210> 15

<211> 1390

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

35 40 45
Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
50 55 60
Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys
65 70 75 80
Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
85 90 95
Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp

100 105 110
Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
115 120 125
Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
130 135 140

Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
145 150 155 160
Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
165 170 175
Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
180 185 190
Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
195 200 205
His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
210 215 220
Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
225 230 235 240
Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
245 250 255
Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
260 265 270
Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
275 280 285
His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
290 295 300
Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
305 310 315 320
Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
325 330 335
Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
340 345 350
Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
355 360 365
Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
370 375 380
Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg

385 390 395 400
 Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
 405 410 415
 Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly

 420 425 430
 Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly
 435 440 445
 Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
 450 455 460
 Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
 465 470 475 480
 Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu

 485 490 495
 Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
 500 505 510
 Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
 515 520 525
 Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys
 530 535 540
 Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile

 545 550 555 560
 Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu
 565 570 575
 Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg
 580 585 590
 Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu
 595 600 605
 Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys

 610 615 620
 Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile
 625 630 635 640

Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
645 650 655

Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly
660 665 670

Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg
675 680 685

His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
690 695 700

Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
705 710 715 720

Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
725 730 735

Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
740 745 750

Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn
755 760 765

Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg
770 775 780

Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys
785 790 795 800

Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys
805 810 815

Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp
820 825 830

Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val
835 840 845

Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp
850 855 860

Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys
865 870 875 880

Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val

885	890	895
Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys		
900	905	910
Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp		
915	920	925
Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Thr Ala		
930	935	940
Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln		
945	950	955
Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His		
965	970	975
Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro Thr		
980	985	990
Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala Thr Phe Pro		
995	1000	1005
Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln		
1010	1015	1020
Val Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu Thr Ser Gly		
1025	1030	1035
Asp Ser Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val His Ile		
1040	1045	1050
Asp Leu Ser Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His		
1055	1060	1065
Val Val Ile Gly Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe Asn Glu Val		
1070	1075	1080
Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys Val Tyr His Gly Thr Leu Leu		
1085	1090	1095
Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile His Cys Ala Val Lys Ser Leu Asn		
1100	1105	1110
Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val Ser Gln Phe Leu Thr Glu Gly		
1115	1120	1125

Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser	His Pro Asn Val Leu	Ser Leu Leu
1130	1135	1140
Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu	Gly Ser Pro Leu Val	Val Leu Pro
1145	1150	1155
Tyr Met Lys His Gly Asp Leu	Arg Asn Phe Ile Arg	Asn Glu Thr
1160	1165	1170
His Asn Pro Thr Val Lys Asp	Leu Ile Gly Phe Gly	Leu Gln Val
1175	1180	1185
Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu	Ala Ser Lys Lys Phe	Val His Arg
1190	1195	1200
Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys	Met Leu Asp Glu Lys	Phe Thr Val
1205	1210	1215
Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu	Ala Arg Asp Met Tyr	Asp Lys Glu
1220	1225	1230
Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys	Thr Gly Ala Lys Leu	Pro Val Lys
1235	1240	1245
Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu	Gln Thr Gln Lys Phe	Thr Thr Lys
1250	1255	1260
Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly	Val Leu Leu Trp Glu	Leu Met Thr
1265	1270	1275
Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro	Asp Val Asn Thr Phe	Asp Ile Thr
1280	1285	1290
Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg	Arg Leu Leu Gln Pro	Glu Tyr Cys
1295	1300	1305
Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val	Met Leu Lys Cys Trp	His Pro Lys
1310	1315	1320
Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe	Ser Glu Leu Val Ser	Arg Ile Ser
1325	1330	1335
Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile	Gly Glu His Tyr Val	His Val Asn
1340	1345	1350
Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys	Cys Val Ala Pro Tyr	Pro Ser Leu

1355 1360 1365
 Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp Thr Arg Pro
 1370 1375 1380
 Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser
 1385 1390
 <210> 16
 <211> 1210
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
 20 25 30
 Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
 35 40 45
 Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
 50 55 60
 Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
 65 70 75 80
 Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
 85 90 95
 Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
 100 105 110
 Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
 115 120 125
 Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
 130 135 140
 His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
 145 150 155 160
 Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
 165 170 175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
180 185 190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
195 200 205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
210 215 220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
225 230 235 240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
245 250 255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
260 265 270

Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
275 280 285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
290 295 300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
305 310 315 320

Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
325 330 335

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
340 345 350

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
355 360 365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
370 375 380

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
385 390 395 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
405 410 415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln

420 425 430
 His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
 435 440 445
 Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
 450 455 460
 Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu

 465 470 475 480
 Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
 485 490 495
 Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
 500 505 510
 Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
 515 520 525
 Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly

 530 535 540
 Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
 545 550 555 560
 Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
 565 570 575
 Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
 580 585 590
 Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp

 595 600 605
 Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
 610 615 620
 Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
 625 630 635 640
 Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu
 645 650 655
 Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His

 660 665 670

Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
675 680 685

Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
690 695 700

Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
705 710 715 720

Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
725 730 735

Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
740 745 750

Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
755 760 765

Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
770 775 780

Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
785 790 795 800

Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
805 810 815

Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
820 825 830

Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
835 840 845

Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
850 855 860

Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
865 870 875 880

Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
885 890 895

Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
900 905 910

Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu

915	920	925	
Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr			
930	935	940	
Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys			
945	950	955	960
Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln			
965	970	975	
Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro			
980	985	990	
Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp			
995	1000	1005	
Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe			
1010	1015	1020	
Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu			
1025	1030	1035	
Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn			
1040	1045	1050	
Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg			
1055	1060	1065	
Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp			
1070	1075	1080	
Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro			
1085	1090	1095	
Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln			
1100	1105	1110	
Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro			
1115	1120	1125	
His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln			
1130	1135	1140	
Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala			
1145	1150	1155	

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

1160 1165 1170
Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys
1175 1180 1185
Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln
1190 1195 1200
Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
1205 1210

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 17

Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 18

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser

1 5 10 15

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 19

Asn Tyr Gly Val His

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 20

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr

1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 21

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser

1 5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His

1 5 10

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR3H, <ErbB-1> humanized ICR62

<400> 23

Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala

1 5 10

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR2H, <ErbB-1> humanized ICR62

<400> 24

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR1H, <ErbB-1> humanized ICR62

<400> 25

Asp Tyr Lys Ile His

1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR3L, <ErbB-1> humanized ICR62

<400> 26

Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr

1 5

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR2L, <ErbB-1> humanized ICR62

<400> 27

Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr

1 5

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR1L, <ErbB-1> humanized ICR62

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 29
<211> 10
<212> PRT

<213> Artificial
<220><223> heavy chain CDR3H, <c-Met> Mab 5D5
<400> 29

Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 30
<211> 17
<212> PRT

<213> Artificial
<220><223> heavy chain CDR2H, <c-Met> Mab 5D5
<400> 30

Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 31
<211> 5
<212> PRT

<213> Artificial
<220><223> heavy chain CDR1H,
<c-Met> Mab 5D5

<400> 31
Ser Tyr Trp Leu His
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial
<220><223> light chain CDR3L, <c-Met> Mab 5D5
<400> 32

Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR2L, <c-Met> Mab 5D5

<400> 33

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><

223> light chain CDR1L, <c-Met> Mab 5D5

<400> 34

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala