



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0078600  
(43) 공개일자 2025년06월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/2863 (2013.01)  
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2025-7016475(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2019년10월07일  
심사청구일자 2025년05월20일
- (62) 원출원 특허 10-2021-7013513  
원출원일자(국제) 2019년10월07일  
심사청구일자 2022년05월18일
- (85) 번역문제출일자 2025년05월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2019/077116
- (87) 국제공개번호 WO 2020/074459  
국제공개일자 2020년04월16일
- (30) 우선권주장  
102018000009282 2018년10월09일 이탈리아(IT)

- (71) 출원인  
피에르 파브르 메디카먼트  
프랑스, 81500 라보르 레 꼬끼오
- (72) 발명자  
비그나, 엘리사  
이탈리아 아이-10090 빌라르바쎄 (토리노) 비아 데이 플라타니 29/2  
바실리코, 크리스티나  
이탈리아 아이-10020 파바롤로 (토리노) 비아 피라발레 5  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
한인열

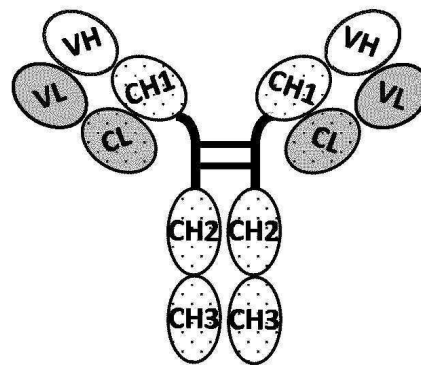
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **종양 및/또는 전이의 치료를 위한 항-Met Fab-Fc**

(57) 요약

단일 항원 결합 아암 및 Fc 영역을 포함하는 항-Met 항체 단편이며, 여기서 항원 결합 아암은 서열식별번호: 7, 8에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 가지는 가변 영역에 의해 규정되고, 항-Met 항체 단편은 종양 및/또는 전이의 치료에 유용하다.

대표도



DN30 mAb

(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)  
C07K 2317/24 (2013.01)  
C07K 2317/33 (2013.01)  
C07K 2317/35 (2013.01)  
C07K 2317/52 (2013.01)  
C07K 2317/526 (2013.01)  
C07K 2317/55 (2013.01)  
C07K 2317/73 (2013.01)

**코모글리오, 파올로 마리아**

이탈리아 아이-10020 아리그나노 (토리노) 비아 델  
라 발레 10

(72) 발명자

**크레팔디, 티지아나**

이탈리아 아이-10153 토리노 룬고 도라 피렌체 151

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

조합 요법제(combination therapy)로서,

하기를 포함하는 항-Met 항체 단편로서:

단일 항원 결합 아암 및

Fc 영역,

여기서 Fc 영역은 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드의 복합체를 포함하고, 상기 항체 단편은

(i) 하나의 인간화된 경쇄 가변 (VL) 도메인 및 하나의 인간 경쇄 불변 (CL) 도메인을 포함하며, 여기서 인간화된 VL 도메인은 인간 CL 도메인에 N-에서 C-말단 방향으로 융합되는, 제1 폴리펩티드;

(ii) 하나의 인간화된 중쇄 가변 (VH) 도메인, 하나의 인간 중쇄 불변 CH1 도메인 및 제1 Fc 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 제1 Fc 폴리펩티드는 하나의 힌지 영역, 하나의 인간 불변 CH2 도메인 및 하나의 인간 CH3 불변 도메인을 포함하고, 여기서 인간화된 VH 도메인은 인간 CH3 도메인에 융합된 인간 CH2 도메인에 융합된 인간 힌지 영역에 융합된 인간 CH1 도메인에 N-에서 C-말단 방향으로 융합되는, 제2 폴리펩티드; 및

(iii) 제2 인간 Fc 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 제2 인간 Fc 폴리펩티드는 하나의 인간 힌지 영역, 하나의 인간 불변 CH2 도메인 및 하나의 인간 CH3 불변 도메인을 포함하고, 여기서 인간 힌지 영역은 인간 CH3 도메인에 융합된 CH2 도메인에 N-에서 C-말단 방향으로 융합되고, 여기서 인간 힌지 영역은 N-말단에서 말단절단된 것인 제3 폴리펩티드를 포함하는 상기 항체 단편; 및

또 다른 항체, 소형 분자 티로신 키나제 억제제, 화학치료제(들), 다른 세포독성 작용제(들), 항-혈관생성 작용제(들), 시토카인 및/또는 성장 억제제(들);을 포함하는 조합 요법제.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인간화된 VL 도메인은 서열식별번호: 1, 2 및 3에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 함유하고, 여기서 인간화된 VL 도메인은 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열로 이루어지고,

상기 인간화된 VH 도메인은 서열식별번호: 4, 5 및 6에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 함유하고, 여기서 인간화된 VH 도메인은 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 것인, 조합 요법제.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 항-Met 항체 단편; 및 상기 또 다른 항체, 소형 분자 티로신 키나제 억제제, 화학치료제(들), 다른 세포독성 작용제(들), 항-혈관생성 작용제(들), 시토카인 및/또는 성장 억제제(들)은 동일 제제에 포함되는, 조합 요법제.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항-Met 항체 단편; 및 상기 또 다른 항체, 소형 분자 티로신 키나제 억제제, 화학치료제(들), 다른 세포독성 작용제(들), 항-혈관생성 작용제(들), 시토카인 및/또는 성장 억제제(들)은 별도 제제에 포함되는, 조합 요법제.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 항-Met 항체 단편은 상기 또 다른 항체, 소형 분자 티로신 키나제 억제제, 화학치료제(들), 다른 세포독성 작용제(들), 항-혈관생성 작용제(들), 시토키인 및/또는 성장 억제제(들) 투여 전 또는 후에 투여되는, 조합 요법제.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 인간 CL 도메인이 인간 경쇄 카파 유형 도메인인 조합 요법제.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 인간 힌지 영역 및 인간 불변 도메인 CH1, CH2 및 CH3이 인간 IgG1로부터의 것인 조합 요법제.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 2개의 Fc 폴리펩티드가 힌지 영역에서 분자간 디설피드 결합을 통하여 연결된 것인 조합 요법제.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 제1 Fc 폴리펩티드와 제2 Fc 폴리펩티드가 경계면에서 만나며, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드 중 하나는 경계면에 노브를 포함하고, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드 중 다른 것은 경계면에 홀을 포함하며, 여기서 노브는 홀 내로 배치가능한 것인 조합 요법제.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드 중 하나가 돌연변이된 CH3 불변 도메인을 포함하며, 여기서 돌연변이된 CH3 불변 도메인은 위치 389에 아미노산 돌연변이를 보유하고, 여기서 위치 389의 원래의 아미노산은 원래의 아미노산에 비해 더 큰 측쇄 부피를 가지는 아미노산을 도입하도록 돌연변이되고; 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드 중 다른 것이 돌연변이된 CH3 불변 도메인을 포함하고, 여기서 돌연변이된 CH3 불변 도메인은 위치 389, 391 및 438에 3개의 아미노산 돌연변이를 보유하고, 여기서 원래의 아미노산은 원래의 아미노산에 비해 더 작은 측쇄 부피를 가지는 아미노산을 도입하도록 돌연변이되고; 여기서 아미노산 번호지정은 카바트의 EU 번호지정 체계에 따른 것인 조합 요법제.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 위치 389, 391 및 438의 원래의 아미노산이 각각 트레오닌, 류신 및 티로신이며; 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드 중 하나에서 위치 389의 트레오닌은 트립토판으로 돌연변이되고; 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드 중 다른 것에서 위치 389의 트레오닌은 세린으로 돌연변이되고, 위치 391의 류신은 알라닌으로 돌연변이되고, 위치 438의 티로신은 발린으로 돌연변이된 것인 조합 요법제.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 인간 CL 도메인이 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열로 이루어지며, 인간 CH1 도메인이 서열식별번호: 10에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 것인 조합 요법제.

**청구항 13**

제1항에 있어서, 제1 인간 Fc 폴리펩티드가 서열식별번호: 11에 제시된 아미노산 서열로 이루어지며, 제2 인간 Fc 폴리펩티드가 서열식별번호: 12에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 것인 조합 요법제.

**청구항 14**

제1항에 있어서, Met에 결합되었을 때 Met의 세포의 도메인의 배출을 유도하는 조합 요법제.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 종양 및/또는 전이로 고통받고 있으며 MET 유전자의 유전자 변형을 보유하는 환자의 치료를 위한 조합 요법제.

**청구항 16**

제1항에 있어서, 종양 및/또는 전이로 고통받고 있으며 야생형 MET 유전자를 보유하는 환자의 치료를 위한 조합 요법제.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 개시내용은 종양 및/또는 전이의 치료를 위한 신규 항체-유래된 치료제에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 암은 체세포 내생 유전자가 돌연변이를 겪는 유전자 질환이다. 암 세포에서는 소수의 유전자 - 종양유전자 및 종양 억제 유전자로 알려져 있음 -만이 변경되어 종양생성을 촉진한다. 활성화된 종양유전자는 촉진인자이며, 불활성화된 종양 억제 유전자는 암 세포 성장의 제동장치 상실이다. 암-야기 돌연변이 유전자의 발견 후, 암 세포가 그의 유전자 변경의 풍부성에도 불구하고 그의 지속적인 증식 또는 생존을 단일 종양유전자 단백질에 계속하여 의존한다는 것을 표시하는 "종양유전자 중독(oncogene addiction)"이라는 종양유전자에 대한 새로운 개념이 출현하였다. 이에 따라, "표적 치료법"을 개발하여 암을 치유하기 위한 새로운 치료상의 반격이 개시되었다. 지난 20년 동안, - 화학 약물 또는 항체를 통한 - 암-유발 돌연변이 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 약학적 표적화는 돌연변이된 세포를 제거하고 암 질환을 퇴치하기 위한 최전선 의료설비를 대표하고 있다. 표적 치료법은 종종 더 적은 부작용으로 통상적인 세포독성 화학치료법에 비해 더 효과적일 것으로 기대된다. 그러나, 그의 종양 내에 변경된 특정 표적 유전자를 보유하는 환자만이 표적 치료법으로부터 이익을 얻을 가능성이 있다. 따라서, 환자 종양의 광범위한 게놈 프로파일링을 통해 약물투여가능한(druggable) 유전자 병소를 평가하는 것과 병행하여, 개인화된 의약이 요구되고 있다.

[0003] MET 종양유전자는 다면발현(pleiotropic) 기능이 부여된 특유의 수용체 티로신 키나제를 코딩한다. 유전적으로 변경되는 경우 (점 돌연변이, 유전자 융합, 전위 및/또는 증폭에 의함), MET는 침습성 성장(invasive growth) 프로그램을 활성화하는 그의 능력으로 인하여, 세포의 형질전환을 개시한다. 이에 따라, 상시성 Met 키나제 과다활성화로 이어지는 MET 유전자 병소는 형질전환된 표현형을 개시하여 유지한다 ("MET 중독")<sup>1</sup>.

[0004] MET 유전자 병소는 대부분의 고형 종양에서 1-4 %의 전체적인 빈도로 출현하여, 그의 키나제 활성을 상향조절할 수 있다<sup>1</sup>. 점 돌연변이는 간세포 성장 인자 (HGF) 리간드 결합 또는 수용체 신호전달에 중요한 도메인 (SEMA 도메인, 막근접(juxtamembrane) 도메인 및 촉매 도메인)에 집중되어 있다. 가장 최근에, 차-세대 서열분석은 비-소세포 폐암의 3 %에서, MET 전사체 막근접 영역의 엑손 생략(skipping) 및 결실로 이어지며, 세린 잔기 (Ser985)가 Met 키나제 활성을 음성으로 조절하고<sup>3</sup> Met 내재화 및 분해에 티로신 잔기 (Tyr1003)가 요구되는<sup>4</sup>, 엑손 14 슬라이스 부위 돌연변이를 찾아내었다<sup>2</sup>.

[0005] MET에 의해 도출되는 "침습성 성장" 프로그램에서, 증식 반응은 이동, 생존, 세포외 매트릭스 분해, 및 세포 극성의 유도과 연계된다<sup>5</sup>. 이러한 생물학적 반응들은 부정적인 조건에 적응하고/거나 더 편한 환경을 찾아 탈출하기 위하여 세포에 의해 경주된다. 적대적인 상황에서, Met는 저산소, 염증성 시토카인, 전구-혈관생성 인자, 미토겐 및 심지어는 HGF 자체와 같은 다양한 자극에 의해 - 전사 상향조절을 통하여 - 과발현된다. 마지막으로, Met는 방사선-유도 DNA 손상 조건에서 과발현되어, DNA 복구의 활성화 및 암 세포의 프로그래밍된 세포 사멸의 회피를 촉진함으로써, 방사선치료법에 대한 내성에 기여한다.

[0006] 선택성이며 강력하고 고도로 효과적인 방식으로 과다활성인 Met 신호전달을 무산시키기 위하여, 몇 가지 Met-표적화 분자가 개발되어 있다. 이러한 약물에는 하기가 포함된다: HGF 길항제 (차단 항체 또는 디코이(decoy) 중 어느 하나), Met 수용체를 표적화하는 mAb 및 화학적 티로신 키나제 억제제 (TKI). 항-Met mAb는 잠재적으로 MET에 의해 촉진되는 암에 대한 싸움에서 주요 단계에 상당한다. 오늘날, 하기 4종의 항-Met mAb가 초기 임상 시험에 진입해 있다: MetMab (오나르투주맙, 로체(Roche) 사), LY2875358 (에미베투주맙, 일라이 릴리 앤 컴퍼니(Eli Lilly & Company) 사), ARGX-111 (아르젠크스(Argenx) 사), SAIT301 (삼성(Samsung) 사), 및 2중 항체의 혼합물인 Sym015 (심포젠(Symphogen) A/S 사). 이들은 경합 방식 (오나르투주맙, ARGX-111) 및/또는 MET를 하향조절하는 것 (에미베투주맙, SAIT301, Sym015)으로 MET에 대한 HGF 결합을 차단하는 것에 의해 작용한다.

[0007] 뮤린 DN30 mAb (WO 2007/090807호에 개시되어 있음)는 인간 Met 수용체의 세포외 도메인에 결합하여 Met-촉발된 생물학적 효과들 중 일부만을 유도하는 IgG2A이다<sup>6</sup>. 그것은 2개의 구별되는 항원 분자에 대한 동시 결합을 가능하게 하는 그의 2가 특성으로 인하여 수용체 인산화를 부분적으로 활성화함으로써, 자연 리간드에 의해 달성되는 것과 유사한 방식으로 수용체 복합체의 안정화를 초래한다. Met에 대한 이와 같은 원치 않는 부분적 작용제 활성화는 1가 DN30 Fab 단편 (MvDN30)에서는 관찰되지 않았다<sup>7</sup>. 2가 DN30 모체 항체의 1가 Fab 단편으로의 전환은 DN30 항-Met 항체의 치료 잠재력을 해제함으로써, 완전 길항제 분자로 이어진다. 그러나, 그의 낮은 분자량으로 인한 Fab의 짧은 반감기는 치료법에의 배치에 심각한 한계가 된다. 이에 따라, 본 발명자들은 DN30 Fab에 존재하는 불변 도메인의 중복을 특징으로 하는, DCD (이중 불변 도메인 Fab)로 지칭되는 새로운 조작된 분자를 개발하였다: 중복이 일렬로 이루어져 있는 DCD-1, 및 경쇄와 중쇄의 불변 도메인이 상호 교환된 DCD-2 (WO 2014/108829호에 개시되어 있음). 상기 새로운 재조합 분자 모두는 완전 Met 길항제로 작용하는 원래의 Fab와 유사한 시험관내에서의 생화학적 특성을 나타낸다. 전신성 투여시, 생체내에서, 새로운 재조합 분자는 Met-중독된 중앙 성장을 감소시킨다. DCD-1 및 DCD-2는 원래의 DN30 Fab에 비해 개선된 약동학적 프로파일을 나타냄에도 불구하고, 2중 중 어느 것도 원래의 mAb에 필적하는 거동에는 도달하지 못하고 있다<sup>8</sup>.

[0008] 2가로부터 항체의 1가 형태로의 전환이 - 분자 조작 접근법을 통하여 - 2개의 항체 아암(arm) 중 하나를 결실시키는 것에 의해서도 달성될 수 있다는 것이 예전에 보고된 바 있다 (WO 2005/063816호에 개시되어 있음). 데이터는 주로 기관에서 발현되는 Fc 수용체에 결합하는 Fc 도메인의 활성화로 인한 분자의 생체내 안정성의 향상을 나타내고 있다.

**발명의 내용**

[0009] **[발명의 개요]**

[0010] 본 개시내용의 목적은 종양학적 환자의 치료에 유용한 단일클론 항체, 즉 DN30 단일클론 항체로부터 유래하는 신규 항-종양 작용제를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명에 있어서, 상기 목적은 본 개시내용의 필수적인 부분을 형성하는 것으로 이해되는 후반부의 청구범위에서 구체적으로 나타내는 주제에 따라 달성된다.

[0012] 본 발명은 단일 항원 결합 아암 및 Fc 영역을 포함하는 항-Met 항체 단편에 관한 것이며, 여기서 상기 Fc 영역은 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드의 복합체를 포함한다. 상기 항체 단편은 하기를 포함한다:

[0013] (i) 하나의 인간화된 경쇄 가변 (VL) 도메인 및 하나의 인간 경쇄 불변 (CL) 도메인을 포함하며, 여기서 인간화된 경쇄 가변 (VL) 도메인은 인간 경쇄 불변 (CL) 도메인에 N-에서 C-말단 방향으로 융합되고, 여기서 인간화된 경쇄 가변 (VL) 도메인은 서열식별번호(SEQ ID NO): 1, 2 및 3에 제시된 아미노산 서열을 가지는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 함유하고, 여기서 인간화된 VL 도메인은 서열식별번호: 7에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 가지는 것인 제1 폴리펩티드;

[0014] (ii) 하나의 인간화된 중쇄 가변 (VH) 도메인, 하나의 인간 중쇄 불변 CH1 도메인 및 제1 Fc 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 제1 Fc 폴리펩티드는 하나의 인간 힌지 영역, 하나의 인간 불변 CH2 도메인 및 하나의 인간 불변 CH3 도메인을 포함하고, 여기서 인간화된 중쇄 가변 (VH) 도메인은 인간 불변 CH3 도메인에 융합된 인간 불변 CH2 도메인에 융합된 인간 힌지 영역에 융합된 인간 중쇄 불변 CH1 도메인에 N-에서 C-말단 방향으로 융합되고, 여기서 인간화된 중쇄 가변 (VH) 도메인은 서열식별번호: 4, 5 및 6에 제시된 아미노산 서열을 가지는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 함유하고, 여기서 인간화된 VH 도메인은 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 가지는 것인 제2 폴리펩티드;

[0015] (iii) 제2 인간 Fc 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 제2 인간 Fc 폴리펩티드는 하나의 힌지 영역, 하나의 인간 불변 CH2 도메인 및 하나의 인간 불변 CH3 도메인을 포함하고, 여기서 힌지 영역은 인간 CH3 불변 도메인에 융합된 인간 CH2 불변 도메인에 N-에서 C-말단 방향으로 융합되고, 여기서 힌지 영역은 N-말단에서 말단절단된 것인 제3 폴리펩티드.

[0016] 상기한 항체 단편의 개선된 치료 특성은 가변 영역의 구조에 의존하는 것이며, 단순히 항체의 1가 형태 및/또는 Fc 영역의 존재로 인한 것이 아니다.

[0017] 본 발명은 또한 단일 병 또는 2개의 병에 (a) 상기한 바와 같은 항-Met 항체 단편 및 제약상 허용되는 비히클, 및 (b) 인간 Met의 세포외 부분 및 제약상 허용되는 비히클을 포함하며, 여기서 인간 Met의 세포외 부분은 안정

한 방식으로 간세포 성장 인자 (HGF)에 결합할 수 있고, 항-Met 항체 단편에 의해 인식되는 에피토프 내에 그에 대한 항-Met 항체 단편의 결합을 방지하기 위한 적어도 하나의 아미노산 돌연변이를 함유하는 것인, 제품에 관한 것이다.

**도면의 간단한 설명**

[0018]

지금부터, 전적으로 예시적이며 비-제한적인 예에 의해, 그리고 하기 첨부 도면을 참조하여 본 발명이 상세하게 기술될 것이다:

- **도 1: DN30 항체 및 그의 1가 유도체의 개략적 표시.** (a) 원래의 무린 2가 mAb; (b) 키메라 Fab인 MvDN30; (c) 키메라 1가 '1-아암' 항체인 chOA-DN30; (d) 인간화된 1가 '1-아암' 항체인 hOA-DN30; (e) OA-DN30 항체를 환원 및 비환원 조건하에서 SDS-PAGE에 적용하였다. 젤 코드 블루(Gel Code blue)로 젤을 염색하였다.

- **도 2: 1가 DN30-유래된 분자의 Met에의 결합.** (a) 인간 Met-Fc 키메라 (고체 상)에 대한 MvDN30, chOA-DN30, hOA-DN30 항체 (액체 상)의 ELISA 결합 분석. (b) Met-Fc 키메라 (고체 상)에 대한 hOA-DN30-c103E08 (액체 상)의 ELISA 결합 분석; 인간, 무린, 래트, 원숭이 기원의 Met를 검정에 포함시켰다. 항-인간  $\kappa$  사슬 항체를 사용하여 결합을 밝혀냈다. O.D.: 광학 밀도; AU: 임의 단위. 각 점은 3반복 값의 평균이며; 막대는 표준 편차를 나타낸다. 그래프 아래의 표는 Kd 값, 결합 최대값 (Bmax) 및 피팅 점수 ( $R^2$ )를 나타낸다. (c) 상이한 종들 (EBC-1, 인간 폐암; C2C12 마우스 근육 근모세포; H9C2 래트 심장 근모세포; MDCK 개 신장 세포; Cos-7 원숭이 신장 세포)로부터 유래하는 세포주의 패널 표면에서 발현된 Met에 대한 hOA-DN30-c103E08 결합의 유동-세포측정기 분석. 새로운 분자가 고도의 친화성으로 인간 Met-Fc에 결합하며; 항체는 인간, 래트, 개 및 원숭이 Met와 교차-반응한다.

- **도 3: 1가 DN30-유래된 분자의 작용제 활성.** 산란 검정. HPAF-II 세포를 표시된 농도의 HGF (Met 리간드), DN30 mAb (부분적 작용제), MvDN30 (완전 길항제), 및 키메라 또는 인간화된 1-아암 항체와 함께 24시간 동안 인큐베이션하였다. 모든 DN30-유래된 1가 분자들이 Met-매개 생물학적 반응인 세포 산란을 유도하지 않았다.

- **도 4: 1가 DN30-유래된 분자로 처리된 세포에서의 Met 배출 및 하향-조절.** A549 세포를 표시된 점증 농도의 MvDN30, chOA-DN30 또는 hOA-DN30 유도체와 함께 무혈청 배지 중에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. 항-Met 항체를 사용한 세포 추출물의 웨스턴 블롯 분석에 의해 총 Met 농도를 측정하였다. 검출된 밴드들은 수용체 (p145 Met)의 성숙한 형태에 상당한다. 적재 대조군으로서, 무관 단백질 (빈클린)을 사용하여 필터를 프로빙하였다. 항-Met 항체를 사용한 컨디셔닝된 배지의 웨스턴 블롯 분석에 의해 Met 배출을 측정하였다. 검출된 밴드들은 배출된 수용체의 세포외 도메인 (p80 Met 엑토도메인)에 상당한다. 표는 이미지(Image)J 소프트웨어를 사용한 농도측정법에 의해 측정되었을 때의 상응하는 빈클린 신호에 대하여 표준화된 각 웨스턴 블롯 밴드의 픽셀 강도 정량을 나타낸다. 모든 1가 1-아암 항체들이 Met를 하향조절하였으며, Met 배출을 유도하였다.

- **도 5: 1가 DN30-유래된 분자에 의한 Met-활성화의 억제.** GTL-16 (MET 유전자 증폭에 의해 지속되는 수용체 과-발현으로 인한 상시성으로 활성화된 Met를 보유하는 MET-중독된 세포)을 무혈청 배지 더하기 hOA-DN30 또는 chOA-DN30 항체 (1000 또는 250 nM) 중에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 주 인산화 부위인 인산화된 Tyr<sup>1234/1235</sup> Met 잔기에 대하여 특이적인 항-Met 항체를 사용한 웨스턴 블러팅에 의해, 총 세포 용해물 중에서 Met 활성화를 측정하였다. 동일한 블롯을 항-Met 항체를 사용하여 재-프로빙하였다. 단백질 적체를 대조하기 위해, 항-빈클린 항체를 사용하여 필터도 프로빙하였다. 키메라 및 인간화된 1-아암 항체들은 Met 인산화를 억제하였다.

- **도 6: 1가 DN30-유래된 분자로 처리된 MET-중독된 세포의 생존율.** 10 % FCS 배지 중 96 웰 플레이트에 GTL-16 인간 위 암종 세포를 플레이팅하였다. 24시간 후, 점증 농도의 MvDN30, chOA-DN30 또는 hOA-DN30 항체로 추가 72시간 동안 세포를 처리하였다. 셀 타이터-글로(Cell titer-glo)에 의해 세포의 수를 평가하였다. 플롯은 미처리 대조군 대비 살아있는 세포의 백분율을 나타낸다. 각 점은 3반복 값의 평균이다. 표는 계산된 IC<sub>50</sub> 값 및 피팅 점수 ( $R^2$ )를 나타낸다. 1-아암 분자들은 MET-중독된 세포의 세포 성장을 억제하였다.

- **도 7: 1가 DN30-유래된 분자를 사용한 처리에 의해 유도되는 MET-중독된 세포의 증식 및 사멸.** (a) 증식 검정: 10 % FCS 배지 중 6 웰 플레이트에 GTL-16 인간 위 암종 세포를 플레이팅하였다. 24시간 후, 고정 농도 (1  $\mu$ M)의 MvDN30, chOA-DN30 또는 hOA-DN30-c103E08을 사용하여 추가 48시간 동안 세포를 처리하였다. 다음에, Edu (10n  $\mu$ M)를 추가 2시간 동안 배양 배지에 첨가하였다. Click-iT Edu 유동 세포측정법 검정의 절차에 따라

세포형광측정기 분석에 의해 S 단계에 있는 세포의 백분율을 측정하였다. 플롯은 APC 염색에 대하여 음성 및 양성인 세포 (EdU+, S 단계 세포)를 나타낸다. 표는 S 단계에 있는 세포의 백분율을 나타낸다. (b) 세포독성 검정: 10 % FCS 배지 중 96 웰 플레이트에 GTL-16 인간 위 암종 세포를 플레이팅하였다. 24시간 후, 점증 농도의 MvDN30, chOA-DN30 또는 hOA-DN30-c103E08을 사용하여 추가 48시간 동안 세포를 처리하였다. 셀-톡스 (Cell-Tox) 그린 검정에 의해 세포 세포독성을 평가하였다. 그래프는 미처리 대조군 대비 세포독성의 증대를 나타낸다. 각 점은 3반복 값의 평균이다. 표는 계산된 EC<sub>50</sub> 값 및 피팅 점수 (R<sup>2</sup>)를 나타낸다. 1-아암 분자는 MET-중독된 세포에서 효율적으로 증식을 차단하고 세포독성을 유도하였다.

- 도 8: **hOA-DN30-c103E08로 처리된 세포에서의 HGF-유도 세포 운동.** 단독 또는 디코이Met<sup>K842E</sup> (hOA-DN30-c103E08과 동일한 양)와의 조합으로서 표시된 농도의 hOA-DN30-c103E08을 사용하여 18시간 동안 HPAF-II 세포를 예비-처리한 다음, HGF (6.25 ng/ml)와 함께 24시간 동안 인큐베이션하였다. hOA-DN30-c103E08은 HGF-유도 세포 운동을 억제하였으며; 디코이Met<sup>K842E</sup>와의 조합은 더 효율적으로 세포 반응을 상쇄하였다.

- 도 9: **hOA-DN30-c103E08로 처리된 세포의 침습.** 단독 또는 디코이Met<sup>K842E</sup> 1 μM와의 조합으로서 hOA-DN30-c103E08 0.5 μM을 포함하는 무혈청 배지 중 매트릭젤(matrigel)로 코팅된 트랜스웰(transwell) 필터의 상부 챔버에 HPAF-II 세포를 플레이팅하였다. 저부 챔버에는 HGF (25 ng/ml)를 포함하는 배지를 첨가하였다. 24시간 후, 염색 및 현미경 관찰에 의해, 필터의 저부 부분상에서 이동한 세포를 평가하였다. hOA-DN30-c103E08은 HGF-유도된 세포 침습을 억제하였으며; 디코이Met<sup>K842E</sup>와의 조합은 생물학적 반응을 차단하였다.

- 도 10: **hOA-DN30-c103E08에 의한 PD-L1 발현의 조절.** 단독 또는 hOA-DN30-c103E08 250 nM과의 조합으로서 50 ng/ml의 IFN-감마를 사용하여 GTL-16 세포를 처리하였다. 48시간 후, 세포를 용해시키고; 웨스턴 블롯에 의해 총 단백질 추출물에서의 PD-L1 발현 및 Met 활성화를 평가하였다. 적재 대조군으로서, 항-GAPDH 항체를 사용하여 필터를 프로빙하였다.

- 도 11: **MvDN30, DN30 mAb 및 hOA-DN30-c103E08의 생체내에서의 약동학적 프로파일.** 면역-결핍 마우스에 단일 투여량 (100 μg)의 MvDN30, DN30 mAb 또는 hOA-DN30을 정맥내 주사하였다. 상이한 시점에 말초 혈액을 수집하였다. ELISA에 의해 치료용 분자의 혈청 농도를 측정하였다. 그래프는 시간의 함수로서의 혈중 분자의 양을 나타낸다. 샘플은 3반복이며; 막대는 표준 편차를 나타낸다.

- 도 12: **1가 DN30 유도체를 사용한 처리에 의한 생체내에서의 MET-중독된 종양 성장의 억제.** 1x10<sup>6</sup>개의 GTL-16 MET-중독된 위 암종 세포를 면역-결핍 NOD-SCID 마우스의 옆구리에 접종하였다. 종양이 평균 부피 68.4 ± 5.4 mm<sup>3</sup>에 도달하였을 때, 마우스를 4개 균질 군으로 무작위화하고, 주 당 2회의 정맥내 주사에 의해 30 mg/kg의 MvDN30, chOA-DN30 또는 hOA-DN30-c103E08로 처리하였다. 대조군으로서, 일 군을 동일 부피의 PBS (비히클)로 처리하였다. 캘리퍼스를 사용하여 주기적으로 종양 성장을 모니터링하였다. 15일 후, 마우스를 희생시켰다. (a) 종양 성장의 동역학; (b) 미처리 군에 대한 백분율로 나타낸 실험 종료시의 종양 부피. hOA-DN30-c103E08은 chOA-DN30에 비해 더 효율적으로 MET-중독된 종양 성장을 억제하였다.

- 도 13: **hOA-DN30-c103E08 처리에 의한 생체내에서의 MET-중독된 종양 성장의 투여량 반응 억제.** 1x10<sup>6</sup>개의 GTL-16 MET-중독된 위 암종 세포를 면역결핍 NOD-SCID 마우스의 옆구리에 접종하였다. 8일 후, 종양이 평균 부피 80.7 ± 2 mm<sup>3</sup>에 도달하면, 마우스를 5개의 균질 군으로 무작위화하고, 정맥내 주사에 의해 점증 농도의 hOA-DN30-c103E08로 처리하였다. 대조군으로서, 일 군을 동일 부피의 PBS (비히클)로 처리하였다. 캘리퍼스를 사용하여 주기적으로 종양 성장을 모니터링하였다. 17일 후, 마우스를 희생시키고, 종양을 절제하여, 칭량하였다. (a) 종양 성장의 동역학; (b) 종양 중량. hOA-DN30-c103E08은 투여량-반응 프로파일로 MET-중독된 종양 성장을 억제하였다.

- 도 14: **chOA-DN30 및 hOA-DN30-c103E08 항체의 VL, VH, CL 및 CH1 도메인의 아미노산 서열.** 굵은 밑줄친 문자로 상보성 결정 영역 서열을 강조하였다.

- 도 15: **OA-DN30의 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드의 아미노산 서열.** 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드의 CH3 도메인 내 아미노산 돌연변이 - 각각 노브 및 홀을 생성시키는 데에 필요함 -를 굵은 밑줄친 문자로 강조하였다.

- 도 16: **디코이Met의 돌연변이된 형태의 아미노산 서열.** 아미노산 돌연변이 K842E를 굵은 밑줄친 문자로 강조

하였다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0019] 하기 상세한 설명에서는, 실시양태에 대한 철저한 이해를 제공하기 위하여, 수많은 구체적인 세부사항들을 제시한다. 실시양태들은 구체적인 세부사항들 중 하나 이상 없이도, 또는 다른 방법, 구성요소, 재료 등을 사용하여서도 실시될 수 있다. 다른 경우에서, 실시양태의 측면들을 불명료하게 하는 것을 방지하기 위하여, 잘 알려져 있는 구조, 재료 또는 작업은 상세하게 나타내거나 기술하지 않는다.
- [0020] "일 실시양태" 또는 "실시양태"에 대한 본 명세서 전체에 걸친 언급은 실시양태와 관련하여 기술되는 구체적인 특성, 구조 또는 특징이 적어도 하나의 실시양태에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서의 "일 실시양태" 또는 "실시양태"라는 구의 출현이 반드시 전적으로 그 실시양태를 언급하는 것은 아니다. 또한, 구체적인 특성, 구조 또는 특징들은 하나 이상의 실시양태에서, 임의의 적합한 방식으로 조합될 수 있다.
- [0021] 본원에서 제공되는 표제는 편의성을 위한 것일 뿐, 실시양태의 영역 또는 의미를 해석하는 것은 아니다.
- [0022] 본 개시내용은 종양 및/또는 전이의 치료를 위한 신규한 치료제에 관한 것이다.
- [0023] 매년 200,000명이 넘는 환자가 "MET-중독"되며, Met 억제제가 잠재적으로 질환의 경감을 초래할 수 있을 것으로 추정된다. 노화에 따라 돌연변이가 축적되며 다음 20년 동안 노화 인구가 증가할 것임을 고려하면, 암 부하는 상승하여 환자 관리를 위한 전 세계 건강관리 자원에 커다란 영향을 줄 것으로 예상된다. "MET-중독"의 원인이 되는 유전자 변경은 위, 식도, 결장직장, 신장 및 폐 암종, 흑색종 및 뇌 종양에서 발견된 바 있다 (코스믹 (COSMIC) 데이터베이스: [www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk) 참조). 또한, MET 유전자 병소의 선택은 결장직장암 및 비-소세포 폐암 (NSCLC)에서의 수많은 다른 표적화된 치료법에 대한 후천성 내성 메커니즘으로서 발견되었었다<sup>9</sup>.
- [0024] 전이에서의 Met의 역할 역시 가혹한 환경에 적응하도록 세포를 돕는 데에 있어서의 Met의 능력과 연관된다. Met에 의해 촉진되는 전이 능력은 유전자 및 후성 변경에 따라서 뿐만 아니라 섬유모세포, 잔류성 상피 세포, 혈관주위세포, 근섬유모세포, 소포성 및 림프-소포성 내피 세포, 그리고 면역 시스템의 침윤성 세포를 포함한 매우 다양한 세포 유형들로 구성되는 종양 간질 조직에 의한 HGF의 주변 분비에 따라서도 달라진다.
- [0025] 오늘날, Met는 하기를 위한 암-특이적 표적으로 인식되고 있다: (i) MET 돌연변이/증폭 ('MET 중독')이 있는 종양의 개인화된 치료; (ii) 다른 표적화된 암 치료법에 대한 Met-구동된 일차 및 이차 내성의 방지/반전; 및 (iii) Met-구동된 침습성/전이성 표현형의 방지/반전<sup>1</sup>.
- [0026] DN30 억제 활성은 원형질 맴브레인으로부터 수용체의 무손상인 세포외 부분을 방출 (Met-배출(shedding))한 후 이어서 Met 세포내 키나제 도메인을 빠르게 분해하는<sup>11</sup>, 세포 표면에서 작용하는 메탈로프로테아제 ADAM-10의 생리학적 활성을 촉진하는<sup>10</sup> 그의 능력에 있다. 이러한 과정의 결과로서, Met는 세포 표면으로부터 물리적으로 제거되고 세포의 도메인이 가용성 '디코이'로 작용함으로써, HGF를 격리하는 것(sequestering)에 의해 리간드 결합을 방지한다. 따라서, DN30의 장점은 Met의 HGF-의존성 및 HGF-비의존성 활성화 모두를 억제한다는 것이다<sup>12</sup>.
- [0027] 다른 항-Met 항체와 비교하였을 때, DN30은 하기의 독특하고 상승작용성인 활성을 야기하는 특유의 메커니즘에 의해 수용체 기능을 차단한다: (i) 엑토도메인(ectodomain)의 '배출'에 의한 세포 표면으로부터의 Met의 제거; (ii) HGF 리간드의 격리; (iii) 맴브레인에서의 Met 수용체의 동중- 또는 이중-이량체화의 억제; (iv) 수용체 분해의 자극. 따라서, DN30은 하나의 돌로 두 마리의 새를 잡는 기회를 제공함으로써 최적의 Met 경로 차단을 가능하게 하는데, 그것이 잠재적으로 암 세포 뿐만 아니라 종양 미세환경에 대해서도 (내피 세포, 섬유모세포 및 대식세포의 HGF-구동된 생물학적 반응) 작용할 수 있기 때문이다.
- [0028] 본 발명은 항-Met 항체를 이용하여 종양에 대한 최고의 치료 잠재력에 도달하기 위해서는 하기인 분자를 적용하는 것이 필수적이라는 생각을 바탕으로 하고 있다: i) 부분적으로라도 Met 활성화시 유발되는 세포내 반응을 도출하지 않는 것, 즉 작용제 또는 부분적 작용제가 아닌 것; ii) 리간드 (HGF) 치환과는 다른 작용 메커니즘을 통하여 Met 활성화를 손상시키는 것; iii) 임상에서의 배지에 적합한 바람직한 약동학적 프로파일을 가지는 것; iv) 당연히 인간에서 면역-반응을 발휘하지 않는 것. 상기한 모든 고려사항을 충족하기 위하여, 본 발명자들은 하기에서 "hOA-DN30"으로 지칭되는 "1-아암(One-Arm)" 형태로 그것을 체계화하는 것에 의해, - 배출 메커니즘에 의해 Met 활성화를 차단하는 - 뮤린 DN30 항체를 완전히 인간화된 1가의 고도로 안정한 분자로 전환하였다.

- [0029] 일 실시양태에서, 본 발명은 단일 항원 결합 아암 및 Fc 영역을 포함하는 항-Met 항체 단편에 관한 것이며, 여기서 상기 Fc 영역은 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드의 복합체를 포함한다. 상기 항체 단편은 하기를 포함하며, 바람직하게는 하기로 구성된다:
- [0030] (i) 하나의 인간화된 경쇄 가변 (VL) 도메인 및 하나의 인간 경쇄 불변 (CL) 도메인을 포함하며 바람직하게는 이들로 구성되고, 여기서 인간화된 경쇄 가변 (VL) 도메인은 인간 경쇄 불변 (CL) 도메인에 N-에서 C-말단 방향으로 융합되고, 여기서 인간화된 경쇄 가변 (VL) 도메인은 서열식별번호: 1, 2 및 3에 제시된 아미노산 서열을 가지는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 함유하고, 여기서 인간화된 경쇄 가변 (VL) 도메인은 서열식별번호: 7에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 가지는 것인 제1 폴리펩티드;
- [0031] (ii) 하나의 인간화된 중쇄 가변 (VH) 도메인, 하나의 인간 중쇄 불변 CH1 도메인 및 제1 Fc 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 제1 Fc 폴리펩티드는 하나의 인간 힌지 영역, 하나의 인간 불변 CH2 도메인 및 하나의 인간 불변 CH3 도메인을 포함하고, 여기서 인간화된 중쇄 가변 (VH) 도메인은 인간 불변 CH3 도메인에 융합된 인간 불변 CH2 도메인에 융합된 인간 힌지 영역에 융합된 인간 중쇄 불변 CH1 도메인에 N-에서 C-말단 방향으로 융합되고, 여기서 인간화된 중쇄 가변 (VH) 도메인은 서열식별번호: 4, 5 및 6에 제시된 아미노산 서열을 가지는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 함유하고, 여기서 인간화된 중쇄 가변 (VH) 도메인은 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 가지는 것인 제2 폴리펩티드;
- [0032] (iii) 제2 인간 Fc 폴리펩티드를 포함하며 바람직하게는 그것으로 구성되고, 여기서 제2 인간 Fc 폴리펩티드는 하나의 인간 힌지 영역, 하나의 인간 불변 CH2 도메인 및 하나의 인간 불변 CH3 도메인을 포함하며 바람직하게는 이들로 구성되고, 여기서 힌지 영역은 인간 CH3 불변 도메인에 융합된 인간 CH2 불변 도메인에 N-에서 C-말단 방향으로 융합되고, 여기서 힌지 영역은 N-말단에서 말단절단된 것인 제3 폴리펩티드.
- [0033] 일 실시양태에서, 상기 인간 경쇄 불변 (CL) 도메인은 인간 경쇄 카파 유형 도메인이다.
- [0034] 일 실시양태에서, 상기 인간 힌지 영역 및 인간 불변 도메인 CH1, CH2 및 CH3는 인간 IgG1로부터의 것이다.
- [0035] 일 실시양태에서, 상기 2개의 Fc 폴리펩티드는 힌지 영역에서 분자간 디설피드 결합을 통하여 연결된다.
- [0036] 일 실시양태에서, 제1 Fc 폴리펩티드와 제2 Fc 폴리펩티드는 경계면에서 만나는데, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드 중 하나는 경계면에 노브(knob)를 포함하며, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드 중 다른 것은 경계면에 홀(hole)을 포함하고, 상기 노브는 상기 홀 내로 배치가능하다.
- [0037] 바람직한 실시양태에서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드 중 하나는 돌연변이된 CH3 불변 도메인을 포함하며, 여기서 돌연변이된 상기 CH3 불변 도메인은 위치 389에 아미노산 돌연변이를 보유하고, 여기서 위치 389의 원래의 아미노산은 원래의 아미노산에 비해 더 큰 측쇄 부피를 가지는 아미노산을 도입함으로써 Fc 폴리펩티드들 사이 경계면에서 노브를 생성시키도록 돌연변이되고; 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드 중 다른 것은 돌연변이된 CH3 불변 도메인을 포함하며, 여기서 돌연변이된 상기 CH3 불변 도메인은 위치 389, 391 및 438에 3개의 아미노산 돌연변이를 보유하고, 여기서 원래의 아미노산은 원래의 아미노산에 비해 더 작은 측쇄 부피를 가지는 아미노산을 도입함으로써 Fc 폴리펩티드들 사이 경계면에서 홀을 생성시키도록 돌연변이되고; 여기서 상기 노브는 상기 홀 내로 배치가능하고, 여기서 아미노산 번호지정은 문헌 [Kabat (pp. 688-696 in Sequences of proteins of immunological interest, 5th ed., Vol. 1, 1991; NIH, Bethesda, MD)]의 EU 번호지정 체계에 따른 것이다.
- [0038] 다른 바람직한 실시양태에서, 위치 389, 391 및 438의 원래의 아미노산은 각각 트레오닌, 류신 및 티로신이며; 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드 중 하나에서 위치 389의 트레오닌은 트립토판으로 돌연변이되고; 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드 중 다른 것에서 위치 389의 트레오닌은 세린으로 돌연변이되고, 위치 391의 류신은 알라닌으로 돌연변이되고, 위치 438의 티로신은 발린으로 돌연변이된다.
- [0039] 바람직한 실시양태에서, 인간 경쇄 불변 (CL) 도메인은 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 가지며, 인간 중쇄 불변 CH1 도메인은 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 가진다.
- [0040] 바람직한 실시양태에서, 제1 인간 Fc 폴리펩티드는 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 가지며, 제2 인간 Fc 폴리펩티드는 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 가진다.
- [0041] 일 실시양태에서, 본 발명은 상기에서 개시된 바와 같은 항-Met 항체 단편을 코딩하는 단리된 핵산에 관한 것이다.
- [0042] 일 실시양태에서, 본 발명은 집합적으로 상기에서 개시된 바와 같은 항-Met 항체 단편을 코딩하는 2종 이상의

재조합 핵산을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

- [0043] 본원에서 개시되는 항-Met 항체 단편은 Met에 결합되었을 때 Met의 세포외 도메인의 배출을 유도한다. 상기 항-Met 항체 단편은 Met에 결합되었을 때 Met에 대한 작용제 활성화는 발휘하지 않는다. 항-Met 항체 단편은 Met에 결합되었을 때 Met 인산화를 억제한다. 항-Met 항체 단편은 Met에 결합되었을 때 또한 MET-중독된 세포에서 증식을 차단하고 세포독성을 유도한다. 항-Met 항체 단편은 Met에 결합되었을 때 또한 간세포 성장 인자 (HGF)에 의해 유도되는 세포 운동 및 세포 침습을 억제한다. 본 상세한 설명의 항-Met 항체 단편 대상의 상기 언급된 특성들은 항-종양 및/또는 항-전이 활성을 상기 항체 단편에 제공한다.
- [0044] 본원에서 사용될 때, "항원 결합 아암"이라는 표현은 대상 표적 분자에 특이적으로 결합하는 능력을 가지는 본 발명 항체 단편의 구성요소 부분을 지칭한다. 항원 결합 아암은 이뮤노글로불린 경쇄 및 중쇄의 CDR 및 프레임 영역을 포함하는 가변 도메인 서열들 (VL 및 VH), 그리고 이뮤노글로불린 경쇄 및 중쇄의 불변 도메인 서열들 (CL 및 CH)의 복합체이다.
- [0045] 비-인간 (예컨대 뮌) 항체의 "인간화된" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래하는 최소한의 아미노산 잔기를 함유하는 비-자연 재조합 항체이다. 대부분의 경우에서, 인간화된 항체는 수용자의 추가 변 영역 (즉 상보성 결정 영역 - CDR)의 잔기들이 원하는 특이성, 친화성 및 특성을 가지는 비-인간 중 (공여자 항체) 추가 변 영역의 잔기들에 의해 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에는, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 (framework) 영역 (FR) 잔기가 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체될 수 있다.
- [0046] 또한, 인간화된 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수도 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 추가적으로 정련하기 위하여 이루어진다. 일반적으로, 인간화된 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 추가 변 루프가 비-인간 이뮤노글로불린의 것에 상당하고, 모든 또는 실질적으로 모든 프레임 잔기 (FR)가 인간 이뮤노글로불린 서열의 것인 2개의 가변 도메인을 포함하게 된다. 인간화된 항체는 또한 통상적으로 인간 이뮤노글로불린의 것인 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 일부를 포함한다. 추가적인 세부사항에 대해서는, <sup>13-15</sup>를 참조하라. 또한, 하기하는 고찰 논문들 및 거기에서 인용되는 참고문헌들을 참조하라: <sup>16-18</sup>.
- [0047] 본원에서 사용될 때, "Fc 영역"이라는 용어는 일반적으로 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 폴리펩티드 서열을 포함하는 이량체 복합체를 지칭하는데, 여기서 C-말단 폴리펩티드 서열은 무손상 항체의 과파인 분해에 의해 수득 가능한 것이다. Fc 영역은 자연상 또는 변이 Fc 서열을 포함할 수 있다. 이뮤노글로불린 중쇄 Fc 서열의 경계가 가변적일 수 있기는 하지만, 인간 IgG1 중쇄 Fc 서열은 보통 카바트(Kabat)의 EU 번호지정 체계에 따라 Asp 234와 Thr 238 사이에 포함되는 아미노산 잔기에서 Fc 서열의 카르복실 말단에 이르는 것으로 정의된다. 이뮤노글로불린의 Fc 서열은 일반적으로 하나의 힌지 영역, 2개의 불변 도메인인 CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하며, 임의적으로 CH4 도메인을 포함한다. 본원에서 "Fc 폴리펩티드"는 Fc 영역을 구성하는 폴리펩티드들 중 하나를 의미한다. Fc 영역은 항원 결합 아암을 포함하는 Fab 분자에 비해 항체 단편의 안정성을 증가시킨다.
- [0048] 본원에서 사용될 때, "힌지 영역", "힌지 서열" 및 이들의 변이는 관련 기술분야에 알려져 있는 의미를 포함하며, 예를 들면 문헌 [Janeway et al., *Immuno Biology: the immune system in health and disease*, (Elsevier Science Ltd., NY) (4th ed. , 1999)] 및 <sup>19,20</sup>에 예시되어 있다.
- [0049] 본원에서 사용될 때, "말단절단된 힌지 영역"이라는 구는 힌지 서열의 전부가 아닌 일부를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 말단절단된 힌지 영역은 "제1" Fc 폴리펩티드에 연결될 수 있다. 야생형 힌지 서열이 존재하지 않는 경우, "제2" Fc 폴리펩티드의 나머지 서열은 "제1" Fc 폴리펩티드에 연결될 수 있는 구성요소를 포함하게 된다. 예를 들면, 상기 구성요소는 디설피드 연결을 형성할 수 있는 변형된 잔기 또는 첨가된 시스테인 잔기일 수 있다.
- [0050] "노브"는 제1 Fc 폴리펩티드의 경계면으로부터 돌출되며, 그에 따라 이종다량체를 안정화하도록 인접 경계면 (즉 제2 Fc 폴리펩티드의 경계면)의 보상 홈 내에 배치가능해서, 예를 들면 동종다량체 형성에 비해 이종다량체 형성을 선호하는, 적어도 하나의 아미노산 측쇄를 지칭한다. 노브는 원래의 경계면에 존재할 수 있거나, 또는 합성에 의해 도입될 수 있다 (예컨대 경계면을 코딩하는 핵산을 변경하는 것에 의함). 보통, 제1 폴리펩티드의 경계면을 코딩하는 핵산이 노브를 코딩하도록 변경된다. 이를 달성하기 위해서는, 제1 폴리펩티드 경계면의 적어도 하나의 "원래" 아미노산 잔기를 코딩하는 핵산이 원래의 아미노산 잔기에 비해 더 큰 측쇄 부피를 가지는 적어도 하나의 "도입" 아미노산 잔기를 코딩하는 핵산으로 대체된다. 하나를 초과하는 원래의 잔기 및 상응하는 도입 잔기가 존재할 수 있다는 것은 알고 있을 것이다. 대체되는 원래 잔기의 수에 있어서의 상위 한계는

제1 폴리펩티드 경계면의 총 잔기 수이다.

- [0051] "홀"은 제2 Fc 폴리펩티드의 경계면으로부터 오목하며, 그에 따라 제1 Fc 폴리펩티드의 인접 경계면상의 상응하는 노브를 수용하는, 적어도 하나의 아미노산 측쇄를 지칭한다. 홀은 원래의 경계면에 존재할 수 있거나, 또는 합성에 의해 도입될 수 있다 (예컨대 경계면을 코딩하는 핵산을 변경하는 것에 의함). 보통, 제2 폴리펩티드의 경계면을 코딩하는 핵산이 홀을 코딩하도록 변경된다. 이를 달성하기 위해서는, 제2 폴리펩티드 경계면의 적어도 하나의 "원래" 아미노산 잔기를 코딩하는 핵산이 원래의 아미노산 잔기에 비해 더 작은 측쇄 부피를 가지는 적어도 하나의 "도입" 아미노산 잔기를 코딩하는 핵산으로 대체된다. 하나를 초과하는 원래의 잔기 및 상응하는 도입 잔기가 존재할 수 있다는 것은 알고 있을 것이다. 대체되는 원래 잔기의 수에 있어서의 상위 한계는 제2 폴리펩티드 경계면의 총 잔기 수이다.
- [0052] 노브는 홀 내로 "배치가능"한데, 이는 각각 제1 Fc 폴리펩티드 및 제2 Fc 폴리펩티드 경계면상 노브 및 홀의 공간적 위치, 그리고 노브 및 홀의 크기가 경계면에서의 제1 및 제2 폴리펩티드의 정상적인 결합을 상당히 교란하지 않으면서 노브가 홀 내로 위치될 수 있도록 되어 있다는 것을 의미한다. 노브가 통상적으로 경계면의 축으로부터 수직으로 연장되지 않으며 바람직한 입체형태를 가지고 있기 때문에, 노브의 상응하는 홀과의 정렬은 X-선 결정학 또는 핵 자기 공명 (NMR)에 의해 수득되는 것과 같은 3-차원 구조를 바탕으로 하여 노브/홀 쌍을 모델링하는 것에 의존한다. 이는 관련 기술분야에 광범위하게 허용되는 기술을 사용하여 달성될 수 있다.
- [0053] 본원에서 사용될 때의 항-Met 항체 단편의 "비-작용제 활성화"이라는 표현은 Met 활성화시 유발되는 세포 반응을 부분적으로라도 도출하는 어떠한 활성화도 발휘하지 않는 항-Met 항체 단편을 지칭한다. 항-Met 항체 단편의 비-작용제 활성화는 상기 비-작용제 항체를 동반한 세포 인큐베이션시의 웨스턴 블롯, 면역형광, 면역조직화학, ELISA, 세포형광측정기 분석, 또는 Met, 또는 인산화된 것인 경우 Met 잔기 Tyr<sup>1234-1235</sup> (즉 Met<sup>21</sup>의 주 인산화 부위), 또는 인산화된 것인 경우 Met 잔기 Tyr<sup>1349/1356</sup> (즉 Met<sup>22</sup>의 도킹(docking) 부위)을 특이적으로 인식하는 항체의 사용을 포함하는 임의의 다른 방법과 같은 통상적인 기술에 의한 Met 인산화 수준의 평가에 의해 측정될 수 있다. 대안으로서, HGF 처리에 의해 유도되는 반응에 비교한 항체 처리시의 세포 생물학적 반응의 평가가 적용될 수 있다.
- [0054] 본 발명은 또한 단일 병 또는 2개의 병에 (a) 본원에서 개시되는 바와 같은 항-Met 항체 단편 및 제약상 허용되는 비히클, 및 (b) 인간 Met의 세포의 부분 및 제약상 허용되는 비히클을 포함하며, 여기서 인간 Met의 세포의 부분은 안정한 방식으로 간세포 성장 인자 (HGF)에 결합할 수 있고, 항-Met 항체 단편에 의해 인식되는 에피토프 내에 그에 대한 항-Met 항체 단편의 결합을 방지하기 위한 적어도 하나의 아미노산 돌연변이를 함유하는 것인, 제품에 관한 것이다.
- [0055] 일 실시양태에서, 상기 인간 Met의 세포의 부분은 SEMA, PSI, IPT-1, IPT-2, IPT-3 및 IPT-4 도메인을 함유한다.
- [0056] 바람직한 실시양태에서, 인간 Met의 세포의 부분은 서열식별번호: 13에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 가지며, 여기서 서열식별번호: 13의 위치 797과 위치 875 사이 아미노산 중 적어도 하나는 그에 대한 항-Met 항체 단편의 결합을 방지하기 위하여 돌연변이된다.
- [0057] 더욱 바람직한 실시양태에서, 인간 Met의 세포의 부분은 서열식별번호: 14에 제시된 아미노산 서열을 가진다.
- [0058] 본 상세한 설명은 또한 안정한 방식으로 간세포 성장 인자 (HGF)에 결합할 수 있고, 항-Met 항체 단편에 의해 인식되는 에피토프 내에 그에 대한 항-Met 항체 단편의 결합을 방지하기 위한 적어도 하나의 아미노산 돌연변이를 함유하는 인간 Met의 세포의 부분을 코딩하며, 바람직하게는 상기 인간 Met의 세포의 부분은 서열식별번호: 14에 제시된 아미노산 서열을 가지는, 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0059] 본원에서 사용될 때, "인간 Met의 세포의 부분이 안정한 방식으로 인간 HGF에 결합할 수 있다"는 표현은 인간 Met의 세포의 부분이 100 nM 이하의 Kd 계산치로 HGF에 결합한다는 것을 의미한다.
- [0060] 본원에서 사용될 때, "인간 Met의 세포의 부분이 항-Met 항체 단편에 의해 인식되는 에피토프에 적어도 하나의 아미노산 돌연변이를 함유한다"는 표현은 항-Met 항체 가변 도메인에 의한 상기 영역의 관여를 방지하는 Met 세포의 부분 내의 변형을 유도할 수 있는, Met 세포의 부분 내의 하나 이상 돌연변이 (즉 아미노산 치환 및/또는 결실 및/또는 삽입)의 존재를 의미한다. 통상의 기술자라면, 그의 통상적인 일반 지식 (일반적으로 DNA 복제 동안 특정 프라이머를 사용하여 주어진 DNA 서열에 단일 뉴클레오티드 변화를 포함하는 cDNA를 생성시킬 가능성으로 대표됨; 문헌 [Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory,

1982] 참조)으로 볼 때, 인간 HGF에 결합하나 항-Met 항체 단편에는 결합하지 않는 능력을 보유하는 인간 Met 세포의 부분의 돌연변이된 형태의 구현에 관한 추가적인 세부사항은 필요로 하지 않는다. 이에 따라, 본 발명이 본원에서 개시되는 바와 같은 인간 Met의 돌연변이된 세포의 부분 (즉 서열식별번호: 14)만을 포괄하는 것으로 해석되어서는 아니되는데, 통상적인 일반 지식을 고려하는 통상의 기술자라면 그에 대한 항-Met 항체의 결합을 방지하는 서열식별번호: 13을 가지는 인간 Met 세포의 부분의 추가적인 돌연변이 버전들을 생성시킬 수 있기 때문이다.

- [0061] "SEMA", "PSI", "IPT-1", "IPT-2", "IPT-3" 및 "IPT-4"라는 용어는 Met의 세포의 영역을 구성하는 Met 도메인들을 지칭한다. 그와 같은 도메인명들은 일반적으로 <sup>23,24</sup>에 의해 대표되는 바와 같은 통상의 기술자의 통상적인 일반 지식에 속한다. SEMA 도메인은 Met (서열식별번호: 13)의 아미노산 25-516 사이에 포함되는 영역을 포괄하는 세마포린 및 플렉신과 공통되는 단백질 상호작용 모듈이며; PSI는 Met (서열식별번호: 13)의 아미노산 519-561 사이에 포함되는 영역을 포괄하는 플렉신, 세마포린 및 인테그린과 공통되는 도메인이고; IPT 도메인 - 4회 반복됨 -은 Met (서열식별번호: 13)의 아미노산 563-934 사이에 포함되는 영역을 포괄하는 플렉신 및 전사 인자와 공통되는 이뮤노글로불린-유사 영역이다. 구체적으로, IPT 반복체 1은 서열식별번호: 13의 아미노산 위치 563-656을 차지하며, IPT 반복체 2는 서열식별번호: 13의 아미노산 위치 657-740을 차지하고, IPT 반복체 3은 서열식별번호: 13의 아미노산 위치 741-837을 차지하며, IPT 반복체 4는 서열식별번호: 13의 아미노산 위치 838-934를 차지한다.
- [0062] 본 발명은 또한 임의적으로 본원에서 개시되는 바와 같은 인간 Met 세포의 부분과의 조합으로서 본원에서 개시되는 바와 같은 항-Met 항체 단편의, 종양 및/또는 전이로 고통받는 환자의 치료에서 사용하기 위한 치료적 용도에 관한 것이며, 여기서 환자는 MET 유전자의 유전자 변형을 보유한다.
- [0063] 본 발명은 또한 본원에서 개시되는 바와 같은 인간 Met 세포의 부분과의 조합으로서 본원에서 개시되는 바와 같은 항-Met 항체 단편의, 종양 및/또는 전이로 고통받는 환자의 치료에서 사용하기 위한 치료적 용도에 관한 것이며, 여기서 환자는 야생형 MET 유전자를 보유한다.
- [0064] 일 측면에서, 본 발명은 대상체에서의 종양 및/또는 전이의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 해당 이상이 그에 의해 치료되는 임의적으로 인간 Met 세포의 부분과의 조합으로서 항-Met 항체 단편 유효량의 대상체에의 투여를 포함한다.
- [0065] 일 측면에서, 본 발명은 Met를 발현하는 세포의 성장 억제 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 세포를 임의적으로 본 발명의 인간 Met 세포의 부분과의 조합으로서 본원에서 개시되는 항-Met 항체 단편과 접촉시킴으로써, 상기 세포의 성장 억제를 야기하는 것을 포함한다.
- [0066] 일 측면에서, 본 발명은 암성 종양 및/또는 전이를 보유하는 포유동물의 치료적 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 포유동물을 그에 의해 효과적으로 치료하는 임의적으로 인간 Met 세포의 부분과의 조합으로서 본원에서 개시되는 항-Met 항체 단편 유효량의 상기 포유동물에의 투여를 포함한다.
- [0067] 일 측면에서, 본 발명은 세포 증식성 장애의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 세포 증식성 장애를 그에 의해 효과적으로 치료하거나 예방하는 임의적으로 인간 Met 세포의 부분과의 조합으로서 본 개시내용의 항-Met 항체 단편 대상 유효량의 그와 같은 치료를 필요로 하는 대상체에의 투여를 포함한다.
- [0068] 일 측면에서, 본 발명은 포유동물에서의 종양 및/또는 전이의 치료적 치료 방법을 제공하며, 여기서 상기 종양의 성장은 적어도 부분적으로 세포 증식의 증가, 세포자멸사로부터의 보호 중 어느 하나 또는 둘 다의 결과로서의 Met/HGF 시스템의 성장 강화 효과에 의존한다. 상기 방법은 종양 세포를 상기 종양 및/또는 전이를 그에 의해 효과적으로 치료하는 임의적으로 본 발명의 인간 Met 세포의 부분 유효량과의 조합으로서 항-Met 항체 단편 유효량과 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0069] 임의적으로 인간 Met 세포의 부분과의 조합으로서 항-Met 항체를 사용하여 효과적으로 치료될 수 있는 종양은 유방, 결장직장, 폐, 결장, 췌장, 전립선, 난소, 자궁경부, 중추신경계, 신장, 간세포, 방광, 위, 두부 및 경부 종양 세포, 유두 암종 (예컨대 갑상선), 흑색종, 림프종, 골수종, 신경아교종/아교모세포종 (예컨대 역형성 별아교세포종, 다형 아교모세포종, 역형성 퓌지교종, 역형성 희소돌기별아교세포종), 백혈병 세포, 육종, 횡문근육종, 또는 미지 초대 기원 암 (CUP) 유래의 종양에서 선택된다.
- [0070] 일 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 치료 표적화되는 세포는 과다증식 및/또는 과다형성 세포이다. 일 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 표적화되는 세포는 형성이상 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법

에서 표적화되는 세포는 전이성 세포이다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 표적화되는 세포는 종양 및/또는 전이를 지탱하는 미세환경에 속하는 Met 발현 세포이다.

- [0071] 본 발명자들은 CH3 도메인의 선택된 점 돌연변이에 의해 수득되며 효율적인 Fc 이중이량체화로 이어지는 1-아암 구조가 1가의 형태로 항체를 창출한다는 것을 입증하였다.
- [0072] 1가성은 2가인 자연상 항체 구조로 인한 DN30의 궁극적인 작용제 활성을 방지하는 데에 필수적이다.
- [0073] 예상밖이고도 놀랍게도, 본 발명자들은 DN30의 인간화된 1-아암 체계 중 하나 (즉 hOA-DN30-c103E08)가 시험관 내 및 생체내에서 강한 억제 특성을 나타낸다는 것을 발견하였다.
- [0074] 시험관내에서, hOA-DN30-c103E08은 상응하는 키메라 형태 (하기에서 "chOA-DN30"로 지칭됨) 및 본원에서 개시되는 모든 다른 인간화된 1-아암 유도체들 ("hOA-DN30 항체들"로 지칭됨) (DN30으로부터 유래하는 모든 1-아암 항체에 대한 상세한 설명에 대해서는 재료 및 방법 부문 참조)과 비교하였을 때, 탁월한 활성을 나타낸다. 예상밖으로, hOA-DN30-c103E08은 키메라인지 인간인지에 관계없이 시험된 다른 OA-DN30 항체들과 비교하였을 때, 더 고도의 친화성으로 Met에 결합한다. 예상밖으로, 본 발명자들은 Met에 대한 DN30 항체의 친화성을 증가시키는 것에 의해 배출 반응이 강화된다는 것을 발견하였다. 결론적으로, 인간화된 Met 수용체의 양으로 측정되었을 때의 Met 활성화의 억제는 더 강하였다. 이러한 활성은 Met-매개된 생물학적 반응의 억제로 이어진다. MET-중독된 종양 세포 성장의 손상은 매우 낮은 투여량에서 이루어져서; hOA-DN30-c103E08 IC<sub>50</sub>은 키메라인지 인간인지에 관계없이 분석에 포함된 OA-DN30 항체들에서 측정된 모든 것 중 가장 낮다. 종양 세포 성장의 더 우수한 억제는 세포 증식의 더 광범위한 차단 및/또는 세포독성의 더 현저한 증대로 인한 것일 수 있다.
- [0075] hOA-DN30-c103E08은 생체내에서도 향상된 치료 잠재력을 나타낸다. 이는 그의 낮은 분자량으로 인하여 고도 신장 청소(high kidney clearance)에 적용되는 분자인 MvDN30과 비교가 이루어지는 경우에 예상된다. MvDN30의 저조한 약동학적 특성은 생체내 실험 모델에서의 분자의 성능에 상당한 영향을 준다.
- [0076] 신장 청소의 컷-오프(cut-off)에 비해 더 높은 분자량에 도달하는 것이면 원래 최고 치료 반응을 도출하는 데에 충분하다고 생각할 수 있으나, 그것은 그렇지 않다. 실제로는, DN30 mAb의 DCD-1 및 DCD-2 유도체 - MvDN30 대비 증가된 크기를 가지는 재조합 분자 -를 사용하여 수득되는 결과는 약동학적 프로파일이 부분적으로만 개선되고 치료 반응이 종양 성장 속도의 감소로 제한된다는 것을 분명하게 보여준다<sup>8</sup>.
- [0077] hOA-DN30-c103E08의 탁월한 활성은 부분적으로 Fc 수용체와의 결합으로 인하여 항체의 조직/기관 분포에 차이를 발생시킴으로써 매우 바람직한 약동학적 프로파일을 제공하는 Fc 영역의 존재로 인한 것일 수 있다.
- [0078] Fc 영역의 존재로 인한 생체내 안정성과 관련한 긍정적인 측면은 오나르투주맙 적용분야에서 이미 논의 및 개시된 바 있다. 그것은 1-아암 체계로 설계된 항-Met 항체이다<sup>25</sup>. 그럼에도 불구하고, 상기 항체는 세균에서 제조되며, 그에 따라 글리코실화되지 않는다. 결과적으로, 거기에는 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 활성화하는 능력이 결핍되어 있다. 반면, hOA-DN30-c103E08은 포유동물 세포에서 제조되며, 따라서 그것은 Fc 효과기 기능을 완전히 도출할 수 있는 것으로 간주될 수 있다.
- [0079] hOA-DN30-c103E08은 작용 메커니즘에 있어서도 오나르투주맙과 상이하다. 첫 번째 항체는 Met 수용체 배출을 유도하여 세포 표면으로부터 Met를 제거하고 세포의 환경에서 HGF를 흡수하는 반면, 두 번째 것은 Met 결합에 대하여 HGF와 경쟁한다. 결과적으로, hOA-DN30은 종양-수용체의 이상 활성화를 지탱하는 메커니즘과 관계없이 Met를 억제하는 반면, 오나르투주맙은 리간드-의존성 활성화의 경우에서만 효과적이다.
- [0080] Fc 영역의 존재가 hOA-DN30-c103E08에 의해 수득되는 생체내에서의 치료 반응의 눈에 띄는 향상을 책임질 수는 없는데, 그와 같은 도메인이 시험된 모든 인간화된 및 키메라 1-아암 항체에 존재하기 때문이다. 인간화된 및 키메라 1-아암 항체가 공유하지 않는 것은 항체의 결합 부위가 존재하는 가변 영역이다. 구체적으로, DN30 CDR - 모든 유도체에서 동일함 -이 프레임 영역에 삽입된다. 항체의 이러한 부분은 결합 포켓의 형성에 직접적으로 연관되지는 않는다 할지라도, CDR 구조의 최종 입체형태에 영향을 줄 수 있으며 그에 따라 항원에 대한 항체의 최종 친화성을 결정할 수 있는 베르니어 잔기(Vernier residue)<sup>26</sup>로 지칭되는 특정 아미노산들을 포함한다. c103E08의 프레임 서열, 즉 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 서열과의 조합으로서 DN30 CDR은 더 강한 친화성을 가지는 항-Met 항체를 창출하는데, 상기 서열 조합이 Met 수용체상의 상응하는 에피토프와 더 잘 맞는 결합 포켓을 생성시키기 때문일 가능성이 있다. 항체와 Met 사이의 더 강력한 상호작용은 추가적으로 수용체의 배출, 및 결합적인 Met-매개 생물학적 반응의 손상을 제공한다. 1-아암 체계로 인한 향상된 혈장 안정성과 연계될 경우,

이는 MET-중독된/구동된 암에 대하여 예상치 못한 탁월한 활성을 가지는 항체 - 즉 c103E08 -을 산출한다.

[0081] 문헌 [Basilico et al.]<sup>27</sup>에 보고된 데이터는 HGF 및 Met 둘 다의 동시 표적화가 종양 및/또는 전이의 치료에서 더 높은 치료 강력성을 산출한다는 것을 보여준다. 본원에서 입증된 실험 데이터는 예상밖으로 디코이Met<sup>K842E</sup>와의 조합으로서 hOA-DN30에 의한 MET/HGF 축의 억제에 디코이Met<sup>K842E</sup>와의 조합으로서 MvDN30의 적용시 획득되는 것에 비해 탁월하다는 것을 보여준다. 실제로, 침습 검정에서 획득되는 결과 (본원의 도 9에 기록되어 있음)를 문헌 [Basilico et al.]<sup>27</sup>에 공개된 것과 비교해보면, hOA-DN30은 암 세포의 HGF-구동된 침습을 무산시키는 반면, MvDN30이 조합의 일부인 경우 잔류 활성이 여전히 존재한다.

[0082] MET 유전자 변경이 없는 암 세포는 저산소, 이온화 방사선 또는 화학치료법과 같은 스트레스 조건에 반응하여 악성 표현형을 제고하고 침습성 전이 표현형을 해제하기 위한 '방편'으로서 MET 종양유전자에 의해 촉발되는 '생리학적' 프로그램을 활용한다. '방편'은 그의 리간드 HGF에 의한 야생형 MET의 자극을 필요로 한다. 본원에서 제공되는 데이터는 MET '방편' 조건하에서 MET/HGF 축 양 측면을 건드리는 동시 개제가 향상된 억제 활성으로 이어진다는 것을 보여준다. hOA-DN30-c103E08은 엑토도메인의 '배출'에 의해 세포 표면으로부터의 MET의 물리적 제거를 유도한다. 후자는 세포의 환경으로 방출되어, HGF용 '디코이'로 작용한다. 재조합 디코이Met의 외인성 공급은 hOA-DN30-c103E08에 의해 생성되는 내생 디코이Met의 HGF-격리 활성을 강화한다. hOA-DN30-c103E08과 디코이Met<sup>K842E</sup>의 조합은 Met-발현 암 세포 및 HGF-분비 종양 간질에 동시에 작용한다. 이는 최적의 HGF-구동된 Met 신호전달 차단을 가능하게 하며, 그에 따라 침습성/전이성 표현형을 지탱하는 데 있어서 MET에 의존하는 야생형 MET를 발현하는 종양을 보유하는 대형 환자 코호트를 위한 신뢰성 있는 치료 선택사항에 상당한다.

[0083] 본원에서 개시되는 단백질 (일반적으로 인간화된 항-Met 항체 및 인간 Met의 세포의 부분)은 일반적으로 문헌 [Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory (1982)]에 나타나 있는 바와 같은 재조합 DNA 기술과 관련된 분야의 통상적인 일반 지식을 고려하여 통상의 기술자에 의해 단백질의 형태 또는 단백질을 코딩하는 핵산 분자의 형태 중 어느 하나로 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들면, 하기의 표준 절차가 이어질 수 있다: (i) 상응하는 cDNA 서열들의 합성, (ii) 통상적인 재조합 DNA 방법에 의한 포유동물에서의 발현에 적합한 플라스미드에 상기 cDNA들의 삽입, (iii) 포유동물 세포주의 상기 언급된 플라스미드를 사용하여 일시적이거나 안정적인 공동-형질감염, (iv) 배양물 상층액의 수집, (v) 재조합 단백질의 친화성 크로마토그래피에 의한 정제.

[0084] 본 발명의 활성 성분(들), 즉 단독 또는 인간 Met의 세포의 부분과의 조합으로서 인간화된 항-Met 항체 단편을 포함하는 치료용 조성물은 생리학적으로 허용되는 캐리어, 부형제 또는 안정화제 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980])를 사용하여 수성 용액, 동결건조되거나 달리 건조된 제제의 형태로 제조될 수 있다. 허용되는 캐리어, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투약량 및 농도에서 수용자에게 비독성인 것이며, 완충제; 향산화제; 보존제; 저분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산; 당류, 이당류, 및 기타 탄수화물; 킬레이팅제; 당; 염-형성 상대-이온; 금속 착물 및/또는 비-이온계 계면활성제가 포함된다. 제제는 또한 치료되는 구체적인 징후에 필요한 다른 활성 화합물(들), 바람직하게는 단독 또는 인간 Met 세포의 부분과의 조합으로서 hOA-DN30의 치료 활성에 부정적인 영향을 주지 않는 보완적인 활성을 가지는 것들을 함유할 수 있다. 그와 같은 분자는 적합하게는 예정 목적에 효과적인 양으로 조합되어 존재한다.

[0085] 활성 성분(들)은 또한 일반적으로 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시된 기술에 의해 제조된 미세캡슐 내에 포획될 수 있다.

[0086] 지속-방출 제제가 제조될 수도 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예에는 본 발명의 활성 성분을 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되는데, 매트릭스는 성형 물품, 예컨대 필름 또는 미세캡슐의 형태로 존재한다.

[0087] 본 발명의 활성 성분(들)은 단독, 또는 또 다른 항체, 소형 분자 티로신 키나제 억제제, 화학치료제(들) (화학치료제 각테일 포함), 다른 세포독성 작용제(들), 항-혈관생성 작용제(들), 시토카인 및/또는 성장 억제제(들)과의 조합 중 어느 하나로서 사용될 수 있다. 상기 언급된 그와 같은 조합 치료법에는 조합 투여 (2종 이상의 작용제가 동일하거나 별도로 제제에 포함됨), 그리고 hOA-DN30의 투여가 보조 치료법 또는 치료법들의 투여 전 및/또는 후에 이루어 질 수 있는 경우인 별도 투여가 포함된다.

- [0088] 본 발명의 활성 성분(들) (및 보조 치료제(들))은 비경구, 피하, 복막내, 폐내, 비내, 그리고 원할 경우 국소 치료용으로 병소내 투여를 포함한 임의의 적합한 수단에 의해 투여된다. 본 발명의 활성 성분(들)은 적합하게는 특히 감쇠 투여량의 활성 성분을 사용하는 펄스 주입에 의해 투여될 수 있다. 투여는 부분적으로 투여가 단기인지 장기인지에 따라 임의의 적합한 경로, 예컨대 주사, 예컨대 정맥내 또는 피하 주사에 의한 것일 수 있다.
- [0089] 본 발명의 활성 성분(들)은 우수한 의료 구현에 부합하는 방식으로 제제화, 투약 및 투여되게 된다. 이와 같은 맥락에서의 고려 인자에는 치료되는 구체적인 장애, 치료되는 구체적인 포유동물, 개별 환자의 임상적 조건, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 일정, 그리고 의료 개업의에게 알려져 있는 기타 인자들이 포함된다. 본 발명의 활성 성분(들)이 문제의 장애를 예방하거나 치료하는 데에 현재 사용되고 있는 1종 이상의 작용제와 함께 제제화되어야 할 필요는 없으나, 임의적으로 그럴 수는 있다. 그와 같은 다른 작용제의 유효량은 제제에 존재하는 본 발명 활성 성분(들)의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기에서 논의된 기타 인자에 따라 달라진다. 이들은 일반적으로 이전에 사용되던 것과 동일한 투약량 및 투여 경로로, 또는 지금까지 사용되던 투약량의 약 1 내지 99 %로 사용된다.
- [0090] 질환의 치료에 있어서, (단독으로, 또는 화학치료제(들)와 같은 다른 작용제(들)와의 조합으로서 사용될 때의) 본 발명 활성 성분(들)의 적절한 투약량은 치료되는 질환의 유형, 질환의 중증도 및 추이, 활성 성분이 예방 목적으로 투여되는지 치료 목적으로 투여되는지 여부, 환자의 임상 이력 및 본 발명 활성 성분(들)에 대한 반응이 적절하게 고려되는지, 및 담당 의사의 재량에 따라 달라지게 된다.
- [0091] hOA-DN30는 적합하게는 1회로, 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 투여된다. 질환의 유형 및 중증도에 따라, 약 1 mg/kg 내지 30 mg/kg의 항체가 예를 들면 1회 이상의 별도 투여에 의한 것인지 또는 연속 주입에 의한 것인지에 관계없이, 환자에의 투여를 위한 개시 후보 투약량이다. 한 가지 통상적인 하루 투여량은 상기 언급된 인자들에 따라 약 1 µg/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 이상의 범위일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우, 조건에 따라 원하는 질환 증상의 억제가 이루어질 때까지 치료가 지속된다. 항체 단편의 한 가지 대표적인 투약량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 범위일 수 있다. 이에 따라, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 이들의 임의의 조합)인 1회 이상 투여분이 환자에게 투여될 수 있다. 그와 같은 투여량은 간헐적으로, 예를 들면 매주 또는 3주마다 투여될 수 있다 (예컨대 환자가 약 2 내지 약 20회, 예컨대 약 6회 투여분의 항체를 투여받도록 함). 더 높은 개시 적재 투여량 후 이어서 1회 이상의 더 낮은 투여량이 투여될 수 있다. 대표적인 투여 처방계획은 약 4 mg/kg의 개시 적재 투여량 후 이어지는 약 2 mg/kg 항체의 주당 유지 투여량을 투여하는 것을 포함한다. 그러나, 다른 투약 처방계획이 유용할 수도 있다. 이와 같은 치료법의 진행은 통상적인 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링된다. 조합 치료법과 관련하여, 인간 Met의 세포외 부분은 바람직하게는 hOA-DN30와 동일한 시간에 전달되며, 바람직하게는 비제한적으로 질환의 유형 및 중증도에 따라 1:1 hOA-DN30:디코이Met<sup>K842E</sup> 물비로 hOA-DN30에 비례하여 투여된다.
- [0092] 결과
- [0093] **DN30 항체의 키메라 및 인간화된 1-아암 체계 생성**
- [0094] 전통적인 분자 생물학 기술을 통하여, 본 발명자들은 DN30 mAb 중쇄 및 경쇄의 불변 도메인들을 인간 이뮤노글로불린으로부터 유래하는 불변 도메인들로 치환하였다. 경쇄 불변 도메인은 인간 카파 유형 도메인 (자연 인간 항체에서 더 많이 나타나는 것)으로 치환한 반면, 중쇄 불변 도메인은 인간 IgG1로부터 유래하는 상동성 도메인 (ADCC/CDC를 유도할 수 있는 것)으로 치환하였다.
- [0095] DN30 마우스 항체의 인간화는 페어 저니 바이올로지스(Fair Journey Biologics)사에서 파지 디스플레이 라이브러리(phage display library) 접근법을 사용하여 수행하였다. 그들은 벗어난 FR (프레임) 잔기의 식별, 및 CDR1-CDR2의 동일한 정준 배수 조합을 가지는 생식계열에서 선택된 최근접 인간 V 생식계열의 분석으로부터 시작하였는데, 하기의 가용한 도구 및 데이터베이스를 사용하였다: UCL 플러스 Dr. 앤드류 마틴(Andrew Martin)의 abYsistool, <http://www.bioc.uzh.ch/plueckthun/antibody/> 및 <http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/>. 파지 디스플레이 라이브러리의 생성시에는 - 여기서 VH 및 VL 영역의 무작위화가 수행되었음 -, 4회의 진화성-구동된 파지 디스플레이 선택 라운드를 수행하였다. 과정 종료시에는, 최고의 인간 동일성 및 상동성을 가지는 DN30 인간화 변이를 선택하였다. 전통적인 분자 생물학 기술을 통하여, 인간 이뮤노글로불린으로부터 유래하는 불변 도메인 서열, 즉 인간 카파 경쇄 및 IgG1 중쇄 불변 도메인에 가변 영역을 연결하였다.
- [0096] 키메라 및 인간화된 항체를 1-아암 단일 사슬 형태로 체계화하기 위하여, 특정 아미노산 변형을 CH3 영역에 삽

입하여 '노브와 홀(knob into hole)' 구조<sup>28,29</sup>를 생성시켰는데; 하나의 CH3 도메인은 노브 돌연변이인<sup>389</sup> T→W를 보유하고 있으며, 다른 CH3 도메인은 홀 돌연변이인<sup>389</sup> T→S; <sup>391</sup> L→A; <sup>438</sup> Y→V를 보유하고 있다. 키메라 또는 인간화된 경쇄, 키메라 또는 인간화된 중쇄 (CH3 도메인에서 돌연변이된 것) 및 인간 Fc 도메인 (CH3 도메인에서 돌연변이된 것)을 코딩하는 cDNA들을 발현 플라스미드로 클로닝한 다음, 진핵 세포로 발현시켰다. 친화성 크로마토그래피 및 젤 여과에 의해 세포 배양물 상정액으로부터 조립된 1-아암 항체를 정제하였다. 도 1은 DN30 유도체들의 개략적 도면, 및 정제된 재조합 OA-DN30 분자의 비환원 및 환원 조건하에서의 SDS-Page 분리를 보여준다.

**[0097] DN30 1-아암 항체는 고도의 친화성으로 Met를 인식함**

**[0098]** 키메라 또는 인간화된 DN30 항체의 정제된 1-아암 형태들을 ELISA 검정에 의해 Met 수용체에의 결합에 대하여 분석하였다. 참조로서, 키메라 DN30 Fab (MvDN30)<sup>12</sup>을 분석에 포함시켰다. 검정은 고체 상에 Met-Fc를, 그리고 액체 상에 DN30 유도체를 포함하도록 구성하였다. 결합은 항-인간 κ 사슬 항체를 사용하여 밝혀냈다. 데이터는 키메라 및 인간화된 항체 모두가 Met에 결합하며, hOA-DN30-c103E08이 최고의 친화성을 나타낸다는 것을 보여주었다 (도 2a).

**[0099] 비-인간 Met 수용체와의 hOA-DN30-c103E08 교차-반응성의 분석**

**[0100]** 본 발명자들은 하기를 수행하는 hOA-DN30-c103E08의 중 교차 반응성을 분석하였다: (i) 인간, 마우스, 래트 및 원숭이 기원의 정제된 Met의 세포의 도메인을 사용한 ELISA 검정 (도 2b); (ii) 인간, 마우스, 래트, 개 및 원숭이 기원의 세포에 의해 발현되는 표면 Met에 대한 항체 결합의 유동-세포측정기 분석 (도 2c). 실험 결과는 hOA-DN30-c103E08이 인간, 래트, 개, 원숭이 기원의 Met에는 결합하는 반면, 마우스 Met와의 상호작용은 매우 약하다는 것을 보여주었다.

**[0101] DN30 1-아암 항체는 작용제 특성을 발휘하지 않음**

**[0102]** 본 발명자들은 고도로 민감성인 검정인 산란 검정에서 새로운 DN30 유도체들이 Met 작용제 활성을 나타낼 수 있는지를 시험하였다. HGF 자극에 반응하는 세포 운동을 측정하기 위한 표준 시스템 역할을 하는 HPAF-II 인간 췌장 암종 세포를 24시간 동안 점증 농도의 항체로 자극하였다. 양성 대조군으로서, HGF 및 2가 DN30 mAb를 검정에 포함시켰다. 양성 대조군으로 자극된 세포는 분명하게 산란된 반면, 모든 1가 DN30 유도체 (MvDN30, chOA-DN30 및 hOA-DN30 항체)로 처리된 세포의 표현형은 미처리의 것과 구별되지 않았다 (도 3).

**[0103] hOA-DN30은 Met '배출'을 강력하게 유도함**

**[0104]** 본 발명자들은 또한 hOA-DN30이 수용체 배출 및 하향조절을 촉진하는 능력을 유지하는지 여부를 조사하였다. A549 세포를 점증 농도의 chOA-DN30 및 hOA-DN30 항체와 함께 인큐베이팅하였다. 참조로서, MvDN30을 검정에 포함시켰다. 48시간 후, Met의 세포의 부분에 대하여 유도된 단일클론 항체를 사용한 면역 블러팅에 의해 컨디셔닝된 배지에 방출된 Met 엑토도메인을 점증화하였다. 세포 용해물에서 동일한 항체를 사용하여 Met의 총 세포 농도를 또한 측정하였다. 이와 같은 분석은 모든 OA-DN30 항체가 Met 배출을 유도함으로써, 세포의 공간에서의 가용성 Met 엑토도메인의 방출을 초래하고, 세포 표면으로부터 Met를 물리적으로 제거한다는 것을 밝혀냈다 (도 4). 예상밖으로, 시험에 포함된 모든 다른 DN30 유도체와 비교하였을 때, hOA-DN30-c103E08의 활성이 탁월하였다.

**[0105] hOA-DN30-c103E08은 Met 인산화를 강하게 억제함**

**[0106]** 본 발명자들은 chOA-DN30 및 the hOA-DN30 항체가 인간 암종, 즉 GTL-16으로부터 유래하는 세포에서 Met 인산화를 억제하는지를 조사하였다. 상기 세포는 유전자 증폭으로 인한 수용체 과-발현의 결과로서 상시성으로 활성화된 Met를 보유한다. 항-포스포Met 항체를 사용한 면역블러팅에 의해 Met 활성화를 측정하였다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 모든 분자가 투여량-반응 양태로 Met 인산화/활성화를 손상시켰다. 세포에서 Met 농도의 최강 손상을 유도한 hOA-DN30-c103E08이 더 활성화된 DN30 유도체였다.

**[0107] hOA-DN30-c103E08은 MET-중독된 세포 성장을 강하게 억제함**

**[0108]** 세포 성장 (생존율)은 증식/생존을 Met-신호전달에 의존하는 MET-중독된 세포에서만 Met-억제제에 의해 손상될 수 있다. DN30 유도체의 활성을 시험하기 위하여, 지수 성장중인 GTL-16 세포 (MET-중독된 인간 위 암종 세포)를 점증 농도의 chOA-DN30 또는 hOA-DN30 항체와 함께 인큐베이팅하였다. MvDN30을 양성 대조군으로서 검정에 포함시켰다. 72시간 후, 발광-기반 ATP 검정을 사용하여 세포 생존율을 측정하였다. 모든 DN30 유도체들이 투여량-의존적인 방식으로 MET-중독된 세포 성장을 억제하였다 (도 6). hOA-DN30-c103E08이 MvDN30과 비교하였

을 때 2.5배 더 낮으며, chOA-DN30과 비교하였을 때 5.4배 더 낮고, 다른 hOA-DN30 항체들과 비교하였을 때 적어도 5.2배 더 낮은 IC<sub>50</sub>으로, 최고의 억제력을 나타내었다 (도 6의 표 참조).

[0109] hOA-DN30-c103E08은 MET-중독된 세포에서 증식을 차단하는 데에 및 세포독성을 유도하는 데에 고도로 효과적임

[0110] DN30 유도체에 의해 발휘되는 MET-중독된 세포 성장 억제력의 바탕이 되는 메커니즘을 더 분석하기 위하여, 본 발명자들은 세포 증식 및 세포 세포독성을 평가하고, MvDN30, chOA-DN30 및 hOA-DN30-c103E08을 비교하였다. GTL-16 세포를 단일 투여량 (1 μM)의 DN30 유도체와 함께 인큐베이팅하고, ClickIT Edu 유동 세포측정법 검정을 사용하여 세포 주기의 S 단계 동안의 세포에 의한 EdU - 티미딘 유사체 -의 도입을 측정하는 것에 의해, 세포 증식을 평가하였다. MvDN30을 양성 대조군으로서 검정에 포함시켰다. 이와 같은 분석은 DN30 유도체가 증식에 영향을 준다는 것을 밝혀냈는데, S-단계에 있는 처리된 세포의 백분율이 대조군과 비교하였을 때 급격하게 감소되었기 때문이다. 특히, 가장 효과적인 분자는 hOA-DN30-c103E08였는데, 4.9%의 세포만이 여전히 증식성이었다 (대조군 대비 84.2% 감소). chOA-DN30으로 처리된 군집의 증식성 세포는 14.97%이었다 (대조군 대비 52% 감소) (도 7a).

[0111] DN30 유도체가 증식의 차단만을 유도하는지, 또는 그것이 세포독성도 야기하는지를 시험하기 위하여, 지수 성장 중인 MET-중독된 GTL-16 세포를 점증 농도의 chOA-DN30 또는 hOA-DN30-c103E08과 함께 인큐베이팅하였다. MvDN30을 양성 대조군으로서 검정에 포함시켰다. 72시간 후, 셀톡스™ 그린 염료를 세포에 첨가하고 사멸된 세포의 수에 정비례하는 세포의 형광을 측정함으로써, 세포독성을 측정하였다. 모든 DN30 유도체들이 투여량-의존적인 방식으로 GTL-16 세포에서 세포독성을 유도하였다 (도 7b). hOA-DN30-c103E08이 각각 MvDN30 및 chOA-DN30과 비교하였을 때 1.3배 및 6.1배 더 낮은 EC<sub>50</sub>으로, 최고의 유도를 나타내었다.

[0112] hOA-DN30-c103E08은 단독 및 디코이Met와의 조합으로서 HGF-유도 세포 운동을 억제함

[0113] 본 발명자들은 HPAF-II 인간 췌장 암종 세포의 HGF-의존성 세포 운동을 억제하는 hOA-DN30-c103E08의 능력을 시험하였다. 세포를 HGF와 함께 또는 그것 없이 인큐베이팅하고, 점증 투여량의 hOA-DN30-c103E08로 처리하였다. 24시간 후, 세포 집락을 염색하여 분석하였다. 이와 같은 검정에서, hOA-DN30-c103E08은 HGF-의존성 세포 산란을 강하게 감소시켰다 (도 8).

[0114] 상기 세포 시스템에서는, 리간드 (HGF) 및 수용체 (Met)를 동시에 차단하는 것에 의해 HGF-유도 생물학적 반응의 더 효과적인 억제가 달성될 수 있는 것으로 나타났다<sup>27</sup>. 이에 따라, 본 발명자들은 디코이Met<sup>K842E</sup>와의 조합으로서 hOA-DN30-c103E08이 더 고도의 치료 반응을 유도하는지를 시험하였다. 디코이Met<sup>K842E</sup>는 DN30과의 상호작용을 제거하는 돌연변이를 보유하는 Met의 전체 세포의 영역을 포괄하는 재조합 가용성 수용체로서; 그것은 고도의 친화성으로 HGF에 결합하며, HGF를 흡수하여 중화시키는 것에 의해, 그리고 세포 표면에 아직 존재하는 무손상 Met 수용체와 이중이량체를 형성하여 그것이 불활성이 되게 하는 것에 의해, 리간드-구동된 생물학적 활성을 억제한다. 등몰량인 조합으로서 2중 분자를 사용하면, 산란 표현형을 완전히 반전시키는 유효 투여량이 유사한 세포 표현형을 도출할 수 있는 hOA-DN30-c103E08 단독의 투여량에 비해 4배 더 낮았다 (도 8).

[0115] hOA-DN30-c103E08은 단독 및 디코이Met와의 조합으로서 HGF-유도 세포 침습을 억제함

[0116] 본 발명자들은 HPAF-II 세포의 HGF-의존성 세포 침습을 억제하는 hOA-DN30-c103E08의 능력을 시험하였다. 단독 또는 디코이Met<sup>K842E</sup> (1 μM)와의 조합으로서 hOA-DN30-c103E08 (0.5 μM)을 포함하는 무혈청 배지 중 매트릭스로 코팅된 트랜스웰 필터의 상부 챔버에 세포를 시딩하였다. 저부 챔버는 HGF (25 ng/ml)를 함유하는 배지로 충전하였다. 24시간 후, 염색 및 현미경 관찰에 의해, 필터의 저부 부분상에서 이동하는 세포를 평가하였다. 이와 같은 검정에서, hOA-DN30-c103E08은 HGF-의존성 세포 침습을 강하게 감소시켰는데; 조합 hOA-DN30-c103E08 및 디코이Met<sup>K842E</sup>에 의해 세포 반응이 거의 제거되었다 (도 9).

[0117] hOA-DN30-c103E08은 PD-L1 발현의 인터페론-감마 유도를 무산시킴

[0118] 프로그래밍된 세포 사멸 리간드 1 (PD-L1) 및 프로그래밍된 세포 사멸 수용체 1 (PD-1)은 면역 반응과 종양 미세환경 사이의 경계면에서 중심적인 역할을 하는 면역-관문(checkpoint)으로 알려져 있는 핵심 조절 분자이다<sup>30</sup>. 이들은 종양 진행을 제어하는 면역 시스템의 능력을 상당히 손상시킬 수 있다. 종양 세포에 의한 PD-L1의 발현은 유도성이며, 인터페론 감마 (IFN감마)가 가장 강력한 유도인자이다<sup>31</sup>.

- [0119] 본 발명자들은 hOA-DN30-c103E08에 의한 Met의 억제가 IFN감마 경로를 조절하고 결과적으로 PD-L1 조절을 할 수 있는지를 분석하였다 (도 10). MET-중독된 GTL-16 세포를 48시간 동안 INF감마로 처리하고, INF감마-유도성 PD-L1 발현에 대해 분석하였다. 비자극 조건에서는 PD-L1이 검출가능하지 않았던 반면, INF감마에의 노출시, 그것이 일관되게 상향-조절되었다. 48시간 동안의 hOA-DN30-c103E08을 사용한 처리는 INF감마에 의해 유도되는 PD-L1의 상향-조절을 상당히 손상시켰다.
- [0120] **hOA-DN30-c103E08은 생체내에서 바람직한 약동학적 프로파일을 나타냄**
- [0121] 본 발명자들은 MvDN30 및 키메라 DN30 mAb와 비교하여 hOA-DN30-c103E08의 약동학적 특성을 연구하였다. 단일 투여량의 상기 언급된 분자들을 정맥내 주사에 의해 면역결핍 마우스로 전달하였다. 전달 후 상이한 시점에, 처리된 마우스로부터의 말초 혈액을 수집하였다. 혈청 샘플에서 수행된 ELISA에 의해, 연구 분자의 혈중 농도를 측정하였다. hOA-DN30-c103E08 혈중 농도는 mAb에 대하여 측정된 것에 필적하였으며, MvDN30에 비해서는 항상 더 높았다 (도 11).
- [0122] **hOA-DN30-c103E08은 생체내에서 MET-중독된 종양의 성장을 손상시킴**
- [0123] MET-중독된 모델에서, 생체내에서 종양 성장을 억제하는 DN30-유도체들의 능력을 시험하였다.  $1 \times 10^6$ 개의 GTL-16 세포를 NOD-SCID 마우스의 옆구리에 피하로 주사하였다. 1주 후, 촉진성인 종양을 보유하는 마우스를 하기 4개의 균질 처리 군으로 무작위화하였다: 비히클 (n=6), MvDN30 (n=6), hOA-DN30-c103E08 (n=5), chOA-DN30 (n=5). 30 mg/Kg의 2회/주로 정맥내 주사에 의해 항체를 전달하고; 동일한 양의 분자를 투여하기 위하여, 동일한 일정에 따라 15 mg/kg으로 MvDN30을 전달하였는데, 1-아암 항체의 분자량이 MvDN30 대비 2배였기 때문이다 (즉 OA-DN30 체계에서는 100 KDa 가량, 그리고 MvDN30에서는 50 KDa 가량임). MvDN30은 - 그의 짧은 혈장 반감기에서 예측되던 대로 - 효과적이지 않았던 반면, 양 1-아암 유도체는 종양 성장을 억제하였다 (도 12a) (각각 비히클 대비 hOA-DN30-c103E08 및 chOA-DN30에서  $P = 0.0007$  및  $0.05$ ). 놀랍게도, hOA-DN30-c103E08이 chOA-DN30에 비해 대단히 더 효과적이었는데; 처리된 양은 대조군 대비 hOA-DN30-c103E08의 경우 87.8 %, 그리고 chOA-DN30의 경우 52.9 % 더 적었다 (도 12b) (chOA-DN30 대비 hOA-DN30-c103E08에서  $P = 0.009$ ). 본 발명자들은 또한 투여량 반응 실험을 수행하여 hOA-DN30-c103E08의 억제 활성을 분석하였다. 상기한 실험 조건을 유지하면서, 마우스를 5개의 균질 군으로 무작위화하고, 상이한 투여량의 hOA-DN30-c103E08을 사용하여 3회/주의 i.v. 주사에 의해 처리하였다. 10, 30 및 60 mg/kg의 투여량은 종양 성장을 차단하는 데에 고도로 효과적이었던 반면, 3.3 mg/kg을 사용한 처리는 대조군과 통계적으로 다르지 않았다 (도 13).
- [0124] 재료 및 방법
- [0126] **\*세포 배양**
- [0127] A549 인간 폐 선암종 세포, HPAF-II 인간 췌장 선암종 세포, C2C12 마우스 근육 근모세포, H9C2 (2-1) 래트 심장 근모세포, MDCK 개 신장 세포 및 Cos-7 원숭이 신장 세포는 ATCC/LGC 스탠다즈(Standards) S.r.l. 사 (이탈리아 세스토 산 지오반니 소재)로부터 입수하였으며; GTL-16 세포주는 MET 유전자 사본 수에서 모체 세포주와 상이한<sup>32</sup> MKN-45 세포 (일본 오사카 소재 일본 연구 생물자원 컬렉션(Japanese Collection of Research Bioresources)에서 가용한 인간 위 암종 세포)로부터 유래한 클론이다. GTL-16 세포주는 이탈리아 소재 인터랩 셀 라인 컬렉션(Interlab Cell Line Collection) (ICLC)의 첨단 생물공학 센터(Advanced Biotechnology Center) (ABC)에서 ICLC PD 08003의 기탁 번호로 가용하다. 인간 폐암인 EBC-1은 일본 연구 생물자원 컬렉션의 것이었다. DN30 하이브리도마는 이탈리아 소재 인터랩 셀 라인 컬렉션 (ICLC)의 첨단 생물공학 센터 (ABC)에서 ICLC PD 05006의 기탁 번호로 가용하다.
- [0128] 모든 세포는 공급자가 제안한 대로 배양하였다. 모든 세포 배양물을 미코플라스마 오염에 대하여 시험하였다.
- [0130] **\*DN30 항체의 키메라 및 인간 1-아암 형태의 생성**
- [0131] 키메라 DN30 항체: 유전자 합성에 의해, 각각 경쇄 (VL-CL), 중쇄 (VH-CH1-CH2-CH3) 및 Fc 도메인 (CH2-CH3)을 코딩하는 3종의 별도 cDNA를 생성시켰다. 가변 영역 (마우스 서열)은 DN30 항체의 것이었으며 (서열식별번호: 15 및 16); 인간 이뮤노글로불린으로부터 유래하는 인간 기원 불변 영역, 특히 경쇄는 인간 카파 유형 불변 도메인 (진뱅크(GenBank) 서열 ID#: DI165992)을 포함하고, 중쇄는 인간 IgG1 불변 도메인 (진뱅크 서열 ID#:

DJ392898)을 포함한다. 코딩 서열의 C-말단에, 중쇄는 His-TAG (서열식별번호: 38, 39)를 포함하며, Fc는 스트랩-TAG (서열식별번호: 40, 41)를 포함한다.

[0132] 인간화된 DN30 항체: 페어 저니 바이올로지스 사에서 파지 디스플레이 라이브러리 접근법을 사용하여, DN30 마우스 항체의 생식 계열 스크리닝에 의한 인간화를 수행하였다. 그들은 벗어난 FR (프레임) 잔기의 식별, 및 CDR1-CDR2의 동일한 정준 배수 조합을 가지는 생식계열에서 선택된 최근접 인간 V 생식계열의 분석으로부터 시작하였는데, 하기의 가용한 도구 및 데이터베이스를 사용하였다: UCL 플러스 Dr. 앤드류 마틴의 abYsistool, <http://www.bioc.uzh.ch/plueckthun/antibody/> 및 <http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/>. 파지 디스플레이 라이브러리의 생성시에는 - 여기서 VH 및 VL 영역의 무작위화가 수행되었음 -, 4회의 친화성-추진 파지 디스플레이 선택 라운드를 수행하였다. 과정 종료시에는, 최고의 인간 동일성 및 상동성을 가지는 5종의 서로 다른 DN30 인간화 변이, 즉 클론 03E08, 03G05, 03F04, 03H08 및 04H08을 선택하였다. 전통적인 분자 생물학 기술을 통하여, 인간 이뮤노글로불린으로부터 유래하는 불변 도메인 서열, 즉 인간 카파 경쇄 및 IgG1 중쇄 불변 도메인에 가변 영역을 연결하였다.

[0133] 1-아암 형태 (chOA-DN30 및 hOA-DN30 항체)로의 키메라 및 인간화된 항체의 체계화: 특정 아미노산 변형을 CH3 영역에 삽입하여, '노브와 홀' 구조<sup>28,29</sup>를 생성시켰다. '노브와 홀'은 동종이량체에 비해 이종이량체의 형성을 강화하는 데에 효과적인 설계 전략이라는 것이 입증되어 있다. 전략은 인간 IgG 분자의 H 사슬들 사이에서 가장 광범위한 단백질-단백질 상호작용 부위인 항체 Fc 단편의 CH3 영역에 입체적으로 상보성인 돌연변이를 도입하는 도메인 경계면 재형성을 바탕으로 한다. 하나의 사슬 VH-CH1-CH2-CH3 폴리펩티드는 작은 아미노산이 더 큰 것으로 치환되는<sup>389</sup> T→W (노브 돌연변이)를 포함하며; 반대로, 다른 사슬인 CH2-CH3 폴리펩티드는 더 작은 것을 사용한 대형 잔기의 치환<sup>389</sup> T→S; <sup>391</sup> L→A; <sup>438</sup> Y→V (홀 돌연변이)를 포함한다. 이들 돌연변이는 상대물 CH3 도메인상 노브에 근접해 있는 잔기 389, 391 및 438이 무작위로 치환된 파지 디스플레이 기술<sup>33</sup>에 의한 최적화에서 선택되었다. 노브와 홀 조작용 동종이량체, 즉 진정 항체 (VL-CL+VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub> 또는 Fc 도메인 단독 (CH2-CH3)<sub>2</sub> 대신, 3종의 상이한 아미노산 사슬 (VL-CL + VH-CH1-CH2-CH3 + CH2-CH3)을 포함하는 이종이량체의 조립을 촉진한다.

[0134] N-말단에서, CH2-CH3 폴리펩티드는 말단절단된 인간 힌지 영역에 상응하는 서열을 포함한다. 경쇄 불변 도메인 (CL) C-말단 위치의 시스테인과의 사슬-간 디설피드 결합의 형성에 연관된 카바트의 EU 번호지정 체계에 따른 위치 233에서는, 시스테인을 배제하기 위하여 결실이 필요하다. 또한, CH2-CH3 폴리펩티드가 단백질 합성의 RER/골기 경로에 진입하는 것을 가능하게 하기 위하여, - 항체의 경쇄 (VL-CL) 및 중쇄 (VH-CH1-CH2-CH3)가 그러하듯이 - N-말단의 말단절단된 힌지 영역 전에, DN30 중쇄의 신호 펩티드에 상응하는 서열이 포함된다.

[0135] 본원에서 개시되는 키메라 항-Met 항체 단편 (chOA-DN30)은 하기로 구성된다:

[0136] (i) 서열식별번호: 15에 제시된 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변 도메인;

[0137] (ii) 서열식별번호: 16에 제시된 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변 도메인;

[0138] (iii) 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간 경쇄 불변 (CL) 도메인;

[0139] (iv) 서열식별번호: 10에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간 중쇄 불변 CH1 도메인;

[0140] (v) 서열식별번호: 11에 제시된 아미노산 서열을 가지는 제1 인간 Fc 폴리펩티드; 및

[0141] (vi) 서열식별번호: 12에 제시된 아미노산 서열을 가지는 제2 인간 Fc 폴리펩티드.

[0142] 본 개시내용의 인간화된 항-Met 항체 단편 (hOA-DN30-c103E08) 대상은 하기로 구성된다:

[0143] (i) 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간화된 경쇄 가변 도메인;

[0144] (ii) 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간화된 중쇄 가변 도메인;

[0145] (iii) 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간 경쇄 불변 (CL) 도메인;

[0146] (iv) 서열식별번호: 10에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간 중쇄 불변 CH1 도메인;

[0147] (v) 서열식별번호: 11에 제시된 아미노산 서열을 가지는 제1 인간 Fc 폴리펩티드; 및

- [0148] (vi) 서열식별번호: 12에 제시된 아미노산 서열을 가지는 제2 인간 Fc 폴리펩티드.
- [0149] 인간화된 항-Met 항체 단편 (hOA-DN30-c103G05)은 하기로 구성된다:
- [0150] (i) 서열식별번호: 17에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간화된 경쇄 가변 도메인;
- [0151] (ii) 서열식별번호: 18에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간화된 중쇄 가변 도메인;
- [0152] (iii) 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간 경쇄 불변 (CL) 도메인;
- [0153] (iv) 서열식별번호: 10에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간 중쇄 불변 CH1 도메인;
- [0154] (v) 서열식별번호: 11에 제시된 아미노산 서열을 가지는 제1 인간 Fc 폴리펩티드; 및
- [0155] (vi) 서열식별번호: 12에 제시된 아미노산 서열을 가지는 제2 인간 Fc 폴리펩티드.
- [0156] 인간화된 항-Met 항체 단편 (hOA-DN30-c103F04)은 하기로 구성된다:
- [0157] (i) 서열식별번호: 19에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간화된 경쇄 가변 도메인;
- [0158] (ii) 서열식별번호: 20에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간화된 중쇄 가변 도메인;
- [0159] (iii) 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간 경쇄 불변 (CL) 도메인;
- [0160] (iv) 서열식별번호: 10에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간 중쇄 불변 CH1 도메인;
- [0161] (v) 서열식별번호: 11에 제시된 아미노산 서열을 가지는 제1 인간 Fc 폴리펩티드; 및
- [0162] (vi) 서열식별번호: 12에 제시된 아미노산 서열을 가지는 제2 인간 Fc 폴리펩티드.
- [0163] 본 개시내용의 인간화된 항-Met 항체 단편 (hOA-DN30-c103H08) 대상은 하기로 구성된다:
- [0164] (i) 서열식별번호: 21에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간화된 경쇄 가변 도메인;
- [0165] (ii) 서열식별번호: 22에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간화된 중쇄 가변 도메인;
- [0166] (iii) 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간 경쇄 불변 (CL) 도메인;
- [0167] (iv) 서열식별번호: 10에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간 중쇄 불변 CH1 도메인;
- [0168] (v) 서열식별번호: 11에 제시된 아미노산 서열을 가지는 제1 인간 Fc 폴리펩티드; 및
- [0169] (vi) 서열식별번호: 12에 제시된 아미노산 서열을 가지는 제2 인간 Fc 폴리펩티드.
- [0170] 본 개시내용의 인간화된 항-Met 항체 단편 (hOA-DN30-c104H08) 대상은 하기로 구성된다:
- [0171] (i) 서열식별번호: 23에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간화된 경쇄 가변 도메인;
- [0172] (ii) 서열식별번호: 24에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간화된 중쇄 가변 도메인;
- [0173] (iii) 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간 경쇄 불변 (CL) 도메인;
- [0174] (iv) 서열식별번호: 10에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간 중쇄 불변 CH1 도메인;
- [0175] (v) 서열식별번호: 11에 제시된 아미노산 서열을 가지는 제1 인간 Fc 폴리펩티드; 및
- [0176] (vi) 서열식별번호: 12에 제시된 아미노산 서열을 가지는 제2 인간 Fc 폴리펩티드.

[0177] **키메라 및 인간 1-아암 항체의 발현 및 정제**

[0178] 상기한 경쇄 (인간화된 경쇄의 경우 서열식별번호: 25, 26, 27, 28, 29에, 그리고 키메라 경쇄의 경우 서열식별번호: 30에 제시된 뉴클레오티드 서열), 중쇄 (인간화된 중쇄의 경우 서열식별번호: 31, 32, 33, 34, 35에, 그리고 키메라 중쇄의 경우 서열식별번호: 36에 제시된 뉴클레오티드 서열) 및 Fc (서열식별번호: 37에 제시된 뉴클레오티드 서열)를 코딩하는 cDNA를 흔하게 가용한 발현 벡터 (예컨대 캘리포니아 카마릴로 소재 인비트로젠 코퍼레이션(Invitrogen Corporation)사의 pcDNA3.1 플라스미드 cat.# V79020)로 클로닝하고, ExpiCHO-S 세포 (cat.#: A29127, 서모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific) 사)를 형질감염시키는 데에 사용하였다. 벡터 비는 원하는 97.5 kDa 이종이량체 (OA-Ab)의 산출은 최대화하고 소정의 150 kDa 2가 동종이량체 (진정 Mab)의 존재는 최소화하도록 최적화하였다. 최적 비는 하기였다: 경쇄, 중쇄 완전 크기 ("노브" 벡터) 및 Fc ("홀"

벡터)에 대하여 각각 1:1:2. 이와 같은 조건은 최소량의 동종이량체 존재로 이어졌으며, 이종이량체는 총 단백질의 대략 85 %이었다. 엑스피펙타민(Expifectamine)<sup>TM</sup> CHO 형질감염 반응물 (cat.# A29130, 서모피셔 사이언티픽 사)에 의해 일시적 발현을 추진하였다. 생성 9일 후 상청액을 수확하였다. 약타 퓨어(AKTA Pure) 25 크로마토그래피 시스템에서 히트랩 맵셀렉트 슈어(Hitrap MabSelect Sure) 컬럼 (cat.# GE29-0491-04, 시그마 알드리치(Sigma Aldrich) 사)을 사용하여 OA-DN30 항체를 정제하였다. 이후, 0.1 M 시트레이트 완충제를 사용하여 pH 3.0에서 OA-DN30 항체를 용리하였다. 용리 분획을 수집하고, 1M 트리스(Tris)-HCl pH 9.0 (용리 단백질 ml 당 0.15 ml의 비)을 사용하여 중화하였다. GE 약타 프라임(AKTA Prime) 액체 크로마토그래피 시스템 (GE 헬스케어 라이프 사이언시즈(Healthcare Life Sciences) 사) 상의 1x PBS (pH 7.4)-평형화 수퍼덱스(Superdex) 200 26/600 크기 배제 컬럼 (cat.# GE28-9893-36, 시그마 알드리치 사)에서, OA-DN30 항체를 추가 정제함으로써, OA-Ab를 함유하는 분획을 동종이량체 분획 (mAb 또는 Fc)으로부터 분리하였다. OA-DN30 항체를 함유하는 정제용 SEC 분획을 혼합수집하여, SDS-PAGE에 의해 분석함으로써, 순도를 확인하였다. 혼합수집된 분획을 내독소 농도에 대해서도 시험하였다. 정제용 SEC 정제로부터의 최종 혼합수집 분획은 모든 2가 동종이량체의 부재, 그리고 노브-노브 Fc 동종이량체에 상응하는 소량 (<5 %)의 더 작은  $\approx 70$  kDa 밴드의 존재를 보여주었다.

**[0179] 돌연변이된 Met 엑토도메인의 생성, 발현 및 정제**

**[0180]** 기탁 번호 X54559로 진뱅크에 게시된 바와 같은 인간 Met 엑토도메인 서열로부터 시작하고 퀵체인지(QuickChange) II 부위-지침 돌연변이유발 키트 (cat.# 200524 캘리포니아 산타 클라라 소재 아길런트 테크놀로지스(Agilent Technologies) 사)를 사용하여 제조자의 지침에 따라 합성으로 단일 아미노산 치환을 보유하는 인간 MET 엑토도메인 (디코이Met)의 cDNA 서열을 생성시켰다. 상기 절차는 원하는 점 돌연변이를 포함하는 센스 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 설계를 필요로 한다. 하기 올리고를 사용하였다:

**[0181]** - 돌연변이 K842E:

**[0182]** sn. 5'-gtacataatcctgtgtttgagccttttgaagccagtg-3' (서열식별번호: 42);

**[0183]** as. 5'-cactggcttttcaaaaggctcaaacacaggattatgtac-3' (서열식별번호: 43).

**[0184]** 디코이Met 돌연변이를 코딩하는 cDNA를 발현하는 pcDNA3.1 플라스미드 (cat.# V79020 인비트로젠 코포레이션 사, 캘리포니아 카마틸로 소재)를 사용한 HEK-293T 세포의 일시적 형질감염에 의해, 조작된 가용성 수용체를 생성시켰다. 형질감염된 세포를 3일 동안 고갈시키고, 가용성 수용체를 함유하는 세포 배양물 상청액을 수집하였다. 제조자의 지침에 따라 히스트랩(HisTrap) HP 컬럼 (cat.# 17524701 GE 헬스케어 사, 독일 프라이부르크 소재)을 사용한 친화성 크로마토그래피에 의해, 재조합 단백질의 정제를 수행하였다. U-프로테인 익스프레스(Protein Express) BV 사 (네덜란드 우트레흐트 소재)에서 대-규모 단백질 제조 및 정제를 수행하였다.

**[0185]** 인간 디코이Met의 변이 (디코이MET<sup>K842E</sup>)는 서열식별번호: 14에 제시된 아미노산 서열을 가진다.

**[0186] SDS-PAGE + 블루 쿠마씨에 의한 정제된 단백질의 분석**

**[0187]** 표준 방법에 따라  $\beta$ -메르캅토 에탄올의 존재 또는 부재하에 SDS-PAGE에 의해 4-12 % 아크릴아미드 구배 젤로 정제된 OA-DN30 항체 (1  $\mu$ g)를 분리하였다. 분자량 마커 (cat.# 1610374, 바이오-라드(Bio-Rad) 사)를 분석에 포함시켰다. 젤로 분리된 폴리펩티드를 젤 코드 블루 염색 시약 (cat.# 24590, 서모 피셔 사이언티픽 사)에 의해 밝혀냈다.

**[0188] ELISA 결합 검정**

**[0189]** Met와 DN30 유도체 사이의 상호작용 분석을 위하여, 정제된 Met-Fc 키메라 (cat.#. 358-MT-100 R&D 시스템즈 (Systems) 사, 100 ng/웰)를 ELISA 플레이트상에 고정시켰다. 0.5 % BSA를 사용한 포화 후, 37 °C에서 1시간 동안 인큐베이팅하고, 점증 농도의 항체 (MvDN30, chOA-DN30 또는 hOA-DN30 항체, PBS-BSA 0.5 % - 트윈 (Tween) 0.1 % 중에 제조된 0 - 500 nM)를 액체 상에 첨가하였다. HRP-접합된 항-인간  $\kappa$  사슬 항체 (cat.# A7164, 시그마-알드리치 사)를 사용하여 결합을 밝힌 후, 이어서 TMB (cat.# T8665, 시그마-알드리치 사)와 함께 인큐베이팅하였다. 다중-표지 플레이트 판독기 빅터(VICTOR)-X4 (피킨 엘머 인스트루먼트(Perkin Elmer Instruments) INC. 사, 매사추세츠 왈트만 소재)에 의해 비색법 검정을 정량하였다. 데이터를 분석하고, 프리즘(Prism) 소프트웨어 (그래프패드(GraphPad) 사)를 사용하여 피팅하였다.

**[0190]** 상이한 종들로부터 유래하는 Met-Fc 키메라 (고체 상)에 대한 hOA-DN30-c103E08 (액체 상)의 ELISA 결합 분석을 위하여, 인간 (cat.#. 358-MT-100 R&D 시스템즈 사), 뮤린 (cat.# 50622-M02H, 시노 바이올로지칼(Sino

Biological) 사), 래트 (cat.# 80004-R02H, 시노 바이올로지칼 사) 및 원숭이 (cat.# 90304-C02H, 시노 바이올로지칼 사) 기원의 Met를 검정에 포함시켰다. 질차는 상기한 것과 동일하였다.

[0191] **유동-세포측정기 결합 분석**

[0192] 세포 표면에 발현된 Met에의 hOA-DN30-c103E08 결합을 위하여,  $2 \times 10^5$  개의 EBC-1, C2C12, H9C2, MDCK 또는 Cos-7 세포를 스템프로(StemPro)<sup>TM</sup> 아큐타제(Accutase)<sup>TM</sup> 세포 해리 반응물 (cat.# A1110501, 서모피셔 사이언티픽 사)로 처리하고, 수집하여, PBS-2 % FCS 중에서 4 °C로 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBS-2 % BSA 중에서 10 µg/ml의 hOA-DN30-c103E08과 함께 4 °C로 30분 동안 세포를 인큐베이션하는 것에 의해 항체 염색을 수행하였다. PBS-2 % BSA를 사용한 6회 세척 후, 세포를 1:100 희석된 항-인간 IgG-APC (cat.# 109-606-088 잭슨 이뮤노 리서치(Jackson Immuno Research) 사)와 함께 4 °C로 30분 동안 인큐베이션한 다음, 세척하여 비결합 항체를 제거하였다. DAPI (3 µl의 1 µg/ml 작용 용액, 시그마-알드리치 사, cat.# 10236276001)를 사용하여 4 °C로 5분 동안 세포들을 공동-염색하고, 서밋(Summit) 4.3 소프트웨어 (다코(Dako) 사)에 의해 Met 발현에 대하여 분석하였다. 동형 대조군 (항 인간 APC IgG)으로부터 유래하는 형광 신호를 임계치 ( $0 < \text{MFI} < 10^1$ )로 설정하였다. 평균 형광 강도 (MFI)가 임계치에 비해 더 높은 경우 ( $\text{MFI} > 10^1$ ), 세포를 Met 발현에 있어서 양성인 것으로 간주하였다.

[0193] **Met 배출의 분석**

[0194] 합류-이하 A549 단층을 PBS로 2회 세척한 다음, 점증 농도 (37, 111, 333, 1000 nM)의 DN-30 유도체와 함께 무-혈청 배지 중에서 인큐베이션하였다. 48시간 후, 컨디셔닝된 배지를 수집하고, 램리(Laemmli) 완충체를 사용하여 세포를 용해시켰다. 항-Met 항체 (3D4, cat.# 08-1366 인비트로젠 코포레이션 사)를 사용한 웨스턴 블롯에 의해 15 µg의 총 세포 단백질 중에서 Met 단백질 농도를 측정하였으며; 적제 대조군으로서, 항-빈클린 항체 (클론 hVIN-1, cat.# V9131 시그마 라이프 사이언스(Sigma Life Science) 사)를 사용하여서도 필터를 프로빙하였다. 수용체의 세포의 도메인에 대하여 유도된 항-인간 HGFR/Met 항체 (cat.# AF276, R&D 시스템즈 사)를 사용한 웨스턴 블롯팅에 의해, 15 µl의 세포 배양물 상청액 중에서 Met 엑토도메인 농도를 측정하였다. 항-마우스 IgG1 HRP-접합 이차 항체 (cat.# JI115035003, 잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch) 사) 및 ECL 시스템 (cat.# W1015, 프로메가(Promega) 사)을 단백질 검출에 사용하였다. 이미지J 소프트웨어를 사용하여 웨스턴 블롯 밴드를 정량하였다.

[0195] **MET 인산화 검정**

[0196] 혈청-고갈된 GTL-16 세포를 DN30 유도체 (1000 또는 250 nM)와 함께 24시간 동안 인큐베이션하였다. 하기의 일차 항체들을 사용한 웨스턴 블롯에 의해 총 세포 용해물을 분석하였다: 항-Met 포스포-Tyr<sup>1234/1235</sup> (D26, cat.# 3077 셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology) 사); 항-Met (3D4, cat.# 08-1366 인비트로젠 코포레이션 사); 및 항-빈클린 (클론 hVIN-1, cat.# V9131 시그마 라이프 사이언스 사). 항-마우스 IgG1 및 항-토끼 IgG (cat.# JI111035003) HRP-접합 이차 항체 및 ECL 시스템을 단백질 검출에 사용하였다. 이미지J 소프트웨어를 사용하여 웨스턴 블롯 밴드를 정량하였다.

[0197] **시험관내 생물학적 검정**

[0198] 세포 산란 검정을 위하여, 완전 배양 배지 중 96-웰 플레이트에 HPAF-II 세포 (8000개/웰)를 시딩하였다. 항체의 작용제 활성을 분석하기 위하여, 24시간 후, HGF (8 ng/ml, 양성 대조군, cat.# 294-HG-025, R&D 시스템즈 사) 또는 항체 (DN30 mAb, MvDN30, chOA-DN30, hOA-DN30 항체, 모두 200 nM 농도)를 배양 배지에 첨가하였다. 억제 활성을 분석하기 위하여, 단독 또는 디코이Met<sup>K842E</sup>와의 1:1 조합으로서 점증 농도 (0 - 4 µM)의 hOA-DN30-c103E08을 첨가하였다. 추가 24시간의 시간 후, 6.25 ng/ml의 HGF를 사용하여 24시간 동안 세포를 자극하였다. 다음에, 11 % 글루타르알데히드 (cat.# 340855 시그마-알드리치 사)를 사용하여 세포를 고정하고, 0.1 % 크리стал 바이올렛 (cat.# C3886 시그마-알드리치 사)을 사용하여 염색한 후, 현미경 관찰 (현미경 레이카(Leica) DM2000)에 의해 분석하였다. QICAM 패스트(Fast) 1394 컬러 디지털 카메라 (Q이미징(Imaging) 사)를 사용하여 이미지를 촬영하였다.

[0199] 세포 침습 검정을 위하여, 단독 또는 1 µM 디코이Met<sup>K842E</sup>와의 조합으로서 0.5 µM hOA-DN30-c103E08의 존재하에 무-혈청 배양 배지 중에 HPAF-II 세포 ( $1.5 \times 10^5$  개/웰)를 현탁하고, 30 µg/웰의 매트릭셀 매트릭스 (cat.#

354234, 코닝(Corning) Inc. 사)로 사전-코팅된 트랜스웰 챔버의 상부 구획에 시딩하였다. 2 % FBS 및 6.25 ng/ml의 HGF가 보충된 배양 배지를 챔버의 저부 구획에 첨가하였다. 24시간 후, 트랜스웰 필터의 상부 측상 세포는 기계식으로 제거한 반면, 멤브레인을 통하여 이동된 세포는 11 % 글루타르알데히드를 사용하여 고정하고, 0.1 % 크리스탈 바이올렛을 사용하여 염색하였다. 이미지-J 소프트웨어를 사용하여 세포 침습을 정량하였다.

[0200] 생존율 검정을 위하여, 10 % FBS 배양 배지 중 96 웰 플레이트에 2000개 세포/웰로 GTL-16 세포를 시딩하였다. 24시간 후, 10 % FBS 더하기 시험될 분자 (점증 농도 - 0 내지 10  $\mu$ M)를 포함하는 새로운 것으로 배지를 교체하였다. 72시간 후, 셀타이터-글로 (cat.# G7573 프로메가 Corp 사)를 사용하여 제조자의 지침에 따라 세포 생존율을 평가하였다. 빅터 X4를 사용하여 화학-발광을 검출하였다.

[0201] 증식 검정을 위하여, 10 % FCS 배지 중 6 웰 플레이트에 350000개의 GTL-16 세포를 플레이팅하였다. 24시간 후, 고정 농도 (1  $\mu$ M)의 DN30 유도체를 사용하여 추가 48시간 동안 세포를 처리하였다. 다음에, 10  $\mu$ M의 EdU (cat. # A10044, 서모 피셔 사)를 추가 2시간 동안 배양 배지에 첨가하였다. Click-iT™ EdU 알렉사 플루오르 (Alexa Fluor)™ 488 유도 세포측정법 검정 (cat. # C10425, 서모 피셔 사)의 절차에 따라 세포형광측정기 분석에 의해 S 단계에 있는 세포의 %를 측정하였다.

[0202] 세포독성 검정을 위하여, 10 % FCS 배지 중 96 웰 플레이트에 2000개의 GTL-16 세포를 플레이팅하였다. 24시간 후, 점증 농도의 DN30 유도체를 사용하여 추가 48시간 동안 세포를 처리하였다. 제조자의 지침에 따라 셀-톡스™ 그린 세포독성 검정 (cat. # G8741, 프로메가 사)에 의해 세포 세포독성을 평가하였다.

[0203] **PD-L1 발현 분석**

[0204] 250 nM hOA-DN30-c103E08과의 조합으로서 50 ng/ml의 IFN  $\gamma$ -1b (밀테니이 바이오텍(Miltenyi Biotec) 사, cat.# 130-096-484)를 사용하여 48시간 동안 (24시간마다 교체) 합류-이하 GTL-16 세포를 처리하였다. 다음에, 램리 완충제 중에서 단층을 용해시키고, 45  $\mu$ g의 총 단백질을 8 % SDS-PAGE 젤에 적용하였다. 표준 방법에 따라 단백질을 젤로부터 아이블롯(iBlot) 전달 니트로셀룰로스 멤브레인 (라이프 테크놀로지스(Life technologies) 사, cat.# IB23001)상으로 전달하였다. 항-PD-L1 항체 (E1L3N, cat.# 13684, 셀 시그널링 테크놀로지 사)에 의해 PD-L1 발현을 검출하였다. 항-MET 포스포-Tyr<sup>1234/1235</sup> (D26) 항체에 의해 P-Met 농도를 확인하였다. 적재 대조군으로서, 항-GAPDH (D4C6R, cat.# 97166 셀 시그널링 테크놀로지 사)를 사용하여 필터를 프로빙하였다. 이차 HRP-접합 염소 항-마우스 IgG (cat.# JI115035003) 또는 항-토끼 IgG (cat.# JI111035144) (모두 잭슨 이뮤노리서치 사의 것) 및 ECL 시스템을 단백질 검출에 사용하였다.

[0205] **생체내 실험**

[0206] 모든 동물 절차는 [Fondazione Piemontese per la Ricerca sul Cancro]의 동물 실험 윤리 위원회 및 이탈리아 보건성에 의해 승인된 프로토콜에 따라 수행하였다. NOD-SCID 마우스는 찰스 리버(Charles River) 사 (이탈리아 칼코 소재)로부터 구매하였다.

[0207] 약동학적 분석을 위하여, NOD-SCID 마우스에 단일 투여량 (100  $\mu$ g)의 hOA-DN30-c103E08을 정맥내 주사하였다. 하기의 상이한 시점에 말초 혈액을 수집하였다: 10', 30', 1시간, 4시간, 8시간, 24시간, 48시간, 72시간, 120시간. 결합 검정 부문에서 상기한 바와 같이 ELISA에 의해 치료용 분자의 혈청 농도를 측정하고, 상이한 정제 분자들의 연속 회색에 의해 수득된 표준 곡선의 선형 부분에 샘플의 흡광도 값을 보삽(interpolating)하였다. 각 시점은 4 마리 마우스의 평균 값이었다.

[0208] 종양 성장 분석을 위하여,  $1 \times 10^6$ 개의 GTL-16 세포를 NOD-SCID 마우스의 옆구리에 접종하였다. 주당 2회 캘리퍼 측정에 의해 종양 성장을 모니터링하였다. 하기의 수확식을 사용하여 종양 부피를 계산하였다:  $V = 4/3 \pi (x/2)(y/2)(z/2)$ 로서, 식 중 x, y 및 z는 종양 덩어리의 높이, 너비 및 깊이이다. 종양이 70-100 mm<sup>3</sup>의 부피에 도달하였을 때 (세포 주사 대략 1주 후), 마우스를 균질 군으로 무작위화하였다. 한 가지 경우에는, 4개 군을 생성시켰으며 (PBS-비히클, MvDN30, chOA-DN30, hOA-DN30-c103E08; 모든 항체 30 mg/kg, 주 당 2회); 다른 경우에는, 5개 군을 생성시켰다 (PBS-비히클, hOA-DN30-c103E08 60 mg/kg, 30 mg/kg, 10 mg/kg, 3.3 mg/kg; 모든 투여량 주 당 3회). 정맥내 주사에 의해 분자들을 투여하였다. 실험 종료시 (처리 15 또는 17일)에는, 마우스를 희생시키고, 종양을 절제하여, 칭량하였다.

[0209] **통계 분석**

[0210] 평균 및 표준 편차 (SD)는 마이크로소프트 오피스 엑셀(Microsoft Office Excel) 2010 소프트웨어 (마이크로소

프트 코포레이션(Microsoft Corporation) 사)를 사용하여 계산하였다.  $K_d$  값을 계산하기 위하여, ELISA 검정으로부터의 데이터를 분석하고, 그래프패드 프리즘 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어 사)를 사용하여 비선형 회귀 1 부위 결합 쌍곡선 곡선에 따라 피팅하였다.  $IC_{50}$  및  $EC_{50}$  값을 계산하기 위해서는, 데이터를 분석하고, 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비선형 회귀 시그모이드(sigmoidal) 투여량-반응 곡선에 따라 피팅하였다. 모든 실험은 적어도 2회 반복하였다. 도면들은 하나의 대표적인 실험을 나타낸다.

[0211]

[참고문헌]

1. Comoglio PM, Trusolino L, Boccaccio C. Known and novel roles of the MET oncogene in cancer: a coherent approach to targeted therapy. *Nat Rev Cancer* 2018; **18**(6): 341-358; doi 10.1038/s41568-018-0002-y.
2. Kong-Beltran M, Seshagiri S, Zha J, Zhu W, Bhawe K, Mendoza N et al. Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. *Cancer Res* 2006; **66**(1): 283-289; doi 10.1158/0008-5472.CAN-05-2749.
3. Gandino L, Longati P, Medico E, Prat M, Comoglio PM. Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. *J Biol Chem* 1994; **269**(3): 1815-1820.
4. Petrelli A, Gilestro GF, Lanzardo S, Comoglio PM, Migone N, Giordano S. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* 2002; **416**(6877): 187-190; doi 10.1038/416187a.
5. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; **11**(12): 834-848; doi 10.1038/nrm3012.
6. Prat M, Crepaldi T, Pennacchietti S, Bussolino F, Comoglio PM. Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. *J Cell Sci* 1998; **111** ( Pt 2): 237-247.
7. Pacchiana G, Chiriaco C, Stella MC, Petronzelli F, De Santis R, Galluzzo M et al. Monovalency unleashes the full therapeutic potential of the DN-30 anti-Met antibody. *J Biol Chem* 2010; **285**(46): 36149-36157; e-pub ahead of print 2010/09/10; doi 10.1074/jbc.M110.134031.
8. Cignetto S, Modica C, Chiriaco C, Fontani L, Milla P, Michieli P et al. Dual Constant Domain-Fab: A novel strategy to improve half-life and potency of a Met therapeutic antibody. *Mol Oncol* 2016; **10**(6): 938-948; e-pub ahead of

[0212]

- print 2016/03/28; doi 10.1016/j.molonc.2016.03.004.
9. Wang Q, Yang S, Wang K, Sun SY. MET inhibitors for targeted therapy of EGFR TKI-resistant lung cancer. *J Hematol Oncol* 2019; **12**(1): 63; e-pub ahead of print 2019/06/21; doi 10.1186/s13045-019-0759-9.
  10. Schelter F, Kobuch J, Moss ML, Becherer JD, Comoglio PM, Boccaccio C et al. A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates DN30 antibody-induced shedding of the met surface receptor. *J Biol Chem* 2010; **285**(34): 26335-26340; doi 10.1074/jbc.M110.106435.
  11. Foveau B, Ancot F, Leroy C, Petrelli A, Reiss K, Vingtdeux V et al. Down-regulation of the met receptor tyrosine kinase by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis. *Mol Biol Cell* 2009; **20**(9): 2495-2507; doi 10.1091/mbc.E08-09-0969.
  12. Vigna E, Chiriaco C, Cignetto S, Fontani L, Basilico C, Petronzelli F et al. Inhibition of ligand-independent constitutive activation of the Met oncogenic receptor by the engineered chemically-modified antibody DN30. *Mol Oncol* 2015; **9**(9): 1760-1772; doi 10.1016/j.molonc.2015.05.007.
  13. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986; **321**(6069): 522-525; doi 10.1038/321522a0.
  14. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 1988; **332**(6162): 323-327; doi 10.1038/332323a0.
  15. Presta LG. Antibody engineering. *Curr Opin Biotechnol* 1992; **3**(4): 394-398.
  16. Vaswani SK, Hamilton RG. Humanized antibodies as potential therapeutic drugs. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998; **81**(2): 105-115; quiz 115-106, 119; doi 10.1016/S1081-1206(10)62794-9.
  17. Hurlle MR, Gross M. Protein engineering techniques for antibody humanization. *Curr Opin Biotechnol* 1994; **5**(4): 428-

[0213]

- 433.
18. Harris WJ. Production of humanized monoclonal antibodies for in vivo imaging and therapy. *Biochem Soc Trans* 1995; **23**(4): 1035-1038.
  19. Bloom JW, Madanat MS, Marriott D, Wong T, Chan SY. Intrachain disulfide bond in the core hinge region of human IgG4. *Protein Sci* 1997; **6**(2): 407-415; doi 10.1002/pro.5560060217.
  20. Humphreys DP, Chapman AP, Reeks DG, Lang V, Stephens PE. Formation of dimeric Fabs in *Escherichia coli*: effect of hinge size and isotype, presence of interchain disulphide bond, Fab' expression levels, tail piece sequences and growth conditions. *J Immunol Methods* 1997; **209**(2): 193-202.
  21. Ferracini R, Longati P, Naldini L, Vigna E, Comoglio PM. Identification of the major autophosphorylation site of the Met/hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1991; **266**(29): 19558-19564.
  22. Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S et al. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 1994; **77**(2): 261-271.
  23. Gherardi E, Love CA, Esnouf RM, Jones EY. The sema domain. *Curr Opin Struct Biol* 2004; **14**(6): 669-678; doi 10.1016/j.sbi.2004.10.010.
  24. Bork P, Doerks T, Springer TA, Snel B. Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci* 1999; **24**(7): 261-263.
  25. Merchant M, Ma X, Maun HR, Zheng Z, Peng J, Romero M et al. Monovalent antibody design and mechanism of action of onartuzumab, a MET antagonist with anti-tumor activity as a therapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**(32): E2987-2996; doi 10.1073/pnas.1302725110.
  26. Makabe K, Nakanishi T, Tsumoto K, Tanaka Y, Kondo H, Umetsu M et al. Thermodynamic consequences of mutations in vernier

[0214]

- zone residues of a humanized anti-human epidermal growth factor receptor murine antibody, 528. *J Biol Chem* 2008; **283**(2): 1156-1166; e-pub ahead of print 2007/10/17; doi 10.1074/jbc.M706190200.
27. Basilico C, Modica C, Maione F, Vigna E, Comoglio PM. Targeting the MET oncogene by concomitant inhibition of receptor and ligand via an antibody-"decoy" strategy. *Int J Cancer* 2018; e-pub ahead of print 2018/04/25; doi 10.1002/ijc.31550.
28. Ridgway JB, Presta LG, Carter P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng* 1996; **9**(7): 617-621.
29. Zhu Z, Presta LG, Zapata G, Carter P. Remodeling domain interfaces to enhance heterodimer formation. *Protein Sci* 1997; **6**(4): 781-788; doi 10.1002/pro.5560060404.
30. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**(6): 467-477; doi 10.1038/nri2326.
31. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, Saco J, Escuin-Ordinas H, Rodriguez GA et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep* 2017; **19**(6): 1189-1201; doi 10.1016/j.celrep.2017.04.031.
32. Rege-Cambrin G, Scaravaglio P, Carozzi F, Giordano S, Ponzetto C, Comoglio PM et al. Karyotypic analysis of gastric carcinoma cell lines carrying an amplified c-met oncogene. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; **64**(2): 170-173.
33. Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P. Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library. *J Mol Biol* 1997; **270**(1): 26-35; doi 10.1006/jmbi.1997.1116.

[0215]

**수탁번호**

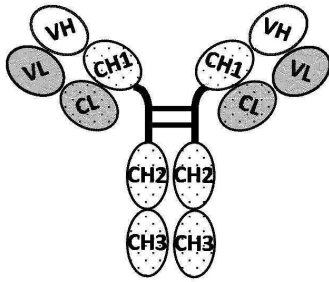
[0216]

기탁기관명 : CBA  
 수탁번호 : PD08003  
 수탁일자 : 20080416

기탁기관명 : CBA  
 수탁번호 : PD05006  
 수탁일자 : 20051229

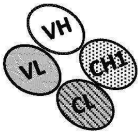
도면

도면1a



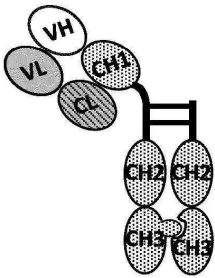
DN30 mAb

도면1b



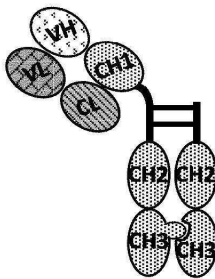
MvDN30

도면1c



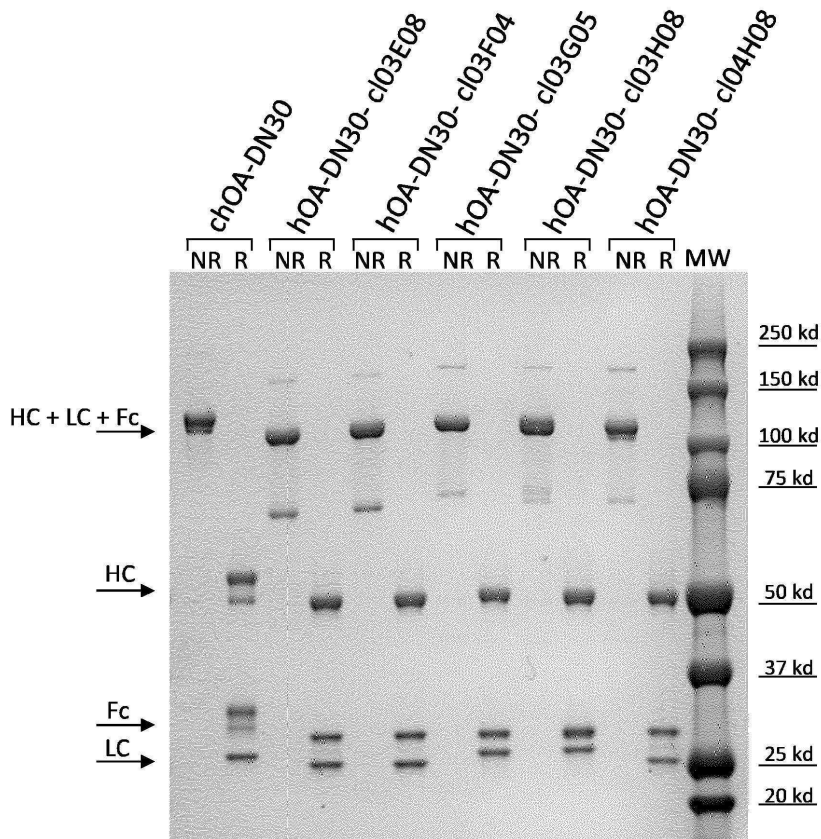
chOA-DN30

도면1d

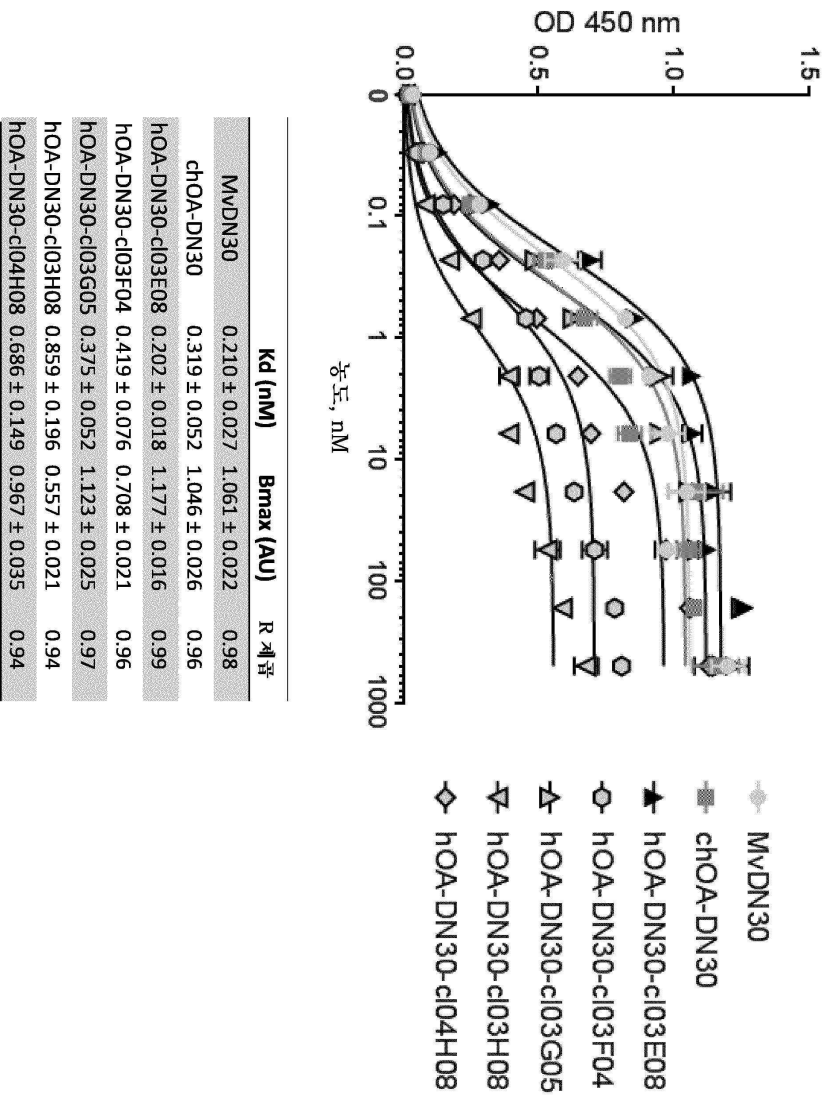


hOA-DN30

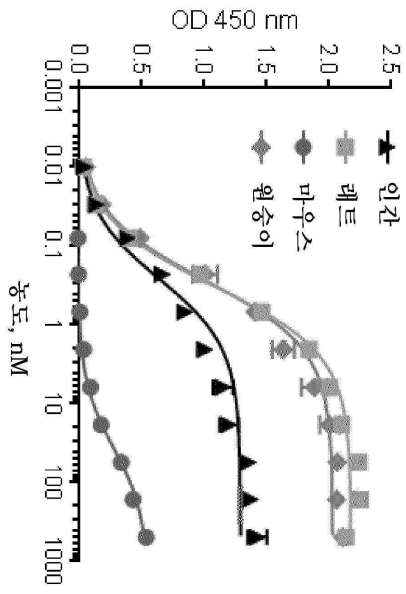
도면1e



도면2a

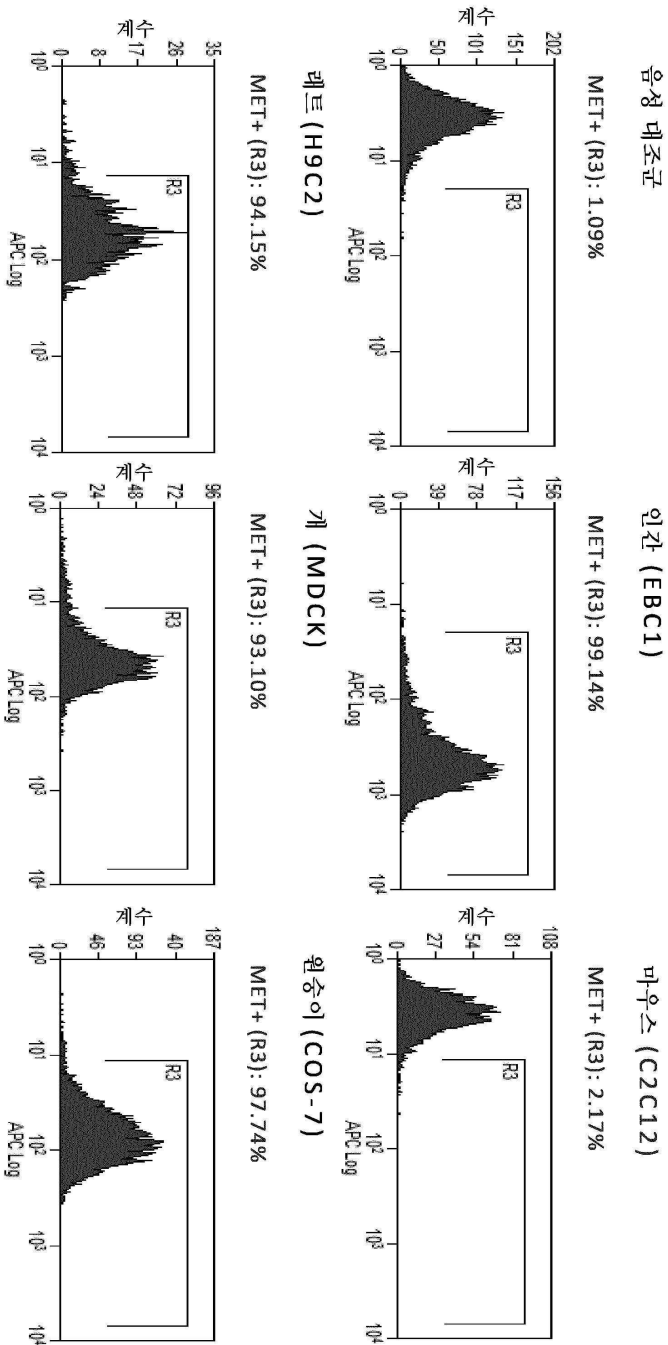


도면2b

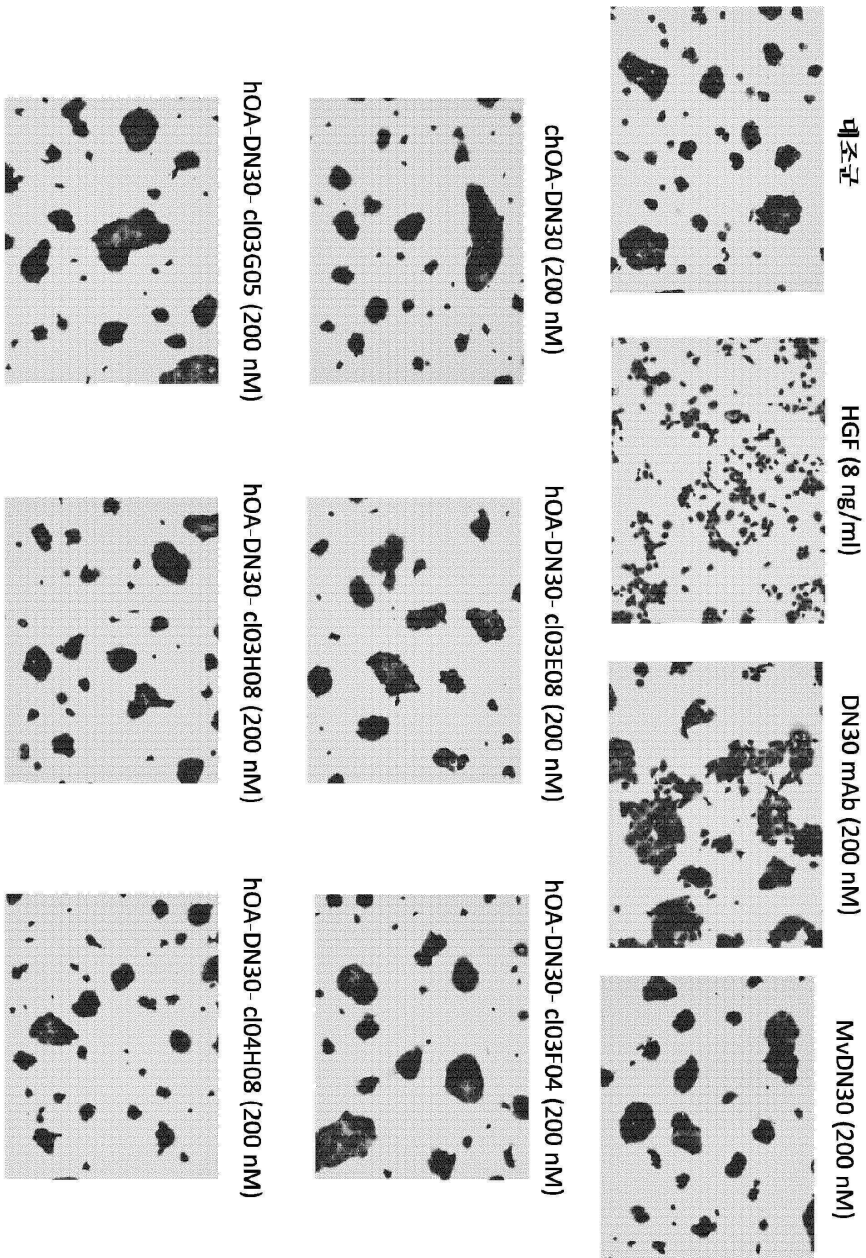


	Kd (nM)	Bmax (AU)	R 계곱
인간	0.262 ± 0.037	1.303 ± 0.029	0.97
레트	0.325 ± 0.016	2.189 ± 0.017	0.99
미우스	35.99 ± 2.381	0.568 ± 0.012	0.99
원숭이	0.273 ± 0.021	2.041 ± 0.025	0.99

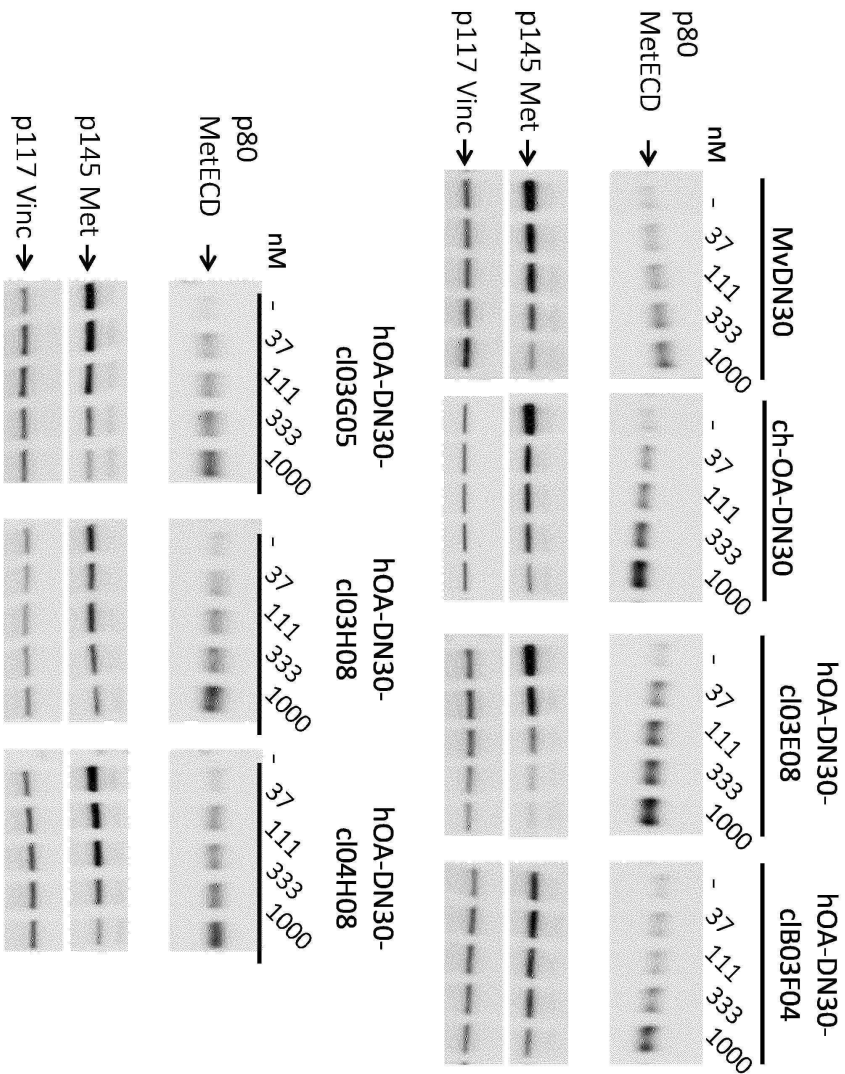
도면2c



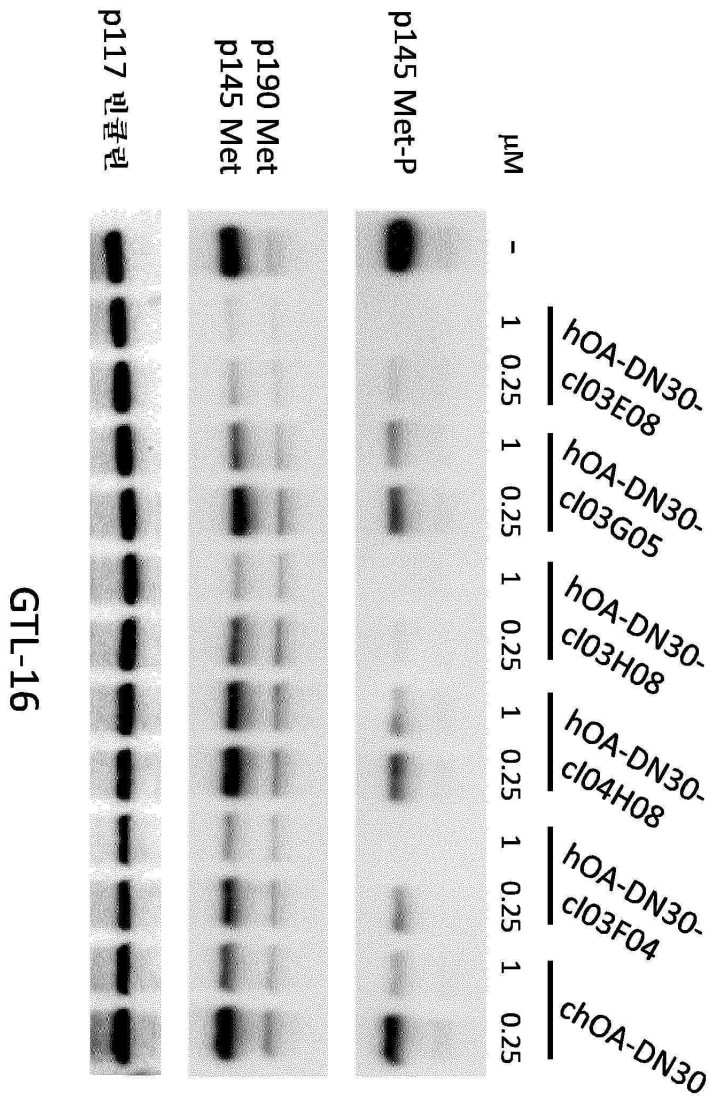
도면3



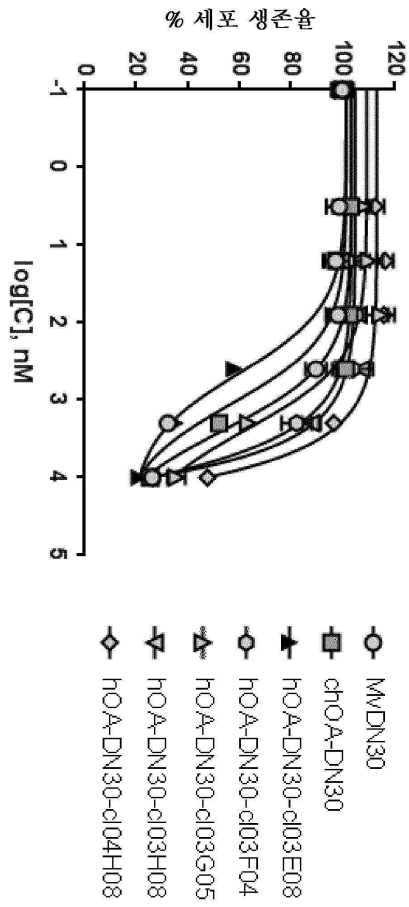
도면4



도면5



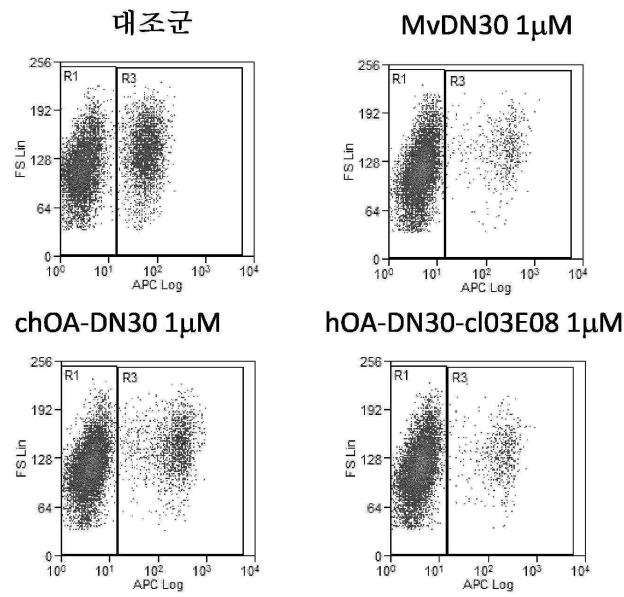
도면6



	IC50 (nM)	R 계급
MvDN30	1136±1.08	0.94
chOA-DN30	2489±1.77	0.96
hOA-DN30-c103E08	460±1.07	0.98
hOA-DN30-c103F04	52310±7.68	0.94
hOA-DN30-c103G05	2381±1.31	0.95
hOA-DN30-c103H08	N/A*	-
hOA-DN30-c104H08	115726±311.2	0.91

\* N/A: 데이터 피팅이 불명료해서 적용가능하지 않았음

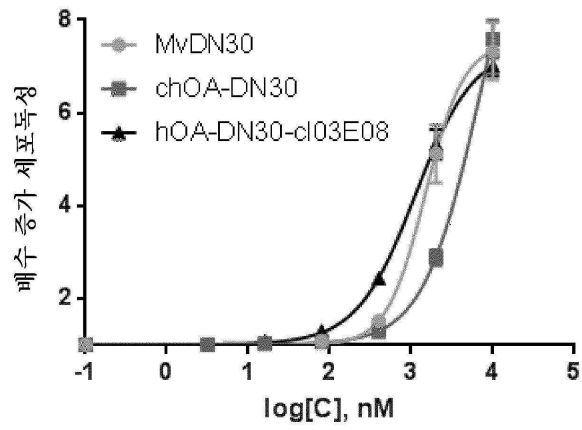
도면7a



**GTL-16**

	<b>% EdU+ 세포 (R3)</b>
대조군	31,17 %
MvDN30	5.20 %
chOA-DN30	14.97%
hOA-DN30-cl03E08	4.92%

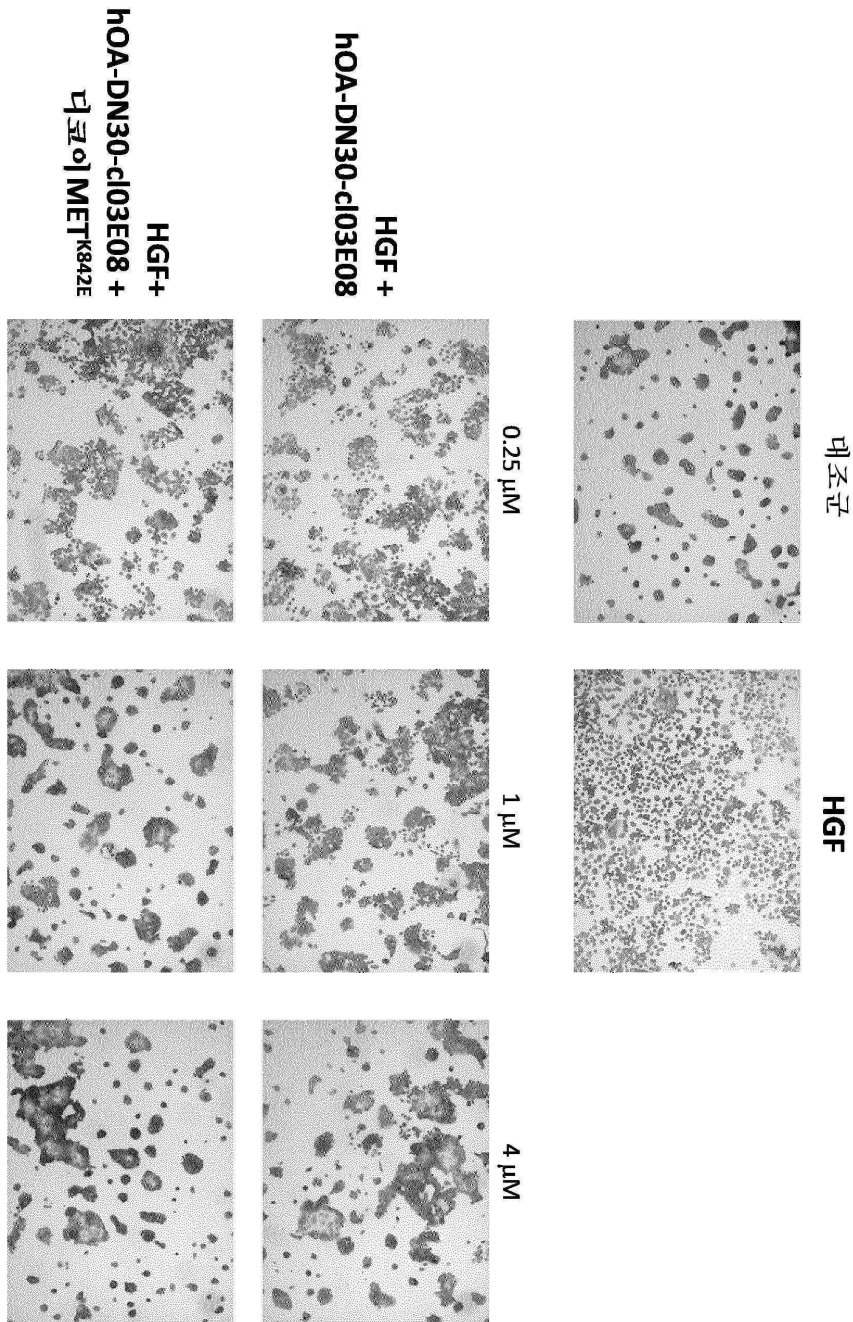
도면7b



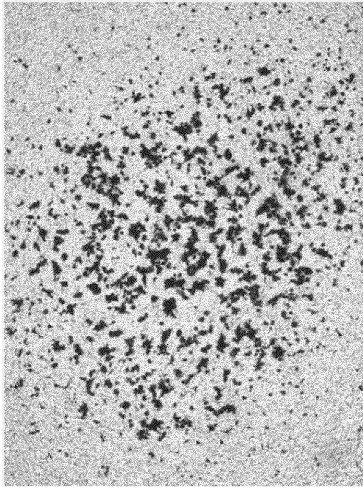
GTL-16

	EC50 (nM)	R 제곱
MvDN30	1486±1.08	0.98
chOA-DN30	6807±1.77	0.99
hOA-DN30-cl03E08	1116±1.07	0.99

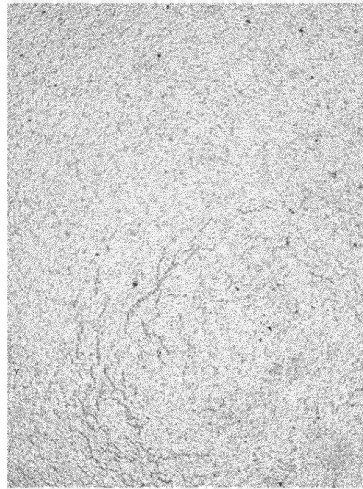
도면8



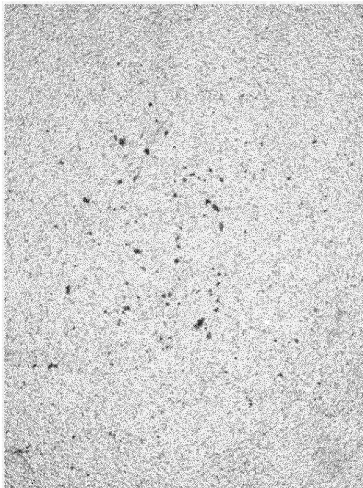
도면9



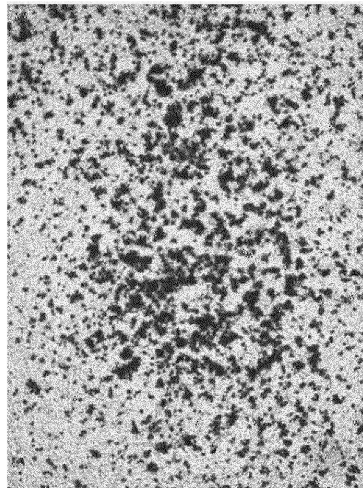
HGF + HOA-DN30-cl03E08



대조군

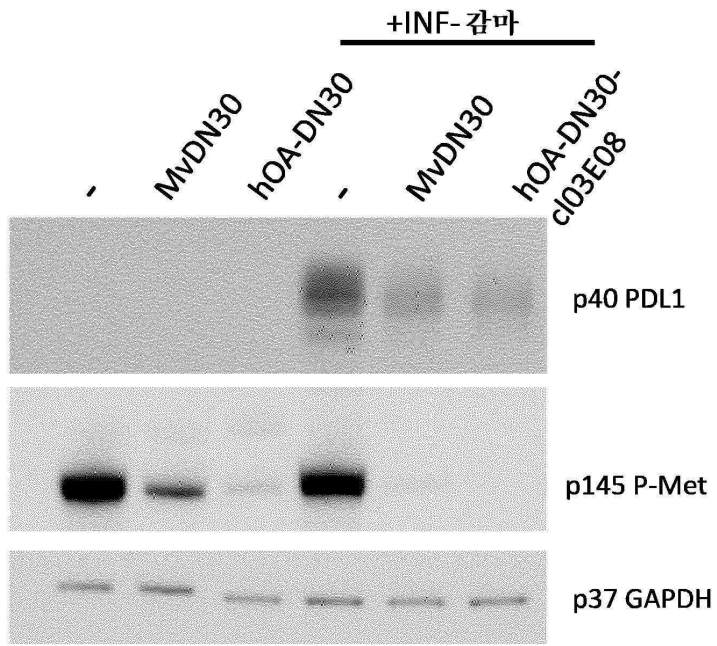


HGF + HOA-DN30-cl03E08 + 다[쿠이]MET<sup>K842E</sup>



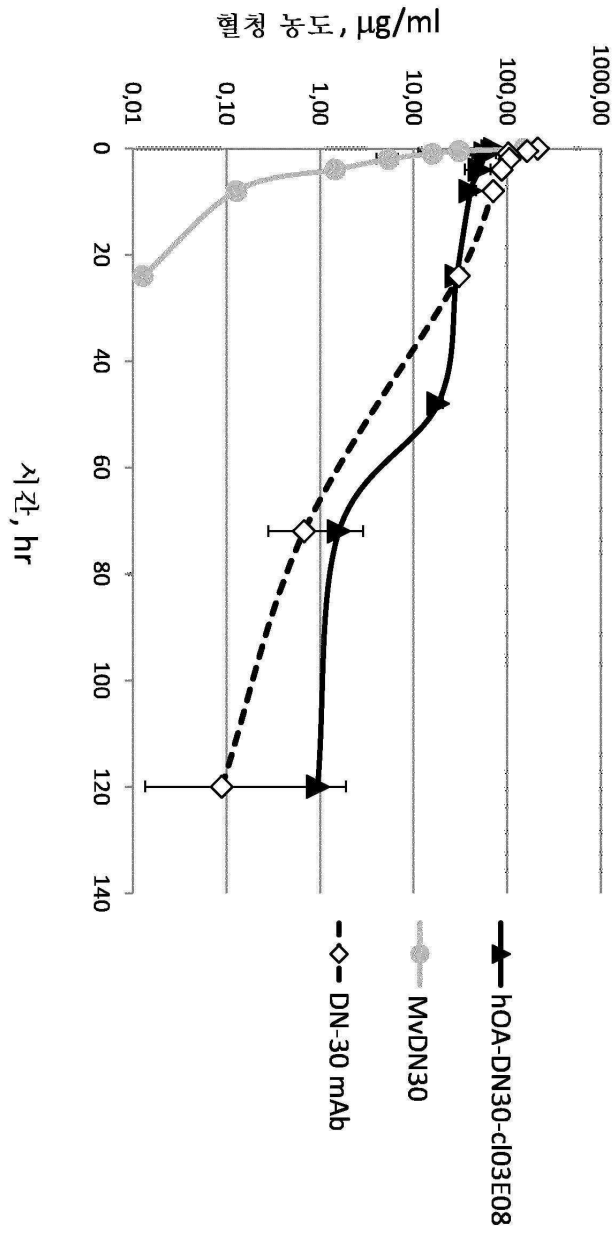
HGF

도면10

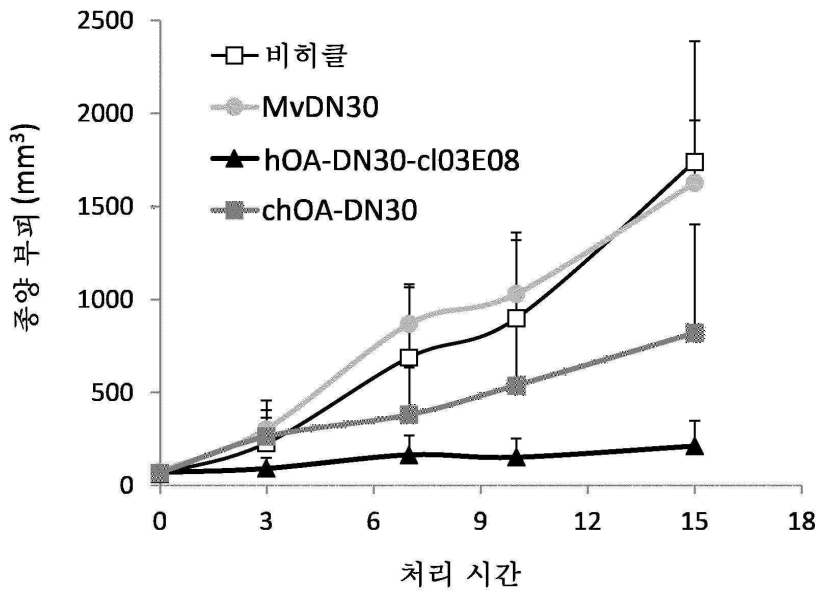


**GTL-16**

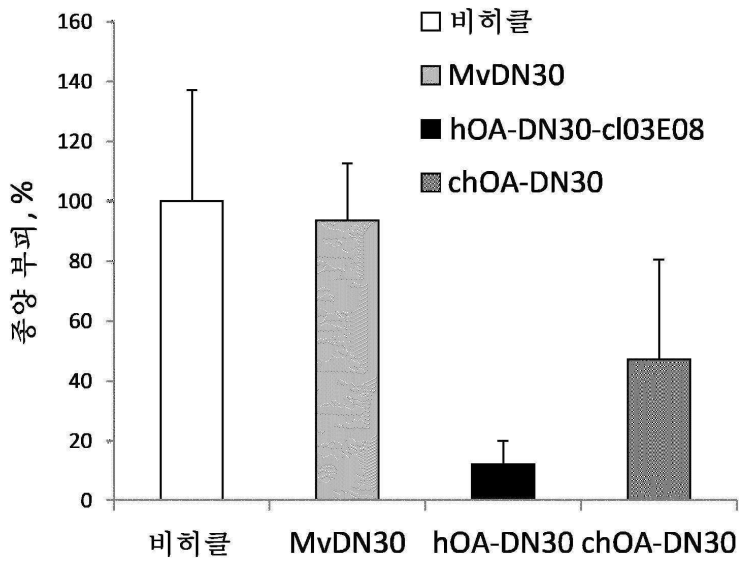
도면11



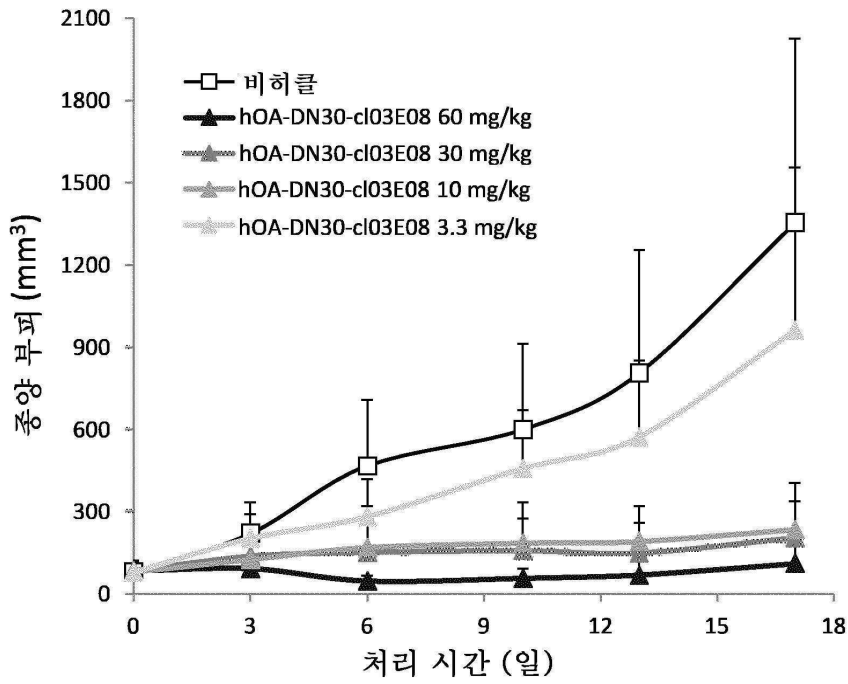
도면12a



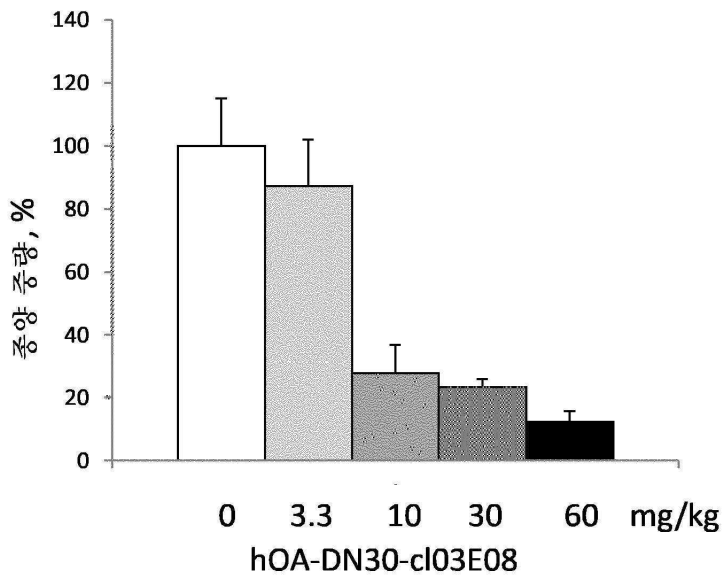
도면12b



도면13a



도면13b



Seq. ID N°7: VL-c103E08 인간화

METDTILLWVLLIWPSTGDIYLLTQSPDSLAVSLGQRATINCKASQSVDYDGGSYMSWFQOKPQPKLL  
IYASNLESGVPAHFSGSGSTDFTLTISSLQAEVDVATYYCQQSYEDPLTFGGKVEIK

Seq. ID N°8: VH-c103E08 인간화

MGWSYIILLFLVATATFDGHSQVQLQSSGAELVKKPGASVKLSCKASGYTFISYWHWVRQAPGQGLEWIGIN  
PSSGRTNNYNEKFKNRVTVTVDKSTSTAYMELSSLTSEDSAVYYCASRGYWGQGTTLVSS

Seq. ID N°9: 인간 CL

RTVAAPSVFIAPPDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST  
LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Seq. ID N°10: 인간 CH1

ASTKGPSPVEPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALITSGVHTTFAVLIQSSGLYSISVVTV  
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKK

도면14

Seq. ID N° 11 : 제 1 Fc (노브 돌연변이)

EPKSCDKTHTTTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRrvvsvLTLH $\overline{Q}$ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPRRPQVY $\overline{T}$ LPPSRDELTKN  
QVSL $\overline{M}$ CLVKGFFYPSDIAVEWESNGQPENNYK $\overline{T}$ TPVLDSDGSFFLYSKL $\overline{T}$ VDKSRWQ $\overline{Q}$ GNV $\overline{F}$ SCSVMHEALHN  
HYT $\overline{Q}$ KSLSLSPGK

Seq. ID N° 12 : 제 2 Fc (홀 돌연변이)

MGWSYIILLFLVATATDGHSDKTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK  
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRrvvsvLTLH $\overline{Q}$ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQ  
VY $\overline{T}$ LPPSRDELTKN $\overline{Q}$ VSL $\overline{S}$  $\overline{C}$  $\overline{A}$ VVKGFFYPSDIAVEWESNGQPENNYK $\overline{T}$ TPVLDSDGSFFLYSKL $\overline{T}$ VDKSRWQ $\overline{Q}$   
NV $\overline{F}$ SCSVMHEALHNHYT $\overline{Q}$ KSLSLSPGK

도면15

도면16

Seq. ID N°14: Met 돌연변이 K842E -TAGs

MKAPAVLAPGIIIVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNYIYV  
 LNEEDLQKVAEYKTPVLEHPDCFPCCDSSKANLSGGVWKDNINMALVVDTYDDQLISCGSVNRGTCQRH  
 VFPHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPPSQPCDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFEVGNINSSYPDPHPLHSISV  
 RRLKETKDGFMFLTDQSYIDVLPFRDSYPIKYVHAFFESNNFIYFLTVQRETLDAQTFHTRIIRFCSINSGL  
 HSYMEMPLLECILTEKRKRKRSFKKEVFNIILQAAVYVSKPGAQLARQIGASINDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRS  
 AMCAFPRIKYVNDFFENKIVNKNVRCIQHFYGNHEHCFNRTLLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFMG  
 QFSEVLLTSSISTFIKGDLLIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDSHPVSPVIVEHTLNQNGYTLV  
 ITGKKITKIPILINGIGCRHFQSCSCLSAPEVQCGWCHDKCVRSEECISGTWTQICLPAIYKVFPNAPLE  
 GGTRLFTICGWDGFRRNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLESTMTLKCTVGPAMNKHFNMSIISNGHGTTO  
 YSTFSYVDPVITSSPKYGPAGGTLTLTGNYLNSGNSRHISIGGKCTLTKSVNSILECYTPAQTI STEF  
 AVKLIKIDLANRETSIFSYREDPIVEIHPTKSFI SGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVHEAGRNF<sup>2</sup>TVACQH  
 RNSSEIICCTTPSLQQLNLQLLPKTKAF<sup>2</sup>FMLDGISKYFDLIYVHN<sup>2</sup>VP<sup>2</sup>PEKPVMSMG<sup>2</sup>ENNVLEIKGND  
 IDPEAVKGEVLKVG<sup>2</sup>NSCENIHLHSEAVLCTV<sup>2</sup>PN<sup>2</sup>DLKLNSE<sup>2</sup>INIEW<sup>2</sup>QAIS<sup>2</sup>TVL<sup>2</sup>GK<sup>2</sup>VI<sup>2</sup>VQ<sup>2</sup>PD<sup>2</sup>QNT<sup>2</sup>ASGA  
 AWSHPQFEKGAWSHPQFEKGAWSHPQFEKGA<sup>2</sup>HHHHH

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Metis Precision Medicine SB S.r.l.
- <120> "Novel therapeutic agent for the treatment of a tumor and/or metastasis"
- <130> BW021403-CF
- <150> IT102018000009282
- <151> 2018-10-09
- <160> 43
- <170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> artificial  
<220><223> VL-CDR1  
<400> 1  
Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Gly Ser Tyr  
1                   5                   10

<210> 2  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> artificial  
<220><223> VL-CDR2

<400> 2  
Ala Ala Ser  
1  
<210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> artificial  
<220><223> VL-CDR3

<400> 3  
Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Leu Thr  
1                   5  
<210> 4  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> artificial  
<220><223> VH-CDR1

<400> 4  
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp  
1                   5  
<210> 5  
<211> 8  
<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VH-CDR2

<400> 5

Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr

1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VH-CDR3

<400> 6

Ala Ser Arg Gly Tyr

1 5

<210> 7

<211> 131

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> humanized VL-c103E08

<400> 7

Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser

35 40 45

Val Asp Tyr Asp Gly Gly Ser Tyr Met Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95

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

100 105 110  
 Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val

115 120 125  
 Glu Ile Lys

130

<210> 8

<211> 131

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> humanized VH-c103E08

<400> 8

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp  
 1 5 10 15

Gly His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn  
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr  
 115 120 125

Val Ser Ser

130

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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> 10

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

<210> 11

<211> 232

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> First Fc (Knob mutation)

<400> 11

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

1                                      5                                      10                                      15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

                                    20                                      25                                      30

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

                                    35                                      40                                      45

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

50                                      55                                      60

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

65                                      70                                      75                                      80

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

                                    85                                      90                                      95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

                                    100                                      105                                      110

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

115                                      120                                      125

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

130                                      135                                      140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

145                                      150                                      155                                      160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

                                    165                                      170                                      175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

180 185 190  
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 195 200 205  
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 210 215 220  
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 225 230

<210> 12

<211> 246

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Second Fc (Hole mutations)

<400> 12

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

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

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 115 120 125  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 130 135 140  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn

145                    150                    155                    160  
 Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
                          165                    170                    175  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
  
                          180                    185                    190  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys  
                          195                    200                    205  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
                          210                    215                    220  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 225                    230                    235                    240  
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                          245

<210> 13

<211> 976

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Decoy Met wt-TAGs

<400> 13

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



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



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 Ala Ser Gly Ala Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu  
 930 935 940  
 Lys Gly Ala Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ala Trp  
 945 950 955 960  
 Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ala His His His His His His  
 965 970 975  
 <210> 14  
 <211> 976  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220><223> Decoy Met mutation K842E-TAGs  
 <400> 14  
 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



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 Glu 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 Ala Ser Gly Ala Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu  
 930 935 940

Lys Gly Ala Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ala Trp  
 945 950 955 960

Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ala His His His His His His  
 965 970 975

<210> 15

<211> 131

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> murine VL

<400> 15

Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

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

20 25 30  
 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser

35 40 45  
 Val Asp Tyr Asp Gly Gly Ser Tyr Met Ser Trp Phe Gln Gln Arg Pro

50 55 60  
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

65 70 75 80  
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95  
 Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys

100 105 110  
 Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val

115 120 125  
 Glu Ile Lys

130

<210> 16

<211> 131

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> murine VH

<400> 16

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp  
 1 5 10 15

Gly His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60  
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn

65 70 75 80  
 Glu Lys Phe Lys Asn Lys Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr

85 90 95  
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Asn Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

115 120 125

Val Ser Ser

130

<210> 17

<211> 131

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> humanized VL-c103G05

<400> 17

Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser

35 40 45

Val Asp Tyr Asp Gly Gly Ser Tyr Met Ser Trp Phe Gln Gln Arg Pro

50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95

Leu Asn Ile Ser Pro Leu Glu Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys

100 105 110

Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val

115 120 125

Glu Ile Lys

130

<210> 18

<211> 131

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> humanized VH-c103G05

<400> 18

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp

1                    5                    10                    15

Gly His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Thr Glu Val Lys Lys

20                    25                    30

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

35                    40                    45

Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

50                    55                    60

Glu Trp Met Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn

65                    70                    75                    80

Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser

85                    90                    95

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

100                    105                    110

Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr

115                    120                    125

Val Ser Ser

130

<210> 19

<211> 131

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> humanized VL-c103F04

<400> 19

Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

Val Asp Tyr Asp Gly Gly Ser Tyr Met Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95

Leu Thr Ile His Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys

100 105 110

Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val

115 120 125

Glu Ile Lys

130

<210> 20

<211> 131

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> humanized VH-c103F04

<400> 20

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn

65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Asn Lys Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

115 120 125

Val Ser Ser

130

<210> 21

<211> 131

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> humanized VL-c103H08

<400> 21

Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser

35 40 45

Val Asp Tyr Asp Gly Gly Ser Tyr Met Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95

Leu Asn Ile Ser Ser Val Gln Glu Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys

100 105 110

Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val

115 120 125

Glu Ile Lys

130

<210> 22

<211> 131

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> humanized VH-c103H08

<400> 22

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

Ser Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

50                    55                    60

Glu Trp Met Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn

65                    70                    75                    80

Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser

85                    90                    95

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

100                    105                    110

Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

115                    120                    125

Val Ser Ser

130

<210> 23

<211> 131

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> humanized VL-c104H08

<400> 23

Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

Val Asp Tyr Asp Gly Gly Ser Tyr Met Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Pro  
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95

Leu Thr Ile His Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys

100 105 110

Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val

115 120 125

Glu Ile Lys

130

<210> 24

<211> 131

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> humanized VH-c104H08

<400> 24

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn

65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Asn Lys Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr

115 120 125

Val Ser Ser

130

<210> 25

<211> 717

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> humanized VL+CL-c103E08 (nucleotides)

<400> 25

atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60  
 gatattgtgc tgaccagag cccggacagc ctggcagtga gtctgggtca acgcgccacc 120  
 attaactgca aagccagcca gagcgtggat tatgacggcg gtagctacat gagctggttt 180  
 cagcagaaac cgggtcagcc gccgaaactg ctgatttatg ccgccagcaa tctggaaagc 240

ggcgttccgg cccgttttag cggtagcggc agcggcaccg atttaccct gaccattagc 300  
 tcgctgcagg cggaggatgt ggccacctat tactgccagc agagctacga agatccgctg 360  
 acctttggcg gcggtaccaa agtggagatt aaacgaactg tggtctgacc atctgtcttc 420  
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480  
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 540  
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600  
 agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660

acccatcagg gctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttaa 717

<210> 26

<211> 717

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> humanized VL+CL-c103G05 (nucleotides)

<400> 26

atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60  
 gacatcgtgc tgaccagtc cctgcttcc ctgctgtgt ccttgggcga gagggctacc 120  
 atctctgta aggctccca gtccgtggac tacgacggcg gctcctacat gtcttggttc 180  
 cagcagagcg ctggccagcc tccaagctg ctgatctacg ctgcctcaa cctggagtcc 240

ggcgtgcctg ataggttcag cggatccggc tccggcaccg acttcaccct gaataatctcc 300

cctctggagg ctgaggacgt ggccgtgtac tactgccagc agtcctacga ggaccctctg 360

accttcggcg gcggcaccaa ggtggagatc aagagaactg tgcagcacc ttccgtcttt 420

atthtccac catcagatga acagctgaaa tccggtactg ccagtgtggt ctgtctgctc 480

aataatttct atccccggga ggctaaagtc cagtggaaag tggataatgc cttcagtcc 540

ggcaactccc aggagagcgt gaccgagcag gattctaagg actcaacata ttcactgtca 600

tctactctca ccctgtctaa ggctgattac gaaaagcaca aggtgtacgc ttgcgaagtt 660

actcatcagg gcctctcttc ccctgtgacc aagagtttca accggggcga gtgctaa 717

<210> 27

<211> 717

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> humanized VL+CL-c103F04 (nucleotides)

<400> 27

atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60

gacatcgtga tgaccacgac ccctgactcc ctggctgtgt ccctgggcga aagggccacc 120

atcaactgca aggccctcca gtccgtggac tacgacggcg gctcctacat gtccctgtac 180

cagcagaagc ccggccagcc tccaagctg ctgatctccg ccgcttcaa tctggagtcc 240

ggcgtgcccc ataggttttc cggtccggc tccggcaccg actttaccct gaccatccac 300

tcctgcagg ccgaggacgt ggctgtgtac tactgccagc agtcctacga ggaccctctg 360

accttcggcg ccggcaccaa ggtggagatc aagagaactg tgcagcacc ttccgtcttt 420

atthtccac catcagatga acagctgaaa tccggtactg ccagtgtggt ctgtctgctc 480

aataatttct atccccggga ggctaaagtc cagtggaaag tggataatgc cttcagtcc 540

ggcaactccc aggagagcgt gaccgagcag gattctaagg actcaacata ttcactgtca 600

tctactctca ccctgtctaa ggctgattac gaaaagcaca aggtgtacgc ttgcgaagtt 660

actcatcagg gcctctcttc ccctgtgacc aagagtttca accggggcga gtgctaa 717

<210> 28

<211> 717

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> humanized VL+CL-c103H08 (nucleotides)

<400> 28

atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60  
 gacatcgtgc tgaccagtc ccctgcttcc ctggctgtgt ccctgggcga gagggctacc 120  
 atctcctgca aggcctccca gtccgtggac tacgacggcg gctcctacat gtccctgtac 180  
 cagcagaagc ccggccagcc tccaagctg ctgatctacg ccgcctcaa cctggagtcc 240  
 ggcgtgcccc ataggttctc cggatccggc tccggcaccg acttcaccct gaacatctcc 300  
 tccgtgcagg aggaggacgt ggccacctac tactgccagc agtcctatga ggacccctg 360

accttcggcg ctggcaccaa ggtggagatc aagagaactg tgcagcacc ttccgtcttt 420  
 attttccac catcagatga acagctgaaa tccggtactg ccagtgtggt ctgtctgctc 480  
 aataatttct atccccggga ggctaaagtc cagtggaaag tggataatgc ccttcagtcc 540  
 ggcaactccc aggagagcgt gaccgagcag gattctaagg actcaacata ttcactgtca 600  
 tctactctca ccctgtctaa ggctgattac gaaaagcaca aggtgtacgc ttgcgaagtt 660  
 actcatcagg gcctctcttc ccctgtgacc aagagtttca accggggcga gtgctaa 717

<210> 29

<211> 717

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> humanized VL+CL-c104H08 (nucleotides)

<400> 29

atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60  
 gacatcgtgc tgaccagtc ccctgcttcc ctggctgtgt ccctgggaga gagggccacc 120  
 atcaactgca aggcctccca gtccgtggac tacgacggcg gctcctacat gtccctgtac 180  
 cagcagaggc ccggacagcc tccaagctg ctgatctacg ctgcctcaa cctggagtcc 240  
 ggcgtgcctg ataggttttc cggctccggc tccggaaccg acttcaccct gaccatccac 300  
 tccctgcagg cggaggacgt ggccacctac tactgccagc agtcctacga ggacccctg 360

acattcggcg gcggaaccaa ggtggagatc aagagaactg tgcagcacc ttccgtcttt 420  
 attttccac catcagatga acagctgaaa tccggtactg ccagtgtggt ctgtctgctc 480  
 aataatttct atccccggga ggctaaagtc cagtggaaag tggataatgc ccttcagtcc 540  
 ggcaactccc aggagagcgt gaccgagcag gattctaagg actcaacata ttcactgtca 600  
 tctactctca ccctgtctaa ggctgattac gaaaagcaca aggtgtacgc ttgcgaagtt 660  
 actcatcagg gcctctcttc ccctgtgacc aagagtttca accggggcga gtgctaa 717

<210> 30

<211> 717

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> chimeric VL+CL (nucleotides)

<400> 30

atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60  
 gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggca gagggccacc 120  
 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg gtagttatat gaggttggtc 180  
 caacagagac caggacagcc acccaaactc ctcatctctg ctgcatccaa cettgaatct 240  
 ggcatcccag ccaggtttag tggcagtggc tctgggacag acttcaccct caatatccat 300  
 cctgtggagg aggaggatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtatga agaccgctc 360

acgttcgggtg ctggtaccaa ggtggagatc aaacgaactg tggctgcacc atctgtcttc 420  
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480  
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaateg 540  
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600  
 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660  
 acctatcagg gectgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttaa 717

<210> 31

<211> 1386

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> humanized VH+CH1+CH2+CH3-c103E08, knob mutation, (nucleotides)

<400> 31

atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgg ccaactcccag 60  
 gtgcagctgc agcagtcggg tgccgaagtg aaaaaaccgg gtgctagtgt gaaactgagc 120  
 tgcaaagcca gcggctatac cttcaccagc tactggatcc actgggtgcg tcaggcgcct 180  
 ggccagggcc tggaatggat tggcgaaatc aatccgagca gcggtcgcac caattacaat 240  
 gaaaaattta aaaatcgtgt gaccgttacc gtggataaaa gcacctccac cgcctatatg 300  
 gagctgagca gcctgaccag cgaagatagc gccgtgtatt attgcgccag ccgcggttat 360

tggggccagg gtaccaccct gaccgtgagc agcgctagca cgaagggccc atcggctcttc 420  
 ccctggcac cctcctccaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc 480

aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgcct gaccagcggc 540  
gtgcacacct tcccgctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg 600  
accgtgccct ccagcagctt gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc 660  
agcaacacca aggtggacaa gaaagttag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc 720  
ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa 780  
  
cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 840  
agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagtgg acggcgtgga ggtgcataat 900  
gccaagacaa agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 960  
accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020  
gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aaggcagcc ccgagaacca 1080  
caggtgtaca cctgcccc atccccggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgtgg 1140  
tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200  
  
ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc 1260  
tacagcaage tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320  
gtgatcatg aggtcttca caaccactac acgcagaaga gcctctcct gtctccgggt 1380  
aaatag 1386  
<210> 32  
<211> 1386  
<212> DNA  
<213> artificial  
<220><223> humanized VH+CH1+CH2+CH3-cl03G05, knob mutation, (nucleotides)  
<400> 32  
atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgg cactcccag 60  
  
gtgcagctgg tgcagcccgg cacagaggtg aagaagcctg gcgcctcct gaagctgtcc 120  
tgcaaggcct cggctacac ctteaccagc tactggatcc actgggtgag gcaggtcct 180  
ggacagggcc tggagtggat gggcgagatc aaccctcct ccggcaggac caactaac 240  
gagaagtta agaaccgggt gaccatcacc gccgacaagt ccacctccac cgctacatg 300  
cagctgtcct cctgaggtc cgaggacacc gccgtgtact actgcgctc caggggatat 360  
tggggccagg gcaccacagt gaccgtgagc tccgctagca cgaagggcc atcggctctc 420  
ccctggcac cctctccaa gacacctct gggggcacag cggcctggg ctgctggtc 480  
  
aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgcct gaccagcggc 540

gtgcacacct tccggctgt cctacagtcc tcaggactct actcctcag cagcgtggtg 600  
accgtgccct ccagcagctt gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc 660  
agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc 720  
ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa 780  
ccaaggaca cctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgctggtt ggtggacgtg 840  
agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900

gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 960  
accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020  
gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aaggcagcc cggagaacca 1080  
caggtgtaca cctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgtgg 1140  
tgctgtgca aaggcttcta tccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200  
ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc tttcttctc 1260  
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320

gtgatgcatg aggtcttga caaccactac acgcagaaga gcctctcctt gtctccgggt 1380  
aatag 1386

<210> 33  
<211> 1386  
<212> DNA  
<213> artificial  
<220><223> humanized VH+CH1+CH2+CH3-c103F04, knob mutation (nucleotides)  
<400> 33

atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgg ccaactcccag 60  
gtgcagctgc agcagcccgg agccgaagtg aagaagcccg gctccagcgt gaagctgtcc 120  
tgcaaggcct ccggtacac cttcacctcc tactggatcc actgggtgaa gcaggtcct 180

ggacagggcc tggagtggat cggcgagatc aaccctcct ccggccggac caactacaac 240  
gagaagtta agaacaaggt gaccatcacc gtggacaagt ccacctccac cgctacatg 300  
gagctgtcca acctgcggtc cgaggactcc gccgtgtact actgtgcctc caggggctat 360  
tggggccagg gcacaacct gaccgtgtcc tccgctagca cgaagggccc atcggtcttc 420  
ccctggcac cctctcaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc 480  
aaggactact tcccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgcct gaccagcggc 540  
gtgcacacct tccggctgt cctacagtcc tcaggactct actcctcag cagcgtggtg 600

accgtgccct ccagcagctt gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc 660  
 agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc 720  
 ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa 780  
 cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgctggtt ggtggacgtg 840  
 agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900  
 gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 960  
 accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020

gcctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 1080  
 caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgtgg 1140  
 tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200  
 ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc 1260  
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcattctcc 1320  
 gtgatgatg aggtcttca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380  
 aaatag 1386

<210> 34

<211> 1386

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> humanized VH+CH1+CH2+CH3-c103H08, knob mutation, (nucleotides)

<400> 34

atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgg ccaactcccag 60  
 gtgcagctgg tgcagtccgg cgccgaagtg aagaagcccg gtcctccgt gaagctgagc 120  
 tgcaaggcct ccggctacac cttctcctcc tactggatcc actgggtgag gcaggctcct 180  
 ggacagggcc tggagtggat gggcgagatc aaccctcct ccggcaggac caactacaac 240  
 gagaagttea agaaccgggt gaccatcacc gccgacaagt ccactccac cgcctacatg 300

gagctgtcca acctgaggtc cgaggactcc gccgtgtact actgctcctc caggggatat 360  
 tggggccagg gcaccacct gacagtgtcc tccgtagca cgaagggccc atcggctctc 420  
 ccctggcac cctcctcaa gagcacctct gggggcacag cgccctggg ctgcctggtc 480  
 aaggactact tcccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgcct gaccagcggc 540  
 gtgcacacct tcccgtgtgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg 600  
 accgtgccct ccagcagctt gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc 660

agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc 720

ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa 780

cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 840

agccacgaag acctgaggt caagttcaac tggtagtgg acggcgtgga ggtgcataat 900

gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 960

accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020

gcctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aaggcagcc ccgagaacca 1080

caggtgtaca cctgcccc atccccggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgtgg 1140

tgcttggtca aaggcttcta tcccagcagc atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200

ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc 1260

tacagcaage tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctec 1320

gtgatcatg aggtcttca caaccactac acgcagaaga gcctctcct gtctccgggt 1380

aaatag 1386

<210> 35

<211> 1386

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> humanized VH+CH1+CH2+CH3-c104H08, knob mutation, (nucleotides)

<400> 35

atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtgcaacag ctacagatgg cactcccag 60

gtgcagctgc agcagcctgg agccgaggtg aagaagcccg gctcctcgt gaagctgtcc 120

tgcaaggcct cgggtacac ctteacctcc tactggatcc actgggtgaa gcagccctc 180

ggacagggcc tggagtggat cggcgagatc aaccctcct ccggcaggac caactacaac 240

gagaagttea agaacaaggt gaccatcacc gtggacaagt ccacctcac cgctacatg 300

gagctgtcct cctgaggtc cgaggacacc gccgtgtact actgtgcctc cagggctat 360

tggggccagg gcacaaccgt gaccgtgtcc tccctagca cgaagggcc atcggcttc 420

ccctggcac cctctccaa gagcacctct gggggcacag cggcctggg ctgcctggtc 480

aaggactact tcccgaacc ggtgacggig tcgtggaact caggcgcct gaccagcggc 540

gtgcacacct tcccgtgtg cctacagtcc tcaggactct actcctcag cagcgtggtg 600

accgtgccct ccagcagctt gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc 660

agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc 720

ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa 780  
 cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacctg 840

agccacgaag accctgaggt caagtccaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900  
 gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 960  
 accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020  
 gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aaggcagacc cggagaacca 1080  
 caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgtgg 1140  
 tgctgtgta aaggcttcta tcccagcagc atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200  
 ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc 1260

tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320  
 gtgatgatg aggtctctga caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380  
 aaatag 1386

<210> 36  
 <211> 1386  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220><223> chimeric VH+CH1+CH2+CH3, knob mutation, (nucleotides)  
 <400> 36

atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgg ccaactcccag 60  
 gtccaactgc aacagcctgg gactgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagctgtcc 120

tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagt tactggatac actgggtgaa gcagaggcct 180  
 ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctagca gcggtcgtac taactacaac 240  
 gagaaattca agaacaaggt cacagtgact gtagacaaat cttcaccac agcctacatg 300  
 caactcagca acctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag taggggctac 360  
 tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcagctagca cgaagggcc atcggtcttc 420  
 ccctggcac cctctcaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc 480  
 aaggactact tcccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgcct gaccagcggc 540

gtgcacacct tccggctgt cctacagtcc tcaggactct actcctcag cagcgtggtg 600  
 accgtgccct ccagcagctt gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc 660  
 agcaacacca aggtggacaa gaaagttag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc 720  
 ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa 780

cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 840  
 agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900  
 gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 960  
  
 accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgaaggt ctccaacaaa 1020  
 gccctccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 1080  
 caggtgtaca cctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgtgg 1140  
 tccttggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200  
 ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtctggact ccgacggctc cttcttctc 1260  
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcagtctcc 1320  
 gtgatgatg aggtcttca caaccactac acgcagaaga gcctctcct gtctccgggt 1380  
  
 aaatag 1386  
 <210> 37  
 <211> 741  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220><223> human CH2+CH3, Hole mutations, (nucleotides)  
 <400> 37  
 atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgg cactccgac 60  
 aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 120  
 ctcttcccc caaaaccaa ggacacctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 180  
 gtggtggtg acgtgagcca cgaagacct gaggtcaagt tcaactgta cgtggacggc 240  
  
 gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 300  
 gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 360  
 aaggtctcca acaaagcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 420  
 cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 480  
 caggtcagcc tgagttgccc ggtcaaaggc ttctatcca gcgacatgc cgtggagtgg 540  
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac 600  
 ggctcctct tctctgtag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 660  
  
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 720  
 tcctgtctc cgggtaaata g 741  
 <210> 38

<211> 18  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220><223> His-TAG (nucleotide)  
 <400> 38  
 caccatcacc atcaccat 18  
 <210> 39  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220><223> His-TAG  
 <400> 39  
 His His His His His His  
 1 5  
 <210> 40  
 <211> 108  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220><223> Strep-TAG (nucleotide)  
 <400> 40  
 ggtgccgcat ggagccacc ccagttcgaa aaaggggccg catggagcca cccccagttc 60  
 gaaaaagggg ccgcatggag ccacccccag ttcgaaaaag gggccgca 108  
 <210> 41  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220><223> Strep-TAG  
 <400> 41  
 Gly Ala Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ala Trp Ser  
 1 5 10 15  
 His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu  
 20 25 30  
 Lys Gly Ala Ala

35

<210> 42

<211> 39

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> K842E sense nucleotide

<400> 42

gtacataatc ctgtgtttga gccttttgaa aagccagtg 39

<210> 43

<211> 39

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> K842E antisense nucleotide

<400> 43

cactggcttt tcaaaaggct caaacacagg attatgtac 39