

發明專利說明書 200523269

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：93123241

※申請日期：93.8.3

※IPC 分類：

C07K 16/28,

A61K 39/395

一、發明名稱：(中文/英文)

針對C-MET之抗體

ANTIBODIES TO c-MET

二、申請人：(共 2 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 美商輝瑞產品公司
PFIZER PRODUCTS INC.
2. 美商艾伯吉尼斯公司
ABGENIX, INC.

代表人：(中文/英文)

1. J 崔佛 盧
LUMB, J. TREVOR
2. C 傑佛瑞 戴維斯
DAVIS, C. GEOFFREY

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 美國康乃狄克州葛羅頓市東點路
EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340,
U.S.A.
2. 美國加州佛貿市凱瑟大道6701號
6701 KAISER DRIVE, FREMONT, CALIFORNIA 94555, U.S.A.

國籍：(中文/英文)

- 1.2.均美國 U.S.A.

三、發明人：(共 7 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 尼爾 R 米查德
MICHAUD, NEIL R.
2. 夏瑪 凱傑傑
KAJJI, SHAMA
3. 蓋瑞 博茲洛
BORZILLO, GARY
4. 維 畢帝恩
BEDIAN, VAHE
5. 凱文 科曼
COLEMAN, KEVIN
6. 賴瑞 L 格林
GREEN, LARRY L.
7. 賈孝齊
JIA, XIAO-CHI

國 籍：(中文/英文)

- 1.-7.均美國 U.S.A.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2003年08月04日；60/492,432

2.

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

1. 食品工業研究所；93年10月28日；BCRC 960211

2. 食品工業研究所；93年10月28日；BCRC 960212

3. 食品工業研究所；93年10月28日；BCRC 960213

4. 食品工業研究所；93年10月28日；BCRC 960214

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

1. 美國；ATCC；2003年03月04日；PTA-5026

2. 美國；ATCC；2003年03月04日；PTA-5027

3. 美國；ATCC；2003年03月04日；PTA-5028

4. 美國；ATCC；2003年03月04日；PTA-5029

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於抗體，包括專一地結合至c-Met(較佳為人類c-Met)及作用為抑制c-Met之人類抗體及其抗原結合部分。本發明亦關於人類抗-c-Met抗體及其抗原結合部分。本發明亦關於抗體為嵌合性、雙專一性、衍生化、單鏈抗體或融合蛋白質的部分。本發明亦關於來自於人類抗-c-Met抗體之分離的重及輕鏈免疫球蛋白及編碼此免疫球蛋白之核酸分子。本發明亦關於製造人類抗-c-Met抗體之方法、包含此等抗體之組合物及利用抗體及組合物做診斷及治療之方法。本發明亦提供基因療法，利用編碼組成人類抗-c-Met抗體之重及/或輕鏈免疫球蛋白分子之核酸分子。本發明亦關於包含本發明核酸分子之基因轉殖動物或植物。

【先前技術】

肝細胞生長因子(HGF, hepatocyte growth factor)也稱為離散因子(scatter factor)，為一種多功能的生長因子，其藉引發有絲分裂及細胞運動性增加轉化及腫瘤發育。再者，HGF經由許多訊息傳遞路徑藉刺激細胞運動性及侵犯促進轉移。

為了產生細胞作用，HGF必須結合至其受體：c-Met，其為一種受體酪胺酸激酶。c-Met為廣泛表現的異二聚體蛋白質，包含有一個50千道爾頓(kDa, kilodalton) α -次單元及一個145千道爾頓(kDa, kilodalton) β -次單元(Maggiora等

人，*J. Cell Physiol*, 173:183-186(1997))。c-Met β -次單元包含有酪胺酸激酶區塊及兩個自體磷酸化位置(Y1349及Y1356)-其對HGF訊號之傳送為關鍵性(Maggiora等人，*J. Cell Physiol*, 173:183-186(1997)；Ponzetto等人，*Cell*, 77:2610271(1994)；Maina等人，*Cell*, 87:531-542(1996))。

HGF結合至c-Met造成活化許多訊息傳遞路徑，其造成相關於疾病如癌症之許多細胞活性。此等包括促進有絲分裂、細胞生存、細胞運動性、細胞外間質(ECM, extracellular matrix)之入侵、血管生成及轉移，此皆為促進轉化及疾病發展的活性(Jeffers等人，*J. Mol.Med.*, 74:505-513(1996)；Amicone等人，*EMBO J.*, 16:495-503(1997)；Matsumoto及Nakamura，*Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 239:639-44(1997)；Corps等人，*Int. J. Cancer*, 73:151-155(1997))。表現或過度表現HGF及c-Met兩者可造成數種細胞類型之型態的轉化及腫瘤發生(Jeffers等人，*J. Mol.Med.*, 74:505-513(1996))。HGF及c-Met表現或過度表現也促進有絲分裂及錨定不依賴性生長(anchorage-independent growth)(Rubin等人，*Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 88:514-419(1991)；Kan等人，*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174:331-337(1991))。特別是，ECM之入侵已被報導當活化c-Met造成蛋白酶之表現，如似脈激酶(urokinase)胞漿素原活化子(plasminogen activator)及膠原蛋白酶，允許細胞分解及局部侵入組織(Jeffers等人，*J. Mol.Med.*, 74:505-513(1996))。再者，僅表現或過度表現c-Met而非HGF之數種腫瘤利用旁

體內分泌(paracrine)而非自體內分泌(autocrine)訊息傳遞機制來支持腫瘤形成(Beviglio等人, *Int. J. Cancer*, 74:301-309(1997))。

HGF及c-Met也已涉及於許多人類癌症之病原學中。相伴的表現或過度表現HGF及c-Met已於乳癌(Nagy等人, *Surg. Oncol.*, 5:15-21(1996); Tuck等人, *Am. J. Pathol.*, 148:225-232(1996))、胰臟癌(Ebert等人, *Cancer Res.*, 54:5775-5778(1994))、口腔鱗狀細胞癌(Marshall及Kornberg, *Laryngoscope*, 108:1413-1417(1998))、神經膠質瘤(Koochekpour等人, *Cancer Res.*, 57:5391-5398(1997))、及惡性肋膜間皮瘤(pleural mesotheliomas)(Tolpay等人, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 124:291-296(1998); Klominek等人, *Intl. J. Cancer*, 76:240-249(1998))中觀察到。此外, c-Met的過度表現於其他腫瘤的發展上可能為重要, 其中HGF的角色尚待證實。此等癌症包括肝細胞癌(Suzuki等人, *Hepatology*, 20:1231-1236(1996))、腎細胞癌(Natali等人, *Intl. J. Cancer*, 69:212-217(1996))、肺癌(Harvey等人, *J. Pathol.*, 180:389-394 (1996))、卵巢癌(Nagy等人, *J. Surg. Oncol.*, 60:95-99(1995))、胃癌(Taniguchi等人, *Cancer*, 82:2112-2122(1998))、及結腸直腸癌(Hiscox等人, *Cancer Invest.*, 15:513-521(1997))。此外, 已報導於具有乳突型腎癌的個體中無HGF出現而活化c-Met受體的生殖系(Germline)及體細胞(Somatic)突變(Schmidt等人, *Nat. Genet.*, 16:68-73 (1997); Jeffers等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:

11445-11450(1997))。其他癌，包括胃、直腸、肺、胰、乳房、及膽管已於個體中偵測到具有含活化突變的c-Met(Zbar等人，J. Urol., 151:561-566(1994))。

需要抑制c-Met結合之策略以避免導致疾病如癌症之路徑的活化。C-Met功能可能減弱c-Met活化及/或HGF引發的生物反應(Date等人，FEBS Letters, 420:1-6(1997); Kaji等人，Cancer Gene Ther., 3:393-404(1996); Li等人，Clin. Exp. Metastasis, 16:74-82(1998))及因而抑制腫瘤發展。雖然已報導於細胞培養中具有抗有絲分裂活性之小鼠抗c-Met單株抗體(US 5646036、US 6207152、US 6214344)，無法輕易地使用小鼠抗體來治療人類病患。因此，有需要改善的組合物，其結合c-Met及可用來如藉由抑制有絲分裂、侵入、轉移、及/或存活而抑制HGF及c-Met相關的腫瘤生長。

【發明內容】

本發明提供一種分離的抗體或其抗原結合部分，其專一地結合c-Met並顯著地作用為c-Met對抗劑，及於某些情況中作為c-Met促效劑抗體及包含該抗體或部副之組合物。

本發明提供一組合物，包含有抗-c-Met抗體之重及/或輕鏈、其可變區塊、或其抗原結合部分、或編碼本發明之抗體、抗體鏈或其可變區塊之核酸分子及醫藥上可接受的載體。本發明之組合物可進一步包含另一成分，如治療藥劑或診斷藥劑。診斷及治療方法亦由本發明提供。

本發明更提供分離的細胞株，其製造抗-c-Met抗體或其抗原結合部分。

本發明亦提供編碼抗-c-Met抗體之重及/或輕鏈、其可變區塊或其抗原結合部分之核酸分子。

本發明提供包含核酸分子之載體及宿主細胞，以及基因重組製造由核酸分子編碼的多胜肽之方法。

也提供表現抗-c-Met抗體之重及/或輕鏈、或其抗原結合部分之非人類基因轉殖動物或植物。

【實施方式】

定義及一般技術

除非另外於本文中定義，與本發明有關使用的科學及技術用語應具有熟悉本技藝者共同了解的意義。再者，除非另外由上下文要求，單數用詞應包括複數及複數用詞應包括單數。一般而言，與本文中說明的細胞及組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學及蛋白質及核酸化學及雜交有關使用的術語及技術為技藝中已熟知及一般使用者。

除非另外指出，本發明之方法及技術一般根據技藝中已熟知的習見方法實施並如本專利說明書中全文引述及討論的許多一般及更明確的參考資料中所述。見如 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989)及 Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates(1992), 及 Harlow 及 Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(1990), 以參考

資料併入本文中。酵素反應及純化技術係根據製造商的說明書實施，如一般於技藝中完成或如本文中所述。與本文中說明的分析化學、合成有機化學、及藥物及製藥化學有關使用的術語及實驗室程序及技術為技藝中已熟知及一般使用者。使用標準技術做化學合成、化學分析、醫藥製品、配方、及傳遞，及治療病患。

除分另外指明，應了解下列用詞具有下列意義：

用詞"多胜肽"包含天然或人造蛋白質、蛋白質片段及蛋白質序列之多胜肽類似物。多胜肽可為單體或多聚體。

用詞"分離的蛋白質"、"分離的多胜肽"或"分離的抗體"為一種蛋白質、多胜肽或抗體，其由於其起源或衍生之來源(1)與其天然狀態伴隨之的自然相連成分分離，(2)無來自相同物種之其他蛋白質，(3)由來自不同物種之細胞表現，或(4)天然不會發生。因此，化學合成或於不同於其天然產生的細胞之細胞系統中合成的多胜肽將為與其天然相連的成分"分離"。利用技藝中已熟知的蛋白質純化技術，藉由分離也可使蛋白質大體上無天然相連的成分。

分離的抗體之實例包括利用 c-Met 經親合力純化的抗-c-Met 抗體、藉融合瘤或其他細胞株於試管中合成的抗-c-Met 抗體、及衍生自基因轉殖鼠之人類抗-c-Met 抗體。

當樣品之至少約 60 至 75% 呈現單一種多胜肽時，蛋白質或多胜肽為"大體上純"、"大體上同質"、"大體上經純化"。多胜肽或蛋白質可為單體或多聚體。大體上純的多胜肽或蛋白質典型將包含約 50%、60%、70%、80% 或 90% W/W 蛋

白質樣品，更通常約95%，及較佳將為超過99%純度。蛋白質純度或同質性可由許多技藝中已熟知的工具指出，如蛋白質樣品之聚丙烯醯胺膠體電泳，之後以技藝中已熟知的染色劑將膠體染色而顯現單一多胜肽帶。為了某些目的，藉由利用HPLC或其他純化技藝中已熟知的工具可提供更高解析度。

使用於本文中之用詞"多胜肽片段"意指具有胺基端及/或羧基端刪去的多胜肽，但是其中剩餘的胺基酸序列相同於天然發生的序列中相對應的位置。於某些具體實施例中，片段為至少5、6、8或10個胺基酸長。於另一些具體實施例中，片段為至少14、至少20、至少50、或至少70、80、90、100、150或200個胺基酸長。

使用於本文中之用詞"多胜肽類似物"意指一種多胜肽，其包含具有大體上一致於胺基酸序列之部分的段落及具有至少一種下列性質：(1)於適當結合條件下專一結合至c-Met，(2)能夠抑制或活化c-Met。典型而言，多胜肽類似物包含有關天然序列之保留性取代(或插入或刪去)。類似物典型為至少20或25個胺基酸長，較佳至少50、60、70、80、90、100、150或200個胺基酸長或更長，且常可為長如完整長度多胜肽。本發明之一些具體實施例包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17個取代生殖系胺基酸序列之多胜肽片段或多胜肽類似物抗體。

於某些具體實施例中，對抗-c-Met抗體或其抗原結合部

分之胺基酸取代為下列：(1)降低對蛋白質水解的敏感性，(2)降低對氧化的敏感性，(3)改變形成蛋白質複合物之結合親合力，及(4)賦予或修飾此類似物之其他理化或功能性質，但仍保留對c-Met專一性結合。類似物可包括除了正常發生的胜肽序列之許多突變蛋白之序列。例如，可製造單一或多個胺基酸取代(較佳為保留性胺基酸取代)於正常發生的序列中，較佳於形成分子間接觸的區塊外的多胜肽部份中。保留性胺基酸取代大體上不應改變母序列之結構特徵；如，代替胺基酸不應改變發生於母序列中組成免疫球蛋白結合區塊的反平行 β 片層，或瓦解形成母序列特徵之其他類型二級結構。一般而言，甘胺酸及脯胺酸不會用於反平行 β 片層中。技藝確認的多胜肽二級結構及三級結構之實例係說明於 *Proteins, Structures and Molecular Principles*(Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York(1984)); *Introduction to Protein Structure*(C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y.(1991));及 Thornton等人, *Nature* 354:105(1991)，以參考資料併入本文中。

一般於製藥工業中使用非胜肽類似物作為具有類似於模版胜肽性質之藥物。將此類非胜肽化合物稱為"胜肽模擬物"或"擬胜肽物質(peptidomimetics)"。Fauchere, *J. Adv. Drug Res.* 15:29(1986); Veber及Freidinger, *TINS* p.392(1985); 及 Evans等人, *J. Med. Chem.* 30:1229(1987)，以參考資料併入本文中。此類化合物常藉電腦化分子模型之助開發。可使

用結構上類似於治療上有用的胜肽之胜肽模擬物來產生相等的治療或預防效果。一般而言，擬胜肽物質為結構上類似於範例多胜肽(即具有理想生化性質或藥理活性之多胜肽)，如人類抗體，但藉由技藝中已熟知的方法而具有一或多個胜肽連結視情況由選自： $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (順式及反式)、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 、及 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 組成的群組選出的連結取代。也可使用以相同類型之D-胺基酸(如D-離胺酸取代L-離胺酸)系統性取代共有序列(consensus sequence)之一或多個胺基酸來產生更穩定的胜肽。此外，包含共有序列或大致上相同共有序列變異之限制胜肽可由技藝中已知的方法產生(Rizo及Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387(1992)，以參考資料併入本文中)；例如，藉加入能夠形成分子內二硫化物橋環化胜肽的內部半胱胺酸基團。

在本文中提出關於本發明之"抗體"之處，通常應知也可使用其抗原結合部分。對於專一性結合，抗原結合部分比得上完整抗體。一般見Fundamental Immunology, 第7章(Paul, W.編，第2版，Raven Press, N.Y.(1989))(為所有目的將其全文以參考資料併入本文中)。抗原結合部分可由重組DNA技術或由酵素或化學切斷完整抗體而製造。於一些具體實施例中，抗原結合部分包括Fab、Fab'、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 、Fd、Fv、dAb、及互補性決定區域(CDR, complementarity determining region)片段、單鏈抗體(scFv)、嵌合抗體、微型雙功能抗體(diabody)及含有抗體之至少一部份足以賦予多胜肽專一抗

原結合之多胜肽。

由N-端至C-端，成熟輕及重鏈可變區塊兩者皆包含區域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。本文中各區塊之胺基酸指派係根據Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*(National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1987及1991))、Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987)或Chothia等人, *Nature* 342:878-883(1989)之定義。

如本文中使用，由數字提及的抗體與由相同數字之融合瘤得到的單株抗體相同。例如，單株抗體13.3.2與由融合瘤13.3.2或其次株(subclone)得到的抗體相同。

如本文中使用，Fd片段意指由V_H及C_{H1}區塊組成的抗體片段；Fv片段由抗體單臂之V_L及V_H區塊組成；及dAb片段(Ward等人, *Nature* 341:544-546(1989))由V_H區塊組成。

於某些具體實施例中，抗體為單鏈抗體(scFv)，其中將V_L及V_H區塊經由合成連結子使其製成單一蛋白質鏈而成對形成單價分子。(Bird等人, *Science* 242:423-426(1988)及Huston等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883(1988)。)於某些具體實施例中，抗體為微型雙功能抗體，即為雙價抗體，其中將V_L及V_H區塊表現於單一多胜肽鏈上，但利用太短不足以於相同鏈上的兩區塊之間配對的連結子，因而強迫區塊與另一鏈之互補區塊配對並產生兩個抗原結合位置。(見如Holliger P.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448(1993)，及Poljak R.J.等人, *Structure*

2:1121-1123(1994)。)於某些具體實施例中，可將來自本發明抗體之一或多個CDR共價或非共價地併入一分子以使其成為專一結合至c-Met的免疫黏著素。於此具體實施例中，可將CDR併入成為更大多胜肽鏈之部分、共價連結至另一多胜肽鏈、或非共價地併入。

於具有一或多個結合位置之具體實施例中，結合位置可與另一個相同或可為不同。

如本文中使用的用詞"人類抗體"意指任何抗體，其中可變及固定區塊序列為人類序列。此用詞包含具有衍生自人類基因之序列的抗體，但其未曾改變，如以降低可能的免疫原性(immunogenicity)、增加親合力、去除可能造成不必要摺疊之半胱胺酸等。此用詞包含基因重組產生於非人類細胞中的此類抗體，其可能給予人類細胞不常見的糖化。可將此等抗體以不同方式製備，如下述。

如本文中使用的用詞"嵌合抗體"意指包含來自二或多個不同抗體之區域的抗體。於一個具體實施例中，嵌合抗體之一或多個CDR係衍生自人類抗-c-Met抗體。於另一個具體實施例中，所有CDR皆衍生自人類抗-c-Met抗體。於另一個具體實施例中，將來自超過一種人類抗-c-Met抗體之CDR組合於一嵌合抗體中。例如，嵌合抗體可包含來自第一個人類抗-c-Met抗體之輕鏈的CDR1、來自第二個人類抗-c-Met抗體之輕鏈的CDR2及來自第三個人類抗-c-Met抗體之輕鏈的CDR3、及來自重鏈之CDR可衍生自一或多個其他抗-c-Met抗體。再者，骨架區域可衍生自採用一或多個CDR

之抗-c-Met抗體之其中一個或自一或多個不同人類抗體。

於一些具體實施例中，本發明的嵌合抗體為人化抗-c-Met抗體。本發明之人化抗-c-Met抗體包含一或多個骨架區域之胺基酸序列及/或來自本發明一或多個人類抗-c-Met抗體之固定區域至少一部份之胺基酸序列及衍生自非人類抗-c-Met抗體之CDR。

如本文中使用之"活化抗體"(於本文中 also 稱為"促效劑抗體")意指一抗體，當加至表現c-Met的細胞、組織或生物體時，增加一或多個c-Met活性至少約40%。於一些具體實施例中，抗體活化c-Met活性至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、100%或大於100%。於一些具體實施例中，於HGF存在中將活化抗體加入。於一些具體實施例中，本發明之促效劑抗體增加c-Met的至少一種活性10倍。

抗體或免疫球蛋白分子之片段或類似物可由熟悉本技藝者遵循本說明書的教導輕易地製備。較佳的胺基-及羧基-端片段或類似物發生靠近功能區塊的邊界。藉由比較核苷酸及/或胺基酸序列資料與公共或私人的序列資料庫可確認結構及功能區塊。較佳的是，使用電腦化比較方法來確認發生於其他蛋白質之已知結構及/或功能之特定序列(motif)或預測的蛋白質形態區塊。確認摺疊成為已知三度空間結構的蛋白質序列之方法為已知。見Bowie等人，*Science* 253:164(1991)。

如本文中使用的，用詞"表面等離子共振(surface plasmon resonance)"意指藉偵測於生物感測器內蛋白質濃度的變化

允許分析即時生物專一交互作用之光學現象，例如利用 BIACORE™ 系統 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.)。進一步說明見 Jonsson U. 等人，*Ann, Biol. Clin.* 51:19-26(1993); Jonsson U 等人，*Biotechniques* 11:620-627(1991); Jonsson B 等人，*J. Mol. Recognit.* 8:125-131(1995); 及 Johnson B. 等人，*Anal. Biochem.* 198:268-277(1991)。

用詞 " K_D " 意指特定抗體-抗原交互作用之平衡解離常數。

用詞 "抗原決定部位 (Epitope)" 包括能夠專一結合至免疫球蛋白或 T 細胞受體或以其他方式與分子交互作用的任何蛋白質決定部位。抗原決定部位一般由化學活性的表面基團分子組成，如胺基酸或碳水化合物或糖側鏈，及一般具有特定三度空間結構特徵，以及特定電荷特徵。抗原決定部位可為 "線性" 或 "構象 (conformational)"。於線性抗原決定部位中，蛋白質及交互作用的分子 (如抗體) 之間所有交互作用的點沿蛋白質的一級胺基酸序列直線發生。於構象抗原決定部位中，交互作用的點發生穿過蛋白質上彼此分開的胺基酸基團。當解離常數為 ≤ 1 mM，較佳 ≤ 100 nM 及最佳 ≤ 10 nM 時，稱此抗體為專一地結合此抗原。於某些具體實施例中， K_D 為 1 pM 至 500 pM。於其他具體實施例中， K_D 為 500 pM 至 1 μ M 之間。於其他具體實施例中， K_D 為 1 μ M 至 100 nM 之間。於其他具體實施例中， K_D 為 100 mM 至 10 nM 之間。一旦決定抗原上一個理想抗原決定部位，能夠產生對該抗原決定部位的抗體，如利用說明於本發明中的技術。或者，

於發現過程期間，抗體的產生及定性可闡明關於理想抗原決定部位之資訊。由此資訊，能夠有競爭性地篩選結合相同抗原決定部位的抗體。達到此的一個方法為實施交叉競爭研究以發現彼此競爭結合的抗體，即抗體競爭結合至抗原。基於其交叉競爭以"儲藏"抗體之高產量方法係說明於世界專利申請案編號WO 03/48731中。

如本文中使用的，二十個習見胺基酸及其縮寫遵循習見用法。見Immunology-A Synthesis(第2版，E.S. Golub及D.R. Gren編著，Sinauer Associates, Sunderland, Mass.(1991))，以參考資料併於本文中。

如本文中提及的用詞"多核苷酸"意指至少10個鹼基長的核苷酸之聚合物形式，無論是核糖核苷酸或去氧核苷酸或兩者其中任何形式核苷酸之修飾形式。

如本文中使用的用詞"分離的多核苷酸"意指基因組、cDNA、或合成起源之多核苷酸或其某組合，其由於其起源，"分離的多核苷酸"(1)不與見於天然的"分離的多核苷酸"之所有或部分多核苷酸結合，(2)被可操作地連結至天然不連結的多核苷酸，或(3)天然不發生為較大序列之部分。

如本文中使用的用詞"天然發生的核苷酸"包括去氧核糖核苷酸及核糖核苷酸。如本文中使用的用詞"修飾的核苷酸"包括具有修飾的或置換的糖基等之核苷酸。本文中提及的用詞"寡核苷酸連結"包括如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒酸磷酸酯、二硒酸磷酸酯、phosphoroanilothioate、phosphoranilidate、胺基磷酸酯等。見如LaPlanche等人，

Nucl. Acids Res. 14:9081(1986); Stec 等人, *J. Am. Chem. Soc.* 106:6077(1984); Stein 等人, *Nucl. Acids Res.* 16:3209(1988); Zon 等人, *Anti-Cancer Drug Design* 6:539(1991); Zon 等人, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, 87-108 頁 (F. Eckstein 編著, Oxford University Press, Oxford England(1991)); 美國專利編號 5,151,510; Uhlmann 及 Peyman, *Chemical Reviews* 90:543(1990), 將其揭示以參考資料併於本文中。視需要, 寡核苷酸可包括用以偵測之標記。

"可操作的連結"序列包括與研究基因連續的表現控制序列及逆位或於遠距作用以控制研究基因之表現控制序列兩者。如本文中使用的用詞"表現控制序列"意指使其連接的編碼序列完成表現及處理所必須的多核苷酸序列。表現控制序列包括適當轉錄起始、終止、啟動子及增強子序列; 有效率的 RNA 處理訊號如接合及多聚腺苷酸化訊號; 穩定細胞質 mRNA 之序列; 增強轉譯效率之序列(即科扎克(Kozak)共有序列); 增加蛋白質穩定性之序列; 及當需要, 增加蛋白質分泌的序列。此控制序列的本質視宿主生物體而不同; 於原核細胞中, 此控制序列一般包括啟動子、核糖體結合位置、及轉錄終止序列; 於真核細胞中, 此控制序列一般包括啟動子及轉錄終止序列。用詞"控制序列"係用來至少包括存在對表現及處理為必要的所有成分, 且也可包括存在為有利的其他成分, 例如, 領導序列(leader sequence)及融合夥伴序列。

如本文中使用的用詞"載體"意指能夠運送另一核酸至其被連結之處的核酸分子。於某些具體實施例中，載體為質體，即一個圓形雙股DNA，可將另一DNA段落連結於其中。於某些具體實施例中，載體為病毒載體，其中可將另一DNA段落連結進入病毒基因組。於某些具體實施例中，載體能夠於將其導入的宿主細胞中自主複製(如細菌載體具有細菌的複製起點及游離基因的哺乳類載體)。於其他具體實施例中，在導入宿主細胞時，可將載體(如非游離基因的哺乳類載體)併入宿主細胞的基因組中，因而可隨宿主基因組複製。再者，某些載體能夠引導表現其操作性連結的基因。此載體於本文中稱為"重組表現載體"(或簡稱"表現載體")。

如本文中使用的用詞"重組宿主細胞"(或簡稱"宿主細胞")意指已將重組表現載體導入其中的細胞。應知"重組宿主細胞"及"宿主細胞"不僅意指特定實驗細胞也包括此細胞之後代。因為由於突變或環境影響某些改質可能發生於後繼的世代，事實上此後代可能不會與母細胞一致，但仍包括於本文中使用的用詞"宿主細胞"之範圍內。

於本文中提及的用詞"選擇性雜交"意指可偵測及專一性地結合。於將可偵測的結合至非專一性核酸之可觀察量減至最小之雜交及清洗條件下，多核苷酸、寡核苷酸及其片段根據本發明選擇性雜交至核酸股。可使用"高嚴謹性(high stringency)"或"高度嚴謹"條件來達到如技藝中已知及本文中說明的選擇性雜交條件。"高嚴謹性"或"高度嚴謹"條件之一個實例為培養多核苷酸與另一多核苷酸，其中可將一個

多核苷酸固定於固體表面如膜，於雜交緩衝液6X SSPE或SSC、50%甲醯胺、5X登哈特試劑(Denhardt's reagent)、0.5% SDS、100微克/毫升變性片段的鮭魚精子DNA中於42°C雜交溫度12-16小時，之後於55°C利用清洗緩衝液1X SSC、0.5%SDS清洗兩次。也見Sambrook等人同前文獻，9.50-9.55頁。

於核酸序列之文中用詞"序列一致性百分比"意指於當比對最大相似處時兩序列中為相同的基團。序列一致性比較之長度可為遍及一段至少約九個核苷酸，通常至少約18個核苷酸，更常至少約24個核苷酸，典型至少約28個核苷酸，更典型至少約32個核苷酸，較佳至少約36、48、或更多個核苷酸。技藝中已知有許多不同演算法可用來測量核苷酸序列一致性。例如，可利用FASTA、Gap或Bestfit可比較多核苷酸序列，其為Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group(GCG), Madison, Wisconsin中的程式。FASTA(其包括如程式FASTA2及FASTA3)提供詢問及搜尋序列之間最佳重疊區域之比對及序列一致性百分比(Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98(1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219(2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266:227-258(1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276:71-84(1998);以參考資料併於本文中)。除非另外指定，使用特定程式或演算法之隱含參數。例如，利用FASTA以其隱含參數(字長為6及NOPAM因子於計分矩陣)或利用Gap以其如GCG 6.1版(以參考資料併於本文中)中提供之隱含

參數，可決定於核苷酸序列之間的序列一致性百分比。

提及核苷酸序列包含其互補，除非另外指明。因此，應知提及具有特定序列之核酸包含其互補股，與其互補序列。

如本文中使用的，將用詞"序列一致性百分比"及"序列同源性百分比"可互換地使用。

當提及核酸或其片段時，用詞"大體上類似性"或"大體上序列類似性"意指當以適當核苷酸插入或刪去與另一核酸(或其互補股)最佳比對時，有核苷酸序列一致性至少約85%，較佳至少約90%，及更佳至少約95%、96%、97%、98%或99%之核苷酸鹼基，如由序列一致性之任何已熟知演算法測量，如FASTA、BLAST或Gap，如上述。

當運用至多胜肽，用詞"大體上一致性"意指當最佳比對時，如藉由程式GAP或BESTFIT利用程式提供的隱含間隔權重，兩胜肽序列共有至少70%、75%、80%序列一致性，較佳至少90%或95%序列一致性，更佳至少97%、98%或99%序列一致性。於某些具體實施例中，不一致的基團位置差別在於保留性胺基酸取代。"保留性胺基酸取代"為一種其中胺基酸基團被具有類似化學性質(如電荷或疏水性)之側鏈R基團的另一胺基酸基團取代。一般而言，保留性胺基酸取代將大體上不會改變蛋白質的功能性質。在二或多個彼此不同保留性取代之胺基酸序列的情況中，可將序列一致性百分比向上調整以校正取代之保留性本質。做此調整之工具對熟悉本技藝者為已熟知。見如 Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243:307-31(1994)。具有類似化學性質之側鏈的胺基

酸群組之實例包括1)脂肪族側鏈：甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸(valine)，白胺酸(leucine)、及異白胺酸(isoleucine)；2)脂肪族-羥基側鏈：絲胺酸和羥丁胺酸；3)含醯胺側鏈：天門冬醯胺和麩胺醯胺；4)芳族側鏈：苯丙胺酸、酪胺酸、及色胺酸；5)鹼性側鏈：離胺酸、精胺酸、及組胺酸；6)酸性側鏈：天門冬胺酸和麩胺酸；及7)含硫側鏈：半胱胺酸和甲硫胺酸。保留性胺基酸取代群組為：纈胺酸-白胺酸-異白胺酸、苯丙胺酸-酪胺酸、離胺酸-精胺酸、丙胺酸-纈胺酸、麩胺酸-天門冬胺酸、及天門冬醯胺-麩胺醯胺。

或者，保留性取代為揭示於 Gonnet 等人，*Science* 256:1443-45(1992)中 PAM250 對數可能性矩陣中具有正值的任何改變，以參考資料併於本文中。"適度保留性"取代為於 PAM250 對數可能性矩陣中具有非負值的任何改變。

對於多胜肽之序列一致性典型利用序列分析軟體測量。蛋白質分析軟體利用指定至各種取代、刪去及其他修飾(包括保留性胺基酸取代)之類似性基準比對序列。例如，GCG 含有程式如 "Gap" 及 "Bestfit"，可使用其以程式指定的隱含參數來決定接近相關的多胜肽之間的序列同源性或序列一致性，如來自不同種類生物體之同源多胜肽或野生型蛋白質及其突變蛋白之間。見 GCG 6.1 版(威斯康辛大學，WI)。利用 FASTA 使用隱含或建議參數也可比較多胜肽序列，見 GCG 6.1 版。FASTA(如 FASTA2 及 FASTA3)提供詢問及搜尋序列之間最佳重疊區域之比對及序列一致性百分比 (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98(1990); Pearson,

Methods Mol. Biol. 132:185-219(2000))。當比較本發明之序列與含有來自不同生物體的大量序列資料庫時，另一較佳演算法為電腦程式BLAST，特別是blastp或tblastn，利用程式提供的隱含參數。見如Altschul等人，*J. Mol. Biol.* 215:403-410(1990)；Altschul等人，*Nucleic Acids Res.* 25:3389-402(1997)。

比較同源性之多胜肽序列長度一般為至少約16個胺基酸基團，通常至少約20個基團，更常至少約24個基團，典型至少約28個基團，較佳多於約35個基團。當搜尋含有來自大量不同生物體之序列的資料庫時，較佳比較胺基酸序列。

如本文中使用的，用詞"標記"或"標記的"意指於抗體中加入另一分子。於一個具體實施例中，標記為可偵測的標記物，如併入放射線標記的胺基酸或將可由標記的卵白素(Avidin)偵測的生物素(biotinyl)部分連接至多胜肽(如含有螢光標記物的鏈霉親和素(Streptavidin)或可由光學或色度法偵測的酵素活性)。於另一個具體實施例中，標記或標記物可為有療效的，如藥物結合或毒素。許多標記多胜肽及醣蛋白的方法為技藝中已知且可使用。多胜肽標記之實例包括(但不限於)下列：放射線同位素或放射線核素(如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、螢光標記(如FITC、若丹明(Rhodamine)、鐳系磷光粉)、酵素標記(如辣根過氧化物酶(horseradish peroxidase)、 β -半乳糖苷酶、螢光酵素(luciferase)、鹼性磷酸酶)、化學發光標記物、生物素基團、由二級報告子辨認的預定多胜肽抗原決定部位(如白胺酸

拉鍊對序列、二級抗體的結合位置、金屬結合區塊、抗原決定部位標示)、磁性試劑,如釷(Gadolinium)螯化物、毒素如百日咳毒素、紫杉醇(Taxol)、細胞鬆弛素B(cytochalasin B)、短桿菌素D(Gramicidin D)、溴化乙錠、吐根鹼(emetine)、絲裂黴素(mitomycin)、依託泊苷(Etoposide)、tenoposide、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、秋水仙鹼(colchicin)、阿黴素(doxorubicin)、柔紅黴素(daunorubicin)、二羥基蔥二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蔥醌(Mitoxantrone)、光輝黴素(Mithramycin)、放線菌素D(Actinomycin D)、二氫睪固酮(dehydrotestosterone)、糖化皮質類固醇(glucocorticoids)、普羅卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利都卡因(Lidocaine)、普萘洛爾(Propranolol)、及嘌呤黴素(Puromycin)及其類似物或同源物。於某些具體實施例中,藉不同長度的間隔臂連結標記以降低可能的空間阻礙。

於本說明書及專利申請範圍全文中,應知用詞"包含"意味包括陳述的整體或整體之群組但非排除任何其他整體或整體之群組。

人類抗-c-Met抗體及其特徵

於一個具體實施例中,本發明提供人化抗-c-Met抗體。於另一個具體實施例中,本發明提供人類抗-c-Met抗體。於一些具體實施例中,人類抗-c-Met抗體係由免疫非人類基因轉殖動物如齧齒動物而製造,其基因組包含人類免疫球蛋白基因,所以基因轉殖動物產生人類抗體。

本發明之抗-c-Met抗體可包含人類 κ 或人類 λ 輕鏈或由其衍生的胺基酸序列。於包含 κ 輕鏈之一些具體實施例中，輕鏈可變區塊(V_L)係由人類L5V κ_1 或A27V κ_3 基因編碼部分。

於一些具體實施例中，c-Met抗體之 V_L 包含一或多個胺基酸取代相對於生殖系胺基酸序列。於一些具體實施例中，c-Met抗體之 V_L 包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10個胺基酸取代相對於生殖系胺基酸序列。於一些具體實施例中，一或多個由生殖系之彼等取代係於輕鏈的CDR區域中。於一些具體實施例中，相對於生殖系之胺基酸取代為如同於抗體13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3或13.3.2L-A91T之 V_L 中任何一或多個中相對於生殖系取代之一或多個相同位置。例如，抗-c-Met抗體之 V_L 可含有相較於見於抗體9.1.2的 V_L 中之基因組一或多個胺基酸取代或可有相較於見於抗體13.3.2的 V_L 中之基因組一或多個胺基酸取代，其利用如抗體8.70.2相同的 V_K 基因。於一些具體實施例中，胺基酸改變為在一或多個相同位置，但是包含與參考抗體不同之取代。

於一些具體實施例中，相對於生殖系之胺基酸改變發生於如同於抗體13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3或13.3.2L-A91T之 V_L 中任何一或多個位置，但改變可代表保留性胺基酸取代於此位置相對於參考抗體中的胺基酸。例如，若將一個此等抗體中的特定位置相對於生殖系改變並為麩胺酸，吾人可置換天門冬胺酸於該位置。類似地，若相較於生殖系

胺基酸取代為絲胺酸，吾人可保留性以羥丁胺酸取代絲胺酸於該位置。保留性胺基酸取代係如上所述。

於一些具體實施例中，人類抗-c-Met抗體之輕鏈包含抗體13.3.2之V_L胺基酸序列(SEQ ID NO:4，其中X₈為丙胺酸)；抗體13.3.2L-A91T之V_L胺基酸序列(SEQ ID NO:4，其中X₈為羥丁胺酸)；抗體9.1.2之V_L胺基酸序列(SEQ ID NO:8)；抗體8.70.2之V_L胺基酸序列(SEQ ID NO:12)或抗體8.90.3之V_L胺基酸序列(SEQ ID NO:16)或具有高達1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10個保留性胺基酸取代及/或總共高達3個非保留性胺基酸取代之該胺基酸序列。於一些具體實施例中，輕鏈包含任一前述抗體由CDR1開始至CDR3末了的胺基酸序列。

於一些具體實施例中，輕鏈可包含CDR1、CDR2及CDR3，其分別獨立選自輕鏈抗體13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3或13.3.2L-A91T之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，或CDR區域各具有小於4或小於3個保留性胺基酸取代及/或總共三個或更少的非保留性胺基酸取代。於一些具體實施例中，抗-c-Met抗體之輕鏈包含輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，其各獨立選自單株抗體13.3.2(SEQ ID NO:4，其中X₈為丙胺酸；SEQ ID NO:3，其中X₇為鳥嘌呤(guanosine))；13.3.2L-A91T(SEQ ID NO:4，其中X₈為羥丁胺酸；SEQ ID NO:3，其中X₇為腺嘌呤(adenosine))；9.1.2(SEQ ID NO:8；SEQ ID NO:7)；8.70.2(SEQ ID NO:12；SEQ ID NO:11)；或8.90.3(SEQ ID NO:16；SEQ ID NO:15)之輕鏈CDR1、CDR2

及CDR3區域。於某些具體實施例中，抗-c-Met抗體之輕鏈包含抗體之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3區域，包含抗體V_L區域之胺基酸序列，而該抗體選自13.3.2(SEQ ID NO:4，其中X₈為丙胺酸)；9.1.2(SEQ ID NO:8)；8.70.2(SEQ ID NO:12)；8.90.3(SEQ ID NO:16)或13.3.2L-A91T(SEQ ID NO:4，其中X₈為羥丁胺酸)或該CDR區域各具有小於4或小於3個保留性胺基酸取代及/或總共三個或更少的非保留性胺基酸取代。

關於重鏈，於一些具體實施例中，可變區塊係由人類V_H 1-18、V_H 4-31、V_H 4-39或V_H 3-48基因編碼部分。於一些具體實施例中，抗-c-Met抗體之V_H序列相對於生殖系胺基酸序列含有一或多個胺基酸取代、刪去或插入(加入)。於一些具體實施例中，重鏈的可變區塊包含來自生殖系胺基酸序列之1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、或17個突變。於一些具體實施例中，突變相較於生殖系胺基酸序列為非保留性取代。於一些具體實施例中，突變位於重鏈的CDR區域中。於一些具體實施例中，將胺基酸改變製於來自抗體13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3；13.3.2H-A14P；13.3.2H-E42K；13.3.2H-S97T；13.3.2H-A14P, E42K；13.3.2H-E42K,S97T；或13.3.2 H-A14P,E42K,S97T之任何一個或多個V_H突變之一或多個相同位置。於其他具體實施例中，胺基酸改變位於一或多個相同位置但包含不同於參考抗體中的突變。

於一些具體實施例中，重鏈包含抗體13.3.2之V_H胺基酸

序列 (SEQ ID NO:2, 其中 X_2 為麩胺酸、 X_4 為絲胺酸) ;
13.3.2H-E42K 之 V_H 胺基酸序列 (SEQ ID NO:2, 其中 X_2 為離
胺酸、 X_4 為絲胺酸) ; 13.3.2H-E42K, S97T 之 V_H 胺基酸序列
(SEQ ID NO:2, 其中 X_2 為離胺酸、 X_4 為羥丁胺酸) ; 9.1.2
之 V_H 胺基酸序列 (SEQ ID NO:6) ; 8.70.2 之 V_H 胺基酸序列
(SEQ ID NO:10) 或 8.90.3 之 V_H 胺基酸序列 (SEQ ID NO:14)
或該 V_H 胺基酸序列具有高達 1、2、3、4、6、8、或 10 個保
留性胺基酸取代及/或總共高達 3 個非保留性胺基酸取代。
於一些具體實施例中, 重鏈包含任一前述抗體由 CDR1 開始
至 CDR3 末了的胺基酸序列。

於一些具體實施例中, 重鏈包含 13.3.2 ; 9.1.2 ; 8.70.2 ;
8.90.3 ; 13.3.2H-A14P ; 13.3.2H-E42K ; 13.3.2H-S97T ;
13.3.2H-A14P,E42K ; 13.3.2H-E42K,S97T ; 或 13.3.2
H-A14P,E42K,S97T 之重鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 區域, 或該
CDR 區域各具有小於 8、小於 6、小於 4、或小於 3 個保留性
胺基酸取代及/或總共三個或更少的非保留性胺基酸取代。

於一些具體實施例中, 重鏈 CDR 區域係獨立選自二或多
個 13.3.2 ; 9.1.2 ; 8.70.2 ; 8.90.3 ; 13.3.2H-A14P ;
13.3.2H-E42K ; 13.3.2H-S97T ; 13.3.2H-A14P,E42K ; 13.3.
2H-E42K,S97T ; 或 13.3.2 H-A14P,E42K,S97T 抗體之 CDR 區
域。於另一個具體實施例中, 重鏈包含 CDR 區域獨立選自
二或多個選自 13.3.2 之 V_H 區域 (SEQ ID NO:2, 其中 X_2 為麩
胺酸、 X_4 為絲胺酸) ; 13.3.2H-E42K 之 V_H 區域 (SEQ ID
NO:2, 其中 X_2 為離胺酸、 X_4 為絲胺酸) ; 13.3.2H-E42K, S97T

之 V_H 區域 (SEQ ID NO:2, 其中 X_2 為離胺酸、 X_4 為羥丁胺酸); 9.1.2 之 V_H 區域 (SEQ ID NO:6); 8.70.2 之 V_H 區域 (SEQ ID NO:10) 或 8.90.3 之 V_H 區域 (SEQ ID NO:14)。於另一個具體實施例中，抗體包含如上述之輕鏈及如上述之重鏈。於再另一個具體實施例中，輕鏈 CDR 及重鏈 CDR 係來自相同抗體。

可做的一類胺基酸取代為改變抗體中一或多個半胱胺酸 (其可為化學反應性) 至另一基團，如 (不限於) 丙胺酸或絲胺酸。於一個具體實施例中，有取代非標準的半胱胺酸。可將取代形成於抗體的可變區塊之 CDR 或骨架區域中或於固定區域中。於一些具體實施例中，半胱胺酸為標準的。

可做的另一類胺基酸取代為改變抗體中任何可能的蛋白質水解位置。此位置可發生於抗體的可變區塊之 CDR 或骨架區域中或於固定區域中。取代半胱胺酸基團及去除蛋白質水解位置可降低抗體產物中任何異質風險及因而增加其均質性。另一類胺基酸取代為藉由改變一或兩者基團消除天門冬醯胺-甘胺酸對，其形成可能的脫醯胺作用 (deamidation) 位置。

於一些具體實施例中，將本發明抗-c-Met 抗體之重鏈的 C 端離胺酸切斷。於本發明的許多具體實施例中，抗-c-Met 抗體之重鏈及輕鏈可視情況包括訊號序列。

於一個觀點中，本發明係關於四個抑制性人類抗-c-Met 單株抗體及製造之的融合瘤細胞株。表 1 列出編碼全長重及輕鏈 (包括領導序列) 之核酸的序列識別子 (SEQ ID NO:)，及相對應全長演繹的胺基酸序列。

表 1

人類抗-c-Met抗體				
單株抗體	序列識別子 (SEQ ID NO:)			
	全長			
	重		輕	
	DNA	蛋白質	DNA	蛋白質
13.3.2	1	2	3	4
9.1.2	5	6	7	8
8.70.2	9	10	11	12
8.90.3	13	14	15	16

本發明更提供某些上列人類抗-c-Met抗體之重及/或輕鏈變體，包含一或多個胺基酸取代。為了標明變體，第一個字母為天然發生的抗體鏈之胺基酸符號，數字意指胺基酸的位置(其中位置1為N端胺基酸)，及第二個字母符號為變體胺基酸。於一些具體實施例中，本發明提供單株抗體13.3.2之重鏈變體。一個13.3.2重鏈變體為E42K，其具有離胺酸位於SEQ ID NO:2的位置X₂。編碼E42K 13.3.2變體之DNA序列具有腺嘌呤於SEQ ID NO:1的位置X₁。

第二個13.3.2重鏈變體為S97T，其具有羥丁胺酸於位置X₄。編碼S97T 13.3.2變體之DNA序列具有腺嘌呤於SEQ ID NO:1的位置X₃。第三個13.3.2重鏈變體為A14P，其具有脯胺酸基團於SEQ ID NO:2的X₆。於DNA序列中，A14P 13.3.2變體係由SEQ ID NO:1編碼，其中X₅為胞嘧啶。本發明也提供單株抗體13.3.2之變體輕鏈。A91T為13.3.2輕鏈變體，由SEQ ID NO:4代表，其中X₈為羥丁胺酸基團。於DNA序列中，A91T 13.3.2變體係由SEQ ID NO:3編碼，其中X₇為腺嘌呤。包含變體重或輕鏈及野生型鏈之抗體係由變體鏈標

明。因此，將含有抗體13.3.2之野生型輕鏈及E42K重鏈變體之抗體記為13.3.2H-E42K。

於本發明的其他具體實施例中，可製造含有胺基酸變體組合之抗體，如13.3.2H-E42K,S97T。包括13.3.2的變體重鏈及變體輕鏈之其他組合。於較佳具體實施例中，抗-c-Met抗體為13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3；13.3.2H-A14P；13.3.2H-E42K；13.3.2H-A14P,E42K；13.3.2H-E42K,S97T；13.3.2H-A14P,E42K,S97T；13.3.2H-S97T；13.3.2L-A91T；13.3.2L-A91T,H-A14P；13.3.2L-A91T,H-E42K；13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K；13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T或13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K,S97T。於再其他具體實施例中，本發明包括抗體包含對任何上列人類抗-c-Met抗體之可變區塊胺基酸序列具有多於80%、多於85%、多於90%、多於95%、多於96%、多於97%、多於98%或多於99%序列一致性之可變區塊胺基酸序列。

抗-c-Met抗體之種類及亞型

抗-c-Met抗體之種類及亞類可由技藝中已知的任何方法決定。一般而言，抗體之種類及亞類可利用專一於特定抗體之種類及亞類之抗體決定。此抗體為市面上可購得。藉ELISA或西方點漬法以及其他技術可決定種類及亞類。或者，藉由定序所有或部分抗體之重及/輕鏈的固定區塊，比較其胺基酸序列與免疫球蛋白之許多種類及亞類的已知胺基酸序列可決定種類及亞類。

於一些具體實施例中，抗-c-Met抗體為單株抗體。抗

-c-Met抗體可為IgG、IgM、IgE、IgA、或IgD分子。於較佳具體實施例中，抗-c-Met抗體為IgG及為IgG1、IgG2、IgG3、IgG4亞類。於另一較佳具體實施例中，抗體為亞類IgG2。

抗-c-Met抗體對c-Met的結合親和力

於本發明的一些具體實施例中，抗-c-Met抗體以高親和力結合至c-Met。於一些具體實施例中，抗-c-Met抗體以 2×10^{-7} M或以下之 K_D 結合至c-Met。於其他較佳具體實施例中，抗體以 2×10^{-8} M、 2×10^{-9} M、 5×10^{-10} M或以下之 K_D 結合至c-Met。於再更佳具體實施例中，抗體以如同選自13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3；13.3.2H-A14P；13.3.2H-E42K；13.3.2H-S97T；13.3.2H-A14P, E42K；13.3.2H-E42K,S97T；13.3.2H-A14P,E42K,S97T；13.3.2L-A91 T；13.3.2L-A91T,H-A14P；13.3.2L-A91T,H-E42K；13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K；13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T或13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K,S97T之抗體大體上相同之 K_D 結合至c-Met。於再另一較佳具體實施例中，抗體以如同包含具有SEQ ID NO:2[13.3.2(SEQ ID NO: 2，其中 X_2 為麩胺酸、 X_4 為絲胺酸)；13.3.2H-E42K(SEQ ID NO:2，其中 X_2 為離胺酸、 X_4 為絲胺酸)；13.3.2H-E42K, S97T(SEQ ID NO:2，其中 X_2 為離胺酸、 X_4 為羥丁胺酸)]、6、10、或14 V_H 區域胺基酸序列之重鏈可變區塊，或具有SEQ ID NO:4[13.3.2(SEQ ID NO:4，其中 X_8 為丙胺酸)；13.3.2L-A91T(SEQ ID NO:4，其中 X_8 為羥丁胺酸)]、8、12、或16 V_L 區域胺基酸序列之輕鏈可變區塊或兩者之抗體大體上相同之 K_D 結合至c-Met。於另一較佳具體實施例中，抗體以大體上如同包含具有SEQ ID

NO:4[13.3.2(SEQ ID NO:4, 其中 X_8 為丙胺酸); 13.3.2L-A91T(SEQ ID NO:4, 其中 X_8 為羥丁胺酸)]、8、12、或 16 V_L 區域胺基酸序列之輕鏈可變區塊的 CDR 區域的抗體或包含具有 SEQ ID NO: 2[13.3.2(SEQ ID NO:2, 其中 X_2 為麩胺酸、 X_4 為絲胺酸); 13.3.2H-E42K(SEQ ID NO:2, 其中 X_2 為離胺酸、 X_4 為絲胺酸); 13.3.2H-E42K, S97T(SEQ ID NO:2, 其中 X_2 為離胺酸、 X_4 為羥丁胺酸)]、6、10、或 14 V_H 區域胺基酸序列之重鏈可變區塊的 CDR 區域的抗體大體上相同之 K_D 結合至 c-Met。

於一些具體實施例中，抗-c-Met 抗體具有低解離速率常數 (k_{off})。於一些具體實施例中，抗-c-Met 抗體具有 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ 或更低之 k_{off} 或 $5.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或更低之 k_{off} 。於其他較佳具體實施例中，抗體以 $2 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或更低之 k_{off} 結合至 c-Met。於一些具體實施例中， k_{off} 大體上與本文中說明的抗體相同，包括選自 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3; 13.3.2H-A14P; 13.3.2H-S97T; 13.3.2H-E42K; 13.3.2H-A14P,E42K; 13.3.2 H-E42K,S97T; 13.3.2H-A14P,E42K,S97T; 13.3.2L-A91T; 13.3.2L-A91T,H-A14P; 13.3.2L-A91T,H-E42K; 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K; 13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T 或 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K,S97T 之抗體。於一些具體實施例中，抗體以如同包含重鏈之 CDR 區域; 或來自選自 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3 或 13.3.2L-A91T 之抗體的輕鏈 CDR 區域之抗體大體上相同之 k_{off} 結合至 c-Met。於一些具體實施例中，抗體以大體上如同包含具有 SEQ ID NO:2[13.3.2(SEQ ID NO:2, 其中 X_2 為麩胺酸、 X_4 為絲胺

酸)；13.3.2H-E42K(SEQ ID NO:2，其中X₂為離胺酸、X₄為絲胺酸)；13.3.2H-E42K,S97T(SEQ ID NO:2，其中X₂為離胺酸、X₄為羥丁胺酸)]、6、10、或14 V_H區域胺基酸序列之重鏈可變區塊，具有SEQ ID NO:4[13.3.2(SEQ ID NO:4，其中X₈為丙胺酸)；13.3.2L-A91T(SEQ ID NO:4，其中X₈為羥丁胺酸)]、8、12、或16 V_L區域胺基酸序列之輕鏈可變區塊或兩者之抗體大體上相同之k_{off}結合至c-Met。於另一較佳具體實施例中，抗體以大體上如同包含具有SEQ ID NO:4[13.3.2(SEQ ID NO:4，其中X₈為丙胺酸)；13.3.2L-A91T(SEQ ID NO:4，其中X₈為羥丁胺酸)]、8、12、或16 V_L區域胺基酸序列之輕鏈可變區塊的CDR區域的抗體或包含具有SEQ ID NO:2[13.3.2(SEQ ID NO:2，其中X₂為麩胺酸、X₄為絲胺酸)；13.3.2H-E42K(SEQ ID NO:2，其中X₂為離胺酸、X₄為絲胺酸)；13.3.2H-E42K, S97T(SEQ ID NO:2，其中X₂為離胺酸、X₄為羥丁胺酸)]、6、10、或14 V_H區域胺基酸序列之重鏈可變區塊的CDR區域的抗體大體上相同之k_{off}結合至c-Met。

抗-c-Met抗體對c-Met的結合親和力及解離速率常數可由技藝中已知方法決定。結合親和力可由ELISA、RIA、流式細胞儀(Flow Cytometry)、表面電漿共振(Surface Plasmon Resonance)(如BIACORE™)測量。解離速率可由表面電漿共振測量。較佳的是，藉表面電漿共振測量結合親和力及解離速率。更佳的是，利用BIACORE™測量結合親和力及解離速率。藉由利用技藝中已知的方法，吾人可決定是否一

抗體具有如抗-c-Met抗體大體上相同之 K_D 。實例VIII舉例藉BIACORETM決定抗-c-Met單株抗體的親和力常數之方法。

鑑定由抗-c-Met抗體辨認的c-Met抗原決定部位

本發明提供一種人類抗-c-Met單株抗體，其結合至c-Met及與下列抗體競爭或交互競爭及／或結合相同抗原決定部位：(a)選自13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3；13.3.2H-A14P；13.3.2H-E42K；13.3.2H-A14P, E42K；13.3.2 H-E42K,S97T；13.3.2H-A14P,E42K,S97T；13.3.2H-S97T；13.3.2L-A91T；13.3.2L-A91T,H-A14P；13.3.2L-A91T,H-E42K；13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K；13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T或13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K,S97T之抗體；(b)包含具有SEQ ID NO:2、6、10、或14 胺基酸序列之重鏈可變區塊之抗體；(c)具有SEQ ID NO:4、8、12、或16胺基酸序列之輕鏈可變區塊之抗體，或(d)包含如(b)中定義的重鏈可變區塊及如(c)中定義的輕鏈可變區塊兩者之抗體。

藉由利用技藝中已知的方法，吾人可決定是否一抗體結合至抗-c-Met抗體相同抗原決定部位或交叉競爭結合。於一個具體實施例中，吾人使本發明之抗-c-Met抗體於飽和條件下結合至c-Met，而後測量測試抗體結合至c-Met的能力。若測試抗體能夠於與抗-c-Met抗體同時結合至c-Met，則測試抗體結合至與抗-c-Met抗體不同的抗原決定部位。然而，若測試抗體無法與抗-c-Met抗體同時結合至c-Met，則測試抗體結合至相同抗原決定部位(重疊抗原決定部位)或緊密靠近由人類抗-c-Met抗體結合的抗原決定部位。此

實驗可利用ELISA、RIA、BIACORE™、或流式細胞儀實施。於較佳具體實施例中，利用ELISA實施此實驗。決定 K_D 之方法係於下進一步討論。

由抗-c-Met抗體抑制c-Met活性

於另一具體實施例中，本發明提供抑制HGF結合至c-Met受體之抗-c-Met抗體。於較佳具體實施例中，c-Met受體為人類的。於另一較佳具體實施例中，抗-c-Met抗體為人類抗體。於藉ELISA、RIA、或其他分析法之配體結合分析法及以細胞為基礎的分析法如散射分析、軟凝膠生長及管狀形態發生分析可決定 IC_{50} 。於一個具體實施例中，抗體或其部分由ELISA分析法測量，以不超過5微克/毫升，較佳不超過1微克/毫升，更佳不超過0.5微克/毫升，再更佳不超過0.20微克/毫升之 IC_{50} 抑制HGF及c-Met之間的配體結合。(見圖1A)實例III舉例此類型分析法。

於另一具體實施例中，本發明提供一種抗-c-Met抗體其在HGF存在中避免活化c-Met。於較佳具體實施例中，抗-c-Met抗體抑制發生於結合至c-Met時HGF引發的酪胺酸磷酸化。藉由以西方點漬法或ELISA分析法決定自體磷酸化程度，吾人可決定是否一抗-c-Met抗體可在HGF存在中避免活化c-Met。於較佳具體實施例中，利用ELISA分析法吾人將決定c-Met自體磷酸化程度。於另一較佳具體實施例中，利用ELISA分析法測量的 IC_{50} 為不超過5微克/毫升，較佳不超過1微克/毫升，更佳不超過0.5微克/毫升，再更佳不超過0.20微克/毫升。實例IV舉例一類型分析法，其測量在HGF

存在中由抗-c-Met抗體抑制c-Met活化(見圖1B)。

於本發明的另一觀點中，在與抗體培養後，抗體可引起細胞表面c-Met量之向下調節。於一些具體實施例中，培養可為短時間期間(如4小時)或較長時間期間(如24小時)。細胞表面c-Met量之向下調節可利用西方點漬法或ELISA測量。於本發明的特定具體實施例中，抗體較佳可引起細胞表面c-Met量之6%向下調節，較佳10%向下調節，或更佳20%向下調節，更佳50%向下調節或再更佳至少50%向下調節細胞表面c-Met量，如由西方點漬法或ELISA測量。實例V舉例與抗體短時間培養後，測量細胞表面c-Met量之向下調節的一類型ELISA。

於另一具體實施例中，本發明提供一種抗-c-Met抗體其抑制軟凝膠中菌落的形成。於許多具體實施例中，由軟凝膠生長分析法測量的 IC_{50} 為不超過25微克/毫升，較佳不超過20微克/毫升，更佳不超過5微克/毫升，再更佳不超過1微克/毫升。於另一具體實施例中，可使用管狀形態發生分析法來測量於HGF存在中及以本發明的抗體處理時於細胞生長中c-Met相關的形態變化之抑制百分比。較佳的是，以管狀形態發生分析法測量的抑制百分比不小於20%，較佳不小於60%，或再更佳不小於80%。實例VI及VII舉例許多類型分析法。

於活體內以抗-c-Met抗體抑制腫瘤細胞生長

根據一些具體實施例，本發明提供一種抗-c-Met抗體其於活體內抑制腫瘤細胞的增殖。腫瘤細胞可衍生自認核細

胞類型，包括(不限於)表皮、上皮、內皮或中胚層細胞。腫瘤細胞可衍生自實體腫瘤或非實體腫瘤，包括(不限於)白血病、肉瘤、多發性骨髓瘤、膠質母細胞瘤、絨毛癌(Choriocarcinoma)、卡波西氏(Kaposi)或子宮頸上皮內贅瘤(Cervical intraepithelial neoplasia)。於另一具體實施例中，抗-c-Met抗體抑制動物中之前列腺、結腸、乳房、卵巢、胃、肺及膠質母細胞瘤腫瘤生長。c-Met抗體抑制之細胞的實例為S114，其為基因工程改造成表現人類HGF及人類c-Met的NIH-3T3細胞株(Rong等人，*Mol. Cell. Biol.*, 12(11):5152-5158(1992)；美國專利4,405,712)。於一些具體實施例中，使用本發明之抗-c-Met抗體來治療肺癌、骨癌、胰癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門區域的癌症、胃癌、結腸癌、乳癌、婦科腫瘤(如子宮肉瘤、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌或陰戶癌)、何杰金氏症(Hodgkin's disease)、食道癌、小腸癌、內分泌系統之癌症(如甲狀腺、副甲狀腺或腎上腺之癌症)、軟組織之肉瘤、脈道癌、陰莖癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、兒童之實體腫瘤、淋巴球的淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管的癌症(如腎臟細胞癌、腎盂癌)、或中樞神經系統的癌(如原發性中樞神經系統淋巴瘤(Primary CNS lymphoma)、脊髓軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤(Gliomas)或腦垂體腺瘤)。

於較佳具體實施例中，相較於未經處理的動物中腫瘤之生長，抗體抑制腫瘤細胞生長。於更佳具體實施例中，抗

-c-Met抗體抑制腫瘤生長至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。於一個具體實施例中，在動物開始以抗體治療後至少7天時測量腫瘤細胞生長的抑制。於另一個具體實施例中，在動物開始以抗體治療後至少14天時測量腫瘤細胞生長的抑制。見實例IX。於另一個具體實施例中，抗-c-Met抗體造成腫瘤復原至少10%至100%。

由抗-c-Met抗體活化c-Met

本發明的另一觀點包含為活化抗體之抗-c-Met抗體，即c-Met促效劑。活化抗體放大或取代HGF於c-Met的效果。於一些具體實施例中，活化抗體實質上為HGF的模擬，及與HGF競爭結合至c-Met。於一些具體實施例中，抗體不與HGF競爭結合至c-Met，但放大HGF結合至c-Met的效果。於一些具體實施例中，抗-c-Met抗體在HGF存在或不存在中活化c-Met。抗-c-Met抗體促效劑活性可利用c-Met活化ELISA分析法測量。於本發明的一些具體實施例中，促效劑活性為未以HGF刺激的細胞之2至3倍刺激。於其他具體實施例中，促效劑活性為至少6倍。實例X說明c-Met活化分析法的實例。抗-c-Met抗體促效劑活性可利用管狀形態發生分析法測量。於本發明的一些具體實施例中，藉由利用測量c-Met抗體促效劑活性之管狀形態發生分析法可測量微弱促效劑活性。實例X舉例測量c-Met抗體促效劑活性之一類型管狀形態發生分析法。

物種及分子選擇性

於本發明的另一觀點中，抗-c-Met抗體同時顯示物種及分子選擇性。於一些具體實施例中，抗-c-Met抗體結合至人類及食蟹猴(Cynomol gus monkey)及獼猴(Rhesus monkey) c-Met。於另一具體實施例中，抗-c-Met抗體另外結合至大鼠c-Met。於另一具體實施例中，抗-c-Met抗體不結合至小鼠或狗c-Met。遵循本說明書之教導，利用技藝中已熟知的方法，吾人可決定抗-c-Met抗體之物種選擇性。例如，利用西方點漬法、流式細胞儀、ELISA、免疫沉澱法或RIA，吾人可決定物種選擇性。於較佳具體實施例中，利用流式細胞儀吾人可決定物種選擇性。

於另一具體實施例中，抗-c-Met抗體具有對c-Met之選擇性比其對IGF-1R(類胰島素生長因子1受體)之選擇性大超過100倍(見圖2)。於一些具體實施例中，抗-c-Met抗體對除了c-Met之任何其他蛋白質不呈現任何可觀察到的專一結合。遵循本說明書之教導，利用技藝中已熟知的方法，吾人可決定抗-c-Met抗體對c-Met之選擇性。例如利用西方點漬法、流式細胞儀、ELISA、免疫沉澱法或RIA，吾人可決定選擇性。

製造抗體及產生抗體的細胞株之方法

免疫

於一些具體實施例中，藉由以c-Met抗原免疫包含於其基因組內部分或所有人類免疫球蛋白重鏈及輕鏈基因座(loci)之非人、基因轉殖動物而將人類抗體產生。於較佳具體實施例中，非人動物為XENOMOUSETM動物(Abgenix, Inc.,

Fremont, CA)。

XENOMOUSETM小鼠為包含人類免疫球蛋白重鏈及輕鏈基因座之大片段且缺乏小鼠抗體製造的基因工程小鼠品種。見如Green等人，Nature Genetics 7:13-21(1994)及美國專利 5,916,771、5,939,598、5,985,615、5,998,209、6,075,181、6,091,001、6,114,598、6,130,364、6,162,963及6,150,584。也見世界專利WO 91/10741、WO 94/02602、WO 96/34096、WO 96/33735、WO 98/16654、WO 98/24893、WO 98/50433、WO 99/45031、WO 99/53049、WO 00/09560、及WO 00/037504。

於另一觀點中，本發明提供藉由以c-Met抗原免疫包含人類免疫球蛋白基因座之非人基因轉殖動物而自非人、非小鼠動物製造抗-c-Met抗體之方法。吾人可利用上面引述的文獻中說明的方法製造此動物。揭示於此等文獻中之方法可如美國專利5,994,619中所述修改，將其以參考資料併於本文中。美國專利5,994,619說明製造衍生自豬及牛的新穎培養的內細胞團(CICM, cultured inner cell mass)細胞及細胞株，及已將異源DNA插入其中之基因轉殖CICM細胞之方法。可使用CICM基因轉殖細胞來製造複製的基因轉殖胚胎、胎兒、及後代。此專利也說明製造能夠遺傳異源DNA至其後代的基因轉殖動物之方法。於本發明之較佳具體實施例中，非人動物為哺乳類，特別是大鼠、綿羊、豬、山羊、牛或馬。

XENOMOUSETM小鼠製造類似成人全部項目之完整人類

抗體及產生抗原專一性的人類抗體。於一些具體實施例中，XENOMOUSE™小鼠經由導入人類重鏈基因座及 κ 輕鏈基因座之兆鹼基大小的生殖系結構片段於酵母菌人造染色體中而含有大約80%人類抗體V基因項目。於其他具體實施例中，XENOMOUSE™小鼠更含有大約所有人類 λ 輕鏈基因座。見Mendez等人，*Nature Genetics* 15:146-156(1997)、Green及Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188:483-495(1998)、及世界專利WO 98/24893，將此等揭示以參考資料併於本文中。

於一些具體實施例中，包含人類免疫球蛋白基因的非人動物為具有人類免疫球蛋白"迷你基因座"之動物。於迷你基因座的方法中，經由包含來自Ig基因座之獨立基因模仿外生的Ig基因座。因此，將一或多個 V_H 基因、一或多個 D_H 基因、一或多個 J_H 基因、 μ 固定區塊、及第二個固定區塊(較佳為 γ 固定區塊)形成於用以插入動物中的構體內。此方法係說明於(特別是)美國專利編號5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,661,016、5,770,429、5,789,650、5,814,318、5,591,669、5,612,205、5,721,367、5,789,215及5,643,763，以參考資料併於本文中。

於另一觀點中，本發明提供製造人化抗-c-Met抗體之方法。於一些具體實施例中，如下述允許抗體製造的條件下以c-Met抗原免疫非人動物。自動物分離產生抗體的細胞，與骨髓瘤融合而產生融合瘤，並將編碼研究的抗-c-Met抗體重及輕鏈之核酸分離。隨後將此等核酸利用熟悉本技藝

者已知的技術基因工程及如下所述以降低非人序列之量，即人化抗體以降低人類的免疫反應。

於一些具體實施例中，c-Met抗原為分離的及/或純化的c-Met。於較佳具體實施例中，c-Met抗原為人類c-Met。於一些具體實施例中，c-Met抗原為c-Met的片段。於一些具體實施例中，c-Met片段為c-Met的細胞外區塊。於一些具體實施例中，c-Met片段包含c-Met之至少一個抗原決定部位。於其他具體實施例中，c-Met抗原為表現或過度表現c-Met之細胞或於其表面上的免疫抗原片段。於一些具體實施例中，c-Met抗原為c-Met融合蛋白質。於一些具體實施例中，c-Met為合成的胜肽免疫抗原。

動物之免疫可為技藝中已知的任何方法。見如Harlow及Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990。免疫非人動物如小鼠、大鼠、綿羊、山羊、豬、牛及馬的方法為技藝中已熟知。見如Harlow及Lane, 同前, 及美國專利5,994,619。於較佳具體實施例中，將c-Met抗原與佐劑一起給予以刺激免疫反應。例示佐劑包括完全及不完全弗氏佐劑(Freund's adjuvant)、RIBI(胞壁醯二肽(muramyl dipeptide))或ISCOM(免疫刺激複合物)。此佐劑藉由隔離其於局部堆積可保護多胜肽免於快速分散，或其可含有刺激宿主分泌對巨噬細胞有趨化作用之因子的物質或免疫系統其他成分。較佳的是，若給予多胜肽，免疫計劃表將包含多胜肽之二或多次給予，於數週期間散開。實例I舉例於XENOMOUSETM小鼠中製造抗-c-Met

單株抗體之方法。

製造抗體及產生抗體的細胞株

以c-Met抗原免疫動物後，可由動物得到抗體及/或產生抗體的細胞。於一些具體實施例中，藉由放血或殺死動物可由動物得到含抗-c-Met抗體之血清。可將得自動物之血清直接使用，可將免疫球蛋白部分自血清取得，或可將抗-c-Met抗體由血清純化。

於一些具體實施例中，產生抗體的不朽細胞株係由分離自免疫的動物之細胞製備。免疫後，將動物殺死並將淋巴結及/或脾臟B細胞藉技藝中已知的任何方式不朽化。不朽化細胞方法包括(但不限於)以致癌基因(Oncogene)轉染之、以致癌性病毒感染之及於選擇不朽細胞之條件下培養之、使其接受致癌或突變化合物、與不朽細胞如骨髓瘤細胞融合、及去活化腫瘤抑制基因。見如Harlow及Lane,同前。若使用與骨髓瘤細胞融合，骨髓瘤細胞較佳不分泌免疫球蛋白多胜肽(非分泌的細胞株)。利用c-Met、其部分或表現c-Met的細胞篩選不朽細胞。於較佳具體實施例中，利用酵素連結免疫吸附分析(ELISA, enzyme-linked immunoassay)或放射免疫分析(Radioimmunoassay)實施起始的篩選。ELISA篩選之實例係提供於世界專利WO 00/37504中，以參考資料併於本文中。

將產生抗-c-Met抗體的不朽細胞(如融合瘤)選擇、複製及進一步篩選理想特性，包括健全的生長、高抗體產量及理想抗體特性，如下進一步說明。可將融合瘤增長於同系

(syngeneic)動物中活體內、於缺乏免疫系統的動物中，如裸鼠中，或於試管內細胞培養中。選擇、複製及增長融合瘤的方法對普通熟悉本技藝者為已熟知。

於較佳具體實施例中，免疫動物為表現人類免疫球蛋白基因的非人動物及將脾臟B細胞融合至作為非人動物之相同物種的骨髓瘤細胞株。於更佳具體實施例中，免疫動物為XENOMOUSETM小鼠及骨髓瘤細胞株為非分泌的小鼠骨髓瘤。於再更具體實施例中，骨髓瘤細胞株為P3-X63-Ag8.653(American Type Culture Collection)。見如實例I。

因此，於一個具體實施例中，本發明提供方法來製造產生針對c-Met之人類單株抗體或其片段之細胞株，包含有(a)以c-Met、c-Met的一部份或表現c-Met的細胞或組織免疫如本文中所述之非人基因轉殖動物；(b)允許基因轉殖動物發動對c-Met之免疫反應；(c)自基因轉殖動物分離製造抗體的細胞；(d)不朽化製造抗體的細胞；(e)建立不朽製造抗體的細胞之個別單株群組；及(f)篩選不朽製造抗體的細胞以確認針對c-Met之抗體。

於另一觀點中，本發明提供製造人類抗-c-Met抗體之融合瘤。於較佳具體實施例中，融合瘤為小鼠融合瘤，如上述。於其他具體實施例中，將融合瘤產生於非人非小鼠物種如大鼠、綿羊、豬、山羊、牛或馬。於另一具體實施例中，融合瘤為人類融合瘤

於本發明的一個具體實施例中，將製造抗體的細胞分離

及表現於宿主細胞中，例如骨髓瘤細胞。於另一較佳具體實施例中，將基因轉殖動物以c-Met免疫，將原始細胞如脾臟或週邊血液細胞自免疫的基因轉殖動物分離及將產生專一於理想抗原的抗體之個別細胞確認。將來自各獨立細胞的多聚腺苷酸化mRNA分離並利用煉合到可變區域序列之正股引子(sense primer)，如辨認大部分或所有人類重及輕鏈可變區域基因的FR1區域之兼併引子(degenerate primer)及煉合到固定或絞鏈區(joining region)序列之反義引子(antisense primer)進行反轉錄聚合酶鏈反應(RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction)。而後將重及輕鏈可變區塊的cDNA複製及表現於任何適當的宿主細胞，如骨髓瘤細胞，作為具有個別免疫球蛋白固定區域的嵌合抗體，如重鏈及 κ 或 λ 固定區塊。見Babcock, J.S.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48, 1996，以參考資料併於本文中。而後如本文中所述可將抗-c-Met抗體確認及分離。

於另一具體實施例中，可使用噬菌體展示(Phage Display)技術來提供含有具有對c-Met不同親和力之抗體全體資料庫。為了製造此全體，不需要不朽化來自免疫動物的B細胞。而是可直接使用原始B細胞作為DNA的來源。使用得自B細胞的cDNA混合物(如衍生自脾臟)來製備表現資料庫，例如轉染進入大腸桿菌的噬菌體展示資料庫。測試形成的細胞對c-Met之免疫反應性。由此資料庫確認高親和力人類抗體的技術係由Griffiths等人，EMBO J., 13:3245-

3260(1994); Nissim等人，出處同上，692-698頁及由Griffiths等人，出處同上，12:725-734說明，將其以參考資料併於本文中。最後，將來自資料庫的群落確認，其產生對抗原一理想強度之結合親和力，並將編碼負責此結合之產物的DNA回收及運用於標準重組表現。利用先前運用的核苷酸序列也可將噬菌體展示資料庫建立及以類似的方式篩選。一般而言，編碼重及輕鏈的cDNA為獨立地提供或連接以形成用以製造噬菌體資料庫中的Fv類似物。

而後將噬菌體資料庫篩選具有對c-Met最高親和力的抗體及自適當的群落回收基因遺傳物質。進一步篩選循環可增加分離的原始抗體之親和力。

核酸、載體、宿主細胞、及製造抗體之重組方法

核酸

本發明也包含編碼抗-c-Met抗體之核酸分子。於一些具體實施例中，不同核酸分子編碼抗-c-Met免疫球蛋白之重鏈及輕鏈。於其他具體實施例中，相同核酸分子編碼抗-c-Met免疫球蛋白之重鏈及輕鏈。於一個具體實施例中，核酸編碼本發明之c-Met抗體。

於一些具體實施例中，編碼輕鏈的可變區塊(V_L)之核酸分子包含有人類L5V κ 1或A27V κ 3基因，及J κ 1、J κ 2、J κ 3、或J κ 4基因。

於一些具體實施例中，編碼輕鏈的核酸分子編碼包含自生殖系胺基酸序列之1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10個取代之胺基酸序列。於一些具體實施例中，核酸分子包

含一核苷酸序列，其編碼相較於生殖系 V_L 及 $J\kappa$ 序列包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 個保留性胺基酸取代及 / 或 1、2、或 3 個非保留性取代之 V_L 胺基酸序列。取代可於 CDR 區域、骨架區域、或於固定區塊中。

於一些具體實施例中，編碼 V_L 胺基酸序列的核酸分子包含相較於生殖系序列之一或多個變體，其相同於發現於抗體 13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3 或 13.3.2L-A91T 其中之一的 V_L 中之變體。

於一些具體實施例中，核酸分子編碼相較於發現於抗體 13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3 或 13.3.2L-A91T 其中之一的 V_L 中之生殖系序列至少三個胺基酸取代。

於一些具體實施例中，核酸分子包含一核苷酸序列，其編碼單株抗體 13.3.2 之 V_L 胺基酸序列 (SEQ ID NO:4，其中 X_8 為丙胺酸)；抗體 13.3.2L-A91T 之 V_L 胺基酸序列 (SEQ ID NO:4，其中 X_8 為羥丁胺酸)；抗體 9.1.2 之 V_L 胺基酸序列 (SEQ ID NO:8)；抗體 8.70.2 之 V_L 胺基酸序列 (SEQ ID NO:12)；或抗體 8.90.3 之 V_L 胺基酸序列 (SEQ ID NO: 16)，或其變體或部分。於一些具體實施例中，核酸編碼一胺基酸序列，包含有該上列抗體其中一者之輕鏈 CDR。於一些具體實施例中，該部分為包含有 CDR1-CDR3 之連續部分。

於一些具體實施例中，核酸分子包含一核苷酸序列，其編碼 SEQ ID NO:4 [13.3.2 (SEQ ID NO:4，其中 X_8 為丙胺酸)；13.3.2L-A91T (SEQ ID NO:4，其中 X_8 為羥丁胺酸)]、8、12、或 16 其中之一個胺基酸序列，或缺乏訊號序列之該序

列。於一些較佳具體實施例中，核酸分子包含SEQ ID NO:3[13.3.2(SEQ ID NO:3，其中X₇為鳥嘌呤)；13.3.2L-A91T(SEQ ID NO:3，其中X₇為腺嘌呤)]、7、11、或15之核苷酸序列，或其部分，該序列視情況缺少訊號序列。

於一些具體實施例中，核酸分子編碼該抗體輕鏈CDR之胺基酸序列。於一些具體實施例中，該部分編碼來自抗-c-Met抗體輕鏈之CDR1-CDR3的連續區域。

於一些具體實施例中，核酸分子編碼一V_L胺基酸序列，其為至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%一致於示於圖3A-3D中的V_L胺基酸序列或一致於抗體13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3或13.3.2L-A91T之任何一個V_L區域的V_L胺基酸序列，或SEQ ID NO:4 [13.3.2(SEQ ID NO:4，其中X₈為丙胺酸)；13.3.2L-A91T(SEQ ID NO:4，其中X₈為羥丁胺酸)]、8、12、或16 其中之任一個V_L區域的胺基酸序列。本發明之核酸分子包括於高度嚴謹條件(如上述者)下雜交至編碼SEQ ID NO: 4[13.3.2(SEQ ID NO:4，其中X₈為丙胺酸)；13.3.2L-A91T(SEQ ID NO:4，其中X₈為羥丁胺酸)]、8、12、或16 之V_L區域的核酸分子之胺基酸序列的核酸序列，或具有編碼SEQ ID NO:3[13.3.2(SEQ ID NO:3，其中X₇為鳥嘌呤)；13.3.2L-A91T(SEQ ID NO:3，其中X₇為腺嘌呤)]、7、11、或15之V_L區域的核酸分子之核酸序列。

於另一具體實施例中，核酸編碼選自13.3.2；9.1.2；

8.70.2；8.90.3或13.3.2L-A91T之抗體的全長輕鏈，或包含有SEQ ID NO:4[13.3.2(SEQ ID NO:4，其中X₈為丙胺酸)；13.3.2L-A91T(SEQ ID NO:4，其中X₈為羥丁胺酸)]、8、12、或16之胺基酸序列的輕鏈，或包含一突變之輕鏈，如揭示於本文者。再者，核酸可包含SEQ ID NO:3[13.3.2(SEQ ID NO:3，其中X₇為鳥嘌呤)；13.3.2L-A91T(SEQ ID NO:3，其中X₇為腺嘌呤)]、7、11、或15之核苷酸序列，或編碼包含一突變之輕鏈的核酸分子，如揭示於本文者。

於另一較佳具體實施例中，核酸分子編碼重鏈之可變區塊(V_H)，其包含人類1-18、4-31、4-39或3-48 V_H基因序列或自其衍生的序列。於許多具體實施例中，核酸分子包含人類1-18 V_H基因、D2-15基因及人類J_H4b基因；人類4-31 V_H基因、人類D2-2及D7-27基因及J_H6b基因；人類4-31 V_H基因、人類D2-2基因及人類J_H6b基因；人類4-31 V_H基因、人類D7-27基因及人類J_H6b基因；人類4-39 V_H基因、人類D2-2基因及人類J_H4b基因；人類3-48 V_H基因、人類D4-17基因及人類J_H4b基因，或衍生自人類基因之序列。

於一些具體實施例中，核酸分子編碼相較於人類V、D或J基因之生殖系胺基酸序列包含有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18個突變之胺基酸序列。於一些具體實施例中，該突變位於V_H區域中。於一些具體實施例中，該突變位於CDR區域中。

於一些具體實施例中，核酸分子編碼相較於生殖系序列與發現於單株抗體13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3；13.3.2H

-A14P ; 13.3.2H-E42K ; 13.3.2H-S97T ; 13.3.2H-A14P,E42K ; 13.3.2H-E42K,S97T 或 13.3.2H-A14P,E42K,S97T 之 V_H 中胺基酸突變相同的一或多個胺基酸突變。於一些具體實施例中，核酸分子編碼相較於生殖系序列與發現於上列單株抗體其中一者中至少三個胺基酸突變相同的至少三個胺基酸突變。

於一些具體實施例中，核酸分子包含一核苷酸序列，其編碼選自單株抗體 13.3.2 之 V_H 胺基酸序列 (SEQ ID NO:2，其中 X_2 為麩胺酸、 X_4 為絲胺酸)；13.3.2H-E42K 之 V_H 胺基酸序列 (SEQ ID NO:2，其中 X_2 為離胺酸、 X_4 為絲胺酸)；13.3.2H-E42K, S97T 之 V_H 胺基酸序列 (SEQ ID NO:2，其中 X_2 為離胺酸、 X_4 為羥丁胺酸)；9.1.2 之 V_H 胺基酸序列 (SEQ ID NO:6)；8.70.2 之 V_H 胺基酸序列 (SEQ ID NO:10) 或 8.90.3 之 V_H 胺基酸序列 (SEQ ID NO:14) 之至少一部份，或其變體，或具有保留性胺基酸突變及/或總共三個或更少非保留性胺基酸取代之該序列。於許多具體實施例中，序列編碼一或多個 CDR 區域，較佳為 CDR3 區域、所有三個 CDR 區域、包括 CDR1-CDR3 之連續部分、或整個 V_H 區域 (有或無訊號序列皆可)。

於一些具體實施例中，核酸分子包含一核苷酸序列，其編碼 SEQ ID NO:2、6、10、或 14 其中之一個胺基酸序列，或缺少訊號序列之該序列。於一些較佳具體實施例中，核酸分子包含 SEQ ID NO:1 [13.3.2 (SEQ ID NO:1，其中 X_1 為鳥嘌呤， X_3 為羥丁胺酸及 X_5 為鳥嘌呤)；13.3.2 H-E42K (SEQ ID

NO:1，其中X₁為腺嘌呤，X₃為羥丁胺酸及X₅為鳥嘌呤)；
13.3.2H-E42K,S97T(SEQ ID NO:1，其中X₁為腺嘌呤，X₃為
腺嘌呤及X₅為鳥嘌呤)；13.3.2H-A14P(SEQ ID NO:1，其中
X₁為鳥嘌呤，X₃為羥丁胺酸及X₅為胞嘧啶)；
13.3.2H-A14P,E42K(SEQ ID NO:1，其中X₁為腺嘌呤，X₃為
羥丁胺酸及X₅為胞嘧啶)；13.3.2H-A14P,E42K,S97T(SEQ ID
NO:1，其中X₁為腺嘌呤，X₃為腺嘌呤及X₅為胞嘧啶)]、5、
9、或13之核苷酸序列至少一部份，或缺少訊號序列之該序
列。於一些具體實施例中，該部分編碼V_H區域(有或無訊號
序列)、CDR3區域、所有三個CDR區域、或包括CDR1-CDR3
之連續區域。

於一些具體實施例中，核酸分子編碼一V_H胺基酸序列，
其為至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%
或99%一致於示於圖3E-3H中的V_H胺基酸序列或一致於
SEQ ID NO:2 [13.3.2(SEQ ID NO:2，其中X₂為麩胺酸及X₄
為絲胺酸)；13.3.2H-E42K(SEQ ID NO:2，其中X₂為離胺酸
及X₄為絲胺酸)；13.3.2H-E42K,S97T(SEQ ID NO:2，其中
X₂為離胺酸及X₄為羥丁胺酸)、6、10、或14 其中之任一個
V_H胺基酸序列。本發明之核酸分子包括於高度嚴謹條件(如
上述者)下雜交至編碼SEQ ID NO: 2 [13.3.2(SEQ ID
NO:2，其中X₂為麩胺酸、X₄為絲胺酸及X₆為丙胺酸)；
13.3.2H-E42K(SEQ ID NO:2，其中X₂為離胺酸、X₄為絲胺
酸及X₆為丙胺酸)；13.3.2H-E42K, S97T(SEQ ID NO:2，其
中X₂為離胺酸、X₄為羥丁胺酸及X₆為丙胺酸)；

13.3.2H-A14P(SEQ ID NO:2, 其中X₂為麩胺酸、X₄為絲胺酸及X₆為脯胺酸); 13.3.2H-A14P, E42K(SEQ ID NO:2, 其中X₂為離胺酸、X₄為絲胺酸及X₆為脯胺酸); 13.3.2H-A14P,E42K,S97T(SEQ ID NO:2, 其中X₂為離胺酸、X₄為羥丁胺酸及X₆為脯胺酸)]、6、10、或14之胺基酸序列的核酸序列, 或至其V_H區域, 或具有SEQ ID NO:1[13.3.2(SEQ ID NO:1, 其中X₁為鳥嘌呤, X₃為羥丁胺酸及X₅為鳥嘌呤); 13.3.2 H-E42K(SEQ ID NO:1, 其中X₁為腺嘌呤, X₃為羥丁胺酸及X₅為鳥嘌呤); 13.3.2H-E42K,S97T(SEQ ID NO:1, 其中X₁為腺嘌呤, X₃為腺嘌呤及X₅為鳥嘌呤); 13.3.2H-A14P(SEQ ID NO:1, 其中X₁為鳥嘌呤, X₃為羥丁胺酸及X₅為胞嘧啶); 13.3.2H-A14P,E42K(SEQ ID NO:1, 其中X₁為腺嘌呤, X₃為羥丁胺酸及X₅為胞嘧啶); 13.3.2H-A14P,E42K,S97T(SEQ ID NO:1, 其中X₁為腺嘌呤, X₃為腺嘌呤及X₅為胞嘧啶)]、5、9、或13之核苷酸序列或編碼其V_H區域者。

於另一具體實施例中, 核酸分子編碼選自13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3; 13.3.2H-A14P; 13.3.2H-E42K; 13.3.2H-S97T; 13.3.2H-A14P,E42K; 13.3.2H-E42K,S97T或13.3.2H-A14P,E42K,S97T之抗體的全長重鏈, 或具有SEQ ID NO: 2 [13.3.2(SEQ ID NO:2, 其中X₂為麩胺酸、X₄為絲胺酸及X₆為丙胺酸); 13.3.2H-E42K(SEQ ID NO:2, 其中X₂為離胺酸、X₄為絲胺酸及X₆為丙胺酸); 13.3.2H-E42K,S97T(SEQ ID NO:2, 其中X₂為離胺酸、X₄為羥丁胺酸及X₆為丙胺酸)];

13.3.2H-A14P(SEQ ID NO:2, 其中X₂為麩胺酸、X₄為絲胺酸及X₆為脯胺酸); 13.3.2H-A14P,E42K(SEQ ID NO:2, 其中X₂為離胺酸、X₄為絲胺酸及X₆為脯胺酸); 13.3.2H-A14P,E42K,S97T(SEQ ID NO:2, 其中X₂為離胺酸、X₄為羥丁胺酸及X₆為脯胺酸)]、6、10、或14之胺基酸序列的重鏈(有或無訊號序列), 或包含突變之重鏈, 如本文中說明的其中一個變體。再者, 核酸可包含SEQ ID NO:1[13.3.2(SEQ ID NO:1, 其中X₁為鳥嘌呤, X₃為羥丁胺酸及X₅為鳥嘌呤); 13.3.2 H-E42K(SEQ ID NO:1, 其中X₁為腺嘌呤, X₃為羥丁胺酸及X₅為鳥嘌呤); 13.3.2H-E42K,S97T(SEQ ID NO:1, 其中X₁為腺嘌呤, X₃為腺嘌呤及X₅為鳥嘌呤); 13.3.2H-A14P(SEQ ID NO:1, 其中X₁為鳥嘌呤, X₃為羥丁胺酸及X₅為胞嘧啶); 13.3.2H-A14P,E42K(SEQ ID NO:1, 其中X₁為腺嘌呤, X₃為羥丁胺酸及X₅為胞嘧啶); 13.3.2H-A14P,E42K,S97T(SEQ ID NO:1, 其中X₁為腺嘌呤, X₃為腺嘌呤及X₅為胞嘧啶)]、5、9、或13之核苷酸序列(有或無訊號序列), 或編碼包含突變之重鏈的核酸分子, 如本文中說明的其中一個變體。

可自產生此抗體之任何來源分離出編碼抗-c-Met抗體之重或輕鏈或其部分的核酸分子。於許多具體實施例中, 自以c-Met免疫的動物分離的B細胞或自衍生自此表現抗-c-Met抗體的B細胞之不朽細胞將核酸分子分離出來。分離編碼抗體之mRNA的方法為技藝中已熟知。見如 Sambrook 等人。可使用 mRNA 來製造用於聚合酶鏈反應 (PCR,

polymerase chain reaction)或cDNA選殖抗體基因之cDNA。於較佳具體實施例中，將核酸分子分離自融合瘤，其具有如同其融合配對其中之一為來自非人基因轉殖動物的人類免疫球蛋白製造細胞。於再更佳的具體實施例中，人類免疫球蛋白製造細胞係分離自XENOMOUSETM動物。於另一個具體實施例中，人類免疫球蛋白製造細胞係來自非人非鼠基因轉殖動物，如上述。於另一個具體實施例中，核酸分子係分離自非人非基因轉殖動物。可使用分離自非人非基因轉殖動物的核酸分子，如作為人化抗體。

於一些具體實施例中，編碼本發明抗-c-Met抗體重鏈的核酸可包含編碼本發明V_H區塊之核苷酸序列於同一個讀框中連接至編碼來自任何來源之重鏈固定區塊的核苷酸序列。類似地，編碼本發明抗-c-Met抗體輕鏈的核酸可包含編碼本發明V_L區塊之核苷酸序列於同一個讀框中連接至編碼來自任何來源之輕鏈固定區塊的核苷酸序列。

於本發明的另一觀點中，將編碼重鏈的可變區塊(V_H)及/或輕鏈的可變區塊(V_L)之核酸分子"轉變"成全長抗體基因。於一個具體實施例中，藉由分別插入早已編碼重鏈固定(C_H)或輕鏈固定(C_L)區塊之表現載體，使得於載體內將V_H段落操作地連結至C_H段落，且/或V_L段落於載體內操作地連結至C_L段落，而將編碼V_H或V_L區塊之核酸分子轉變成全長抗體基因。於另一個具體實施例中，藉由利用標準分子生物學技術連結(如黏接)編碼V_H或V_L區塊的核酸分子至編碼C_H及/或C_L區塊，將編碼V_H及/或V_L區塊之核酸分子轉變

成全長抗體基因。人類重及輕鏈免疫球蛋白固定區塊基因的核酸序列為技藝上已知。見如Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版，NIH Publ. No. 91-3242, 1991。而後可將編碼全長重及輕鏈之核酸分子表現自將其導入的細胞及將抗-c-Met抗體分離。

可使用核酸分子來重組表現大量抗-c-Met抗體。也可使用核酸分子來製造嵌合抗體、雙專一性抗體、單鏈抗體、免疫黏著素、微型雙功能抗體(diabody)、突變抗體及抗體衍生物，如下進一步說明。若核酸分子衍生自非人非基因轉殖動物，可使用核酸分子作為抗體人化，也如下所述。

於另一具體實施例中，使用本發明之核酸分子作為探針或PCR引子作為專一性抗體序列。例如，可使用核酸作為診斷方法中的探針或作為PCR引子以放大可使用的DNA區域，由其以分離編碼抗-c-Met抗體可變區塊的其他核酸分子。於一些具體實施例中，寡核苷酸係來自研究的抗體之重及輕鏈的高度可變區塊。於一些具體實施例中，寡核苷酸編碼所有或部分抗體13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3或其如本文中所述之變體之一或多個CDR。

載體

本發明提供載體，其包含有編碼本發明抗-c-Met抗體之重鏈或其抗原結合部分之核酸分子。本發明亦提供載體，其包含有編碼本發明抗-c-Met抗體之輕鏈或其抗原結合部分之核酸分子。本發明更提供載體，其包含有編碼融合蛋白質、修飾的抗體、抗體片段、及其探針之核酸分子。

於一些具體實施例中，藉由將DNA編碼部分或全長輕及重鏈(如上述取得)插入表現載體使得基因被操作地連結至必須的表現控制序列如轉錄及轉譯控制序列，而表現本發明抗-c-Met抗體或抗原結合部分。表現載體包括質體、反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒(AAV, adeno-associated viruses)、植物病毒如花椰菜嵌紋病毒(Cauliflower Mosaic Virus)、菸草嵌紋病毒(tobacco mosaic virus)、黏接質體(cosmid)、YAC、EBV衍生的游離基因(episomes)等。將抗體基因黏接至載體使得於載體內的轉錄及轉譯控制序列擔任其預定的功能調節抗體基因的轉錄及轉譯。選擇表現載體和表現控制序列能與使用的表現宿主細胞相容。可將抗體輕鏈基因及抗體重鏈基因插入分開的載體。於較佳具體實施例中，將兩者基因插入相同表現載體中。藉由標準方法(如連接抗體基因片段及載體上互補的限制位置，或若無限制位置存在用鈍端連接)將抗體基因插入表現載體。

習見載體為編碼功能上完整的人類 C_H 或 C_L 免疫球蛋白序列及適當基因工程的限制位置以使可輕易地將 V_H 或 V_L 序列插入及表現，如上述。於此載體中，剪接(splicing)通常發生於插入的J區域中的剪接提供點及人類C區塊前的剪接接受點之間，及於發生在人類 C_H 外顯子(exon)內之剪接區域。多聚腺苷酸化及轉錄終止發生於編碼區域的天然染色體位置下游。重組表現載體也可編碼促進抗體鏈自宿主細胞分泌的訊號胜肽。可將抗體鏈基因選殖進入載體使得將訊號胜肽讀框連接至免疫球蛋白鏈的胺基端。訊號胜肽可

為免疫球蛋白訊號胜肽或異源訊號胜肽(即來自非免疫球蛋白之蛋白質的訊號胜肽)。

除了抗體鏈基因，本發明之重組表現載體攜帶控制抗體鏈基因於宿主細胞中表現的調控序列。熟悉本技藝者將知表現載體的設計，包括調控序列之選擇可視幾個因素如受轉化之宿主細胞的選擇、理想蛋白質之表現量等而定。哺乳類宿主細胞較佳的調控序列包括指引高量蛋白質表現於哺乳類細胞中的病毒元件，如衍生自反轉錄LTR的啟動子及/或增強子、巨細胞病毒(CMV, Cytomegalovirus)(如CMV啟動子/增強子)、類人猿病毒第40型(SV40, Simian virus 40)(如SV40啟動子/增強子)、腺病毒(如腺病毒主要晚期啟動子(adMLP, adenovirus major late promoter))、多瘤病毒及強哺乳類啟動子如天然免疫球蛋白及肌動蛋白啟動子。對於病毒調控元件之進一步說明，及其序列，見如美國專利編號5,168,062、美國專利編號4,510,245及美國專利編號4,968,615。表現抗體於植物的方法，包括啟動子及載體之說明，以及植物之轉化為技藝中已知。見如美國專利編號6,517,529，以參考資料併於本文中。表現多胜肽於細菌細胞或真菌細胞(如酵母菌細胞)中之方法也為技藝中已熟知。

除了抗體鏈基因及調控序列，本發明的重組表現載體可攜帶其他的序列，如調控載體於宿主細胞中的複製(如複製起始點)及可選擇的標記基因。可選擇的標記基因幫助選擇已將載體導入於其中的宿主細胞(見如美國專利編號4,399,216、4,634,665及5,179,017，以參考資料併於本文

中)。例如，典型可選擇的標記基因賦予已將載體導入於其中的宿主細胞對藥物的耐受力，如 G418、效高黴素 (Hygromycin) 或甲氨蝶呤 (Methotrexate)。較佳可選擇的標記基因包括葉酸二氫還原酶 (DHFR, dihydrofolate reductase) 基因 (用於具有甲氨蝶呤選擇/放大的 dhfr-宿主細胞)、neo 基因 (作為 G418 選擇)，及麩胺酸合成酶基因。

非融合瘤宿主細胞及重組製造蛋白質的方法

可使用編碼抗 -c-Met 抗體的核酸分子及包含此等核酸分子的載體於轉染適當哺乳類、植物、細菌或酵母菌宿主細胞。轉化可為藉任何已知方法導入多核苷酸進入宿主細胞。導入異源多核苷酸進入哺乳類細胞的方法為記憶中已熟知，包括葡聚糖介導轉染 (dextran-mediated transfection)、磷酸鈣沉澱、凝聚胺 (Polybrene) 介導轉染、原生質體融合、電穿孔、將多核苷酸裝入微脂粒、及直接顯微注射 DNA 進入細胞核。此外，藉病毒載體可將核酸分子導入哺乳類細胞。轉化細胞的方法為技藝中已熟知。見如美國專利編號 4,399,216、4,912,040、4,740,461、及 4,959,455，以參考資料併於本文中。轉化植物細胞的方法為技藝中已熟知，包括如農桿菌 (agrobacterium) 介導轉、基因槍法 (Biolistic) 轉化、直接注入、電穿孔及病毒轉化。轉化細菌及酵母菌細胞的方法也為技藝上已熟知。

可作為表現宿主的哺乳類細胞株為技藝中已熟知，包括可購自美國菌種保藏中心 (ATCC, American Type Culture Collection) 之許多不朽細胞株。此等尤其包括中國倉鼠卵巢

(CHO, Chinese hamster ovary)細胞、NSO細胞、SP2細胞、HEK-293T細胞、NIH-3T3細胞、HeLa細胞、幼倉鼠腎(BHK, baby hamster kidney)細胞、非洲綠猴腎細胞(COS)、人類肝細胞癌細胞(如Hep G2)、A549細胞、及許多其他細胞株。經由決定何者細胞株具有高表現量選擇特定較佳的細胞株。其他可使用的細胞株為昆蟲細胞株，如Sf9或Sf21細胞。當將編碼抗體之重組表現載體導入哺乳類宿主細胞時，藉培養宿主細胞一段足以允許抗體於宿主細胞表現的時間，將抗體製造，或更佳的是分泌抗體進入宿主細胞生長的培養基內。利用標準蛋白質純化方法可將抗體自培養基回收。植物宿主細胞包括如煙草、阿拉伯芥(Arabidopsis)、浮萍、玉米、小麥、馬鈴薯等。細菌宿主細胞包括大腸桿菌及鏈黴菌。酵母菌宿主細胞包括裂殖酵母菌(Schizosaccharomyces pombe)、出芽酵母菌(Saccharomyces cerevisiae)及酵母菌(Pichia pastoris)。

再者，利用許多已知技術可將本發明的抗體自製造細胞株之表現增加。例如，麩胺酸合成酶基因表現系統(GS系統)為於某些條件下增強表現的常見方式。將GS系統全部說明或部分關聯於歐洲專利編號0 216 846、0 256 055、0 323 997及0 338 841。

可能由不同細胞株或於基因轉殖動物中表現的載體將具有彼此不同的醣化作用。然而，由本文提供的核酸分子編碼之所有抗體，或包含本文提供的胺基酸序列為本發明之部分，無論抗體之醣化作用。

基因轉殖動物及植物

經由產生對研究的免疫球蛋白重及輕鏈序列基因轉殖之哺乳類或植物及由之製造可回收形式的抗體，可基因轉殖地製造本發明之抗-c-Met抗體。關於在哺乳類中之基因轉殖製造，可將抗-c-Met抗體製造於(及回收自)羊、牛、或其他哺乳類的乳汁。見如美國專利編號5,827,690、5,756,687、5,750,172、及5,741,957，以參考資料併於本文中。於一些具體實施例中，將包含有人類免疫球蛋白基因座之非人基因轉殖動物以c-Met或其免疫抗原部分免疫，如上述。於植物中製造抗體之方法係說明於如美國專利6,046,037及5,959,177，以參考資料併於本文中。

於一些具體實施例中，藉由標準基因轉殖技術導入編碼本發明抗-c-Met抗體之一或多個核酸分子進入動物或植物產生非人基因轉殖動物或植物。見Hogan及美國專利6,417,429，同前。用於製造基因轉殖動物之基因轉殖細胞可為胚胎幹細胞或體細胞或受精卵。基因轉殖非人生物體可為嵌合、非嵌合雜合子、及非嵌合同合子。見如Hogan等人，*Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* 第2版，Cold Spring Harbor Press(1999); Jackson等人，*Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach*, Oxford University Press(2000); 及 Pinkert, *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press (1999)，所有皆以參考資料併於本文中。於一些具體實施例中，基因轉殖非人動物受編碼研究的重鏈及/或輕鏈之目標

構體目標分裂及取代。於較佳具體實施例中，基因轉殖動物包含及表現專一結合至c-Met(較佳為人類c-Met)之重及輕鏈的核酸分子。於一些具體實施例中，基因轉殖動物包含編碼修飾的抗體如單鏈抗體、嵌合抗體或人化抗體之核酸分子。可將抗-c-Met抗體製造於任何基因轉殖動物中。於較佳具體實施例中，非人動物為小鼠、大鼠、綿羊、豬、山羊、牛或馬。非人基因轉殖動物表現該編碼的多胜肽於血液、乳汁、脈、唾液、眼淚、黏液及其他體液中。

噬菌體展示資料庫

本發明提供一種製造抗-c-Met抗體或其抗原結合部分之方法，包含步驟有於噬菌體上合成人類抗體資料庫，以c-Met或其部分篩選資料庫，分離結合c-Met的噬菌體，及由噬菌體得到抗體。藉由實例，用於噬菌體展示技術中的抗體資料庫的一個製備方法包含步驟有以c-Met或其抗原部分免疫包含有人類免疫球蛋白基因座的非人動物以產生免疫反應，自免疫的動物取出抗體製造細胞；自取出的細胞分離編碼本發明抗體重及輕鏈的RNA，反轉錄RNA以產生cDNA，利用引子放大cDNA，及將cDNA插入噬菌體展示載體使得抗體被表現於噬菌體上。可將本發明之重組抗-c-Met抗體以此方式得到。

藉由篩選重組組合抗體資料庫可將本發明之重組抗-c-Met人類抗體分離。較佳的是，資料庫為scFv噬菌體展示資料庫，利用由B細胞分離的mRNA製備的人類V_L及V_HcDNA產生。製備及篩選此資料庫的方法為技藝中已知。產

生噬菌體展示資料庫之套組為市面上可購得(如 Pharmacia Recombinant Phage Antibody System，型錄編號 27-9400-01；及 Stratagene SurfZAPTM噬菌體展示套組，型錄編號 240612)。有其他方法及試劑可用於產生及篩選抗體展示資料庫(見如美國專利編號 5,223,409；世界專利編號 WO 92/18619、WO 91/17271、WO 92/20791、WO 92/15679、WO 93/01288、WO 92/01047、WO 92/09690；Fuchs 等人，*Bio/Technology* 9:1370-1372(1991)；Hay 等人，*Hum, Antibod. Hybridomas* 3:81-85(1992)；Huse 等人，*Science* 246:1275-1281(1989)；McCafferty 等人，*Nature* 348:552-554(1990)；Griffiths 等人，*EMBO J.* 12:725-734(1993)；Hawkins 等人，*J. Mol. Biol.* 226:889-896(1992)；Clackson 等人，*Nature* 352:624-628(1991)；Gram 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580(1992)；Garrad 等人，*Bio/Technology* 9:1373-1377(1991)；Hoogenboom 等人，*Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137(1991)；及 Barbas 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982(1991)，所有皆以參考資料併於本文中)。

於一個具體實施例中，為了分離及製造具有理想特性之人類抗-c-Met 抗體，利用說明於世界專利編號 WO 93/06213 中之抗原決定部位印記法，首先將如本文中所述的人類抗-c-Met 抗體用來選擇對 c-Met 具有類似結合活性之人類重及輕鏈序列，將其以參考資料併於本文中。使用於此發中的抗體資料庫較佳為 scFv 資料庫，如世界專利編號 WO

92/01047、McCafferty等人，*Nature* 348:552-554(1990);及 Griffiths等人，*EMBO J.* 12:725-734(1993)中所述製備及篩選，所有皆以參考資料併於本文中。ScFv抗體資料庫較佳利用人類c-Met作為抗原篩選。

一旦選擇起始人類V_L及V_H區塊，實施"混合及配對"實驗，其中將起始選擇的V_L及V_H段落之不同配對針對c-Met結合篩選以選出較佳的V_L/V_H配對組合。此外，為了進一步改善抗體的品質，可將較佳V_L/V_H配對的V_L及V_H段落隨機突變，較佳於V_L及/或V_H的CDR3區域，類似於自然免疫反應期間負責抗體親合力成熟之活體內體突變過程的過程。此試管內親合力成熟可由利用分別互補於V_H CDR3或V_L CDR3的PCR引子放大V_H及V_L區塊而達成，此引子已於某些位置"加入(spiked)"四個核苷酸鹼基之隨機混合物使得形成的PCR產物編碼V_H及V_L段落其中已將隨機突變導入V_L及/或V_H的CDR3區域中。可將此等隨機突變的V_H及V_L段落對c-Met結合重新篩選。

自重組免疫球蛋白展示資料庫篩選及分離本發明抗-c-Met抗體後，可將編碼選定抗體之核酸自展示組合(如自噬菌體基因組)回收及藉標準重組DNA技術次選殖進入其他表現載體。視需要，可進一步將核酸操作以產生本發明之其他抗體形式，如下說明。為了表現藉篩選組合資料庫分離的重組人類抗體，將編碼抗體的DNA選殖進入重組表現載體及導入哺乳類宿主細胞，如上述。

種類轉換

本發明之另一觀點提供轉變抗-c-Met抗體之種類或亞型成為另一種類或亞型之方法。於一些具體實施例中，將不包括編碼 C_L 或 C_H 之編碼 V_L 或 V_H 的核酸分子利用技藝中已熟知的方法分離。而後將核酸分子操作地連結至編碼 C_L 或 C_H 之核酸序列形成理想免疫球蛋白種類或亞型。利用包含有 C_L 或 C_H 鏈之載體或核酸分子可將此達成，如上述。例如，可將原先為IgM的抗-c-Met抗體種類轉換至IgG。再者，可使用種類轉換來轉變一個IgG亞型至另一個，如自IgG1至IgG2。製造包含理想同種型(isotype)之本發明抗體的另一方法包含步驟有分離編碼抗-c-Met抗體重鏈之核酸及編碼抗-c-Met抗體輕鏈之核酸，分離編碼 V_H 區域的序列，接合 V_H 序列至編碼理想同種型之重鏈固定區塊的序列，於細胞中表現輕鏈基因及重鏈構體，及收集具有理想同種型之抗-c-Met抗體。

去免疫抗體

於本發明的另一觀點中，利用說明於如世界專利編號WO 98/52976及WO 00/34317(以參考資料併於本文中)的技術，可將抗體去免疫以降低其免疫原性。

突變的抗體

於另一具體實施例中，可使用核酸分子、載體及宿主細胞來製造突變的抗-c-Met抗體。可將抗體於重及/或輕鏈之可變區塊中突變，如以改變抗體的結合性質。例如，可將突變製造於一或多個CDR區域以增加或降低抗體對c-Met的 K_D 、增加或降低 k_{off} 、或改變抗體的結合專一性。定點突

變法(site-directed mutagenesis) 之技術為技藝中已熟知。見如 Sambrook 等人及 Ausubel 等人，同前文獻。於另一具體實施例中，將一或多個突變製造於已知相較於生殖系於單株抗體 13.3.2 ; 9.1.2 ; 8.70.2 ; 8.90.3 ; 13.3.2H-A14P ; 13.3.2H-E42K ; 13.3.2H-S97T ; 13.3.2H-A14P,E42K ; 13.3.2H-E42K,S97T ; 13.3.2H-A14P,E42K, S97T ; 13.3.2L-A91T ; 13.3.2L-A91T,H-A14P ; 13.3.2L-A91T,H-E42K ; 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K ; 13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T 或 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K,S97T 中改變的胺基酸基團。可將突變製造於可變區塊的 CDR 區域或骨架區域，或於固定區塊。於較佳具體實施例中，將突變製造於可變區塊中。於一些具體實施例中，將一或多個突變製造於已知相較於生殖系於選自 SEQ ID NO: 2 [13.3.2(SEQ ID NO:2，其中 X₂ 為麩胺酸、X₄ 為絲胺酸及 X₆ 為丙胺酸)；13.3.2H-E42K(SEQ ID NO:2，其中 X₂ 為離胺酸、X₄ 為絲胺酸及 X₆ 為丙胺酸)；13.3.2H-E42K, S97T(SEQ ID NO:2，其中 X₂ 為離胺酸、X₄ 為羥丁胺酸及 X₆ 為丙胺酸)；13.3.2H-A14P(SEQ ID NO:2，其中 X₂ 為麩胺酸、X₄ 為絲胺酸及 X₆ 為脯胺酸)；13.3.2H-A14P, E42K(SEQ ID NO:2，其中 X₂ 為離胺酸、X₄ 為絲胺酸及 X₆ 為脯胺酸)；13.3.2H-A14P,E42K,S97T(SEQ ID NO:2，其中 X₂ 為離胺酸、X₄ 為羥丁胺酸及 X₆ 為脯胺酸)]、4 [13.3.2(SEQ ID NO:4，其中 X₈ 為丙胺酸)及 13.3.2L-A91T(SEQ ID NO:4，其中 X₈ 為羥丁胺酸)]、6、8、10、12、14 或 16 之胺基酸序列或整個核酸序列存在於 SEQ ID

NO:1[13.3.2(SEQ ID NO:1, 其中 X_1 為鳥嘌呤, X_3 為羥丁胺酸及 X_5 為鳥嘌呤); 13.3.2 H-E42K(SEQ ID NO:1, 其中 X_1 為腺嘌呤, X_3 為羥丁胺酸及 X_5 為鳥嘌呤); 13.3.2H-E42K,S97T(SEQ ID NO:1, 其中 X_1 為腺嘌呤, X_3 為腺嘌呤及 X_5 為鳥嘌呤); 13.3.2H-A14P(SEQ ID NO:1, 其中 X_1 為鳥嘌呤, X_3 為羥丁胺酸及 X_5 為胞嘧啶); 13.3.2H-A14P,E42K(SEQ ID NO:1, 其中 X_1 為腺嘌呤, X_3 為羥丁胺酸及 X_5 為胞嘧啶); 13.3.2H-A14P,E42K,S97T(SEQ ID NO:1, 其中 X_1 為腺嘌呤, X_3 為腺嘌呤及 X_5 為胞嘧啶)]、3[13.3.2(SEQ ID NO:3, 其中 X_7 為鳥嘌呤); 13.3.2L-A91T(SEQ ID NO:3, 其中 X_7 為腺嘌呤)]、5、7、9、11、13或15的可變區塊之CDR區域或骨架區域中改變的胺基酸基團。

於另一個具體實施例中, 將骨架區域突變以使形成的骨架區域具有相對應於生殖系基因之胺基酸序列。可將突變製造於骨架區域或固定區塊中以增加抗-c-Met抗體的半生期。見如世界專利WO 00/09560, 以參考資料併於本文中。也可將骨架區域或固定區塊中的突變製造以改變抗體的免疫原性, 以提供共價或非共價結合至另一分子的位置, 或改變如補體結合、FcR結合及抗體相關的細胞介導細胞毒性(ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)之性質。根據本發明, 單一抗體可具有突變於可變區塊之任何一或多個CDR或骨架區域或於固定區塊中。

於一些具體實施例中, 相較於突變前的抗-c-Met抗體,

有1至8個(包括於其間任何數字)胺基酸突變於突變的抗-c-Met抗體之 V_H 或 V_L 區塊中。於上述任何一個中,突變可發生於一或多個CDR區域中。再者,任何突變可為保留性胺基酸取代。於一些具體實施例中,有不超過5、4、3、2、或1個胺基酸改變於固定區塊中。

修飾的抗體

於另一個具體實施例中,可製造融合抗體或免疫黏著素,其包含本發明之抗-c-Met抗體所有及一部份連接至另一個多胜肽。於較佳具體實施例中,僅將抗-c-Met抗體的可變區塊連接至多胜肽。於另一較佳具體實施例中,將抗-c-Met抗體的 V_H 區塊連接至第一個多胜肽,同時將抗-c-Met抗體的 V_L 區塊連接至第二個多胜肽,其與第一個多胜肽以使得 V_H 及 V_L 區塊可彼此交互作用而形成抗原結合位置的方式結合。於另一較佳具體實施例中, V_H 區塊與 V_L 區塊相隔一連接子,使得 V_H 及 V_L 區塊可彼此交互作用(見以下單鏈抗體)。而後將 V_H -連接子- V_L 抗體連接至研究的多胜肽。融合抗體有用於指引多胜肽至c-Met表現的細胞或組織。多胜肽可為治療劑,如毒素、生長因子或其他調控蛋白質,或可為診斷劑,如可輕易觀察的酵素,如辣根過氧化物酶。此外,可將融合抗體建立於將二(或多個)單鏈抗體彼此連接。如果吾人想要建立雙價或多價抗體於多胜肽鏈上,或若吾人想要建立雙專一性抗體時,此為有用。

為了建立單鏈抗體(scFv),將 V_H -及 V_L -編碼DNA片段操作地連接至編碼彈性連接子的另一片段,如編碼胺基酸序列

(Gly₄-Ser)₃，使得可將V_H及V_L序列表現為連續單鏈蛋白質，而將V_H及V_L區塊由彈性連接子連接。見如Bird等人，*Science* 242:423-426(1988)；Huston等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883(1988)；McCafferty等人，*Nature* 348:552-554(1990)。單鏈抗體可為單價(若僅使用單一V_H及V_L)、雙價(若使用兩個V_H及V_L)、或多價(若使用超過兩個V_H及V_L)。可產生專一地結合至c-Met及至另一分子的雙專一性或多價抗體。

於另一個具體實施例中，利用編碼核酸分子的抗-c-Met抗體可製備其他修飾的抗體。例如，利用標準分子生物學技術遵循本說明書之教導，可製備" κ 體"(Ill等人，*Protein Eng.* 10:949-57(1997))、"微型體"(Martin等人，*EMBO J.* 13:5303-9(1994))、"微型雙功能抗體"(Holliger等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448(1993))、或"Janusins"(Traunecker等人，*EMBO J.* 10:3655-3659(1991)及Traunecker等人，*Int. J. Cancer(Suppl.)*7: 51-52(1992))。

藉由許多方法包括融合瘤之融合或Fab'片段之連結，可製造雙專一性抗體或抗原結合片段。見如Songsivilai & Lachmann，*Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321(1990)、Kostelny等人，*J. Immunol.* 148:1547-1553(1992)。此外，可將雙專一性抗體形成為"微型雙功能抗體"或"Janusins"。於一些具體實施例中，雙專一性抗體結合至c-Met的兩個不同抗原決定部位。於一些具體實施例中，雙專一性抗體具有來自單株抗體 13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3；13.3.2H-A14P；

13.3.2H-E42K ; 13.3.2H-A14P,E42K ; 13.3.2H-S97T ;
13.3.2H-E42K,S97T ; 13.3.2H-A14P,E42K,S97T; 13.3.2L-
A91T ; 13.3.2L-A91T,H-A14P ; 13.3.2L-A91T,H-E42K ;
13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K ; 13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T
或13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K,S97T之第一個重鏈及第一個
輕鏈及其他的抗體重鏈及輕鏈。於一些具體實施例中，其
他的輕鏈及重鏈也為來自上述單株抗體其中之一，但不同
於第一個重及輕鏈。

於一些具體實施例中，利用來自本文中提供的人類抗
-c-Met單株抗體之一或多個可變區塊或CDR區域可製備上
述修飾的抗體。

衍生化及標記的抗體

可將本發明抗-c-Met抗體或抗原結合部分衍生化或連結
至另一分子(如另一胜肽或蛋白質)。一般而言，將抗體或其
部分衍生化使得c-Met結合不受衍生化或標記的不利影
響。因此，本發明的抗體或抗體部分用來包括本文中所述
人類抗-c-Met抗體之完整及修飾的形式兩者。例如，可將
本發明之抗體或抗體部分功能上連接(藉化學耦合、基因融
合、非共價結合或以其他方式)至一或多個其他分子實體，
如另一抗體(如雙專一性抗體或微型雙功能抗體)、偵測劑、
細胞毒素、藥劑、及/或可調節抗體或抗體部分與其他分子
結合之蛋白質或胜肽(如鏈霉親和素核心區域或多聚組胺
酸標籤)。

一類型衍生化抗體係由交聯二或多個抗體(相同類型或

不同類型，如以製造雙專一性抗體)而產生。適當的交聯劑包括具有兩個由適當間隔分開之不同反應基團的異雙官能基者(如間-馬來醯亞胺苯甲醯基-N-羥基琥珀醯亞胺酯)或同雙官能基者(如二琥珀醯亞胺辛二酸酯)。此交聯劑可購自Pierce Chemical Company, Rockford, Il.

另一類衍生化抗體為標記的抗體。本發明抗體或抗原結合部分可與其衍生的有用的偵測劑包括螢光化合物，包括螢光素、異硫氰酸螢光素(fluorescein isothiocyanate)、羅丹明(rhodamine)、5-二甲胺-1-萘磺醯氯、藻紅素(phycoerythrin)、磷化鏷(Lanthanide phosphors)等。也可將抗體以有用於偵測的酵素標記，如辣根過氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、螢光酵素、鹼性磷酸酶、葡萄糖氧化酶等。當將抗體以可偵測的酵素標記時，將其藉加入酵素使用的其他試劑以產生可被分辨的反應產物而偵測。例如，當試劑辣根過氧化物酶存在時，加入過氧化氫及二胺基聯苯胺(Diaminobenzidine)導致有色的反應產物，其為可偵測。也可將抗體以生物素標記，並經由間接量測卵白素或鏈霉親和素結合而偵測。也可將抗體以由二級報導者辨識的預先決定多胜肽抗原決定部位標記(如白胺酸拉鍊對序列、二級抗體之結合位置、金屬結合區塊、抗原決定部位標籤)。於一些具體實施例中，藉不同長度之間隔臂將標記連接以降低可能的立體障礙。

也可將抗-c-Met抗體以放射線標記的胺基酸標記。可使用放射線標記於診斷及治療目的兩者。例如，可使用放射

線標記藉x光或其他診斷技術來偵測表現c-Met的腫瘤。再者，治療上可使用放射線標記作為癌細胞或腫瘤之毒素。多胜肽標記之實例包括(但不限於)下列放射線同位素或放射性核素-- ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、及 ^{131}I 。

也可將抗-c-Met抗體以化學基團如聚乙二醇(PEG, polyethylene glycol)、甲基或乙基、或碳水化合物基團衍生化。此等基團有用於改善抗體之生物特性，如增加血清半生期或增加組織結合。

醫藥組合物及套組

本發明係關於包含有具有促效劑性質之人類抗-c-Met抗體的組合物用於治療需要治療程序包括(但不限於)組織再生或傷口癒合之病患。於一些具體實施例中，治療對象為人類。於其他具體實施例中，對象為獸醫對象。需要組織再生之組織的實例包括(但不限於)肝組織(如急性、慢性或酒精性肝炎或硬化的情況)、肺組織、胃組織(如胃潰瘍的情況)及腎組織(如急性腎衰竭的情況)。可將本發明促效劑抗-c-Met抗體及包含之的組合物與一或多種其他治療、診斷、或預防藥劑組合給予。於一些具體實施例中，可使用本發明一或多種促效劑抗-c-Met抗體作為疫苗或對一疫苗的佐劑。治療可包括單獨給予一或多種本發明促效劑抗-c-Met單株抗體或其抗原結合片段或與醫藥上可接受的載體一起給予。

於另一觀點中，具有抑制性質的本發明抗-c-Met抗體可

包含任何組織或器官，包括(但不限於)腦、肺、鱗狀細胞、膀胱、胃、胰、乳房、頭、頸、肝、腎、卵巢、前列腺、結腸直腸、食道、婦科、鼻咽、或甲狀腺癌、黑色素瘤、淋巴瘤、白血病、多發性骨髓瘤、絨毛癌、卡波西氏或子宮頸上皮內贅瘤。可由具有抑制性質之本發明的抗-c-Met抗體治療或預防的其他疾病包括(但不限於)增生性玻璃體視網膜病變(Proliferative vitreoretinopathy)、增殖期糖尿病視網膜病變、子宮內膜異位及關節炎。於本發明之其他具體實施例中，可使用抗-c-Met抗體來抑制阿滋海默症(Alzheimer's disease)的斑塊(plaque)形成及抑制細胞有絲分裂性(Mitogenic)反應。藉由包含於可注射的避孕器中，可使用本發明之抗-c-Met抗體來抑制胚胎植入。藉由抑制增殖，可使用抗-c-Met抗體來治療腫瘤生長、治療/抑制腫瘤血管新生、或治療轉移之轉移性分散/散播。特別是，具有抑制性質之本發明人類抗-c-Met抗體有用於治療膠質母細胞瘤、肉瘤、或例如，乳房、卵巢、前列腺、結腸、或肺之癌症。

治療可包括單獨給予一或多種本發明抑制性抗-c-Met單株抗體，或其抗原結合片段或與醫藥上可接受的載體一起。可將本發明抑制性抗-c-Met抗體及包含之的組合物與一或多種其他治療、診斷或預防試劑組合給予。其他治療試劑包括其他抗-瘤、抗-腫瘤、抗-血管新生或化學治療試劑。可將此其他試劑包含於相同組合物中或分開給予。於一些具體實施例中，可使用一或多種本發明抑制性抗

-c-Met抗體作為疫苗或作為對一疫苗的佐劑。

除了包含有癌症相關的抗原之癌症疫苗，有用於與抗體組合之疫苗包括(不限於)GM-CSF DNA及以細胞為基本的疫苗、樹突細胞疫苗、重組病毒(如牛痘病毒(vaccinia virus))疫苗、及熱休克蛋白質(HSP, heat shock protein)疫苗。有用的疫苗也包括腫瘤疫苗，如由黑色素瘤細胞形成者；及可為自體或異體使用(autologous or allogeneic)。疫苗可為如以胜肽、DNA或細胞為基本。

如本文中所述，"醫藥上可接受的載體"意指任何及所有溶劑、分散介質、塗層、抗菌及抗真菌劑、等張及吸收延遲劑等生理上可相容者。醫藥上可接受的載體之一些實例為水、鹽水、磷酸緩衝的鹽水、葡萄糖、甘油、乙醇等，及其組合。於許多情況中，較佳包括等張劑，例如，糖、多元醇如甘露醇、山梨醇、或氯化鈉於組合物中。醫藥上可接受的物質之其他實例為濕潤劑或少量輔助物質如濕潤或乳化劑、防腐劑或緩衝劑，其增加儲存壽命或抗體之效用。

本發明之組合物可為許多形式，例如，液體、半液體及固體劑量形式，如液體溶液(如可注射及可灌入溶液)、分散液或懸浮液、藥片、藥丸、粉末、微脂粒及栓劑。較佳的形式視給予的理想模式及治療運用而定。典型較佳的組合物為可注射或可灌入溶液之形式，如類似於用於人類之被動免疫的組合物。較佳給予模式為非口服(如靜脈內、皮下、腹膜內、肌肉內)。於較佳具體實施例中，藉靜脈內灌

注或注射給予抗體。於另一較佳具體實施例中，藉肌肉內或皮下注射給予抗體。

治療組合物典型必須於製造及儲存條件下為無菌及安定。可將組合物配製為溶液、微乳液、分散液、微脂粒、或其他適於高藥物濃度之整齊結構。無菌的可注射溶液可藉由加入所需量之抗-c-Met抗體於適當溶劑，視需要以上面列舉的成分其中之一或組合，接著過濾殺菌而製備。一般而言，分散液係由加入活性化合物至含有基本分散介質及由上數列舉的所需其他成分之無菌載體中而製備。在製備無菌可注射溶液之無菌粉末的情況中，製備的較佳方法為真空乾燥及冷凍乾燥，其產生活性成分加上來自先前其無菌過濾溶液的任何其他理想成分之粉末。例如藉由利用塗層如卵磷脂、在分散液的情況中藉由維持必須的顆粒大小及藉由利用界面活性劑，可保持溶液之適當流動性。藉由將延遲吸收的藥劑例如單硬脂酸鹽及明膠包含於組合物中，可引起可注射組合物的延長吸收。

藉由許多技藝中已知方法可給予本發明之抗體，雖然對於許多治療運用，較佳的給予途徑/模式為皮下、肌肉內、或靜脈內灌入。如熟悉本技藝者將知，給予途徑/模式將視理想結果而改變。

於某些具體實施例中，抗體組合物活性化合物可與保護抗體免於快速釋放的載體一起製備，如控制釋放的配方，包括植入物、皮膚滲透貼、及微膠囊傳遞系統。可使用生物可分解、生物可相容的聚合物，如乙烯-醋酸乙烯酯

(Ethylene Vinyl Acetate)、聚酞類(polyanhydrides)、聚羥基乙酸、膠原、聚原酸酯(polyorthoesters)、及聚乳酸。製備此配方之許多方法為專利或對熟悉本技藝者為一般已知。見如 Sustained and Controlled Released Drug Delivery Systems(J. R. Robinson編, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978)。

於一些具體實施例中, 可將本發明之抗-c-Met抗體口服給予, 例如, 與惰性稀釋劑或可吸收的可食載體一起。也可將化合物(視需要與其他成分)封入硬或軟殼明膠膠囊、壓成藥片、或直接加入對象的飲食中。對於口服治療給予, 可將抗-c-Met抗體與賦形劑合併並以可攝取的藥片、口頰片、含片、膠囊、漿液、懸浮液、糖漿、薄片等之形式使用。為了藉由除了非口服給予方式給予本發明化合物, 可能需要將化合物塗佈一物質或將化合物與一物質共同給予以避免其失去活性。

也可將其他活性化合物加入組合物中。於一些具體實施例中, 將本發明之抑制性抗-c-Met抗體與一或多種其他治療藥劑一起配製或一起給予。此等藥劑包括(不限於)結合其他目標之抗體、防腫瘤劑、抗腫瘤劑、化學治療劑、抑制c-Met之胜肽類似物、結合至HGF及避免其結合至或活化c-Met之抗體或其他分子。此組合療法可能需要較少劑量之抑制性抗-c-Met抗體以及共同給予藥劑, 因而避免可能的毒性或伴隨不同單一療法之併發症。

也可將本發明之抑制性抗-c-Met抗體及包含之的組合物

與其他治療程序組合給予，特別是與放射性治療結合。

於一些具體實施例中，將本發明之活化性或抑制性抗-c-Met抗體與一或多種其他治療藥劑一起配製或一起給予。在活化性c-Met抗體的情況中，此等藥劑包括(不限於)一或多種活化c-Met之化學藥劑及/或技藝中已知增強治療程序如組織再生或傷口癒合的其他藥劑。在抑制性抗體的情況中，此等藥劑包括抑制c-Met者。再者，也可使用此組合療法來治療疾病如閉塞性動脈硬化、腎小管間質纖維化、難治性皮膚潰瘍、胃潰瘍或伴隨移植的問題。此組合療法可能需要較少劑量之抑制性或促效劑抗-c-Met抗體以及共同給予藥劑，因而避免可能的毒性或伴隨不同單一療法之併發症。

本發明之組合物可包括"治療有效量"或"預防有效量"之本發明抗體或其抗原結合部分。"治療有效量"意指在所需的劑量及時間期間有效達到理想治療結果的量。抗體或抗體部分之治療有效量可根據因素如個體的疾病狀態、年齡、性別、及重量，及抗體或抗體部分造成個體中理想反應之能力而改變。治療有效量也為其中抗體或抗體部分的治療有益效果超過其任何毒素或有害的效果的部分。"預防有效量"意指在所需的劑量及時間期間有效達到理想預防結果的量。典型而言，因為預防藥劑係於疾病之前或於早期階段用於對象，預防有效量可為小於治療有效量。

可將劑量用法調整以提供最佳理想反應(如治療或預防反應)。例如，可將單一大丸藥給予，可將數個分開的劑量

隨時間給予或可將劑量成比例地隨治療狀態之需要指示而降低或增加。特別有利為以劑量單位形式配製非口服組合物以方便給予及劑量一致性。如本文中使用的劑量單位形式意指物理上分離的單位適於作為受治療的哺乳類對象之單位劑量；各單位含有計算製造理想效果之預定量活性化合物與所需醫藥載體一起。本發明之劑量單位形式的規格係由下列規定及直接相關(a)抗-c-Met抗體或其部分之獨特性質及欲達到的特定治療或預防效果，及(b)混合此抗體作為個體中敏感度治療於技藝中天生的限制。

本發明抗體或抗體部分之治療或預防有效量的例示非限制性範圍為0.025至50 mg/kg，更佳的是0.1至50 mg/kg，更佳的是0.1-25、0.1至10或0.1至3 mg/kg。於一些具體實施例中，配方含有5 mg/ml抗體於20 mM檸檬酸鈉，pH 5.5，140 mM NaCl，及0.2 mg/ml聚山梨醇酯(polysorbate 80)之緩衝液中。應注意劑量值可隨欲減輕的症狀之類型及嚴重性而改變。應更了解對於任何特定對象，應根據個體需要及給予或監督給予組合物者之專業判斷，隨時間調整明確劑量用法，及本文中提出的劑量範圍僅為例示且不是用來限制申請專利組合物之範圍或實行。

本發明之另一觀點提供套組，其包含本發明抗-c-Met抗體或抗體部分或包含此抗體之組合物。除了抗體或組合物，套組可包括診斷或治療試劑。套組也可包括用於診斷或治療方法中之說明。於較佳具體實施例中，套組包括抗體或包含之的組合物及可用於下述方法之診斷試劑。於另

一具體實施例中，套組包括抗體或包含之的組合物及可用於下述方法之一或多種治療試劑。

本發明亦關於於哺乳類中抑制不正常細胞生長之組合物，其包含一定量之本發明抗體與一定量化學治療藥劑組合，其中化合物、鹽、溶劑化物、或先驅藥物(Prodrug)之量及化學治療藥劑的量一起為有效於抑制不正常細胞生長。許多化學治療藥劑為目前技藝中已知。於一些具體實施例中，化學治療藥劑係由有絲分裂抑制劑、烷基化試劑、抗-代謝物、嵌入抗生素、生長因子抑制劑、細胞週期抑制劑、酵素、拓撲異構酶抑制劑、生物反應修飾劑、抗荷爾蒙(如抗-雄激素)、及抗血管新生藥劑組成的群組選出。

抗血管新生藥劑，如基質金屬蛋白酶2(MMP-2, matrix-metalloproteinase 2)抑制劑、基質金屬蛋白酶9(MMP-9, matrix-metalloproteinase 9)抑制劑、及環氧合酶II(COX-II, cyclooxygenase II)抑制劑，可與本發明抗-c-Met抗體結合使用。有用的COX-II抑制劑之實例包括CELEBREXTM(塞萊昔布(celecoxib))、伐地考昔(valdecoxib)、及羅非昔布(rofecoxib)。有用的基質金屬蛋白酶抑制劑之實例係說明於世界專利WO 96/33172(1996年10月24日公告)、WO 96/27583(1996年3月7日公告)、歐洲專利申請案編號97304971.1(1997年7月8日申請)、歐洲專利申請案編號99308617.2(1999年10月29日申請)、WO 98/07697(1998年2月26日公告)、WO 98/03516(1998年1月29日公告)、WO 98/34918(1998年8月13日公告)、WO 98/34915(1998年8月13

日公告)、WO 98/33768(1998年8月6日公告)、WO 98/30566(1998年7月16日公告)、歐洲專利公告606,046(1994年7月13日公告)、歐洲專利公告931,788(1999年7月28日公告)、WO 90/05719(1990年5月31日公告)、WO 99/52910(1999年10月21日公告)、WO 99/52889(1999年10月21日公告)、WO 99/29667(1999年6月17日公告)、PCT世界專利申請案編號PCT/IB98/01113(1998年7月21日申請)、歐洲專利申請案編號99302232.1(1999年3月25日申請)、大英專利申請案編號9912961.1(1999年6月3日申請)、美國臨時申請案編號60/148,464(1999年8月12日申請)、美國專利5,863,949(1999年1月26日發行)、美國專利5,861,510(1999年1月19日發行)、及歐洲專利公告780,386(1997年6月25日公告), 將其所有全文皆以參考資料併於本文中。

較佳的MMP抑制劑為不顯現關節痛者。更佳的是相對於其他基質金屬蛋白酶(即MMP-1、MMP-3、MMP-4、MMP-5、MMP-6、MMP-7、MMP-8、MMP-10、MMP-11、MMP-12、及MMP-13)選擇性抑制MMP-2及/或MMP-9者。有用於本發明之MMP抑制劑的一些明確實例為AG-3340、RO 32-3555、RS 13-0830、及列舉於下清單之化合物: 3-[[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺醯]-(1-羥胺甲醯基-環戊基)-胺基]-丙酸; 3-外-3-[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺醯胺基]-8-氧雜-雙環[3.2.1]辛烷-3-羧酸羥醯胺; (2R,3R) 1-[4-(2-氟-4-氟-苄氧基)-苯磺醯]-3-羥基-3-甲基-哌啶-2-羧酸羥醯胺; 4-[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺醯]-(1-羥胺甲醯基-環丁基)-胺基]-丙酸; 3-[[4-(4-

氯-苯氧基)-苯磺醯基]-(1-羥基羰基-環丁基)-胺基]-丙酸；
4-[4-(4-氯-苯氧基)-苯磺醯胺基]-四氫吡喃-4-羧酸羥醯
胺；(R)3-[4-(4-氯-苯氧基)-苯磺醯胺基]-四氫吡喃-3-羧酸
羥醯胺；(2R,3R) 1-[4-(4-氯-2-甲基-苄氧基)-苯磺醯]-3-羥
基-3-甲基-哌啶-2-羧酸羥醯胺；3-[[4-(4-氯-苯氧基)-苯磺
醯]-(1-羥胺甲醯基-1-甲基-乙基)-胺基]-丙酸；3-[[4-(4-氯-
苯氧基)-苯磺醯]-(4-羥胺甲醯基-四氫吡喃-4-基)-胺基]-丙
酸；3-外-3-[4-(4-氯-苯氧基)-苯磺醯胺基]-8-氧雜-雙環
[3.2.1]辛烷-3-羧酸羥醯胺；3-內-3-[4-(4-氯-苯氧基)-苯磺醯
胺基]-8-氧雜-雙環[3.2.1]辛烷-3-羧酸羥醯胺；及(R)3-[4-(4-
氯-苯氧基)-苯磺醯胺基]-四氫吡喃-3-羧酸羥醯胺；及該化
合物之醫藥上可接受的鹽類及溶劑化物。

本發明之抗-c-Met抗體也可與訊號傳導抑制劑一起使
用，如抑制上皮生長因子受體(EGF-R, epidermal growth
factor receptor)反應的藥劑，包括但不限於EGF-R抗體、EGF
抗體、及為EGF-R抑制劑的分子；血管內皮生長因子(VEGF,
Vascular Endothelial Growth Factor)及VEGF受體(VEGF-R)
抑制劑；及erbB2受體抑制劑，如結合至erbB2受體之有機
分子或抗體，例如HERCEPTINTM(Genentech, Inc.)。EGF-R
抑制劑係說明於例如世界專利WO 95/19970(1995年7月27
日公告)、WO 98/14451(1998年4月9日公告)、WO
98/02434(1998年1月22日公告)、及美國專利5,747,498(1998
年5月5日發行)，皆以參考資料併於本文中，且可將此類物
質如本文所述使用於本發明中。

EGF-R抑制劑包括(但不限於)單株抗體C225及抗-EGF-R 22Mab(ImClone Systems Incorporated)、ABX-EGF(Abgenix/Cell Genesys)、EMD-7200(Merck KgaA)、EMD-5590(Merck KgaA)、MDX-447/H-477 (Medarex Inc. and Merck KgaA)及化合物 ZD-1834、ZD-1838 及 IRESSATM(ZD-1839)(AstraZeneca)、PKI-166(Novartis)、PKI-166/CGP-75166(Novartis)、PTK787 (Novartis)、CP 701(Cephalon)、來氟米特(Leflunomide) (Pharmacia/ Sugen)、TarcevaTM(OSI, Roche及Genetech)、CI-1033(Warner Lambert Parke Davis)、CI-1033/PD 183,805(Warner Lambert Parke Davis)、CL-387,785(Wyeth-Ayerst)、BBR-1611(Boehringer Mannheim GmbH/Roche)、Naamidine A(Bristol Myers Squibb)、RC-3940-II(Pharmacia)、BIBX-1382(Boehringer Ingelheim)、OLX-103(Merck & Co.)、VRCTC-310(Ventech Research)、EGF融合毒素(Seragen Inc.)、DAB-389(Seragen/Lilgand)、ZM-252808(Imperial Cancer Research Fund)、RG-50864(INSERM)、LFM-A12 (Parker Hughes Cancer Center)、WHI-P97(Parker Hughes Cancer Center)、GW-282974(Glaxo)、KT-8391(Kyowa Hakko)及EGF-R疫苗(York Medical/Centro de Immunologia Molecular(CIM))。可使用此等及其他EGF-R抑制劑於本發明中。

VEGF-R及VEGF抑制劑，例如SU-5416、SU-11248及SU-6668(Sugen Inc.)、SH-268(Schering)、及NX-1838(NeXstar)也可與本發明化合物結合。VEGF及VEGF-R抑制

劑係說明於例如世界專利 WO 99/24440(1999年5月20日公告)、世界專利 PCT/IB99/00797(1999年5月3日申請)、於 WO 95/21613(1995年8月17日公告)、WO 99/61422(1999年12月2日公告)、美國專利 5,834,504(1998年11月10日發行)、WO 98/50356(1998年11月12日公告)、美國專利 5,883,113 (1999年3月16日發行)、美國專利 5,886,020(1999年3月23日發行)、美國專利 5,792,783(1998年8月11日發行)、WO 99/10349(1999年3月4日公告)、WO 97/32856(1997年9月12日公告)、WO 97/22596(1997年6月26日公告)、WO 98/54093(1998年12月3日公告)、WO 98/02438(1998年1月22日公告)、WO 99/16755(1999年4月8日公告)、及 WO 98/02437(1998年1月22日公告)，將其全文皆以參考資料併於本文中。

有用於本發明的一些特定 VEGF-R 及 VEGF 抑制劑之其他實例為 IM862(Cytran Inc.); AvastinTM; 及 angiozyme，其為來自 Ribozyme 及 Chiron 的的合成核酶。可將此等及其他 VEGF 及 VEGF-R 抑制劑如本文所述使用於本發明中。

可將 erbB2 受體抑制劑，如 GW-282974(Glaxo Wellcome plc)、及單株抗體 AR-209(Aronex Pharmaceuticals Inc.)及 2B-1(Chiron)進一步與本發明化合物結合，例如指示於世界專利 WO 98/02434(1998年1月22日公告)、WO 99/35146(1999年7月15日公告)、WO 99/35132(1999年7月15日公告)、WO 98/02437(1998年1月22日公告)、WO 97/13760(1997年4月17日公告)、WO 95/19970(1995年7月27

日公告)、美國專利5,587,458(1996年12月24日發行)、及美國專利5,877,305(1999年3月2日發行)中者,將其全文皆以參考資料併於本文中。有用於本發明之erbB2受體抑制劑也說明於美國專利6,465,449(2002年10月15日發行)及於美國專利6,284,764(2001年9月4日發行),以參考資料併於本文中。說明於前述專利文獻中的erbB2受體抑制劑化合物及物質(以及抑制erbB2受體的其他化合物及物質)可根據本發明與本發明的化合物一起使用。

本發明之抗-c-Met抗體也可與PDGFR、BCR-ABL或原癌基因(c-kit)之抑制劑如GleevecTM(Novartis)一起使用。

本發明之抗-c-Met抗體也可與抗-IGF-IR抗體一起使用,如說明於世界專利WO 02053596(2002年7月11日公告),例如具有抗體2.12.1、2.13.2、2.14.3、3.1.1、4.9.2或4.17.3序列之抗體。本發明之抗體也可與CTLA-4抗體一起使用,如說明於美國專利6,682,736中,包括具有抗體3.1.1、4.1.1、4.8.1、4.10.2、4.13.1、4.14.3、6.1.1、11.2.1、11.6.1、11.7.1、12.3.1.1或12.9.1.1序列之抗體。本發明之抗體也可與CD40抗體一起使用,如說明於世界專利WO 03040170(2003年5月15日公告)中,包括具有抗體3.1.1、3.1.1H-A78T、3.1.1H-A78T-V88A-V97A、7.1.2、10.8.3、15.1.1、21.4.1、21.2.1、22.1.1、22.1.1H-C109A、23.5.1、23.25.1、23.28.1、23.28.1H-D16E、23.29.1或24.2序列之抗體。也可將抗體與抗整合素(integrin)藥劑組合,如抗-整合素抗體。

可與抗體組合之藥劑的一些明確實例包括下列：(1)烷基化試劑氮芥 (nitrogen mustard)N-氧化物、環磷酸胺 (Cyclophosphamide)、異環磷醯胺 (Ifosfamide)、馬法侖 (melphalan)、busulfanmitobronitol、卡波醯 (Carboquone)、塞替派 (thiotepa)、雷莫司汀 (ranimustine)、尼莫司汀 (nimustine)、及替莫唑胺 (Temozolomide)；(2)抗-代謝物甲氨蝶呤、6-巰基嘌呤、苷 (riboside)、巰基嘌呤、5-FU、替加氟 (Tegafur)、去氧氟脲苷 (Doxifluridine)、卡莫氟 (Carmofur)、阿糖胞苷 (Cytarabine)、ocfosfate、依諾他濱 (Enocitabine)、S-1、吉西他濱 (Gemcitabine)、氟達拉濱 (fludarabine)、及卡培他濱 (capecitabine)；(3)抗生素放線菌素 D、阿黴素、柔紅黴素、新制癌菌素 (neocarzinostatin)、博來黴素 (Bleomycin)、匹來黴素 (Peplomycin)、絲裂黴素 C、阿克拉黴素 (Aclarubicin)、吡柔比星 (Pirarubicin)、表阿黴素 (Epirubicin)、淨司他丁 (Zinostatin)、stimalamer、及伊達比星 (idarubicin)；(4)植物衍生的抗腫瘤藥劑長春新鹼、長春鹼、vindesine、依託泊苷、索布佐生 (sobuzoxane)、多烯紫杉醇 (Docetaxel)、太平洋紫杉醇 (Paclitaxel)、及長春花 (Vinorelbine)；(5)鉑配位的化合物順鉑 (Cisplatin)、卡鉑 (Carboplatin)、奈達鉑 (Nedaplatin)、及奧沙利鉑 (Oxaliplatin)；(6)喜樹鹼 (Camptothecin) 衍生物依利替康 (Irinotecan)、排列替康 (Topotecan) 及喜樹鹼；(7)酪胺酸激酶抑制劑 IressaTM (gefitinib) 及 SU5416；(8)抗-CD20 藥劑如 RituxanTM (Rituximab)、Bexxar (tositumomab)、及 ZevalinTM

(Ibritumomab tiuxetan); (9)干擾素干擾素 α 、干擾素 α -2a、干擾素 α -2b、干擾素 β 、干擾素 γ -1a及干擾素 γ -n1; (10)生物反應修飾劑雲芝多糖(Krestin)、香菇多醣(Lentinan)、西佐糖(Sizofiran)、溶鏈菌製劑(picibanil)及烏苯美司(Ubenimex); 或(11)其他抗腫瘤試劑米托蒽醌、1-天門冬醯胺脒、達卡巴嗪(dacarbazine)、羥基脲(hydroxycarbamide)、噴司他丁(pentostatin)、及維生素A酸(Tretinoin)。此外，本發明抗體可與抗癌藥劑如依曼適達(Exemestane)、EdotecarinTM(J-107088)、及SU11248組合使用。

使用之診斷方法

於另一觀點，本發明提供診斷方法。可使用抗-c-Met抗體來在試管中或活體內偵測生物樣品中的c-Met。於一個具體實施例中，本發明提供於需要的對象中診斷表現c-Met腫瘤的存在或位置，包含步驟有注射抗體至對象中，藉由定位抗體結合之處而決定對象中c-Met的表現，比較對象中之表現與正常參考對象或標準的表現，及診斷腫瘤的存在或位置。

可使用抗-c-Met抗體於習見免疫分析法中，包括(不限於)ELISA、RIA、流式細胞儀、組織免疫組織化學、西方點漬法或免疫沉澱法。可使用本發明之抗-c-Met抗體來偵測來自人類的c-Met。於另一具體實施例中，可使用抗-c-Met抗體來偵測來自食蟹猴或獼猴的c-Met。於另一具體實施例中，可使用抗-c-Met抗體來偵測來自大鼠的c-Met。

本發明提供於生物樣品中偵測c-Met的方法，包含使生物

樣品與本發明之抗-c-Met抗體接觸及偵測結合的抗體。於一個具體實施例中，將抗-c-Met抗體直接以可偵測的標記標示。於另一具體實施例中，抗-c-Met抗體(第一個抗體)為未標記的而將第二個抗體或可結合抗-c-Met抗體的其他分子標記。如熟悉本技藝者已熟知，選擇第二個抗體使其能夠專一地結合第一個抗體之特定物種或種類。例如，若抗-c-Met抗體為人類IgG，則二級抗體可為抗-人類IgG。可結合至抗體之其他分子包括(不限於)蛋白質A及蛋白質G，兩者皆可於市面上購得，如自Pierce Chemical Co.

抗體或二級抗體之適當標記已揭示於上文，包括許多酵素、輔基、螢光材料、冷光材料及放射線活性材料。適當的酵素之實例包括辣根過氧化物酶、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、或乙醯膽鹼酯酶；適當輔基複合物之實例包括鏈霉親和素/生物素及卵白素/生物素；適當螢光材料之實例包括傘形花內酯(umbelliferone)、螢光素、異硫氰酸螢光素、羅丹明、二氯三嗪基胺螢光素、丹磺醯氯(Dansyl chloride)或藻紅素；冷光材料之實例包括光敏靈(Luminol)；及適當放射線活性材料之實例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

於其他具體實施例中，利用以可偵測的物質標記之c-Met標準品與未標記的抗-c-Met抗體藉由競爭免疫分析法可於生物樣品中分析c-Met。於此分析法中，將生物樣品、標記的c-Met標準品及抗-c-Met抗體合併並決定標記的c-Met標準品結合至未標記的抗體之量。生物樣品中的c-Met量與結合至抗-c-Met抗體的標記的c-Met標準品之量成反比。

吾人可使用上述免疫分析法於許多目的。例如，可使用抗-c-Met抗體來偵測培養的細胞中之c-Met。於較佳具體實施例中，使用抗-c-Met抗體來決定已用許多化合物處理之細胞表面上的c-Met量。可使用此方法來確認調控c-Met蛋白質量之化合物。根據此方法，將一個細胞樣品以測試化合物處理一段時間，而使量一個樣品保持未經處理。若欲測量總c-Met量，將細胞分解並利用上述其中一種免疫分析法測量總c-Met量。比較於處理的細胞相對於未處理的細胞中總c-Met量以決定測試化合物的效果。

測量總c-Met量之較佳免疫分析法為流式細胞儀或組織免疫組織化學。若欲測量c-Met的細胞表面量，細胞不分解，並利用上述其中一種免疫分析法測量c-Met的細胞表面量。決定c-Met的細胞表面量之較佳免疫分析法包括步驟有以可偵測的標記(如生物素或¹²⁵I)標記細胞表面蛋白質，以抗-c-Met抗體免疫沉澱c-Met及而後偵測標記的c-Met。

決定c-Met位置(如細胞表面量)之另一較佳免疫分析法為藉由利用組織免疫組織化學。偵測c-Met之細胞表面量的較佳免疫分析法包括結合以適當螢光(如螢光素或藻紅素)標記的抗-c-Met抗體，及利用流式細胞儀偵測一級抗體。於另一具體實施例中，抗-c-Met抗體為未標記的而將第二個抗體或可結合抗-c-Met抗體的其他分子標記。方法如ELISA、RIA、流式細胞儀、西方點漬法、免疫組織化學、貫穿性膜蛋白質(integral membrane protein)之細胞表面標記及免疫沉澱法為技藝中已熟知。見如Harlow及Lane，出

處同上。此外，可將免疫分析法放大做高產量篩選以便測試大量化合物是否活化或抑制c-Met。

也可使用本發明抗-c-Met抗體來決定組織中或衍生自組織的細胞中c-Met的量。於一些具體實施例中，組織為疾病的組織。於一些具體實施例中，組織為腫瘤或其切片。於方法之一些具體實施例中，組織或其切片為自病患取出。而後使用組織或切片於免疫分析法中藉上述之方法決定如總c-Met量、c-Met之細胞表面量或c-Met之定位。

可使用上述診斷方法來決定是否腫瘤表現高量c-Met，其可為腫瘤是以抗-c-Met抗體治療的目標之象徵。也可使用此診斷方法來決定是否組織或細胞表現不足量c-Met或活化的c-Met，及因而是以活化抗-c-Met抗體、HGF及/或其他治療藥劑增加c-Met量或活性之治療的候選者。

也可使用本發明的抗體於活體內以確認表現c-Met的組織或器官。於一些具體實施例中，使用抗-c-Met抗體來確認表現c-Met的腫瘤。利用本發明人類抗-c-Met抗體之一個優點為其在給予時可於活體內安全地使用而不引起對抗體實質免疫反應，不像非人類起源之抗體或以人化或嵌合抗體。

方法包含步驟有給予可偵測的標記抗-c-Met抗體或包含之的組合物至需要此診斷測試之病患及使病患經過影像分析以決定表現c-Met的組織之位置。影像分析為醫學技藝中已熟知，包括(不限於)x光分析、磁共振造影(MRI, magnetic resonance imaging) 或 電腦斷層 (CT, computed

tomography)。可將抗體以任何適於活體造影的藥劑標記，例如顯像劑(contrast agent)如鋇，其可用於x光分析，或磁顯像劑如釷螯化物，其可用於MRI或CT。其他標記藥劑包括(不限於)放射線同位素，如⁹⁹Tc。於另一具體實施例中，抗-c-Met抗體將為未標記並將藉由給予第二個抗體或為可偵測且可結合抗-c-Met抗體之其他分子而成像。於具體實施例中，自病患取得切片以決定是否研究的組織表現c-Met。

使用之治療方法

於另一具體實施例中，本發明提供藉由給予抗-c-Met抗體至需要其的病患抑制c-Met活性之方法。於另一具體實施例中，本發明提供藉由給予抗-c-Met抗體至需要其的病患活化c-Met活性之方法。本文中所述之任何類型抗體皆可治療上使用。於較佳具體實施例中，抗-c-Met抗體為人類、嵌合或人化抗體。於另一較佳具體實施例中，c-Met為人類的及病患為人類病患。或者，病患可為表現與抗-c-Met抗體交叉反應之c-Met的哺乳類。可將抗體給予表現與抗-c-Met抗體交叉反應之c-Met的非人哺乳類(即大鼠、或食蟹猴)作為獸醫目的或作為人類疾病之動物模型。此動物模型可為有用於評估本發明抗體之治療功效。

如本文中使用的，用詞"c-Met活性為有害的疾病"希望包括患有疾病的對象中高量c-Met的存在已證實為或懷疑為疾病的病理生理學之原因或促成疾病惡化的因素之疾病或其他失調。此疾病可藉由於細胞表面之c-Met量增加或於患有

此疾病之對象的受影響細胞或組織中c-Met酪胺酸自體磷酸化增加而證實。c-Met量增加可利用抗-c-Met抗體如上述偵測。

於一個具體實施例中，可將抗-c-Met抗體給予具有表現c-Met腫瘤的病患。腫瘤可為實體腫瘤或可為非實體腫瘤，如淋巴瘤。於更較佳具體實施例中，可將抗-c-Met抗體給予具有表現c-Met之癌性腫瘤的病患。於再更佳具體實施例中，將抗-c-Met抗體給予具有表現c-Met之肺部、乳房、前列腺、或結腸腫瘤的病患。於另一較佳具體實施例中，將抗-c-Met抗體給予具有表現c-Met之膠質母細胞瘤腫瘤的病患。於高度較佳的具體實施例中，方法造成腫瘤不增加重量或體積或降低重量或體積。於另一具體實施例中，方法避免HGF結合至腫瘤細胞表面上的c-Met或造成c-Met細胞表面蛋白質的向下調節。於較佳具體實施例中，抗體係選自 13.3.2 ; 9.1.2 ; 8.70.2 ; 8.90.3 ; 13.3.2H-A14P ; 13.3.2H-E42K ; 13.3.2H-A14P,E42K ; 13.3.2H-S97T ; 13.3.2H-E42K,S97T ; 13.3.2H-A14P,E42K,S97T ; 13.3.2L-A91T ; 13.3.2L-A91T,H-A14P ; 13.3.2L-A91T,H-E42K ; 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K ; 13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T 或 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K,S97T，或包含其重鏈、氫鏈或抗原結合區域。

於另一較佳具體實施例中，可將抗-c-Met抗體給予表現過度高量c-Met之病患。技藝中已知c-Met的高量表現可導致許多常見癌症。於一個具體實施例中，該方法係關於癌

症之治療，如腦、鱗狀細胞、膀胱、胃、胰、乳房、頭及頸、食道、前列腺、結腸直腸、肺、腎、卵巢、婦科或甲狀腺癌。可以本發明化合物根據本發明的方法治療之病患包括，例如，已被診斷具有肺癌、骨癌、胰癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門區域的癌症、胃癌、結腸癌、乳癌、婦科腫瘤(如子宮肉瘤、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌或陰戶癌)、何杰金氏症(Hodgkin's disease)、食道癌、小腸癌、內分泌系統之癌症(如甲狀腺、副甲狀腺或腎上腺之癌症)、軟組織之肉瘤、脈道癌、陰莖癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、兒童之實體腫瘤、淋巴球的淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管的癌症(如腎臟細胞癌，特別是遺傳性及偶發性乳頭狀腎細胞癌，其具有活化突變於c-Met激酶區塊、腎盂癌)、或中樞神經系統的癌(如原發性中樞神經系統淋巴瘤(Primary CNS lymphoma)、脊髓軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤(Gliomas)或腦垂體腺瘤)之病患於更佳具體實施例中，將抗-c-Met抗體給予具有乳癌、前列腺癌、肺癌、結腸癌或膠質母細胞瘤之病患。於再更佳具體實施例中，方法造成癌症停止不正常增殖，或不增加重量或體積或降低重量或體積。

可將抗體給予一次，但更佳給予多次。可將抗體給予由每天三次至每六個月一次或更久。給予可為於時間表如每天三次、每天兩次、每天一次、每兩天一次、每三天一次、每週一次、每兩週一次、每月一次、每兩月一次、每三月

一次及每六個月一次。也可將抗體經由微泵(minipump)連續給予。可將抗體經由口服、黏膜、口頰、鼻內、可吸入、靜脈內、皮下、肌肉內、非口服、腫瘤內或局部途徑給予。可將抗體給予於腫瘤位置、進入腫瘤、或與腫瘤位置遠離的位置。可將抗體給予一次、至少兩次或至少一段時間直到症狀被治療、減輕或痊癒。只要腫瘤存在，一般將給予抗體，其限制條件為抗體造成腫瘤或癌症停止生長或降低重量或體積。一般給予抗體為如上述醫藥組合物之部分。抗體之劑量一般為0.1-100 mg/kg之範圍，更佳的是0.5-50 mg/kg，更佳的是1-20 mg/kg，再更佳的是1-10 mg/kg。抗體之血清濃度可由技藝中任何已知方法測量。

於另一觀點中，可將抗-c-Met抗體與其他治療藥劑(如抗-腫瘤藥物或分子)一起給予至具有過度增殖疾病(如癌症或腫瘤)之病患。於一個觀點中，本發明係關於在哺乳類中治療過度增殖疾病之方法，包含有給予該哺乳類治療有效量之本發明化合物與自有絲分裂抑制劑、烷基化試劑、抗-代謝物、嵌入抗生素、生長因子抑制劑、細胞週期抑制劑、酵素、拓撲異構酶抑制劑、生物反應修飾劑、抗荷爾蒙、激酶抑制劑、基質金屬蛋白酶抑制劑、基因療法及抗-雄激素組成(但不限於)的群組選出之抗-腫瘤藥劑合併。於更佳具體實施例中，將抗體與抗瘤藥劑一起給予，如阿黴素(Adriamycin)或紫杉醇。於另一較佳具體實施例中，將抗體或組合療法與放射線療法、化學療法、光動力療法、手術或其他免疫療法一起給予。於再另一較佳具體實施例中，

將抗體與另一抗體一起給予。例如，可將抗-c-Met抗體與已知抑制腫瘤或癌細胞增殖的抗體或藥劑一起給予，如抑制erbB2受體、EGF-R、CD20或VEGF之抗體或藥劑。

抗體與其他治療藥劑之共同給予(組合療法)包含給予一種醫藥組合物，其包含抗-c-Met抗體及其他治療藥劑，以及給予二或多個分開的醫藥組合物，一個包含抗-c-Met抗體而另一包含其他治療藥劑。另外，雖然共同給予或組合療法一般意指將抗體及其他治療藥劑同時給予，其也包含將抗體及其他治療藥劑不同時間給予的情況。例如，可將抗體每三天給予一次，而其他治療藥劑每天給予一次。或者，可將抗體給予於以其他治療藥劑治療疾病之前或之後，例如於病患已以其他藥劑治療失敗後。類似地，可將抗-c-Met抗體之給予施行於其他療法如放射線療法、化學療法、光動力療法、手術或其他免疫療法之前或之後。

可將抗體及一或多種其他治療藥劑(組合療法)給予一次、兩次或至少一段時間直到症狀被治療、減輕或痊癒。較佳的是，將組合療法給予多次。可將組合療法給予由每天三次至每六個月一次。給予可為於時間表如每天三次、每天兩次、每天一次、每兩天一次、每三天一次、每週一次、每兩週一次、每月一次、每兩月一次、每三月一次及每六個月一次，或可經由微泵連續給予。可將組合療法經由口服、黏膜、口頰、鼻內、可吸入、靜脈內、皮下、肌肉內、非口服、腫瘤內或局部途徑給予。可將組合療法給予於與腫瘤位置遠離的位置。只要腫瘤存在，一般將給予

組合療法，其限制條件為抗體造成腫瘤或癌症停止生長或降低重量或體積。

於再另一個具體實施例中，將抗-c-Met抗體以放射線標記、免疫毒素或毒素標記，或為包含有毒性胜肽之融合蛋白質。抗-c-Met抗體或抗-c-Met抗體融合蛋白質指引放射線標記、免疫毒素、毒素或毒性胜肽至表現c-Met腫瘤或癌細胞。於較佳具體實施例中，在抗-c-Met抗體結合至腫瘤或癌細胞表面上的c-Met後將放射線標記、免疫毒素、毒素或毒性胜肽內化。

於另一觀點中，可使用抗-c-Met抗體來治療與c-Met相關之非癌疾病或症狀。於一個具體實施例中，方法包含步驟有給予抗-c-Met抗體至具有由c-Met活性引起或惡化的非癌病理狀態之病患。於更較佳具體實施例中，抗-c-Met抗體減慢非癌病理狀態之進展。於更較佳具體實施例中，抗-c-Met抗體停止或倒轉(至少部分)非癌病理狀態。

於另一觀點中，本發明提供給予活化抗-c-Met抗體至需要之的病患的方法。於一些具體實施例中，將活化抗體或包含之的醫藥組合物給予需要之的病患有效量以增加c-Met活性。於較佳具體實施例中，活化抗體能夠重新恢復正常c-Met活性。於另一較佳具體實施例中，可將活化抗體給予需要組織再生的病患。於另一具體實施例中，可將活化抗體給予病患以治療腎或小管間質纖維化。於另一具體實施例中，可將活化抗體給予病患以治療伴隨移植手術之問題，例如，以治療伴隨腎移植排斥之局部缺血。於另一

具體實施例中，可使用活化抗體來減小伴隨移植手術後環孢靈(Cyclosporin)治療之毒性。於另一具體實施例中，可給予活化抗-c-Met抗體以治療心肌梗塞、由於再灌注損傷的心臟缺血、血管修復術後的再狹窄(restenosis)、或血管疾病如閉塞性動脈硬化。於另一個具體實施例中，可給予活化抗體以癒合傷口，例如難治性皮膚潰瘍或治療胃潰瘍。於另一個較佳具體實施例中，可將活化抗體與一或多個增強治療程序如組織再生或增加c-Met活性之其他因子一起給予。此因子包括生長因子如HGF、及/或活化c-Met的HGF類似物。於較佳具體實施例中，抗體係選自13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3，其變體或包含其重鏈、氫鏈或抗原結合區域。

基因療法

可將本發明之核酸分子經由基因療法給予需要的病患。此療法可為於活體內或於活體外。於較佳具體實施例中，將編碼重鏈及輕鏈兩者之核酸分子給予病患。於更佳具體實施例中，給予核酸分子使其穩定地整合進入B細胞的染色體，因為此等細胞為專門製造抗體。於較佳具體實施例中，於活體外將前驅體B細胞轉染或感染並重新移植入需要的病患。於另一具體實施例中，利用已知感染研究的細胞類型之病毒，將前驅體B細胞或其他細胞於活體內感染。用於基因療法的典型載體包括微脂粒、質體及病毒載體。例示病毒載體為反轉錄病毒、腺病毒及腺相關病毒。活體內或活體外感染後，藉由自治療的病患取樣及利用技藝中已知

或本文中說明的任何免疫分析法可監測抗體表現量。

於較佳具體實施例中，基因療法包括步驟有給予編碼抗-c-Met抗體之重鏈或其抗原結合部分之分離的核酸分子及表現核酸分子。於另一具體實施例中，基因療法包括步驟有給予編碼抗-c-Met抗體之輕鏈或其抗原結合部分之分離的核酸分子及表現核酸分子。於更佳的方法中，基因療法包括步驟有給予編碼重鏈或其抗原結合部分之分離的核酸分子及編碼本發明抗-c-Met抗體之輕鏈或其抗原結合部分之分離的核酸分子及表現核酸分子。基因療法也可包含步驟有給予另一抗癌藥劑，如紫杉醇或阿黴素。

為了可使本發明更加清楚，提出下列實例。此等實例係僅為了說明的目的，不可以任何方式視為限制本發明之範圍。

實例 I

製造抗-c-Met抗體之融合瘤之產生

如下將本發明抗體製備、選擇、及分析：

將八至十週大XenoMouseTM小鼠以c-Met細胞外區塊融合蛋白質(10微克/劑量/鼠)(R & D Systems, 目錄#358MT)或以表現人類c-Met於其細胞膜之NIH-3T3轉染細胞株(10×10^6 個細胞/劑量/鼠)於腹膜內或於其後足墊中接種。將此劑量於三至八週期間重複五至七次。融合前四天，給予小鼠人類c-Met細胞外區塊融合蛋白質於PBS之最後注射。將來自免疫的小鼠之脾及淋巴結淋巴球與非分泌性骨髓瘤P3-X63-Ag8.653細胞株融合，並將此等融合的細胞經過

HAT選擇，如先前所述(Galfre及Milstein, Methods Enzymol. 73:3-46, 1981)。將一組融合瘤回收，其皆分泌c-Met專一的人類IgG2抗體。選擇四個融合瘤做進一步研究並記為13.3.2；9.1.2；8.70.2及8.90.3。將融合瘤根據布達佩斯條約(the Budapest Treaty)之條件於2003年3月4日寄存於美國菌種保藏中心(ATCC, American Type Culture Collection)，10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209。已將融合瘤指定下列登錄號碼：

融合瘤 13.3.2(LN 15883) PTA-5026

融合瘤 9.1.2(LN 15884) PTA-5027

融合瘤 8.70.2(LN 15885) PTA-5028

融合瘤 6.90.3(LN 15886) PTA-5029

實例II

根據本發明製備的抗-c-Met抗體之序列

為了分析根據本發明製造的抗體之結構，將核酸選殖，其編碼來自製造抗-c-Met單株抗體13.3.2；9.1.2；8.70.2及8.90.3之融合瘤的重及輕鏈片段。如下將選殖及定序完成：

利用Fast-Track套組(Invitrogen)自大約 2×10^5 個衍生自XenoMouseTM小鼠以人類c-Met接種的融合瘤細胞將Poly(A)⁺ mRNA分離。藉由隨機引子自mRNA合成cDNA。將隨機引導的cDNA利用人類V_H或人類V_κ家族特定的可變區塊引子(Marks等人，"人類免疫球蛋白可變基因的聚合酶鏈反應放大用之寡核苷酸引子及家族專一性寡核苷酸探針之設計"*Eur. J. Immunol.* 21:985-991(1991))或通用人類V_H

引子 [MG-30, 5'-CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCIGG-3'] (SEQ ID NO:25)], 與專門為人類 C γ 2 固定區域的引子 MG-40d[5'-GCTGAGGGAGTAGAGTCCTGAGGA-3'(SEQ ID NO:26)]或 C κ 固定區域[h κ P2; 如前述於 Green 等人, 1994] 一起放大。藉由直接定序產生自 Poly(A⁺)RNA 利用上述引子之 PCR 產物, 得到核酸分子, 其編碼來自製造抗-c-Met 融合瘤之人類重及 κ 輕鏈轉錄體。利用 TA 轉殖套子 (Invitrogen) 將 PCR 產物轉殖入 pCRII (Invitrogen) 並利用 Prism dye-terminator 定序套組 (Applied Biosystems Inc) 及 ABI 377 定序機器 (Applied Biosystems Inc) 將兩股定序。將所有序列藉與 "VBASE 序列指南" (Tomlinson 等人, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) 利用 MacVector 及 GeneWorks 軟體程式比對而分析。

使單株抗體 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2 及 8.90.3 經過全長 DNA 選殖及定序。對於各定序, 將 RNA 自大約 2×10^6 個融合瘤細胞利用 QIAGEN Rneasy RNA 分離套組 (QIAGEN) 分離。利用隨機六合體 (Roche Applied Science) 及 SuperScript II Rnase H-反轉錄酶套組 (Invitrogen) 將 mRNA 反轉錄。使用 V Base 來設計正向放大引子, 其包括限制位置、最佳科扎克 (Kozak) 序列、ATG 開始位置及部分重鏈之訊號序列。表 2 列出用來得到抗體株的正向放大引子。

表 2

株	正向引子重鏈	SEQ ID NO:
13.3.2	TATCTAAGCTTCTAGACGCCACCATGGACTGGACCTGGAGCATC	31
9.1.2	TATCTAAGCTTCTAGACGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTC	32
8.70.2	TATCTAAGCTTCTAGACGCCACCATGAAGCACCTGTGGTTCTTC	33
8.90.3	TATCTAAGCTTCTAGACGCCACCATGGAGTTGGGGCTGTGCTGG	34

使用相同方法來設計引子以包括3'編碼序列、IgG2固定區域的停止密碼子 [5'-TTCTCTGATCAGAATTCCTATCATTACCCGGAGACAGGGAGAG-3'(SEQ ID NO:27)]及限制位置。

使用相同方法來設計引子靠近 κ 鏈的ATG起始位置 [5'-TATCTAAGCTTCTAGACGCCACCATGGACATGAGGTGCCCCGCT-3'(SEQ ID NO:28)]。將最佳科扎克(Kozak)序列(CCGCCACC)加至ATG起始位置之5'端。使用此引子來PCR選殖抗體株13.3.2; 8.70.2及8.90.3之輕鏈。使用第二個正向引子 [5'-TATCTAAGCTTCTAGACGCCACCATGGAAACCCAGCGCAGCTTC-3'(SEQ ID NO:29)]來選殖抗體株9.1.2之輕鏈。也使用相同方法來設計引子靠近 κ 固定區域的停止密碼子 [5'-TTCTTTGATCAGAATTCTCACTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC-3'(SEQ ID NO:30)]。使用鉬Pfx DNA聚合酶(Invitrogen)與引子對來放大cDNA。將PCR產物選殖入pCR-Blunt-II-TOPO(Invitrogen)利用標準技術(如引

子步移)及利用染色終止劑定序套組及ABI PRISM 3700定序機器(Applied Biosystems Inc)以得到各 κ 鏈基因的三至五株序列。將PCR產物選殖入哺乳類表現載體並將細胞株定序以確認體突變。對各株，於至少三次反應中將兩股上的序列核對。

基因利用分析

由抗體的核酸序列及預測的胺基酸序列，對各抗體鏈確認基因使用。表3提出根據本發明抗體之選定的融合瘤細胞株之基因利用：

表3
重及輕鏈基因利用

株	重鏈生殖系				κ 輕鏈生殖系		
	SEQ ID NO:	V _H	D _H	J _H	SEQ ID NO:	V _{κ}	J _{κ}
13.3.2	21	1-18	D2-15	J _H 4b	17	L5V κ 1	4
9.1.2	22	4-31	D2-2, D7-27	J _H 6b	18	A27V κ 3	2
8.70.2	23	4-39	D2-2	J _H 4b	19	L5V κ 1	3
8.90.3	24	3-48	D4-17	J _H 4b	20	L5V κ 1	1

藉由設計引子及利用購自Stratagene的快速改變定點突變法(QuickChange Site Directed Mutagenesis)套組，根據製造商的說明書，實施重及輕鏈的特定基團突變。由自動定序確認突變，並將突變插入體次選殖入表現載體。將此等表現載體轉染入NSO(ECACC#85110503)及HEK-293T細胞(ATCC)以表現本發明之重組抗體。

實例 III

人類抗-c-Met抗體阻擋HGF對c-Met的結合

實施試管中分析測量在抗-c-Met抗體存在中HGF結合至c-Met以決定是否抗-c-Met抗體能夠抑制HGF結合至c-Met及其抑制程度。

將96孔組織培養盤的孔以100微升含有c-Met ECD/Fc(R&D Systems#358MT)於磷酸緩衝的鹽水(PBS, phosphate buffered saline)之5微克/毫升溶液於室溫塗佈隔夜。將盤保持於4°C直到實驗需要。將盤以具有0.5% TWEEN-20之Tris緩衝的鹽水(pH=8.0)(TBS-T)清洗四次。接下來，將200微升/孔之阻斷緩衝液(blocking buffer)(3%牛血清白蛋白(BSA, bovine serum)於TBS-T中)於室溫加入60分鐘以阻斷非專一的結合位置。將盤以300微升/孔之TBS-T清洗四次。接下來，將100微升來自融合瘤上層清液含抗-c-Met抗體之補充10%FBS的Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)或純化的抗體於PBS或20 mM醋酸鈉(pH=5.5)、140 mM NaCl以不同濃度(如10、3、1、0.3、0.1、0.03、及0.01微克/毫升，基於上層清液中人類IgG2濃度)加至各孔。不將抗-c-Met抗體加至實驗的控制組孔中。將樣品於室溫混合4小時。接下來，將10微升之100ng/ml HGF於無血清DMEM加至各孔。將樣品於室溫混合15分鐘。將盤以300微升/孔之TBS-T清洗4次。接下來，加入100微升之1:2000稀釋之100微克/毫升抗-HGF生物素化的抗體於阻斷緩衝液中。將溶液於孔中室溫培養30分鐘。將孔以300微升/孔之TBS-T清洗5次。接下來，加入100微升/孔之1.25 mg/ml

鏈霉親和素-辣根過氧化物酶(HRP, horseradish peroxidase)以1:5000稀釋於阻斷緩衝液中。將樣品於室溫培養30分鐘。將孔以TBS-T清洗5次,每次約300微升/孔。接下來,將100微升/孔之3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMB, tetramethylbenzidine)過氧化物酶受質(Kirkegaard & Perry Laboratories)加入並於室溫顯影1-2分鐘。為了停止反應,將100微升/孔之TMB停止溶液(Kirkegaard & Perry Laboratories,#50-85-04)加入。將樣品於96孔盤讀取機上於450奈米(nm)波長讀值,無減去背景。

此等實驗證實相較於控制組樣品抗-c-Met抗體抑制HGF的結合。配體結合分析(表4)顯示對抗體13.3.2;9.1.2;8.70.2及8.90.3之配體結合的抑制 IC_{50} 。

表4

抗體	9.1.2	8.90.3	13.3.2	8.70.2	13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T
配體結合分析[IC_{50} , 微克/毫升]	0.093	0.110	0.090	0.115	0.127
細胞pTyr分析[IC_{50} , 微克/毫升]	0.033	0.086	0.033	0.143	0.032
細胞Met量[%損失於1.0 微克/毫升]	46.9	17.5	23.8; 21.9	11.0	28.5
軟凝膠生長[IC_{50} , 微克/毫升]	5.5	10.5	8.5	25	ND
管狀形態發生[%抑制於1 微克/毫升]	84	61	ND	25	ND
促效劑活性[最大倍數刺激]	6.5	2.3	2.7	2.5	2.5
管狀形態發生[倍數刺激於50微克/毫升]	2.2	2.5	ND	8.2	ND

ND: 未做

實例IV

由抗-c-Met抗體抑制c-Met磷酸化

使用本發明之抗-c-Met抗體來測量細胞中以HGF刺激後c-Met磷酸化之抑制。

將A549細胞以密度每孔 1×10^5 個細胞於總體積200微升/孔DMEM補充10%FBS植入96孔U形底組織培養處理盤(Falcon, #3077)。將盤於10%CO₂大氣中於37°C培養24小時。將培養基小心地自盤的各孔吸出。將待測融合瘤上層清液於14,000 rpm微量離心5-10分鐘並將細胞以200微升/孔之融合瘤上層清液或其稀釋、或純化的抗體於PBS或20 mM醋酸鈉(pH=5.5)、140 mM NaCl處理。將無關的融合瘤上層清液加至負控制組孔。將細胞於37°C培養短時間(如4小時)或較長時間(如24小時)及而後以加入22微升/孔之2微克/毫升HGF於無血清DMEM培養基或Hank's緩衝液之溶液而產生最終濃度44 ng/孔HGF刺激。將盤於37°C培養15分鐘，而後將培養基小心地自盤的孔吸出。將細胞以含有1 mM Na₃VO₄之冷PBS清洗並將溶液小心地自盤吸出。將細胞以50微升分解緩衝液(NP-40分解緩衝液：150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH=8.0, 1% NP-40, 10 mM EDTA, 10%甘油)加上新鮮加入的1 mM Na₃VO₄及蛋白酶抑制劑(Complete tablet, Roche#1-873-580, 根據製造商的指示使用)分解。將盤於室溫搖動10分鐘。而後將盤儲存於-20°C直到ELISA需要。

使用 ELISA 來決定 c-Met 磷酸化量。為了 ELISA 盤準備，將 Reacti-Bind 山羊抗-兔子塗佈的盤以清洗緩衝液 (TBS-T Sigma#T-9039) 清洗三次。接下來，將 100 微升 c-Met 多株捕捉抗體 (Santa Cruz, sc-10) 於稀釋緩衝液 (10% 來自 Pierce 的 SuperBlock 於 TBS-T) (最終濃度 5 微克/毫升) 加入。將盤於室溫搖動 2 小時培養，而後將盤以 TBS-T 清洗五次。將非專一結合位置以 200 微升/孔 Superblock 於 TBS-T 於室溫搖動阻斷 30 分鐘。使用前，將阻斷溶液自 Reacti-Bind 盤吸出。

藉由加入 100 微升含有 1 mM Na_3VO_4 的稀釋緩衝液並用吸管上下吸分解液並以尖端刮孔而製備細胞分解液。接下來，將稀釋 1:3 的細胞分解液 100 微升/孔加至 Reacti-Bind 盤並將盤於室溫培養 60 分鐘同時搖動。將盤以 TBS-T 清洗五次。接下來，將 100 微升/孔之 1 微克/毫升抗磷酸酪胺酸抗體 PY20-HRP (Transduction Labs, #P 11625) 於含 1 mM Na_3VO_4 的 3% 牛血清白蛋白-TBS-T 加入。將盤於室溫培養 2 小時同時搖動。將盤以 TBS-T 清洗五次，以抽吸將清洗液取出。將盤於紙巾上吸乾以去除過量液體。接下來，將 100 微升/孔之 TMB 過氧化物酶受質溶液 (Kirkegaard & Perry Laboratories, #50-76-04) 加入並於室溫顯影同時溫和搖動 4-5 分鐘。將反應以 100 微升/孔之 TMB 停止溶液 (Kirkegaard & Perry Laboratories, #50-85-04) 停止。將盤利用 96 孔盤讀取機上於 450 nm 波長讀值。

此等實驗證實相較於控制組細胞以 HGF 刺激細胞中抗-c-Met 抗體抑制 c-Met 磷酸化。細胞磷酸酪胺酸分析 (表 4) 顯

示對抗體 13.3.2 ; 9.1.2 ; 8.70.2及 8.90.3之細胞 c-Met磷酸化的抑制 IC₅₀(細胞 pTyr分析)。

實例 V

以 HGF 刺激後於細胞中以抗-c-Met 抗體向下調控 c-Met 進行一分析以測量用 HGF 刺激的細胞中抗-c-Met 抗體對 c-Met 表現量之抑制效果。

如實例 IV 中所述製備 A549 細胞分解液。為了決定 c-Met 量，實施 ELISA。大體如實例 IV 中所述進行 ELISA，除了下列改變：代替使用抗-磷酸酪氨酸抗體，將 100 微升 UBI 05-237 抗體(腹水)(抗-Met, ECD, 株 DO24 Upstate Biotechnology, #21601)稀釋 1:1000 於 3% BSA-TBS-T(與 1 mM Na₃VO₄)加至各孔。培養及清洗步驟與實例 IV 中相同。接下來，將 100 微升/孔之 0.8 mg/ml 山羊抗-小鼠 IgG 結合至 (H+L)-HRP (Jackson Immuno Research Labs, #115-035-146 重新組成於 750 微升水+750 微升甘油)(稀釋 1:5000 於 3% BSA-TBS-T) 加入。將盤於室溫培養 60 分鐘同時搖動。清洗及偵測步驟與實例 IV 中相同。

此等實驗證實相較於控制組細胞以 HGF 刺激，以 HGF 刺激後的細胞中在抗-c-Met 抗體存在下，c-Met 量有些向下調控(細胞 Met 量向下調控，見細胞 Met 量表 4)。

實例 VI

抗-c-Met 抗體對軟凝膠中的細胞生長之抗-增殖效果

進行軟凝膠生長分析以測量抗-c-Met 抗體之抗增殖效果。

將S114腫瘤細胞(基因工程的NIH-3T3細胞以表現人類HGF及人類c-Met)維持於補充10%小牛血清、1,000單位/毫升青黴素、1,000微克/毫升鏈黴素及2 mM L-麩醯胺酸之DMEM中(生長培養基)。將細胞培養胰蛋白酶消化並以無血清DMEM清洗及調整濃度至50,000個細胞/毫升。將純化的抗體於PBS或20mM醋酸鈉(pH=5.5)、140 mM NaCl以10倍使用的不同最終濃度製備於15毫升試管中。將稀釋於細胞生長培養基中的0.5(底)及0.35%(頂)之兩凝膠層於35 mm 培養皿中製備。底層由含有0.5%凝膠於總體積2毫升之生長培養基組成。頂層由含有0.35%凝膠、5,000個S114細胞、及以最終濃度於0.625-50微克/毫升抗體處理於1毫升總體積之生長培養基組成，將其置於底凝膠層之頂端上。使此溶液於室溫固化及於37°C在10%CO₂大氣中培養。24小時後，加入0.5毫升培養基與適當抗體處理以保持其潮濕並將培養皿於37°C在10%CO₂大氣中再培養7-10天。將培養基取出並更換成0.5毫升之1 mg/ml對-碘硝基四唑紫於PBS 48小時。利用ETC3000軟體(Engineering Technology Center)以ROBOT(Ludel Electronics, Ltd.)計算細胞株數量。

此等實驗證實抗-c-Met抗體抑制軟凝膠中的細胞生長之增殖。軟凝膠生長(表4)顯示對抗體13.3.2；9.1.2；8.70.2及8.90.3之軟凝膠細胞增殖的抑制IC₅₀。

實例VII

以抗-c-Met抗體抑制細胞中c-Met相關的細胞形態改變
當生長於MATRIGEL™(Becton-Dickinson)中(一種含有

基底膜成分之細胞外間質材料)，在HGF存在中，表現c-Met的HepG2細胞形成管狀結構。利用HepG2細胞進行分析以測量管子形成(管狀形態發生)及其抑制當將細胞生長於HGF存在中及以抗-c-Met抗體處理。

將兩毫升培養基-MATRIGEL™溶液(MATRIGEL™(Becton-Dickinson)稀釋於Opti-MEM I(Invitrogen)、10%熱去活性FBS、2 mM L-麩醯胺酸、及1X青黴素/鏈黴素)置入35毫米(mm)組織培養盤中。在培養基-MATRIGEL™溶液固化後，將1毫升補充10%血清及40,000個HepG2細胞的培養基加入。接下來，將HGF(最終濃度50 ng/ml)及/或c-Met抗體(最終濃度1、5或10 微克/ml)加至培養基。使細胞於37°C在10%CO₂大氣中生長4天。4天終了時，將上層培養基取出並將0.5毫升之1 mg/ml對-碘硝基四唑紫於PBS 加入48小時。將染色的35 mm盤照相並利用ImagePro(Media Cybernetics, Silver Spring, MD)分析。

此等實驗證實相較於控制組樣品，當表現c-Met的細胞生長於HGF存在下，抗-c-Met抗體抑制c-Met相關的管狀形態改變。表4顯示對抗體9.1.2；8.70.2及8.90.3以1微克/毫升濃度之管狀形態發生的抑制。

實例 VIII

藉BIACORE™決定抗-c-Met單株抗體之親和常數(K_D)

利用BIACORE™300儀器(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.)，依照製造商的程序，利用表面電漿共振決定純化的抗體之結合親合力。

將實驗進行於BIACORE™3000儀器於25℃含0.0005% Tween-20之Dulbecco's磷酸緩衝的鹽水中。蛋白質濃度係由沉降速度實驗或藉測量樣品於280 nm波長利用衍生自胺基酸序列之理論消光係數而得到。為了測量抗體結合至固定的抗原之實驗，藉標準直接胺耦合程序將220共振單位(RU, resonance units)c-Met ECD-Fc(人類或食蟹猴)固定於B1晶片(BIACORE™)。將抗體樣品對13.3.2；8.70.2及8.90.3以 $0.67 \mu\text{M}$ 及對9.1.2以 $0.23 \mu\text{M}$ 製備。將此等樣品連續稀釋3倍至8.5 nM或2.8 nM成大約100倍範圍濃度。對各濃度，將樣品以二重複用5微升/分鐘流量注入4分鐘。將分解監測2000秒。利用BIACORE™ Biavel軟體，數據總體套用符合簡單1:1結合模型。此外，為了決定 k_{off} 無關任何可能誤差於活性濃度或套用模型，將分解數據總體及獨立地自結合數據套用至簡單分解模型。於所有的情況中，使用此方法來得到 k_{off} 及發現其良好比較至由結合及分解數據之總體套用符合所得的數據。

表5顯示以抗體13.3.2；8.70.2及8.90.3及9.1.2產生的 K_D 及 k_{off} 數據。

表5

	13.3.2	9.1.2	8.70.2	8.90.3	13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T
K_D (M) (人)	2.2×10^{-10}	8.2×10^{-10}	3.3×10^{-10}	5.3×10^{-10}	2.0×10^{-10}
k_{off} (1/s) (人)	1.5×10^{-4}	6.8×10^{-5}	6.1×10^{-5}	1.5×10^{-4}	1.8×10^{-4}
K_D (M) (食蟹猴)	6.0×10^{-10}	1.1×10^{-9}	3.2×10^{-10}	1.22×10^{-9}	6.1×10^{-10}
k_{off} (1/s) (食蟹猴)	2.9×10^{-4}	9.8×10^{-5}	6.5×10^{-5}	2.5×10^{-4}	4.0×10^{-4}

實例 IX

以流式細胞儀決定抗-c-Met單株抗體之親和常數(K_D)

利用BD™ Biosciences LSR流式細胞儀，根據製造商的程序，藉由流式細胞儀決定純化的抗體對人類A549肺癌細胞及食蟹猴腎細胞表面上表現的c-Met之結合親和力。

將生長於培養的細胞用PBS清洗，短暫培養於0.25%胰蛋白-EDTA(Invitrogen)存在下及收集。將收集的細胞於含有0.025%疊氮化鈉及2%熱去活性血清的PBS清洗緩衝液中清洗、沉澱及將 5×10^5 個細胞重新懸浮於500微升相同緩衝液中。藉由培養次飽和濃度之各抗體與細胞，獨立地決定各抗體於室溫達到平衡結合所需的時間為六至八小時之間。接下來，自抗體濃度範圍自0.1 ng/ml至3微克/毫升之螢光強度的幾何平均數決定各抗體之半最大結合(K_D)。將各抗體於室溫與脫離的細胞培養6至8小時，視達到平衡所需的時間而定。將細胞清洗，重新懸浮及培養於500微升之1:500稀釋的生物素化小鼠抗-人類IgG(Jackson Labs)於PBS清洗緩衝液於冰上45分鐘。接下來，將細胞清洗，重新懸浮及與10微克/毫升鏈霉親和素R-藻紅素結合體(Caltag)於200微升PBS清洗緩衝液中於冰上及避光培養15分鐘。將細胞清洗並將訊號以BD Biosciences LSR流式細胞儀，根據製造商的程序偵測。

此等實驗證實說明的抗-c-Met抗體各以可比較的親和力結合至表現於細胞表面上之人類及食蟹猴c-Met(見表6)。

表 6

	13.3.2	9.1.2	8.70.2	8.90.3	13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T
K_D (M) (人)	3.93×10^{-11}	1.69×10^{-10}	4.07×10^{-11}	2.60×10^{-11}	5.60×10^{-11}
k_{off} (1/s) (人)	ND	ND	ND	ND	ND
K_D (M) (食蟹猴)	4.86×10^{-11}	1.68×10^{-10}	5.53×10^{-11}	3.93×10^{-10}	7.33×10^{-11}
k_{off} (1/s) (食蟹猴)	ND	ND	ND	ND	ND

實例 X

活體內以抗-c-Met抗體抑制腫瘤生長

實施活體內分析以測量以抗c-Met抗體治療後實體腫瘤之腫瘤生長抑制。

將S114、U87(人類膠質母細胞瘤細胞)、GTL-16(人類胃腫瘤細胞)及A549(人類肺癌上皮細胞)維持於補充10%熱去活性FBS(Invitrogen)、2 mM L-麩醯胺酸(Invitrogen)、及1%[體積/體積]青黴素(1,000單位/毫升)-鏈黴素(1,000微克/毫升)(Invitrogen)之DMEM(Invitrogen)中於37°C/10%CO₂組織培養箱中。為了以腫瘤細胞接種無胸腺(Athymic)(nu/nu)小鼠，使用0.25%胰蛋白酶於1 mM EDTA來自其組織培養瓶取出腫瘤細胞。將細胞計數及以Hank's緩衝鹽水溶液稀釋。利用1.0-5.0×10⁶個腫瘤細胞於最終體積為0.2毫升Hank's緩衝鹽水溶液，將腫瘤細胞皮下接種至各動物對象中。一旦腫瘤達到100-200 mm³大小(對S114及U87腫瘤為接種後第5天，對A549腫瘤約15-20天，及對GTL-16腫瘤約6天)，注入200微升抗體溶液。抗體係儲存於20 mM醋酸鈉(pH=5.5)、140 mM NaCl中並以無菌磷酸緩衝的鹽水稀釋至理想抗體

濃度。將100微克或200微克抗體注入各實驗動物對象之腹膜內(IP, intraperitoneal)腔。將媒介溶液給予至控制組動物。IP給予抗體溶液後每兩至三天利用卡尺測量小鼠中的腫瘤大小直到實驗終止。

此等實驗證實與控制組動物比較所有抗-c-Met抗體於活體內抑制實體腫瘤之生長。再者，藉由利用不同濃度抗體，決定由抗體13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3及13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T抑制腫瘤生長百分比(見表7)。於整理於表7中的實驗中，將所有抗體以單一腹膜內劑量給予，除了承受A549腫瘤動物之41天實驗，其包含四次劑量抗體，及承受GTL-16腫瘤動物之21天實驗，其包含二次劑量抗體。使用的劑量為200微克對S114腫瘤，100微克對U87腫瘤，200微克對A549腫瘤及200微克對GTL-16腫瘤。括弧中的數字相當於200微克劑量13.3.2於U87模型。ND為於顯示的實驗中未做。

表 7

腫瘤 類型： 抗體：	%抑制 (腫瘤體積)			
	S114 (第12天)	U87 (第17天)	A549 (第41天)	GTL-16 (第21天)
9.1.2	77.2	61.4	40.6	ND
13.3.2	99.1	74.2 (83.1)	45.9	ND
8.70.2	83.2	ND	ND	ND
8.90.3	94.8	49.0	ND	ND
13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T	ND	ND	ND	55.7

實例 XI

促效劑活性與抗-c-Met抗體

在無HGF刺激下由抗c-Met抗體活化c-Met

測量無HGF存在中以抗-c-Met抗體培養之細胞中c-Met的活性以決定本發明c-Met抗體之促效劑活性。藉由測量c-Met的磷酸化，使用ELISA來決定視否c-Met於細胞中受活化。將0.01-10微克/毫升之間的抗體加至如實例IV說明植入的A549細胞中，除了細胞不以HGF刺激。將A549細胞分解液如實例IV中所述製備。如實例IV中所述實施ELISA。

此等實驗證實與未以抗-c-Met抗體或HGF培養的細胞比較，在無HGF存在中，測試的三種抗體顯示微弱、大約2-3倍活化c-Met(見表4)；然而，抗體9.1.2顯示較高倍活化。

在無HGF存在下以抗c-Met抗體處理的細胞中c-Met相關的細胞形態改變

實施管狀形態發生分析以測量抗-c-Met抗體促效劑活性。如實例VII中所述實施分析，除了將細胞生長於無HGF下及以抗-c-Met抗體(1、10及50微克/毫升)處理。如實例VII中所述決定管狀形態發生之量。此分析顯示測試的三種抗-c-Met抗體具有弱至中等促效劑活性。表4顯示促效劑活性之量如測量對抗體9.1.2；8.70.2及8.90.3之管狀形態發生。

實例 XII

活體內以抗-c-Met抗體抑制c-Met磷酸化及引發c-Met分解

我們決定活體內抗c-Met抗體對c-Met的磷酸化狀態及蛋白質量之影響。根據V.A.Pollack等人之方法("以CP-358,774於人類癌細胞中抑制上皮生長因子受體相關的酪胺酸磷酸化：於無胸腺小鼠中原位受體抑制之動力學及抗腫瘤效果

"J. Pharmacol. Exp. Ther. 291:739-748(1999))將人類腫瘤細胞導入無胸腺小鼠造成異種移植腫瘤的形成。

將U87人類膠質母細胞瘤細胞(5×10^6)皮下注射入3-4週大無胸腺(nu/nu)小鼠，及隨後將本發明之抗-c-Met抗體腹膜內注射入小鼠懷有已建立的腫瘤中(大約 300 mm^3)。於抗體注射後不同時間(1、3、6、12、24、48、72、96、168、及216小時)將腫瘤取出並產生均質液(1毫升分解緩衝液/100毫克腫瘤重)以便評估c-Met磷酸化及蛋白質量。將含有兩毫克蛋白質之分解液以25微升對c-Met專一的sc-10瓊脂糖膠珠(agarose beads)(Santa Cruz)於 4°C 免疫沉澱2小時。將珠清洗並將結合的蛋白質以於拉米尼(Laemmli)樣品緩衝液煮沸5分鐘而沖提出並利用4-12%梯度NovexTM膠以SDS-PAGE分離。而後將免疫捕捉的蛋白質電點漬至 $0.45 \mu\text{M}$ PVDF膜(Invitrogen)。將膜於室溫於3%BSA於PBS-T(0.5% Tween20)阻斷1小時並以抗-磷酸酪胺酸專一的抗體PY100(Cell Signaling Technology)偵測，接著以抗小鼠IgG-HRP以偵測磷酸化Met或sc-10-HRP(Invitrogen)以偵測總Met蛋白質。以ECL試劑(Amersham Biosciences)顯影訊號並由曝光放射線照相底片(Kodak)而偵測。

圖5顯示隨時間血清13.3.2L- A91T, H-E42K, S97T抗體量、磷酸化c-Met量及總c-Met蛋白質量。此實驗證實降低的磷酸化c-Met及總c-Met蛋白質量與抗體有關及c-Met抑制之程度與抗體之血清濃度為劑量成比例。

實例 XIII

抗原決定部位繪圖研究

利用ELISA方式進行競爭實驗以界定由本發明抗體辨識的抗原決定部位種類。

將96孔盤的孔以50微升/孔之0.5微克/毫升人類Met ECD-Fc母液於0.1 M NaHCO₃緩衝液，pH 9.6 於4°C塗佈隔夜或37°C塗佈2小時。將盤於PBS，0.05% Tween-20(PBS-T)清洗及以200微升/孔之阻斷緩衝液(PBS含0.5%BSA、0.1% Tween-20、及0.01%硫柳汞(Thimerosal))於室溫阻斷1小時。清洗後，將100微升不同濃度(15、5、1.7、及0.6微克/毫升)抗體於阻斷緩衝液中加入並將盤於室溫培養1小時。接下來，將100微升83 pg/ml生物素化抗體(~4生物素/分子)於阻斷緩衝液中之溶液加入，並將盤於室溫培養1小時。清洗後，將鏈霉親和素-HRP加入並將盤於室溫培養15分鐘。加入100微升/孔未稀釋TMB過氧化酶溶液(BioFX Labs)後之顏色顯影指示結合。用100微升/孔未稀釋停止溶液(BioFX Labs)將顏色顯影終止並由在OD_{450nm}測量而定量。

此等實驗證實單株抗體13.3.2、13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T、8.70.2及8.90.3結合至共同抗原決定部位(bin1)於c-Met的細胞外區塊及單株抗體9.1.2結合至不同抗原決定部位(bin 2)。

將本說明書中引用的所有文獻及專利申請案以參考資料併於本文中，猶如將個別的文獻及專利申請案明確地及獨立地指示為以參考資料併於本文中。雖然為了了解清楚的目的，藉由舉例及實例已將前述發明於一些細節說明，對

熟悉本技藝者將輕易了解按照本發明之教導可做某些改變及修飾而不離隨附專利申請之精神或範圍。

【圖式簡單說明】

圖 1A 及 1B 顯示抗 -c-Met 抗體抑制配體結合至分離的 c-Met ECD/Fc 蛋白質及抑制細胞中以 HGF 刺激後之 c-Met 磷酸化。

圖 1A 為曲線圖說明以本發明之抗 c-Met 單株抗體抑制配體的結合。抗 -c-Met 單株抗體 13.3.2L-A91T、H-E42K、S97T 及 13.3.2 結合至 c-Met 受體及抑制 HGF 結合。

圖 1B 為曲線圖說明於 c-Met 磷酸化 ELISA 中之抑制。抗 -c-Met 單株抗體 13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T 及 13.3.2 抑制細胞中以 HGF 刺激後之 c-Met 酪胺酸磷酸化，如由 c-Met 磷酸化 ELISA 測量。

圖 2 為曲線圖說明抗 c-Met 單株抗體專一性。抗 IGF-1R 單株抗體 2.13.2 及 2.12.1 結合至 IGF-1R 並造成以 IGF-1 處理後 IGF-1R 之酪胺酸磷酸化降低。抗 -c-Met 抗體 9.1.2 及 13.3.2 不結合至 IGF-1R，即使於高濃度抗體，且不造成 IGF-1R 之酪胺酸磷酸化降低。

圖 3A-3H 為來自四個抗 c-Met 抗體輕及重鏈可變區塊之預測胺基酸序列與相對應人類基因之生殖系胺基酸序列比較之序列比對。抗體序列與生殖系序列之間的差異由抗體序列之陰影代表。於各比對中劃底線的序列由左至右代表生殖系訊號胜肽、CDR1、CDR2、及 CDR3 序列。

圖 3A 顯示抗體 13.3.2 之輕鏈預測的胺基酸序列 (SEQ ID

NO:4, 其中X₈為丙胺酸)及13.3.2L-A91T變體之輕鏈預測的胺基酸序列(SEQ ID NO:4, 其中X₈為羥丁胺酸(Threonine))對生殖系L5Vκ1, Jκ4序列(SEQ ID NO:17)之比對。

圖3B顯示抗體9.1.2之輕鏈預測的胺基酸序列(SEQ ID NO:8)對生殖系A27Vκ3, Jκ2序列(SEQ ID NO:18)之比對。

圖3C顯示抗體8.70.2之輕鏈預測的胺基酸序列(SEQ ID NO:12)對生殖系L5Vκ1, Jκ3序列(SEQ ID NO:19)之比對。

圖3D顯示抗體8.90.3之輕鏈預測的胺基酸序列(SEQ ID NO:16)對生殖系L5Vκ1, Jκ1序列(SEQ ID NO:20)之比對。

圖3E顯示抗體13.3.2之重鏈預測的胺基酸序列(SEQ ID NO:2, 其中X₂為麩胺酸、X₄為絲胺酸及X₆為丙胺酸); 13.3.2H-E42K之重鏈預測的胺基酸序列(SEQ ID NO:2, 其中X₂為離胺酸、X₄為絲胺酸及X₆為丙胺酸); 13.3.2H-E42K, S97T之重鏈預測的胺基酸序列(SEQ ID NO:2, 其中X₂為離胺酸、X₄為羥丁胺酸及X₆為丙胺酸); 13.3.2H-A14P之重鏈預測的胺基酸序列(SEQ ID NO:2, 其中X₂為麩胺酸、X₄為絲胺酸及X₆為脯胺酸); 13.3.2H-A14P, E42K之重鏈預測的胺基酸序列(SEQ ID NO:2, 其中X₂為離胺酸、X₄為絲胺酸及X₆為脯胺酸); 及13.3.2H-A14P, E42K, S97T之重鏈預測的胺基酸序列(SEQ ID NO:2, 其中X₂為離胺酸、X₄為羥丁胺酸及X₆為脯胺酸)對生殖系V_H1-18, D2-15, J_H4b序列(SEQ ID NO:21)之比對。

圖3F顯示抗體9.1.2之重鏈預測的胺基酸序列(SEQ ID NO:6)對生殖系V_H4-31, D2-2, D7-24, J_H6b序列(SEQ ID

NO:22)之比對。

圖 3G 顯示抗體 8.70.2 之重鏈預測的胺基酸序列 (SEQ ID NO:10) 對生殖系 V_H4-39, D2-2, J_H4b 序列 (SEQ ID NO:23) 之比對。

圖 3H 顯示抗體 8.90.3 之重鏈預測的胺基酸序列 (SEQ ID NO:14) 對生殖系 V_H3-48, 4-17, J_H4b 序列 (SEQ ID NO:24) 之比對。

圖 4A-4E 顯示抗 -c-Met 抗體於活體內抑制腫瘤生長。沿 x 軸之箭號代表給予的抗 c-Met 抗體劑量。

圖 4A 顯示實驗之結果證實抗 -c-Met 抗體抑制 3T3-S114 腫瘤之生長。

圖 4B 顯示實驗之結果證實抗 -c-Met 抗體抑制 U87 腫瘤之生長。

圖 4C 顯示實驗之結果證實抗 -c-Met 抗體抑制 A549 腫瘤之生長。

圖 4D 顯示實驗之結果證實抗 -c-Met 抗體抑制 GTL-16 腫瘤之生長。

圖 4E 顯示實驗之結果證實抗 -c-Met 抗體 13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T 以劑量相關的方式抑制 U87 腫瘤之生長。

圖 5 顯示抗 -c-Met 抗體 13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T 血清濃度及抑制 c-Met 活性之間的關係。圖 5 也顯示抗 -c-Met 抗體 13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T 血清濃度及於 U87 腫瘤中 c-Met 向下調節之間的關係。

圖 6A-6P 為來自四種抗 -c-Met 抗體之完整長度重及輕鏈

核苷酸及預測的胺基酸序列。對各重或輕鏈序列之訊號胜肽以劃底線的小寫字母標出。對各重或輕鏈序列之CDR1、CDR2及CDR3序列以劃底線的大寫字母標出。對各序列之可變區塊以大寫字母標出。對各序列之固定區域以小寫字母標出。

圖 6A 顯示 13.3.2 重鏈 DNA 序列 (SEQ ID NO:1)。

圖 6B 顯示 13.3.2 重鏈蛋白質序列 (SEQ ID NO:2)。

圖 6C 顯示 13.3.2 輕鏈 [κ 鏈] DNA 序列 (SEQ ID NO:3)。

圖 6D 顯示 13.3.2 輕鏈 [κ 鏈] 蛋白質序列 (SEQ ID NO:4)。

圖 6E 顯示 9.1.2 重鏈 DNA 序列 (SEQ ID NO:5)。

圖 6F 顯示 9.1.2 重鏈蛋白質序列 (SEQ ID NO:6)。

圖 6G 顯示 9.1.2 輕鏈 [κ 鏈] DNA 序列 (SEQ ID NO:7)。

圖 6H 顯示 9.1.2 輕鏈 [κ 鏈] 蛋白質序列 (SEQ ID NO:8)。

圖 6I 顯示 8.70.2 重鏈 DNA 序列 (SEQ ID NO:9)。

圖 6J 顯示 8.70.2 重鏈蛋白質序列 (SEQ ID NO:10)。

圖 6K 顯示 8.70.2 輕鏈 [κ 鏈] DNA 序列 (SEQ ID NO:11)。

圖 6L 顯示 8.70.2 輕鏈 [κ 鏈] 蛋白質序列 (SEQ ID NO:12)。

圖 6M 顯示 8.90.3 重鏈 DNA 序列 (SEQ ID NO:13)。

圖 6N 顯示 8.90.3 重鏈蛋白質序列 (SEQ ID NO:14)。

圖 6O 顯示 8.90.3 輕鏈 [κ 鏈] DNA 序列 (SEQ ID NO:15)。

圖 6P 顯示 8.90.3 輕鏈 [κ 鏈] 蛋白質序列 (SEQ ID NO:16)。

序列表

<110> ABGENIX, INC.

輝瑞產品公司(PFIZER PRODUCTS INC.)

MICHAUD, NEIL R., 等人

<120> 針對 c-MET 之抗體

<130> ABX-PF5 PCT

<140> 093123241

<141> 2004-08-03

<150> US 60/492,432

<151> 2003-08-04

<160> 34

<170> PatentIn 3.2 版

<210> 1

<211> 1389

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 1

```

atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcas caacaggtgc ccaactcccag 60
gttcagctgg tgcagctctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120
tgcraggctt ctggttacac ctttaccagc tatggtttca gctgggtgcy acaggcccct 180
ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc agcgttcca atggtaacac atactatgca 240
cagaagctcc agggcagagt caccatgacc acagacacat ccacgagcw agcctacatg 300
gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcyag agtctacgcc 360
gactacgctg actactgggg ccagggaaacc ctggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag 420
ggcccacggt tcttccccct ggcgcccctg tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 480
ctgggctgcc tggccaagga ctacttcccc gaaccgggtg cgggtgctgt gaactcaggc 540
gctctgacca gcggcgtgca caccttcccc agtctcctac agtctcctcagg actctactcc 600
ctcagcagcy tggtgaccgt gccctccagc aacttcggca cccagaccta cacctgcaac 660
gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagacag ttgagcgcga atgttgtgtc 720
gagtgcccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttccct ctcccccca 780
aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcyt ggtggtggac 840
gtgagccacg aagaccccga ggtccagttc aactggtagc tggacggcgt ggaggtgcat 900
aatgccaaaga caaagccagc ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 960
ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1020
aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaggggca gccccgagaa 1080
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1140
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1200
cagccggaga acaactaaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcttctctc 1260
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1380
ggtaaata 1389

```

<210> 2

<211> 462

<212> PRT

<213> 現代人

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)

<223> Glu 或 Lys

<220>

<221> MOD_RES

<222> (42)

<223> Ser 或 Thr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (97)

<223> Ala 或 Pro

<400> 2

Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Ser	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ala	Xaa	Thr	Gly
1				5					10					15	
Ala	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
			20					25					30		
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Xaa	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
		35					40					45			
Thr	Ser	Tyr	Gly	Phe	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Ser	Ala	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Ala
65					70					75					80
Gln	Lys	Leu	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser
				85					90					95	
Xaa	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Tyr	Ala	Asp	Tyr	Ala	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
		115					120					125			
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
	130					135					140				
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala
145					150					155					160
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
				165					170					175	
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
			180					185					190		
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
		195					200					205			
Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys
	210					215					220				
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val
225					230					235					240
Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
				245					250					255	

<212> PRT

<213> 現代人

<220>

<221> MOD_RES

<222> (91)

<223> Ala 或 Thr

<400> 4

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1          5          10
Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
          20          25          30
Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
          35          40          45
Gln Gly Ile Asn Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50          55          60
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Lys Ser Gly Val
 65          70          75          80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Xaa Asp Phe Thr Leu Thr
          85          90          95
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
          100          105          110
Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
          115          120          125
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
          130          135          140
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
          145          150          155          160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
          165          170          175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
          180          185          190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
          195          200          205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
          210          215          220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          225          230          235

```

<210> 5

<211> 1443

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 5

atgaaacacc tgtgggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60

gtgcagctgc aggagtctggg cccaggactg gtgaagcctt cacagaccct gtcctcacc 120
 tgcactgtct ctggtggctc catcagcagt ggtgggtact actggagctg gatccgccag 180
 caccagggga agggcctgga gtggattggg tacatctatt acagtgggag cacctactac 240
 aaccctgccc tcaagagctc agttaccata tcagtagaca cgtctaagaa ccagttctcc 300
 ctgaagctga gctctgtgac tgccgcggac acggccgtgt attactgtgc gagagatggg 360
 ccctaggat attgtagtag taccagctgc ccggttaactg gggaatacta ctactacggg 420
 atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct cagcctccac caagggccca 480
 tcggtcttcc ccctggcgcc ctgctccagg agcacctccg agagcacagc ggccctgggc 540
 tgctgtgca aggactactt ccccgaaccg gtgacgggtg cgtggaactc aggcgtctctg 600
 accagcggcg tgcacacctt cccagctgtc ctacagtcct caggactcta ctccctcagc 660
 agcgtgggtga ccgtgccctc cagcaacttc ggcacccaga cctacacctg caacgtagat 720
 cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag acagttgagc gcaaagtgtg tgtcgagtgc 780
 ccaccgtgcc cagcaccacc tgtggcagga ccgtcagctt tcctcttccc cccaaaaccc 840
 aaggacacc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacgt gcgtgggtgg ggacgtgagc 900
 cacgaagacc ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 960
 aagacaaagc cacgggagga gcagttcaac agcacgttcc gtgtggtcag cgtcctcacc 1020
 gttgtgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaaggc 1080
 ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaaaccaaag ggcagccccg agaaccacag 1140
 gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1200
 ctgggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1260
 gagaacaact acaagaccac acctcccatg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1320
 agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1380
 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacagc cagaagagcc tctcctgtc tccgggtaaa 1440
 tga 1443

<210> 6
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 6
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45
 Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 85 90 95
 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Pro Leu Gly Tyr Cys Ser Ser Thr
 115 120 125
 Ser Cys Pro Val Thr Gly Glu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 130 135 140
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 145 150 155 160

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 165 170 175
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 180 185 190
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 195 200 205
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 210 215 220
 Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 225 230 235 240
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys
 245 250 255
 Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 260 265 270
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 275 280 285
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 290 295 300
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 305 310 315 320
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
 325 330 335
 Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 340 345 350
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 355 360 365
 Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 370 375 380
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 385 390 395 400
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 405 410 415
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 420 425 430
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 435 440 445
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 450 455 460
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475 480

<210> 7
 <211> 711
 <212> DNA
 <213> 現代人

<400> 7
 atggaaaccc cagcgcagct tctcttctct ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc aacaactact tagcctggta ccagcagaaa 180
 cctggccagg ctcccaggct cctcatcttt ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatgata tctcacctat gtacagtttt 360
 ggccagggga ccaagctgga gatgaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 420
 ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480
 ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggtaac 540
 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600
 ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660
 cagggcctga gctcgcctgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta g 711

<210> 8
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 8
 Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 Val Ser Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60
 Pro Arg Leu Leu Ile Phe Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110
 Asp Ile Ser Pro Met Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Met
 115 120 125
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 9
 <211> 1392
 <212> DNA
 <213> 現代人

<400> 9
 atgaagcacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcggctc ccagatgggt cctgtcccag 60
 ctgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtcacctcacc 120
 tgcactgtct ctgggtggctc catcagcagt agtagttact acgggggctg gatccgccag 180
 cccccagggg aggggctgga ttggattggg agtatctatt atagtgggaa cacctactac 240
 aaccctgccc tcaagagtcg agtcaccata tccgtagaca cgtccaagaa ccagttctcc 300
 ctgaagctga gttctgtgac cgccgcagac acggctgtgt attactgtgc gagacatagc 360
 tgggactact ttgactactg ggaccagggg accctgggtca ccgtctctc agcctccacc 420
 aagggcccat cgggtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 480
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540
 ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgcccctc agcaacttcg gcacccagac ctacacctgc 660
 aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 720
 gtcgagtgcc caccgtgccc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctcttcccc 780
 ccaaaaacca aggacacctt catgatctcc cggacccttg aggtcacgtg cgtgggtggtg 840
 gacgtgagcc acgaagacct cgaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900
 cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtgggtcagc 960
 gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020
 aacaaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaagg gcagccccga 1080
 gaaccacagg tgtacacctt gccccatccc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140
 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200
 gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccattg tggactccga cggctccttc 1260
 ttctcttaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320
 tgctccgtga tgcattgagg tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380
 ccgggtaaat ga 1392

<210> 10
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 10
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45
 Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Asp Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 85 90 95
 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Asp
 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
 225 230 235 240
 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 245 250 255
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 305 310 315 320
 Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350
 Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
 405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 11
 <211> 711
 <212> DNA
 <213> 現代人

<400> 11
 atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgggtt cccaggttcc 60
 agatgcgaca tccagatgac ccagctctcca tcttccgtgt ctgcatctgt aggagacaga 120
 gtcaccatca cttgtcgggc gagtcagggt attagcagct ggtagcctg gtatcagcag 180
 aaaccaggga aagcccctaa gctcctgatc tatgctgcat ccagtttgca aagtgggggc 240
 ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
 cagtctgaag attttgcaac ttactattgt caacaggcta acagtttccc aatcactttc 360
 ggccctggga ccaaagtgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 420
 ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgctt gctgaataac 480
 ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggtaac 540
 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600
 ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660
 cagggcctga gctcgcctgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta g 711

<210> 12
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 12
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Ala Asn Ser Phe Pro Ile Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile

115																			
Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp				
130						135					140								
Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn				
145					150					155					160				
Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu				
				165					170					175					
Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp				
			180					185					190						
Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr				
		195					200					205							
Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser				
	210					215					220								
Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys								
225					230					235									

<210> 13
 <211> 1389
 <212> DNA
 <213> 現代人

<400> 13
 atggagttgg ggctgtgctg ggttttcctt gttgctattt tagaaggtgt ccagtgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg ggggggccct gagactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac cttcagtaga tatagcatga attgggtccg ccaggctcca 180
 ggaagggggc tggagtgggt ttcatacatt agtagtagaa gtagtaccat atactacgca 240
 gactctgtga agggccgatt caccatgtcc agagacaatg ccaagaactc actgtatatg 300
 caaatgaaca gcctgagaga cgaggacacg gctgtgtatt actgtggcta cggtgactac 360
 gactactttg actattgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctcage ctccaccaag 420
 ggcccatcgg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 480
 ctgggctgcc tggcaagga ctacttcccc gaaccgggta cgggtgctg gaactcaggc 540
 gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600
 ctcagcagcg tggtagccgt gccctccagc aacttcggca ccagaccta cacctgcaac 660
 gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc 720
 gagtgcccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctt cttcccccca 780
 aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 840
 gtgagccacg aagaccccga ggtccagttc aactggtagc tggacggcgt ggaggtgcat 900
 aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 960
 ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1020
 aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa 1080
 ccacaggtgt acaccctgcc cccatccccg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1140
 acctgctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1200
 cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcttctctc 1260
 ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1380
 ggtaaatga 1389

<210> 14
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 14

Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Arg Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Ser Leu Tyr Met Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Gly Tyr Gly Asp Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 145 150 155 160
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205
 Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 210 215 220
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
 225 230 235 240
 Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
 245 250 255
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 260 265 270
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 275 280 285
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 290 295 300
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
 305 310 315 320
 Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 325 330 335

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 340 345 350

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 355 360 365

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
 405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 15
 <211> 710
 <212> DNA
 <213> 現代人

<400> 15
 atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgggt cccaggttcc 60
 agatgogaca tccagatgac ccagctctcca tcttccgtgt ctgcatctgt aggagacaga 120
 gtcataatca cttgtcgggc gagtcagggt attagcagct ggtagcctg gtatcagcag 180
 aaaccagggg aagcccctaa gctcctgatc tatgctgcat ccagtttgaa aagtgggggtc 240
 ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctgtcaccat cagcagcctg 300
 cagcctgaag attttgcaac ttactatgct aacagtctaa cagtttaccg tggacgttcg 360
 gccaaaggac caaggtggaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgct ttcattctcc 420
 cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg ctgaataact 480
 tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa tcgggtaact 540
 cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcacc 600
 tgacgctgag caaagcagac tacgagaac acaaagtcta cgctgcgaa gtcacccatc 660
 agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 710

<210> 16
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 16
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Lys Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Val Thr
 85 90 95
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110
 Ser Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 17
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 17
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

			100						105					110		
Ala	Asn	Ser	Phe	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	
		115					120					125				

Lys

<210> 18
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 18																
Met	Glu	Thr	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Pro	
1				5					10					15		
Asp	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	
			20					25					30			
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	
		35					40					45				
Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	
	50					55					60					
Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	
65				70						75					80	
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	
				85					90					95		
Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	
			100					105					110			
Gly	Ser	Ser	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
		115					120					125				

<210> 19
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 19																
Met	Asp	Met	Arg	Val	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	
1				5					10					15		
Phe	Pro	Gly	Ser	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	
			20					25					30			
Val	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	
		35					40					45				
Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	
	50					55					60					
Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	
65					70					75					80	
Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	

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

Lys

<210> 20
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 20
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110
 Ala Asn Ser Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125

Lys

<210> 21
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 21
 Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Pro Thr Gly
 1 5 10 15
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

<400> 23

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45
 Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 85 90 95
 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Cys Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 24

<211> 136

<212> PRT

<213> 現代人

<400> 24

Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 25
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：引子

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)
 <223> i

<400> 25
 caggtgcagc tggagcagtc ngg

23

<210> 26
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：引子

<400> 26
 gctgagggag tagagtcctg agga

24

<210> 27
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：引子

<400> 27
 ttctctgatc agaattccta tcatttacct ggagacaggg agag

44

<210> 28
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：引子

<400> 28
 tatctaagct tctagacgcc accatggaca tgaggggtccc cgct

44

<210> 29
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：引子

<400> 29
tatctaagct tctagacgcc accatggaaa ccccagcgca gcttc 45

<210> 30
<211> 43
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：引子

<400> 30
ttctttgatc agaattctca ctaacactct cccctgttga agc 43

<210> 31
<211> 44
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：引子

<400> 31
tatctaagct tctagacgcc accatggact ggacctggag catc 44

<210> 32
<211> 44
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：引子

<400> 32
tatctaagct tctagacgcc accatgaaac acctgtggtt cttc 44

<210> 33
<211> 44
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：引子

<400> 33
tatctaagct tctagacgcc accatgaagc acctgtggtt cttc 44

<210> 34
<211> 44
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：引子

<400> 34
tatctaagct tctagacgcc accatggagt tggggctgtg ctgg 44

五、中文發明摘要：

本發明係關於抗體，其包括專一地結合至c-Met（較佳為人類c-Met）及作用為抑制c-Met之人類抗體及其抗原結合部分。本發明亦關於人類抗-c-Met抗體及其抗原結合部分。本發明亦關於嵌合性、雙專一性、衍生化、單鏈抗體或融合蛋白質部分之抗體。本發明亦關於來自於人類抗-c-Met抗體之分離的重及輕鏈免疫球蛋白，以及編碼此免疫球蛋白之核酸分子。本發明亦關於製造人類抗-c-Met抗體之方法、包含此等抗體之組合物及利用抗體及組合物做診斷及治療之方法。本發明亦提供基因療法，利用編碼組成人類抗-c-Met抗體之重及/或輕鏈免疫球蛋白分子之核酸分子。本發明亦關於包含本發明核酸分子之基因轉殖動物或植物。

六、英文發明摘要：

十、申請專利範圍：

1. 類單株抗體或其抗原結合部分，其專一地結合至c-Met。
2. 如請求項1之人類單株抗體或其抗原結合部分，其中該抗體或部分具有至少一種下列性質：
 - (a)人類細胞；
 - (b)c-Met之選擇性大於其對類胰島素生長因子1受體之選擇性至少100倍；
 - (c) 2×10^{-10} M或以下之 K_D 結合至c-Met；
 - (d)c-Met具有脫離率(k_{off})為 $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 或更小；
 - (e)HGF存在中結合人類c-Met。
3. 如請求項2之人類單株抗體或其抗原結合部分，其中該抗體或部分以 8.2×10^{-10} M或以下之 K_D 結合c-Met，且抑制HGF結合至c-Met。
4. 如請求項1之人類單株抗體或其抗原結合部分，其專一地結合至且抑制人類c-Met，其中抗體或部分具有至少一個性質選自下列群組：
 - (a)13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3；13.3.2H-E42K；13.3.2H-E42K,S97T；13.3.2L-A91T；13.3.2L-A91T,H-E42K；及13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T組成之群組選出的抗體交叉競爭結合至c-Met；
 - (b)13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3；13.3.2H-E42K；13.3.2H-E42K,S97T；13.3.2L-A91T；13.3.2L-A91T,H-E42K；及13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T組成之群組選出的抗體競爭結合至c-Met；

(c)由 13.3.2 ; 9.1.2 ; 8.70.2 ; 8.90.3 ; 13.3.2H-E42K ; 13.3.2H-E42K,S97T ; 13.3.2L-A91T ; 13.3.2L-A91T,H-E42K ; 及 13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T組成之群組選出的抗體結合至 c-Met的相同抗原決定部位 ;

(d)由 13.3.2 ; 9.1.2 ; 8.70.2 ; 8.90.3 ; 13.3.2H-E42K ; 13.3.2H-E42K,S97T ; 13.3.2L-A91T ; 13.3.2L-A91T,H-E42K ; 及 13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T組成之群組選出的抗體以大致相同 K_D 結合至 c-Met ; 及

(e)由 13.3.2 ; 9.1.2 ; 8.70.2 ; 8.90.3 ; 13.3.2H-E42K ; 13.3.2H-E42K,S97T ; 13.3.2L-A91T ; 13.3.2L-A91T,H-E42K ; 及 13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T組成之群組選出的抗體以大致相同脫離率結合至 c-Met ;

5. 一種專一結合 c-Met之單株抗體，其中該抗體包含：

(a)一重鏈，其具有於 SEQ ID NO:2中提出的胺基酸序列並無訊號序列，其中 X_2 為離胺酸及 X_4 為羥丁胺酸，及

(b)一重鏈，其具有於 SEQ ID NO:4中提出的胺基酸序列並無訊號序列，其中 X_8 為羥丁胺酸。

6. 一種專一結合 c-Met之單株抗體，其中該抗體係由下列組成的群組選出：

(a)一抗體，其包含具有於 SEQ ID NO:2中提出的胺基酸序列之重鏈，其中 X_2 為麩胺酸及 X_4 為絲胺酸，及具有於 SEQ ID NO:4中提出的胺基酸序列之輕鏈，其中 X_8 為丙胺酸，兩者皆無訊號序列；

(b)一抗體，其包含具有於 SEQ ID NO:6中提出的胺基酸

序列之重鏈及具有於SEQ ID NO:8中提出的胺基酸序列之輕鏈，兩者皆無訊號序列；

(c)一抗體，其包含具有於SEQ ID NO:10中提出的胺基酸序列之重鏈及具有於SEQ ID NO:12中提出的胺基酸序列之輕鏈，兩者皆無訊號序列；及

(d)一抗體，其包含具有於SEQ ID NO:14中提出的胺基酸序列之重鏈及具有於SEQ ID NO:16中提出的胺基酸序列之輕鏈，兩者皆無訊號序列。

7. 一種一種單株抗體或其抗原結合部分，其專一地結合c-Met，其中：

(a)重鏈包含由13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3；13.3.2H-E42K；13.3.2H-E42K,S97T；及13.3.2H-S97T組成之群組選出的抗體之重鏈CDR1、CDR2及CDR3胺基酸序列；

(b)輕鏈包含由13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3；及13.3.2L-A91T組成之群組選出的抗體之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3胺基酸序列；

(c)抗體包含(a)之重鏈及(b)之輕鏈；及

(d)(c)之抗體其中重鏈及輕鏈CDR胺基酸序列係由13.3.2；9.1.2；8.70.2；8.90.3；13.3.2H-E42K；13.3.2H-E42K,S97T；13.3.2H-S97T；及13.3.2L-A91T組成之群組選出的相同抗體選出。

8. 一種如請求項7之單株抗體或其抗原結合部分，

(a)其中該重鏈包含由13.3.2(SEQ ID NO:2，其中X₂為麩胺酸及X₄為絲胺酸)；9.1.2(SEQ ID NO:6)；8.70.2(SEQ ID

NO:10) ; 8.90.3(SEQ ID NO:14) ; 13.3.2H-E42K ; 13.3.2H-S97T ; 及 13.3.2H-E42K,S97T 組成之群組選出的抗體之重鏈可變區塊的胺基酸序列 ;

(b)其中該輕鏈包含由 13.3.2(SEQ ID NO:4, 其中 X₈為丙胺酸) ; 9.1.2(SEQ ID NO:8) ; 8.70.2(SEQ ID NO:12) ; 8.90.3(SEQ ID NO:16) ; 及 13.3.2L-A91T 組成之群組選出的抗體之輕鏈可變區塊的胺基酸序列 ;

(c)其中該抗體或其部分包含(a)之可變區塊及(b)之可變區塊 ; 或

(d)其中該抗體或其部分包含由 13.3.2(SEQ ID NO:2, 其中 X₂為麩胺酸及 X₄為絲胺酸及 SEQ ID NO:4, 其中 X₈為丙胺酸) ; 9.1.2(SEQ ID NO:6及 8) ; 8.70.2(SEQ ID NO:10及 12) ; 8.90.3(SEQ ID NO:14 及 16) ; 13.3.2H-E42K ; 13.3.2H-S97T ; 及 13.3.2H-E42K,S97T 及 13.3.2L-A91T 組成之群組選出的相同抗體之可變區塊序列。

9. 一種如請求項 1 之專一地結合 c-Met 的單株抗體, 其中抗體係由下列組成的群組選出 :

(a)一抗體, 其包含胺基酸序列說明於 SEQ ID NO:4 中, 其中 X₈為羥丁胺酸及 SEQ ID NO:2, 其中 X₂為離胺酸, X₄為絲胺酸 ;

(b)一抗體, 其包含胺基酸序列說明於 SEQ ID NO:4 中, 其中 X₈為羥丁胺酸及 SEQ ID NO:2, 其中 X₄為羥丁胺酸及 X₂為離胺酸 ;

(c)一抗體, 其包含胺基酸序列說明於 SEQ ID NO:4 中,

其中 X₈ 為 羥 丁 胺 酸 及 SEQ ID NO:2，其中 X₂ 為 麩 胺 酸，X₄ 為 絲 胺 酸；

(d) 一 抗 體，其 包 含 胺 基 酸 序 列 說 明 於 SEQ ID NO:4 中，其中 X₈ 為 丙 胺 酸 及 SEQ ID NO:2，其中 X₂ 為 麩 胺 酸，X₄ 為 羥 丁 胺 酸；

(e) 一 抗 體，其 包 含 胺 基 酸 序 列 說 明 於 SEQ ID NO:4 中，其中 X₈ 為 丙 胺 酸 及 SEQ ID NO:2，其中 X₂ 為 離 胺 酸，X₄ 為 絲 胺 酸；及

(f) 一 抗 體，其 包 含 胺 基 酸 序 列 說 明 於 SEQ ID NO:4 中，其中 X₈ 為 丙 胺 酸 及 SEQ ID NO:2，其中 X₂ 為 離 胺 酸，X₄ 為 羥 丁 胺 酸，所 有 序 列 皆 無 訊 號 序 列。

10. 一 種 醫 藥 組 合 物，其 包 含 如 請 求 項 1 至 9 中 任 一 項 之 抗 體 或 其 抗 原 結 合 部 分 及 醫 藥 上 可 接 受 的 載 體。
11. 一 種 如 請 求 項 1 至 9 中 任 一 項 之 抗 體 或 其 抗 原 結 合 部 分 於 製 造 用 以 治 療 過 度 增 殖 疾 病 於 需 要 的 對 象 之 藥 劑 的 用 途，其 中 該 抗 體 或 部 分 為 c-Met 對 抗 劑。
12. 一 種 如 請 求 項 1 至 9 中 任 一 項 之 抗 體 或 其 抗 原 結 合 部 分 於 製 造 用 以 促 進 傷 口 癒 合 或 組 織 再 生 於 需 要 的 對 象 之 藥 劑 的 用 途，其 中 該 抗 體、抗 原 結 合 部 分 或 醫 藥 組 合 物 活 化 c-Met。
13. 一 種 分 離 的 細 胞 株，其 製 造 請 求 項 1 至 9 中 任 一 項 之 抗 體 或 其 抗 原 結 合 部 分 或 該 抗 體 或 該 部 分 之 重 鏈 或 輕 鏈。
14. 一 種 分 離 的 核 酸 分 子，其 包 含 有 編 碼 請 求 項 1 至 9 中 任 一 項 之 重 鏈 或 其 抗 原 結 合 部 分 或 輕 鏈 或 其 抗 原 結 合 部 分 之

核苷酸序列。

15. 一種載體，其包含有請求項14之核酸分子，其中載體視情況包含一表現控制序列可操作地連結至核酸分子。
16. 一種宿主細胞，其包含有請求項15之載體或請求項14之核酸分子。
17. 一種製造抗-c-Met抗體或其抗原結合部分之方法，其包含於適當條件下培養請求項16之宿主細胞或請求項16之細胞株並回收該抗體或抗原結合部分。
18. 如請求項1之抗體或抗原結合部分，其係選自下列組成的群組：

(a)一抗體，其包含有抗體13.3.2H-E42K之重鏈胺基酸序列及說明於SEQ ID NO:4中輕鏈胺基酸序列，其中X₈為丙胺酸，無訊號序列；

(b)一抗體，其包含有抗體13.3.2H-E42K,S97T之重鏈胺基酸序列及說明於SEQ ID NO:4中輕鏈胺基酸序列，其中X₈為丙胺酸，無訊號序列；

(c)一抗體，其包含有說明於SEQ ID NO:2中胺基酸序列，其中X₂為麩胺酸及X₄為絲胺酸及抗體13.3.2L-A91T之輕鏈胺基酸序列，無訊號序列；

(d)一抗體，其包含抗體13.3.2H-E42K之重鏈胺基酸序列及抗體13.3.2L-A91T之輕鏈胺基酸序列，無訊號序列；
及

(e)一抗體，其包含抗體13.3.2H-E42K,S97T之重鏈胺基酸序列及抗體13.3.2L-A91T之輕鏈胺基酸序列，無訊號序列。

十一、圖式：

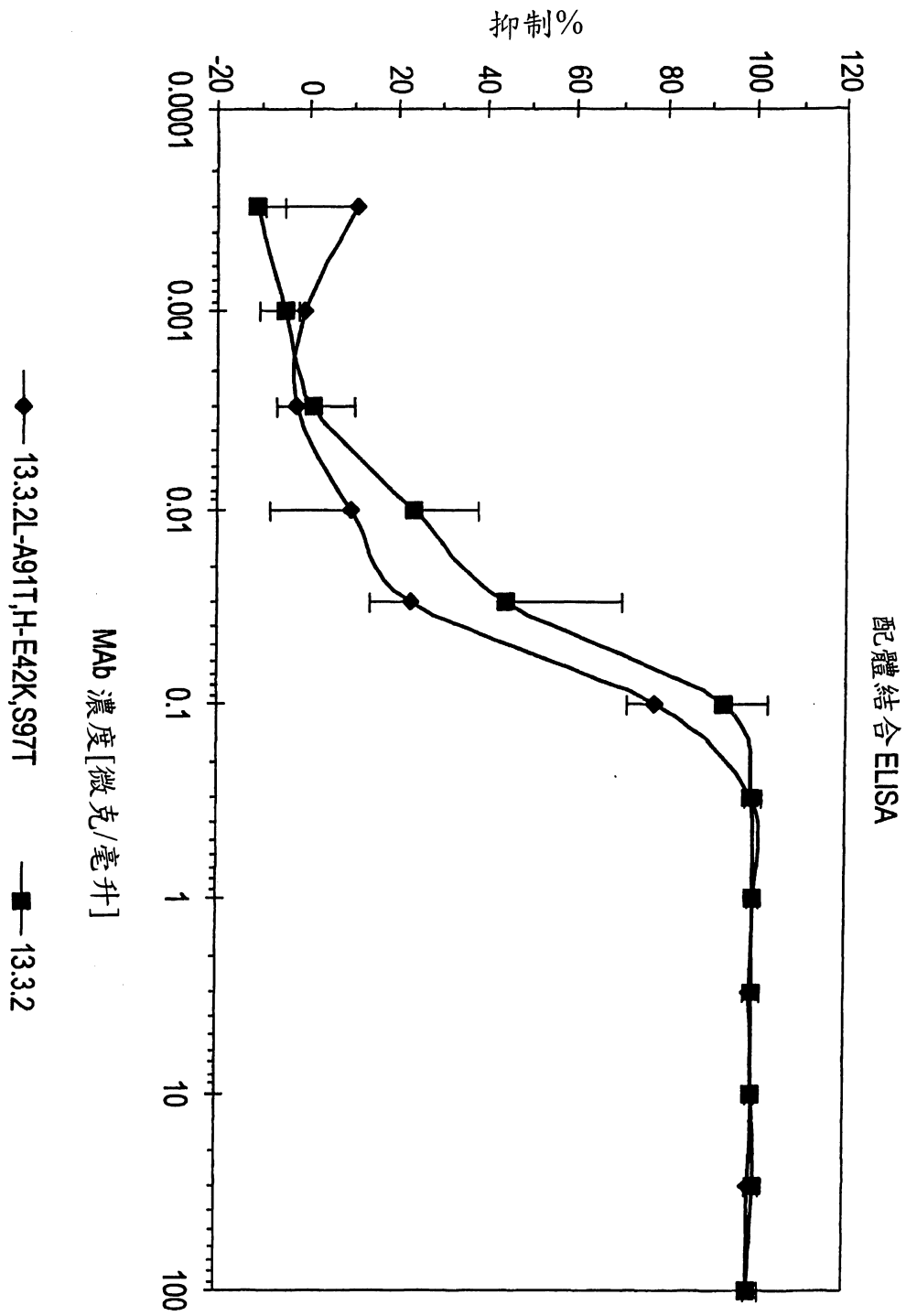


圖 1A

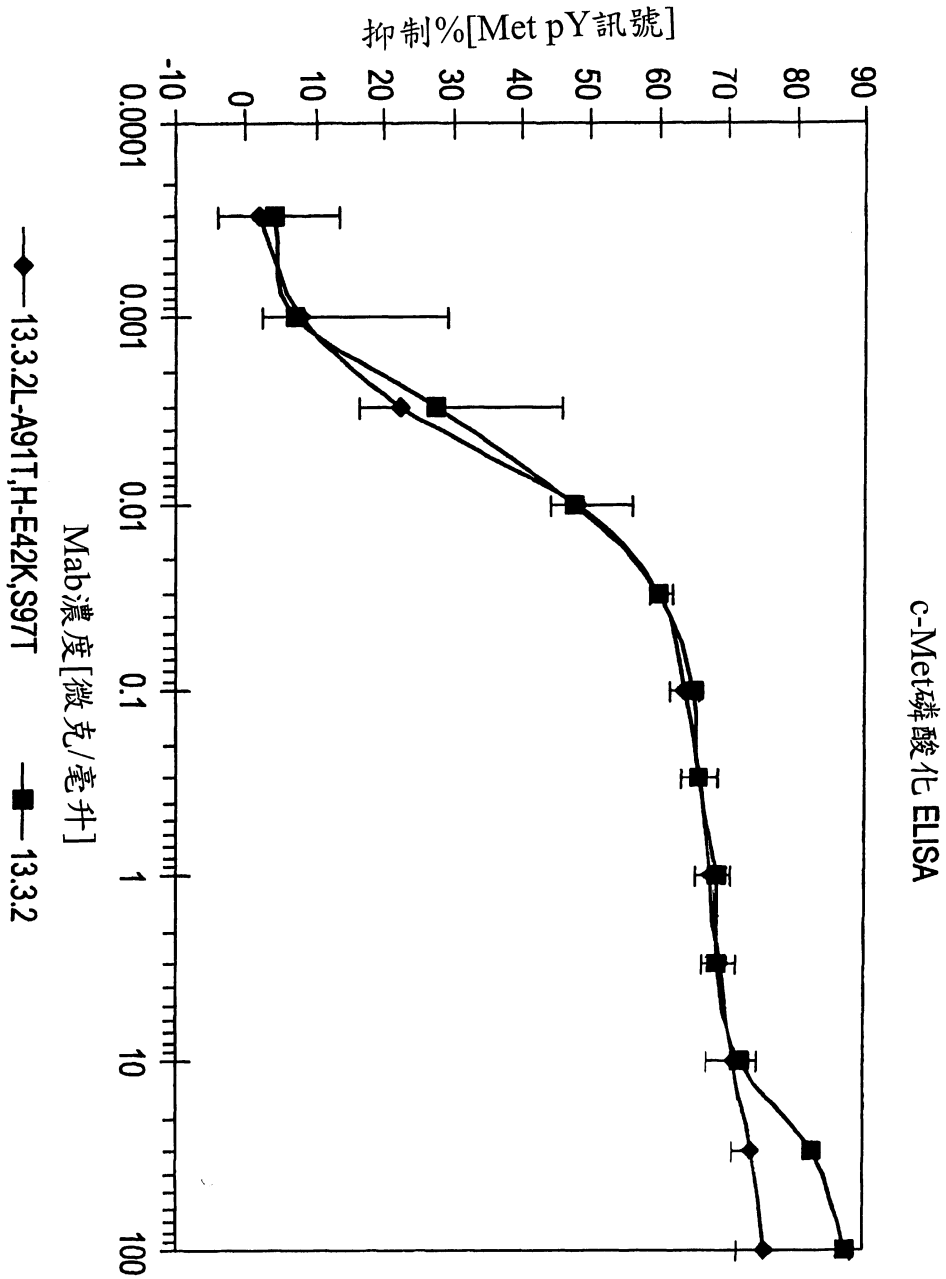


圖 1B

IGF-1R細胞ELISA：
抗-IGF-1R及抗-c-Met抗體

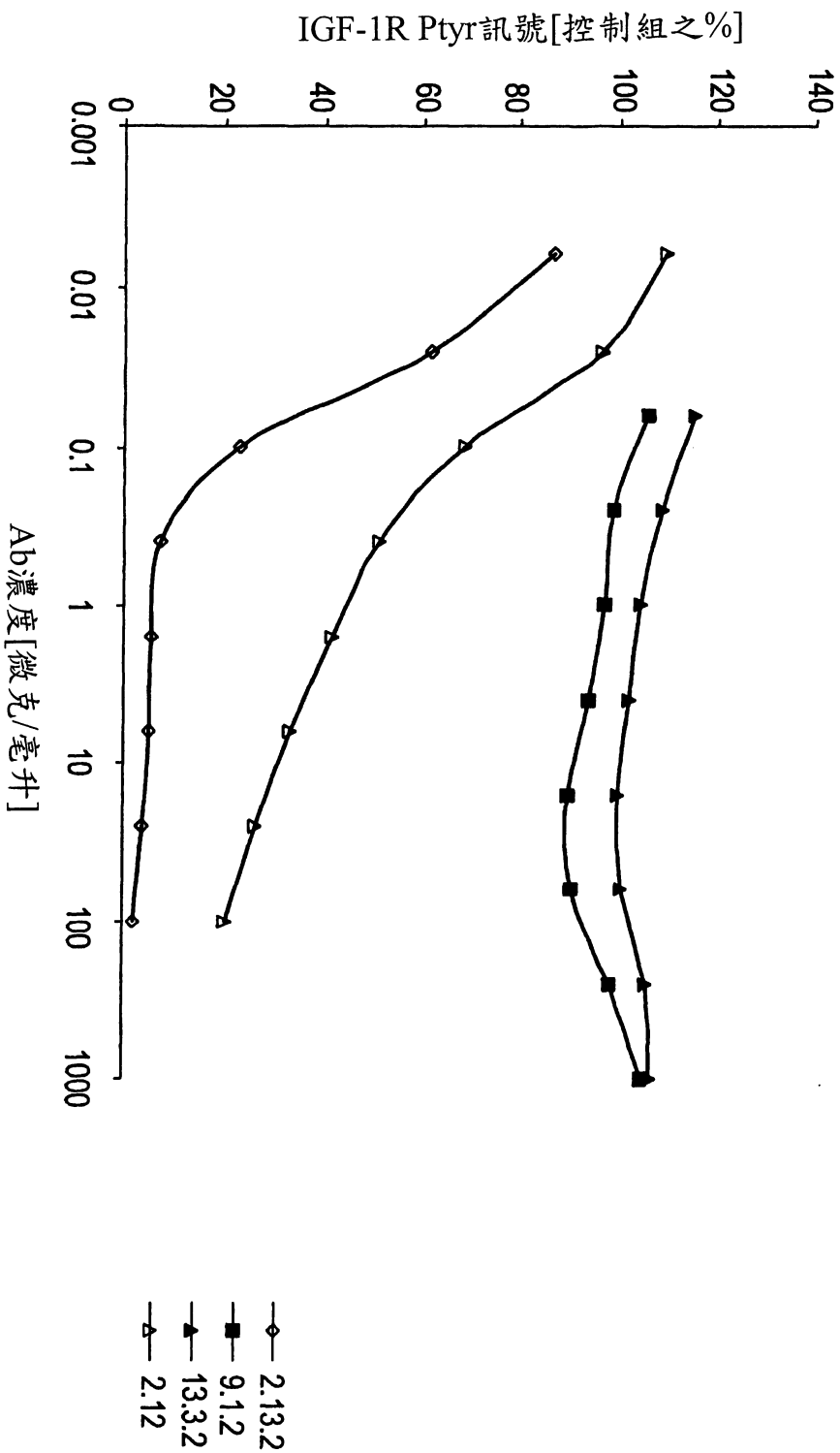


圖 2

圖 3A

生殖系 V=L5, J=JK4
 13.3.2 MDMRVPAGQLLGILLIMFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRAVITTCRASQGIINWLANVYQQRGKAPKLLIYAASSISGVPSPRESGSGSQQDFTLTISSLOPEDEPATVYCCQANSFPLTFGGGTKEIK
 13.3.2 A91T MDMRVPAGQLLGILLIMFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRAVITTCRASQGIINWLANVYQQRGKAPKLLIYAASSISGVPSPRESGSGSQTDFTLTISSLOPEDEPATVYCCQANSFPLTFGGGTKEIK
 生殖細胞 MDMRVPAGQLLGILLIMFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRAVITTCRASQGIINWLANVYQQRGKAPKLLIYAASSISGVPSPRESGSGSQTDFTLTISSLOPEDEPATVYCCQANSFPLTFGGGTKEIK
 訊號胜肽 CDR1 CDR2 CDR3

圖 3B

生殖系 V=A27, J=JK2
 9.1.2 METPAQLLFLILLIMFDPTGCEIVLTQSPGFTISLPGERATLSCRASQGSVSNWLANVYQQRGQAPRLLIYGASSRATGIPDRRESGSGSQTDFTLTISSLEPEDEPAVYCCQYDTSRMVSTGQGTKEIK
 生殖細胞 METPAQLLFLILLIMFDPTGCEIVLTQSPGFTISLPGERATLSCRASQGSVSNWLANVYQQRGQAPRLLIYGASSRATGIPDRRESGSGSQTDFTLTISSLEPEDEPAVYCCQYDTSRMVSTGQGTKEIK
 訊號胜肽 CDR1 CDR2 CDR3

圖 3C

生殖系 V=L5, J=JK3
 8.70.2 MDMRVPAGQLLGILLIMFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRAVITTCRASQGISNHLANVYQQRGKAPKLLIYAASSISGVPSPRESGSGSQTDFTLTISSLOPEDEPATVYCCQANSFPLTFGGGTKEIK
 生殖細胞 MDMRVPAGQLLGILLIMFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRAVITTCRASQGISNHLANVYQQRGKAPKLLIYAASSISGVPSPRESGSGSQTDFTLTISSLOPEDEPATVYCCQANSFPLTFGGGTKEIK
 訊號胜肽 CDR1 CDR2 CDR3

圖 3D

生殖系 V=L5, J=JK1
 8.90.3 MDMRVPAGQLLGILLIMFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRAVITTCRASQGISNHLANVYQQRGKAPKLLIYAASSISGVPSPRESGSGSQTDFTLTISSLOPEDEPATVYCCQANSFPLTFGGGTKEIK
 生殖細胞 MDMRVPAGQLLGILLIMFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRAVITTCRASQGISNHLANVYQQRGKAPKLLIYAASSISGVPSPRESGSGSQTDFTLTISSLOPEDEPATVYCCQANSFPLTFGGGTKEIK
 訊號胜肽 CDR1 CDR2 CDR3

圖 3E

生殖系 V=1-18, D=D2-15, J=JH4b

1
 13.3.2 MDNTMSILFLVAALN¹GAHSQVQ²L³VQSGAEVKKPKASVYVSG⁴ASG⁵YTF⁶SY⁷Q⁸SW⁹ROAPGGGL¹⁰EMNGI¹¹SA¹²NG¹³NT¹⁴Y¹⁵AK¹⁶GRVT¹⁷MT¹⁸DT¹⁹ST²⁰SA²¹MEL²²RS²³LRSD²⁴DTAVYYCAR²⁵V²⁶AD²⁷Y²⁸WGQ²⁹G³⁰TL³¹Y³²V³³SS
 13.3.2 E42K MDNTMSILFLVAALN¹GAHSQVQ²L³VQSGAEVKKPKASVYVSG⁴ASG⁵YTF⁶SY⁷Q⁸SW⁹ROAPGGGL¹⁰EMNGI¹¹SA¹²NG¹³NT¹⁴Y¹⁵AK¹⁶GRVT¹⁷MT¹⁸DT¹⁹ST²⁰SA²¹MEL²²RS²³LRSD²⁴DTAVYYCAR²⁵V²⁶AD²⁷Y²⁸WGQ²⁹G³⁰TL³¹Y³²V³³SS
 13.3.2 E42K, S97T MDNTMSILFLVAALN¹GAHSQVQ²L³VQSGAEVKKPKASVYVSG⁴ASG⁵YTF⁶SY⁷Q⁸SW⁹ROAPGGGL¹⁰EMNGI¹¹SA¹²NG¹³NT¹⁴Y¹⁵AK¹⁶GRVT¹⁷MT¹⁸DT¹⁹ST²⁰SA²¹MEL²²RS²³LRSD²⁴DTAVYYCAR²⁵V²⁶AD²⁷Y²⁸WGQ²⁹G³⁰TL³¹Y³²V³³SS
 13.3.2 A14P MDNTMSILFLVAALN¹GAHSQVQ²L³VQSGAEVKKPKASVYVSG⁴ASG⁵YTF⁶SY⁷Q⁸SW⁹ROAPGGGL¹⁰EMNGI¹¹SA¹²NG¹³NT¹⁴Y¹⁵AK¹⁶GRVT¹⁷MT¹⁸DT¹⁹ST²⁰SA²¹MEL²²RS²³LRSD²⁴DTAVYYCAR²⁵V²⁶AD²⁷Y²⁸WGQ²⁹G³⁰TL³¹Y³²V³³SS
 13.3.2 A14P, E42K MDNTMSILFLVAALN¹GAHSQVQ²L³VQSGAEVKKPKASVYVSG⁴ASG⁵YTF⁶SY⁷Q⁸SW⁹ROAPGGGL¹⁰EMNGI¹¹SA¹²NG¹³NT¹⁴Y¹⁵AK¹⁶GRVT¹⁷MT¹⁸DT¹⁹ST²⁰SA²¹MEL²²RS²³LRSD²⁴DTAVYYCAR²⁵V²⁶AD²⁷Y²⁸WGQ²⁹G³⁰TL³¹Y³²V³³SS
 13.3.2 A14P, E42K, S97T MDNTMSILFLVAALN¹GAHSQVQ²L³VQSGAEVKKPKASVYVSG⁴ASG⁵YTF⁶SY⁷Q⁸SW⁹ROAPGGGL¹⁰EMNGI¹¹SA¹²NG¹³NT¹⁴Y¹⁵AK¹⁶GRVT¹⁷MT¹⁸DT¹⁹ST²⁰SA²¹MEL²²RS²³LRSD²⁴DTAVYYCAR²⁵V²⁶AD²⁷Y²⁸WGQ²⁹G³⁰TL³¹Y³²V³³SS
 生殖細胞 MDNTMSILFLVAALN¹GAHSQVQ²L³VQSGAEVKKPKASVYVSG⁴ASG⁵YTF⁶SY⁷Q⁸SW⁹ROAPGGGL¹⁰EMNGI¹¹SA¹²NG¹³NT¹⁴Y¹⁵AK¹⁶GRVT¹⁷MT¹⁸DT¹⁹ST²⁰SA²¹MEL²²RS²³LRSD²⁴DTAVYYCAR²⁵V²⁶AD²⁷Y²⁸WGQ²⁹G³⁰TL³¹Y³²V³³SS
 訊號胜肽 CDR1 CDR2 CDR3

圖 3F

生殖系 V=4-31, D=D2-2+D7-27, J=JH6b

9.1.2 MKHLN¹FTLLI²VAA³PRN⁴W⁵LSQ⁶LQ⁷ES⁸SG⁹GL¹⁰VK¹¹PK¹²PS¹³ET¹⁴SL¹⁵FC¹⁶W¹⁷SG¹⁸SI¹⁹SS²⁰GG²¹Y²²NS²³NI²⁴RO²⁵PK²⁶GL²⁷EM²⁸IG²⁹TY³⁰SS³¹TY³²NP³³SL³⁴SR³⁵VT³⁶IS³⁷VD³⁸TS³⁹KN⁴⁰Q⁴¹FS⁴²L⁴³KS⁴⁴VT⁴⁵AA⁴⁶DF⁴⁷AVYYCAR⁴⁸---G⁴⁹CS⁵⁰TS⁵¹-⁵²IG⁵³DY⁵⁴Y⁵⁵ED⁵⁶Y⁵⁷WG⁵⁸Q⁵⁹GT⁶⁰LY⁶¹V⁶²SS
 生殖細胞 MKHLN¹FTLLI²VAA³PRN⁴W⁵LSQ⁶LQ⁷ES⁸SG⁹GL¹⁰VK¹¹PK¹²PS¹³ET¹⁴SL¹⁵FC¹⁶W¹⁷SG¹⁸SI¹⁹SS²⁰GG²¹Y²²NS²³NI²⁴RO²⁵PK²⁶GL²⁷EM²⁸IG²⁹TY³⁰SS³¹TY³²NP³³SL³⁴SR³⁵VT³⁶IS³⁷VD³⁸TS³⁹KN⁴⁰Q⁴¹FS⁴²L⁴³KS⁴⁴VT⁴⁵AA⁴⁶DF⁴⁷AVYYCAR⁴⁸---G⁴⁹CS⁵⁰TS⁵¹-⁵²IG⁵³DY⁵⁴Y⁵⁵ED⁵⁶Y⁵⁷WG⁵⁸Q⁵⁹GT⁶⁰LY⁶¹V⁶²SS
 訊號胜肽 CDR1 CDR2 CDR3

圖 3G

生殖系 V=4-39, D=D2-2, J=JH4b

8.70.2 MKHLN¹FTLLI²VAA³PRN⁴W⁵LSQ⁶LQ⁷ES⁸SG⁹GL¹⁰VK¹¹PK¹²PS¹³ET¹⁴SL¹⁵FC¹⁶W¹⁷SG¹⁸SI¹⁹SS²⁰GG²¹Y²²NS²³NI²⁴RO²⁵PK²⁶GL²⁷EM²⁸IG²⁹TY³⁰SS³¹TY³²NP³³SL³⁴SR³⁵VT³⁶IS³⁷VD³⁸TS³⁹KN⁴⁰Q⁴¹FS⁴²L⁴³KS⁴⁴VT⁴⁵AA⁴⁶DF⁴⁷AVYYCAR⁴⁸SC⁴⁹-⁵⁰Y⁵¹ED⁵²Y⁵³WG⁵⁴Q⁵⁵GT⁵⁶LY⁵⁷V⁵⁸SS
 生殖細胞 MKHLN¹FTLLI²VAA³PRN⁴W⁵LSQ⁶LQ⁷ES⁸SG⁹GL¹⁰VK¹¹PK¹²PS¹³ET¹⁴SL¹⁵FC¹⁶W¹⁷SG¹⁸SI¹⁹SS²⁰GG²¹Y²²NS²³NI²⁴RO²⁵PK²⁶GL²⁷EM²⁸IG²⁹TY³⁰SS³¹TY³²NP³³SL³⁴SR³⁵VT³⁶IS³⁷VD³⁸TS³⁹KN⁴⁰Q⁴¹FS⁴²L⁴³KS⁴⁴VT⁴⁵AA⁴⁶DF⁴⁷AVYYCAR⁴⁸SC⁴⁹-⁵⁰Y⁵¹ED⁵²Y⁵³WG⁵⁴Q⁵⁵GT⁵⁶LY⁵⁷V⁵⁸SS
 訊號胜肽 CDR1 CDR2 CDR3

圖 3H

生殖系 V=3-48, D=D4-17, J=JH4b

8.90.3 MELIG¹CW²FL³V⁴ALIEG⁵VQ⁶CE⁷VQ⁸LV⁹ESGG¹⁰AV¹¹Q¹²PPG¹³SL¹⁴RL¹⁵SCAAS¹⁶G¹⁷TF¹⁸SN¹⁹MN²⁰WR²¹Q²²AP²³KG²⁴LE²⁵W²⁶SY²⁷SS²⁸TY²⁹AA³⁰DS³¹V³²K³³RF³⁴SR³⁵DA³⁶AK³⁷NS³⁸Y³⁹Q⁴⁰M⁴¹SL⁴²RD⁴³ED⁴⁴TA⁴⁵YY⁴⁶CG⁴⁷-⁴⁸Y⁴⁹G⁵⁰DY⁵¹ED⁵²Y⁵³WG⁵⁴Q⁵⁵GT⁵⁶LY⁵⁷V⁵⁸SS
 生殖細胞 MELIG¹CW²FL³V⁴ALIEG⁵VQ⁶CE⁷VQ⁸LV⁹ESGG¹⁰AV¹¹Q¹²PPG¹³SL¹⁴RL¹⁵SCAAS¹⁶G¹⁷TF¹⁸SN¹⁹MN²⁰WR²¹Q²²AP²³KG²⁴LE²⁵W²⁶SY²⁷SS²⁸TY²⁹AA³⁰DS³¹V³²K³³RF³⁴SR³⁵DA³⁶AK³⁷NS³⁸Y³⁹Q⁴⁰M⁴¹SL⁴²RD⁴³ED⁴⁴TA⁴⁵YY⁴⁶CG⁴⁷-⁴⁸Y⁴⁹G⁵⁰DY⁵¹ED⁵²Y⁵³WG⁵⁴Q⁵⁵GT⁵⁶LY⁵⁷V⁵⁸SS
 訊號胜肽 CDR1 CDR2 CDR3

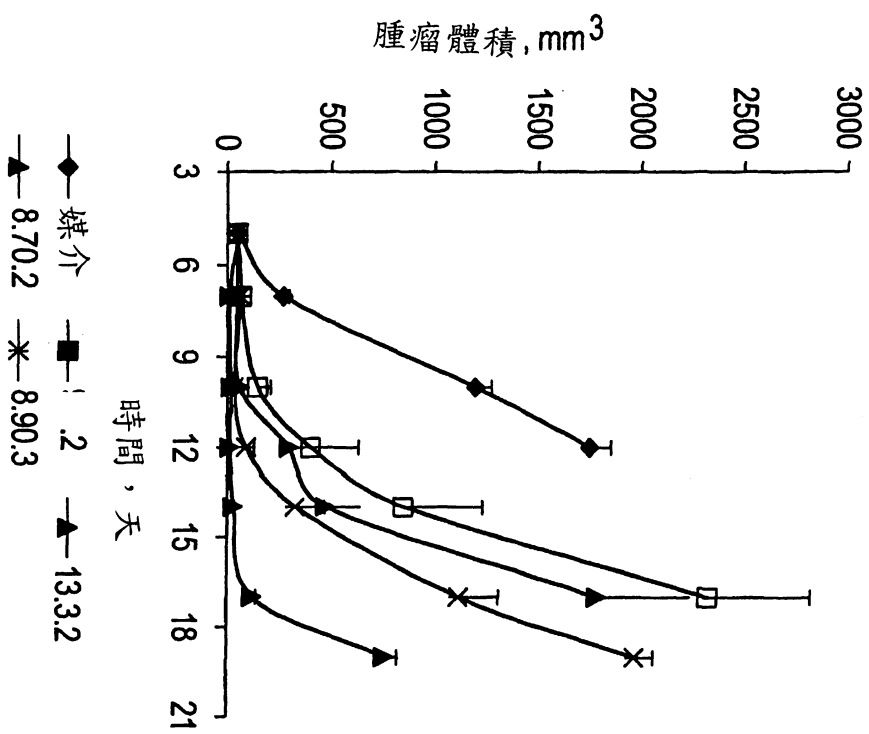


圖4A

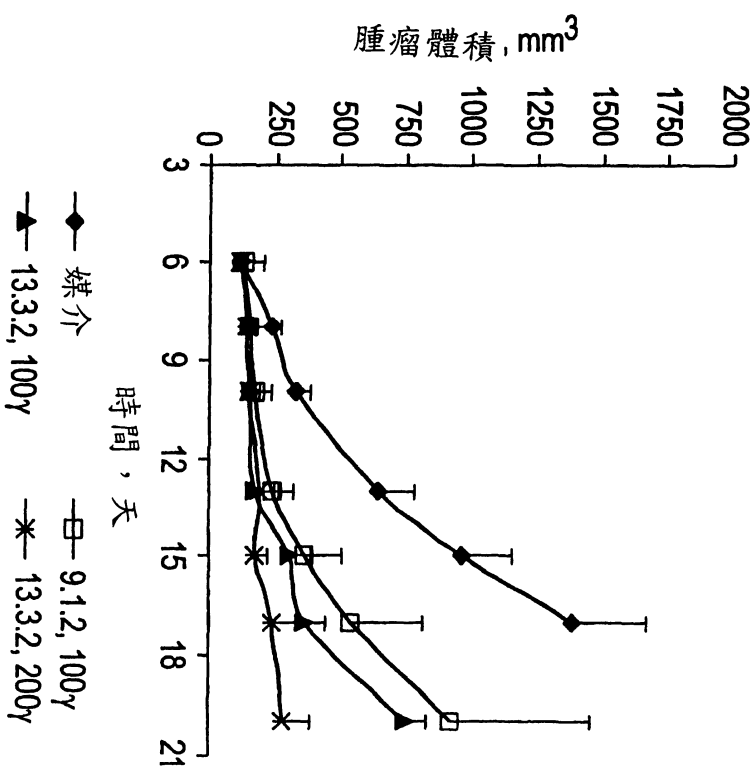


圖4B

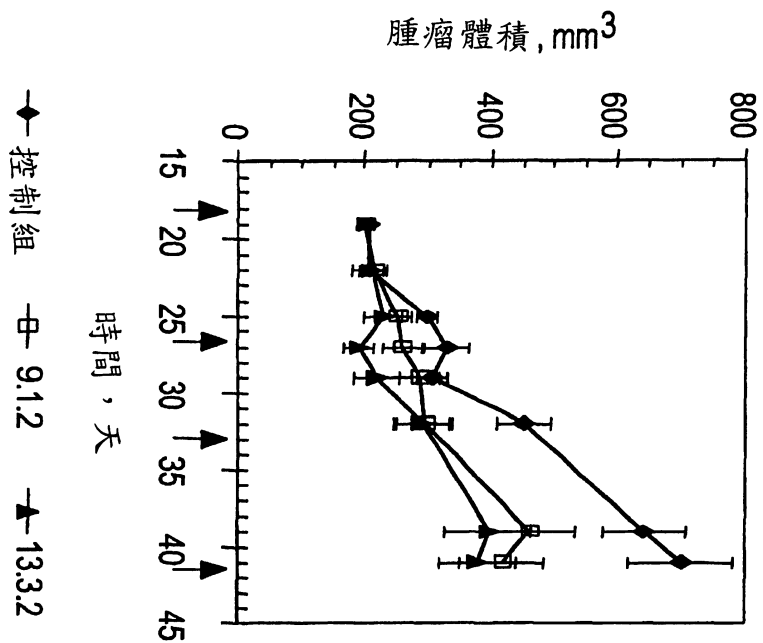


圖4C

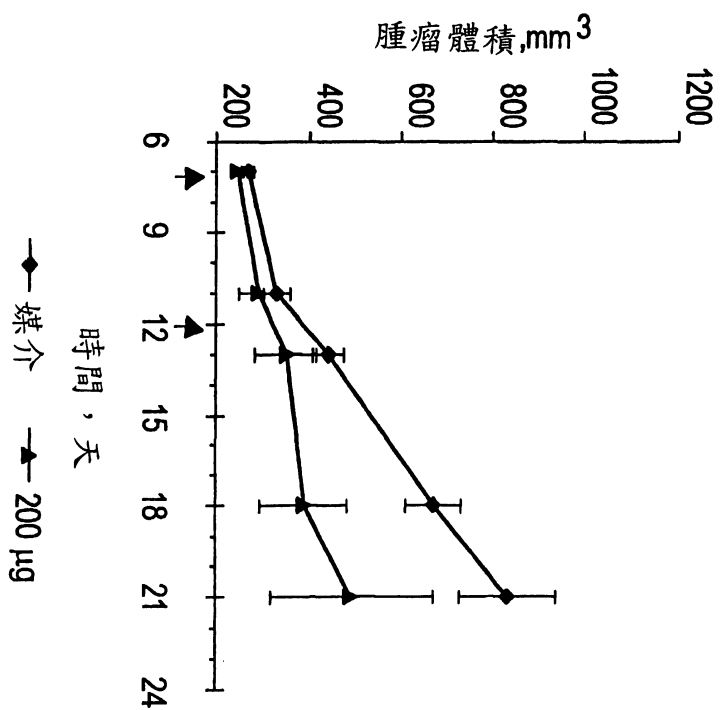


圖4D

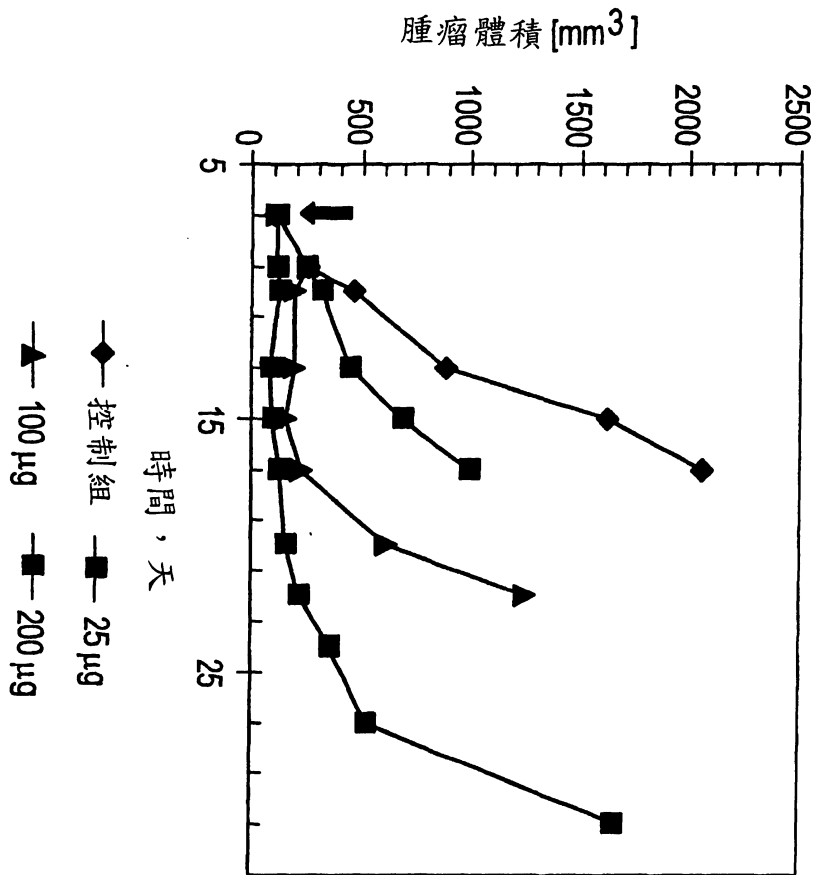


圖4E

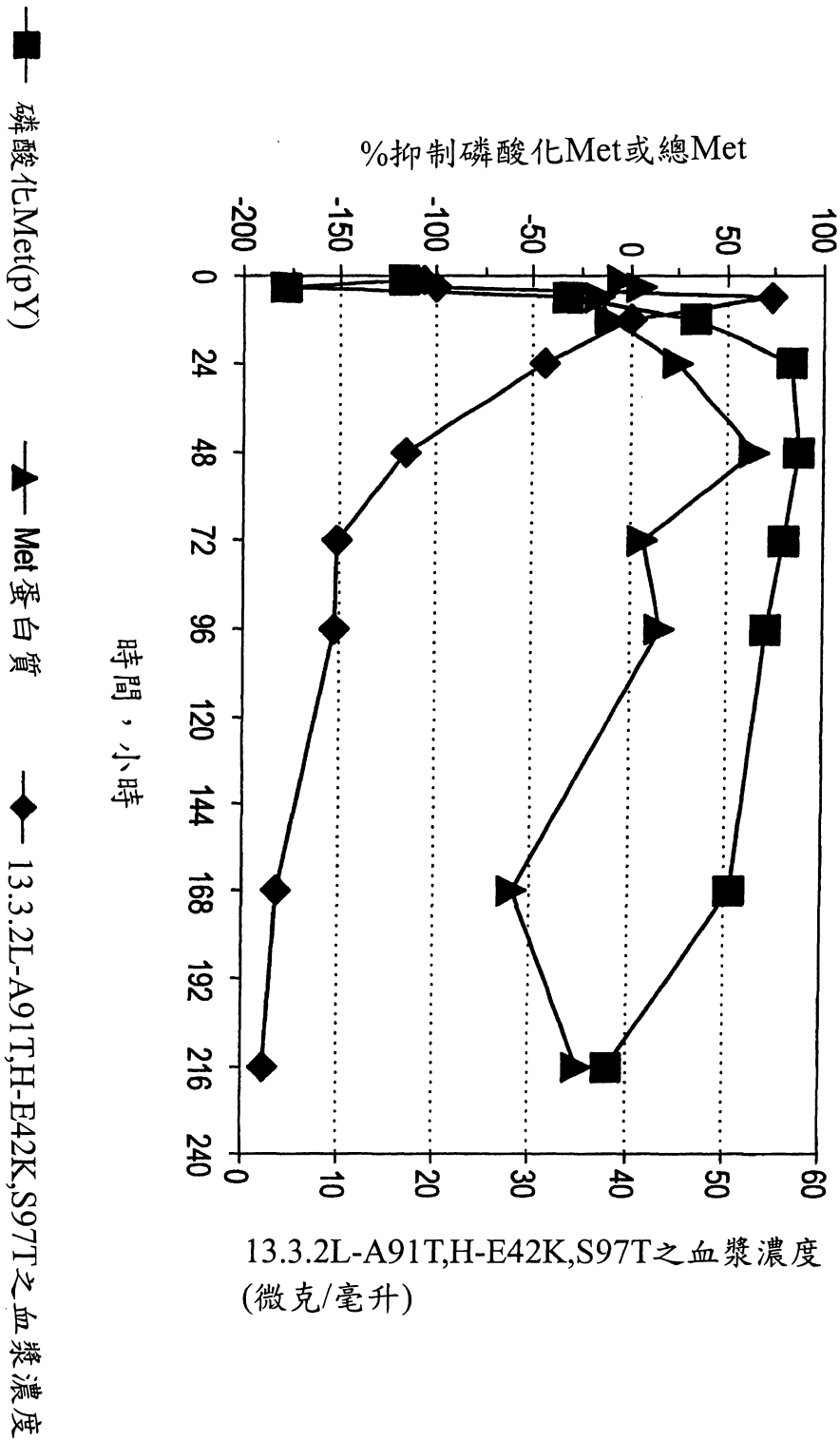


圖5

atggactggacctggagcatcctttcttggtggcagcaX₅caacaggtgccactccCAGG TTCAGCTGGT
GCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCT
GCX₁AGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTTTCAGCTGGGTGCGA
 CDR1

CAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTCCAA
 CDR2

TGGTAACACATACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCA
 CDR2 (continued (con't))

CAGACACATCCACGAGCX₃CAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATC
TGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTCTACGCCGACTACGCTG
 CDR3

ACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAgcctccaagggcccat
 CDR3 con't

cggtcttccccctggcgcctgctccaggagcacctccgagagcacagcggccctgggctgcttggtcaaggactacttc
 cccgaaccgggtgacgggtgctggaactcaggcgtctgaccagcggcgtgcacacctcccagctgctctacagtctc
 aggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcccctccagcaacttggcaccagacctacacctgcaacgtagatca
 caagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatgtgtgctgagtgcccaccgtgcccagcaccacct
 gtggcaggaccgtcagtcttcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacgtgc
 gtggtggtggacgtgagccacgaagaccccagggtccagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcca
 agacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtctcaccgtgtgcaccaggactggctg
 aacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaggcctcccagccccatcgagaaaacctctccaaaaccaag
 ggagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacct
 gcctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaaga
 ccacacctccatgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag
 gggaaacttctctatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggta
 aatga

X₁: G or A
 X₃: T or A
 X₅: G or C

圖 6A

mdwtwsilflvaaX₆tgahsQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCX₂ASGYTFTSYGF^SWV
CDR1

RQAPGQGLEWMGWISASNGNTYYAOKLQGRVTMTTDTSTX₄AYMELRSLR
CDR2

SDDTAVYYCARVYADYADYWGQGLVTVSSastkgpsvfplapcstrstsestaalgclvkdyf
CDR3

pepvtvswngaltsgvhtfpavlqssgylslssvvtvpsnfgtqytcnvdhkpsntkvdktverkccvecppcpap
pvagpsvflfppkpkdtlmisrtpetcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvh
qdwlngkeykckvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqp
ennykttppmldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

X₂:E or K

X₄:S or T

X₆:A or P

圖 6B

atggacatgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctciggtcccaggtccagatgcGACATCCAG
ATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAACACCTGGTTAGCCTGGTATCA
CDR1

GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTT
CDR2

TGAAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGX₇CAGA
CDR2 con't

TTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTA
TTGTCAACAGGCTAACAGTTTCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGT
CDR3

GGAGATCAAAcgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactg
cctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatccagagaggccaaagtacagtgaaggtggataacgccctccaatcggg
taactcccaggagagtgctacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaa
agcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcaagtcacccatcagggcctgagctgcccgtcacaagagcttc
aacaggggagagtgttag

X₇: G or A

圖 6C

mdmrvpaqlgllllwfpgrsrcDIQMTQSPSSVSASVGDRTTITCRASOGINTWLAWYQ
CDR1

QKPGKAPKLLIYAAASSLKSGVPSRFSSGSGSX₉DFTLTISSLQPEDFATYYCQQ
CDR2 CDR3

ANSFPLTFGGGTKVEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsq
CDR3 con't

svteqdsksdstysltsltliskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec

X₈: A or T

圖 6D

atgaaacacctgtggttctcctcctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtccCAGGTGCAGCTGCAGG

AGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGC

ACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATC

CDR1

CGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTTACATCTATTACAG

CDR2

TGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAG

CDR2 con't

TAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCC

GCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGGCCCCCTAGGATATTG

CDR3

TAGTAGTACCAGCTGCCCGGTAAGTGGGGAATACTACTACTACGGTATGG

CDR3 con't

ACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAgcctccaccaaggcccat
CDR3 con't

cggtctccccctggcgcctgtccaggagcacctccgagagcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactactic

cccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgcctgtaccagcggcgtgcacacctcccagctgtcctacagtcctc

aggacttactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcaccagacctacacctgcaacgtatgata

caagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgaatgttgtgtcagtgcccaccgtgccagcaccacct

gtggcaggaccgtcagcttctctcccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgc

gtggtggtggacgtgagccacgaagaccccagggtccagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcca

agacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctaccgtgtgcaccaggactggctg

aacggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaaggcctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaag

ggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacct

gcctggtcaaaggcttctacccagcagatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaaga

ccacacctccatgctggactccgacggctcttctctctacagcaagctaccgtggacaagagcaggtggcagcag

gggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacgcagaagagcctctccctgtctccgggta

aatga

圖 6E

mkhlwfflllvaaprwwlsQVQLQESGPELVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIR
CDR1

QHPGKGLEWIGYIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA
CDR2

VYYCARDGPLGYCSSTSCPVTGEYYYYGMDVWGQGTTVTVSSastkgpsvfplapc
CDR3

srstestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslsvvtpssnfgtqytvcndhkpsntkvd
ktverkccvecppcpappvagpsvflfppkpkdtlmisrtpvctvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpr
eeqfnstfrvsvltvvhqdwlngkeykckvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkg
fypsdiavewesngqpennyktpmldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslslspgk

圖 6F

atggaacccccagcgcagcttctctctctgctactctggtccccagataccaccggaGAAATTGTGTTGAC
GCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTC
CTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAACAACACTACTTAGCCTGGTACCAGC
CDR1

AGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTTTGGTGCATCCAGCAGG
CDR2

GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT
CDR2 con't

CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTG
TCAGCAGTATGATATCTCACCTATGTACAGTTTTGGCCAGGGGACCAAGCT
CDR3

GGAGATGAAAcgaactgtgctgcaccatctgtcttcatcttcccgcctctgatgagcagtgaaatctggaactg
cctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcggg
taactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaa
agcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttc
aacaggggagagtgttag

圖 6G

200523269

metpaqlflflllwlpdttgEIVLTQSPGTL~~SLSPGERATL~~SCRASQSVSNNYLAWYQQKP
CDR1

GQAPRLLIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYDISP
CDR2 CDR3

MYSFGQGTKLEMKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvc~~llnnfy~~preakvqwkvdnalqsgnsqesvte
CDR3 con't

qdskdstyslsstltl~~skadyekh~~kyacevthqglsspvtksfnrgec

圖 6H

atgaagcacctgtggttcttctctctgtgtggcggctcccagatgggtcctgtccCAGCTGCAGCTGCAG
GAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG
CACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTTACTACGGGGGCTGGAT
CDR1

CCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGATTGGATTGGGAGTATCTATTATA
CDR2

GTGGGAACACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCC
CDR2 con't

GTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGC
CGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACATAGCTGGGACTACTTG
CDR3

ACTACTGGGACCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAgcctccaccaaggcccat
CDR3 con't

cggtcttccccctggcgcctgtccaggagcacctccgagagcacagcggccctgggtgcctggtaaggactacttc
cccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaactcaggcgtctgaccagcggcgtgcacacctcccagctgtcctacagtctc
aggactctactccctcagcagcgtggtagcctccagcaactcggcaccagacctacacctgcaacgtagatca
caagcccagcaaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatgtgtgtcagtgcccaccgtgccagcaccacct
gtggcaggaccgtcagttctcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacgtgc
gtggtggggacgtgagccacgaagaccccagggtccagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcca
agacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtgtcagcgtcctaccgtgtgcaccaggactggctg
aacggcaaggagtacaagtcaaggtctcaacaaggcctcccagccccatcgagaaaacctctcaaaaccaaag
ggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacct
gcctggtcaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaaga
ccacacctcccatgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag
gggaacgttctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggta
aatga

圖 6I

mkhlwfflllvaaprwlslQLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYGGWIRQ
CDR1

PPGKGLDWIGSIYYSGNYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAV
CDR2

YYCARHSWDYFDYWDQGTLVTVSSastkgpsvflapcsrstsestaalgclvkdyfepvtvsw
CDR3

sgaltsgvhtfpavllqssglyslssvvtvpssnfgtqytycndhkpnsntkvdktverkccvecppcpappvagpsvflf
ppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwlngkey
kckvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttpp
mldsdsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

圖 6J

atggacatgagggtccccgctcagctcctgggctcctgctgctggtcccaggtccagatgcGACATCCAG
ATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCA
CDR1

GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTT
CDR2

TGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAT
CDR2 con't

TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAACTTACTAT
TGTCAACAGGCTAACAGTTTCCCAATCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGT
CDR3

GGAAATCAAAcgaactgtggetgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactg
cctctgttgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgaaggtggataacgccctccaatcggg
taactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgetgagcaa
agcagactacgagaaacacaagtctacgcctgcaagtcacccatcaggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttc
aacaggggagagttag

圖 6K

200523269

mdmrvpaqllgllllwfpgrsrcDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ
CDR1

KPGKAPKLLIYAAASSLQSGVPSRFSSGSGTDFTLTISSLQSEDFATYYCQOAN
CDR2 CDR3

SFPITFGPGTKVEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvte
CDR3 con't

qdskdstyslsstltliskadyekkhkvyacevthqglsspvtksfnrgec

圖 6L

atggagtggggctgtgctgggtttcctgttgctattttagaagggtccagtgtGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGATATAGCATGAATTGGGTCCGCCAG
CDR1

GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTAGTAGAAGTAG
CDR2

TACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATGTCCAGAG
CDR2 con't
ACAATGCCAAGAACTCACTGTATATGCAAATGAACAGCCTGAGAGACGAG
GACACGGCTGTGTATTACTGTGGCTACGGTGACTACGACTACTTTGACTAT
CDR3

TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAgcctccaccaagggccatcggtcttcc
ccctggcgcctgctccaggagcacctccgagagcacagcggccctgggctgcctgtcaaggactactccccgaacc
ggtgacgggtgctggaactcaggcgtctgaccagcggcgtgcacacctccagctgtcctacagtctcaggactcta
ctccctcagcagcgtggtgacctgcccctccagcaactcggcaccagacctacacctgcaacgtagatcacaagccca
gcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgaatgtgtgtagtgcccaccgtgccagcaccacctgtggcagg
accgtcagtcttcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacgtgcgtggtggtg
gacgtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaactggtagtgacggcgtggaggtgcataatgccaagacaag
ccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgtgtgcaccaggactggtgaacggcaa
ggagtacaagtgaaggtctccaacaaggcctcccagccccatcgagaaaacctctccaaaacaaagggcagcc
ccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtc
aaaggcttctacccagcagatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacact
cccatgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgt
cttctcatgctccgtgatgatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgctccgggtaaatga

圖 6M

melglcwvflvailegvqcEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYSMNWVRQ
CDR1

APGKGLEWVSYISSRSSTIYYADSVKGRFTMSRDNAKNSLYMQMNSLRDEDT
CDR2

AVYYCGYGDYDYFDYWGQGLVTVSSastkgpsvflapcsrstsestaalglvkdyfpepvtv
CDR3

swnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpsnfgtqytcnvdhkpsntkvdktverkccecpappvags
vflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwling
keykckvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykt
ppmlsdsgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealthnhytqkslsispk

圖 6N

atggacatgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctggttcccaggtccagatgcGACATCCAG
ATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCATA
ATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCA
CDR1

GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTT
CDR2

TGAAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAT
CDR2 con't

TTCACTGTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTAT
GTCAACAGTCTAACAGTTTACCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGT
CDR3

GGAAATCAAacgaactgtggetgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactg
cctctgtgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgaaggtggataaacgccctccaatcggg
taactcccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaa
agcagactacgagaaacaaaagtctacgcctgcaagtcacccatcagggcctgagctcgccgtcacaagagcttc
aacaggggagagtgttag

圖 6O

200523269

mdmrvpaqllglllwfpgrcDIQMTQSPSSVSASVGDRVIITCRASQGISSWLA WYQQ
CDR1

KPGKAPKLLIYAAASSLKSGVPSRFSSGSGTDFTVTISSLQPEDFATYYCQOSN
CDR2 CDR3

SLPWTFGQGTKVEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvt
CDR3 con't

eqdskdstysslstltskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec

圖 6P

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (4A) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)