



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I592427 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 07 月 21 日

(21)申請案號：103121603

(22)申請日：中華民國 97 (2008) 年 07 月 11 日

(51)Int. Cl. : C07K16/46 (2006.01)

C07K16/40 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2007/07/12 歐洲專利局

07301231.2

2007/07/12 美國

60/929,789

2008/01/11 美國

61/020,639

(71)申請人：皮爾法伯製藥公司 (法國) PIERRE FABRE MEDICAMENT (FR)
法國

(72)發明人：構特區 利利安尼 GOETSCH, LILIANE (FR)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

(56)參考文獻：

US 2005/0233960A1

Burgess T et al., "Fully Human Monoclonal Antibodies to Hepatocyte Growth Factor with Therapeutic Potential against Hepatocyte Growth Factor/c-Met-Dependent Human Tumors", Cancer Research, Vol.66, No. 3, P.1721-1729, 2006/02/01

審查人員：莊智惠

申請專利範圍項數：24 項 圖式數：77 共 209 頁

(54)名稱

抑制 C-MET 之二聚化的新穎抗體及其等之用途

NOVEL ANTIBODIES INHIBITING C-MET DIMERIZATION, AND USES THEREOF

(57)摘要

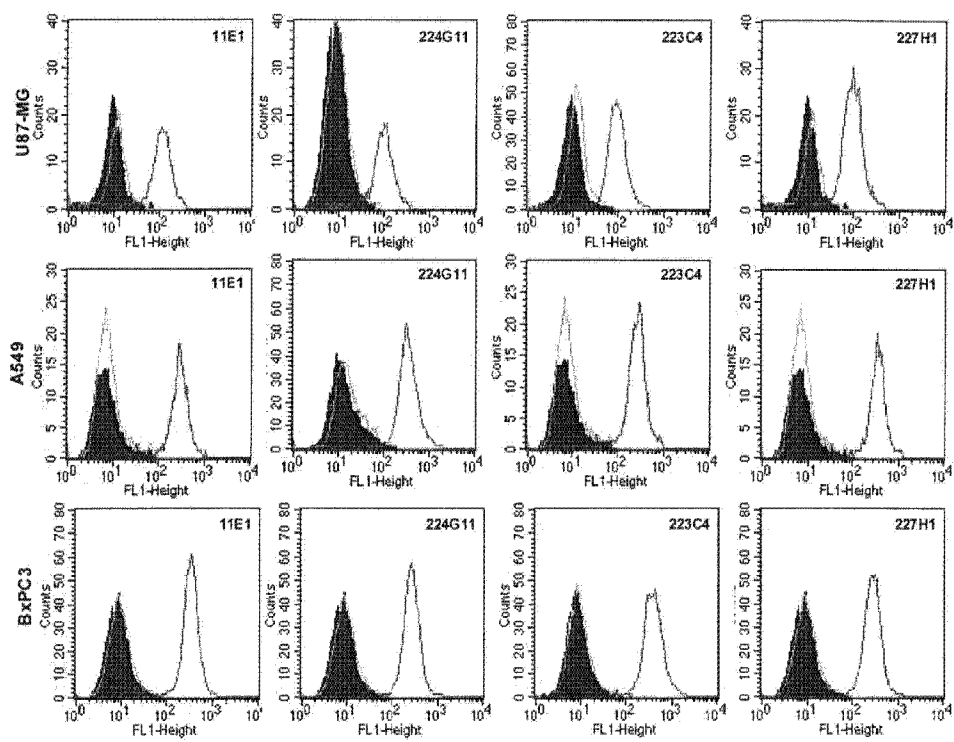
本發明係相關於一種篩選 c-Met 抗體，其可抑制配位體依賴型與非配位體依賴型之 c-Met 活化，之方法。更特別的是，該方法係以抑制 c-Met 二聚化為基礎。

另一方面，本發明係相關於使用此抗體，與包含此抗體之組成物，製備治療癌症之藥物。診斷方法與套組亦為本發明之一部份。

The present invention relates to a process for the selection of anti c-Met antibodies capable to inhibit both ligand-dependent and ligand-independent activation of c-Met. More particularly, said process is based on the inhibition of the c-Met dimerization.

In another aspect, the present invention concerns such antibodies and compositions comprising such antibodies for the preparation of a medicament to treat cancer. Diagnosis process and kits are also part of the invention.

指定代表圖：



第1圖

發明摘要

※ 申請案號：103121603 (申 97126356 分案)

※ 申請日：97.7.11

※ IPC 分類：

C07K16/46 (2006.01)

C07K16/40 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

抑制C-MET之二聚化的新穎抗體及其等之用途

NOVEL ANTIBODIES INHIBITING C-MET DIMERIZATION, AND
USES THEREOF

【中文】

本發明係相關於一種篩選c-Met抗體，其可抑制配位體依賴型與非配位體依賴型之c-Met活化，之方法。更特別的是，該方法係以抑制c-Met二聚化為基礎。

另一方面，本發明係相關於使用此抗體，與包含此抗體之組成物，製備治療癌症之藥物。診斷方法與套組亦為本發明之一部份。

【英文】

The present invention relates to a process for the selection of anti c-Met antibodies capable to inhibit both ligand-dependent and ligand-independent activation of c-Met. More particularly, said process is based on the inhibition of the c-Met dimerization.

In another aspect, the present invention concerns such antibodies and compositions comprising such antibodies for the preparation of a medicament to treat cancer. Diagnosis process and kits are also part of the invention.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

(無)

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

抑制C-MET 之二聚化的新穎抗體及其等之用途
NOVEL ANTIBODIES INHIBITING C-MET
DIMERIZATION, AND USES THEREOF

【技術領域】

發明領域

[0001]本發明係相關於一種新穎之抗體，可特異性地結合至人類c-Met受體，及/或可特異性地抑制該受體之酪胺酸激酶活性，尤其是鼠科、嵌合性與人源化來源之單株抗體，以及編碼這些抗體之胺基酸與核酸。更特別的是，本發明之抗體可抑制c-Met二聚化。本發明類似地包含使用這些抗體作為藥物，用於預防及/或治療癌症，或任何與該受體過度表現相關之疾病，以及診斷與c-Met相關病症之方法與套組。本發明最後包含一種產物與組成物，其包含此抗體與其他抗體及/或化學化合物結合，直接對抗其他生長因子，其涉及腫瘤進展或轉移，及/或化合物，及/或抗癌試劑，或與毒素結合之試劑，以及其用於預防及/或治療某些癌症之用途。

【先前技術】

發明背景

[0002]受體酪胺酸激酶(RTK)標靶試劑，如特拉組單抗(trastuzumab)、喜他喜單抗(cetuximab)、比菲組單抗(bevacizumab)、依馬替尼(imatinib)與吉菲替尼(gefitinib)抑

制劑，已說明了科學家對於這群可治療某些癌症之蛋白質族群之興趣。

[0003]c-Met，為RTKs次家族之原型成員，該次家族亦包括RON與SEA。該c-Met家族結構上不同於其他RTK家族，且已知僅為肝細胞生長因子(HGF)之高親和性受體，亦稱之為scatter因子(SF) [D.P. Bottaro et al., Science 1991, 251: 802-804; L. Naldini et al., Eur. Mol. Biol. Org. J. 1991, 10:2867-2878]。c-Met與HGF廣泛地表現於各組織中，且其表現分別限制於上皮與間葉組織來源[M.F. Di Renzo et al., Oncogene 1991, 6:1997-2003; E. Sonnenberg et al., J. Cell. Biol. 1993, 123:223-235]。二者皆為哺乳動物正常發育所必須，且已顯示對於細胞移動、型態分化，以及三度空間管狀結構之組織特別重要 [F. Balducci et al., Nature 1995, 376:768-771; C. Schmidt et al., Nature. 1995:373:699-702; Tsarfaty et al., Science 1994, 263:98-101]。而c-Met與HGF之控制調節則顯示出對於哺乳動物之發育、組織維持與修復相當重要[Nagayama T, Nagayama M, Kohara S, Kamiguchi H, Shibuya M, Katoh Y, Itoh J, Shinohara Y., Brain Res. 2004, 5;999(2):155-66; Tahara Y, Ido A, Yamamoto S, Miyata Y, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H., J Pharmacol Exp Ther. 2003, 307(1):146-51]，其功能異常與癌症進程相關。

[0004]由於c-Met不適當活化所造成之不正常訊息傳遞，為人類癌症中最常見的一種變化，並在腫瘤產生與轉移上扮演相當重要角色[Birchmeier et al., Nat. Rev. Mol.

Cell Biol. 2003, 4:915-925; L. Trusolino and Comoglio P. M., Nat Rev. Cancer. 2002, 2(4):289-300]。

[0005]不適當之c-Met活化可能由於配位體依賴型與非依賴型機制所引起，其包括c-Met 過度表現，及/或旁分泌(paracrine)或自分泌(autocrine)活化，或經由功能突變而引起[J.G. Christensen, Burrows J. and Salgia R., Cancer Letters. 2005, 226:1-26]。然而，在c-Met受體寡合化中，在配位體存在或不存在下，需要調節激酶與ATP與含酪胺酸之胜肽受質之結合親和性與結合動力學[Hays JL, Watowich SJ, Biochemistry, 2004 Aug 17, 43:10570-8]。經活化之c-Met會召集訊號作用子至其位於細胞內區塊之多停泊位置，導致數個重要訊息傳遞路徑之活化，包括Ras-MAPK、PI3K、Src與Stat3 [Gao CF, Vande Woude GF, Cell Res. 2005, 15(1):49-51; Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, Oncogene. 2000, 19(49):5582-9]。這些路徑為腫瘤細胞增生、侵入與血管生成，以及避開細胞凋亡所必須[Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, Oncogene, 2000, 19(49):5582-9; Gu H, Neel BG, Trends Cell Biol. 2003 Mar, 13(3):122-30; Fan S, Ma YX, Wang JA, Yuan RQ, Meng Q, Cao Y, Laterra JJ, Goldberg ID, Rosen EM, Oncogene. 2000 Apr 27, 19(18):2212-23]。此外，相關於其他RTK之c-Met訊息傳遞之一獨特性質，為其與局部黏著複合物與非激酶結合分子如 $\alpha 6 \beta 4$ 整合素(integrins) [Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM, Cell. 2001, 107:643-54]、CD44v6[Van der Voort R, Taher

TE, Wielenga VJ, Spaargaren M, Prevo R, Smit L, David G, Hartmann G, Gherardi E, Pals ST, J Biol Chem. 1999, 274(10):6499-506]、Plexin B1或semaphorins[Giordano S, Corso S, Conrotto P, Artigiani S, Gilestro G, Barberis D, Tamagnone L, Comoglio PM, Nat Cell Biol. 2002, 4(9):720-4; Conrotto P, Valdembrì D, Corso S, Serini G, Tamagnone L, Comoglio PM, Bussolino F, Giordano S, Blood. 2005, 105(11):4321-9; Conrotto P, Corso S, Gamberini S, Comoglio PM, Giordano S, Oncogene. 2004, 23:5131-7]之交互作用，其可更進一步加至由此受體調節之複合物上。最近報導之資料顯示c-Met可能涉及腫瘤對於吉菲替尼(gefitinib)或爾羅替尼(erlotinib)之抗藥性，顯示結合EGFR與c-Met二者之標靶化合物具有明顯意義[Engelman JA et al., Science, 2007, 316:1039-43]。

[0006]在過去幾年，已發展出許多不同之策略，減緩癌細胞株中之c-Met訊息傳遞。這些策略包括i)對抗c-Met或HGF/SF之中和抗體[Cao B, Su Y, Oskarsson M, Zhao P, Kort EJ, Fisher RJ, Wang LM, Vande Woude GF, Proc Natl Acad Sci U S A. 2001, 98(13):7443-8; Martens T, Schmidt NO, Eckerich C, Fillbrandt R, Merchant M, Schwall R, Westphal M, Lamszus K, Clin Cancer Res. 2006, 12(20):6144-52]，或使用HGF/SF拮抗劑NK4，阻止配位體結合至c-Met [Kuba K, Matsumoto K, Date K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T, Cancer Res., 2000, 60:6737-43]，ii)小ATP對於c-Met之結合

位置抑制劑，阻斷激酶活性[Christensen JG, Schreck R, Burrows J, Kuruganti P, Chan E, Le P, Chen J, Wang X, Ruslim L, Blake R, Lipson KE, Ramphal J, Do S, Cui JJ, Cherrington JM, Mendel DB, Cancer Res. 2003, 63:7345-55]，iii)經改造之SH2區塊胜肽，其會干擾多停泊位置以及降低受體或配位體表現之RNAi或核酵素(ribozyme)之接近。這些方法大部分顯示出對於c-Met之選擇性抑制，導致腫瘤抑制，並顯示出c-Met在癌症療法研究中相當引人興趣。

[0007]c-Met標靶分子中，有些是抗體。

[0008]其中最為廣泛描述的為抗-c-Met 5D5抗體，由Genentech生產[WO96/38557]，其可作為一強效之協同劑，當單獨加入於各種模式中，並作為拮抗劑，當使用為Fab片段時，由此抗體產生之單價物描述為單臂5D5(OA5D5)，並於以重組蛋白形式於大腸桿菌中製造，亦為Genentech之專利申請案之一主旨[WO2006/015371]。然而，此分子不僅可被視為一抗體，由於其特殊之骨架結構，其突變後亦可成為人體內之免疫原。就活性而言，此未醣化分子缺乏作用子功能，最終並無明確之資料顯示OA5D5可抑制c-Met之二聚化。此外，當測試於G55體內模式中時，表現有c-Met，而非HGF mRNA與蛋白質，並獨立地產生配位體之膠質母細胞瘤細胞株，該單臂c-Met抗體，對於G55腫瘤生長並不具明顯之作用，顯示OA5D5主要作用係藉由阻斷HGF之結合，無法標靶與HGF活化無關之腫瘤[Martens T. et al, Clin.

Cancer Res., 2006, 12(20):6144-6152]。

[0009]另一標靶c-Met之抗體係由Pfizer描述為一抗體，“主要作用為c-Met之拮抗劑，而在某些情況下，為c-Met之協同劑”[WO 2005/016382]。無資料顯示Pfizer抗體對於本申請案中所描述的c-Met二聚化有作用。

[0010]本發明之一新穎觀點為產生小鼠單株抗體，其不具內生性之協同劑活性，並抑制c-Met之二聚化。除了標靶配位體依賴型腫瘤外，此方法亦可修復非配位體依賴型之c-Met活化，由於其細胞內區塊之過度表現或突變，其為訊息傳遞寡合化所依賴。此抗體活性另一觀點為對於c-Met與其伙伴交互作用之空間障礙，其導致c-Met功能之失常。這些抗體可為人源化，且較佳改造為，但不限於，人類IgG1，以獲得作用子功能，如ADCC與CDC，除了與c-Met受體特異性阻斷之功能相關外。

【發明內容】

發明概要

[0011]令人驚訝地，由本發明人首度製造出一抗體，不僅可結合至c-Met，同時可抑制c-Met之二聚化。在先前技藝中，有時可看到猜測抗體可抑制c-Met與其伙伴之二聚化，但從未有文獻揭示，或清楚顯示出可如此做之抗體。此外，就抗體之特異性而言，並未有證據顯示出曾成功製造出此活性抗體。

[0012]在第一觀點中，本發明之一目的為一種產生並篩選本發明抗體之方法。

[0013]更特別的是，本發明係相關於一種篩選c-Met抗體，或其片段或衍生物之方法，可抑制配位體依賴型或非配位體依賴型之c-Met活化，該方法包含下列步驟：

i) 篩選產生之抗體並選擇出可特異性地結合至c-Met之抗體；

ii) 體外評估經步驟i)選出之抗體，並選擇出可抑制至少一種腫瘤類型之50%，較佳至少60%、70%、80%之腫瘤細胞增生；以及之後

iii)測試該經步驟ii)選出之抗體，並選出可抑制c-Met二聚化之抗體。

[0014]如同先前所解釋，抑制c-Met二聚化為本發明之一主要目的，由於此抗體對於相當大之病患族群有幫助。不僅是配位體依賴型之c-Met活化癌症，其為本發明之案例，同時非配位體依賴型之c-Met活化癌症亦可使用由本發明方法製造出之抗體治療。

[0015]抗體之產生可經由熟知此技術領域者所知之任何方法進行，如融合來自經免疫化之小鼠，或其他可與該經選擇骨髓瘤細胞相容之物種之骨髓瘤細胞與脾細胞[Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497]。經免疫化之動物可包括具有人類免疫球蛋白之轉殖小鼠，其之後直接製造出人類抗體。另一可能之實施例可使用噬菌體展示(phage display)技術，以篩選該資料庫。

[0016]該篩選步驟i)可以熟知此技術領域者所知之任何方法進行。如非限制性範例，為ELISA、BIAcore、免疫

組織化學法、FACS分析與功能篩選。較佳之方法係以ELISA篩選c-Met重組蛋白質，之後經FACS分析至少一腫瘤細胞株，確認產生之抗體亦可辨識該腫瘤細胞上之原始受體。此方法更詳細地描述於下。

[0017]在相同方法中，步驟ii)亦可以一般已知方法流程進行，如使用³H-胸線嘧啶或其他DNA染色試劑，MTT、ATP評估法等。本發明較佳之腫瘤細胞模式為BxPC3模式。

[0018]抑制c-Met二聚化，應瞭解為較佳c-Met同質二聚化。

[0019]在本發明步驟iii)之篩選步驟中，該步驟iii)之較佳實施例在於以BRET分析評估表現有c-Met-RLuc/c-Met-YFP二者之細胞，並篩選可抑制至少30%，較佳35%、40%、45%、50%、55%，且最佳60%之BRET訊號之抗體。

[0020]BRET技術為一已知偵測蛋白質二聚化之代表技術[Angers et al., PNAS, 2000, 97:3684-89]。

[0021]BRET，使用於步驟iii)，為此技術領域者已知之技術，且將於下詳細描述。更特別的是，BRET(生物冷光共振能量轉移，Bioluminescence Resonance Energy Transfer)為一非放射活性能量轉移，發生於生物冷光供應者(Renilla螢光酶(Rluc))，與螢光接受者，GFP(綠色螢光蛋白質)突變物或YFP(黃色螢光蛋白質)之間。在此情況下係使用EYFP(強化黃色螢光蛋白)。其轉移效率取決於供應者與接受者間之位向與距離。之後，能量轉移會在二分子相當接

近時發生(1-10 nm)。此特性係用於產生蛋白質-蛋白質交互作用試驗。事實上，爲了研究二分子間之交互作用，第一分子係融合至Renilla螢光酶上，而第二分子則融合至GFP之黃色突變物上。融合蛋白一般，但並非一定，表現於哺乳動物細胞中。在其膜可穿透受質(腔腸素(coelenterazine))存在下，Rluc會發出藍光。若GFP突變物與Rluc之距離近於10 nm，能量轉移便會發生，而會偵測到一額外之黃色訊號。該BRET訊號係以供應者之發光量與接受者之發光量之間之比例表示。如此，BRET訊號增加表示二融合蛋白質相當接近，或構形改變使得Rluc與GFP突變物更接近。

[0022]若BRET分析爲一較佳之實施例，任一此技術領域者已知之技術皆可用於測量c-Met二聚化。不受限制，下列技術皆可使用：FRET(螢光共振能量轉移)、HTRF(均相時差式螢光)、FLIM(螢光壽命成像顯微鏡)或SW-FCCS(單波長螢光交叉相關光譜)。

[0023]其他典型之技術亦可使用，如共免疫沈澱法、Alpha 篩選、化學交聯、雙雜合、親和性層析法、ELISA或遠西方墨漬法。

[0024]在第二觀點中，本發明之一目的爲一經單離之抗體，或其功能性片段或衍生物，由該方法獲得者。該抗體或其片段或衍生物，可特異性地結合至人類c-Met，以及，若有需要的話，較佳可抑制其配位體HGF之天然結合，及/或可特異性地抑制該c-Met之酪胺酸激酶活性，該抗體亦可抑制c-Met二聚化。更特別的是，該抗體可抑制配位體依賴

型與配位體非依賴型之c-Met活化。

[0025]“功能性片段與衍生物”之表現，將於本說明書稍後詳細定義。

[0026]應瞭解到本發明並非相關於天然形式之抗體，亦即其並非於天然環境中，但其可自天然來源單離或純化出，或另外由基因重組物中，或藉由化學合成獲得，之後其可包含非天然胺基酸，如下所述。

[0027]更特別的是，依據本發明之另一觀點，其申明一抗體，或其功能性片段或衍生物，該抗體之特徵為其包含至少一互補性決定區域CDR，選自於包含胺基酸序列之序列識別號(SEQ ID No.)1至17與56至61之CDR。

[0028]任一抗體，或片段或衍生物，具有至少一CDR，其序列具有至少80%等同性，較佳85%、90%、95%與98%等同性，在與SEQ ID No. 1至17與56至61進行最佳化比對後，應瞭解到其作為一等效物，為一結果，為本發明之一部份。

[0029]就CDR區域或CDR(s)而言，其代表免疫球蛋白之重鏈與輕鏈之高度變異區域，如IMGT所定義。

[0030]該IMGT獨特成員已經定義，經由比較抗體受體、鏈種類，或其他物種之變化區域而得[Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27,

55-77 (2003)]。在該MGT獨特成員中，保守胺基酸永遠為相同位置，如半胱胺酸23(1st-CYS)、色胺酸41(保守-TRP)、疏水性胺基酸89、半胱胺酸104 (2nd-CYS)、苯丙胺酸或色胺酸118 (J-PHE或J-TRP)。該IMGT獨特成員提供一標準化框架區域(framework region)之定義(FR1-IMGT：位置1至26，FR2-IMGT：39至55，FR3-IMGT：66至104，以及FR4-IMGT：118至128)，以及互補性決定區域：CDR1-IMGT：27至38，CDR2-IMGT：56至65，以及CDR3-IMGT：105至117。由於空格代表未佔領位置，該CDR-IMGT長度(顯示於括弧中，並以點區隔，如[8.8.13])變成為一重要資訊。該IMGT獨特成員係用於2D圖代表，由IMGT Colliers de Perles指定[Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)]，以及在3D結構中為IMGT/3D結構-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell substrate and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)]。

[0031]存在三重鏈CDR與3輕鏈CDR。術語CDR或CDR使用於此係表示，依據此範例，這些區域之一或數個，或甚至整個區域，其包含對應於該抗體結合至抗原，或其辨識之表位區域之大部分胺基酸殘基。

[0032]本發明中二核酸序列或胺基酸序列之“等同性百分比”，表示在二比較之序列中，相同之核酸或胺基酸殘基之百分比，在經最佳比對後(最佳比對)，此百分比純粹為統

計性，二序列間之差異係隨機分佈，且遍布於全長中。二核酸與胺基酸序列間之比較，一般係以最佳方式對齊後比較這些序列，該比較可於片段或“比較視窗”中進行。比較序列之最佳對齊可使用，除了人工對齊外，Smith與Waterman之局部相同性演算法(1981) [Ad. App. Math. 2:482]、Neddleman與Wunsch之局部相同性演算法(1970) [J. Mol. Biol. 48: 443]、Pearson 與Lipman之類似度搜尋法(1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444]、使用這些演算法之電腦軟體(GAP、BESTFIT、FASTA與TFASTA，於Wisconsin基因軟體套件、基因電腦族群、575 Science Dr., Madison, WI，或BLAST N或BLAST P比較軟體)。

[0033]二核酸與胺基酸之等同度百分比，係以比較此二序列，其經最佳方式對齊後，而決定，其中該待比較之二核酸與胺基酸可包含插入與刪除，相對於此二序列經最佳化對齊後之參考序列。該等同度百分比係以二序列之間同一位置之相同核苷酸或胺基酸殘基數目，除以比較視窗中之位置總數目，再乘以100，便可獲得此二序列間之等同度百分比。

[0034]例如，可使用BLAST程式，“BLAST 2序列”(Tatusova et al., “Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”, FEMS Microbiol Lett. 174:247-250)，可獲得自<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>，參數選用預設值(尤其是參數“開放空格罰值”: 5，及“延長空格罰值”: 2；所

選用之矩陣，如矩陣“BLOSUM 62”，程式所設定者)，二序列間之等同度百分比可由該程式直接計算。

[0035]與參考胺基酸序列具有至少80%，較佳85%、90%、95%與98%等同度之胺基酸序列，具有某些修飾，相較於參考序列，尤其是加入或取代至少一胺基酸、一段截斷或延長。在取代一或多個連續或非連續胺基酸之情況下，該取代較佳以“等效”胺基酸取代。表現“等效胺基酸”主要係指該基礎結構之一胺基酸經取代後，實質上不會改變對應抗體之生物活性，此將於後定義，尤其是在範例中。這些等效胺基酸可依據所置換之胺基酸之結構同質性，或所產生之不同抗體之生物活性試驗後之結果而決定。

[0036]舉例而言，可能之取代為不會導致該經修飾抗體之生物活性大改變者。

[0037]作為一非限制性範例，下列表1為可能之取代，可使經修飾抗體有保守性生物活性。當然，亦可於相同位置進行逆向取代。

表1

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

[0038]應瞭解到本發明並非相關於天然形式之抗體，亦即其並非於天然環境中，但其可自天然來源單離或純化出，或另外由基因重組物中，或藉由化學合成獲得，之後其可包含非天然胺基酸，如下所述。

[0039]依據第一個方法，該抗體係定義為其重鏈序列。更特別的是，本發明之抗體，或其功能性片段或衍生物，特徵為其包含一重鏈，包含至少一CDR，選自於包含胺基酸序列SEQ ID No. 1至9與56至58之CDR。

[0040]上述序列包含下列：

SEQ ID No. 1: GYIFTAYT

SEQ ID No. 2: IKPNNGLA
 SEQ ID No. 3: ARSEITTEFDY
 SEQ ID No. 4: GYSFTDYT
 SEQ ID No. 5: INPYNGGT
 SEQ ID No. 6: AREEITKDFDF
 SEQ ID No. 7: GYTFTDYN
 SEQ ID No. 8: INPNNGGT
 SEQ ID No. 9: ARGRYVGYYYAMDY
 SEQ ID No. 56: GYTFTSYW
 SEQ ID No. 57: INPTTGST
 SEQ ID No. 58: AIGGYGSWFAY

[0041]重鏈之CDR可於前述序列，即SEQ ID No. 1至9與56至58中隨機選擇。

[0042]依據一較佳觀點，本發明之抗體或其功能性片段或衍生物，包含一重鏈，其包含至少一CDR選自於CDR-H1、CDR-H2與CDR-H3，其中：

- DR-H1包含胺基酸序列SEQ ID No. 1、4、7或56，
- DR-H2包含胺基酸序列SEQ ID No. 2、5、8或57，以及
- DR-H3包含胺基酸序列SEQ ID No. 3、6、9或58。

[0043]依據該觀點之第一實施例，本發明之抗體或其功能性片段或衍生物，包含一重鏈，其包含CDR-H1、CDR-H2與CDR-H3，其中CDR-H1包含胺基酸序列SEQ ID No. 1，CDR-H2包含胺基酸序列SEQ ID No. 2，以及CDR-H3包含

胺基酸序列SEQ ID No. 3。

[0044]更特別的是，該抗體或其功能性片段或衍生物，依據此第一實施例，包含一重鏈，其序列包含胺基酸序列SEQ ID No. 18。

[0045]SEQ ID No. 18:

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYIFTAYTMHWVRQ
SLGESLDWIGGIKPNNGLANYNQKFKGKATLTVDKSSST
AYMDLRSLTSEDSAVYYCARSEITTEFDYWGQGTLTVS
S

[0046]依據該第二觀點，本發明之抗體或其功能性片段或衍生物，包含一重鏈，包含CDR-H1、CDR-H2與CDR-H3，其中CDR-H1包含胺基酸序列SEQ ID No. 4，CDR-H2包含胺基酸序列SEQ ID No. 5，以及CDR-H3 包含胺基酸序列SEQ ID No. 6。

[0047]該抗體或其功能性片段或衍生物，依據該第二觀點，較佳包含一重鏈，其序列包含胺基酸序列SEQ ID No. 19。

[0048]SEQ ID No. 19:

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTDYTLNWVK
QSHGKTLEWIGLINPYNGGTTYNQKFKGKATLTVDKSSS
TAYMELLSLTSEDSAVYYCAREEITKDFDFWGQGTTTLTVS
S

[0049]依據該觀點之第三實施例，本發明之抗體或其功能性片段或衍生物，包含一重鏈，其包含CDR-H1、 CDR-H2

與CDR-H3，其中CDR-H1包含胺基酸序列SEQ ID No. 7，
CDR-H2包含胺基酸序列SEQ ID No. 8，以及CDR-H3包含
胺基酸序列SEQ ID No. 9。

[0050]該抗體或其功能性片段或衍生物，依據該第三實施例，較佳包含一重鏈，其序列包含胺基酸序列SEQ ID No. 20。

[0051]SEQ ID No. 20:

EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNMDWVK
QSHGMSLEWIGDINPNNGGTIFNQKFKGKATLTVDKSSST
AYMELRSLTSED TAVYYCARGRYVGYY YAMDYWGQGT
SVTVSS

[0052]依據該觀點之第四實施例，本發明之抗體或其功能性片段或衍生物，包含一重鏈，其包含CDR-H1、CDR-H2與CDR-H3，其中CDR-H1包含胺基酸序列SEQ ID No. 56，CDR-H2包含胺基酸序列 SEQ ID No. 57，以及CDR-H3包含胺基酸序列 SEQ ID No. 58。

[0053]該抗體或其功能性片段或衍生物，依據該第四實施例，較佳包含一重鏈，其序列包含胺基酸序列SEQ ID No. 62。

[0054]SEQ ID No. 62:

QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMNWW
KQRPGQGLEWIGYINPTTGSTDYNQKLKDKATLTADKSS
NTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAIGGYGSWFAYWGQGTLVT
VSA

[0055]在第二方法中，該抗體定義為其輕鏈序列。更特別的是，依據本發明之第二觀點，該抗體或其功能性片段或衍生物，特徵為其包含一輕鏈，包含至少一CDR 選自於包含胺基酸序列 SEQ ID No. 10至17，以及59至61之CDR。

[0056]上述之序列如下：

SEQ ID No. 10: ESVDSYANSF

SEQ ID No. 11: RAS

SEQ ID No. 12: QQSKEDPLT

SEQ ID No. 13: ESIDTYGNSF

SEQ ID No. 14: QQSNEDPFT

SEQ ID No. 15: ENIYSN

SEQ ID No. 16: AAT

SEQ ID No. 17: QHFWGPPYT

SEQ ID No. 59: SSVSSTY

SEQ ID No. 60: TTS

SEQ ID No. 61: HQWSSYPFT

[0057]輕鏈之CDR可於前述序列，即SEQ ID No. 10至17與59至61中隨機選擇。

[0058]依據一較佳觀點，本發明之抗體或其功能性片段或衍生物，係包含一輕鏈，包含至少一CDR選自於CDR-L1、CDR-L2與CDR-L3，其中：

- DR-L1包含胺基酸序列SEQ ID No. 10、13、15或59，
- DR-L2包含胺基酸序列SEQ ID No. 11、16或60，以及
- DR-L3包含胺基酸序列SEQ ID No. 12、14、17或61。

[0059]依據另一觀點之第一實施例，該抗體或其功能性片段或衍生物，包含一輕鏈CDR-L1、CDR-L2與CDR-L3，其中CDR-L1包含胺基酸序列SEQ ID No. 10，CDR-L2包含胺基酸序列SEQ ID No. 11，以及CDR-L3包含胺基酸序列SEQ ID No. 12。

[0060]更特別的是，該抗體或其功能性片段或衍生物，依據該第一實施例，包含一輕鏈，其序列包含胺基酸序列SEQ ID No. 21。

[0061]SEQ ID No. 21:

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYANSFMHWY
QKPGQPPKLLIYRASNLGIPARFSGSGSRTDFTLTINP
VEADDVATYYCQQSKEDPLTFGSGTKLEMK

[0062]依據另一觀點之第二實施例，該抗體或其功能性片段或衍生物，包含一輕鏈，其包含CDR-L1、CDR-L2與CDR-L3，其中CDR-L1包含胺基酸序列SEQ ID No. 13、CDR-L2包含胺基酸序列SEQ ID No. 11，以及CDR-L3包含胺基酸序列SEQ ID No. 14。

[0063]該抗體或其功能性片段或衍生物，依據該第二實施例，較佳包含一輕鏈，其序列包含胺基酸序列SEQ ID No. 22。

[0064]SEQ ID No. 22:

GIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRVSESIDTYGNSFIHWYQ
QKPGQPPKLLIYRASNLGIPARFSGSGSRTDFTLTINPV
EADDSATYYCQQSNEDPFTFGSGTKLEMK

[0065]依據另一觀點之第三實施例，該抗體或其功能性片段或衍生物，包含一輕鏈，包含CDR-L1、CDR-L2與CDR-L3，其中CDR-L1包含胺基酸序列SEQ ID No. 15，CDR-L2包含胺基酸序列SEQ ID No. 16，以及CDR-L3包含胺基酸序列SEQ ID No. 17。

[0066]該抗體或其功能性片段或衍生物，依據該第三實施例，包含一輕鏈，其序列包含胺基酸序列SEQ ID No. 23。

[0067]SEQ ID No. 23:

DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWYQQKQ
GKSPQLLVYAATNLVDGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQS
EDFGSYYCQHFHWGPPYTFGGGKLEIK

[0068]依據另一觀點之第四實施例，該抗體或其功能性片段或衍生物，包含一輕鏈，包含CDR-L1、CDR-L2與CDR-L3，其中CDR-L1包含胺基酸序列SEQ ID No. 59，CDR-L2包含胺基酸序列SEQ ID No. 60，以及CDR-L3包含胺基酸序列SEQ ID No. 61。

[0069]該抗體或其功能性片段或衍生物，依據該第三實施例，包含一輕鏈，其序列包含胺基酸序列SEQ ID No. 63。

[0070]SEQ ID No. 63:

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTCSASSSVSSTYLYWYQQK
PGSSPKLWIYTTASILASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMETE
DAASYFCHQWSSYPFTFGSGTKLDIK

[0071]依據第三方法，該抗體現在定義為其輕鏈序列與重鏈序列。本發明之抗體或其功能性片段或衍生物，特徵

爲其包含一重鏈，其包含胺基酸序列SEQ ID No. 18、19、20或62，以及一輕鏈，其包含胺基酸序列SEQ ID No. 21、22、23或63。

[0072]更特別的是，一較佳之抗體或其功能性片段或衍生物，依據本發明，命名爲224G11，包含CDR-H1、CDR-H2與CDR-H3，分別包含胺基酸序列SEQ ID No. 1、2與3；以及輕鏈，包含CDR-L1、CDR-L2與CDR-L3，分別包含胺基酸序列SEQ ID No. 10、11與12。

[0073]在另一觀點中，該抗體224G11包含一重鏈，其包含胺基酸序列SEQ ID No. 18，以及一輕鏈，其包含胺基酸序列SEQ ID No. 21。

[0074]另一較佳抗體或其功能性片段或衍生物，依據本發明，命名爲227H1，包含一重鏈，其包含CDR-H1、CDR-H2與CDR-H3，分別包含胺基酸序列SEQ ID No. 4、5與6；以及一輕鏈，包含CDR-L1、CDR-L2與CDR-L3，分別包含胺基酸序列SEQ ID No. 13、11與14。

[0075]在另一觀點中，該抗體227H1，包含一重鏈，其包含胺基酸序列SEQ ID No. 19，以及一輕鏈，包含胺基酸序列SEQ ID No. 22。

[0076]在另一較佳抗體或其功能性片段或衍生物，命名爲223C4，包含一重鏈，其包含CDR-H1、CDR-H2與CDR-H3，分別包含胺基酸序列SEQ ID No. 7、8與9；以及一輕鏈，包含CDR-L1、CDR-L2與CDR-L3，分別包含胺基酸序列SEQ ID No. 15、16與17。

[0077]在另一觀點中，抗體223C4包含一重鏈，其包含胺基酸序列SEQ ID No. 20，以及一輕鏈，其包含胺基酸序列SEQ ID No. 23。

[0078]另一較佳抗體或其功能性片段或衍生物，命名為11E1，包含一重鏈，包含CDR-H1、CDR-H2與CDR-H3，分別包含胺基酸序列SEQ ID No. 56、57與58；以及一輕鏈，包含CDR-L1、CDR-L2與CDR-L3，分別包含胺基酸序列SEQ ID No. 59、60與61。

[0079]在另一觀點中，該抗體11E1包含一重鏈，其包含胺基酸序列SEQ ID No. 62，以及一輕鏈，包含胺基酸序列SEQ ID No. 63。

[0080]依據另一觀點，本發明係相關於一種鼠科融合瘤，可分泌出本發明之單株抗體，尤其是鼠科來源之融合瘤。

[0081]這些融合瘤為鼠科融合瘤，為經免疫小鼠之脾細胞與骨髓細胞株(Sp20 Ag14)融合而成。

[0082]下列表2重新組合較佳抗體之元素。

表2

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

[0083]從表2清楚顯示出，抗體227H1與224G11之CDR-L2相當類似。此範例清楚支持本申請案申請專利範圍中所涵蓋之抗體，其包含至少一CDR，由所述之CDR序列中隨機選取。

[0084]依據一較佳實施例，本發明係相關於一種單株抗體。

[0085]術語「單株抗體」或依據原始用意使用，係指一抗體，來自一群實質上同質之抗體，即，各族群包含之抗體係相等，除了可能之天然發生突變物，其出現極小量。換句話說，單株抗體為一均質性抗體，產生自單一殖株細胞之增生(如融合瘤細胞、經編碼該均質性抗體DNA轉染之真核宿主細胞、經編碼該均質性抗體DNA轉染之原核宿主細胞等)，其一般特徵為單一族群與亞群之重鏈，以及單一種類之輕鏈。單株抗體為高度特異性，直接對抗一抗原。此外，相對於多株抗體製劑，其一般包括不同之抗體，對抗

不同之決定原或表位，每一單株抗體係直接對抗單一決定原或抗原。

[0086]在本說明書中，術語聯結至抗體化合物或其序列之多胜肽、多胜肽序列、胺基酸序列、胜肽與蛋白質，可交換使用。

[0087]依據類似之觀點，本發明係相關於一種嵌合性抗體，或其功能性片段，依據本發明，特徵為該抗體更包含輕鏈與重鏈恆定區域，衍生自異源於小鼠之物種之抗體，尤其是人類，且較佳該輕鏈與重練恆定區域分別衍生自kappa 與gamma-1、gamma-2或gamma-4區域。

[0088]在本申請書中，IgG1較佳可獲得作用子功能，最佳為ADCC與CDC。

[0089]熟習之技術人源應瞭解到該作用子功能包括，如，C1q結合；互補依賴性細胞毒性(CDC)；Fc受體結合；抗體-依賴性細胞媒介毒性(ADCC)；胞噬作用；以及細胞表面受體之減弱調節(如B細胞受體；BCR)。

[0090]本發明之抗體較佳為單株抗體，尤其是鼠科、嵌合性或人源化來源，其可依據熟習此技術領域者所知之標準方法獲得。

[0091]一般而言，就單株抗體或其功能性片段或衍生物之製備而言，尤其是鼠科來源，可參考“Antibodies”使用手冊中所描述的(Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988)，或製備自Kohler與Milstein所描述之融

合瘤(Nature, 256:495-497, 1975)。

[0092]本發明之單株抗體可獲得自，如經c-Met或其片段，其含有可由本發明之單株抗體辨識之表位之片段，免疫之動物細胞。該c-Met或其片段，可特別依據一般方法製備，藉由基因重組，起始於含有編碼c-Met之cDNA序列之核酸序列，或是胜肽合成，起始於含有c-Met胜肽序列之胺基酸序列。

[0093]本發明之單株抗體可，例如，經親和性管柱純化，其上固定有c-Met或其片段，其含有可由本發明單株抗體辨識之表位。更特別的是，該單株抗體可經蛋白質A及/或G層析法純化，之後進行或不進行離子交換層析法，目標在於消除殘餘之蛋白質污染物，以及DNA與LPS，之後進行或不進行尺寸排除層析法，使用Sepharese凝膠，以消除潛在之聚集物，由於二聚體或其他多聚體之存在所致。在一較佳實施例中，所有技術皆可同時或連續使用。

[0094]嵌合性或人源化抗體係類似地包括本發明之抗體。

[0095]嵌合性抗體係指該抗體包含天然可變化區域(輕鏈與重鏈)，衍生自特定物種抗體與另一異源性物種(如小鼠、馬、兔子、狗、母牛、雞等)之抗體之重鏈與輕鏈恆定區域之結合物。

[0096]本發明嵌合性種類之抗體或其片段，可使用基因重組法製備。舉例而言，該嵌合性抗體可由選殖一重組DNA製造，其含有促進子與編碼本發明該非人類，尤其是鼠科

之單株抗體可變區域之序列，以及編碼人類抗體恆定區域之序列。本發明之嵌合性抗體係由此重組基因編碼，為小鼠-人類嵌合物，此抗體之特異性係由鼠科DNA所衍生之變化區域所決定，其同型係由衍生自人類DNA恆定區域所決定。就嵌合性抗體之製備方法而言，其可參照Verhoeyn et al. (BioEssays, 8:74, 1988)、Morrison et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6851-6855, 1984) ou le brevet US 4,816,56之文獻。

[0097]人源化抗體係指一抗體，其含有CDR區域，衍生自非人類來源之抗體，而該抗體分子之其他部分則衍生自一(或數個)人類抗體。此外，骨架(稱之為FR)之片段之某些殘基可經修飾，以保留結合之親和性(Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988)。

[0098]本發明之人源化抗體或其片段，可依據此技術領域者所熟知的方法製備(如，描述於Singer et al., J. Immun. 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10: 1-142, 1992; 或 Bebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992)。

[0099]其他人源化方法為此技術領域者已知，例如，“CDR接枝(Grafting)”法，由Protein Design Lab (PDL)描述於專利申請案EP 0 451261、EP 0 682 040、EP 0 9127、EP 0 566 647，或US 5,530,101、US 6,180,370、US 5,585,089與US 5,693,761。下列專利申請案亦有描述：US 5,639,641；

US 6,054,297；US 5,886,152與US 5,877,293。

[0100]本發明抗體之“功能性片段”係特別指一抗體片段，如Fv、scFv（單鏈之sc）、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc片段或雙功能抗體，或其片段，其半生期經化學修飾而增加，如加入聚(烷)二醇，如聚乙二醇(“PEG化”) (PEG化片段稱之為Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEG或Fab'-PEG)(“PEG”為聚乙二醇)，或加入微脂體中，該片段具有至少一特徵性CDR，序列如本發明SEQ ID No. 1至17與56至61，尤其是，其甚至可發揮部分抗體活性，即使活性下降，如其可辨識與結合至c-Met之能力，且，若有需要的話，抑制該c-Met之活性。

[0101]較佳，該功能性片段可包含或由其所衍生之抗體之重鏈或輕鏈可變異部分序列組成，該部分序列足以維持如同其衍生之抗體之結合特異性與足夠之親和性，較佳至少相等於1/100，更佳至少1/10其所衍生之抗體之特性，相對於c-Met而言。此功能性片段含有最少5個胺基酸，較佳6、7、8、9、10、12、15、25、50與100個連續胺基酸，衍生自該抗體序列。

[0102]較佳為，該功能性片段為Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、F(ab')、scFv-Fc型或雙功能抗體片段，其一般具有如同所衍生之抗體之相同結合特異性。在本發明之一較佳實施例中，這些片段係選自於二價片段，如F(ab')₂片段。依據本發明，該抗體片段可獲得自上述抗體，使用如上述之方法，如以酵素切割，如胃蛋白酶或木瓜酵素，及/或經化學反應

切斷雙硫鍵。在另一方法中，本發明之抗體片段可由基因重組技術獲得，為此技術領域者所熟知，或使用胜肽合成法，如使用自動胜肽合成儀，如Applied Biosystems公司所提供者。

[0103]“二價片段”，應瞭解為包含二臂與，尤其是， $F(ab')_2$ 片段之抗體。

[0104]更特別的是，本發明包含抗體或其功能性片段，依據本發明，尤其是嵌合性 or 人源化抗體，獲得自基因重組或化學合成。

[0105]本發明之抗體«衍生物»係指一結合蛋白，包含一蛋白質骨架與至少一選自於來源抗體之CDR，以維持結合能力。此化合物為此技術領域者已知，且於本說明書後列詳細描述。

[0106]更特別的是，本發明之抗體或其功能性片段或衍生物，其特徵在於該衍生物係由一結合蛋白組成，其包含一骨架，其上為至少一經接枝之CDR，以維持來源抗體對位(paratopic)辨識特性。

[0107]本發明描述之6 CDR序列之一或數個序列，可表示於一蛋白質骨架上。在此案例中，該蛋白質骨架會複製出一蛋白質骨架，其上接枝之CDR具有正確折疊，因而使其可維持抗原對位(paratopic)辨識特性。

[0108]此技術領域者知道如何選擇蛋白質骨架，其上有至少一CDR，選自於來源抗體，可經接枝。更特別的是，已知經選擇之骨架可展現出下列數種特性(Skerra A., J.

Mol. Recogn., 13, 2000, 167-187) :

- 系統發生學之良好保守性，
- 強韌的結構，具有已知之三度空間分子組織(如結晶學或NMR)，
- 小尺寸，
- 無或僅有低度之轉譯後修飾，
- 容易製造、表現與純化。

[0109]此蛋白質骨架可具有，但不侷限於，選自於由纖維黏連蛋白(fibronectin)組成族群之結構，較佳為第III型纖維黏連蛋白第十個區塊(FNfn10)、脂質運載蛋白(lipocalin)、抗運載蛋白(anticalin) (Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74(4):257-75)，蛋白質Z衍生自葡萄球菌蛋白質A之B區塊，硫還原蛋白A或任一具有重複區塊，如“錨蛋白重複”(Kohl et al., PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705)、“狢狢重複”、“亮胺酸-富含重複”或“三角四肽重複”之蛋白質。

[0110]亦涉及衍生自毒素(如蠍子、昆蟲、植物或軟體動物毒素)，或神經一氧化氮合成酶之蛋白質抑制劑(PIN)。亦涉及衍生自毒素之骨架。

[0111]作為此雜合架構物之非限制性範例，應涉及插入抗-CD4抗體之CDR-H1(重鏈)，即13B8.2抗體，至PIN暴露迴圈之一中。所得之結合蛋白質之結合特性可維持與來源抗體相同(Bes et al., BBRC 343, 2006, 334-344)。亦包括抗-溶菌酶VHH抗體之neocarzinostatine迴圈之CDR-H3 (重鏈)之接枝(Nicaise et al., 2004)。

[0112]在本發明中，有興趣之CDR係保留，不受限於，CDR-L2，由於其於本發明之二抗體中為保守性，即227H1與224G11。

[0113]如上所述，此蛋白質骨架可包含1至6 CDR，來自來源抗體。在一較佳實施例中，但不受任何限制，此技術領域者可選擇至少一CDR來自重鏈，該重鏈已知特別具有抗體特異性。有興趣CDR之篩選為此技術領域者所熟知 (BES et al., FEBS letters 508, 2001, 67-74)。

[0114]作為一證據，這些範例並非限制性，且任一其他已知或已描述之骨架應包含於本發明中。

[0115]依據一新穎之觀點，本發明係相關於一經單離之核酸，特徵在於其選自於下列核酸：

a) 一核酸、DNA或RNA，編碼一抗體或其功能性片段或衍生物，依據本發明；

b) 一核酸，包含DNA序列，選自於下列序列族群：

- 一核酸，包含序列SEQ ID No. 24、SEQ ID No. 25、SEQ ID No. 26，以及序列SEQ ID No. 33、SEQ ID No. 34與SEQ ID No. 35；

- 一核酸序列，包含序列SEQ ID No. 27、SEQ ID No. 28、SEQ ID No. 29，以及序列SEQ ID No. 36、SEQ ID No. 34與SEQ ID No. 37；

- 一核酸序列，包含序列SEQ ID No. 30、SEQ ID No. 31與SEQ ID No. 32，以及序列SEQ ID No. 38、SEQ ID No. 39與SEQ ID No. 40，以及

- 一核酸序列，包含序列SEQ ID No. 64、SEQ ID No. 65、SEQ ID No. 6，以及序列SEQ ID No. 67、SEQ ID No. 68 與SEQ ID No. 69；

c) 一核酸，包含一DNA序列，選自於下列序列組成之族群：

- 一核酸序列，包含序列SEQ ID No. 41與SEQ ID No. 44；
- 一核酸序列，包含序列 SEQ ID No. 42與SEQ ID No. 45；
- 一核酸序列，包含序列SEQ ID No. 43與SEQ ID No. 46，以及
- 一核酸序列，包含序列SEQ ID No. 70與SEQ ID No. 71；

d) b)或c)中所描述之核酸所對應之RNA核酸；

e) a)、b)與c)中定義之核酸互補核酸；以及

f) 一核酸，其中至少有18個核苷酸可在高度嚴苛條件下與CDR序列SEQ ID No. 24至40，以及64至69之至少一者雜合。

[0116]術語核酸、核酸性或核酸序列、聚核苷酸、寡核苷酸聚核苷酸序列、核苷酸序列，皆等同地使用於本發明中，係指與核苷酸準確之聯結，其經修飾或未經修飾，可為一經定義之核酸片段或區域，含有或未含有非天然核苷酸，且可對應於雙股DNA、單股DNA，為該DNA之轉錄產物。

[0117]應瞭解到本發明並不相關於其天然染色體環境中之核苷酸序列，亦即，天然狀態。其相關於經單離及/或純化之序列，亦即，其經直接或間接選擇，如藉由複製，其環境至少經部分修飾。因此，於此係指一經單離之核酸，經由如宿主細胞基因重組，或化學合成而獲得。

[0118]在高嚴苛條件下之雜合，其溫度條件與離子強度條件皆經選擇，可維持二互補DNA片段間之雜合狀態。用於定義上述聚核苷酸片段之高嚴苛度雜合步驟條件較佳如下。

[0119]該DNA-DNA或DNA-RNA雜合係於二步驟中進行：(1)於42°C下預雜合3小時，於磷酸緩衝液(20 mM, pH 7.5)，含有5 x SSC (1 x SSC，對應於0.15 M NaCl + 0.015 M 檸檬酸鈉溶液)、50%甲醯胺、7%十二烷基硫酸鈉(SDS)、10 x Denhardt's、5%葡聚糖硫酸鹽，以及1%鮭魚精子DNA；(2)實際雜合20小時，於依據探針大小所選擇之溫度下(即42°C，就探針大小> 100個核苷酸)，之後清洗二次，於20°C之2 x SSC + 2% SDS，20分鐘，清洗1次，於20°C之0.1 x SSC + 0.1% SDS，20分鐘。最後一次清洗係於0.1 x SSC + 0.1% SDS，60°C下進行30分鐘，就探針尺寸> 100個核苷酸而言。上述用於經定義尺寸之聚核苷酸之高嚴苛度雜合條件，可由熟習此技術領域者所採用，用於更大或更小尺寸之寡核苷酸，依據Sambrook et al.所揭示者(1989, Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor)。

[0120]本發明類似地相關於一種載體，其包含本發明之

核酸。

[0121]本發明目標在於選殖及/或表現含有本發明核苷酸序列之載體。

[0122]本發明之載體較佳含有可允許選定之宿主細胞中之核苷酸序列表現及/或分泌之元素。因此，該載體必須包含一促進子、轉譯起始訊號與終止訊號，以及適當之轉錄調節區域。其必須於宿主細胞中維持一穩定狀態，並選擇性地具有特定訊號，其特異於轉譯蛋白質之分泌。這些不同之元素係經此技術領域者選擇與最佳化，作為宿主細胞之一功能。就此效應而言，本發明之核苷酸序列可插入經選擇宿主之自動複製載體中，或經選擇宿主之整合載體中。

[0123]此載體係由此技術領域者目前使用之方法製備，所得之選殖物可引入適當之宿主中，經由標準方法，如微脂體轉染、電破法、熱休克或化學方法。

[0124]本發明之載體為，如，質體或病毒來源。其用於轉型宿主細胞，以選殖或表現本發明之核苷酸序列。

[0125]因此，本發明包含經本發明載體轉型或含有本發明載體之宿主細胞。

[0126]該宿主細胞可選自原核或真核系統，如細菌細胞與酵母菌細胞或動物細胞，尤其是哺乳動物細胞，同樣地，亦可使用昆蟲細胞或植物細胞。

[0127]因此，本發明相關於一種動物，除了人類之外，其包含至少一經本發明轉型之細胞。

[0128]依據另一觀點，本發明之一目的為本發明抗體或其功能性片段之製造方法，特徵在於其包含下列步驟：

a) 於適當培養基與培養條件下培養本發明之宿主細胞；以及

b) 回收該抗體，或其一功能性“二價片段”或“衍生物”之一者，其製造於培養基或該經培養細胞中。

[0129]本發明經轉型細胞可用於製備本發明重組多胜肽之方法中。本發明製備重組形式多胜肽之方法，特徵在於其使用一載體及/或經本發明載體轉型之細胞，其本身包含於本發明中。較佳，經本發明載體轉型之細胞，係培養於可允許該多胜肽表現，並可回收該重組胜肽之條件下。

[0130]如前所述，宿主細胞可為原核或真核細胞。尤其是，可辨識本發明核苷酸序列，幫助於此原核性或真核性系統中分泌出。帶有此序列之本發明載體較佳係使用於製造分泌性重組蛋白質。實際上，這些有興趣重組蛋白之純化，會由於其存在於細胞培養上清液中而獲益，而非宿主細胞內部。

[0131]因此，本發明多胜肽可以化學合成方法製備。此製備方法為本發明目的之一。此技術領域者知曉化學合成之方法，如使用固相技術[Steward et al., 1984, Solid phase peptide synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd ed., (1984)]，或使用部分固相技術，藉由片段縮合化，或藉由典型溶液合成法。由化學合成之多胜肽，以及包含對應之非天然胺基酸者，皆包含於本發明中。

[0132]該抗體，或其功能性片段或衍生物，可由本發明方法獲得者，亦包含於本發明中。

[0133]本發明亦相關於使用本發明抗體作為藥物。

[0134]本發明亦相關於一種醫藥組成物，其包含由本發明抗體或其功能性片段組成之活性化合物，較佳混合有賦形劑，及/或醫藥上可接受之載劑。

[0135]本發明之另一實施例為上述之組成物，其更包含一抗腫瘤抗體，以同時、單獨或依序使用之組合產物形式。

[0136]最佳為，該第二抗腫瘤抗體可選自於抗-IGF-IR、抗-EGFR、抗-HER2/neu、抗-VEGFR、抗-VEGF等抗體，或其他技術上已知之抗腫瘤抗體。使用上述第二抗體或其功能性片段或衍生物，為本發明之一部份。

[0137]作為一最佳抗體，抗-EGFR抗體係經選擇，如抗體C225 (Erbix).

[0138]“同時使用”應瞭解為投以本發明之二化合物，於單一或相等之醫藥形式中。

[0139]“分開使用”應瞭解為，同時投以本發明組成物之二化合物於單獨之藥劑形式中。

[0140]“依序使用”應瞭解為連續投以本發明組成物之二化合物，每一者皆置於單獨之藥劑形式中。

[0141]在一般情況下，本發明組成物會可觀地增加癌症治療效果。換句話說，本發明抗-c-Met抗體之效果會未預期地增強，藉由投以細胞毒性試劑。另一個投以本發明組成物之優勢為，可使用較低有效劑量之活性物質，其可預防

或降低副作用之風險，尤其是細胞毒性試劑之副作用。

[0142]此外，本發明組成物可快速獲得預期之療效。

[0143]本發明組成物之特徵在於，其更包含一細胞毒性/細胞生長抑制試劑，以同時、單獨或依序使用之組合產物形式。

[0144]“抗癌治療試劑”或“細胞毒性/細胞生長抑制試劑”係指一物質，當投至一個體時，其可治療或預防該個體癌症之發展。作為此試劑之非限制性範例，其可為烷基化試劑、抗代謝劑、抗腫瘤抗生素、有絲分裂抑制劑、染色體功能抑制劑、抗血管增生試劑、抗雌激素劑、抗雄激素劑或免疫調節劑。

[0145]此試劑，舉例而言，如同VIDAL，2001版所引用者，該頁上指出癌症學與血液學中專欄相關連之化合物“細胞毒性物”，這些引用之細胞毒性物質為本發明較佳之細胞毒性試劑。

[0146]更佳為，下列試劑為本發明較佳者。

[0147]“烷基化試劑”係指任一物質，其可於一細胞中交聯或烷基化任一分子，較佳為核酸(如DNA)。烷基化試劑之範例包括氮芥子氣，如甲二氯二乙胺(mechlorethamine)、氯崙布寇(chlorambucol)、美法崙(melphalen)、氯瑞覺(chlorydrate)、皮普波曼(pipobromen)、潑尼莫司汀(prednimustin)、二-磷酸鹽或雌莫司汀(estramustine)；噁唑樸林(oxazophorins)，如癌得星(cyclophosphamide)、六甲蜜胺(altretamine)、曲洛磷胺(trofosfamide)、硫醯胺

(sulfofosfamide)或異環磷醯胺(ifosfamide)；氮雜環丙烷(aziridines)或亞胺-乙烯(imine-ethylenes)，如塞替派(thiotepa)、三乙基胺(triethylenamine)或四胺(altetramine)；亞硝基尿素，如卡莫司汀(carmustine)、鏈尿佐菌素(streptozocin)、福特莫司汀(fotemustin)或洛莫司汀(lomustine)；烷基磺酸鹽如白消安(busulfan)、替歐舒凡(treosulfan)或英丙舒凡(improsulfan)；三氮烯(triazenes)，如氮烯唑胺(dacarbazine)；或鉑錯合物如順鉑、草酸鉑與卡鉑(carboplatin)。

[0148]“抗代謝物”係指一物質，其可阻斷細胞生長及/或代謝，藉由干擾某些活性，通常為DNA合成。抗代謝物之範例包括氨甲喋呤(methotrexate)、5-氟脲嘧啶、氟脲苷(floxuridine)、5-氟去氧尿苷、截瘤達(capecitabine)、阿糖胞苷(cytarabine)、氟達拉濱(fludarabine)、阿糖胞苷(cytosine arabinoside)、6-巰基嘌呤(6-MP)、6-硫代鳥嘌呤(6-TG)、氟去氧腺苷、5-氮胞苷、吉塞他濱(gemcitabine)、克拉區濱(cladribine)、去氧助間型黴素(deoxycoformycin)與噴司他丁(pentostatin)。

[0149]“抗腫瘤抗生素”係指一化合物，其可預防或抑制DNA、RNA，及/或蛋白質之合成。抗腫瘤抗生素之範例包括多索魯濱(Doxorubicin)、柔紅黴素(daunorubicin)、艾達黴素(idarubicin)、戊柔比星(valrubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、放線菌黴素(dactinomycin)、光輝黴素(mithramycin)、普卡黴素(plicamycin)、絲裂黴素(mitomycin)

C、平陽黴素(bleomycin)，以及甲基苄肼(procarbazine)。

[0150]“有絲分裂抑制劑”可預防正常細胞週期與有絲分裂之進展。一般而言，微小管抑制劑或類毒素，如紫杉醇與多西紫杉醇(docetaxel)，可抑制細胞分裂。長春藤植物鹼如長春鹼(vinblastine)、長春新鹼(vincristine)、長春地新(vindesine)與長春瑞濱(vinorelbine)，亦可抑制細胞分裂。

[0151]“染色體功能抑制劑”或“拓樸酶抑制劑”係指一物質，其可抑制染色體重組蛋白，如拓樸酶I或拓樸酶II之正常功能。染色體功能抑制劑之範例包括，就拓樸酶I而言，喜樹鹼(camptothecine)與其衍生物，如拓樸替康(topotecan)或依諾替康(irinotecan)，以及，就拓樸酶II而言，依托泊苷(etoposide)、依托泊苷磷酸鹽與替尼泊苷(teniposide)。

[0152]“抗血管生成試劑”係指任一藥物、化合物、物質或試劑，其可抑制血管生長。抗血管生成試劑之範例包括，但不侷限於，瑞左新(razoxin)、馬力馬司他(marimastat)、巴替馬司他(batimastat)、皮諾馬司他(prinomastat)、他諾馬司他(tanomastat)、依諾馬司他(ilomastat)、CGS-27023A、鹵素黴菌酮(halofuginon)、COL-3、新伐司他(neovastat)、BMS-275291、沙力邁寶(thalidomide)、CDC 501、DMXAA、L-651582、角鯊多胺(squalamine)、內皮抑制素(endostatin)、SU5416、SU6668、干擾素- α 、EMD121974、介白素-12、IM862、血管抑制素與維他辛(vitaxin)。

[0153]“抗雌激素”或“抗雌激素試劑”係指任一物質，其

會降低、拮抗或抑制雌激素之作用。抗雌激素試劑之範例爲他莫昔芬(tamoxifen)、托力米芬(toremifene)、羅拉昔芬(raloxifene)、左拉昔芬(droloxifene)、艾多昔芬(idoxyfene)、安美達(anastrozole)、來曲唑(letrozole)，以及依西美坦(exemestane)。

[0154]“抗雄激素”或“抗雄激素試劑”係指任一物質，其會降低、拮抗或抑制雄激素之作用。抗雄激素試劑之範例爲氟它胺(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)、比卡魯胺(bicalutamide)、螺內酯(sprironolactone)、環丙氯地孕酮醋酸酯(cyproterone acetate)、柔沛(finasteride)與西咪替丁(cimetidine)。

[0155]“免疫調節劑”爲可刺激免疫系統之物質。

[0156]免疫調節劑之範例包括干擾素、介白素，如阿地介白素(aldesleukine)、OCT-43、地尼介白素(denileukin diflitox)與介白素-2、腫瘤壞死因子，如他索那明(tasonermine)或其他免疫調節劑，香菇多醣(lentinan)、西左醣(sizofiran)、羅喹美克(roquinimex)、匹多莫得(pidotimod)、培家酶(pegademase)、賽莫噴汀(thymopentine)、poly I:C，或左美索(levamisole)與5-氟尿素(flourouracil)組合。

[0157]更詳細的說，此技術領域者應參考由“Association Française des Enseignants de Chimie Thérapeutique”編輯之手冊，標題爲“traité de chimie thérapeutique, vol. 6, Médicaments antitumoraux et

perspectives dans le traitement des cancers, edition TEC & DOC, 2003”。

[0158]亦可作為化學式劑或細胞毒性試劑者，所有皆為激酶抑制劑，如吉菲替尼(gefitinib)或爾羅替尼(erlotinib)。

[0159]在一尤佳實施例中，該組成物作為本發明之一組合產物，特徵為該細胞毒性試劑係化學性耦合至該抗體，用於同時使用。

[0160]為了幫助該細胞毒性試劑與本發明抗體間之耦合，特別可於該二待耦合之分子間引入空間子(spacer)分子，如聚(烷)二烯，如聚乙二烯，或其他胺基酸，或，在另一實施例中，引入該細胞毒性試劑之活性衍生物，其引入之官能基可與本發明抗體反應。這些耦合技術為此技術領域者已知，而不在本說明書中贅述。

[0161]另一方面，本發明係相關於一種組成物，其特徵在於至少一該抗體，或其功能性片段或衍生物，係結合至一細胞毒素及/或放射性元素中。

[0162]較佳為，該毒素或該放射性元素可抑制表現有c-Met之細胞之至少一細胞活性，以一較佳方式，其可阻止該細胞之生長或增生，尤其是使該細胞完全失去活性。

[0163]較佳該毒素亦為一腸內菌毒素，尤其是假單胞菌內毒素A。

[0164]結合至治療用抗體上之放射性元素(或放射性同位素)，較佳為可放射出gamma射線，且較佳為碘¹³¹、鉕⁹⁰、金¹⁹⁹、鉍¹⁰⁰、銅⁶⁷、鉍²¹⁷與銻²¹¹。可放射出β與α射線之同

位素亦可用於治療中。

[0165]藉由將毒素或放射線元素結合到至少一抗體或其功能性片段上，依據本發明，其可使用任何可使該毒素或該放射性元素結合至至少一抗體上之方法，尤其是藉由該二化合物間之共價性耦合，引入或不引入一聯結分子。

[0166]可以化學性(共價)、靜電性或非共價方式結合至共軛物之全部或部分成分之試劑，特別為苯醌、碳二亞胺，尤其是EDC (1-乙基-3-[3-二甲基-胺基丙基]-碳二亞胺氯化氫)、二馬來亞醯胺、二硫雙-硝基苯甲酸(DTNB)、N-琥珀醯胺基S-醯基硫代-醋酸酯(SATA)，具有一或多個苯基疊氮基團之橋聯試劑，其可與紫外光(U.V.)反應，較佳為N-[4-(疊氮水楊基胺基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫基)-丙醯胺(APDP)、N-琥珀亞醯胺-基3-(2-吡啶二硫基)丙酸酯(SPDP)、6-胍基-菸鹼醯胺(HYNIC)。

[0167]另一形式之耦合，尤其是放射性元素，係使用雙官能基離子鉗合劑。

[0168]在這些鉗合劑中，可使用衍生自EDTA(乙二胺四醋酸)，或DTPA(二乙二胺三胺五醋酸)之鉗合劑，其已發展為結合至金屬，尤其是放射活性金屬，以及免疫球蛋白。因此，DTPA與其衍生物可在碳鏈上以不同基團取代，以增加穩定性，以及配位體-金屬錯合物之剛性(Krejcarek et al. (1977); Brechbiel et al. (1991); Gansow (1991); US patent 4,831,175)。

[0169]例如，二乙二胺三胺五醋酸(DTPA)與其衍生

物，其廣泛應用於藥物與生物領域一段很長時間，不論是其自由形式或與金屬離子之錯合形式，具有明顯之特徵，其可與金屬離子形成穩定之鉗合物，且可與醫療用或診斷用蛋白質耦合，如癌症治療中之放射免疫共軛物所發展出之抗體(Meases et al., (1984); Gansow et al. (1990))。

[0170]因此，較佳該至少一抗體形成之本發明共軛物係選自於其功能性片段，尤其是刪除Fc成分之片段，如scFv片段。

[0171]如上所述，在本發明之一較佳實施例中，該細胞毒性/細胞生長抑制試劑，或該毒素及/或放射性元素，係化學性耦合至該組成物之至少一元素上，用於同時使用。

[0172]本發明包含該描述之化合物作為一藥物。

[0173]此外，本發明更包含使用本發明之組成物以製備一藥物。

[0174]在另一觀點中，本發明係說明使用一抗體或其功能性片段或衍生物，及/或上述之組合物，以製備用於抑制腫瘤細胞生長及/或增生之藥物。

[0175]本發明之另一觀點係使用一抗體或其功能性片段或衍生物，及/或上述之組合物，以製備用於預防或治療癌症之藥物。

[0176]本發明亦包含一抑制病患腫瘤細胞生長及/或增生之方法，包含投以本發明抗體或其功能性片段或衍生物，或由本發明融合瘤製造之抗體，或本發明之組成物，至有需要之病患。

[0177]本發明更包含一種預防或治療有需要病患之癌症之方法，包含投以該病患本發明抗體或其功能性片段或衍生物，或由本發明融合瘤製造之抗體，或本發明之組成物。

[0178]在一尤佳觀點中，該癌症為選自於前列腺癌、骨肉瘤、肺癌、乳癌、子宮內膜癌、膠質母細胞瘤或大腸癌之癌症。

[0179]如前所解釋，本發明之一優點為可治療HGF依賴型與非依賴型Met-活化相關癌症。

[0180]本發明，在另一觀點中，包含一疾病之體外診斷方法，該疾病由於c-Met受體之過度表現或低度表現而誘發，起始於懷疑出現異常c-Met受體之生物樣本，特徵為該方法包含一步驟，其中該生物樣本係與本發明之抗體接觸，該抗體，若有需要的話，可經標記。

[0181]較佳為，該疾病係相關於c-Met受體不正常之存在，在該診斷方法中為癌症。

[0182]該抗體或其功能性片段或衍生物，可以免疫共軛或經標記抗體形式存在，以獲得可偵測及/或可定量訊號。

[0183]本發明經標記之抗體或其功能性片段包括，如，稱之為免疫共軛物，其可結合至酵素，如過氧化酶、鹼性磷酸酶、 β -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖澱粉酶、碳酸苷酶、乙醯膽鹼酯酶、溶菌酶、蘋果酸脫氫酶或葡萄糖6-磷酸鹽脫氫酶，或藉由分子如生物素、地高新素(digoxigenin)或5-溴去氧尿苷。螢光標記可類似地結合至本

發明抗體或其功能性片段上，尤其是包括螢光素與其衍生物，螢光團(fluorochrome)、羅丹明(rhodamine)與其衍生物、GFP (GFP為“綠色螢光蛋白”)、丹磺醯基(dansyl)、繖形花內酯(umbelliferone)等。在此共軛物中，本發明之抗體或其功能性片段可以此技術領域者已知之方法製備。其可直接耦合至酵素或螢光標記上，或藉由空間子基團或連接基團媒介，如聚醛，如戊醛、乙烯基二胺四醋酸(EDTA)、二乙烯基-三胺五醋酸(DPTA)，或在如上述耦合劑存在下，用於醫療共軛物。含有螢光標記之共軛物可藉由與異硫基氰酸酯反應而製備。

[0184]其他共軛物可類似地包括化學冷光標記，如魯米諾(luminol)與二氧烷酮(dioxetanes)，生物冷光標記，如螢光酶與螢光素，或放射活性標記，如碘¹²³、碘¹²⁵、碘¹²⁶、碘¹³³、溴⁷⁷、鎳^{99m}、銥¹¹¹、銥^{113m}、鎳⁶⁷、鎳⁶⁸、釷⁹⁵、釷⁹⁷、釷¹⁰³、釷¹⁰⁵、汞¹⁰⁷、汞²⁰³、鎳^{99m}、鎳¹⁰¹、鎳¹⁰⁵、釷⁴⁷、碲^{121m}、碲^{122m}、碲^{125m}、鈾¹⁶⁵、鈾¹⁶⁷、鈾¹⁶⁸、氟¹⁸、釷¹⁹⁹、碘¹³¹。此技術領域者所知，可用於耦合醫療用放射線同位素至抗體上，不論是直接或經由鉗合試劑如前述EDTA、DTPA之方法，皆可用於診斷。亦可標記Na[I¹²⁵]，藉由氫胺T法[Hunter W.M. and Greenwood F.C. (1962) Nature 194:495]，或藉由鎳^{99m}，使用Crockford等人之技術(美國專利4,424,200)，或經由DTPA聯結，如Hnatowich 所描述(美國專利4,479,930)。

[0185]因此，本發明之抗體或其功能性片段，可使用於

偵測及/或定量生物樣本中c-Met受體過度表現或低度表現，較佳為過度表現之方法中，其包含下列步驟：

- a) 將該生物樣本與之抗體或其功能性片段接觸；以及
- b) 呈現出可形成之c-Met/抗體錯合物。

[0186]在一較佳實施例中，本發明之抗體或其功能性片段，可使用於偵測及/或定量生物樣本中c-Met受體之方法中，以監測治療c-Met-依賴型癌症之預防及/或醫療效果。

[0187]更常見的，本發明之抗體或其功能性片段，可優勢地使用於任一情況中，該處表現有c-Met-受體，必須以定性及/或定量方式觀察。

[0188]較佳為，該生物樣本係以生物流體方式形成，如人類來源之血清、全血、細胞、組織樣本或切片。

[0189]任何流程或方便的試驗皆可用於進行此偵測及/或藥劑。該測試可為競爭性或夾層試驗，或任何此技術領域者已知之技術，取決於抗體-抗原形成之免疫錯合物之形成。在本發明說明書之後，該抗體或其功能性片段可經固定或標記。此固定可於數種此技術領域者已知之支撐物上進行。這些支撐物尤其包括玻璃、聚苯乙烯、聚-丙烯、聚乙烯、葡聚糖、耐隆或經修飾槽(cell)。這些支撐物可為可溶性或不可溶性。

[0190]舉例而言，一較佳之方法可使用免疫酵素法，依據ELISA技術，藉由免疫螢光法，或放射線免疫試驗(RIA)技術或等效方法。

[0191]因此，本發明包含進行診斷由於c-Met受體過度

表現或低度表現，所引起病症之方法所需之套組或組件，或用於偵測及/或定量生物樣本中，c-Met受體過度表現或低度表現之方法所需之套組或組件，較佳為過度表現該受體，特徵在於該套組或組件包含下列元件：

- a) 本發明之抗體或其功能性片段；
- b) 選擇性地，中度免疫反應形成試劑；
- c) 選擇性地，該試劑可呈現c-Met/抗體錯合物，由免疫反應製造。

[0192]本發明之一主旨係使用本發明之抗體或組成物，以製備生物活性化合物之藥物，可特異性標靶至過度表現c-Met 受體之細胞。

[0193]該生物活性化合物係指任一化合物，可調節，尤其是抑制細胞活性，尤其是其生長、增生、轉錄或基因轉譯。

[0194]本發明之一主旨亦為體內診斷試劑，包含本發明之抗體或其功能性片段，較佳為經標記，尤其是放射線標記，以及其用於醫療影像，尤其是偵測與細胞中c-Met受體表現或過度表現相關之癌症。

[0195]本發明係相關於一種組成物，為本發明組合產物，或抗-c-Met/毒素共軛物或放射線元素形式，作為一藥物。

[0196]較佳為，該組成物，為本發明組合產物或共軛物形式，可與一賦形劑及/或醫藥上可接受之載體混合。

[0197]在本說明中，醫藥上可接受之載體係指一化合物

或化合物之組合，其整合至一醫藥組成物中，而不會引起副作用，且其可，舉例而言，幫助活性化合物之投藥、增加其半生期及/或體內藥效、增加其於溶液中之溶解度，或增進之保存期。這些醫藥上可接受之載劑為已知，且可為此技術領域者所採用，依據所選擇之活性化合物之天然特性與投藥模式。

[0198]較佳為，這些化合物以系統性途徑投藥，尤其是靜脈內途徑、肌肉內途徑、皮內、腹腔內或皮下途徑。在較佳方式中，該組成物包含本發明之抗體，可投藥數次，以依序方式。

[0199]投藥模式、劑量與最佳醫藥形式可依據一般用於評估病患治療方式之標準，如病患之年紀或體重，他/她一般病症之嚴重程度，應注意到治療之耐受性與副作用。

【圖式簡單說明】

[0200]本發明之其他特徵與優點接於下面範例與圖示進行更詳細之描述，其中：

[0201]第1圖：經篩選抗-c-Met抗體之FACS圖範例；

[0202]第2A與2B圖：以抗體標靶c-Met造成BXPC3增生之體內抑制；

[0203]第3圖：c-Met二聚化之抑制；

[0204]第4圖：以抗-c-Met抗體辨識蛋白質；

[0205]第5A與5B圖：11E1與5D5之“表位拼圖”，使用BIAcore分析；

[0206]第6A與6B圖：MAb對於c-Met磷酸化之影響；

[0207]第7A與7B圖：以抗-c-Met抗體置換經放射線標記之HGF；

[0208]第8圖：抗-c-Met抗體抑制侵入[在此圖中，SVF代表胎牛血清(FCS)]；

[0209]第9圖：抗c-Met抗體對於傷口癒合之影響；

[0210]第10A與10B圖：散佈試驗；

[0211]第11圖：三維管型形成試驗；

[0212]第12A與12B圖：抗體對於橢球體形成之影響；

[0213]第13圖：抗-c-Met Mab在U87MG異種移植模式中之體內活性；

[0214]第14圖：HGF於一組腫瘤細胞株中之表現；

[0215]第15A與15B圖：NCI-H441細胞株之特徵；第15圖A對應於定量RT-PCR分析，以及第15圖B對應於FACS分析；

[0216]第16圖：抗-c-Met抗體在NCI-H441異種移植模式中之體內活性；

[0217]第17A圖：224G11 VL與鼠科IGKV3-5*01生殖細胞基因之比對；

[0218]第17B圖：224G11 VL與鼠科IGKJ4*01生殖細胞基因之比對；

[0219]第18A圖：224G11 VL與人類IGKV3-11*01及IGKV4-1*01生殖細胞基因之比對；

[0220]第18B圖：224G11 VL與人類IGKJ4*02 生殖細胞基因之比對；

[0221]第19A圖：IGKV3-11*01基礎之224G11 VL人源化版本，具有上述之突變；

[0222]第19B圖：IGKV4-1*01基礎之224G11 VL人源化版本，具有上述之突變；

[0223]第20A圖：224G11 VH與鼠科IGHV1-18*01生殖細胞基因之比對；

[0224]第20B圖：224G11 VH與鼠科IGHD2-4*01生殖細胞基因之比對；

[0225]第20C圖：224G11 VH與鼠科IGHJ2*01生殖細胞基因之比對；

[0226]第21A圖：224G11 VH與人類IGHV1-2*02生殖細胞基因；

[0227]第21B圖：224G11 VH與人類IGHJ4*01生殖細胞基因；

[0228]第22圖：人源化224G11 VH，具有上述突變；

[0229]第23A圖：227H1 VL與鼠科IGKV3-5*01生殖細胞基因之比對；

[0230]第23B圖：227H1 VL與鼠科IGKJ4*01生殖細胞基因之比對；

[0231]第24A圖：227H1 VL與人類IGKV3-11*01，及IGKV4-1*01生殖細胞基因之比對；

[0232]第24B圖：227H1 VL與人類IGKJ4*02生殖細胞基因之比對；

[0233]第25A圖：IGKV3-11*01基礎之227H1 VL人源化

版本，具有上述突變；

[0234]第25B圖：IGKV4-1*01基礎之227H1 VL人源化版本，具有上述突變；

[0235]第26A圖：227H1 VH與鼠科IGHV1-18*01生殖細胞基因之比對；

[0236]第26B圖：227H1 VH與鼠科IGHD1-1*02生殖細胞基因之比對；

[0237]第26C圖：227H1 VH與鼠科IGHJ2*01生殖細胞基因之比對；

[0238]第27A圖：227H1 VH與人類IGHV1-2*02生殖細胞基因之比對；

[0239]第27B圖：227H1 VH與人類IGHJ4*01生殖細胞基因之比對；

[0240]第28圖：人源化227H1 VH，具有上述突變；

[0241]第29A圖：223C4 VL與鼠科IGKV12-46*01生殖細胞基因之比對；

[0242]第29B圖：223C4 VL與鼠科IGKJ2*01生殖細胞基因之比對；

[0243]第30A圖：223C4 VL與人類IGKV1-NL1*01生殖細胞基因之比對；

[0244]第30B圖：223C4 VL與人類IGKJ2*01生殖細胞基因之比對；

[0245]第31圖：人源化223C4 VL，具有上述突變；

[0246]第32A圖：223C4 VH與鼠科IGHV1-18*01生殖細胞

胞基因之比對；

[0247]第32B圖：223C4 VH與鼠科IGHD6-3*01生殖細胞基因之比對；

[0248]第32C圖：223C4 VH與鼠科IGHJ4*01生殖細胞基因之比對；

[0249]第33A圖：223C4 VH與人類IGHV1-2*02生殖細胞基因之比對；

[0250]第33B圖：223C4 VH與人類IGHD1-26*01生殖細胞基因之比對；

[0251]第33C圖：223C4 VH與人類IGHJ6*01生殖細胞基因之比對；以及

[0252]第34圖：人源化223C4 VH，具有上述突變；

[0253]第35圖：鼠科224G11 Mab單獨或與溫諾平(Navelbine[®])結合之抗腫瘤活性，在已建立之異種移植NCI-H441腫瘤模式中；

[0254]第36圖：抗-c-Met Mab對於HUVEC增生之評估；

[0255]第37圖：抗-c-Met Mab對於HUVEC管形成之評估；

[0256]第38A圖：11E1 VL與鼠科IGKV4-79*01生殖細胞基因之比對；

[0257]第38B圖：11E1 VL與鼠科IGKJ4*01生殖細胞基因之比對；

[0258]第39A圖：11E1 VL與人類IGKV3D-7*01生殖細胞基因之比對；

[0259]第39B圖：11E1 VL與人類IGKJ4*02生殖細胞基因之比對；

[0260]第40圖：11E1 VL人類源化版本，具有上述突變；

[0261]第41A圖：11E1 VH與鼠科IGHV1-7*01生殖細胞基因之比對；

[0262]第41B圖：11E1 VH與鼠科IGHD4-1*01生殖細胞基因之比對；

[0263]第41C圖：11E1 VH與鼠科IGHJ3*01生殖細胞基因之比對；

[0264]第42A圖：11E1 VH與人類IGHV1-2*02及IGHV1-46*01生殖細胞基因之比對；

[0265]第42B圖：11E1 VH與人類IGHJ4*03生殖細胞基因之比對；

[0266]第43圖：人源化11E1 VH，具有上述突變；

[0267]第44A與44B圖：A549細胞之c-Met磷酸化試驗。評估11E1與224G11純化Mab，在HGF不存在或存在下，不論是30 $\mu\text{g/ml}$ (第44A圖)，或劑量範圍0.0015至30 $\mu\text{g/ml}$ 下，以決定 EC_{50} 值(第44B圖)；

[0268]第45圖：224G11 Mab與溫諾平(Navelbine[®])之體內結合，於NSCLC NCI-H441體外移植模式中；

[0269]第46圖：224G11 Mab與多索魯濱(Doxorubicin)之體內結合，於NSCLC NCI-H441體外移植模式中；

[0270]第47圖：224G11 Mab與多西紫衫醇(Docetaxel)之體內結合，於NSCLC NCI-H441體外移植模式中；

[0271]第48圖：224G11 Mab與替莫唑胺(Temozolomide)之體內結合，於NSCLC NCI-H441體外移植模式中；

[0272]第49A、49B、49C與49D圖：抗-c-Met Mab對於U87-MG橢球體成長之影響；

[0273]第50A與50B圖：嵌合性與人源化形式之224G11之體內活性，於磷酸化-c-Met試驗中；

[0274]第51圖：Biacore分析設定；

[0275]第52圖：在MDA-MB-231細胞與MRC5細胞共植入，作為人類HGF來源之無胸腺裸鼠中，224G11之體內活性；

[0276]第53圖：ELISA基礎之Fc-cMet結合試驗。抗-Fc-c-Met結合活性係於ELISA-基礎試驗中進行，其中抗鼠科Fc共軛物係用於偵測純鼠科單株抗體11E1、224G11與227H1。對於塑膠塗覆重組Fc-cMet之劑量依賴型結合活性，係於450nm偵測；

[0277]第54圖：4HGF-cMet競爭試驗。在此ELISA-基礎試驗中，重組Fc-cMET殘餘結合至塗覆於塑膠之HGF，在經純化鼠科單株抗體11E1、224G11與227H1存在下，係以鼠科Fc共軛物，於450 nm測量；

[0278]第55圖：227H1-衍生重組VH區塊之胺基酸序列比對。227H1 VH胺基酸序列係與經選擇之人類連接用(receiving)框架序列比對，僅具有上述胺基酸序列，發現與鼠科227H1 VH序列不同。227H1 HZ1、HZ2與HZ3 VH序列係對應於互補之227H1鼠科VH區塊人源化版本，粗體部分

保留鼠科之殘基。在HZ3，10個殘基(*)係自動地變化為其人類配對物。在HZ2，來自第三組(3)之七個殘基係經研究。在HZ1VH，來自第二組(2)之九個殘基突變為其人類配對物，僅有來自第一組(1)之六個殘基維持鼠科；

[0279]第56圖：重組227H1抗體之Fc-cMet之ELISA基礎結合試驗。抗-Fc-cMet結合活性係於ELISA-基礎試驗中測量，其中抗人類Fc共軛物係用於偵測嵌合性與人源化227H1-衍生重組抗體。塗覆於塑膠上之人源化VH區塊-衍生227H1抗體之重組Fc-cMet，其劑量依賴性結合活性，係於450nm測量，之後比較原始/參考嵌合性抗體；

[0280]第57圖：重組227H1抗體之Fc-cMet之ELISA基礎結合試驗。抗-Fc-cMet結合活性係於ELISA-基礎試驗中測量，其中抗人類Fc共軛物係用於偵測嵌合性與人源化227H1-衍生重組抗體。塗覆於塑膠上之人源化HZ4VH區塊-衍生227H1抗體之重組Fc-cMet，其劑量依賴性結合活性，係於450nm測量，之後比較原始/參考嵌合性抗體；

[0281]第58圖：227H1 鼠科與重組抗體之HGF-cMet競爭試驗。在此ELISA-基礎試驗中，重組Fc-cMet殘基結合至塑膠塗覆HGF，在不同形式之227H1抗體存在下，使用生物素化不相關之抗-cMet抗體偵測。經純化之鼠科227H1單株抗體，嵌合性與HZ4VH-衍生之人源化227H1-衍生重組抗體，係經試驗，並比較其與HGF-cMet結合之競爭能力，於450nm測量；

[0282]第59圖：227H1-HZ VH人源化可變化區塊序列。

*，代表由於其人類配對物而改變之胺基酸；!，代表在HZ3至HZ1執行(implementation)時人源化之胺基酸；§，代表胺基酸在最後227H1-HZ VH序列中人源化；

[0283]第60圖：11E1-衍生重組VH區塊之胺基酸序列比對。11E1 VH胺基酸序列係與經選擇之人類連接用(receiving)框架序列比對，僅有上述之胺基酸，其中發現與鼠科11E1 VH序列不同。11E1 HZ VH1、VH2與VH3序列對應於11E1鼠科VH區塊之執行人源化版本，粗體字為保留之鼠科殘基。在HZ VH3，七個殘基(*)會自動改變為其配對物。在HZ VH2，來自第三組(3)之七個殘基係經研究。在HZ1VH1，來自第二組(2)之5個殘基突變為其人類配對物，僅有來自第一組(1)之五個殘基維持鼠科；

[0284]第61圖：重組11E1抗體之Fc-cMet之ELISA基礎結合試驗。抗-Fc-cMet結合活性係於ELISA-基礎試驗中測量，其中抗人類Fc共軛物係用於偵測嵌合性與人源化11E1-衍生重組抗體。塗覆於塑膠上之人源化VH區塊-衍生11E1抗體之重組Fc-cMet，其劑量依賴性結合活性，係於450nm測量，之後比較原始/參考嵌合性抗體；

[0285]第62圖：11E1-衍生重組VL區塊之胺基酸序列比對。11E1 VL胺基酸序列係與經選擇之人類連接用(receiving)框架序列比對，僅有上述之胺基酸，其中發現與鼠科11E1 VL序列不同。11E1 HZ VL1、VL2與VL3序列對應於11E1鼠科VL區塊之執行人源化版本，粗體字為保留之鼠科殘基。在HZ VL3，10個殘基(*)會自動改變為其配對

物。在HZ VL2，來自第三組(3)之8個殘基係經研究。在HZ1VL1，來自第二組(2)之8個殘基經突變為其人類配對物，僅有來自第一組(1)之4個殘基維持鼠科；

[0286]第63圖：重組11E1抗體之Fc-cMet之ELISA基礎結合試驗。抗-Fc-cMet結合活性係於ELISA-基礎試驗中測量，其中抗人類Fc共軛物係用於偵測嵌合性與人源化11E1-衍生重組抗體。塗覆於塑膠上之人源化VL區塊-衍生11E1抗體之重組Fc-cMet，其劑量依賴性結合活性，係於450nm測量，之後比較原始/參考嵌合性抗體；

[0287]第64圖：重組11E1抗體之Fc-cMet之ELISA基礎結合試驗。抗-Fc-cMet結合活性係於ELISA-基礎試驗中測量，其中抗人類Fc共軛物係用於偵測嵌合性與人源化11E1-衍生重組抗體。塗覆於塑膠上之單一或雙重人源化區塊-衍生11E1抗體之重組Fc-cMet，其劑量依賴性結合活性，係於450nm測量，之後比較原始/參考嵌合性抗體；

[0288]第65圖：224G11 VH 區塊序列之胺基酸序列比對。224G11 VH胺基酸序列係與227H1 VH序列比對(下標為非均一殘基)，具有經選擇之人類連接用(receiving)框架序列，僅具有上述之胺基酸，發現不同於鼠科224G11 VH序列。224G11 HZ VH0序列係對應於224G1 鼠科VH區塊之“227H1-基礎/全-IMGT”人源化版本。在此序列中並無外-IMGT-CDR殘基維持鼠科；

[0289]第66圖：重組224G11抗體之Fc-cMet之ELISA基礎結合試驗。抗-Fc-cMet結合活性係於ELISA-基礎試驗中

測量，其中抗人類Fc共軛物係用於偵測嵌合性與HZVH0衍生人源化224G11-衍生重組抗體。塗覆於塑膠上之HZVH0“全-IMGT”人源化VH區塊-衍生224G11抗體之重組Fc-cMet，其劑量依賴性結合活性，係於450nm測量，之後比較原始/參考嵌合性抗體；

[0290]第67圖：224G11鼠科與重組抗體之HGF-cMet競爭試驗。在此ELISA-基礎試驗中，重組Fc-cMet殘基結合至塑膠塗覆HGF，在不同形式之224G11抗體存在下，使用生物素化之不相關抗-cMet抗體偵測。經純化之鼠科224G11單株抗體，嵌合性與HZVH0-衍生之人源化224G11-衍生重組抗體，係經試驗，並比較其與HGF-cMet結合之競爭能力，於450nm測量；

[0291]第68圖：224G11 VL區塊之胺基酸序列比對。224G11 VL胺基酸序列係與經選擇之人類連接用(receiving)框架序列比對，僅有上述之胺基酸，其中發現與鼠科224G11 VL序列不同。224G11 HZ VL3序列對應於224G11鼠科VH區塊之“較短-CDR1”人源化版本，而HZ VL6對應於“較長-CDR1”版本，粗體字為保留之鼠科殘基。就二基本人源化版本中，保留之鼠科殘基係排列，用於進一步之人源化過程，其中*代表在基礎版本中人源化之胺基酸，3、2與1代表執行人源化版本設計之殘基基團；

[0292]第69圖：重組224G11抗體之Fc-cMet之ELISA基礎結合試驗。抗-Fc-cMet結合活性係於ELISA-基礎試驗中測量，其中抗人類Fc共軛物係用於偵測嵌合性與人源化

22G11-衍生重組抗體。塗覆於塑膠上之人源化VL3與VL6區塊-衍生224G11抗體之重組Fc-cMet，其劑量依賴性結合活性，係於450nm測量，之後比較原始/參考嵌合性抗體；

[0293]第70圖：重組224G11抗體之Fc-cMet之ELISA基礎結合試驗。抗-Fc-cMet結合活性係於ELISA-基礎試驗中測量，其中抗人類Fc共軛物係用於偵測嵌合性與人源化22G11-衍生重組抗體。塗覆於塑膠上之人源化VL區塊-衍生224G11抗體之重組Fc-cMet，其劑量依賴性結合活性，係於450nm測量，之後比較原始/參考嵌合性抗體；

[0294]第71圖：224G11鼠科與重組抗體之HGF-cMet競爭試驗。在此ELISA-基礎試驗中，重組Fc-cMet殘基結合至塑膠塗覆HGF，在不同形式之224G11抗體存在下，使用生物素化非相關抗-cMet抗體偵測。經純化之鼠科224G11單株抗體，嵌合性與HZ VL4-衍生之人源化224G11-衍生重組抗體，係經試驗，並比較其與HGF-cMet結合之競爭能力，於450nm測量；

[0295]第72圖：VL4人源化224G11 VL區塊之胺基酸序列比對。*，代表由於其在基本HZ VL6版本中之人類配對物而改變之胺基酸；!，代表在HZ VL6至HZ VL4執行時人源化之胺基酸；§，代表胺基酸在最後227H1-HZ VL4序列中人源化；

[0296]第73圖：重組224G11抗體之Fc-cMet之ELISA基礎結合試驗。抗-Fc-cMet結合活性係於ELISA-基礎試驗中測量，其中抗人類Fc共軛物係用於偵測嵌合性與人源化

22G11-衍生重組抗體。塗覆於塑膠上之單一或雙重人源化區塊-衍生224G11抗體之重組Fc-cMet，其劑量依賴性結合活性，係於450nm測量，之後比較原始/參考嵌合性抗體；

[0297]第74圖：224G11鼠科與重組抗體之HGF-cMet競爭試驗。在此ELISA-基礎試驗中，重組Fc-cMet殘基結合至塑膠塗覆HGF，在不同形式之224G11抗體存在下，使用生物素化非相關抗-cMet抗體偵測。經純化之鼠科224G11單株抗體，嵌合性與人源化224G11-衍生重組抗體，係經試驗，並比較其與HGF-cMet結合之競爭能力，於450nm測量；

[0298]第75圖：重組224G11抗體之Fc-cMet之ELISA基礎結合試驗。抗-Fc-cMet結合活性係於ELISA-基礎試驗中測量，其中抗人類Fc共軛物係用於偵測嵌合性與人源化22G11-衍生重組抗體。塗覆於塑膠上之VL4-衍生全人源化224G11抗體之重組Fc-cMet，其劑量依賴性結合活性，係於450nm測量，之後比較原始/參考嵌合性抗體；

[0299]第76圖：重組224G11抗體之Fc-cMet之ELISA基礎結合試驗。抗-Fc-cMet結合活性係於ELISA-基礎試驗中測量，其中抗人類Fc共軛物係用於偵測嵌合性與人源化22G11-衍生重組抗體。塗覆於塑膠上之VL4-衍生全人源化224G11抗體之單一與多突變抗體之重組Fc-cMet，其劑量依賴性結合活性，係於450nm測量，之後比較原始/參考嵌合性抗體；

[0300]第77圖：224G11鼠科與重組抗體之HGF-cMet競爭試驗。在此ELISA-基礎試驗中，重組Fc-cMet殘基結合至

塗覆於塑膠上之HGF，在不同形式之224G11抗體存在下，使用生物素化非相關抗-cMet抗體偵測。經純化之鼠科224G11單株抗體，嵌合性與VL4-衍生全人源化224G11-衍生重組抗體，係經試驗，並比較其與HGF-cMet結合之競爭能力，於450nm測量。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

範例1：產生抗c-Met抗體

[0301]爲了產生-c-Met抗體，8周大之BALB/c小鼠係經皮下免疫3至5次，使用表現有c-Met於細胞膜上之CHO細胞(20×10^6 細胞/劑量/小鼠)，或使用c-Met細胞外區塊融合蛋白轉染2至3次($10-15 \mu\text{g}$ /劑量/小鼠) (R&D Systems, Catalog # 358MT)，或使用此重組蛋白之片段，混合有完全Freund佐劑，用於第一次免疫，以及不完全Freund佐劑，用於下一次。亦進行混合流程，其中小鼠接受CHO-cMet細胞與重組蛋白二者。細胞融合前三天，小鼠經i.p.或i.v.強化(boosted)，使用重組蛋白質或片段。小鼠之脾臟係經收集，並融合至SP2/0-Ag14骨髓細胞(ATCC)，並進行HAT篩選。遂進行四次融合。一般而言，就單株抗體或其功能性片段之製備而言，尤其是鼠科來源，可參照特別描述於“Antibody”手冊中之技術(Harlow and Lane, Antibody: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988)，或製備融合瘤之技術，描述於Kohler and Milstein (Nature, 256:495-497, 1975)。

[0302]所得之融合瘤一開始係以ELISA篩選c-Met重組蛋白，之後經FACS分析A549 NSCLC、BxPC3胰臟，以及U87-MG膠質母細胞瘤細胞株(代表性分析列於第1圖)，確認所製造之抗體亦可辨識腫瘤細胞上之原始受體。在此二試驗中之陽性反應子係經倍增、選殖，一組融合瘤經回收、純化與篩選其穩定性，以抑制體內細胞增生，在BxPC3模式中。

[0303]就此目的而言，50 000 BxPC3細胞係植於96孔盤中，於RPMI培養液，2 mM L-穀胺酸，不含SVF，植入後24小時，待測抗體係加入，最終濃度範圍為0.0097至40 $\mu\text{g/ml}$ ，60分鐘，之後加入100 ng/ml之hHGF。3天後，細胞以0.5 μCi 之 ^3H 胸腺嘧啶暫停16小時。加入三氯醋酸不溶之 ^3H 胸腺嘧啶DNA量係以液態震盪計數器定量。結果係以原始數據表示，以實際評估每一Mab之內生性協同效應(第2A與2B圖)。

[0304]之後係評估抑制至少50%細胞增生之抗體，使用上清液，藉由BRET分析經c-Met轉染之細胞。就此目的而言，表現有C-Met-Rluc或C-Met-Rluc與C-Met-K1100A-YFP之CHO穩定細胞株遂產生。細胞分佈於白色96孔微盤中之DMEM-F12/FBS 5%培養液中，一或二日，之後進行BRET實驗。細胞先培養於37°C，CO₂ 5%環境下，以使細胞貼附於盤上。細胞之後於200 μl DMEM/孔中飢餓(starve)至隔日。在實驗之前，移除DMEM，細胞快速以PBS沖洗。細胞置於PBS中，在待測抗體或參考化合物存在或不存在下，10

分鐘，於37°C，之後加入腔腸素(coelenterazine)，含有或不含HGF，最終體積為50 μ l。繼續靜置於37°C，10分鐘，係於485 nm與530 nm下發出光線，使用Mithras冷光儀(Berthold) (1s/波長/孔，重複15次)。

[0305]BRET比例係如先前定義[Angers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:3684-3689]，為： $[(\text{於} 530 \text{ nm 發光}) - (\text{於} 485 \text{ nm 發光}) \times C_f] / (\text{於} 485 \text{ nm 發光})$ ，其中 C_f 對應於 $(\text{於} 530 \text{ nm 發光}) / (\text{於} 485 \text{ nm 發光})$ ，用於僅表現Rluc融合蛋白之細胞，於相同實驗條件下。簡化此方程式顯示BRET比例對應於530/485 nm所獲得之比例，當二伙伴分子存在時，經所獲得之530/485 nm比例校正，在相同實驗條件下，當僅有一伙伴分子融合至*R. reniformis*螢光酶，存在於該試驗時。為了確保可讀性，結果係以milliBRET單位(mBU)表示；mBU對應於BRET比例乘以1000。

[0306]在此第二體外試驗後，4抗體i)不具內生性活性，當全分子置於增生功能試驗中，ii)抑制明顯之BxPC3增生(第2A與2B圖)，以及iii)抑制c-Met二聚化(第3圖)現象係經選出。此三個IgG1 *kappa*同型抗體為11E1、224G11、223C4與227H1。在此試驗中，5D5 Mab，由Genentech製造，並可獲得於ATCC，係加入作為內生性拮抗劑活性之控制組。

[0307]第2A與2B圖說明11E1、224G11、223C4與227H1不具拮抗活性，相對於5D5，其會降低細胞增生之藥劑依賴性刺激，在配位體不存在下。明顯之細胞增生抑制係於該

經選出之4抗體中觀察到。5D5在此試驗中對於HGF-誘發之細胞增生無影響。

[0308]當評估二聚化阻斷效應時，係觀察到明顯之作用，達到32、55、69與52%之二聚化抑制，分別就224G11、223C4、11E1與227H1。與各實驗之基礎訊號相較，5D5抗體在此二聚化模式中不具作用。

實驗2：抗-c-Met抗體之蛋白直辨識

[0309]爲了鑑定該三抗體之辨識情況，遂設定三個ELISA試驗，使用重組c-Met蛋白，其單體性片段(係由切割該重組c-Met-Fc蛋白與該重組SEMA區塊而得)。

[0310]列於第4圖之結果顯示，該4抗體會辨識雙體與單體蛋白質。爲了呈現這些ELISA試驗，人類雙體c-Met蛋白(R&D systems, cat# 358MT)係塗覆，濃度爲0.7 µg/ml於PBS中，於4°C至隔日。在培養盤(Costar #3690)使用0.5%明膠溶液於37°C飽和2小時後，融合瘤懸浮液係靜置於37°C，1小時。一旦以PBS浸潤後，該抗小鼠HRP-抗體(Jackson ImmunoResearch, catalog #115-035-164)係加至每一孔中，以1/5000稀釋物，於ELISA緩衝液中(0.1%明膠/0.05% Tween 20於PBS)，培養盤靜置於37°C，1小時。以PBS清洗3次後，過氧化酶之活性係以加入50 µl TMB受質(Uptima)而測定。反應維持5分鐘，於室溫下。反應係以加入50 µl/孔之1 M H₂SO₄溶液而停止，並於平面讀取儀，於450 nm讀取。相同之流程係於單體c-Met與SEMA區塊進行，但在此情況下，蛋白質係分別以5與3 µg/ml濃度塗覆。

[0311]引入5D5 Mab作為陽性控制組，預期由SEMA蛋白所辨識。224G11、227H1與223C4並不會結合至SEMA區塊。11E1可結合至SEMA。

[0312]為了決定11E1與5D5二者是否皆可辨識SEMA區塊，而競爭重疊表位，遂進行BIAcore分析。BIAcore系統係以表面等離子體共振(Surface Plasmon Resonance)現象為基礎，傳輸之資料係以監測即時結合現象呈現。可用於將抗體分類，於“表位拼圖”實驗中。無法同時結合至同一抗原分子(相同或鄰近結合位置)之抗體分為同一組。相反的，當其各自之結合位置明顯分開，使該二抗體可同時結合，則分類為二不同組。在此試驗中，抗原一般使用作為配位體(固定於感應晶片上)，而抗體則作為分析物(溶液相)，不具任何標示。

[0313]所有上述實驗皆於BIAcore X儀器上進行(GE Healthcare Europe GmbH)。CM5感應晶片(BIAcore)係以小鼠抗-Tag-6His Mab (R&D System ref. MAB050)活化，依據使用手冊製備，藉由使用胺基耦合套組(BIAcore)。流動緩衝液(running buffer) (HBS-EP)與再生緩衝液(regeneration buffer) (Glycine, HCl)來自BIAcore。所產生之重組可溶性版本人類HGF受體，為嵌合性分子c-Met-Fc-Tag His，來自於R&D系統(ref. 358-MT-CF)。實驗係於25°C進行，流速為30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之c-Met溶液置於流動緩衝液中，係於一分鐘內注入流動槽2 (fc2)，一般會捕捉到270 RU之可溶形式c-Met。流動槽1(fc1)係作為參考物，以確認抗體結合至

感應晶片基質之非特異性結合。

[0314]遂進行待測抗體之連續注射。抗體係注入二流動槽中，在2分鐘內。第二抗體(或相同)之後於相同條件下注入。若未觀察到明顯之結合，則進行第三次注射，使用另一抗體。感應晶片之後注入再生緩衝液30秒進行再生。不論是抗體或c-Met-Fc皆在此階段丟棄。

結果分析：

[0315]抗體“A”阻斷抗體“B”結合之能力，係以下列比例計算 $BIA/C=(R2A/B/R1B) \times 100$ ：其中R2A/B對應於MAb “B”之結合，在MAb “A”之後注射，R1B對應於MAb “B”之結合，當其首先注射。低於20%之BIA/C代表A可阻斷B之結合，表示A與B具有鄰近之結合位置。

[0316]表位拼圖已使用2 Mab，11E1與5D5進行。

表3

$\begin{matrix} 2^{nd} \text{ Ab (B)} \\ 1^{st} \text{ Ab (A)} \end{matrix}$	11E1	5D5
11E1	<u>6.5%</u>	84.2%
5D5	98.4%	<u>11.0%</u>

[0317]約270RU經捕捉c-Met-Fc之結合，使用連續2分鐘注射Mab 5D5 (第一次)、5D5 (第二)與11E1 (第三)，濃度為10 $\mu\text{g/ml}$ ，每一者皆呈現出5D5與11E1可明確地結合至二分開位置(第5A圖)。此觀察係以抗體反倒順序確認(第5B圖)。

[0318]表3摘錄了此二抗體不同順序獲得之計算比例。黑色值(超過75%)代表Mab A不會阻斷Mab B之結合。粗體/斜體值(低於20%)代表二抗體(A與B)結合位置為相等，或相

當接近，而無法同時結合。

範例3：Mab對於c-Met磷酸化之影響

[0319]爲了決定抗-c-Met抗體對於c-Met磷酸化之活性，磷酸c-Met ELISA試驗遂進行。簡言之，500 000個A549細胞係植於6-孔盤中每一孔，使用F12K培養液+ 10% FCS。16小時後，加入HGF(100 ng/ml)，細胞經飢餓，每一待測抗體以最終濃度30 µg/ml加入，15分鐘後以配位體刺激。加入HGF 15分鐘後，加入冷裂解緩衝液，細胞刮下，收集細胞裂解物，並於4°C以13 000 rpm離心10分鐘。上清液係以BCA套組(Pierce)定量，並儲存於-20°C。就ELISA試驗而言，山羊抗-c-Met抗體(R&D ref. AF276)係使用作為捕捉抗體(於4°C塗覆至隔日)，經過飽和步驟後(於室溫下1 h)，使用TBS-BSA 5%緩衝液，將來自不同裂解物之25 µg蛋白質加至96-孔盤之每一孔中。於室溫下靜置90分鐘後，盤清洗四次，並加入抗-磷酸-c-Met抗體(兔子抗-pY1230-1234-1235 c-Met)。額外靜置1小時後，清洗四次，於室溫下加入抗-兔子-HRP (Biosource) 1小時，之後加入魯米諾(Luminol)受質，之後以Mithras裝置評估發光。結果列於第6B圖，顯示11E1、224G11、223C4與227H1分別會抑制c-Met磷酸化68、54、80與65%，與5D5 Mab相較，其顯示出較弱之c-Met磷酸化抑制(42%)。在此試驗中，弱基礎效應(小於20%)係觀察於4候選抗體中(第6A圖)。如本專利之不同範例中所述，此弱基礎效應對於抗體活性並無影響，在其他體外與體內試驗中。5D5使用作為控制組，在此試驗中為一明顯之基礎

效應。

範例4：以抗-c-Met抗體置換經放射線標記之HGF

[0320]爲了測定是否抗-c-Met抗體可置換HGF，遂設置結合試驗。簡言之，蛋白質A之FlashPlate 96-孔微盤(Perkin Elmer)係以0.5%明膠之PBS溶液飽和(200 μ l/孔，2h，於室溫下)，之後加入重組c-Met-Fc (R&D Systems)，作爲塗覆蛋白質。2000 μ l之1 μ g/ml c-Met-Fc 之PBS溶液係加至每一孔中。之後該盤靜置於4°C至隔日。自由之殘餘蛋白A位置更以非相關hIgG (0.5 μ g/well in PBS)進行飽和作用，於室溫下2 h。該盤以PBS清洗，在每一步驟後。

[0321]就競爭試驗而言， $[^{125}\text{I}]$ -HGF (特異活性~2,000 Ci/mmol)在200 pM時結合至經固定c-Met之情況，係於各種抗-c-Met單株抗體11E1、224G11、223C4、227H1或HGF (R&D Systems)存在下，濃度範圍爲0.1 pM至1 μ M，於PBS中，pH 7.4，測量。該盤於室溫下靜置6 h，之後置於Packard頂部計數微盤震盪計數器上。非特異性結合係於1 μ M之HGF存在下測定。單株抗體9G4，其並非標靶c-Met，但會特異性地辨識一大腸桿菌蛋白質，係用於作爲小鼠IgG1同型控制組。

[0322]總特異性 $[^{125}\text{I}]$ -HGF結合百分比，係以配位體濃度函數繪製，爲半對數圖。各抑制劑抑制50%放射線配位體結合時之濃度(IC₅₀)，係由此對數競爭曲線獲得(第7A與7B圖)。

[0323]如同預期，非放射線標記之HGF可完全置換

[¹²⁵I]-HGF而結合至經固定之c-Met，其中該控制組抗體9G4，並未顯示任何HGF阻斷活性(第7A與7B圖)。單株抗-c-Met抗體11E1、224G11、223C4與227H1，可抑制[¹²⁵I]-HGF結合至經固定之c-Met上，IC₅₀值分別為20 nM、3 nM、2.7 nM與5.8 nM。抗體224G11、223C4與227H1之IC₅₀係與未經放射線標記之HGF之IC₅₀相較，其包含3至5 nM，其中抗體11E1具有較高之IC₅₀值。

範例5：以抗-c-Met抗體抑制入侵

[0324]爲了評估抗-c-Met 抗體對於入侵過程之抑制作用，A549細胞係植於BD BioCoat™ Matrigel™侵入室之上室中，(6.5 mm直徑孔，具有8-μm聚碳酸酯薄膜)。A549細胞經飢餓24小時，在進行入侵試驗之前。之後500 000個A549細胞係植於化學趨化緩衝液中(DMEM培養液，0.1% BSA, 12 mM Hepes)，在每一室之上層孔中，以Matrigel塗覆，具有或不具有待測抗體(最終Mab濃度爲10 μg/ml)。該盤靜置於37°C，5% CO₂，1小時，下室充滿含有400 ng/ml 之rhHGF之生長培養液，或僅有培養液。各室係靜置於37°C，5% CO₂，48小時。在此靜置時間終點，維持於過濾膜上層表面之細胞，係輕柔地以棉花移除，而轉移至過濾膜下表面之細胞係經裂解、以CyQuant GR染料緩衝液(Invitrogen)染色，並使用螢光讀取儀Berthold Mithras LB940計數。所有條件皆經三重複測試。

[0325]如預期地，HGF會誘發明顯的腫瘤細胞侵入，可與陽性控制組，加入10% FCS所誘發之現象相較(第8圖)。

所引入作為同型控制組之鼠科IgG1 9G4，並不具有明顯之基礎效應，或HGF-誘發侵入現象，當與不含IgG之植入細胞相較。在11E1、224G11、223C4與227H1未觀察到協同效應，當僅單獨加入時，而明顯且可相較之HGF-誘發侵入之抑制則可於3 Mab觀察到。

範例6：抗-c-Met抗體對於傷口癒合之抑制

[0326]HGF刺激移動。為了測定抗-HGF抗體是否可抑制轉移，NCI-H441細胞係生長至高密度，並使用P200微滴定管尖頭劃出空白處(gap)。細胞之後經HGF (100 ng/ml)刺激，轉移橫越空白處，在11E1存在或不存在下。僅具有11E1之孔亦經評估。每一待測條件係經六次評估，並進行3獨立實驗，靜置至隔日後，細胞係以Axio Vision Camera (物鏡x4)觀測。

[0327]HGF誘發明顯的轉移，導致一夜間完全蔓延(第9圖)。與9G4不相關之IgG1係使用作為一同型控制組，對於細胞轉移不會有任何影響。如同預期，拮抗作用係於5D5觀察到，當單獨添加時，但此抗體會觀察到有明顯之細胞轉移抑制，當存在有HGF時，部分之空白處維持空曠。5D5之Fab片段不具任何協同作用，當單獨加入時。然而，此片段未觀察到任何作用，當HGF存在時。觀察同型控制組9G4時，MAb 11E1並不具有協同作用，當單獨添加時，並作用為完全拮抗劑，當HGF存在時。

範例7：散佈試驗

[0328]SK-HEP-1細胞係以低密度($1 \cdot 10^4$ 細胞/孔)植入於

24-孔盤中，具有DMEM與10% FCS，並生長24小時，之後同時添加HGF (100 ng/ml)與待測抗體(10 µg/ml)。靜置72小時後，殖株係經固定，並以0.2%結晶紫之甲醇溶液染色，並以視覺散佈評估。每一測試條件皆經三重複，並進行3獨立實驗。

[0329]加入HGF至SK-HEP-1細胞中，會誘發明顯的細胞散佈(第10A與10B圖)。引入9G4抗體作為同型控制組，不論是單獨或在HGF存在下皆不具作用。如同預期，5D5抗體僅展示出明顯之協同作用，而無抑制作用，當5D5與HGF一同加入時(第10A圖)。不論是單獨加入11E1 (第10A圖)或224G11 (第10B圖)，皆未觀察到協同作用。這些抗體呈現出非常明顯之抑制作用，當HGF存在時(第10A與10B圖)。

範例8：三度空間管形成試驗

[0330]SK-HEP-1細胞係以 1.10^4 細胞/孔植於24-孔盤中，具有DMEM與10% FCS/Matrigel (50/50)，並靜置30分鐘，之後同時加入HGF (100 ng/ml)與待測抗體(10 µg/ml)。靜置7天後，細胞係以視覺評估管形成。每一待測條件皆重複三次，並進行3獨立實驗。

[0331]添加HGF會誘發明顯之SK-HEP-1管形成(第11圖)。引入抗體9G4作為同型控制組，不論是單獨或在HGF存在下皆不具作用。如同預期，5D5抗體僅展示出明顯之協同作用，而無抑制作用，當5D5與HGF一同加入時。僅加入11E1、223C4與224G11時未觀察到任何協同作用，而在HGF存在時，可於11E1與223C4中觀察到完全抑制作用。部分但

明顯之抑制係於224G11 Mab觀察到。

範例9：橢球體(Spheroid)形成

[0332]爲了評估抗-c-Met抗體抑制體外腫瘤成長之情況，在接近體內情況之模式U-87MG中，係產生人類膠質母細胞瘤細胞(ATCC # HTB-14)橢球體。U87-MG細胞長成單層膜後，以胰蛋白-EDTA使其分離，並且再懸浮於補充有10% FBS之完整細胞培養基(DMEM)中。橢球體始於將625個細胞培養於96孔培養盤之單孔中，內含DMEM-10% FCS。爲了防止細胞黏著於培養盤底部，培養盤預先以含95%乙醇之聚HEMA塗層並於室溫中風乾。細胞於標準培養條件下進行培養，係37°C、5% CO₂之潮濕培養箱。經純化之單株抗體(10 µg/ml)於橢球體培養3天與7天後加入。在培養後第4天加入HGF (400 ng/ml)。橢球體維持培養至少10天。隨後，橢球體之生長觀察係利用axiovision軟體之自動偵測模組測量橢球體之表面積。表面積以µm²表示。每一條件取8-16個橢球體進行測量。

[0333]第12A與12B圖顯示在10% FCS存在下，未觀察到刺激現象，當HGF加至完全培養液時。如預期，9G4同型控制組對於橢球體生長不具影響。11E1與223C4會明顯降低橢球體之生長，在HGF存在或不存在下。5D5 Fab片段未觀察到任何作用。

範例10：抗-c-Met Mab在U87MG異種移植模式中之體內活性

[0334]六至八週大之無胸腺裸鼠(Athymic nude mice)係

飼養於頂部裝有無菌過濾器之飼養籠中，維持於無菌條件下，依據法國與歐洲標準飼養。U87-MG，一種膠質母細胞瘤細胞株，表現有c-Met與自分泌配位體HGF，係選用於體內評估。小鼠係皮下注射 5×10^6 個細胞。細胞植入後6天，係測量腫瘤(約 100 mm^3)，以六隻為一組並依腫瘤大小將小鼠進行分組，每週以1 mg/每劑每一種待測抗體處理兩次。之後小鼠係觀察異種移植生長速率與體重改變。腫瘤體積係以下式計算： $\pi (Pi)/6 \times \text{長} \times \text{寬} \times \text{高}$ 。

[0335]結果摘錄於第13圖，顯示所有測試之抗體會明顯抑制U87-MG細胞之體內生長。A圖使用中和抗-IGF-1R抗體(IgG1)，顯示體內抑制特別與HGF-cMet軸向調節相關。

範例11：抗-c-Met Mab在NCI-H441異種移植模式中之體內活性

[0336]NCI-H441係衍生自乳突狀肺腺癌，表現有高量之c-Met，並呈現出基本之c-Met RTK磷酸化。

[0337]為了測定是否此細胞株表現有高量之c-Met，並可製造HGF，遂進行RT-PCR與FACS或ELISA (Quantikine HGF; R&D systems)二者。就定量RT-PCR而言，細胞株中之總HGF或cMet轉錄表現量係以定量PCR評估，使用標準之TaqMan™ 技術。HGF或c-Met轉錄量係以管家基因核糖體蛋白質，大量，P0 (RPL0)校正，結果係已經校正表現值表示(2-ddCT法)。

[0338]用於 RPL0 之引子 / 探針為，正向，5'-gaaactctgcattctcgcttcctg-3' (SEQ ID No. 47)；逆向，

5'-aggactcgtttgtacccgttga-3' (SEQ ID No. 48); 以及探針, 5'-(FAM)-tgcagattggctacccaactgttgca-(TAMRA)-3' (SEQ ID No. 49)。HGF之引子/探針組, 正向, 5'-aacaatgcctctggttcc-3' (SEQ ID No. 50); 逆向, 5'-cttgtagctgcgtcctttac-3' (SEQ ID No. 51); 以及探針, 5'-(FAM)-ccttcaatagcatgtcaagtggagtga-(TAMRA)-3' (SEQ ID No. 52)。cMet之引子/探針組為, 正向, 5'-cattaaaggagacctcaccatagcta-3' (SEQ ID No. 53); 逆向, 5'-cctgatcgagaaaccacaacct-3' (SEQ ID No. 54); 以及引子, 5'-(FAM)-catgaagcgaccctctgatgtccca-(TAMRA)-3' (SEQ ID No. 55)。熱循環流程為於50°C 熔融2分鐘, 於95°C, 10分鐘, 之後進行40循環之95°C, 15秒, 以及62°C, 1分鐘。

[0339]無HGF之mRNA發現於NCI-H441(第14圖), 且HGF並未於NCI-H441上清液中偵測到, 使用ELISA試驗。在這些實驗中, U87-MG, 一膠質母細胞瘤細胞株, 已知為HGF之自分泌(autocrine)細胞株, 係引入作為陽性控制組。RT-PCR分析係顯示HGF mRNA在U87-MG中有明顯量, 1.9 ng HGF/百萬細胞係於U87-MG細胞上清液中偵測到。進行定量RT-PCR與FACS分析, 第15A與15B顯示出如預期地, NCI-H441細胞會明顯過度表現c-Met, 且此表現會明顯高於U87-MG細胞中觀察者。在此實驗中, MCF-7細胞株係引入作為陰性控制組。NCI-H441為非自分泌組成活化細胞株, 可獨立於HGF配位體成長, 其中配位體非依賴性c-met二聚化會發生, 為受體過度表現之結果。

[0340]抗-c-met抗體於此非自分泌性細胞株中之體內活性評估，可提供某些意義，關於其對於c-met二聚化衝擊之效用。

[0341]第16圖顯示224G11、11E1與227H1會明顯抑制NCI-H441之體內成長，說明除了配位體依賴性抑制外，這些抗體可抑制二聚化，亦可標靶c-met之配位體非依賴性抑制。如本說明書前述，224G11、11E1與227H1顯示出不同於5D5單臂(OA-5D5)抗-c-Met抗體。

範例12：藉由抗體224G11之CDR-接枝之人源化過程

I - 輕鏈可變異區域之人源化

224G11VL核苷酸序列與鼠科生殖細胞基因之比較

[0342]在預先步驟中，224G11 VL之核苷酸序列係與IMGT資料庫(<http://imgt.cines.fr>)之部分鼠科生殖細胞基因比較。

[0343]鼠科IGKV3-5*01與IGKJ4*01生殖細胞基因分別具有99.31%之等同性，在V區域，以及94.28%，在J區域，已經辨識出。就所獲得之等同性而言，決定直接使用224G11VL序列尋找人類類似物。

[0344]這些比對示於第17A圖，為V基因，以及17B，為J基因。

[0345]224G11VL核苷酸序列與人類生殖細胞基因之比較

[0346]為了辨識出用於CDR接枝之最佳人類候選物，展示出與224G11VL有最佳等同度之人類生殖細胞基因係經

搜尋。之後，224G11VL之核苷酸序列係與IMGT資料庫中之部分人類生殖細胞基因比對。爲了使篩選最佳化，遂進行蛋白質序列間之比對，尋找較佳之類似物。

[0347]此二互補方法可辨識出二可能之連接用(receiving)人類V序列，用於鼠科224G11 VL CDR。核苷酸之比對可提供人類IGKV3-11*01生殖細胞基因75.99%之序列等同性，其中蛋白質比對提供人類IGKV4-1*01生殖細胞基因67.30%之序列等同性。值得注意的是，在此二案例中，該二最接近之生殖細胞基因與經分析之序列，顯示出不同之CDR1胺基酸長度(224G11 VL有10個胺基酸；IGKV3-11*01有6個胺基酸；IGKV4-1*01有12個胺基酸)。

[0348]在J區域中，與人類比對最佳之類似積分爲人類IGKJ3*01，顯示出序列等同度80%。但較高量之連續相同核苷酸，與較佳之胺基酸適化，在比對人類IGKJ4*02生殖細胞基因(序列等同度77.14%)時發現。因此，該IGKJ4*02生殖細胞基因係經選擇爲連接用(receiving)人類J區域，用於鼠科11E1 VL CDR。

[0349]比對係示於第18A圖，爲V區域，及第18B圖，爲J區域。

224G11 VL之人源化版本

[0350]爲了提供用於鼠科 224G11 VL CDR之二連接用(receiving)人類V區域，係描述224G11 VL區域之二人源化版本。第一者對應於人類框架之初始試驗，具有較短之CDR1長度(IGKV3-11*01)，第二者具有較長之CDR1長度

(IGKV4-1*01)。

a) IGKV3-11*01基礎之224G11 VL人源化版本

[0351]下列人源化步驟係由聯結生殖細胞基因序列 IGKV3-11*01 與IGKJ4*02，以及鼠科224G11 VL之CDR至這些生殖細胞基因序列之框架組成：

[0352]如第19A圖所示，224G11 VL序列中之粗體殘基對應於25個胺基酸，其發現在224G11 VL區塊與經選擇之人類框架中不同(人類FR，即IGKV3-11*01與IGKJ4*02)。

[0353]就數個標準而言，如其已知參與VH/VL界面、抗原結合或CDR結構，會在鼠科與人類殘基間變異之胺基酸組，係位於可變異區域之3D結構中之殘基，25個胺基酸中有3個為最終突變。此三個最重要之定義殘基，突變為其人類配對物，分別為鼠科之M39變為人類L、H40變為A，以及R84變為G。這些排名第一之殘基係顯示於第19A圖，為224G11 HZ1VL序列中之粗體殘基，其維持為鼠科。

[0354]當然，上述待測之殘基不受限制，但必須考慮為較佳突變。

[0355]由於分子模擬之幫助，可辨識出其他突變。可使用者為下列排名第二殘基，即殘基15 (L/P)、49 (P/A)、67 (L/R)、68 (E/A)、93 (P/S)與99 (V/F)，其上突變亦為另一較佳實施例所採用。

[0356]當然，上述之殘基最終需經測試，並非限制，但必須考慮為較佳突變。在一較佳實施例中，所有其他16個胺基酸為在25個不同胺基酸中排名第三之殘基，可重新考

慮。

[0357]所有上述之突變可單獨測試，或依據各種組合。

[0358]第19A圖代表執行IGKV3-11*01基礎之人源化224G11 VL，具有上述清楚定義之突變。在每一假設之突變下標之數字代表該突變將會形成之排行。

b) IGKV4-1*01基礎之224G11 VL人源化版本

[0359]下列人源化步驟係由聯結生殖細胞基因序列IGKV4-1*01與IGKJ4*02，以及鼠科224G11 VL之CDR至這些生殖細胞基因序列之框架組成。

[0360]如第19B圖所示，224G11 VL序列中之粗體殘基對應於22個胺基酸，其發現在224G11 VL區塊與經選擇之人類框架中不同(人類FR，即IGKV4-1*01與IGKJ4*02)。

[0361]就數個標準而言，如其已知參與抗原結合之VH/VL界面或CDR結構，會在鼠科與人類殘基間變異之胺基酸組，係位於可變異區域之3D結構中之殘基，22個胺基酸中有4個為最終突變。此三個最重要之定義殘基，突變為其人類配對物，分別為鼠科之L4變為人類之M、M39變為L、H40變為A，以及R84變為G。這些排名第一之殘基係顯示於第19B圖，為224G11 HZ2VL序列中之粗體殘基，其維持為鼠科。

[0362]當然，上述待測之殘基不受限制，但必須考慮為最佳突變。

[0363]由於分子模擬之幫助，可辨識出其他突變。可使用者為下列排名第二之殘基，即殘基25 (A/S)、66 (N/T)、

67 (L/R)，以及93 (P/S)，其上突變亦為另一較佳實施例所採用。

[0364]當然，上述之殘基最終需經測試，並非限制，但必須考慮為較佳突變。在另一較佳實施例中，所有其他14個胺基酸，在此22個不同胺基酸中為排名第三，可重新考慮。

[0365]所有上述之突變可單獨測試，或依據各種組合。

[0366]第19B圖代表執行IGKV4-1*01基礎之人源化224G11 VL，具有上述清楚定義之突變。在每一假設之突變處下標之數字代表該突變將會形成之排行。

II -重鏈可變異區域之人源化

224G11 VH核苷酸序列與鼠科生殖細胞基因之比較

[0367]在預先步驟中，224G11 VH之核苷酸序列係與IMGT資料庫(<http://imgt.cines.fr>)之部分鼠科生殖細胞基因比較。

[0368]鼠科IGHV1-18*01、IGHD2-4*01與IGHJ2*01生殖細胞基因分別具有92.70%之等同性，在V區域，以及75.00%，在D區域，以及89.36%，在J區域，已經辨識出。就所獲得之等同性而言，決定直接使用224G11VH序列尋找人類類似物。

[0369]這些比對示於第20A圖，為V基因，20B，為D基因，以及20C，為J基因。

224G11 VH核苷酸序列與人類生殖細胞基因之比較

[0370]為了辨識出用於CDR接枝之最佳人類候選物，展

示出與224G11 VH有最佳等同度之人類生殖細胞基因係經搜尋。之後，224G11 VH之核苷酸序列係與IMGT資料庫中之部分人類生殖細胞基因比對。爲了使篩選最佳化，遂進行蛋白質序列間之比對，尋找較佳之類似物。

[0371]此二互補方法可辨識出二可能之連接用(receiving)人類IGHV1-2*02 V序列，用於鼠科224G11 VH CDR，在核苷酸層級具有75.00%等同度，在蛋白質層級具有64.30%等同度。

[0372]值得注意的是，D區域嚴格地屬於VH區塊之CDR3區域。該人源化過程係依據「CDR-接枝」法。最接近之人類D-基因分析並無法用於此策略中。

[0373]尋找J區域之類似物，可辨識出人類IGHJ4*04生殖細胞基因，具有78.72%之序列等同度。

[0374]人類 IGHV1-2*02 V 生殖細胞基因與人類 IGHJ4*01 J生殖細胞基因，係經選擇爲連接用(receiving)人類序列，用於鼠科224G11 VH CDR。

[0375]比對係示於第21A圖，爲V區域，及第21B圖，爲J區域。

224G11 VH之人源化版本

[0376]下列人源化步驟係由聯結經選擇之生殖細胞基因序列IGHV1-2*02與IGHJ4*01，以及鼠科224G11 VH之CDR至這些生殖細胞基因序列之框架上組成。

[0377]如第22圖所示，224G11 VH序列中之粗體殘基對應於30個胺基酸，其發現在224G11 VH區塊與經選擇之人

類框架中不同(人類FR，即IGK1-2*02與IGKJ4*01)。

[0378]就數個標準而言，如其已知參與VH/VL界面、抗原結合或CDR結構，會在鼠科與人類殘基間變異之胺基酸組，係位於可變異區域之3D結構中之殘基，30個胺基酸中有4個為最終突變。此4個最重要之定義殘基，突變為其人類配對物，分別為鼠科之D51變為人類E、G55變為W、V80變為R，以及K82變為T。這些排名第一之殘基係顯示於第22圖，為224G11 HZVH序列中之粗體殘基，其維持為鼠科。

[0379]當然，上述待測之殘基不受限制，但必須考慮為最佳突變。

[0380]由於分子模擬之幫助，可辨識出其他突變。可使用者為下列排名第二之殘基，即殘基25 (T/A)、48 (E/Q)、49 (S/G)、53 (I/M)、76 (A/V)、78 (L/M)與90 (D/E)，其上突變亦為另一較佳實施例所採用。

[0381]當然，上述之殘基最終需經測試，並非限制，但必須考慮為較佳突變。在一較佳實施例中，所有其他19個胺基酸在30個不同胺基酸中為排名第三之殘基，可重新考慮。

[0382]所有上述之突變可單獨測試，或依據各種組合。

[0383]第22圖代表人源化224G11 VH，具有上述清楚定義之突變。在每一假設之突變處下標之數字代表該突變將會形成之排行。

範例13：藉由抗體227H1之CDR-接枝之人源化過程

I-輕鏈可變異區域之人源化

227H1 VL核苷酸序列與鼠科生殖細胞基因之比較

[0384]在預先步驟中，227H1 VL之核苷酸序列係與IMGT 資料庫(<http://imgt.cines.fr>)之部分鼠科生殖細胞基因比較。

[0385]鼠科IGKV3-5*01與IGKJ4*01生殖細胞基因分別具有96.90%之等同性，在V區域，以及97.29%等同性，在J區域，已經辨識出。就所獲得之等同性而言，決定直接使用227H1 VL序列尋找人類類似物。

[0386]這些比對示於第23A圖，為V基因，以及23B，為J基因。

227H1 VL核苷酸序列與人類生殖細胞基因之比較

[0387]爲了辨識出用於CDR接枝之最佳人類候選物，展示出與227H1 VL有最佳等同度之人類生殖細胞基因係經搜尋。之後，227H1 VL之核苷酸序列係與IMGT資料庫中之部分人類生殖細胞基因比對。爲了使篩選最佳化，遂進行蛋白質序列間之比對，尋找較佳之類似物。

[0388]此二互補方法可辨識出二可能之連接用(receiving)人類V序列，用於鼠科227H1 VL CDR。核苷酸之比對可提供人類IGKV3-11*01生殖細胞基因74.91%之等同性，其中蛋白質比對提供人類IGKV4-1*01生殖細胞基因64.00%之序列等同性。值得注意的是，在此二案例中，該二最接近之生殖細胞基因與經分析之序列，顯示出不同之CDR1胺基酸長度(227H1 VL有10個胺基酸； IGKV3-11*01有6個胺基酸； IGKV4-1*01有12個胺基酸)。

[0389]在J區域中，與人類比對最佳之類似積分為人類IGKJ3*01，顯示出序列等同度78.38%。但較高量之連續相同核苷酸，與較佳之胺基酸適化，在比對人類IGKJ4*02生殖細胞基因(序列等同度75.68%)時發現。因此，該IGKJ4*02生殖細胞基因係經選擇為連接用(receiving)人類J區域，用於鼠科227H1 VL CDR。

[0390]比對係示於第24A圖，為V區域，及第24B圖，為J區域。

224G11 VL之人源化版本

[0391]為了提供用於鼠科227H1 VL CDR之二連接用(receiving)人類V區域，係描述227H1 VL區域之二人源化版本。第一者對應於人類框架之初始試驗，具有較短之CDR1長度(IGKV3-11*01)，第二者具有較長之CDR1長度(IGKV4-1*01)。

a) IGKV3-11*01基礎之227H1 VL人源化版本

[0392]下列人源化步驟係由聯結生殖細胞基因序列IGKV3-11*01與IGKJ4*02，以及鼠科227H1 VL之CDR至這些生殖細胞基因序列之框架組成。

[0393]如第25A圖所示，227H1 VL序列中之粗體殘基對應於26個胺基酸，其發現在227H1 VL區塊與經選擇之人類框架中不同(人類FR，即IGKV3-11*01與IGKJ4*02)。

[0394]就數個標準而言，如其已知參與VH/VL界面、抗原結合或CDR結構，會在鼠科與人類殘基間變異之胺基酸組，係位於可變異區域之3D結構中之殘基，26個胺基酸中

有3個為最終突變。此三個最重要之定義殘基，突變為其人類配對物，分別為鼠科之I39變為人類L、H40變為A，以及R84變為G。這些排名第一之殘基係顯示於第25A圖，為227H1 HZ1VL序列中之粗體殘基，其中維持為鼠科。

[0395]當然，上述待測之殘基不受限制，但必須考慮為最佳突變。

[0396]由於分子模擬之幫助，可辨識出其他突變。可使用者為下列排名第二之殘基，即殘基15 (L/P)、25 (V/A)、49 (P/A)、67 (L/R)、68 (E/A)、93 (P/S)與99 (S/F)，其上突變亦為另一較佳實施例所採用。

[0397]當然，上述之殘基最終需經測試，並非限制，但必須考慮為較佳突變。在一較佳實施例中，所有其他16個胺基酸在25個不同胺基酸中為排名第三之殘基，可重新考慮。

[0398]所有上述之突變可單獨測試，或依據各種組合。

[0399]第25A圖代表執行IGKV3-11*01基礎之人源化227H1 VL，具有上述清楚定義之突變。在每一假設之突變處下標之數字代表該突變將會形成之排行。

b) IGKV4-1*01基礎之227H1 VL人源化版本

[0400]下列人源化步驟係由聯結生殖細胞基因序列IGKV4-1*01與IGKJ4*02，以及鼠科227H1 VL之CDR至這些生殖細胞基因序列之框架組成。

[0401]如第25B圖所示，227H1 VL序列中之粗體殘基對應於24個胺基酸，其發現在227H1 VL區塊與經選擇之人類

框架中不同(人類FR，即IGKV4-1*01與IGKJ4*02)。

[0402]就數個標準而言，如其已知參與抗原結合之VH/VL界面或CDR結構，會在鼠科與人類殘基間變異之胺基酸組，係位於可變異區域之3D結構中之殘基，24個胺基酸中有4個為最終突變。此4個最重要之定義殘基，突變為其人類配對物，分別為鼠科之L4轉變為人類之M、I39變為L、H40變為A，以及R84變為G。這些排名第一之殘基係顯示於第259B圖，為227H1 HZ2VL序列中之粗體殘基，其中維持為鼠科。

[0403]當然，上述待測之殘基不受限制，但必須考慮為最佳突變。

[0404]由於分子模擬之幫助，可辨識出其他突變。可使用者為下列排名第二之殘基，即殘基25 (V/S)、66 (N/T)、67 (L/R)，以及93 (P/S)，其上突變亦為另一較佳實施例所採用。

[0405]當然，上述之殘基最終需經測試，並非限制，但必須考慮為較佳突變。在另一較佳實施例中，所有其他16個胺基酸在22個不同胺基酸中為排名第三之殘基，可重新考慮。

[0406]所有上述之突變可單獨測試，或依據各種組合。

[0407]第25B圖代表執行IGKV4-1*01基礎之人源化227H1 VL，具有上述清楚定義之突變。在每一假設之突變處下標之數字代表該突變將會形成之排行。

II -重鏈可變異區域之人源化

227H1 VH核苷酸序列與鼠科生殖細胞基因之比較

[0408]在預先步驟中，227H1 VH之核苷酸序列係與IMGT資料庫(<http://imgt.cines.fr>)之部分鼠科生殖細胞基因比較。

[0409]鼠科IGHV1-18*01、IGHD1-1*02與IGHJ2*01生殖細胞基因分別具有92.70%之等同性，在V區域，以及63.63%，在D區域，以及91.48%，在J區域，已經辨識出。就所獲得之等同性而言，決定直接使用227H1 VH序列尋找人類類似物。

[0410]這些比對示於第26A圖，為V基因，26B，為D基因，以及26C，為J基因。

227H1 VH核苷酸序列與人類生殖細胞基因之比較

[0411]爲了辨識出用於CDR接枝之最佳人類候選物，展示出與227H1 VH有最佳等同度之人類生殖細胞基因係經搜尋。之後，227H1 VH之核苷酸序列係與IMGT資料庫中之部分人類生殖細胞基因比對。爲了使篩選最佳化，遂進行蛋白質序列間之比對，尋找較佳之類似物。

[0412]此二互補方法可辨識出二可能之連接用(receiving)人類IGHV1-2*02 V序列，用於鼠科224G11 VH CDR，具有序列相等性72.92%。

[0413]值得注意的是，D區域嚴格地屬於VH區塊之CDR3區域。該人源化過程係依據「CDR-接枝」法。最接近之人類D-基因分析無法用於此策略中。

[0414]尋找J區域之類似物，可辨識出人類IGHJ4*04生

殖細胞基因，具有78.72%之序列等同度。

[0415]人類 IGHV1-2*02 V 生殖細胞基因與人類 IGHJ4*01 J生殖細胞基因，係經選擇為連接用(receiving)人類序列，用於鼠科227H1 VH CDR。

[0416]比對係示於第27A圖，為V區域，及第27B圖，為J區域。

[0417]就篩選之最佳化而言，此技術領域者應可在二蛋白質序列中進行比對，以幫助作選擇。

227H1 VH之人源化版本

[0418]下列人源化步驟係由聯結經選擇之生殖細胞基因序列 IGHV1-2*02與IGHJ4*01，以及鼠科227H1 VH之CDR至這些生殖細胞基因序列之框架上組成。

[0419]如第28圖所示，227H1 VH 8序列中之粗體殘基對應於32個胺基酸，其發現在227H1 VH區塊與經選擇之人類框架中不同(人類FR，即IGK1-2*02與IGKJ4*01)。

[0420]就數個標準而言，如其已知參與VH/VL界面、抗原結合或CDR結構，會在鼠科與人類殘基間變異之胺基酸組，係位於可變異區域之3D結構中，32個胺基酸中有6個殘基為最終突變。此6個最重要之定義殘基，突變為其人類配對物，分別為鼠科之L39變為人類之M、N40變為H、L55變為W、T66變為N、V80變為R，以及K82變為T。這些排名第一之殘基係顯示於第28圖，為227H1 HZVH序列中之粗體殘基，其維持為鼠科。

[0421]當然，上述待測之殘基不受限制，但必須考慮為

最佳突變。

[0422]由於分子模擬之幫助，可辨識出其他突變。使用者為下列排名第二之殘基，即殘基48 (K/Q)、49 (T/G)、53 (I/M)、76 (A/V)與78 (L/M)，其上突變亦為另一較佳實施例所採用。

[0423]當然，上述之殘基最終需經測試，並非限制，但必須考慮為較佳突變。在一較佳實施例中，所有其他22個胺基酸在32個不同胺基酸中為排名第三之殘基，可重新考慮。

[0424]所有上述之突變可單獨測試，或依據各種組合。

[0425]第28圖代表人源化227H1 VH，具有上述清楚定義之突變。在每一假設之突變處下標之數字代表該突變將會形成之排行。

範例14：藉由抗體223C4之CDR-接枝之人源化過程

I-輕鏈可變異區域之人源化

223C4 VL核苷酸序列與鼠科生殖細胞基因之比較

[0426]在預先步驟中，223C4 VL之核苷酸序列係與IMGT資料庫(<http://imgt.cines.fr>)之部分鼠科生殖細胞基因比較。

[0427]鼠科IGKV12-46*01與IGKJ2*01生殖細胞基因分別具有99.64%之等同性，在V區域，以及94.59%等同性，在J區域，已經辨識出。就所獲得之等同性而言，決定直接使用223C4 VL序列尋找人類類似物。

[0428]這些比對示於第29A圖，為V基因，以及29B，為

J基因。

223C4 VL核苷酸序列與人類生殖細胞基因之比較

[0429]爲了辨識出用於CDR接枝之最佳人類候選物，展示出與223C4 VL有最佳等同度之人類生殖細胞基因係經搜尋。之後，223C4 VL之核苷酸序列係與IMGT資料庫中之部分人類生殖細胞基因比對。爲了使篩選最佳化，遂進行蛋白質序列間之比對，尋找較佳之類似物。

[0430]人類IGKV1-NL1*01與IGKJ2*01生殖細胞基因分別具有序列等同度78.49%，在V區域，以及81.08%，在J區域，已經辨識出。生殖細胞基因IGKV1-NL1*01，在V區域，及IGKJ2*01，在J區域，係經選擇，作爲連接用(receiving)人類序列，用於鼠科223C4 VL CDR。

[0431]比對係示於第30A圖，爲V區域，及第30B圖，爲J區域。

[0432]爲了使選擇最佳化，此技術領域者應可進行蛋白質序列間之比對，以幫助作選擇。

223C4 VL之人源化版本

[0433]下列人源化步驟係由聯結經選擇之生殖細胞基因序列IGKV1-NL1*01與IGKJ2*01，以及鼠科223C4 VL之CDR至這些生殖細胞基因序列之框架上組成。

[0434]在該過程之此階段，223C4鼠科Fv區塊之分子模擬可發展，並用於選擇待保留之鼠科殘基，由於其維持該分子3度空間結構，或於抗原結合位置與功能之角色。更特別的是，9個最終突變之殘基係經辨識出。

[0435]在第一步驟中，涉及CDR定位子(anchors)或結構之殘基係經測試。此殘基為殘基66 (R/N)與殘基68 (E/V)。

[0436]在第二步驟中，暴露於溶劑，因此可能涉及免疫產生之殘基，將經測試。這些殘基為49 (A/S)、51 (K/Q)、69 (S/D)、86 (D/Q)與92 (S/N)。

[0437]之後，在第三步驟中，涉及各區塊結構/折疊之殘基亦可突變。這些殘基為殘基46 (P/Q)與殘基96 (P/S)。

[0438]當然，上述待測之殘基不受限制，但必須考慮為較佳突變。

[0439]由於分子模擬之幫助，可辨識出其他突變。可使用者為下列排名第二之殘基，即殘基9 (S/A)、13 (A/V)、17 (D/E)、18 (R/T)、54 (L/V)、88 (T/S)、90 (T/K)、100 (A/G)與101 (T/S)，其上突變亦為另一較佳實施例所採用。

[0440]當然，上述之殘基最終需經測試，並非限制，但必須考慮為較佳突變。

[0441]第31圖代表人源化223C4 VL，具有上述清楚定義之突變。在每一假設之突變處下標之數字代表該突變將會形成之排行。

II - 重鏈可變異區域之人源化

223C4 VH核苷酸序列與鼠科生殖細胞基因之比較

[0442]在預先步驟中，223C4 VH之核苷酸序列係與IMGT資料庫(<http://imgt.cines.fr>)之部分鼠科生殖細胞基因比較。

[0443]鼠科IGHV1-18*01、IGHD6-3*01與IGHJ4*01生

殖細胞基因分別具有98.95%之等同性，在V區域，72.72%等同性，在D區域，以及98.11%等同性，在J區域，已經辨識出。就所獲得之等同性而言，決定直接使用223C4 VH序列尋找人類類似物。

[0444]這些比對示於第32A圖，為V基因，32B，為D基因，以及32C，為J基因。

223C4 VH核苷酸序列與人類生殖細胞基因之比較

[0445]為了辨識出用於CDR接枝之最佳人類候選物，展示出與223C4 VH有最佳等同度之人類生殖細胞基因係經搜尋。之後，223C4 VH之核苷酸序列係與IMGT資料庫中之部分人類生殖細胞基因比對。

[0446]人類IGHV1-2*02、IGHD1-26*01與IGHJ6*01生殖細胞基因，分別具有序列等同性76.38%，就V區域，75.00%等同性，在D區域，以及77.41%，在J區域，已經辨識出。生殖細胞基因IGHV1-2*02，在V區域，以及IGHJ6*01，在J區域，係經選擇，作為連接用(receiving)人類序列，用於鼠科223C4 VH CDR。

[0447]比對係示於第33A圖，為V區域，第33B圖，為D區域，以及33C圖，為J區域。

[0448]為了使選擇最佳化，此技術領域者應可進行蛋白質序列間之比對，以幫助作選擇。

223C4 VH之人源化版本

[0449]下列人源化步驟係由聯結經選擇之生殖細胞基因序列IGHV1-2*02與IGHJ6*01，以及223C4 VH之CDR至

這些生殖細胞基因序列之框架上組成。

[0450]在該過程之此階段，223C4鼠科Fv區塊之分子模擬可發展，並用於選擇待保留之鼠科殘基，由於其維持該分子3度空間結構，或於抗原結合位置與功能之角色。更特別的是，14個最終突變之殘基係經辨識出。

[0451]I在第一步驟中，涉及CDR定位子(anchors)或結構之殘基係經測試。此殘基為殘基40 (H/D)、45 (A/S)、55 (W/D)、66 (N/I)，以及67 (Y/F)。

[0452]在第二步驟中，暴露於溶劑，因此可能涉及免疫產生之殘基，將經測試。這些殘基為1 (Q/E)、3 (Q/L)、5 (V/Q)、48 (Q/M)與80 (R/V)。

[0453]之後，在第三步驟中，涉及各區塊結構/折疊之殘基亦可突變。這些殘基為殘基9 (A/P)、13 (K/V)、22 (S/P)與46 (P/H)。

[0454]當然，上述待測之殘基不受限制，但必須考慮為最佳突變。

[0455]由於分子模擬之幫助，可辨識出其他突變。可使用者為下列排名第二之殘基，即殘基12 (V/L)、21 (V/I)、43 (R/K)、49 (G/S)、53 (M/I)、68 (A/N)、72 (Q/K)、75 (R/K)、76 (V/A)、78 (M/L)、82 (T/K)、84 (I/S)、92 (S/R)、93 (R/S)、95 (R/T)與97 (D/E)，其上突變亦為另一較佳實施例所採用。

[0456]當然，上述之殘基最終需經測試，並非限制，但必須考慮為較佳突變。

[0457]第34圖代表人源化223C4 VH，具有上述清楚定

義之突變。在每一假設之突變處下標之數字代表該突變將會形成之排行。

範例 15：鼠科 224G11 MAb 單獨或與化療試劑溫諾平 (Navelbine®) 組合之抗腫瘤活性，在已建立之異種移植 NCI-H441 腫瘤模式中

[0458]成功的化學治療方法部分取決於細胞對於細胞凋亡誘發劑之反應，以及細胞內前-與抗-細胞凋亡路徑之平衡。經活化c-Met對於細胞存活之保護效應已經報導。主要係由於抗細胞凋亡Bcl-xl與Bcl-2之表現增加引起，結果為PI3-K-媒介之訊息傳遞，之後會抑制粒腺體-依賴性細胞凋亡(caspase 9)。事實上，可理解HGF/c-Met系統具有明顯之細胞凋亡調節效應，亦可影響癌細胞之化學敏感性。此假設已測試於溫諾平(Navelbine®)，一種市售之化療試劑，用於肺癌治療(Aapro *et al.*, Crit.Rev.Oncol.Hematol. 2001, 40:251-263; Curran *et al.*, Drugs Aging. 2002, 19:695-697)。係使用異種移植NCI-H441 NSCLC模式，如前所述，此細胞株對於溫諾平(Navelbine) (Kraus-Berthier *et al.*, Clin.Cancer Res., 2000; 6:297-304)，以及治療標靶c-Met (Zou H. T. *et al.*, Cancer Res. 2007, 67: 4408-4417)都很敏感。

[0459]簡言之，將購自ATCC的NCI-H441細胞培養於RPMI 1640培養基，內含10% FCS、1% L-穀胺酸。細胞於移植前兩天進行分盤，並使其成長至指數期。將一千萬個NCI-H441細胞，於PBS中，移植至7週大之Swiss裸鼠。植入3天以後，可觀察到腫瘤產生，以六隻為一組並依腫瘤大

小將小鼠分爲4組。小鼠以腹腔注射2 mg的224G11單抗/小鼠，之後每週注射兩次1 mg的抗體/小鼠。9G4 MAb 係使用作爲同型控制組。

[0460]溫諾平(Navelbine®)係以i.p.注射投藥，劑量爲8 mg/kg，在細胞注射後第5、12、19天。就224G11與溫諾平(Navelbine®)結合治療而言，該二化合物係分開投藥。在此實驗中，該二化合物皆使用其最佳量。腫瘤體積每週測量兩次，並以下列公式計算： $p/6 \times \text{長} \times \text{寬} \times \text{高}$ 。

[0461]第35圖說明224G11如同溫諾平(Navelbine®)一般有效，當單獨使用作爲單一試劑治療時。該二療法組合之明顯優勢爲可觀察到完全腫瘤抑制，在6隻小鼠中有3隻如此，在第63天。

範例16：C-Met抑制劑與血管生成

[0462]除了在各種腫瘤細胞功能調節之直接角色外，c-met之活化亦可能參與腫瘤之血管生成。內皮細胞會表現c-Met與HGF，會刺激內皮細胞之生長、入侵與移動性(Nakamura Y. et al., Biochem. Biophys. Res., Commun. 1995, 215:483-488; Bussolino F. et al., J. Cell Biol. 1992, 119:629-641)。HGF/c-Met對於血管內皮細胞成長、入侵與移動之共同調節，已呈現出其對於3D微血管內皮管形成之體外結果(Rosen E.M. et al., Supplementum to Experientia 1991, 59:76-88)。

[0463]爲了決定抗-c-Met MAb對於HGF-誘發血管生成之干擾，遂進行二組實驗，i) 評估MAb對於HUVEC增生之

影響，以及ii) MAb對於HUVEC管生成影響之試驗。

[0464]就增生實驗而言，7500 HUVEC係植於96孔盤之每一孔中，其以預先經層黏蛋白(laminin)塗覆。細胞於EMB-2試驗培養液中，補充有0.5% FBS與肝素(heparin)生長。之後，係加入待測之MAb (0.15至40 $\mu\text{g/ml}$)，1 h後加入20 ng/ml之HGF。添加24小時後，細胞係以0.5 μCi 之 $[\text{}^3\text{H}]$ 胸腺嘧啶暫停。 $[\text{}^3\text{H}]$ 胸腺嘧啶DNA量係以液態震盪計數器定量。在此實驗中，9G4 MAb為一不相關之抗體，使用作為IgG1同型控制組。

[0465]結果係以原始數據表示，第36圖顯示，如預期，HGF為HUVEC細胞生長之強力誘發劑。抗體係於無HGF下評估，未展現出任何HUVEC協同增生活性，不論在何測試劑量下。在HGF存在下，明顯之劑量依賴型抑制係於11E1與224G11 MAb二者觀察到。

[0466]為了評估HUVEC管生成，25000個細胞係與待測抗體靜置30分鐘，並種於塗覆有matrigel之48-孔盤中。之後加入HGF 50 ng/ml，該盤於37°C靜置。培養基之後經收穫，加入5 μM CMFDA，15分鐘後進行顯微鏡觀察。

[0467]結果顯示於第37圖，說明，如同預期，HGF會誘發明顯之管形成。引入之9G4抗體係作為IgG1同型控制組，對於HGF-誘發之管形成不會有任何影響，其中11E1與224G11皆會明顯抑制管形成。

範例17：藉由抗體11E1之CDR-接枝之人源化過程

I - 輕鏈可變異區域之人源化

11E1 VL核苷酸序列與鼠科生殖細胞基因之比較

[0468]在預先步驟中，11E1 VL之核苷酸序列係與IMGT資料庫(<http://imgt.cines.fr>)之部分鼠科生殖細胞基因比較。

[0469]鼠科IGKV4-79*01與IGKJ4*01生殖細胞基因分別具有98.58%之等同性，在V區域，以及97.22%，在J區域，已經辨識出。就所獲得之等同性而言，決定直接使用11E1 VL序列尋找人類類似物。

[0470]這些比對示於第38A圖，為V基因，以及38B，為J基因。

11E1 VL核苷酸序列與人類生殖細胞基因之比較

[0471]為了辨識出用於CDR接枝之最佳人類候選物，展示出與11E1 VL有最佳等同度之人類生殖細胞基因係經搜尋。之後，11E1 VL之核苷酸序列係與IMGT資料庫中之部分人類生殖細胞基因比對。

[0472]人類IGKV3-7*02與IGKV3D-7*01，二生殖細胞基因皆具有序列等同度69.86%，在V區域，已經辨識出。IGKV3-7*02人類生殖細胞基因已知在IMGT資料庫中為“ORF”，代表此序列已發現於人類基因體中，但存在有某些重組問題，而產生無功能性之IGKV3-7*02衍生之天然抗體。因此，該IGKV3D-7*01生殖細胞基因係選擇為連接用(receiving)人類V區域，用於鼠科11E1 VL CDR。

[0473]在J區域中，與人類比對最佳之類似積分為人類IGKJ3*01，顯示出序列等同度78.38%。但較高量之連續相

同核苷酸，與較佳之胺基酸適化，在比對人類 IGKJ4*02 生殖細胞基因(序列等同度75.68%)時發現。因此，該 IGKJ4*02 生殖細胞基因係經選擇為連接用(receiving)人類 J區域，用於鼠科11E1 VL CDR。

[0474]比對係示於第39A圖，為V區域，及第39B圖，為J區域。

[0475]就篩選之最佳化而言，此技術領域者應可在二蛋白質序列中進行比對，以幫助作選擇。

11E1 VL之人源化版本

[0476]下列人源化步驟係由聯結經選擇之生殖細胞基因序列IGKV3D-7*01與IGKJ4*02，以及鼠科11E1 VL CDR至這些生殖細胞基因序列之框架上組成。

[0477]如第40圖所示，11E1 VL序列中之粗體殘基對應於30個胺基酸，其發現在11E1 VL區塊與經選擇之人類框架中不同(人類FR，即IGKV3D-7*01與IGKJ4*02)。

[0478]就數個標準而言，如其已知參與VH/VL界面、抗原結合或CDR結構，會在鼠科與人類殘基間變異之胺基酸組，係位於可變異區域之3D結構中，30個胺基酸中有4個殘基為最終突變。此4個最重要之定義殘基，突變為其人類配對物，鼠科L4轉變為人類M、Y40轉變為S、Y87轉變為F，以及T96轉變為P。這些排名第一之殘基係顯示於第40圖，為11E1 HZVL序列中之粗體殘基，其維持為鼠科。

[0479]當然，上述待測之殘基不受限制，但必須考慮為較佳突變。

[0480]由於分子模擬之幫助，可辨識出其他突變。可使用者為下列排名第二之殘基，即殘基24 (S/R)、53 (W/L)、66 (I/T)、67 (L/R)、86 (S/D)、95 (Q/E)、99 (A/F)，或121 (E/D)，其上突變亦為另一較佳實施例所採用。

[0481]當然，上述之殘基最終需經測試，並非限制，但必須考慮為較佳突變。在一較佳實施例中，所有其他18個胺基酸在30個不同胺基酸中為排名第三之殘基，可重新考慮。

[0482]所有上述之突變可單獨測試，或依據各種組合。

[0483]第40圖代表執行人源化11E1 VL，具有上述突變，係明確辨識出。在每一假設之突變處下標之數字代表該突變將會形成之排行。

II -重鏈可變異區域之人源化

11E1 VH核苷酸序列與鼠科生殖細胞基因之比較

[0484]在預先步驟中，11E1 VH之核苷酸序列係與IMGT資料庫(<http://imgt.cines.fr>)之部分鼠科生殖細胞基因比較。

[0485]鼠科IGHV1-7*01、IGHD4-1*01與IGHJ3*01生殖細胞基因分別具有94.10%之等同性，在V區域，以及66.67%，在D區域，以及100%，在J區域，已經辨識出。就所獲得之等同性而言，決定直接使用11E1 VH序列尋找人類類似物。

[0486]這些比對示於第41A圖，為V基因，41B，為D基因，以及41C，為J基因。

*11E1 VH*核苷酸序列與人類生殖細胞基因之比較

[0487]爲了辨識出用於CDR接枝之最佳人類候選物，展示出與11E1 VH有最佳等同度之人類生殖細胞基因係經搜尋。之後，11E1 VH之核苷酸序列係與IMGT資料庫中之部分人類生殖細胞基因比對。爲了使篩選最佳化，遂進行蛋白質序列間之比對，尋找較佳之類似物。

[0488]此二互補方法可辨識出二可能之連接用(receiving)人類V序列，用於鼠科11E1 VH CDR。核苷酸之比對可提供人類IGHV1-2*02生殖細胞基因75.69%之等同性，其中蛋白質比對提供人類IGHV1-46*01生殖細胞基因71.10%之序列等同性。

[0489]值得注意的是，D區域嚴格地屬於VH區塊之CDR3區域。該人源化過程係依據「CDR-接枝」法。最接近之人類D-基因分析無法用於此策略中。

[0490]尋找J區域之類似物，可辨識出人類IGHJ4*03生殖細胞基因，具有80.85%之序列等同度。

[0491]探究整體類似度與序列比對，人類IGHV1-46*01 V生殖細胞基因與人類IGHJ4*03 J生殖細胞基因因此經選擇，作為連接用(receiving)人類序列，用於鼠科11E1 VH CDR。

[0492]比對係示於第42A圖，爲V區域，及第42B圖，爲J區域。

*11E1 VH*之人源化版本

[0493]下列人源化步驟係由聯結經選擇之生殖細胞基

因序列IGHV1-46*01與IGHJ4*03，以及鼠科 11E1 VH之 CDR至這些生殖細胞基因序列之框架上組成。

[0494]如第43圖所示，11E1 VH序列中之粗體殘基對應於26個胺基酸，其發現在11E1 VH區塊與經選擇之人類框架中不同(人類FR，即IGHV1-46*01與IGHJ4*03)。

[0495]就數個標準而言，如其已知參與VH/VL界面、抗原結合或CDR結構，會在鼠科與人類殘基間變異之胺基酸組，係位於可變異區域之3D結構中之殘基，26個胺基酸中有5個為最終突變。此5個最重要之定義殘基，突變為其人類配對物，分別為鼠科之N40轉變為人類H、Y55變為I、D66變為S、A80變為R，以及K82變為T。這些排名第一之殘基係顯示於第43圖，為11E1 HZVH序列中之粗體殘基，其維持為鼠科。

[0496]當然，上述待測之殘基不受限制，但必須考慮為最佳突變。

[0497]由於分子模擬之幫助，可辨識出其他突變。可使用者為下列排名第二之殘基，即殘基53 (I/M)、71 (L/F)、76 (A/V)、78 (L/M)與87 (A/V)，其上突變亦為另一較佳實施例所採用。

[0498]當然，上述之殘基最終需經測試，並非限制，但必須考慮為較佳突變。在一較佳實施例中，所有其他16個胺基酸在26個不同胺基酸中為排名第三之殘基，可重新考慮。

[0499]所有上述之突變可單獨測試，或依據各種組合。

[0500]第43圖代表人源化11E1 VH，具有上述清楚定義之突變。在每一假設之突變處下標之數字代表該突變將會形成之排行。

範例18：經純化Mab對於c-met磷酸化之影響

[0501]在範例3中，抗-c-Met Mab對於磷酸化之影響係經評估，使用每一融合瘤投劑後之上清液。試驗再次以經純化之11E1與224G11 Mab進行，其經評估，不論是在最終濃度30 $\mu\text{g/ml}$ (200 nM)，或劑量範圍0.0015至30 $\mu\text{g/ml}$ (0.01-200 nM)，以測定每一抗體之 IC_{50} 。所使用之流程與範例3中所述相同。

[0502]三獨立實驗之結果係呈現於第44圖，並顯示經純化之11E1與224G11未展示協同效應，當單獨加至A549細胞時，而在HGF存在下分別展示出87與75%之拮抗效應。如預期，引入5D5 Mab作為陽性控制組，顯示出明顯之(58%)協同作用，當單獨添加時，且在HGF存在下僅具有中度拮抗作用(39%)。就 EC_{50} 計算而言，11E1與224G11皆具有奈莫耳濃度級之 IC_{50} 。

範例 19: 體內結合 224G11 與溫諾平 (Navelbine®) 對於 NCI-H441異種移植模式之影響

[0503]將購自ATCC的NCI-H441細胞培養於RPMI 1640培養基，內含10% FCS、1% L-穀胺酸。細胞於移植前兩天進行分盤，並使其成長至指數期。將一千萬個NCI-H441細胞移植至無胸腺裸鼠(Athymic nude mice)。植入五天以後，可觀察到腫瘤產生，以六隻為一組並依腫瘤大小將小鼠進

行分組。小鼠以i.p.注射2 mg的224G11單抗/小鼠，之後每週注射兩次1 mg的抗體/小鼠，或注射3次8 mg/kg之 溫諾平(Navelbine®) (D5, D12, D19)直至第38天。第三組則進行結合投藥。溫諾平(Navelbine®)係以i.p.注射投藥。腫瘤體積每週測量兩次，並以下列公式計算： $\pi/6 \times \text{長} \times \text{寬} \times \text{高}$ ，並於溫諾平(Navelbine®)投藥期間每日進行動物秤重。於每一測量時間點進行統計分析，係採用t-檢定或Mann-Whitney檢定。在此實驗中，單一模式處理組之平均腫瘤體積係降低72%、76%與99.8%，就224G11、溫諾平(Navelbine®)與溫諾平(Navelbine®) + 224G11而言，於注射後第41天。在第41天，合併治療會明顯增進腫瘤之成長，與單一治療相較($p \leq 0.041$ ，與僅有溫諾平(Navelbine®) 相較，以及 $p \leq 0.002$ ，與僅有224G11相較，在第41天)，6隻小鼠中有4隻在合併治療組中未產生腫瘤。結果列於第45圖。

[0504]這些結果在治療終點(D88)後50天確認，66隻接受合併治療之小鼠維持無腫瘤。

範例20：體內結合224G11與多索魯濱(Doxorubicine)對於NCI-H441異種移植模式之影響

[0505]將購自ATCC的NCI-H441細胞培養於RPMI 1640培養基，內含10% FCS、1% L-穀胺酸。細胞於移植前兩天進行分盤，並使其成長至指數期。將一千萬個NCI-H441細胞移植至無胸腺裸鼠(Athymic nude mice)。植入五天以後，可觀察到腫瘤產生，以六隻為一組並依腫瘤大小將小鼠進行分組。小鼠以腹腔注射2 mg的224G11單抗/小鼠，之後每

週注射兩次1 mg的抗體/小鼠，或注射4次多西紫衫醇(Docetaxel) (D5、D12、D19、D26)，劑量為5mg/kg。第三組則進行結合投藥。多索魯濱(Doxorubicin)以i.v.注射投藥。腫瘤體積每週測量兩次，並以下列公式計算： $\pi/6 \times \text{長} \times \text{寬} \times \text{高}$ ，並於多索魯濱(Doxorubicin)投藥期間每日進行動物秤重。於每一測量時間點進行統計分析，係採用t-檢定或Mann-Whitney檢定。相較於控制組，單一治療與結合投藥均具備明顯抗腫瘤活性(由D11至D39為 $p \leq 0.002$)。結果顯示於第46圖。

[0506]相較於D11與D39之間的單一形式治療，結合治療亦證實具有顯著抗腫瘤生長能力，顯示結合多索魯濱(Doxorubicin)與抗-c-Met治療之優勢。

範例21：體內結合224G11與多西紫衫醇(Docetaxel)對於NCI-H441異種移植模式之影響

[0507]將購自ATCC的NCI-H441細胞培養於RPMI 1640培養基，內含10% FCS、1% L-穀胺酸。細胞於移植前兩天進行分盤，並使其成長至指數期。將九百萬個NCI-H441細胞移植至無胸腺裸鼠(Athymic nude mice)。植入五天以後，可觀察到腫瘤產生，以六隻為一組，並依腫瘤大小將小鼠進行分組。小鼠以腹腔注射2 mg的224G11單抗/小鼠，之後每週注射兩次1 mg的抗體/小鼠，或注射4次多西紫衫醇(Docetaxel) (D5、D12、D19、D26)，劑量為7.5 mg/kg。第三組則進行結合投藥。多西紫衫醇(Docetaxel)以腹腔注射投藥。腫瘤體積每週測量兩次，並以下列公式計算： $\pi/6 \times$

長X寬X高，並於多西紫衫醇(Docetaxel)投藥期間每日進行動物秤重。於每一測量時間點進行統計分析，係採用t-檢定或Mann-Whitney檢定。相較於控制組，單一治療與結合投藥均具備明顯抗腫瘤活性(由D11至D35為 $p \leq 0.002$)。結果顯示於第47圖。

[0508]相較於D18與D35之間的單一形式治療，結合治療亦證實具有顯著抗腫瘤生長能力，顯示結合多西紫衫醇(Docetaxel)與抗-c-Met治療之優勢。

範例22：體內結合224G11與替莫唑胺(Temozolomide)對於U87MG異種移植模式之影響

[0509]將購自ATCC的U87-MG細胞培養於DMEM培養基，內含10% FCS、1% L-穀胺酸。細胞於移植前兩天進行分盤，並使其成長至指數期。將五百萬個U87-MG細胞移植至無胸腺裸鼠。植入十九天以後，可觀察到腫瘤產生，以六隻為一組並依腫瘤大小將小鼠進行分組。小鼠以腹腔注射2 mg的224G11單抗/小鼠，之後每週注射兩次1 mg的抗體/小鼠，或注射3次替莫唑胺(Temozolomide)(D19、D26、D33)，劑量為5 mg/kg。第三組則進行結合投藥。替莫唑胺(Temozolomide)以腹腔注射投藥。腫瘤體積每週測量兩次，並以下列公式計算： $\pi/6 \times \text{長} \times \text{寬} \times \text{高}$ ，並於替莫唑胺(Temozolomide)投藥期間每日進行動物秤重。於每一測量時間點進行統計分析，係採用t-檢定或Mann-Whitney檢定。相較於控制組，單一治療與結合投藥均具備明顯抗腫瘤活性(由D22至D32為 $p \leq 0.002$ (其中控制組小鼠因倫理因素進行

安樂死))。結果顯示於第48圖。

[0510]相較於單一形式之治療(由第22至第43天為 $p \leq 0.002$ (其中控制組小鼠因倫理因素進行安樂死)之替莫唑胺(Temozolomide)單獨投藥，以及由第29至第53天(最終治療日)之224G11單獨投藥)，結合治療亦證實具有顯著抗腫瘤生長能力。綜合上述，這些數據顯示結合替莫唑胺(Temozolomide)與抗-c-Met治療之優勢。

範例23：橢球體(Spheroid)形成

[0511]如範例9中其他Mab所描述，我們以U87-MG橢球體模式評估224G11 Mab於活體外抑制腫瘤生長的能力。為此，U87-MG細胞長成單層膜後以胰蛋白-EDTA使其分離，並且再懸浮於完整細胞培養基中。橢球體始於將625個細胞培養於96孔培養盤之單孔中，內含DMEM-2.5% FCS。為了防止細胞黏著於培養盤底部，培養盤預先以含95%乙醇之聚HEMA塗層並於室溫中風乾。細胞於標準培養條件下進行培養，係37°C、5% CO₂之潮濕培養箱。經純化之單株抗體(10 µg/ml)於橢球體培養4天與10天後加入。橢球體持續培養至第17天。隨後，橢球體之生長觀察係利用axiovision軟體之自動偵測模組測量橢球體之表面積。表面積以 μm^2 表示。每一條件取8-16個橢球體進行測量。在加入抗體前，事先於培養之第10天與第17天，測量橢球體之大小。

[0512]在這些條件中，僅觀察到同質性之橢球體，且加入抗體前並無統計上差異(第49A圖)。

[0513]如第49B-49D圖所示，培養10或17天後，同型控

制組9G4並未影響橢球體生長。雖然加入5D5並未影響橢球體大小，但是加入224G11與11E1卻都明顯抑制腫瘤生長。

範例 24：嵌合(chimeric)與人源化(humanized)形式之224G11於磷酸-c-Met試驗中之體外活性

[0514]爲了比較鼠科、嵌合與人源化形式抗體於功能試驗中之體外功效，224G11融合瘤與HEK293經轉染細胞之培養上清液之分劑與檢測如範例3所示。數據摘錄於第50圖，顯示未純化之鼠科抗體具備預期結果，並如第6B圖所示。嵌合與人源化之未純化抗體顯示具有可比較之活性，無論是單獨投藥(第50A圖)或於HGF存在下投藥(第50B圖)。

範例 25：以 Biacore 分析決定抗 -c-Met 抗體之親和常數 (affinity constants ; KD)

[0515]經純化 11E1 與 224G11 抗體之結合親和力以 BIAcore X 檢測，係以重組 c-Met-細胞外區域(ECD)融合至人類 IgG1 Fc 區域(R&D Systems)作為抗原(MW = 129 kDa)。由於 c-Met-Fc 融合蛋白與抗體均為二價化合物，單抗 11E1 與 224G11 (MW = 50 kDa) 之 Fab 片段以木瓜蛋白酶(papain)切割產生，經純化後用於本分析以避免干擾活性參數。本分析中，係以一抗-組胺酸標記(Tag)之捕捉抗體塗佈於 CM5 感應晶片上。反應緩衝溶液為 HBS-EP，流速為 30 μ l/min，本項檢測於 25 $^{\circ}$ C 進行。經水可溶之 c-Met (ECD_M1)2-Fc-(HHHHHH)2 抗原可被捕捉於感應晶片上(大約 270 RU)，受測抗體於所使用溶液中如同分析物。感應晶片以甘胺酸、HCl pH 1.5 緩衝液進行再生反應，係於雙

流量計(flowcells)中作用半分鐘。

[0516]第51圖顯示本分析之原理。所得動力參數摘錄於下表4。結果顯示11E1與224G11抗-c-Met抗體均可結合至重組c-Met-Fc融合蛋白，其可比較之親和性範圍約40 pM。

表4

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

範例26：無胸腺裸鼠共植入MDA-MB-231細胞與MRC5細胞作為人類HGF來源之224G11體內活性

[0517]將購自ATCC的MDA-MB-213與MRC5細胞培養於DMEM培養基，內含10% FCS、1% L-穀胺酸。細胞於移植前兩天進行分盤，並使其成長至指數期。將五百萬個MDA-MB-231細胞與500,000個MRC5細胞經皮下共注入無胸腺裸鼠(Athymic nude mice)。植入十二天以後，可觀察到腫瘤產生，以六隻為一組並依腫瘤大小將小鼠進行分組。小鼠以腹腔注射2 mg的224G11單抗/小鼠，之後每週注射兩次1 mg的抗體/小鼠。腫瘤體積每週測量兩次，並以下列公式計算： $\pi/6 \times \text{長} \times \text{寬} \times \text{高}$ 。

[0518]結果描述於第52圖，並顯示相較於控制組，經224G11處理小鼠之腫瘤生長中位數具有明顯差異。

範例27：227H1、11E1與224G11抗體人源化之互補成分
一般步驟

[0519] 抗-cMet抗體人源化係針對各個鏈單獨、依序並配合每一可變區域上欲分析胺基酸進行。人源化步驟之鑑定首先利用ELISA-爲主的重組Fc-cMet結合分析法；以人源化抗體的結合活性比較重組嵌合抗體。接著，以抗-cMet人源化抗體鑑定其置換Fc-cMet並結合至塗佈於塑膠上之重組HGF之能力；此競爭分析法可用於直接比較抗-cMet抗體之鼠科、嵌合與人源化版本。

[0520] 第53與第54圖例舉出典型抗-cMet結合活性之227H1、11E1與224G11鼠科單株抗體。

[0521] 第53圖顯示所測得經純化鼠科抗體之抗-cMet直接結合活性。本分析中，鼠科單株抗-cMet抗體顯示具備不同，但仍維持劑量依賴效應之抗-cMet結合活性。

[0522] 第54圖顯示經純化鼠科抗體之HGF-cMet結合競爭活性。競爭分析顯示這些抗-cMet單株抗體，與中度具競爭活性之11E1單株抗體之間存在可信賴差異，然而鼠科224G11與227H1顯示有類似之競爭活性，於高抗體濃度時具備100%最大HGF結合置換能力。224G11單株抗體具有最佳 IC_{50} 值。

[0523] 鼠科抗體之直接結合活性無法反應其本身HGF-結合競爭特性。

[0524] 此二分析用於確認經重組嵌合與人源化版本(version)的鼠科抗-cMet抗體。最終，簡言之，抗-cMet可變區域，無論鼠科或人源化，均選殖至LONZA's pCONplus表達載體系列，而重組IgG₁/κ-衍生抗體則表達於CHO細胞。

經表達之培養上清液於濃縮後，於PBS中透析，隨後進行抗體濃度分劑，並直接用於抗-cMet結合活性分析。直接結合反應與HGF-競爭分析用於確認較佳之重組融合或人源化版本。

範例27-1: 227H1重鏈可變異區域之人源化

[0525]爲了確定最佳選擇之人類抗體以進行CDR移植，本發明找到表現最佳227H1 VH鼠科序列之人類生殖細胞基因。藉由IMGT數據庫的協助，選出人類IGHV1-2*02 V生殖細胞基因，與人類IGHJ4*01 J生殖細胞基因作為連接用人類序列，用於鼠科227H1 VH CDR。

[0526]第55圖顯示鼠科227H1 VH區域與經選取人類架構之胺基酸排列比較。在人類FR項中，僅就胺基酸異於227H1鼠科VH區域者加以描述。HZ3VH、HZ2VH 與HZ1VH各項爲227H1 VH區域之經改造人源化版本，包括前述之(“改入”項)突變部位。每個突變位置所含數字表示其排序。

[0527]在第一部份實驗中，我們構築並分析227H1鼠科VH區域的三個第一人源化版本，其與227H1融合輕鏈共同表達時之抗-cMet結合活性。抗-cMet直接結合分析法所得結果如第56圖所示。在此實驗中，經檢測之227H1-衍生融合體或部分人源化重組抗體之結合能力未觀察到有差異。其中，32個胺基酸中有26個被發現在鼠科227H1 VH區域內有所不同，並且當結合嵌合輕鏈時，分析經選取之人類架構體發現與227H1人源化VH區域的抗-cMet結合活性無關。

[0528]結合定點突變分析，針對227H1 VH區域之

HZ1VH人源化版本的最後六個鼠科殘基，我們構築一原始HZ4VH «完整-IMGT人源化»版本，並檢測其抗-cMet結合特性。直接結合分析之結果如第57圖所示，HGF結合競爭分析如第58圖所示。相較於親代鼠科抗體，重組嵌合與人源化227H1版本顯示具有較好的競爭活性。

[0529]儘管如此，考慮到關於“全-IMGT”人源化227H1 VH區域之抗-cMet結合特性所得之實驗數據，我們選擇第59 圖中所述之胺基酸序列，隨後進行生物資訊分析以評估所謂227H1-HZ VH人源化可變區域的«人源(humanness) »程度。

[0530]爲此目的，我們利用IMGT工具進行架構序列與人類數據庫的簡單比較。在此過程中的人源化程度，發現有89個經分析胺基酸與架構殘基相符，發現有89個與人類來源相關。僅源自CDR的殘基發現有異，但若如此，其不同於相應之人類生殖細胞基因，且明顯爲高度可變部位。基於IMGT編號系統與同源分析工具，我們首先將鼠源之抗體可變區域完整人源化。

範例27-2: 11E1單株抗體人源化

I -人源化11E1重鏈可變區域

[0531]爲了確定最佳選擇之人類抗體以進行CDR移植，本發明找到表現最佳11E1 VH鼠科序列之人類生殖細胞基因。藉由IMGT數據庫的協助，選出人類IGHV1-46*01 V生殖細胞基因與人類IGHJ4*03 J生殖細胞基因作爲連接鼠科11E1 VH CDR之人類序列。

[0532]第60圖顯示鼠科11E1 VH區域與經選取人類架構之胺基酸排列比較。在人類FR項中，僅就胺基酸異於11E1鼠科VH區域者加以描述。HZ VH3、HZ VH2與HZ VH1各項為11E1 VH區域之經改造人源化版本，包括前述之(“改入”項)突變部位。每個突變位置所含數字表示其排序。

[0533]在第一部份實驗中，我們構築並分析11E1鼠科VH區域的三個第一人源化版本，其與11E1嵌合輕鏈共同表達時之抗-cMet結合活性。抗-cMet直接結合分析法所得結果如第61圖所示。在此實驗中，經檢測之11E1-衍生嵌合或部分人源化重組抗體，觀察到有類似之結合能力。其中，24個胺基酸中有19個被發現在鼠科11E1 VH區域內有所不同，並且當結合嵌合輕鏈時，分析經選取之人類架構體，發現與11E1人源化VH區域的抗-cMet結合活性無關。

II - 人源化11E1輕鏈可變區域

[0534]爲了確定最佳選擇之人類抗體以進行CDR移植，本發明找到表現最佳11E1 VL鼠科序列之人類生殖細胞基因。藉由IMGT數據庫的協助，選出人類IGKV3D-7*01 V生殖細胞基因與人類IGHJ4*01 J生殖細胞基因作為連接鼠科11E1 VL CDR之人類序列。

[0535]第62圖顯示鼠科11E1 VL區域與經選取人類架構之胺基酸排列比較。在人類FR項中，僅就胺基酸異於11E1鼠科VL區域者加以描述。HZ VL3、HZ VL2與HZ VL1各項為11E1 VL區域之經改造人源化版本，包括前述之(“改入”項)突變部位。每個突變位置所含數字表示其排序。

[0536]在第一部份實驗中，我們構築並分析11E1鼠科VL區域的三個第一人源化版本，其與11E1嵌合重鏈共同表達時之抗-cMet結合活性。抗-cMet直接結合分析法所得結果如第63圖所示。在此實驗中，經檢測之11E1-衍生嵌合或部分人源化重組抗體觀察到有類似之結合能力。其中，30個胺基酸中有26個被發現在鼠科11E1 VL區域內有所不同，並且當結合嵌合重鏈時，分析經選取之人類架構體發現，與11E1人源化VL區域的抗-cMet結合活性無關。

III -人源化11E1抗體

[0537]在此11E1單株抗體人源化階段，理論上所產生的人源化抗體序列僅含有來自親代鼠科VH區域的五個外源-CDR殘基以及來自親代鼠科VL序列的四個外源-CDR殘基(請見第60圖，HZ VH1項與第62圖，HZ VL1項)。隨後決定立即確認所產生結合重鏈與輕鏈人源化版本之11E1抗體。抗-cMet直接結合分析結果顯示於第64圖。

[0538]在此實驗中，經檢測之11E1-衍生嵌合或部分人源化重組抗體觀察到有類似之結合能力。HGF-結合競爭特性分析與定點突變分析九個左側鼠科殘基之貢獻，仍必須單獨或結合所選取11E1單株抗體之VH1/VL1 “前-人源化”版本進行。

範例27-3: 224G11單株抗體人源化

I -人源化224G11重鏈可變區域

[0539]爲了確定最佳選擇之人類抗體以進行CDR移植，本發明找到表現最佳224G11 VH鼠科序列之人類生殖

細胞基因。

[0540]關於224G11與227H1 VH區域序列之間的高同源性，以及藉由IMGT數據庫工具的協助，選出相同的人類IGHV1-2*02 V生殖細胞基因與人類IGHJ4*01 J生殖細胞基因作為連接鼠科224G11 VH CDR之人類序列。

[0541]由於其高同源性，故決定直接進行227H1 VH區域人源化資訊轉移(請見範例27)，我們隨後設計出“全-IMGT”人源化版本如第65圖所示，其代表鼠科227H1與224G11 VH區域與經選取人類架構之胺基酸進行排列。在人類FR項中，僅描述異於224G11鼠科VH區域之胺基酸。HZVH0項為224G11 VH區域之«全-IMGT»人源化版本，係得自“全-IMGT” 227H1-HZVH區域。

[0542]隨後構築224G11鼠科VH區域之«完整-IMGT»人源化版本，並分析其與224G11嵌合輕鏈共表達時之抗-cMet結合活性。抗-cMet直接結合分析所得結果如第66圖所示，而第67圖係描述HGF結合競爭分析。考慮到關於“全-IMGT”人源化224G11 VH區域之抗-cMet結合特性所得之實驗數據，我們選擇第65圖中所述之胺基酸序列，隨後進行生物資訊分析以評估所謂224G11-HZ VH0區域的«人源»程度。

[0543]考慮到此處所應用之人源化策略，必須參照範例27以進行224G11 HZ VH0序列之人源分析。如同227H1 VH區域人源化之描述，我們確認了IMGT編號系統與同源分析工具的可信度，同時亦證實的抗體間於本身同源性限制下人源化策略轉移的可能性。

II - 人源化224G11輕鏈可變區域

[0544]爲了確定最佳選擇之人類抗體以進行CDR移植，本發明找到表現最佳224G11 VL鼠科序列之人類生殖細胞基因。藉由IMGT數據庫的協助，選出兩個可能的人類V區域作爲連接鼠科224G11 VL CDR。因此，針對224G11 VL區域，計畫進行兩個人源化策略。首先爲利用一較短CDR1 (IGKV3-11*01)之人類架構初步試驗，接著是較長CDR1 (IGKV4-1*01)。

[0545]第68圖代表鼠科224G11 VL區域與兩個經選取人類架構之胺基酸排列對照。在較短與較長Hu-FR FR項中，僅描述異於224G11鼠科VL區域之胺基酸。HZ VL3與HZ VL6項爲224G11 VL區域之基本人源化版本，含有前述(“順序”項)突變位置。突變位置下方數字代表每當選取基本“較短”或“較長” CDR1-架構時之順序。

[0546]在第一部份實驗中，我們構築兩個基本的224G11鼠科VL區域人源化版本，並分析其與224G11融合重鏈共同表達時之抗-cMet結合活性。抗-cMet直接結合分析法所得結果如第69圖所示。在此實驗中，融合與HZ VL6 («較長-CDR1»)版本可觀察到類似的抗-cMet結合能力，然而HZ VL3 («較短-CDR1)重組224G11-衍生抗體則無結合能力。

[0547]在第二部份實驗中，我們構築並分析HZ VL6-衍生224G11 VH區域人源化版本與224G11嵌合重鏈共表達時之抗-cMet結合活性。另外分析人源化類型；在HZ VL5版本

中，人源化第三組(順序3)的七個殘基，而在HZ VL4版本中，僅第一組(順序1殘基)左側四個殘基保留鼠源。抗-cMet直接結合分析所得結果如第70圖所示。在此實驗中，經檢測224G11-衍生嵌合體或部分人源化重組抗體之結合能力沒有差異。其中，22個胺基酸中有18個被發現在鼠科224G11 VL區域內有所不同，並且當結合融合重鏈時，分析經選取之«較長-CDR1»人類架構體，發現與224G11人源化VL區域的抗-cMet結合活性無關。

[0548]隨後以HGF結合競爭分析檢測224G11 VL區域之HZ VL4人源化版本。如第71圖所示，所得結果證實鼠科與重組經嵌合之HZ VL4人源化224G11-衍生抗體具有類似之競爭活性。

[0549]在此224G11 VL區域人源化階段，所得序列僅含有來自鼠科親代序列的四個外源-CDR殘基。如第72圖所示，這四個§-標記殘基為L4、M39、H40與R84。

[0550]依據IMGT編號系統與同源分析工具，我們證實人類架構在CDR長度方面若具有構造上差異，仍可適用於人源化步驟。故決定確認所得224G11抗體之重鏈與輕鏈人源化版本。以定點突變分析殘餘四個鼠科殘基於結合重鏈VH0人源化版本共表達時之貢獻。

III -人源化224G11抗體

[0551]在第一部份實驗中，我們構築並分析224G11抗體完整人源化版本之抗-cMet結合活性。此重組版本分別包含VH0與VL4人源化VH與VL區域。抗-cMet直接結合分析法

所得結果如第73圖所示。在此實驗中，發現完整人類224G11抗-cMet結合活性類似於「單鏈」人源化與嵌合重組224G11版本。

[0552]利用HGF結合競爭分析法檢測224G11 VL區域之完整人源化版本。所得結果顯示於第74圖，證實親代鼠科與重組融合之完整人源化224G11-衍生抗體具有類似之競爭活性。

[0553]在此224G11抗體人源化階段，所產生序列僅含有來自鼠科親代輕鏈可變區域序列的四個外源-CDR殘基。我們隨後以定點突變分析，當結合重鏈VH0人源化版本共表達時，VL4人源化VL區域之單一變形體。如第75圖所示，利用直接結合分析，我們確定了四個受測殘基中可能有兩個具相關性，即M39與H40。

[0554]隨即，當結合HZ VH0人源化224G11 VH區域共表現時，分析HZ VL4人源化224G11 VL區域中多個突變體。第76圖顯示直接結合分析，而第77圖顯示HGF結合競爭分析，並分析VL4區域中多個胺基酸突變體以確定最佳的人源化組合。依據單一突變體之分析，顯示應針對雙與三突變體以獲得最佳之抗-cMet活性。VH0/VL4-2x突變體代表HZ VH0 224G11人源化VH區域，其表現HZ VL4 224G11人源化VL區域並具有雙突變位置L4M/R84G。VH0/VL4-3x突變體代表HZ VH0 224G11人源化VH區域，其表現HZ VL4 224G11人源化VL區域並具有三突變位置L4M/M39L/R84G。

[0555] 考慮到關於完整人源化224G11抗體之抗-cMet結合特性所得之實驗數據，我們隨後進行生物資訊分析重鏈與輕鏈可變區域序列，以評估VH0/VL4-2x與VH0/VL4-3x最佳人源化版本的「人源」程度。先前已經證實VH0 224G11 VH區域之“完整-I MGT”人源化。有關VL4-2x與-3x 224G11人源化VL區域版本的人源程度，其僅含有鼠科殘基M39與/或H40。這兩個可能的重要殘基位於CDR1末端，M39為N-端CDR嵌體。考量224G11 VL區域人源化期間所面臨CDR長度問題，以及考慮這些位置為部分Kabat對於VL CDR1之定義，完整人源化224G11抗體的人源程度應顯示出明顯之免疫性下降，係因最少保留之鼠科殘基。

【符號說明】

(無)

【序列表】

<110> 皮爾法伯製藥公司
GOETSCH, Liliane

<120> 抑制 C-MET 之二聚化的新穎抗體及其等之用途

<130> D25728

<150> EP 07301231.2

<151> 2007-07-12

<150> US 60/929,789

<151> 2007-07-12

<150> US 61/020,639

<151> 2008-01-11

<160> 71

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 1

Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr Thr
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala
1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 4
Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Thr
1 5

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 5
Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr
1 5

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 6
Ala Arg Glu Glu Ile Thr Lys Asp Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 7
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 8
Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr
1 5

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 9
Ala Arg Gly Arg Tyr Val Gly Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 10
Glu Ser Val Asp Ser Tyr Ala Asn Ser Phe
1 5 10

<210> 11
<211> 3
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 11
Arg Ala Ser
1

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 12
Gln Gln Ser Lys Glu Asp Pro Leu Thr
1 5

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 13
Glu Ser Ile Asp Thr Tyr Gly Asn Ser Phe
1 5 10

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 14
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr
1 5

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 15
Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
1 5

<210> 16
<211> 3
<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 16

Ala Ala Thr

1

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 17

Gln His Phe Trp Gly Pro Pro Tyr Thr

1

5

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 18

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

Ala Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 19

<211> 118

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 19

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Arg Glu Glu Ile Thr Lys Asp Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 20
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 小鼠

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

<210> 21
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 21
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
 100 105 110

<210> 22
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 22
 Gly Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

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

<210> 23
<211> 107
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 23
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45
Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Pro Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 24
<211> 24
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 24
ggatacatat tcactgcata cacc 24

<210> 25
<211> 24
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 25
attaaaccaa acaatggtct tgct 24

<210> 26
<211> 33
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 26
gcaagatctg agattacgac ggaatttgac tac 33

<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 27
ggttattcat tcactgacta cacc 24

<210> 28
<211> 24
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 28
attaatcctt acaatggtgg tact 24

<210> 29
<211> 33
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 29
gcaagagagg aaattacgaa ggactttgat ttc 33

<210> 30
<211> 24
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 30
ggatacacat tcactgacta caac 24

<210> 31
<211> 24
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 31
attaatccta acaatggtgg tact 24

<210> 32
<211> 42
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 32
gcaagagggg ggtatgttgg ttactactat gctatggact ac 42

<210> 33		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> 小鼠		
<400> 33		
gaaagtgttg atagttatgc caatagtttt	30	
<210> 34		
<211> 9		
<212> DNA		
<213> 小鼠		
<400> 34		
cgtgcatcc	9	
<210> 35		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> 小鼠		
<400> 35		
cagcaaagta aggaggatcc tctcacg	27	
<210> 36		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> 小鼠		
<400> 36		
gaaagtattg atacttatgg caatagtttt		30
<210> 37		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> 小鼠		
<400> 37		
cagcaaagta atgaggatcc attcacg		27
<210> 38		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> 小鼠		
<400> 38		
gagaatattt acagtaat		18
<210> 39		
<211> 9		
<212> DNA		
<213> 小鼠		
<400> 39		
gctgcaaca		9

<210> 40
<211> 27
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 40
caacattttt ggggtcctcc gtacacg

27

<210> 41
<211> 354
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 41
gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
tcctgcaaga cttctggata catattcact gcatacacca tgcactgggt gaggcagagc 120
cttggagaga gccttgactg gattggaggt attaaaccaa acaatgggtct tgctaactac 180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
atggacctcc gcagcctgac atctgaggat tctgcagtct attactgtgc aagatctgag 300
attacgacgg aatttgacta ctggggccaa ggcaccgctc tcacagtctc ctca 354

<210> 42
<211> 354
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 42
gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagatt 60
tcctgcaagg cttctggtta ttcatcact gactacaccc tgaactgggt gaagcagagc 120
catggaaaga cccttgagtg gattggactt attaatcctt acaatgggtg tactacctac 180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacatta actgtagaca agtcatccag cacagcctac 240
atggagctcc tcagtctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagaggaa 300
attacgaagg actttgattt ctggggccaa ggcaccctc tcacagtctc ctca 354

<210> 43
<211> 363
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 43
gaggtcctgc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
ccctgcaagg cttctggata cacattcact gactacaaca tggactgggt gaagcagagc 120
catggaatga gccttgagtg gattggagat attaatccta acaatgggtg tactatcttc 180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
atggagctcc gcagcctgac atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagagggagg 300
tatgttggtt actactatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 44
<211> 333
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 44
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atatcctgca gagccagtga aagtgttgat agttatgcc aatagtttat gcactgggtac 120
cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct 180
gggatccctg ccagggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240
cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtaagga ggatcctctc 300
acgttcggct cggggacaaa attggaaatg aaa 333

<210> 45
<211> 333
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 45
ggcatttgtt tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggaca gagggccacc 60
atatcctgca gaggcagtga aagtattgat acttatggca aatagtttat acactgggtac 120
cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct 180
gggatccctg ccagggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240
cctgtggagg ctgatgattc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccattc 300
acgttcggct cggggacaaa gttggaaatg aaa 333

<210> 46
<211> 321
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 46
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc 60
atcacatgtc gagcaagtga gaataatttac agtaatttag catgggtatca gcagaaacag 120
ggaaaatctc ctacagctctt ggtctatgct gcaacaaact tagtagatgg tgtgccatca 180
agggtcagtg gcagtggatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct 240
gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttgggggc ctccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggagataaa g 321

<210> 47
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 管家基因核糖體蛋白質，大，P0 (RPL0)，之引子

<400> 47
gaaactctgc attctcgctt cctg 24

<210> 48
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 管家基因核糖體蛋白質，大，P0 (RPL0)，之引子

<400> 48

aggactcgtt tgtaccggtt ga	22
<210> 49	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 管家基因核糖體蛋白質，大，P0 (RPL0)，之引子	
<400> 49	
tgcagattgg ctacccaact gttgca	26
<210> 50	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> HGF 之引子	
<400> 50	
aacaatgcct ctggttcc	18
<210> 51	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> HGF 之引子	
<400> 51	
cttgtagctg cgtcctttac	20
<210> 52	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> HGF 之引子	
<400> 52	
ccttcaatag catgtcaagt ggagtga	27
<210> 53	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> c-Met 之引子	

<400> 53
cattaaagga gacctcacca tagctaataat 28

<210> 54
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> c-Met 之引子

<400> 54
cctgatcgag aaaccacaac ct 22

<210> 55
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Probe for c-Met

<400> 55
catgaagcga ccctctgatg tccca 25

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 56
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5

<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 57
Ile Asn Pro Thr Thr Gly Ser Thr
1 5

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 58
Ala Ile Gly Gly Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 59
 Ser Ser Val Ser Ser Thr Tyr
 1 5

<210> 60
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 60
 Thr Thr Ser
 1

<210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 61
 His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 62
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 62
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Thr Thr Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Leu
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Gly Gly Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 63
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 63
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Thr
20 25 30
Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
35 40 45
Ile Tyr Thr Thr Ser Ile Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80
Thr Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
85 90 95
Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
100 105

<210> 64
<211> 24
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 64
ggctacactt ttacttccta ctgg 24

<210> 65
<211> 24
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 65
attaacccta ccactgggtc tact 24

<210> 66
<211> 33
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 66
gcaataggag gatatgggtc ctggtttgct tac 33

<210> 67
<211> 21
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 67
tcaagtgtaa gttccaccta c 21

<210> 68
<211> 9
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 68

accacatcc

9

<210> 69
<211> 27
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 69
catcagtgga gtagttaccc attcacg

27

<210> 70
<211> 354
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 70
cagggtccagc ttcagcagtc tggggctgaa ctggcaaaac ctggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaagg ctctcggcta cacttttact tcctactgga tgaactgggt gaaacagagg 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaaccta ccaactgggt tactgactac 180
aatcagaagt taaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccaa cacagcctac 240
atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aataggagga 300
tatgggtcct ggtttgccta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca 354

<210> 71
<211> 324
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 71
caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctcttgggga gaaggtcacc 60
ttgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tccacctact tgtactggta ccagcagaag 120
ccaggatcct cccccaact ctggatttat accacatcca tcctggcttc tggagtcctt 180
gtctgcttca gtggcagtggt gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagcatggag 240
actgaagatg ctgcctctta ttcttgccat cagtggagta gttacccatt cacgttcggc 300
tcggggacaa agttggacat aaaa 324

公 告 本**申 請 專 利 範 圍**

106年3月17日修正本

1. 一種經單離之抗c-Met抗體或者其c-Met結合活性之二價片段之一者，其特徵在於該抗體包含一含有CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3之重鏈，其分別包含下列該等胺基酸序列：SEQ ID No. 56、57及58；以及該抗體包含一含有CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3之輕鏈，其分別包含下列該等胺基酸序列：SEQ ID No. 59、60及61。
2. 如請求項1之抗體或者其c-Met結合活性之二價片段之一者，特徵為其包含一重鏈及一輕鏈，其中該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID No. 62，該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID No. 63。
3. 如請求項1或2之抗體或者其c-Met結合活性之二價片段之一者，特徵為該抗體係一單株抗體。
4. 如請求項3之抗體或者其c-Met結合活性之二價片段之一者，特徵為該抗體為嵌合抗體，其中該輕鏈與重鏈恆定區域係衍生自一人類抗體。
5. 如請求項1或2之抗體或者其c-Met結合活性之二價片段之一者，特徵為其係可特異性地結合至c-Met。
6. 如請求項5之抗體或者其c-Met結合活性之二價片段之一者，特徵為其係可抑制配位體依賴型及配位體非依賴型活化的c-Met。
7. 如請求項5或6之抗體或者其c-Met結合活性之二價片段之一者，特徵為其抑制c-Met之二聚化。

8. 一種經單離之核酸，特徵為其選自於下列核酸：

a) 一核酸、DNA或RNA，其編碼如請求項1及2任一項所述之一抗體或者其c-Met結合活性之二價片段之一者；

b) 一核酸，包含一DNA序列，其包含序列SEQ ID No. 64、SEQ ID No. 65、SEQ ID No. 66，以及序列SEQ ID No. 67、SEQ ID No. 68與SEQ ID No. 69；

c) 一核酸，包含一DNA序列，其包含序列SEQ ID No. 70與SEQ ID No. 71；

d) 如b)和/或c)中定義之核酸所對應之RNA核酸；以及

e) 如a)、b)與c)中定義之核酸之互補核酸。

9. 一種載體，包含如請求項8之核酸。

10. 一種宿主細胞，包含如請求項9之載體。

11. 一種製造如請求項1至7任一項之抗體或者其c-Met結合活性之二價片段之一者的方法，特徵在於該方法包含：

a) 於培養液與適當培養條件下培養如請求項10之宿主細胞；以及

b) 自該培養液或該經培養之細胞中回收該抗體或者其c-Met結合活性之二價片段之一者。

12. 一種抗體或者其c-Met結合活性之二價片段之一者，其係用作為一藥物，其中該抗體或其c-Met結合活性之二價片段之一者係如請求項1至7所界定者，或可由如請求項11項之方法獲得者。

第 103121603 號專利再審查案申請專利範圍替換本 106.3.17

13. 一種組成物，其包含作為一活性成分之化合物，該化合物係由下列所組成：如請求項1至7任一項之抗體或者其c-Met結合活性之二價片段之一者，或由請求項11之方法所製造者。
14. 如請求項13之組成物，特徵在於其進一步包含一試劑，其作為組合產物以同時、單獨或依序使用，其中該試劑係一抗腫瘤抗體。
15. 如請求項13或14之組成物，特徵在於其進一步包含至少一試劑，其作為組合產物以同時、單獨或依序使用，其中該試劑係一細胞毒性/細胞生長抑制試劑。
16. 如請求項13或14之組成物，特徵在於至少一該抗體或者其c-Met結合活性之二價片段之一者係與一細胞毒素及/或放射線元素共軛。
17. 如請求項13或14之組成物，其係作為一藥物。
18. 一種使用一抗體或者其c-Met結合活性之二價片段之一者於製備一藥物之用途，其中該抗體或者其c-Met結合活性之二價片段之一者係如請求項1至7所界定者，或由請求項11項之方法所獲得者，其中該藥物係用於治療癌症。
19. 一種使用如請求項13至16任一項之組成物於製備一藥物之用途，其中該藥物係用於治療癌症。
20. 如請求項18或19之用途，特徵在於該癌症係選自於前列腺癌、骨肉瘤、肺癌、乳癌、子宮內膜癌、膠質母細胞瘤或大腸癌。

第 103121603 號專利再審查案申請專利範圍替換本 106.3.17

21. 如請求項18或19之用途，特徵在於該癌症為與c-Met活化相關之癌症，其係選自於HGF依賴型和/或非依賴型。
22. 如申請專利範圍第20項之用途，特徵在於該癌症為與c-Met活化相關之癌症，其係選自於HGF依賴型和/或非依賴型。
23. 一種體外診斷由於c-Met受體過度表現或表現不足引起之疾病之方法，起始於懷疑出現異常c-Met受體之生物樣本，特徵為該方法包含一步驟，其中該生物樣本係與一抗體或者其c-Met結合活性之二價片段之一者接觸，該抗體或者其c-Met結合活性之二價片段之一者係如請求項1至7項所界定者，或由請求項11之方法所獲得者。
24. 如申請專利範圍第23項之方法，其中該抗體係經標記。