(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0166099
(43) 공개일자 2023년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2863 (2013.01)
A61K 47/6803 (2023.08)
(21) 출원번호 10-2023-7036317
(22) 출원일자(국제) 2022년04월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년10월23일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/059059
(87) 국제공개번호 WO 2022/214517
국제공개일자 2022년10월13일
(30) 우선권주장
21167423.9 2021년04월08일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
비온디스 비.브이.
네덜란드 6545 씨엠 네이메헌 마이크로베그 22
(72) 발명자
브로멘로어 마리온
네덜란드 6545씨엠 네이메헌 마이크로베그 22 비온디스 비.브이.
반 더 리 미란다 마리아 코르넬리아
네덜란드 6545씨엠 네이메헌 마이크로베그 22 비온디스 비.브이.
그루튀스 패트릭 게르하르트
네덜란드 6545씨엠 네이메헌 마이크로베그 22 비온디스 비.브이.
(74) 대리인
김진희, 김태홍

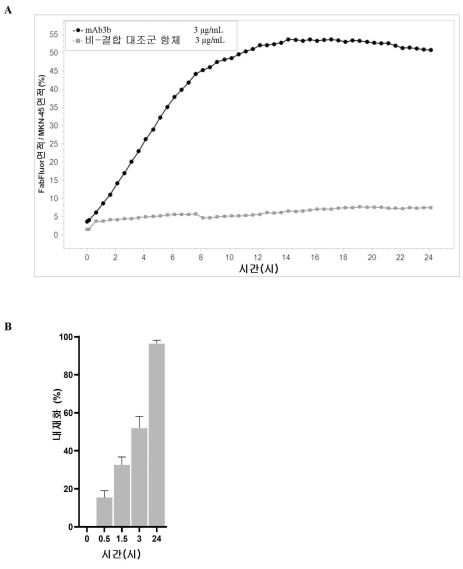
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **항-C-MET 항체 및 항체-약물 접합체**

(57) 요 약

본 발명은 중간엽-상피 전이 인자(c-Met)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이 항-c-Met 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 항체 약물 접합체(ADC); 상기 항체, 항원 결합 단편 또는 ADC를 포함하는 약학 조성물; 및 암 치료에 있어서 이들의 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/6849 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/77 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

중쇄(HC) 가변 영역 상보성 결정 영역(CDR) HC CDR1 내지 CDR3 및 경쇄(LC) 가변 영역 상보성 결정 영역(CDR) LC CDR1 내지 CDR3을 포함하는, 중간엽-상피 전이 인자(c-Met)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서,

HC CDR1의 아미노산 서열이 서열번호 26을 포함하고;

HC CDR2의 아미노산 서열이 서열번호 27을 포함하고;

HC CDR3의 아미노산 서열이 서열번호 28을 포함하고;

LC CDR1의 아미노산 서열이 서열번호 29를 포함하고;

LC CDR2의 아미노산 서열이 서열번호 30을 포함하고;

LC CDR3의 아미노산 서열이 서열번호 31을 포함하는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 인간화 항체 또는 항원 결합 단편인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, HC 가변 영역의 아미노산 서열이 서열번호 16으로 표시되고, LC 가변 영역의 아미노산 서열이 서열번호 20으로 표시되는 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 온전한 IgG1 항체인 항체.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, Fab 단편인 항원 결합 단편.

청구항 6

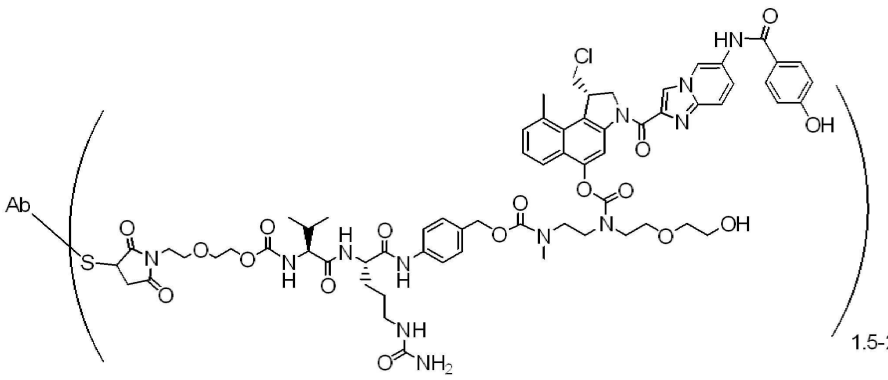
링커, 바람직하게는 절단 가능한 링커를 통해 세포독성 약물에 접합된 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체.

청구항 7

제6항에 있어서, 세포독성 약물이 듀오카마이신 유도체인 항체-약물 접합체.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 화학식 (III)의 항체-약물 접합체:



(III),

상기 식에서,

Ab는 IgG1 항체이고;

Ab의 HC 가변 영역은 서열번호 16의 아미노산 서열로 표시되고, Ab의 LC 가변 영역은 서열번호 20의 아미노산 서열로 표시되고;

세포독성 약물은 카바트(Kabat) 넘버링에 따라 HC 위치 41의 조작된 시스테인에 링커를 통해 부위 특이적으로 접합된 것인 항체-약물 접합체.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편 또는 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 접합체 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 바람직하게는 동결건조된 분말 형태의 약학 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 의약으로서 사용하기 위한 항체 또는 항원 결합 단편, 항체-약물 접합체 또는 약학 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, c-Met 양성 인간 고형 종양 또는 *MET* 유발 혈액 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 항체 또는 항원 결합 단편, 항체-약물 접합체 또는 약학 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, c-Met 양성 인간 고형 종양이 유방암; 뇌암; 두경부암; 갑상선암; 타액선암; 연조직 육종; 안암; 식도암; 위암; 소장암; 대장암; 요로상피세포암; 난소암; 자궁암; 자궁내막암; 자궁경부암; 폐암(특히 비-소세포 폐암 및 소세포 폐암); 흑색종; 간암; 췌장암; 비-흑색종 피부암; 전립선암; 생식세포암; 및 원인불명의 원발성 암으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 항체 또는 항원 결합 단편, 항체-약물 접합체 또는 약학 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, *MET* 유발 혈액 악성 종양이 림프성 악성 종양, 바람직하게는 성숙 T 및 NK 신생물인 항체 또는 항원 결합 단편, 항체-약물 접합체 또는 약학 조성물.

청구항 14

c-Met 양성 인간 고형 종양의 치료에 사용하기 위한, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편, 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체-약물 접합체 또는 제9항에 따른 약학 조성물과, c-Met 항원 이외의 암 관련 표적에 대한 치료 항체, 화학요법제 및/또는 항체-약물 접합체의 조합.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 중간엽-상피 전이 인자(c-Met)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이 항-c-Met 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 항체 약물 접합체(ADC); 상기 항체, 항원 결합 단편 또는 ADC를 포함하는 약학 조성물; 및 암 치료에서 있어서 이들의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 간세포 성장 인자 수용체 또는 중간엽-상피 전이 인자(HGFR, c-Met)는 *MET* 종양유전자에 의해 코딩되고 다양한 상피 세포의 표면에서 발현되는 수용체 티로신 키나제이다. c-Met에 대한 리간드는 혈관신생 및 분열촉진 성질에 대해 알려진 고분자량 폴리펩티드인, 산란 인자(SF)로서도 알려진 간세포 성장 인자(HGF)이다.

[0003] 성숙 인간 c-Met의 세포외 부분은 세 가지 유형의 도메인으로 구성된다: 1) 500개의 N-말단 잔기의 폴딩에 의해 형성되고 전체 알파-서브유닛 및 베타-서브유닛의 일부를 포함하는 세마포린(SEMA) 도메인; 2) 대략 50개의 잔기를 갖고 4개의 디설파이드 결합을 포함하는 PSI 도메인(플렉신, 세마포린 및 인테그린에서 발견됨); 및 3) PSI 도메인을 막횡단 나선에 연결하는 4개의 면역글로불린-플렉신-전사(IPT) 도메인. 세포내에서 c-Met는 구별되는 막인접 서열 및 카르복시 말단 서열에 의해 플랭킹된 티로신 키나제 촉매 도메인을 함유한다. c-Met 단백질의 폴딩된 구조 내에서, SEMA 도메인은 7개의 블레이드를 가진 베타 프로펠러를 형성한다.

[0004] c-Met는 많은 상이한 정상 조직들에서 발현된다(Human Protein Atlas, www.proteinatlas.org, 및 내부 연구결과). 이것은 위장 조직(즉, 위, 담낭, 십이지장, 소장, 결장, 직장), 여성 생식 조직(즉, 자궁내막, 자궁경부, 질, 태반), 비뇨생식기 조직(즉, 방광, 요로, 신장)에서 가장 두드러지게 관찰되고, 특히 갑상선, 피부, 폐, 간, 유방 및 식도에서도 어느 정도 관찰된다. 또한, 두드러진 c-Met 발현은 눈(즉, 각막 및 수정체 상피, 윤부 및 결막)뿐만 아니라, 눈꺼풀(즉, 눈물샘, 마이봄샘(Meibomean gland), 피지선, 모낭)에도 존재한다.

[0005] HGF와 c-Met의 결합은 수용체 이량체화, 헤테로머화 또는 다량체화, 세포내 영역 내의 여러 티로신 잔기의 인산화, 및 증식, 운동성, 이동 및 침습에 관여하는 세포 신호전달 경로를 비롯한 광범위한 다양한 세포 신호전달 경로들의 활성화를 유발한다. c-Met는 정상 생리학적 조건 하에서 조직 항상성의 조절에 중요하지만, (엑손 14) 돌연변이, 유전자 증폭 또는 단백질 과발현을 통한 악성 종양의 발생 및 진행에도 분명히 관여한다. c-Met 관련 기작은 또한 (화학)요법, 예를 들어, 세포 증식의 다른 조절제, 예컨대, 표피 성장 인자 수용체(EGFR), 형질전환 성장 인자-β(TGF-β) 및 인간 표피 성장 인자 수용체 3(HER3)을 겨냥하는 요법에 대한 내성에도 관여하는 것으로 보인다.

[0006] 인간 c-Met 신호전달 경로는 인간 암에서 가장 빈번하게 이상조절되는 경로들 중 하나이다. 이 경로는 많은 유형의 고형 종양들과 관련되어 있고 높은 c-Met 발현은 일반적으로 좋지 않은 예후와 관련되어 있다. 이러한 이유로, c-Met, HGF/SF 신호전달 경로는 암 치료를 위한 표적이 되었다.

[0007] 소분자부터 항체에 이르기까지 매우 다양한 c-Met 억제제들이 임상적으로 개발되었으나, c-Met 신호전달에 의존하는 종양, 예를 들어, *MET* 증폭 또는 엑손 14 돌연변이를 가진 종양을 가진 환자에서만 양성 반응이 확인되었고, 일부 경우 치료가 심지어 환자의 상태를 악화시켰기 때문에, 임상 결과는 실망스러웠다.

[0008] 승인된 소분자 c-Met 억제제는 역형성 림프종 키나제(ALK) 양성 또는 ROS1 티로신 키나제 양성 비-소세포 폐암(NSCLC)의 치료에 사용되는 티로신 키나제 억제제(TKI) 크리조티닙(crizotinib)(Xalkori®, Pfizer), 및 특히 c-Met 및 VEGFR2를 표적화하고 수질 갑상선 암종 및 신장 세포 암종(RCC)의 치료에 사용되는 카보잔티닙(cabozantinib)(Cometriq®, Ipsen Pharma; Cabometyx®, Ipsen Pharma)을 포함한다.

[0009] 암 치료와 관련하여, c-Met에 대한 임의의 아고니스트 효과는 피해져야 한다. 따라서, 적합한 치료 항체는 c-Met 이량체화 및 그에 따른 활성화(아고니스트 효과)가 피해지는 반면, 내재화 및 분해가 유도되는 방식으로 c-Met와 상호작용한다. 재생 의학에 사용하기 위한 아고니스트 항체도 설계에 의해 생성될 수 있지만(예를 들어, WO 2018/001909), 이 항체는 종종 암 치료에 사용될, c-Met 신호전달에 대한 길항(즉, 억제) 효과를 가진 적합한 치료 항체에 대한 검색의 원치 않는 부산물이다.

[0010] 따라서, 암 치료제로서 사용하기 위한 항-c-Met 항체의 설계는 유리한 결합 특성, c-Met 신호전달의 억제, 및 허용 가능한 약동학적 및 약력학적 성질 사이의 섬세한 균형을 수반한다.

[0011] 길항 효과를 갖되 아고니스트 효과를 갖지 않는 항체에 대한 검색은 복잡한 작업이다. 일부 항체는 예를 들어,

마우스 단일클론 항체에 기반한 인간화 과정의 결과로서, 심지어 길항제에서 아고니스트로 바뀔 수 있다.

[0012] 암 치료에 사용하기 위해 c-Met를 표적화하는 여러 항체들이 개발되었으며 임상 시험이 시작되었다. 이러한 c-Met 특이적 항체는 보편적인 항-c-Met 항체뿐만 아니라, c-Met 및 다른 신호전달 단백질, 예컨대, EGFR 둘 다를 표적화하는 이중특이적 항체도 포함한다.

[0013] 임상 개발되고 있는 c-Met에 대한 길항 항체는 예를 들어, 오나르투주맙(onartuzumab)(Genentech, WO 2006/015371), ARGX-111(Argenx, WO 2012/059561), 에미베투주맙(emibetuzumab)(LY2875358; Eli Lilly, WO 2010/059654), SAIT-301(Samsung, US 2014-0154251), 텔리소투주맙(telisotuzumab)(항체 ABT-700; Abbott/Abbvie, Wang *et al.*, *BMC Cancer* **2016**, *16*, 105-118; WO 2017/201204) 및 Sym015(c-Met ECD의 비-중첩 에피토프에 결합하는 2개의 항-c-Met 단일클론 항체들의 혼합물; Symphogen, WO 2016/042412)이다.

[0014] 오나르투주맙은 최초로 개발된 항-c-Met 항체로서, c-Met 아고니스트 항체 5D5로부터 유래한 인간화 1가 길항 항-c-Met 항체이었다(Spigel *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 4105-4114; Xiang *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 5068-5078). 기대되는 실험 결과에도 불구하고, 후기 임상 시험에서 임상적으로 유의미한 효능의 결여로 인해 오나르투주맙의 개발이 종료되었다(Spigel *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, abstract 8000; NCT01456325). 인간화 IgG4 에미베투주맙(LY2875358)은 IV기 EGFR 돌연변이체 NSCLC를 가진 환자에서 2상 임상 시험(NCT01900652)의 대상이었다. 이 연구에서, 치료 의향 집단에서 중앙값 무진행 생존(PFS)의 유의미한 차이는 관찰되지 않았다(에미베투주맙 + 에를로티닙을 사용한 경우 9.3개월 대 에를로티닙 단독요법을 사용한 경우 9.5개월)(Scagliotti *et al.*, *J. Thorac. Oncol.* **2020**, *15*, 80-90). 인간 IgG1 ARGX-111(NCT02055066), 인간화 IgG1 ABT-700(텔리소투주맙; NCT01472016) 및 인간화 단일클론 IgG1 항체 혼합물 Sym015(NCT02648724)는 임상 1상에서 평가되었다. 현재, 항-c-Met 항체는 치료 용도로 승인되지 않았다.

[0015] ADC는 부분적으로, c-Met 신호전달 경로에 의존하지 않는 세포를 사멸시킬 수도 있기 때문에 흥미로운 대안이다. c-Met 표적화 TKI 또는 단일클론 항체의 효능은 c-Met 유도 종양/*MET* 증폭 종양에 주로 의존하는 반면, c-Met에 대한 항체를 포함하는 ADC의 효능은 세포외 c-Met 발현 및 내재화뿐만 아니라, ADC의 항체에 커플링된 세포독성제에 대한 민감성에도 주로 의존한다.

[0016] 따라서, 암 치료에 사용될 ADC에 적합한 것으로 간주되는 항-c-Met 항체는 높은 친화성으로 c-Met에 결합해야 하며, 허용 가능한 약동학적 및 약력학적 성질을 가져야 하는 반면, 이 항체는 아고니스트 효과를 가져서는 안 된다. 추가로, 이 항체는 c-Met 내재화를 유도해야 한다.

[0017] 앞서 설명된 바와 같이, 길항 효과를 갖되, 아고니스트 효과를 갖지 않는 항체에 대한 검색은 이미 복잡한 작업이었지만, ADC에 적합한 항체의 경우 이 검색은 내재화를 유발하되 이량체화를 유발하지 않는 에피토프가 c-Met의 세포외 도메인(ECD)에서 완전히 정의되지 않았기 때문에 훨씬 더 복잡한 작업이다.

[0018] 따라서, ADC의 경우, 효능은 항체의 결합 특성(c-Met에 대한 길항 효과의 관점에서 친화성 및 특이성)에 의존할 뿐만 아니라, ADC가 내재화된 후 세포에 의해 처리되는 정도에도 의존한다. 세포에서 ADC는 그의 세포독성 효과를 발휘할 생물학적 활성 약물을 방출할 것이다. 따라서, 특정 세포독성 페이로드에 대한 종양 세포의 민감성도 중요하다.

[0019] c-Met 특이적 항체에 기반한 ADC는 텔리소투주맙 베도틴(telisotuzumab vedotin)(ABBV-399; Abbvie, WO 2017/201204), TR1801-ADC(Tanabe Research, Gymnopoulos *et al.*, *Mol. Oncol.* **2020**, *14*, 54-68), SHR-A1403(Jiangsu HengRui Medicine Co., Yang *et al.*, *Acta, Pharmacologica Sinica* **2019**, *40*, 971-979) 및 hucMET-27-ADC(Immunogen Inc., WO 2018/129029)를 포함한다.

[0020] 텔리소투주맙 베도틴은 절단 가능한 링커를 통해 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)에 접합된 c-Met 항체 텔리소투주맙(ABT-700)에 기반한다. TR1801-ADC는 인간화 항체 hD12와 피롤로벤조디아제핀(PBD) 독소-링커 테시린(tesirine)의 부위 특이적 접합체이다. SHR-A1403은 세포독성 마이크로튜불 억제제에 접합된, c-Met에 대한 인간화 IgG2 단일클론 항체로 구성된다. 면역원 ADC는 항체 hucMET-27과 인돌리노벤조디아제핀 DNA 알킬화 페이로드 DGN549 또는 DM4의 접합체이다.

[0021] 임상 전 단계의 여러 ADC들은 기대되는 결과를 보여주었고, 일부는 임상 시험으로 진행되었으나(NCT02099058, NCT03539536, NCT03859752, NCT03856541), 생존 이익은 아직 확인되지 않았다.

[0022] 이 분야의 개발이 20년 이상 동안 계속되고 있다는 사실에도 불구하고, c-Met에 특이적인 항체에 기반한 암 치료에 사용될 시판 제품은 아직 입수 가능하지 않다. 다수의 임상 후보들의 개발이 중단되었는데, 이는 c-Met에

대한 아고니스트 효과에 비해 길항 효과에서 충분한 특이성을 가질 뿐만 아니라 허용 가능한 치료 윈도우도 가진 항체를 찾는 것이 결코 간단하지 않다는 또 다른 방증이다.

[0023] 그럼에도 불구하고, 암 진행에서 중요한 역할을 한다는 점을 고려할 때, c-Met는 매력적인 표적으로 남아 있으며, 원하는 선택성, 특이성 및 효능뿐만 아니라 허용 가능한 치료 윈도우도 가진 치료 항체 및 ADC에 대한 필요성은 남아 있다.

발명의 내용

[0024] 본 발명은 c-Met에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 이 항-c-Met 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)에 관한 것이다.

[0025] 첫 번째 측면에서, 본 발명은 중쇄(HC) 가변 영역 상보성 결정 영역(CDR) HC CDR1 내지 CDR3 및 경쇄(LC) 가변 영역 상보성 결정 영역(CDR) LC CDR1 내지 CDR3을 포함하는, c-Met에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것으로, 이때

[0026] HC CDR1의 아미노산 서열은 서열번호 26을 포함하고;

[0027] HC CDR2의 아미노산 서열은 서열번호 27을 포함하고;

[0028] HC CDR3의 아미노산 서열은 서열번호 28을 포함하고;

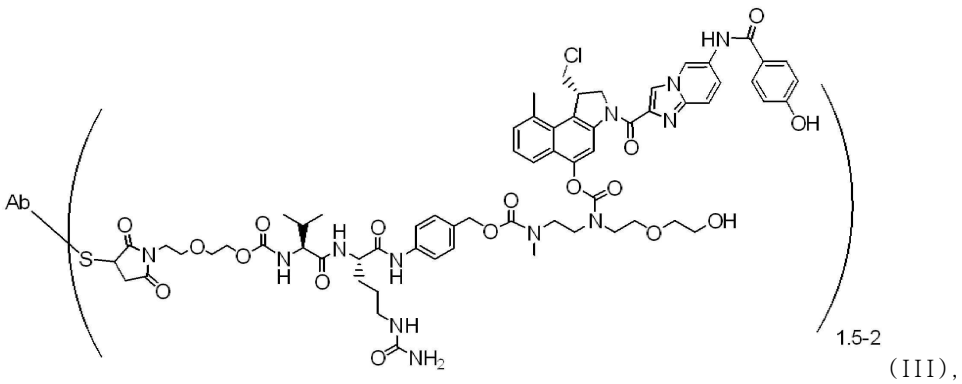
[0029] LC CDR1의 아미노산 서열은 서열번호 29를 포함하고;

[0030] LC CDR2의 아미노산 서열은 서열번호 30을 포함하고;

[0031] LC CDR3의 아미노산 서열은 서열번호 31을 포함한다.

[0032] 두 번째 측면에서, 본 발명은 링커를 통해 세포독성 약물에 접합된 항-c-Met 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 ADC에 관한 것이다.

[0033] 바람직한 실시양태에서, ADC는 화학식 (III)으로 표시된다:

[0034] 

(III),

[0035] 상기 식에서,

[0036] Ab의 HC 가변 영역은 서열번호 16의 아미노산 서열로 표시되고, Ab의 LC 가변 영역은 서열번호 20의 아미노산 서열로 표시되며;

[0037] Ab는 IgG1 항체이고;

[0038] 세포독성 약물은 HC 위치 41(카바트(Kabat) 넘버링에 따름)의 조작된 시스테인에 링커를 통해 부위 특이적으로 접합된다

[0039] 본 발명의 다른 측면은 항체, 항원 결합 단편 또는 ADC를 포함하는 약학 조성물, 및 특히 단일 요법 또는 조합 요법으로 암을 치료하는 데 있어서 의약으로서의 이의 용도를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1. c-Met 양성 MKN45 세포에서 Alexa Fluor 488(AF488) 표지부착된 mAb3b의 내재화 동역학의 정량. (A) 24시간 동안 추적된 세포질에 내재화된 형광 신호의 증가를 모니터링함으로써 IncuCyte S3 기기에서 측정된 내재

화. (B) 유세포분석에 의해 측정된 퍼센트 내재화.

도 2. c-Met 양성 MKN45 세포에서 ADC3b 및 이의 상응하는 비접합 항체 mAb3b의 세포 결합.

도 3. c-Met 발현 수준이 다양한 인간 종양 세포주에서 ADC3b의 시험관내 세포독성.

도 4. c-Met 양성 MKN45 세포와 1:1 공-배양되고 1 ㎍/㎖ ADC3b 또는 비-결합 대조군 ADC로 처리된 c-Met 음성 Jurkat NucLight Red 세포의 방관자 세포독성.

도 5. 암컷 ces1c KO 마우스의 c-Met 양성 MKN-45 종양 모델에서 키메라 ADC인 ADC1, ADC2 및 ADC3, 및 비히클의 생체내 효능.

도 6. 암컷 ces1c KO 마우스의 c-Met 양성 MKN-45 종양 모델에서 인간화 ADC 및 비히클의 생체내 효능.

도 7. 암컷 ces1c KO 마우스의 c-Met 양성 MKN-45 종양 모델에서 인간화 ADC인 ADC3a, ADC3b 및 ADC3c, 및 비히클의 생체내 효능.

도 8. 비-*MET* 증폭 두경부암 PDX 모델 HNXF1905(A) 및 폐암 PDX 모델 LXFL1176(B)에서 ADC3b의 효능. 화살표는 마우스의 무작위배정 및 투약 시간을 표시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] **항체 및 이의 항원 결합 단편**

[0042] 본 발명은 임의의 아고니스트 효과를 발휘하지 않으면서 c-Met에 대한 길항 또는 중성 효과를 가진 항체 또는 항체 결합 단편을 제공한다. 중성 효과는 항체가 c-Met에 결합하지만 결합이 c-Met 신호전달을 자극하지 않음을 의미한다.

[0043] 본 발명은 c-Met에 특이적으로 결합하고, 그의 특이적 상보성 결정 영역(CDR)에 의해 정의되고, 인간 및 사이노몰구스 원숭이(cyno) c-Met 둘 다에 대해 탁월한 친화성뿐만 아니라 우수한 효능도 보이고 허용 가능한 치료 윈도우를 제공하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

[0044] 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 상보성 결정 영역(CDR) HC CDR1 내지 CDR3을 포함하는 중쇄(HC) 가변 영역을 포함하고, 이때 HC CDR1의 아미노산 서열은 서열번호 26을 포함하고, HC CDR2의 아미노산 서열은 서열번호 27을 포함하고, HC CDR3의 아미노산 서열은 서열번호 28을 포함한다.

[0045] 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 상보성 결정 영역 LC CDR1 내지 CDR3을 포함하는 경쇄(LC) 가변 영역을 추가로 포함하고, 이때 LC CDR1의 아미노산 서열은 서열번호 29를 포함하고, LC CDR2의 아미노산 서열은 서열번호 30을 포함하고, LC CDR3의 아미노산 서열은 서열번호 31을 포함한다.

[0046] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 용어 "항체"는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 단일클론 항체(mAb)를 지칭한다. 항체는 임의의 이소타입의 항체, 예컨대, IgA, IgE, IgG 또는 IgM 항체일 수 있다. 바람직하게는, 항체는 IgG 항체, 보다 바람직하게는 IgG1 또는 IgG2 항체이다. 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 인간화된다. 훨씬 더 바람직하게는, 항체는 인간화 또는 인간 IgG 항체, 보다 바람직하게는 인간화 또는 인간 IgG1 항체, 가장 바람직하게는 인간화 IgG1 항체이다. 항체는 κ(카파) 또는 λ(람다) 경쇄, 바람직하게는 κ(카파) 경쇄, 즉 인간화 또는 인간 IgG1-κ 항체를 가질 수 있다.

[0047] 적용 가능한 경우, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (1) 조작되어 있는, 즉 하나 이상의 돌연변이가 예를 들어, 반감기를 증가시키고/시키거나, 링커-약물을 위한 부착 부위를 제공하고/하거나, 이펙터 기능을 증가시키거나 감소시키기 위해 도입되어 있을 수 있는 불변 영역; 또는 (2) 조작되어 있는, 즉 하나 이상의 돌연변이가 링커-약물을 위한 부착 부위를 제공하기 위해 도입되어 있을 수 있는 가변 영역을 포함할 수 있다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 재조합적으로 생성될 수 있거나, 합성에 의해 생성될 수 있거나, 다른 공지된 적합한 방법에 의해 생성될 수 있다.

[0048] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 용어 "항원 결합 단편"은 Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, scFv 또는 환원된 IgG(rIgG) 단편, 단일 쇄(sc) 항체, 단일 도메인(sd) 항체, 디아바디, 또는 미니바디를 포함한다.

[0049] 비인간(예를 들어, 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비인간 항체로부터 유래한 최소 서열을 함유하는 항체(예를 들어, 비인간-인간 키메라 항체)이다. 비인간 항체를 인간화하는 다양한 방법들이 당분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 중쇄(HC)와 경쇄(LC)의 가변 영역(VR)에 있는 항원 결합 상보성 결정 영역(CDR)은 비인간 종, 일반적

으로 마우스, 래트 또는 토끼의 항체로부터 유래한다. 이러한 비인간 CDR은 항체의 기능성, 예컨대, 결합 친화성 및 특이성이 적어도 부분적으로 유지되는 방식으로 HC 및 LC의 가변 영역의 인간 프레임워크 영역(FR, 즉 FR1, FR2, FR3 및 FR4)과 조합될 수 있다. 인간 FR에서 선택된 아미노산은 항체 성능을 더 개량하기 위해, 예컨대, 낮은 면역원성을 유지하면서 결합 친화성을 개선하기 위해 상응하는 원래의 비인간 종 아미노산으로 교체될 수 있다. 이로써 인간화된 가변 영역은 전형적으로 인간 불변 영역과 조합된다. 비인간 항체를 인간화하는 예시적인 방법은 윈터(Winter)와 그의 동료의 방법이다(Jones *et al.*, *Nature* **1986**, *321*, 522-525; Riechmann *et al.*, *Nature* **1988**, *332*, 323-327; Verhoeyen *et al.*, *Science* **1988**, *239*, 1534-1536). 대안적으로, 비인간 항체는 인간에서 천연적으로 생성된 항체 변이체와의 유사성을 증가시키기 위해 그의 아미노산 서열을 변형시킴으로써 인간화될 수 있다. 예를 들어, 원래의 비인간 종 FR의 선택된 아미노산은 항체의 결합 친화성을 유지하면서 면역원성을 감소시키기 위해 그의 상응하는 인간 아미노산으로 교체된다. 더 자세한 내용에 대해서는 문헌[Jones *et al.*, *Nature* **1986**, *321*, 522-525]; 문헌[Riechmann *et al.*, *Nature* **1988**, *332*, 323-327]; 및 문헌[Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* **1992**, *2*, 593-59]을 참조한다. 문헌[Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma and Immunol.* **1998**, *1*, 105-115]; 문헌[Harris, *Biochem. Soc. Transactions* **1995**, *23*, 1035-1038]; 및 문헌[Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* **1994**, *5*, 428-433], 및 이들에서 인용된 참고문헌도 참조한다.

[0050] CDR은 카바트(Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, NIH publication no. 91-3242, pp. 662, 680, 689 (1991)); 초티아(Chothia)(Chothia *et al.*, *Nature* **1989**, *342*, 877-883) 또는 IMGT(Lefranc, *The Immunologist* **1999**, *7*, 132-136)의 접근법을 이용함으로써 확인될 수 있다. 이 방법들은 IMGT에 따른 방법에 의해 확인된 첨부된 서열 서열번호 1 내지 20에서 밑줄로 표시된 CDR, 및 서열번호 26 내지 31로 예시된 바와 같이 카바트의 방법에 의해 확인된 CDR 서열에 의해 예시된 바와 같이 다소 다양한 길이를 가진 CDR을 생성한다.

[0051] 한 실시양태에서, 본 발명은 HC CDR1 내지 CDR3 및 LC CDR1 내지 CDR3을 포함하는 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것으로, 이때

[0052] HC CDR1의 아미노산 서열은 서열번호 26을 포함하고;

[0053] HC CDR2의 아미노산 서열은 서열번호 27을 포함하고;

[0054] HC CDR3의 아미노산 서열은 서열번호 28을 포함하고;

[0055] LC CDR1의 아미노산 서열은 서열번호 29를 포함하고;

[0056] LC CDR2의 아미노산 서열은 서열번호 30을 포함하고;

[0057] LC CDR3의 아미노산 서열은 서열번호 31을 포함한다.

[0058] 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 16으로 표시되는 HC 가변 영역 아미노산 서열 및 서열번호 20으로 표시되는 LC 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다.

[0059] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 온전한 IgG 항체, 보다 바람직하게는 IgG1 항체이다.

[0060] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 단편은 Fab, Fab' 또는 $F(ab')_2$ 단편, 보다 바람직하게는 Fab 단편이다.

[0061] 본 발명에 따른 항체는 인간 및 cyno c-Met 둘 다에 대한 그의 높은 특이성 및 그의 탁월한 친화성으로 인해 치료적 적용에 특히 적합한 반면, 시험관내 또는 생체내에서 아고니스트 효과를 발휘하지 않는다.

[0062] **항체-약물 접합체**

[0063] 본 발명은 추가로 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편이 링커를 통해 소분자 세포독성 약물과 같은 세포독성 약물에 접합되어 있는 항체-약물 접합체(ADC)에 관한 것이다. 링커가 세포독성 약물에 접합되어 있는 모이어티는 링커-약물(모이어티)이다.

[0064] 링커는 바람직하게는 합성 링커이다. 링커의 구조는 링커가 소분자 세포독성 약물에 쉽게 화학적으로 부착될 수 있도록 함으로써, 생성된 링커-약물이 추가 물질, 예를 들어, 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편에 쉽게 접합되어 항체-약물 접합체를 형성될 수 있도록 하는 구조이다. 링커의 선택은 순환계에 있을 때 이러한 최종 접합체의 안정성에 영향을 미칠 수 있으며, 소분자 약물 화합물이 방출되는 경우 이 화합물이 어떤 방식으로 방

출되는지에 영향을 미칠 수 있다. 적합한 링커는 예를 들어, 문헌[Ducry *et al.*, Bioconjugate Chem. **2010**, *21*, 5-13], 문헌[King and Wagner, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 825-839], 문헌[Gordon *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 2198-2215], 문헌[Tsuchikama and An (DOI: 10.1007/s13238-016-0323-0)], 문헌[Polakis (DOI: 10.1124/pr.114.009373)], 문헌[Bargh *et al.* (DOI: 10.1039/c8cs00676h)], 국제 특허 출원 공개 제WO 2011/133039호, 국제 특허 출원 공개 제WO 2015/177360호 및 국제 특허 출원 공개 제WO 2018/069375호에 기재되어 있다. 링커는 절단 가능하거나 절단 불가능할 수 있다. 절단 가능한 링커는 예를 들어, 리소좀 프로테아제에 노출되거나 산성 pH 또는 더 높은 환원 전위를 가진 환경에 노출될 때 절단될 수 있는 모이어티를 포함한다. 적합한 절단 가능한 링커는 당분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 디펩티드, 트리펩티드 또는 테트라펩티드, 즉 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 잔기로 구성된 펩티드를 포함한다. 추가로, 절단 가능한 링커는 자가희생 모이어티, 예컨대, ω-아미노 아미노카르보닐 고리화 스페이서(문헌[Saari *et al.*, *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 97-101] 참조) 또는 -NH-CH_2-O- 모이어티를 포함할 수 있다. 링커의 절단은 ADC의 약물 모이어티를 주변 환경에서 사용될 수 있게 만든다. 절단 불가능한 링커는 예를 들어, 접합된 폴리펩티드가 리소좀에서 분해될 때 ADC로부터 약물 모이어티(의 유도체)를 여전히 효과적으로 방출할 수 있다. 절단 불가능한 링커는 예를 들어, 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸(사이클로헥산)-1-카르복실레이트 및 말레이미도카프로산 및 이의 유사체를 포함한다.

[0065] 절단 가능한 링커 또는 절단 불가능한 링커는 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 바람직하게는, 링커는 시스테인 잔기의 티올 기, 전형적으로 말레이미드 또는 할로아세틸 기와 반응할 수 있는 화학 기를 가진다. 보다 바람직하게는, 링커는 절단 가능한 링커이다.

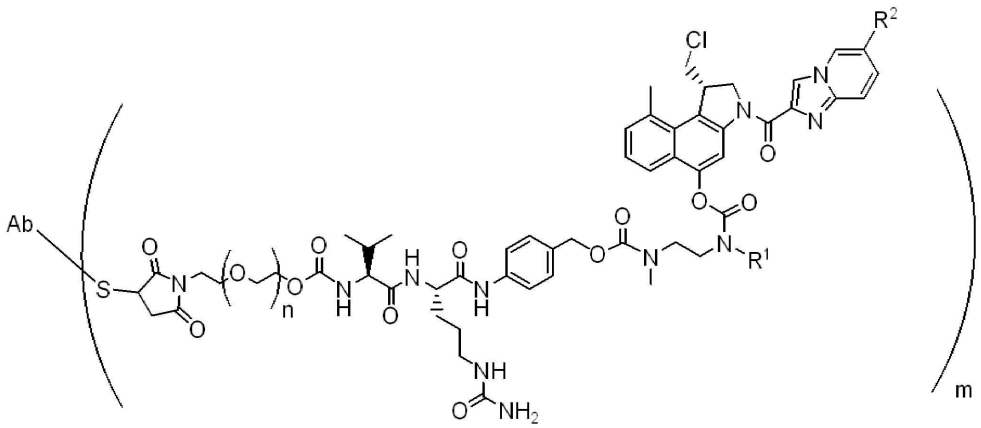
[0066] 본 발명과 관련하여, 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편에 접합된 세포독성 약물은 암 치료에 적합하다. 적합한 세포독성 약물의 예는 듀오카마이신(duocarmycin), 칼리케아미신(calicheamicin), 피롤로벤조디아제핀(pyrrolobenzodiazepine)(PBD) 이량체, 메이탄시노이드(maytansinoid)(예를 들어, DM1 또는 DM4) 및 아우리스타틴(auristatin)(예를 들어, MMAE 또는 MMAF) 유도체를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 바람직하게는, 세포독성 약물은 듀오카마이신 유도체이다.

[0067] 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 종의 배양 브로쓰로부터 처음 단리된 듀오카마이신은 듀오카마이신 A, 듀오카마이신 SA 및 CC-1065를 포함하는 항종양 항생제 계열의 구성원이다. 이러한 극도로 강력한 작용제는 마이너 그루브(groove)에 있는 아데닌의 N3 위치에서 DNA를 서열 선택적으로 알킬화하는 능력으로부터 그의 생물학적 활성을 유도하는 것으로 알려져 있으며, 이것은 아폽토시스 세포 사멸 기작으로 종결되는 일련의 사건을 시작한다.

[0068] 국제 특허 출원 공개 제WO 2011/133039호는 CC-1065의 듀오카마이신 유도체를 포함하는 일련의 링커-약물을 개시한다. 본 발명에 따라 사용되기에 적합한 링커-듀오카마이신 유도체는 제182면 내지 제197면에 개시되어 있다. 다수의 이들 링커-약물의 화학적 합성은 국제 특허 출원 공개 제WO 2011/133039호의 실시예 1 내지 12에 기재되어 있다.

[0069] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 링커-약물이 항체 또는 항원 결합 단편의 시스테인 잔기를 통해 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편에 접합되어 있는 ADC에 관한 것이다.

[0070] 한 실시양태에서, 본 발명은 화학식 (I)의 ADC에 관한 것이다:

[0071] 

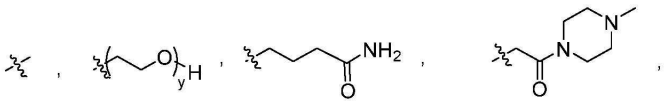
(I),

[0072] 상기 식에서,

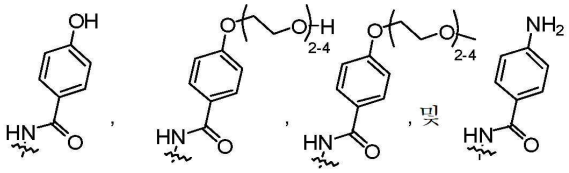
[0073] Ab는 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편이고;

[0074] n은 0 내지 3의 정수이고;

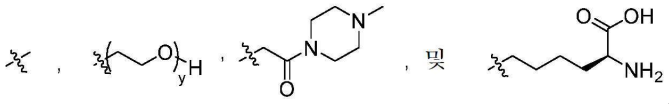
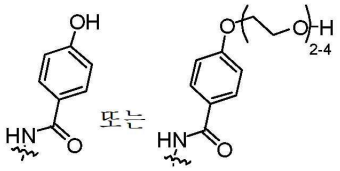
[0075] m은 1 내지 6의 평균 DAR을 나타내고;

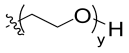
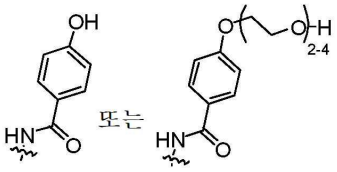
[0076] R^1은  로 구성된 군으로부터 선택되고;

[0077] y는 1 내지 16의 정수이고;

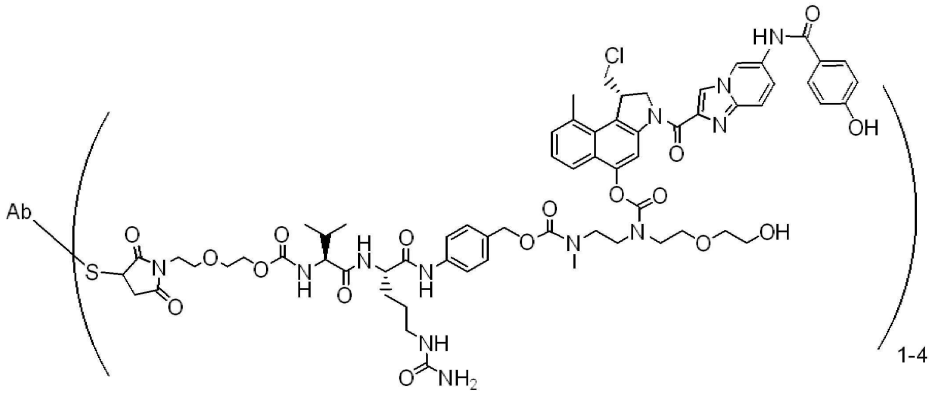
[0078] R^2는  로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0079] 본 명세서에 제시된 구조식에서, n은 0 내지 3의 정수를 나타내는 반면, m은 1 내지 6의 평균 약물-대-항체 비(DAR)를 나타낸다. 당분야에 잘 알려져 있는 바와 같이, DAR 및 약물 부하 분포는 예를 들어, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 또는 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)를 이용함으로써 측정될 수 있다. HIC는 평균 DAR을 결정하는 데 특히 적합하다.

[0080] 특정 실시양태에서, 본 발명은 상기 개시된 바와 같은 화학식 (I)의 ADC에 관한 것으로, 이때 n은 0 또는 1이고, m은 1 내지 6, 바람직하게는 1 내지 4, 보다 바람직하게는 1 내지 2, 가장 바람직하게는 1.5 내지 2의 평균 DAR을 나타내고, R^1은  로 구성된 군으로부터 선택되고; y는 1 내지 16, 바람직하게는 1 내지 4의 정수이고; R^2는  이다.

[0081] 특정 실시양태에서, 본 발명은 상기 개시된 바와 같은 화학식 (I)의 ADC에 관한 것으로, 이때 n은 0 또는 1이고, m은 1.5 내지 2의 평균 DAR을 나타내고, R^1은  이고; y는 1 내지 4이고; R^2는  이다.

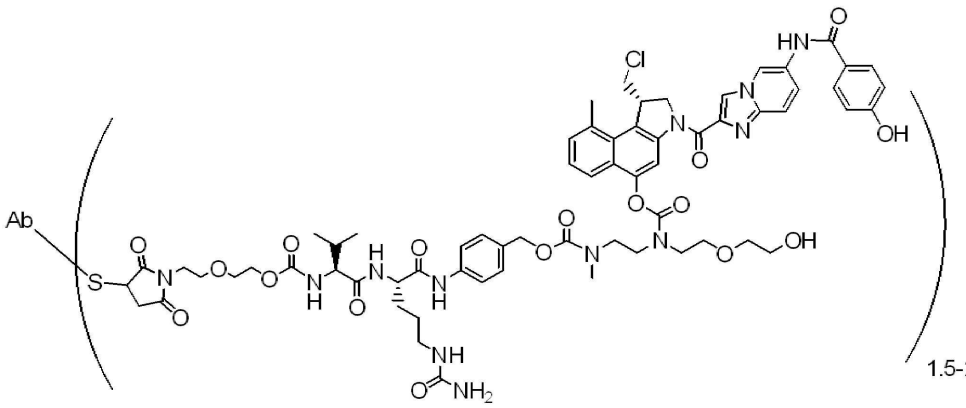
[0082] 바람직한 실시양태에서, ADC는 화학식 (II)의 화합물이다:



[0083] (II),

[0084] 상기 식에서, Ab는 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편이고, 1-4는 화합물에 대한 평균 DAR을 나타낸다.

[0085] 특히 바람직한 실시양태에서, ADC는 화학식 (III)의 화합물이다:



[0086] (III),

[0087] 상기 식에서, Ab는 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편이고, 1.5-2는 화합물에 대한 평균 DAR을 나타낸다.

[0088] 본 발명의 ADC는 야생형일 수 있거나 부위 특이적일 수 있고, 아래에 예시된 바와 같이 당분야에 공지된 임의의 방법에 의해 생성될 수 있다.

[0089] 야생형 ADC는 바람직하게는 활성화된 에스테르와 같은 아민 반응성 기를 포함하는 링커-약물을 사용하여, 예를 들어, 항체의 라이신 ε-아미노 기를 통해 링커-약물을 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 접합시킴으로써 생성될 수 있고; 활성화된 에스테르와 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 접촉은 ADC를 생성할 것이다. 대안적으로, 야생형 ADC는 당분야에 공지된 방법 및 조건을 사용하여 쇄간 디설파이드 결합의 환원을 통해 생성된 시스테인의 측쇄의 유리 티올을 통해 링커-약물을 접합시킴으로써 생성될 수 있다(예를 들어, 문헌[Doronina *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 2006, *17*, 114-124] 참조). 제조 과정은 용매 노출된 쇄간 디설파이드를 부분적으로 환원시킨 후, 마이클 수용자 함유 링커-약물, 예컨대, 말레이미드 함유 링커-약물, 알파-할로아세트산 아미드 또는 에스테르를 사용하여 생성된 티올을 변형시키는 단계를 포함한다. 시스테인 부착 전략은 환원된 디설파이드당 최대 2개의 링커-약물을 생성한다. 대부분의 인간 IgG 분자들은 4개의 용매 노출된 디설파이드 결합을 가지므로, 항체당 0개 내지 8개 링커-약물의 정수 범위가 가능하다. 항체당 링커-약물의 정확한 수는 디설파이드 환원의 정도 및 후속 접합 반응에 사용된 링커-약물의 몰 당량 수에 의해 결정된다. 4개의 디설파이드 결합 모두의 완전한 환원은 항체당 8개의 링커-약물을 가진 균질한 구축물을 제공하는 반면, 부분적 환원은 전형적으로 항체당 0개, 2개, 4개, 6개 또는 8개의 링커-약물을 가진 불균질한 혼합물을 생성한다.

[0090] 부위 특이적 ADC는 바람직하게는 돌연변이된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 적합한 위치에서 조작된 시스테인 잔기의 측쇄를 통해 링커-약물을 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 접합시킴으로써 생성된다. 조작된 시스테인은 일반적으로 시스테인 또는 글루타티온과 같은 다른 티올에 의해 캡핑되어 디설파이드를 형성한다. 이러한 캡핑된 잔기는 링커-약물 부착이 일어나기 전에 언캡핑될 필요가 있다. 링커-약물과 조작된 잔기의 부착은 (1) 천연 쇄간 디설파이드 및 돌연변이체 디설파이드 둘 다를 환원시킨 다음, $CuSO_4$ 또는 데하이드로아스코르브산과 같은 약한 산화제를 사용하여 천연 쇄간 시스테인을 재산화한 후, 언캡핑된 조작된 시스테인과 링커-약물의 표

준 접합을 수행함으로써 달성되거나, (2) 쇄간 디설파이드 결합보다 더 높은 속도로 돌연변이체 디설파이드를 환원시키는 약한 환원제를 사용한 다음, 언캡핑된 조작된 시스테인과 링커-약물의 표준 접합을 수행함으로써 달성된다. 최적 조건 하에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편당 2개의 링커-약물(즉, 약물-대-항체 비인 DAR은 2임)이 부착될 것이다(하나의 시스테인이 mAb 또는 단편의 HC 또는 LC 내로 조작되는 경우). 링커-약물을 부위 특이적으로 접합시키는 적합한 방법은 예를 들어, 환원 및 재산화 과정이 기재되어 있는 국제 특허 출원 공개 제WO 2015/177360호, 약한 환원제를 사용하는 방법이 기재되어 있는 국제 특허 출원 공개 제WO 2017/137628호, 및 환원된 쇄간 시스테인 및 언캡핑된 조작된 시스테인 둘 다를 접합시키는 방법이 기재되어 있는 국제 특허 출원 공개 제WO 2018/215427호에서 발견될 수 있다.

[0091] 본 발명에 따르면, 용어 "조작된 시스테인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 비-시스테인 아미노산을 시스테인으로 대체하는 것을 의미한다. 당업자에게 알려져 있는 바와 같이, 이것은 예를 들어, 부위 지정 돌연변이유발을 이용함으로써 아미노산 수준 또는 DNA 수준에서 수행될 수 있다.

[0092] 한 실시양태에서, 본 발명은 링커-약물이 중쇄 또는 경쇄 가변 또는 불변 영역에 도입된 조작된 시스테인 잔기를 통해 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편에 부위 특이적으로 접합되어 있는 ADC에 관한 것이다.

[0093] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 링커-약물이 HC 가변 영역 위치 40, 41 및 89(카바트 넘버링에 따름) 및 LC 가변 영역 위치 40 및 41(카바트 넘버링에 따름)로부터 선택된, 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편의 하나 이상의 위치에서 조작된 시스테인을 통해 상기 항체 또는 항원 결합 단편에 부위 특이적으로 접합되어 있는 ADC에 관한 것이다. 바람직하게는, 상기 조작된 시스테인은 HC 위치 41 또는 LC 위치 40 또는 41, 보다 바람직하게는 HC 위치 41에 있다.

[0094] 특정 실시양태에서, Ab의 HC 가변 영역은 서열번호 16의 아미노산 서열로 표시되고, Ab의 LC 가변 영역은 서열번호 20의 아미노산 서열로 표시된다. 바람직하게는, ADC는 화학식 (III)의 ADC이다. 보다 바람직하게는, 세포독성 약물은 링커를 통해 HC 위치 41(카바트 넘버링에 따름)의 조작된 시스테인을 통해 Ab에 부위 특이적으로 접합된다. 훨씬 더 바람직하게는 Ab는 IgG1 항체이다. 가장 바람직하게는, Ab는 κ(카파) 경쇄를 가진 IgG1 항체이다.

[0095] 서열번호 16으로 표시되는 HC 가변 영역 및 서열번호 20으로 표시되는 LC 가변 영역을 포함하는 ADC는 많은 상이한 정상 조직들에서의 c-Met의 발현을 고려할 때 사이노몰구스 원숭이에서 현저히 유리한 독성 프로파일을 보였는데, 이때 vc-seco-DUBA 약물은 HC 위치 41의 조작된 시스테인을 통해 부위 특이적으로 접합된다. 이러한 광범위한 발현에도 불구하고, 이 ADC의 내약성은 놀라울 정도로 높다. ADC에 대한 최고 비심각 독성 용량(HNSTD)은 15 mg/kg/Q3주인 것으로 추정된다.

[0096] **약학 조성물**

[0097] 본 발명은 또한 전술된 항-c-Met 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 항-c-Met ADC, 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. mAb, 단편 및 (단일클론) ADC와 같은 치료 단백질의 전형적인 약학 제제는 정맥내 주입 전에 (수성) 용해(즉, 재구성)를 필요로 하는 동결건조된 케이크(동결건조된 분말), 또는 사용 전에 해동을 필요로 하는 냉동된 (수성) 용액의 형태를 취한다.

[0098] 전형적으로, 약학 조성물은 동결건조된 케이크의 형태로 제공된다. (동결건조 전에) 본 발명에 따른 약학 조성물에 포함시키기에 적합한 약학적으로 허용되는 부형제는 완충제 용액(예를 들어, 물 중에 염을 함유하는 구연산염, 히스티딘 또는 석신산염), 동결보호제(예를 들어, 수크로스, 트레할로스), 등장성 변형제(예를 들어, 염화나트륨), 계면활성제(예를 들어, 폴리소르베이트) 및 증량제(예를 들어, 만니톨, 글리신)를 포함한다. 동결건조된 단백질 제제에 사용되는 부형제는 동결건조 과정 및 보관 동안 단백질 변성을 방지하는 그의 능력으로 인해 선택된다. 예를 들어, Kadcyla™(Roche)의 멸균 동결건조된 분말 일회용 제제는 정균 또는 멸균 주사용수(BWFI 또는 SWFI)로 재구성할 때 20 mg/㎖ 아도-트라스투주맙 엠탄신(ado-trastuzumab emtansine), 0.02% w/v 폴리소르베이트 20, 10 mM 석신산나트륨, 및 5.0의 pH를 가진 6% w/v 수크로스를 함유한다.

[0099] **의학적 용도**

[0100] 추가 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한, 바람직하게는 암 치료에 사용하기 위한 전술된 항-c-Met 항체 또는 이의 항원 결합 단편, ADC 또는 약학 조성물을 제공한다.

[0101] 본 발명과 관련하여, 암은 바람직하게는 c-Met를 발현하는 종양이다. 이러한 종양은 c-Met 양성 고형 종양 또는 *MET* 유발 혈액 악성 종양일 수 있다. 상기 정의된 바와 같이 본 발명에 따라 치료될 수 있는 고형 종양 또는 혈

액 악성 종양의 예는 유방암; 뇌암(예를 들어, 다형성 교모세포종(GBM) 또는 수모세포종); 두경부암; 갑상선암; 타액선암(예를 들어, 이하선암); 부신암(예를 들어, 신경모세포종, 부신경절종 또는 크롬친화세포종); 골암(예를 들어, 골육종); 연조직 육종(STS); 안암(예를 들어, 포도막 흑색종); 식도암; 위암(GC); 소장암; 대장암(CRC); 요로상피 세포암(예를 들어, 방광암, 음경암, 요관암 또는 신장암); 난소암; 자궁암(예를 들어, 자궁내막암); 질암, 외음부암 및 자궁경부암; 폐암(특히 비-소세포 폐암(NSCLC) 및 소세포 폐암(SCLC)); 흑색종; 중피종(특히 악성 흉막 및 복부 중피종); 간암(예를 들어, 간세포 암종(HCC)); 췌장암; 피부암(예를 들어, 기저종, 편평 세포 암종, 또는 융기성 피부섬유육종); 고환암; 전립선암; 생식세포암; 원인불명의 원발성 암(CUP); 및 림프성(예를 들어, 성숙 T 및 NK 신생물) 또는 골수성 악성 종양(다발성 골수종)을 포함할 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다.

[0102] 한 실시양태에서, 본 발명은 c-Met 양성 인간 고형 종양 또는 *MET* 유발 혈액 악성 종양, 바람직하게는 c-Met 양성 인간 고형 종양의 치료에 사용하기 위한 전술된 항-c-Met 항체 또는 이의 항원 결합 단편, ADC 또는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0103] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 유방암; 뇌암; 두경부암; 갑상선암; 타액선암; 연조직 육종(STS); 안암; 식도암; 위암(GC); 소장암; 대장암(CRC); 요로상피세포암(UCC); 난소암; 자궁암; 자궁내막암; 자궁경부암; 폐암(특히 비-소세포 폐암(NSCLC) 및 소세포 폐암(SCLC)); 흑색종; 간암; 췌장암; 비-흑색종 피부암; 전립선암; 생식세포암; 및 원인불명의 원발성 암(CUP)으로 구성된 군으로부터 선택된 c-Met 양성 인간 고형 종양의 치료에 사용하기 위한 전술된 항-c-Met 항체 또는 이의 항원 결합 단편, ADC 또는 약학 조성물, 특히 듀오카마이신 유도체 링커-약물을 포함하는 ADC에 관한 것이다.

[0104] 보다 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 유방암; 다형성 교모세포종(GBM); 수모세포종; 두경부암; 유두상 갑상선암; 타액선암; 연조직 육종(STS); 포도막 흑색종; 식도암; 위암(GC); 소장암; 대장암(CRC); 요로상피세포암(UCC); 방광암; 요로암; 음경암; 유두상 신장세포암(PRCC); 투명 세포 신장세포암(CCRCC); 비-투명 세포 신장세포암; 신모세포종; 난소암; 자궁암; 자궁내막암; 자궁경부암; 비-소세포 폐암(NSCLC); 소세포 폐암(SCLC); 흑색종; 간세포 암종(HCC); 췌장암; 비-흑색종 피부암; 전립선암; 생식세포암; 및 원인불명의 원발성 암(CUP)으로 구성된 군으로부터 선택된 c-Met 양성 인간 고형 종양의 치료에 사용하기 위한 전술된 항-c-Met 항체 또는 이의 항원 결합 단편, ADC 또는 약학 조성물, 특히 듀오카마이신 유도체 링커-약물을 포함하는 ADC에 관한 것이다.

[0105] 추가 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 *MET* 유발 인간 혈액 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 전술된 항-c-Met 항체 또는 이의 항원 결합 단편, ADC 또는 약학 조성물, 특히 듀오카마이신 유도체 링커-약물을 포함하는 ADC에 관한 것으로, 이때 *MET* 유발 혈액 악성 종양은 림프성 또는 골수성 악성 종양, 보다 바람직하게는 성숙 T 및 NK 신생물 또는 다발성 골수종이다.

[0106] 전술된 항-c-Met 항체 또는 이의 항원 결합 단편, ADC 또는 약학 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 의약의 제조에 사용하기 위한 것일 수 있다. 전술된 항-c-Met 항체 또는 이의 항원 결합 단편, ADC 또는 약학 조성물은 바람직하게는 치료 방법을 위한 것이고, 이때 항-c-Met 항체 또는 이의 항원 결합 단편, ADC 또는 약학 조성물은 대상체, 바람직하게는 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량으로 투여된다. 따라서, 대안적으로 또는 임의의 다른 실시양태와 함께, 한 실시양태에서, 본 발명은 암 치료용 의약의 제조를 위한 전술된 항-c-Met 항체 또는 이의 항원 결합 단편, ADC 또는 약학 조성물의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따라 치료될 예시적인 비제한적 암에 대해서는 상기 설명을 참조한다.

[0107] 대안적으로, 또는 임의의 다른 실시양태와 함께, 한 실시양태에서, 본 발명은 암 치료 방법에 관한 것으로, 이 방법은 치료 유효량의 전술된 항-c-Met 항체 또는 이의 항원 결합 단편, ADC 또는 약학 조성물을 상기 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명에 따라 치료될 예시적인 비제한적 암에 대해서는 상기 설명을 참조한다.

[0108] 전술된 항-c-Met 항체 또는 이의 항원 결합 단편, ADC 또는 약학 조성물은 대상체에게 투여하기 위한 것이다. 전술된 항-c-Met 항체 또는 이의 항원 결합 단편, ADC 또는 약학 조성물은 유효량의 조성물을, 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여함으로써 전술된 치료 방법에 사용될 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "대상체"는 포유동물로서 분류되는 모든 동물들을 지칭하며, 영장류 및 인간을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 대상체는 바람직하게는 인간이다. "치료 유효량"이라는 표현은 원하는 반응을 달성하거나 증상 또는 징후를 호전시키기에 충분한 양을 의미한다. 특정 대상체를 위한 치료 유효량은 치료되는 질병, 대상체의 전반적인 건강, 투여 방법, 경로 및 용량, 및 부작용의 중증도와 같은 요인에 따라 달라질 수 있다.

[0109] 본 발명은 또한 전술된 항-c-Met 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 항-c-Met ADC 또는 약학 조성물과 하나 이상의 다른 치료제의 순차적으로 또는 동시적으로 투여되는 조합의 용도에 관한 것이다.

[0110] 적합한 화학요법제는 알킬화제, 예컨대, 질소 머스타드, 하이드록시우레아, 니트로소우레아, 테트라진(예를 들어, 테모졸로마이드) 및 아지리딘(예를 들어, 미토마이신); DNA 손상 반응을 방해하는 약물, 예컨대, PARP 억제제, ATR 및 ATM 억제제, CHK1 및 CHK2 억제제, DNA-PK 억제제 및 WEE1 억제제; 항대사물질, 예컨대, 항폴레이트(예를 들어, 페메트렉세드), 플루오로피리미딘(예를 들어, 젬시타빈), 데옥시뉴클레오사이드 유사체 및 티오퓨린; 항마이크로튜불제, 예컨대, 빈카 알칼로이드 및 탁산; 토포이소머라제 I 및 II 억제제; 세포독성 항생제, 예컨대, 안트라사이클린 및 블레오마이신; 저메틸화제, 예컨대, 데시타빈 및 아자시티딘; 히스톤 데아세틸라제 억제제; 올-트랜스 레티노산; 및 삼산화비소를 포함한다. 적합한 방사선 치료제는 방사성 동위원소, 예컨대, ^{131}I 메타요오도벤질구아니딘(MIBG), 인산나트륨으로서 ^{32}P, ^{223}Ra 염화물, ^{89}Sr 염화물 및 ^{153}Sm 디아민 테트라메틸렌 포스포네이트(EDTMP)를 포함한다. 호르몬 치료제로서 사용하기에 적합한 작용제는 호르몬 합성의 억제제, 예컨대, 아로마타제 억제제 및 GnRH 유사체; 호르몬 수용체 길항제, 예컨대, 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(예를 들어, 타목시펜 및 풀베스트란트) 및 항안드로겐, 예컨대, 비칼루타마이드, 엔잘루타마이드 및 플루타마이드; CYP17A1 억제제, 예컨대, 아비라테론; 및 소마토스타틴 유사체를 포함한다.

[0111] 표적화 치료제는 종양발생 및 증식에 관여하는 특정 단백질을 방해하는 치료제이며 소분자 약물; 단백질, 예컨대, 치료 항체; 펩티드 및 펩티드 유도체; 또는 단백질-소분자 하이브리드, 예컨대, ADC일 수 있다. 표적화 소분자 약물의 예는 mTor 억제제, 예컨대, 에버롤리무스(everolimus), 템시롤리무스(temsirolimus) 및 라파마이신(rapamycin); 키나제 억제제, 예컨대, 이마티닙(imatinib), 다사티닙(dasatinib) 및 닐로티닙(nilotinib); VEGF 억제제, 예컨대, 소라페닙(sorafenib) 및 레고라페닙(regorafenib); EGFR/HER2 억제제, 예컨대, 제피티닙(gefitinib), 라파티닙(lapatinib) 및 에를로티닙(erlotinib); 및 CDK4/6 억제제, 예컨대, 팔보시클립(palbociclib), 리보시클립(ribociclib) 및 아베마시클립(abemaciclib)을 포함한다. 펩티드 또는 펩티드 유도체 표적화 치료제의 예는 프로테아좀 억제제, 예컨대, 보르테조밉(bortezomib) 및 카르필조밉(carfilzomib)을 포함한다.

[0112] 적합한 소염성 약물은 D-페니실라민(penicillamine), 아자티오프린(azathioprine) 및 6-머캅토퓨린(mercaptopurine), 사이클로스포린(cyclosporine), 항-TNF 생물제제(예를 들어, 인플릭시맙(infliximab), 에타네르셉트(etanercept), 아달리무맙(adalimumab), 골리무맙(golimumab), 세르톨리주맙(certolizumab) 또는 세르톨리주맙 페골(certolizumab pegol)), 렌플루노마이드(lenflunomide), 아바타셉트(abatacept), 토실리주맙(tocilizumab), 아나킨라(anakinra), 우스테키누맙(ustekinumab), 리툭시맙(rituximab), 다라투무맙(daratumumab), 오파투무맙(ofatumumab), 오비누투주맙(obinutuzumab), 세쿠키누맙(secukinumab), 아프레밀라스트(apremilast), 아세트레틴(acetretin) 및 JAK 억제제(예를 들어, 토파시티닙(tofacitinib), 바리시티닙(baricitinib) 또는 우파다시티닙(upadacitinib))를 포함한다.

[0113] 면역치료제는 면역 반응을 유도하거나, 향상시키거나 억제하는 작용제, 예컨대, 사이토카인(IL-2 및 IFN-α); 면역 조절 이미드 약물, 예를 들어, 탈리도마이드(thalidomide), 레날리도마이드(lenalidomide), 포말리도마이드(pomalidomide) 또는 이미퀴모드(imiquimod); 치료 암 백신, 예를 들어, 탈리모겐 라헤르파레프벡(talimogene laherparepvec); 세포 기반 면역치료제, 예를 들어, 수지상 세포 백신, 입양 T 세포 또는 키메라 항원 수용체 변형 T 세포; 및 세포의 막 결합 리간드에 결합할 때 그의 Fc 영역을 통해 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC), 항체 의존적 세포 식균작용(ADCP) 또는 보체 의존적 세포독성(CDC)을 유발할 수 있는 치료 항체를 포함한다.

[0114] 한 실시양태에서, 본 발명은 전술된 인간 고형 종양 또는 혈액 악성 종양의 치료를 위한 전술된 항-c-Met 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 항-c-Met ADC 또는 약학 조성물과 c-Met 항원 이외의 암 관련 표적에 대한 치료 항체, 화학요법제 및/또는 ADC의 순차적으로 또는 동시적으로 투여되는 조합의 용도에 관한 것이다.

[0115] 본 발명에 따른 항-c-Met 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 ADC의 치료 유효량은 약 0.01 내지 약 15 mg/kg 체중의 범위, 특히 약 0.1 내지 약 10 mg/kg 체중의 범위, 보다 구체적으로 약 0.3 내지 약 10 mg/kg 체중의 범위 내에 있다. 이 후자 범위는 대략 20 내지 800 mg 범위 내의 항체 또는 ADC의 균일 용량에 상응한다. 본 발명의 화합물은 매주, 격주, 3주마다, 매월 또는 6주마다 투여될 수 있다. 적합한 치료 용법은 질환의 중증도, 환자의 연령, 투여되는 화합물, 및 치료 의사에 의해 고려될 다른 요인에 의해 좌우된다.

[0116] 본 발명과 관련하여, 치료는 바람직하게는 암의 예방, 회복, 완치, 호전 및/또는 지연이다. 이것은 암의 적어도

하나의 증상의 중증도가 감소되었고/되었거나 암과 연관된 적어도 하나의 파라미터가 개선되었음을 의미할 수 있다.

[0117] **일반 정의**

[0118] 본 명세서 및 이의 청구범위에서, 동사 "포함하는" 및 이의 활용형은 단어 뒤의 항목이 포함되지만 구체적으로 언급되지 않은 항목도 배제되지 않음을 의미하기 위해 그의 비제한적 의미로 사용된다. 또한, 부정관사 "하나" 또는 "한"에 의한 요소의 언급은 문맥상 요소들 중 하나만이 있을 것이 요구되지 않는 한, 요소들 중 하나 초과의 요소가 존재할 가능성을 배제하지 않는다. 따라서, 부정관사 "하나" 또는 "한"은 일반적으로 "적어도 하나"를 의미한다.

[0119] 수치 값(예를 들어, 약 10)과 관련하여 사용될 때 단어 "약" 또는 "대략"은 바람직하게는 값이 값의 1% 더 많거나 더 적은 주어진 값일 수 있음을 의미한다.

[0120] 본 명세서에 인용된 모든 특허 및 참고문헌은 전체적으로 본원에 참고로 포함된다.

[0121] 다음 실시예는 단지 예시 목적으로만 제공되고, 어떤 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0122] **실시예**

[0123] **ADC의 특징규명을 위한 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)**

[0124] 분석 HIC를 위해, 5 내지 10 ㎕의 샘플(1 mg/㎖)을 TSKgel 부틸-NPR 컬럼(4.6 mm ID x 3.5 cm L, Tosoh Bioscience, 카탈로그 번호 14947)에 주입하였다. 용출 방법은 20분에 걸쳐 0.4 ㎖/분의 속도로 100% 완충제 A(25 mM 인산나트륨, 1.5 M 황산암모늄, pH 6.95)부터 100% 완충제 B(25 mM 인산나트륨, pH 6.95, 20% 이소프로판올)까지 선형 구배로 구성되었다. PDA 검출기와 Empower 소프트웨어를 갖춘 Waters Acquity H-Class UPLC 시스템을 이용하였다. 214 nm에서 흡광도를 측정하였고, ADC의 체류 시간을 측정하였다.

[0125] **ADC의 특징규명을 위한 크기 배제 크로마토그래피(SEC)**

[0126] 분석 SEC를 위해, 5 ㎕의 샘플(1 mg/㎖)을 TSKgel SWXL Guard 컬럼(7 ㎛, 6.0 mm ID x 4.0 cm L, Tosoh Bioscience, 카탈로그 번호 08543)을 갖춘 TSKgel G3000SWXL 컬럼(5 ㎛, 7.8 mm ID x 30 cm L, Tosoh Bioscience, 카탈로그 번호 08541)에 주입하였다. 용출 방법은 30분 동안 0.6 ㎖/분의 속도로 100% 50 mM 인산나트륨, 300 mM NaCl, pH 7.5로 용출하는 것으로 구성되었다. 컬럼 온도를 25℃로 유지하였다. PDA 검출기와 Empower 소프트웨어를 갖춘 Waters Acquity H-Class UPLC 시스템을 이용하였다. HMW 종의 양을 정량하기 위해 214 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0127] **예방접종 프로토콜 및 선택**

[0128] 마우스를 재조합 인간 HGFR/c-Met ECD-Fc 융합 단백질로 반복적으로 예방접종하였다. B 세포를 비장으로부터 채취하고 57개의 하이브리도마를 생성하는 데 사용하였다. 이러한 하이브리도마는 B 세포와 뮤린 골수종 세포(수탁번호 CVCL_J288)를 사용하여 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 매개 세포 융합을 수행하고 HAT 배지(하이포잔틴-아미노프테린-티미딘 배지)를 사용하는 선택 과정을 적용함으로써 만들어졌다. 고정된 c-Met-Fc를 사용한 Luminex 비드 어세이를 이용하여 불멸화된 항체 분비 하이브리도마 세포 배양물의 상청액을 IgG 생성, 항체 이소타입 및 HGFR/c-Met에의 특이적 결합에 대해 분석하였다.

[0129] **기능성 마우스 항체에 대한 스크리닝**

[0130] 항체의 부재 또는 존재 하에서 간세포 성장 인자(HGF)에 의한 HepG2 세포의 자극을 분석함으로써 항체의 기능성을 확인하였다. 면역블롯 분석에서, HGF에 의해 유도된 c-Met 및 단백질 키나제 B(PKB) 인산화를 길항하고 HepG2 유세포분석에서 양성을 띠는 항체를 확인할 수 있었다. 이들의 중성 또는 길항 성질을 기반으로, 초기 57개의 하이브리도마들 중 11개만을 선택하고 시퀀싱하였다. 하나의 아고니스트 하이브리도마를 선택하고 시퀀싱하여 양성 대조군으로서 사용하였다. 흔하지 않고 잠재적으로 불안정하며 저수준으로 발현되는 항체 쇄 서열을 피하기 위해 아미노산 서열들 중 일부를 생식계열과 더 유사한 서열로 돌연변이시켰다. 코돈 최적화 전에, VL 도메인의 플랭킹 영역 내의 하나 이상의 아미노산 잔기를 국제 ImMunoGeneTics(IMGT) 데이터베이스(Scaviner *et al.*, *Exp. Clin.* Immunogenetics **1999**, *16.4*, 234-240)로부터 알려진 생식계열 서열의 아미노산 잔기로 교체하였다. 생식계열화로서도 지칭되는, 생식계열 서열로의 이 역돌연변이 과정을 각각 프레임워크 1 또는 J 분절의 일부인 VL 도메인 서열의 일부, 즉 마우스 IGKV-FR1 또는 IGKJ에 적용하였다. 11개의 중쇄 가변 도메인(VH)과

13개의 경쇄 가변 도메인(VL)을 수득하였다.

[0131] 아미노산 서열을 기반으로, 상응하는 DNA 코딩 서열을 인간 세포에서 발현되도록 코돈 최적화하고, 합성하고, IgG1 서브클래스의 인간 항체 불변 부분을 코딩하는 DNA 서열(HC 서열번호 22, LC 서열번호 23)에 융합시켰다. Expi293F 세포에서 발현되는 항체 서열 코딩 플라스미드를 사용한 형질전이유전자 발현으로 14개의 키메라 항체의 배치를 제조하였다. 단백질 A 친화성 정제를 이용하여 세포 상청액으로부터 항체를 정제하였다.

[0132] 키메라 항체를 전체 길이 세포 표면 발현된 인간 및 사이노몰구스(cyno) c-Met에 대한 친화성에 대해 시험하였다. 이를 위해, 전체 길이 인간 및 cyno c-Met 수용체를 코딩하는 플라스미드 벡터를 사용하여 ExpiCHO-S 세포를 일시적으로 형질감염시키고 항체 결합 연구에 사용하기 전에 제조업체의 설명서에 따라 배양하였다. 인간 CMV 프로모터 뒤에 전체 길이 인간 또는 cyno c-Met 항원 코딩 서열(각각 수탁번호 P08581(서열번호 24) 및 A0A2K5UM05(서열번호 25)에 따름)을 함유하는 상업적으로 입수 가능한 포유동물 발현 벡터 pcDNA3.4(Thermo Fisher Scientific)를 표준 플라스미드 골격으로서 사용하였다.

[0133] **인간화**

[0134] 인간화 항체를 CDR 이식으로 제조하였다. 넘버링 시스템 IMGT(Lefranc and Marie-Paule. *Immunologist* 1999, *7.4*, 132-136) 및 카바트의 CDR 정의를 이용하여 2개의 길항 클론과 3개의 중성 클론의 CDR을 확인하였다. BLAST 검색 알고리즘을 이용하여 마우스 VH 도메인을 사용하여 인간 IgG 서열의 온라인 공개 데이터베이스를 검색하고 후보 인간 가변 도메인을 확인하였다. 프레임워크 상동성, 핵심 프레임워크 잔기의 유지, 정규 루프 구조 및 면역원성과 같은 기준을 기반으로 각각의 가변 도메인에 대해 5개의 후보를 선택하였다. 항체의 VL 도메인에 대해 동일한 절차를 반복하였다. 모든 인간화 VH 변이체를 모든 인간화 VL 변이체와 조합하여, 각각의 항체에 대해 25개의 인간화 변이체, 즉 총 125개의 인간화 변이체를 생성하였다.

[0135] 중쇄 41C(HC-41C) 돌연변이를 포함하는 인간화 변이체를 아래 절차에 따라 합성하였고 인간 또는 cyno c-Met를 발현하는 ExpiCHO-S 세포를 사용하여 인간 및 cyno c-Met에 대한 이들의 친화성을 측정하였다.

[0136] **항체 및 c-Met 항원의 형질전이유전자 발현**

[0137] a) cDNA 구축물 및 발현 벡터의 제조

[0138] 마우스 아미노산 서열의 중쇄 가변 도메인(VH)을 각각 N-말단에서 HAVT20 리더 서열(서열번호 21)에 연결하고 C-말단에서 서열번호 22에 따른 인간 IgG1 HC의 불변 도메인에 연결하였다. 생성된 키메라 아미노산 서열을 cDNA 서열로 역번역하고 인간 세포(호모 사피엔스)에서 발현되도록 코돈 최적화하였다.

[0139] 유사하게, 적합한 분비 신호의 서열(또한 HAVT20 리더 서열), 마우스 아미노산 서열의 경쇄 가변 도메인(VL) 및 인간 IgG κ 경쇄 불변 영역(서열번호 23)을 연결하고 수득된 아미노산 서열을, 인간 세포(호모 사피엔스)에서 발현되도록 코돈 최적화된 cDNA 서열로 역번역함으로써, 경쇄(LC) 구축물에 대한 키메라 cDNA 서열을 수득하였다.

[0140] 유사한 절차를 이용하여 HC-41C 돌연변이를 가진 인간화 변이체의 LC 및 HC를 코딩하는 cDNA 서열을 수득하였다. HC 및 LC 서열을 N-말단에서 HAVT20 리더 서열(서열번호 21)에 연결하고 C-말단에서 서열번호 22에 따른 인간 IgG1 HC의 불변 영역 또는 인간 IgG κ 경쇄 불변 영역(서열번호 23)에 연결하였다.

[0141] b) 벡터 구축 및 클로닝 전략

[0142] 항체 쇄 및 c-Met 항원의 발현을 위해, CMV:BGHpA 발현 카세트를 함유하는 상업적으로 입수 가능한(Thermo Fisher Scientific) 포유동물 발현 벡터 pcDNA3.4를 사용하였다. 제한 부위 AscI 및 NheI를 사용하여 HC, LC 또는 항원에 대한 cDNA를 pcDNA3.4 벡터에 라이게이션시켰다. HC, LC 또는 c-Met 발현 카세트를 함유하는 최종 벡터(각각 CMV:HC:BGHpA 및 CMV:LC-BGHpA)를 대장균 NEB 5-알파 세포의 형질전환에 사용하였다. Maxiprep 또는 Megaprep 키트(Qiagen)를 사용하여 형질감염을 위한 최종 발현 벡터의 대규모 제조를 수행하였다.

[0143] c) 포유동물 세포에서 항체의 일시적인 발현

[0144] 다음과 같이 제조업체의 설명서에 따라 ExpiFectamine 형질감염제를 사용하여 발현 벡터로 상업적으로 입수 가능한 Expi293F 세포(Thermo Fisher Scientific)를 형질감염시켰다: $75x10^7$개의 세포를 300 mℓ FortiCHO 배지에 시딩하고, 300 ㎍의 발현 벡터를 800 ㎕의 ExpiFectamine 형질감염제와 조합하고 세포에 첨가하였다. 형질감염 1일 후, 1.5 mℓ 증강제(Enhancer) 1 및 15 mℓ 증강제 2를 배양물에 첨가하였다. 형질감염 6일 후, 15분 동안 4,000g에서 원심분리하고 PES 병 필터/MF 75 필터(Nalgene)를 통해 정화된 수거물을 여과함으로써 세포 배양 상

청액을 수거하였다.

[0145] d) 포유동물 세포에서 c-Met의 일시적인 발현

[0146] 다음과 같이 제조업체의 설명서에 따라 ExpiFectamineCHO 형질감염제를 사용하여 발현 벡터로 상업적으로 입수 가능한 ExpiCHO-S 세포(Thermo Fisher Scientific)를 형질감염시켰다: $1.2x10^9$개의 세포를 200 ㎖ ExpiCHO 발현 배지에 시딩하고, 200 ㎍의 발현 벡터를 640 ㎕의 ExpiFectamineCHO 형질감염제와 조합하고 세포에 첨가하였다. 형질감염 1일 후, 세포 배양물을 용량 의존적 세포 결합 분석에 사용하였다.

[0147] **세포 결합 실험**

[0148] 키메라 항체

[0149] 14개의 야생형 키메라 및 14개의 HC-41C 키메라 항-c-Met 항체의 세포 결합을 인간 c-Met 양성 종양 세포주 MKN45, NCI-H596 및 PC-3, 붉은털원숭이 c-Met 양성 종양 세포주 4MBr-5, 및 인간 c-Met 음성 종양 세포주 MDA-MB-175-VII에서 연구하였다. 어세이할 때 약 90%의 전면생장률에서 세포를 사용하고 5분 내지 10분 동안 트립신-베르센(Trypsin-Versene)(EDTA)(Lonza)으로 탈착시키고 세척하고 빙냉 FACS 완충제(PBS 1x, 0.1% v/w BSA, 0.02% v/v 나트륨 아지드(NaN_3))에서 $1x10^6$개 세포/㎖의 농도로 조절하였다. 표면 항원의 조절 및 내재화를 방지하기 위해 4℃에서 빙냉 시약/용액을 사용하여 96웰 환저 마이크로타이터 플레이트에서 염색을 수행하였다. 100,000개 세포/웰을 96웰 플레이트에 첨가하고(100 ㎕/웰) 3분 동안 300xg에서 원심분리하였다. HGF와 사전인큐베이션하는 경우(오로지 측분비 세포주), 세포를 FACS 완충제에 50 ng/㎖ 재조합 인간 HGF로 재현탁하고(50 ㎕/웰) 4℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 150 ㎕ FACS 완충제로 2회 세척하였다. 상청액을 버리고 세포를 50 ㎕의 각각의 항체로 30분 동안 염색하였다. 빙냉 FACS 완충제로 연속 희석액을 만들었다. 세포를 3분 동안 300xg에서 원심분리하여 2회 세척하고 6000배 희석된 2차 $F(ab')_2$ 염소 항-인간 IgG(Fc 단편 특이적) 항체 접합된 APC(Jackson ImmunoResearch) 50 ㎕에 재현탁하였다. 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 세포를 다시 2회 세척하고 FACS 분석을 위해 150 ㎕의 빙냉 FACS 완충제에 재현탁하였다. 데이터 분석을 위해, 중앙 형광 강도(MFI) 값을 수득하였다.

[0150] 모든 키메라 항체들은 시험된 세포주에서 인간 c-Met에의 우수한 결합을 보여주었다. 또한 5개의 키메라 항체만이 4MBr-5 세포주에서 붉은털원숭이 c-Met에의 우수한 결합을 보여주었다. 예상된 바와 같이, 야생형 키메라 항체와 이의 HC-41C 대응물 사이에 결합 성질의 차이는 없었다. c-Met 음성 세포주에서는 어떤 항체도 결합을 보여주지 않았는데, 이는 모든 항체들이 c-Met 수용체를 특이적으로 인식한다는 것을 시사한다. 인간 및 붉은털원숭이 c-Met 둘 다에 대한 이들의 높은 친화성을 기반으로, 추가 개발을 위해 3개의 야생형 키메라 항체들 및 이들의 상응하는 HC-41C 키메라 항체를 선택하였다(표 1 참조). 측분비 세포주에서, HGF는 6개의 선택된 키메라 항체들의 EC_{50} 값의 변동을 야기하였는데, 이는 HGF가 이 항체들의 결합과 경쟁한다는 것을 시사한다. 2개의 선택되지 않은 키메라 항체들 및 이들의 HC-41C 대응물의 경우에는 이 효과가 관찰되지 않았다.

표 1

야생형(wt) 및 HC-41C(41C) 키메라 항체의 VH 및 VL

항체	VH 서열번호	VL 서열번호	기능성
wt-chi-mAb1	1	2	부분적 아고니스트
41C-chi-mAb1	7	2	부분적 아고니스트
wt-chi-mAb2	3	4	부분적 아고니스트
41C-chi-mAb2	8	4	부분적 아고니스트
wt-chi-mAb3	5	6	중성
41C-chi-mAb3	9	6	중성

[0151]

표 2

3 개의 선택된 하이브리도마의 특성

하이브리도마	서브클래스	K_D(pM)	기능성	유세포분석
Hyb1	IgG1	< 10	길항제	양성
Hyb2	IgG1	< 10	길항제	양성
Hyb3	IgG1	< 10	중성	양성

[0152]

[0153] 그러나, 하이브리도마 Hyb1 및 Hyb2는 원래 (시험관내에서) 시험되었고 길항제로서 분류되었지만(표 2), 상응하는 키메라 항체 wt/41C-chi-mAb1 및 wt/41C-chi-mAb2는 시험관내에서(NCI-H596 세포에서의 증식 자극 실험에서) 부분적 아고니스트인 것으로 평가되었다. 이러한 관점에서 볼 때, 3개의 wt/41C 키메라 mAb 모두를 인간화하고 추가 실험에서 연구하였지만, wt/41C-chi-mAb3은 암 적응증의 치료를 위한 ADC로 추가 개발하기에 가장 바람직한 키메라 항-c-Met 항체이다.

[0154] 인간화 항체

[0155] 총 75개의 인간화 항-c-Met 항체(3개의 선택된 키메라 항체로부터 유래)의 세포 결합을 인간 c-Met 양성 종양 세포주 MKN45, NCI-H596 및 PC-3, 붉은털원숭이 c-Met 양성 종양 세포주 4MBr-5, 및 인간 c-Met 음성 종양 세포주 MDA-MB-175-VII에서 연구하였다. 어세이할 때 약 90%의 전면생장률에서 세포를 사용하고 5분 내지 10분 동안 트립신-베르센(EDTA)(Lonza)으로 탈착시키고 세척하고 빙냉 FACS 완충제(PBS 1x, 0.1% v/w BSA, 0.02% v/v 나트륨 아지드(NaN_3))에서 $1x10^6$개 세포/㎖의 농도로 조절하였다. 표면 항원의 조절 및 내재화를 방지하기 위해 4℃에서 빙냉 시약/용액을 사용하여 96웰 환저 마이크로타이터 플레이트에서 염색을 수행하였다. 100,000개 세포/웰을 96웰 플레이트에 첨가하고(100 ㎕/웰) 3분 동안 300xg에서 원심분리하였다. HGF와 사전인큐베이션하는 경우, 세포를 FACS 완충제에 50 ng/㎖ 재조합 인간 HGF로 재현탁하고(50 ㎕/웰) 4℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 150 ㎕ FACS 완충제로 2회 세척하였다. 상청액을 버리고 세포를 50 ㎕의 각각의 항체로 30분 동안 염색하였다. 빙냉 FACS 완충제로 연속 희석액을 만들었다. 세포를 3분 동안 300xg에서 원심분리하여 2회 세척하고 6000배 희석된 2차 $F(ab')_2$ 염소 항-인간 IgG(Fc 단편 특이적) 항체 접합된 APC(Jackson ImmunoResearch) 50 ㎕에 재현탁하였다. 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 세포를 다시 2회 세척하고 FACS 분석을 위해 150 ㎕의 빙냉 FACS 완충제에 재현탁하였다. 데이터 분석을 위해, 중앙 형광 강도(MFI) 값을 수득하였다.

[0156] 인간화 항체들 중 어느 항체도 c-Met 음성 세포주에서 결합을 보여주지 않았다. wt/41C-chi-mAb2 및 wt/41C-chi-mAb3으로부터 유래한 모든 인간화 항체들은 시험된 세포주에서 인간 및 붉은털원숭이 c-Met 둘 다에의 우수한 결합을 보여준 반면, wt/41C-chi-mAb1로부터 유래한 25개의 인간화 항체들 중 5개의 항체들만이 우수한 결합을 보여주었다. wt/41C-chi-mAb2로부터 유래한 인간화 항체의 우수한 결합 성질에도 불구하고, HIC에 의해 측정된 바와 같이 25개의 인간화 항체들 중 20개의 항체들의 소수성이 현저히 증가되었다. (동물 모델에서) 항체를 포함하는 소수성 생물학적 화합물이 많을수록 이들이 순환계로부터 더 빨리 제거되기 때문에, 이러한 소수성의 증가는 원치 않는 효과이다. wt/41C-chi-mAb1로부터 유래한 25개의 인간화 항체들 중 14개의 항체들에 대해서도 유사한 관찰이 이루어졌다. wt/41C-chi-mAb3의 인간화는 결합 성질 또는 소수성에 영향을 미치는 것으로 보이지 않았다.

[0157] 아래 표 4는 추가 개발을 위해 선택된 9개의 HC-41C 인간화 항체들(표 3)에 대한 세포 결합 EC_{50} 값을 보여준다. 측분비 세포주에서 표 4에 나타낸 바와 같이, 그리고 키메라 항체에 대한 결과에 따라, HGF는 인간화 항체의 EC_{50} 값의 변동을 야기하였고, 이는 HGF가 이 항체들의 결합과 경쟁한다는 것을 시사한다.

[0158] 인간 c-Met 항원 발현 MKN45, NCI-H596 및 PC-3 세포, 및 붉은털원숭이 c-Met 항원 발현 4MBr-5 세포에서 측정된 인간화 mAb1a(키메라 항체 wt/41C-chi-mAb1로부터 유래)의 세포 결합(EC_{50})은 각각 0.16 ㎍/㎖(95% CI: 0.12 내지 0.21 ㎍/㎖), 0.04 ㎍/㎖(95% CI: 0.006 내지 0.225 ㎍/㎖), 0.08 ㎍/㎖(95% CI: 0.02 내지 0.25 ㎍/㎖) 및 0.07 ㎍/㎖(95% CI: 0.05 내지 0.09 ㎍/㎖)이었다. HGF 결합은 측분비 세포주에서 세포 결합의 1.1배 내지 2.5배 변동을 야기하였다.

[0159] 인간 c-Met 항원 발현 MKN45, NCI-H596 및 PC-3 세포, 및 붉은털원숭이 c-Met 항원 발현 4MBr-5 세포에서 측정

된 인간화 mAb2a, mAb2b 및 mAb2c(키메라 항체 wt/41C-chi-mAb2로부터 유래)의 세포 결합(EC_{50})은 각각 0.09 내지 0.14 ㎍/㎖, 0.02 내지 0.04 ㎍/㎖, 0.03 내지 0.05 ㎍/㎖ 및 0.06 내지 0.09 ㎍/㎖이었다. HGF 결합은 측분비 세포주에서 세포 결합의 1.2배 내지 4.0배 변동을 야기하였다.

[0160] 인간 c-Met 항원 발현 MKN45, NCI-H596 및 PC-3 세포, 및 붉은털원숭이 c-Met 항원 발현 4MBr-5 세포에서 측정된 인간화 mAb3a, mAb3b, mAb3c, mAb3d 및 mAb3e(키메라 항체 wt/41C-chi-mAb3으로부터 유래)의 세포 결합(EC_{50})은 각각 0.05 내지 0.07 ㎍/㎖, 0.02 내지 0.03 ㎍/㎖, 0.03 내지 0.03 ㎍/㎖ 및 0.02 내지 0.04 ㎍/㎖이었다. HGF 결합은 측분비 세포주에서 세포 결합의 0.8배 내지 7.5배 변동을 야기하였다.

표 3

HC-41C 인간화 항체의 VH 및 VL

[0161]

항체	VH 서열번호	VL 서열번호
mAb1a	10	11
mAb2a	12	15
mAb2b	13	14
mAb2c	13	15
mAb3a	16	19
mAb3b	16	20
mAb3c	16	18
mAb3d	17	19
mAb3e	17	18

표 4

인간 및 붉은털원숭이 c-Met ECD 에 대한 인간화 HC-41C 키메라 항체의 결합 친화성

[0162]

항체	EC_{50} (㎍/㎖)	95% CI (㎍/㎖)*	EC_{50} (㎍/㎖)	95% CI (㎍/㎖)*	배수 변동 (HGF)
	HGF 부재		50 ng/㎖ HGF 존재		
MKN45(항시적 활성 세포주)					
mAb1a	0.16	0.12 내지 0.21			
mAb2a	0.09	0.07 내지 0.13			
mAb2b	0.14	0.11 내지 0.18			
mAb2c	0.11	0.08 내지 0.13			
mAb3a	0.07	0.06 내지 0.10			
mAb3b	0.06	0.05 내지 0.09			
mAb3c	0.05	0.04 내지 0.07			

항체	EC_{50} (μg/mℓ)	95% CI (μg/mℓ)*	EC_{50} (μg/mℓ)	95% CI (μg/mℓ)*	배수 변동 (HGF)
	HGF 부재		50 ng/mℓ HGF 존재		
mAb3d	0.07	0.05 내지 0.10			
mAb3e	0.07	0.05 내지 0.10			
NCI-H596(측분비 세포주)					
mAb1a	0.04	0.006 내지 0.225	0.10	0.08 내지 0.12	2.5
mAb2a	0.02	0.004 내지 0.113	0.08	0.07 내지 0.11	4.0
mAb2b	0.04	0.008 내지 0.204	0.11	0.09 내지 0.13	2.8
mAb2c	0.03	0.006 내지 0.171	0.10	0.08 내지 0.12	3.3
mAb3a	0.02	0.003 내지 0.101	0.08	0.05 내지 0.11	4.0
mAb3b	0.02	0.003 내지 0.108	0.07	0.04 내지 0.1	3.5
mAb3c	0.02	0.004 내지 0.081	0.11	0.08 내지 0.15	5.5
mAb3d	0.02	0.004 내지 0.128	0.15	0.11 내지 0.21	7.5
mAb3e	0.02	0.003 내지 0.153	0.14	0.1 내지 0.19	7.0
PC-3(측분비 세포주)					
mAb1a	0.08	0.02 내지 0.25	0.15	0.13 내지 0.18	1.9
mAb2a	0.04	0.01 내지 0.17	0.09	0.08 내지 0.11	2.3
mAb2b	0.05	0.01 내지 0.21	0.13	0.1 내지 0.16	2.6
mAb2c	0.03	0.01 내지 0.15	0.09	0.07 내지 0.12	3.1
mAb3a	0.03	0.01 내지 0.10	0.07	0.06 내지 0.09	2.4
mAb3b	0.03	0.01 내지 0.11	0.06	0.04 내지 0.09	2.0
mAb3c	0.03	0.01 내지 0.10	0.06	0.04 내지 0.08	1.9
mAb3d	0.03	0.01 내지 0.12	0.08	0.05 내지 0.12	2.7
mAb3e	0.03	0.01 내지 0.14	0.09	0.05 내지 0.14	2.8
4MBr-5(측분비 세포주)					
mAb1a	0.07	0.05 내지 0.09	0.08	0.07 내지 0.09	1.1
mAb2a	0.06	0.05 내지 0.09	0.09	0.08 내지 0.1	1.4
mAb2b	0.09	0.06 내지 0.14	0.15	0.14 내지 0.17	1.7
mAb2c	0.07	0.05 내지 0.1	0.09	0.07 내지 0.1	1.2
mAb3a	0.04	0.02 내지 0.06	0.03	0.03 내지 0.04	0.8
mAb3b	0.02	0.01 내지 0.04	0.04	0.03 내지 0.04	1.8
mAb3c	0.02	0.01 내지 0.04	0.03	0.03 내지 0.04	1.7
mAb3d	0.03	0.02 내지 0.06	0.05	0.04 내지 0.06	1.6
mAb3e	0.03	0.02 내지 0.05	0.04	0.03 내지 0.05	1.4

*N=2

[0163]

[0164] 인간 및 사이노몰구스 c-Met 세포외 도메인(ECD)에 대한 비접합 항체 mAb3b의 관찰된 결합 친화성(K_D-obs)은 표 5에 제시되어 있다. 낮은 K_D-obs(0.01 nM)는 인간 또는 cyno c-Met ECD와 항체 사이의 높은 친화성을 표시한다.

[0165] 37℃에서 표면 플라즈몬 공명 기기(Biacore© T200 시스템, GE Life Sciences)에서 결합 분석을 수행하였다. 2 μℓ/분의 속도로 300초 동안 바이오틴 포획 시약을 유동 셀 1 및 2에 주입함으로써, 바이오티닐화된 인간 또는 cyno c-Met를 바이오티닐화된 분자의 포획에 적합하도록 제작된 CAP칩(센서 칩 CAP, GE Life Sciences)의 표면에 포획하였다. 런닝 완충제(150 mM NaCl, 3 mM EDTA 및 0.005% v/v 폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우레이트(계면활성제 P20)를 함유하는 25℃ 및 pH 7.4의 10 mM HEPES 완충제) 중의 바이오티닐화된 c-Met 항원의 희석액을 가변적 접촉 시간에서 5 μℓ/분으로 주입하여 다양한 포획 수준을 수득하였다. c-Met 변이체에 대한 희석 및 접촉 시간은 약 20 RU의 포획 수준을 목표로 추정되었다. 1분 기준시점 후, 900초 해리 시간으로 60초 동안 5가지 증가하는 농도(0.037, 0.11, 0.33, 1 및 3 nM)에서 mAb3b 샘플을 주입하였다. 상호작용에 대한 R_{max}는 5 내지 10 RU이었다. 6 M 구아니딘-HCl, 0.25 M NaOH 용액(30 μℓ/분의 유속으로 120초)을 사용하여 재생을 수행하였다. 수득된 센서그램에 대해 이중 블랭크 차감을 수행하여, 블랭크 기준 유동 채널 및 런닝 완충제 주입의 신호를 차감하였다. Biacore© T200 평가 소프트웨어(v3.1)를 이용하여 센서그램을 만들었다. 센서그램을 1:1 Langmuir 결합 모델에 피팅한 후, 적합도(chi2), 적합 고유성(U-값), 및 육안 검사 및 생물학적 관련성에 대해 평가하였다.

표 5

인간 및 사이노몰구스 c-Met ECD 에 대한 mAb3b 의 결합 친화성

[0166]

수용체	mAb3b K_D-obs(nM)
인간 c-Met ECD	< 0.01
Cyno c-Met ECD	< 0.01

[0167] **내재화 연구**

[0168] 인간 c-Met 양성 종양 세포주 MKN45, NCI-H441 및 PC-3에서 mAb3b의 내재화를 연구하였다. 세포(96웰 환저 마이크로타이터 플레이트의 웰당 100,000개 세포)를 50 ㎕ 10 ㎍/㎖ mAb3b 또는 적절한 비-결합 대조군 항체와 함께 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 10% 열 불활성화된(HI) 태아 소 혈청(FBS)(Gibco) 및 80 U/㎖ 페니실린/스트렙토마이신(Lonza)으로 보충된 RPMI(Lonza)로 구성된 빙냉 완전 생장 배지(CGM)를 사용한 세척 단계 후, 세포를 50 ㎕ Alexa Fluor 488(AF488) 표지부착된 Fab 단편 염소 항-인간 IgG(1:600 희석)(Jackson Immunoresearch)와 함께 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 빙냉 CGM을 사용한 세척 단계 후, 세포를 150 ㎕의 예열된 CGM에 재현탁하고 각각의 시점(0시간, 0.5시간, 1시간, 3시간, 24시간)마다 하나씩 폴리프로필렌 튜브로 옮기고 37℃ 수조에 넣어 내재화를 시작하였다. 표시된 인큐베이션 시간 후, 세포를 0.1% v/w BSA(Sigma) 및 0.02% 나트륨 아지드 용액(Sigma)으로 보충된 1x PBS(Lonza)로 구성된 빙냉 FACS 완충제로 1회 세척하여 내재화를 중단하였다. 4℃에서 10분 동안 50 ㎕의 항-Alexa Fluor 488 토끼 IgG Ab(빙냉 FACS 완충제에 1:30 희석됨)(Molecular Probes, Life Technologies)로 켄칭한 후, 남은 표면 발현을 시각화하였다. 측정 전에 또 다른 100 ㎕의 빙냉 FACS 완충제를 첨가하였다. 동일한 켄칭되지 않은 튜브를 각각의 시점에서 총 형광에 대해 측정하였다. 형광 강도를 유세포분석(BD FACSVerse, 뉴저지주 프랭클린 레이크스)으로 측정하고 중앙 형광 강도(MFI)로서 표시하였다. 기재된 식을 이용하여 내재화의 퍼센트를 계산함으로써 내재화를 정량하였다:

[0169] % 내재화 = $1-(N_1-Q_1)/N_1-(N_1*Q_0/N_0)*100\%$

[0170] N_1 = 각각의 시점에서 켄칭되지 않은 MFI

[0171] Q_1 = 각각의 시점에서 켄칭된 MFI

[0172] Q_0 = 시점 0시간에 대한 켄칭된 MFI

[0173] N_0 = 시점 0시간에 대한 켄칭되지 않은 MFI

[0174] 이 접근법의 한계는 세포 표면에 결합된 AF488 표지부착된 mAb의 불완전한 켄칭이다. 이것은 접합된 AF488 염료의 경우 최대 90% 이하의 AF488 염료의 최대 켄칭이 기재되어 있는 공급업체의 설명서와 일치한다.

[0175] 도 1b에서 MKN45 세포의 경우 표시된 바와 같이, 24시간에서 최대 내재화를 가진 각각의 세포주에서 mAb3b에 대한 효율적인 내재화가 나타났다.

[0176] mAb3b의 내재화의 실시간 모니터링을 MKN45 세포에서 수행하였다. 완전 생장 배지의 세포(18,750개 세포/웰)를 96웰 플레이트에 플레이팅하였다(50 ㎕/웰). 37℃ 및 5% CO_2에서 밤새 인큐베이션한 후, 인간 FabFluor-pH 적색 형광 염료(Sartorius)와 함께 3 ㎍/㎖의 사전표지부착된 mAb3b를 세포에 첨가하였다(총 부피 100 ㎕/웰). IncuCyte S3 기기에서 플레이트를 영상화하고, 48시간 동안 30분마다 10배 대물렌즈로 웰당 2개의 영상으로 상 및 적색 형광을 스캐닝함으로써 내재화의 실시간 생존 세포 분석을 평가하였다. IncuCyte S3 소프트웨어의 세포별(Cell-by-Cell) 부착 모듈을 사용하여 적색 형광 영역과 전체 세포 영역을 차폐하고 카운팅하고, 이들(FabFluor 적색 영역/MKN45 영역)을 시간 대비 그래프로 작도하였다(도 1의 A). FabFluor의 강도는 리소좀으로의 pH 의존적 이동 동안 증가하며, pH 4.7에서 가장 높은 형광이 나타났다.

[0177] **부위 특이적 및 야생형 접합을 위한 프로토콜**

[0178] 부분적으로 환원된 내인성 디설파이드를 통한 접합(야생형(wt) 접합)을 위한 일반 접합 프로토콜

[0179] 항체 용액(4.2 mM 히스티딘, 50 mM 트레할로스 중의 5 내지 10 mg/㎖, pH 6)을 EDTA(물 중의 25 mM, 4% v/v)로 희석하였다. TRIS(물 중의 1 M, pH 8)를 사용하여 pH를 약 7.4로 조절한 후, TCEP(물 중의 10 mM, 항체 및 원하는 DAR에 따라 1 내지 3 당량)를 첨가하고 생성된 혼합물을 1시간 내지 3시간 동안 실온(RT)에서 인큐베이션하였다. 디메틸아세트아미드(DMA)를 첨가한 다음, 링커-약물 용액(DMA 중의 10 mM)을 첨가하였다. DMA의 최종 농도는 5% 내지 10%이었다. 생성된 혼합물을 1시간 내지 16시간 동안 광의 부재 하에서 RT에서 인큐베이션하였다. 과량의 링커-약물을 제거하기 위해, 활성탄을 첨가하고 혼합물을 1시간 동안 RT에서 인큐베이션하였다. 0.2 ㎛ PES 필터를 사용하여 상기 활성탄을 제거하고 Vivaspin 원심분리 농축기(30 kDa 컷오프, PES)를 이용하여 생성된 ADC를 4.2 mM 히스티딘, 50 mM 트레할로스(pH 6)에 제제화하였다. 마지막으로, 0.22 ㎛ PES 필터를 이용하여 ADC 용액을 멸균 여과하였다.

[0180] 일반 부위 특이적 접합 프로토콜

[0181] 프로토콜 A 또는 프로토콜 B에 설명된 절차에 따라 부위 특이적 접합체를 합성하였다.

[0182] 1) 프로토콜 A

[0183] 시스테인 조작된 항체의 용액(4.2 mM 히스티딘, 50 mM 트레할로스 중의 5 내지 10 mg/㎖, pH 6)을 EDTA(물 중의 25 mM, 4% v/v)로 희석하였다. TRIS(물 중의 1 M, pH 8)를 사용하여 pH를 약 7.4로 조절한 후, TCEP(물 중의 10 mM, 20 당량)를 첨가하고 생성된 혼합물을 1시간 내지 3시간 동안 RT에서 인큐베이션하였다. 4.2 mM 히스티딘, 50 mM 트레할로스(pH 6)을 사용하여 PD-10 탈염 컬럼 또는 원심분리 농축기(Vivaspin 필터, 30 kDa 컷오프, PES)로 과량의 TCEP를 제거하였다.

[0184] TRIS(물 중의 1 M, pH 8)를 사용하여 생성된 항체 용액의 pH를 약 7.4로 상승시킨 후, 데하이드로아스코르브산(물 중의 10 mM, 20 당량)을 첨가하고 생성된 혼합물을 1시간 내지 2시간 동안 RT에서 인큐베이션하였다. RT 또는 37℃에서 DMA를 첨가한 다음, 링커-약물 용액(DMA 중의 10 mM)을 첨가하였다. DMA의 최종 농도는 5% 내지 10%이었다. 생성된 혼합물을 1시간 내지 16시간 동안 광의 부재 하에서 RT 또는 37℃에서 인큐베이션하였다. 과량의 링커-약물을 제거하기 위해, 활성탄을 첨가하고 혼합물을 1시간 동안 RT에서 인큐베이션하였다. 0.2 ㎛ PES 필터를 사용하여 상기 활성탄을 제거하고 Vivaspin 원심분리 농축기(30 kDa 컷오프, PES)를 사용하여 생성된 ADC를 4.2 mM 히스티딘, 50 mM 트레할로스(pH 6)에 제제화하였다. 마지막으로, 0.22 ㎛ PES 필터를 이용하여 ADC 용액을 멸균 여과하였다.

[0185] 2) 프로토콜 B

[0186] 시스테인 조작된 항체의 용액(500 ㎕, 15 mM 히스티딘, 50 mM 수크로스, 0.01% 폴리소르베이트-20 중의 40 mg/㎖, pH 6)을 100 mM 히스티딘(pH 5)(1300 ㎕)로 희석하였다. 2-(디페닐포스피노)벤젠설폰산(diPPBS)(426 ㎕, 물 중의 10 mM, 32당량)을 첨가하고 생성된 혼합물을 16시간 내지 24시간 동안 RT에서 인큐베이션하였다. 4.2 mM 히스티딘, 50 mM 트레할로스(pH 6)를 사용하여 원심분리 농축기(Vivaspin 필터, 30 kDa 컷오프, PES)로 과량의 diPPBS를 제거하였다.

[0187] TRIS(물 중의 1 M, pH 8)를 사용하여 생성된 항체 용액의 pH를 약 7.4로 상승시켰다. RT 또는 37℃에서 DMA를 첨가한 다음, 링커-약물 용액(DMA 중의 10 mM)을 첨가하였다. DMA의 최종 농도는 5% 내지 10%이었다. 생성된 혼합물을 1시간 내지 16시간 동안 광의 부재 하에서 RT 또는 37℃에서 인큐베이션하였다. 과량의 링커-약물을 제거하기 위해, 활성탄을 첨가하고 혼합물을 1시간 동안 RT에서 인큐베이션하였다. 0.2 ㎛ PES 필터를 이용하여 상기 활성탄을 제거하고 Vivaspin 원심분리 농축기(30 kDa 컷오프, PES)를 이용하여 생성된 ADC를 4.2 mM 히스티딘, 50 mM 트레할로스(pH 6)에 제제화하였다. 마지막으로, 0.22 ㎛ PES 필터를 이용하여 ADC 용액을 멸균 여과하였다.

[0188] mAb3b에 대한 부위 특이적 접합 프로토콜

[0189] diPPBS(물 중의 10 mM, 16 내지 32 당량)를 mAb3b 용액(100 mM 히스티딘 중의 10 내지 12 mg/㎖, pH 5)에 첨가하고, 생성된 혼합물을 밤새 RT에서 인큐베이션하였다. 4.2 mM 히스티딘, 50 mM 트레할로스(pH 6)를 사용하여 Vivaspin 원심분리 농축기(30 kDa 컷오프, PES)로 과량의 diPPBS를 제거하였다. DMA를 첨가한 다음, 링커-약물 용액(DMA 중의 10 mM)을 첨가하였다. DMA의 최종 농도는 10%이었다. 생성된 혼합물을 광의 부재 하에서 RT에서 밤새 인큐베이션하였다. 과량의 링커-약물을 제거하기 위해, 활성탄을 첨가하고 혼합물을 1시간 동안 RT에서 인큐베이션하였다. 0.2 ㎛ PES 필터를 이용하여 상기 활성탄을 제거하고 Vivaspin 원심분리 농축기(30 kDa 컷오프, PES)를 이용하여 생성된 ADC를 4.2 mM 히스티딘, 50 mM 트레할로스(pH 6)에 제제화하였다. 마지막으로,

0.22 ㎛ PES 필터를 이용하여 ADC 용액을 멸균 여과하였다.

[0190] **ADC의 시험관내 세포독성**

[0191] 접합되지 않은 항체와 ADC는 도 2에서 항체 mAb3b 및 항체-약물 접합체 ADC3b에 대해 표시된 바와 같이 c-Met 발현 MKN45 세포에 대한 동등한 결합 친화성을 가졌다(이중으로 수행된 2회 실험의 평균 ± S.E.M). 따라서, ADC의 항원 결합 성질은 부착된 듀오카마이신 유도체 링커-약물에 의해 영향을 받지 않았다.

[0192] 다양한 수준의 c-Met 발현을 가진 인간 종양 세포주에서 키메라 및 인간화 항-c-Met ADC의 시험관내 세포독성(표 6)을 측정하였다. 완전 생장 배지의 세포를 96웰 플레이트에 플레이팅하고(90 또는 80 ㎕/웰) 다음 세포 밀도로 37℃ 및 5% CO_2에서 인큐베이션하였다: 웰당 2500개 MKN-45, 1000개 PC-3, 2500개 NCI-H596 및 5000개 MDA-MB-175-VII 세포. 하룻밤 인큐베이션 후, 10 ㎕의 ADC 또는 10 ㎕의 ADC 및 10 ㎕의 HGF(500 ng/㎖)를 첨가하였다. 배양 배지로 ADC의 연속 희석액을 만들었다. 제조업체의 설명서에 따라 CellTiter-Glo™(CTG) 발광 어세이 키트(Promega Corporation, 위스콘신주 매디슨)를 사용하여 6일 후에 세포 생존율을 평가하였다. 각각의 ADC 농도에 대해 측정된 발광을 처리되지 않은 세포(생장 배지만)의 평균으로 나누고 100을 곱함으로써 생존율을 계산하였다.

[0193] 결과는 하기 표 7에 제시되어 있다. 예상된 바와 같이, 비-결합 대조군 ADC(리툭시맙-vc-*seco*-DUBA)는 고농도에서만 c-Met 발현 종양 세포의 생장에 영향을 미쳤다. 모든 항-c-Met ADC들은 c-Met 음성 인간 종양 세포주인 MDA-MB-175-VII에 대한 활성을 나타내지 않았다(IC_{50} > 10 nM).

[0194] 다양한 세포주들에서 HC-41C 인간화 항-c-Met ADC의 효능의 유의미한 차이는 없었다. PC-3 세포에서는 세포독성에 대한 HGF(50 ng/㎖)의 영향이 없었다. HGF로 자극한 NCI-H596 세포의 효능은 HGF 자극을 하지 않은 NCI-H596 세포와 동일한 수준에 도달하였다. 따라서, HGF가 없는 세포에 비해 50 ng/㎖ HGF로 자극된 NCI-H596 세포에서 증식이 유도되었다. HGF는 세포독성을 유도하지 않았다.

표 6

HC-41C 키메라 및 인간화 ADC

[0195]

ADC	항체	링커-약물	DAR
ADC1	41C-chi-mAb1	vc-*seco*-DUBA	1.5
ADC1a	mAb1a	vc-*seco*-DUBA	1.7
ADC2	41C-chi-mAb2	vc-*seco*-DUBA	1.7
ADC2a	mAb2a	vc-*seco*-DUBA	1.7
ADC2b	mAb2b	vc-*seco*-DUBA	1.7
ADC2c	mAb2c	vc-*seco*-DUBA	1.7
ADC3	41C-chi-mAb3	vc-*seco*-DUBA	1.1
ADC3a	mAb3a	vc-*seco*-DUBA	1.9
ADC3b	mAb3b	vc-*seco*-DUBA	1.9
ADC3c	mAb3c	vc-*seco*-DUBA	1.8
ADC3d	mAb3d	vc-*seco*-DUBA	1.8
ADC3e	mAb3e	vc-*seco*-DUBA	1.9

표 7

c-Met 를 발현하는 인간 종양 세포에서 키메라 및 인간화 ADC 의 시험관내 세포독성

ADC	MKN-45		PC-3				NCI-H596			
	-HGF		-HGF		+HGF		-HGF		+HGF	
	IC_{50} (nM)	효능 (%)	IC_{50} (nM)	효능 (%)	IC_{50} (nM)	효능 (%)	IC_{50} (nM)	효능 (%)	IC_{50} (nM)	효능 (%)
ADC1	0.73	72	0.069	41	0.185	42	>10	16	0.38	29
ADC1a	0.42	84	0.6[1] 224[2]	78	~1.22	77	>10	14	>10	40
ADC2	0.44	76	0.05 84	69	~10	69	>10	6	>10	32
ADC2a	0.44	86	0.06 40	77	~0.74	76	>10	8	>10	26
ADC2b	0.40	84	0.05 100	77	~2.46	75	>10	10	>10	34
ADC2c	0.41	84	0.08 58	76	~1.97	75	>10	3	>10	32
ADC3	0.77	50	0.076	24	0.224	30	>10	16	1.86	53
ADC3a	0.55	85	0.05 5.77	73	~0.71	72	>10	3	2.14	43
ADC3b	0.38	84	0.05 -	75	~1.01	75	>10	10	1.47	44
ADC3c	0.41	84	0.04 112	73	~1.85	72	>10	10	1.89	44
ADC3d	0.50	82	0.04 54	74	~2.49	73	>10	5	2.17	41
ADC3e	0.46	81	0.04 541	74	~2.86	74	>10	11	2.52	44
비-결합 대조군 ADC	>10	0	>10	36	>10	36	>10	7	>10	18
유리 약물	0.17	97	0.06	97	0.07	97	~4.35	81	0.18	88

* MKN-45 는 세포당 약 150,000 개의 c-Met 수용체를 갖고; PC-3 은 세포당 약 41,000 개의 c-Met 수용체를 갖고; NCI-H596 은 세포당 약 35,000 개의 c-Met 수용체를 가진다.

[1] IC_{50}[1]

[2] IC_{50}[2]

[0196]

[0197] 별도의 실험에서, 다양한 수준의 c-Met 발현을 가진 인간 종양 세포주에서 ADC3b의 시험관내 세포독성을 측정하였다. 완전 생장 배지의 세포를 384웰 플레이트에 플레이팅하고(45 ㎕/웰) 다음 세포 밀도로 37℃ 및 5% CO_2에서 인큐베이션하였다: 웰당 650개 MKN-45, 600개 EBC-1, 250개 PC-3, 400개 KP-4, 2000개 NCI-H441, 2500개 Hep-G2, 4000개 A2780, 1500개 HCC-1954 및 600개 Jurkat NucLight Red 세포. 밤새 인큐베이션한 후, 5 ㎕의 ADC3b를 첨가하였다. 배양 배지로 ADC의 연속 희석액을 만들었다. 제조업체의 설명서에 따라 형광 기반 PrestoBlue® 세포 생존율 시약(Invitrogen, Thermo Fisher science, 미국) 및 형광 기반 CyQUANT® 세포 증식 어세이(Invitrogen, Thermo Fisher science, 미국)를 이용하여 6일 후에 세포 생존율을 평가하였다. 각각의 ADC 농도에 대해 측정된 형광을 처리되지 않은 세포(생장 배지만)의 평균으로 나누고 100을 곱함으로써 생존율을 계산하였다.

[0198] 판독값 둘 다에서, ADC3b는 높은 c-Met 발현, 중간 c-Met 발현 및 낮은 c-Met 발현을 가진 인간 종양 세포주에서 세포독성을 유도하는 것으로 확인되었다(도 3은 CyQUANT® 세포 증식 어세이의 판독값을 보여준다). 도 3에서 세포 생존은 삼중으로 수행된 2회 실험의 평균 ± S.E.M으로서 제시되어 있다. 비-결합 대조군에 대해서는 세포독성이 관찰되지 않았다. c-Met 음성 A2780(세포당 약 35개의 c-Met 항원 결합 부위) 또는 Jurkat NucLight Red 세포(세포당 0개의 c-Met 항원 결합 부위)에서 ADC3b에 대해서는 세포독성이 관찰되지 않았다.

[0199] **ADC의 방관자 세포독성**

[0200] c-Met 양성 MKN45 세포와 1:1 공-배양된 c-Met 음성 Jurkat NucLight Red 세포에서 방관자 세포독성을 측정하였다. 5000개 세포/웰의 각각의 세포 유형(1:1 비)을 폴리-L-오르니틴(0.1 mg/㎖, Sigma)으로 사전코팅된 96웰 플레이트 내의 그들 자신의 배양 배지에 첨가하였다. 37℃ 및 5% CO_2에서 밤새 인큐베이션한 후, 10 ㎕의 1 ㎍/㎖ ADC3b 또는 비-결합 대조군 ADC(리툭시맙-vc-*seco*-DUBA)를 첨가하였다. IncuCyte S3 기기에서 플레이트를 영상화하고 6일 동안 6시간마다 10배 대물렌즈로 웰당 4개의 영상으로 상 및 형광을 스캐닝함으로써, 공-배양된

c-Met 음성 Jurkat NucLight Red 세포의 증식의 생존 세포 분석을 평가하였다.

[0201] ADC3b는 c-Met를 발현하지 않는 이웃 세포에서 방관자 살해 효과를 유도할 수 있다(도 4).

[0202] **생체내 암컷 ces1c KO 마우스의 피하 이종이식편 위 MKN-45 종양 모델에서 키메라 항체-약물 접합체(ADC)의 평가**

[0203] B6.Ces1ctm1.1Loc.Foxn1nu 마우스의 MKN-45(위 선암종) 세포주 이종이식편 모델에서 키메라 항-c-Met ADC의 생체내 효능을 평가하였다. 이 마우스는 Ces1c 유전자의 엑손 5를 결여함으로써, 효소 기능의 상실을 유발한다. *MET* 유전자는 이 세포주에서 증폭되어 있고; 면역조직화학적 염색은 세포 표면에서 c-Met의 높은 발현을 확인시켜주었다.

[0204] 30G 바늘 주사기를 사용하여 200 ㎕ PBS:Matrigel 1:1 중의 $5x10^6$개 MKN-45 종양 세포를 모든 참여 마우스들의 왼쪽 옆구리의 피하 공간에 피하 주사함으로써 종양을 유도하였다. 동물 체중을 매주 3회 측정하였다. 원발성 종양을 캘리퍼로 측정하고 종양 부피를 식 $W^2xL/2$(L= 길이 및 W= 종양의 수직 폭, L>W)에 따라 계산하였다. 원발성 종양이 약 100 mm^3의 부피에 도달한 후, 종양 보유 동물을 종양 부피에 따라 치료군으로 무작위배정하고 당일 또는 다음날 10 mg/kg ADC1(DAR 1.5), ADC2(DAR 1.7) 또는 ADC3(DAR 1.1)의 단일 주사를 투약하였다. 이식 당일 또는 다음날 마우스에게 투약하였다.

[0205] 시험된 3개의 키메라 ADC 모두가 도 5에 나타낸 바와 같이 유의미한 항종양 활성을 보여주었다.

[0206] **생체내 암컷 ces1c KO 마우스의 피하 이종이식편 위 MKN-45 종양 모델에서 인간화 항체-약물 접합체(ADC)의 평가**

[0207] 전술된 바와 동일한 프로토콜을 이용하여 B6.Ces1ctm1.1Loc.Foxn1nu 마우스의 MKN-45(위 선암종) 세포주 이종이식편 모델에서 인간화 항-c-Met ADC의 생체내 효능을 평가하였다.

[0208] 원발성 종양이 약 100 mm^3의 부피에 도달한 후, 종양 보유 동물을 종양 부피에 따라 치료군으로 무작위배정하고 무작위배정 당일 또는 다음날 ADC1로부터 유래한 ADC1a, ADC2로부터 유래한 ADC2a, ADC2b 및 ADC2c, 및 ADC3으로부터 유래한 ADC3a, ADC3b, ADC3c, ADC3d 및 ADC3e의 단일 주사를 투약하였다.

[0209] ADC3에 사용된 키메라 mAb로부터 유래한 인간화 항체에 기반한 ADC는 도 6에 나타낸 바와 같이 가장 높은 항종양 활성을 보여주었다.

[0210] **환자 유래 유방암 이종이식편 모델 MAXF574에서 인간화 항체-약물 접합체(ADC)의 항종양 효능의 평가**

[0211] 3개의 인간화 항-c-Met ADC인 ADC3a, ADC3b 및 ADC3c의 생체내 효능을 B6-Ces1ctm1.1Loc.CB17 $Prkdc^{scid}$ 마우스 품종의 침윤성 유관 유방 암종 MAXF574의 환자 유래 이종이식편 모델에서 평가하였다. 이 마우스는 Ces1c 유전자의 엑손 5를 결여함으로써, 효소 기능의 상실을 유발하였다. *MET* 유전자는 이 종양에서 증폭되어 있지 않고; 면역조직화학적 염색은 세포 표면에서 c-Met의 중간 내지 높은 발현을 확인시켜주었다.

[0212] 누드 마우스에서 연속 계대배양된 이종이식편으로부터 종양 단편을 수득하였다. 종양을 공여자 마우스로부터 제거한 후 단편으로 절단하고(가장자리 길이 3 내지 4 mm) 10% 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 PBS에 넣었다. 수용자 동물은 이소플루란의 흡입에 의해 마취되었고 옆구리에서 피하로 일측 종양 이식편을 받았다. 종양 성장을 매주 2회 모니터링하였다. 디지털 캘리퍼를 사용한 2차원 측정으로 종양 부피를 측정하였다. 종양 부피를 다음 식에 따라 계산하였다: 종양 부피 = $(l \times w^2) \times 0.5$, 이때 l = 종양의 길이 및 w = 종양의 폭(mm). 종양 이식편 부피가 80 내지 250 mm^3의 목표 범위에 근접하였을 때, 필적할만한 중간 군 종양 부피 및 평균 군 종양 부피를 목표로 마우스를 치료군으로 무작위배정하였다. 당일 또는 다음날 3 mg/kg ADC3a, ADC3b 또는 ADC3c의 단일 주사를 마우스에게 투약하였다. 비히클과 비-결합 대조군 ADC를 포함시켰다. 도 7에 나타낸 바와 같이, 비-결합 대조군 ADC는 방관자 활성을 표시하는 일부 항종양 활성을 보여주었다. 상기 3개의 항-c-Met ADC는 추가 표적 매개 항종양 활성을 보여주었다. 평가된 상기 3개의 ADC들 중에서 ADC3b가 가장 높은 항종양 활성을 보여주었다.

[0213] **환자 유래 암 이종이식편 모델 LXFL1176(폐) 및 HNXF1905(두경부)에서 ADC3b를 사용한 용량-반응 연구**

[0214] 2종의 환자 유래 이종이식편 모델에서 용량-반응 연구를 수행하였다: 1) 림프절 전이로부터 유래한 거대 세포

암종인 LXFL1176, 및 2) 안와상 부위로부터의 원발성 편평 세포 암종인 HNXF1905. 전술된 바와 동일한 프로토콜을 이용하여 종양 체외이식편을 B6-Ces1ctm1.1Loc.CB17 Prkdc^{scid} 마우스에 이식하였다. *MET* 유전자는 어느 종양에서도 증폭되어 있지 않고; 면역조직화학적 염색은 LXFL1176 모델에서 세포 표면에서의 높은 c-Met 발현을 확인시켜주었고, HNXF1905 모델에서 중간 c-Met 발현을 확인시켜주었다.

[0215] 무작위화 당일 또는 다음날 0.3, 1, 3 또는 10 mg/kg ADC3b의 단일 주사를 마우스에게 투약하였다. 비히클 및 비-결합 이소타입 대조군 ADC를 포함시켰다. 비-결합 대조군 ADC는 항종양 활성을 거의 또는 전혀 보여주지 않았는데, 이는 이들 모델에서 방관자 활성이 거의 없음을 시사한다. 상기 두 모델에서, 용량 의존적 항종양 활성이 입증되었다. 두경부암 PDX 모델 HNXF1905에서의 ADC3b의 효능은 도 8a에 제시되어 있고, 폐암 PDX 모델 LXFL1176에서의 효능은 도 8b에 제시되어 있다.

[0216] **사이노몰구스 원숭이에서의 생체내 독성 연구**

[0217] ADC3b의 생체내 독성을 수컷 및 암컷 사이노몰구스 원숭이에서 평가하였다. ADC3b(5, 15 또는 25 mg/kg Q3W, 정맥내 주입)를 원숭이(5M + 5F/군)에게 투약하였다.

[0218] ADC3b는 많은 상이한 정상 조직들에서의 c-Met의 발현을 고려할 때 사이노몰구스 원숭이의 4-주기 중추 독성 및 PK 연구에서 현저히 약한 독성 프로파일을 보여주었다. ADC3b와 사이노몰구스 원숭이 및 인간 c-Met의 결합은 필적할만하다(앞서 제시된 바와 같음). 이 정상 조직들에서는 c-Met 인산화가 이 조직들에서 관찰되지 않기 때문에 c-Met가 활성화되지 않는다는 점을 인지해야 한다. 이 광범위한 발현에도 불구하고, ADC3b의 내약성은 놀랍다. ADC3b에 대한 최고 비-심각 독성 용량(HNSTD)은 15 mg/kg/Q3주인 것으로 추정된다. ADC의 독성 효과의 대부분이 표적을 발현하는 (정상) 조직에서 관찰된다는 점을 고려하면(Masson Hinrichs and Dixit, *AAPS J.* **2015**, *17*, 1055-1064), c-Met 표적화 ADC ADC3b의 내약성이 이처럼 높다는 것은 놀랍다.

[0219] **생체내 PKPD 연구**

[0220] 종양 보유 CES1c KO SCID 마우스에서 항-c-Met ADC ADC3b를 사용하여 약동학/약력학 연구를 수행하였다. 이 마우스는 Ces1c 유전자의 엑손 5를 결여하여, 효소 기능의 상실을 유발한다. 사이노몰구스 원숭이에서 ADC3b를 사용한 독성학 연구로부터 추가 약동학 데이터를 수득하였다.

[0221] ADC3b(0.3, 1, 3 또는 10 mg/kg, 정맥내(i.v.) 볼루스 주사)를 마우스에게 투약하고 투약 후 1시간, 48시간, 168시간, 336시간 및 504시간에서 혈장을 채취하였다. ADC3b(5, 15 또는 25 mg/kg, 정맥내 주입)를 원숭이에게 투약하고 1시간, 6시간, 24시간, 48시간, 96시간, 192시간, 360시간 및 504시간에서 혈장을 채취하였다. LC-MS/MS 기반 어세이를 이용하여 총 항체를 정량하고 리간드 결합 어세이를 이용하여 접합된 항체를 정량하였다. 접합된 항체 어세이는 적어도 하나의 링커 약물을 함유하는 ADC 종을 포획한다. 표 8, 9(마우스) 및 10(원숭이)에 제시된 결과는 ADC가 매우 안정하고 긴 반감기로 천천히 제거된다는 것을 보여준다.

표 8

폐 LXFL1176 종양 보유 Ces1c KO 마우스에서 ADC3b 의 약동학

마우스 LXFL1176 이종이식편	용량 (mg/kg)	대략 $t_{1/2}$(시(hr))	C_{max} (㎍/㎖)	AUC_{last} (시*㎍/㎖)
총 항체	0.3	NC	6.24	388
	1	95.5	22.9	1870
	3	192	69.8	7130
	10	NC	222	38500
접합된 항체	0.3	NC	4.96	355
	1	87.5	19.0	1670
	3	NC	57.4	5920
	10	NC	187	33900

[0222] NC: 계산될 수 없음

표 9

두경부 HNXF1905 종양 보유 Ces1c KO 마우스에서 ADC3b 의 약동학

마우스 HNXF1905 이종이식편	용량 (mg/kg)	대략 $t_{1/2}$(시)	C_{max} (㎍/㎖)	AUC_{last} (시*㎍/㎖)
총 항체	0.3	207	3.86	1120
	1	NC	11.4	3250
	3	NC	73.2	11200
	10	NC	181	41500
접합된 항체	0.3	181	4.85	896
	1	221	11.7	2330
	3	NC	46.7	7500
	10	NC	130	32300

[0223] NC: 계산될 수 없음

표 10

사이노몰구스 원숭이에서 ADC3b 의 약동학, 단일 용량

건강한 원숭이	용량 (mg/kg)	대략 $t_{1/2}$(시)	C_{max} (㎍/㎖)	AUC_{last} (시*㎍/㎖)
총 항체	5	82.4 (M) / 79.1 (F)	134 (M) / 141 (F)	14600 (M) / 15000 (F)
	15	166 (M) / 143 (F)	372 (M) / 373 (F)	53800 (M) / 47300 (F)
	25	159 (M) / NR (F)	586 (M) / 554 (F)	84900 (M) / 84500 (F)
접합된 항체	5	73.7 (M) / 73.6 (F)	147 (M) / 155 (F)	13000 (M) / 13700 (F)
	15	143 (M) / 125 (F)	371 (M) / 390 (F)	43100 (M) / 39200 (F)
	25	152 (M) / 172 (F)	676 (M) / 659 (F)	77300 (M) / 78900 (F)

[0224] M: 수컷. F: 암컷. NR: 보고될 수 없음

서열목록

마우스 HCVR 및 LCVR 아미노산 서열에서 밑줄친 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 가진 서열목록

서열번호 1(HCVR)

```
  1    EVQLQQSGPE LLKPGASVKM SCKASGYIFT DYFMNWVKQS HGKSLEWIGR
 51    VNPKNGDITY NQKFRGKATL TVDKSLTTAY MQLNSLTSED SAVYFCAYDG
101    YYDGMDFWGQ GTSVTVSS
```

서열번호 2(LCVR)

```
  1    ENVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCRANSSVS SNFLHWYQQK SGASPKLWIS
 51    STSNLAFGVP PRFSGSGSGT SYSLTISSVE AEDAATYYCH QYSGHPFTFG
101    SGTKLEIK
```

서열번호 3(HCVR)

```
  1    QVQLQQSGAE LVRPGASVKL SCKASGYVFP DYEMHWVKQT PVHGLEWIGA
 51    FDPETGDTTY NQNFKGKATL TADKASSTAY MDLRSLTSGD SAVYYCARDY
101    KYLYYYAMDN WGQGTSVTVS S
```

서열번호 4(LCVR)

```
  1    QIVLTQSPAI MSASLGERVT MTCTASSSIT SSYLHWYQQK PGSSPKLWIY
 51    STTNLASGVP GRFSGSGSGT SFSLTISSME AEDAATYYCH QYRRSPLTFG
101    AGTKLELK
```

서열번호 5(HCVR)

```
  1    QIQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DYYLNWVKQR PGQGLEWIGL
 51    IFPGNDKTEY SEKFKGKATL TVDTSSSTAY IQLSRLSSED SAIYFCSGGD
101    YGGFVYWGQG TLVTVSS
```

서열번호 6(LCVR)

```
  1    DIQMTQSPTS LSASVGETVT ITCGASENIY GALNWYQRKQ GKSPQLLIYG
 51    ATNLADGMSS RFSGSGSGRQ FSLKINSLHP DDVATYFCQN VLSSPLTFGS
101    GTKLEIK
```

[0225]

마우스 HCVR 41C 조작된 아미노산 서열에서 밑줄친 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 가진 서열목록

서열번호 7(HCVR - VH H41C)

```
  1    EVQLQQSGPE LLKPGASVKM SCKASGYIFT DYFMNWVKQS CGKSLEWIGR
 51    VNPKNGDITY NQKFRGKATL TVDKSLTTAY MQLNSLTSED SAVYFCAYDG
101    YYDGMDFWGQ GTSVTVSS
```

서열번호 8(HCVR - VH P41C)

```
  1    QVQLQQSGAE LVRPGASVKL SCKASGYVFP DYEMHWVKQT CVHGLEWIGA
 51    FDPETGDTTY NQNFKGKATL TADKASSTAY MDLRSLTSGD SAVYYCARDY
101    KYLYYYAMDN WGQGTSVTVS S
```

서열번호 9(HCVR - VH P41C)

```
  1    QIQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DYYLNWVKQR CGQGLEWIGL
 51    IFPGNDKTEY SEKFKGKATL TVDTSSSTAY IQLSRLSSED SAIYFCSGGD
101    YGGFVYWGQG TLVTVSS
```

인간화 HCVR 및 LCVR 아미노산 서열에서 밑줄친 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 가진 서열 목록

서열번호 10(HCVR)

```
  1    QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYIFT DYFMNWVRQA CGQGLEWMGR
 51    VNPKNGDITY NQKFRGRVSL TKDTSINTAY MELSGLTSDD TAIYYCAYDG
101    YYDGMDFWGQ GTSVTVSS
```

서열번호 11(LCVR)

```
  1    ELVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRANSSVS SNFLHWYQQK PGKAPKLLIS
 51    STSNLAFGVP SRFSGTGSGT DFSLTISSLQ PEDFAIYYCH QYSGHPFTFG
101    QGTKLEIK
```

서열번호 12(HCVR)

```
  1    QVQLVQSGAE LRKPGSSVKV SCRASGYVFP DYEMHWVRQA CGQGLEWMGA
 51    FDPETGDTTY NQNFKGRVTI AADKSTSTAY MELRSLRSED TAIYYCARDY
101    KYLYYYAMDN WGQGTMVTVS S
```

[0226]

서열번호 13(HCVR)

```
  1    QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVFP DYEMHWVRQA CGQGLEWMGA
 51    FDPETGDTTY NQNFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARDY
101    KYLYYYAMDN WGQGTTVTVS S
```

서열번호 14(LCVR)

```
  1    DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCTASSSIT SSYLHWYQQK PGKAPKLLIY
 51    STTNLASGVP SRFSGSGSGT DFTLTISSLQ PEDFATYYCH QYRRSPLTFG
101    GGTKLEIK
```

서열번호 15(LCVR)

```
  1    EIVLTQSPSL LSASIGDRVT IPCTASSSIT SSYLHWYQQK PGKAPKLLIY
 51    STTNLASGVP SRFSGSGSGT EFTLTISSLQ PEDFATYYCH QYRRSPLTFG
101    GGTKLEIK
```

서열번호 16(HCVR)

```
  1    QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYYLNWVRQA CGQGLEWMGL
 51    IFPGNDKTEY SEKFKGRVTL TTDTSISTAY MELSSLTSDD TALYYCSGGD
101    YGGFVYWGQG TLVTVSS
```

서열번호 17(HCVR)

```
  1    QVQLQESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYYLNWVRQA CGQGLEWMGL
 51    IFPGNDKTEY SEKFKGRVTM TRDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCSGGD
101    YGGFVYWGQG TLVTVSS
```

서열번호 18(LCVR)

```
  1    DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCGASENIY GALNWYQQKP GKAPKLLIYG
 51    ATNLADGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCQN VLSSPLTFGS
101    GTKLEIK
```

서열번호 19(LCVR)

```
  1    DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCGASENIY GALNWYQQKP GKAPKLLIYG
 51    ATNLADGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQN VLSSPLTFGP
101    GTKVDIK
```

[0227]

서열번호 20(LCVR)

```
  1    DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ISCGASENIY GALNWYQQQP GKAPKVLIFG
 51    ATNLADGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQN VLSSPLTFGQ
101    GTKLEIK
```

다른 서열목록

서열번호 21(HAVT20 리더)

```
  1    MACPGFLWAL VISTCLEFSM A
```

서열번호 22(인간 IgG1 항체 HC 불변 영역)

```
  1    ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 51    HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
101    KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
151    HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
201    EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
251    LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
301    QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
```

서열번호 23(인간 IgG 항체 LC κ 불변 영역)

```
  1    RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
 51    NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
101    SFNRGEC
```

서열번호 24(인간 c-Met)

```
  1    MKAPAVLAPG ILVLLFTLVQ RSNGECKEAL AKSEMNVNMK YQLPNFTAET
 51    PIQNVILHEH HIFLGATNYI YVLNEEDLQK VAEYKTGPVL EHPDCFPCQD
101    CSSKANLSGG VWKDNINMAL VVDTYYDDQL ISCGSVNRGT CQRHVFPHNH
151    TADIQSEVHC IFSPQIEEPS QCPDCVVSAL GAKVLSSVKD RFINFFVGNT
201    INSSYFPDHP LHSISVRRLK ETKDGFMFLT DQSYIDVLPE FRDSYPIKYV
251    HAFESNNFIY FLTVQRETLD AQTFHTRIIR FCSINSGLHS YMEMPLECIL
301    TEKRKKRSTK KEVFNILQAA YVSKPGAQLA RQIGASLNDD ILFGVFAQSK
351    PDSAEPMDRS AMCAFPIKYV NDFFNKIVNK NNVRCLQHFY GPNHEHCFNR
401    TLLRNSSGCE ARRDEYRTEF TTALQRVDLF MGQFSEVLLT SISTFIKGDL
451    TIANLGTSEG RFMQVVVSRS GPSTPHVNFL LDSHPVSPEV IVEHTLNQNG
501    YTLVITGKKI TKIPLNGLGC RHFQSCSQCL SAPPFVQCGW CHDKCVRSEE
551    CLSGTWTQQI CLPAIYKVFP NSAPLEGGTR LTICGWDFGF RRNNKFDLKK
601    TRVLLGNESC TLTLSESTMN TLKCTVGPAM NKHFNMSIII SNGHGTTQYS
651    TFSYVDPVIT SISPKYGPMA GGTLLTLTGN YLNSGNSRHI SIGGKTCTLK
```

[0228]

```
 701    SVSNSILECY TPAQTISTEF AVKLKIDLAN RETSIFSYRE DPIVYEIHPT
 751    KSFISGGSTI TGVGKNLNSV SVPRMVINVH EAGRNFTVAC QHRSNSEIIC
 801    CTTPSLQQLN LQLPLKTKAF FMLDGILSKY FDLIYVHNPV FKPFEKPVMI
 851    SMGNENVLEI KGNDIDPEAV KGEVLKVGNK SCENIHLHSE AVLCTVPNDL
 901    LKLNSELNIE WKQAISSTVL GKVIVQPDQN FTGLIAGVVS ISTALLLLLG
 951    FFLWLKKRKQ IKDLGSELVR YDARVHTPHL DRLVSARSVS PTTEMVSNES
1001    VDYRATFPED QFPNSSQNGS CRQVQYPLTD MSPILTSGDS DISSPLLQNT
1051    VHIDLSALNP ELVQAVQHVV IGPSSLIVHF NEVIGRGHFG CVYHGTLLDN
1101    DGKKIHCAVK SLNRITDIGE VSQFLTEGII MKDFSHPNVL SLLGICLRSE
1151    GSPLVVLPYM KHGDLRNFIR NETHNPTVKD LIGFGLQVAK GMKYLASKKF
1201    VHRDLAARNC MLDEKFTVKV ADFGLARDMY DKEYYSVHNK TGAKLPVKWM
1251    ALESLQTQKF TTKSDVWSFG VLLWELMTRG APPYPDVNTF DITVYLLQGR
1301    RLLQPEYCPD PLYEVMLKCW HPKAEMRPSF SELVSRISAI FSTFIGEHYV
1351    HVNATYVNVK CVAPYPSLLS SEDNADDEVD TRPASFWETS
```

서열번호 25(cyno c-Met)

```
   1    MKAPAVLVPG ILVLLFTLVQ RSNGECKEAL AKSEMNVNMK YQLPNFTAET
  51    AIQNVILHEH HIFLGATNYI YVLNEEDLQK VAEYKTGPVL EHPDCFPCQD
 101    CSSKANLSGG VWKDNINMAL VVDTYYDDQL ISCGSVNRGT CQRHVFPHNH
 151    TADIQSEVHC IFSPQIEEPN QCPDCVVSAL GAKVLSSVKD RFINFFVGNT
 201    INSSYFPHHP LHSISVRRLK ETKDGFMFLT DQSYIDVLPE FRDSYPIKYI
 251    HAFESNNFIY FLTVQRETLN AQTFHTRIIR FCSLNSGLHS YMEMPLECIL
 301    TEKRKKRSTK KEVFNILQAA YVSKPGAQLA RQIGASLNDD ILFGVFAQSK
 351    PDSAEPMDRS AMCAFPIKYV NDFFNKIVNK NNVRCLQHFY GPNHEHCFNR
 401    TLLRNSSGCE ARRDEYRAEF TTALQRVDLF MGQFSEVLLT SISTFVKGDL
 451    TIANLGTSEG RFMQVVVSRS GPSTPHVNFL LDSHPVSPEV IVEHPLNQNG
 501    YTLVVTGKKI TKIPLNGLGC RHFQSCSQCL SAPPFVQCGW CHDKCVRSEE
 551    CPSGTWTQQI CLPAIYKVFP TSAPLEGGTR LTICGWDFGF RRNNKFDLKK
 601    TRVLLGNESC TLTLSESTMN TLKCTVGPAM NKHFNMSIII SNGHGTTQYS
 651    TFSYVDPIIT SISPKYGPMA GGTLLTLTGN YLNSGNSRHI SIGGKTCTLK
 701    SVSNSILECY TPAQTISTEF AVKLKIDLAN RETSIFSYRE DPIVYEIHPT
 751    KSFISGGSTI TGVGKNLHSV SVPRMVINVH EAGRNFTVAC QHRSNSEIIC
 801    CTTPSLQQLN LQLPLKTKAF FMLDGILSKY FDLIYVHNPV FKPFEKPVMI
 851    SMGNENVLEI KGNDIDPEAV KGEVLKVGNK SCENIHLHSE AVLCTVPNDL
 901    LKLNSELNIE WKQAISSTVL GKVIVQPDQN FTGLIAGVVS ISIALLLLLG
 951    LFLWLKKRKQ IKDLGSELVR YDARVHTPHL DRLVSARSVS PTTEMVSNES
1001    VDYRATFPED QFPNSSQNGS CRQVQYPLTD MSPILTSGDS DISSPLLQNT
1051    VHIDLSALNP ELVQAVQHVV IGPSSLIVHF NEVIGRGHFG CVYHGTLLDN
1101    DGKKIHCALM SPPLDFLGIT DIGEVSQFLT EGIIMKDFSH PNVLSLLGIC
1151    LRSEGSPLVV LPYMKHGDLR NFIRNETHNP TVKDLIGFGL QVAKGMKYLA
```

[0229]

1201 SKKFVHRDLA ARNCMLDEKF TVKVADFGLA RDMYDKEYYS VHNKTGAKLP
1251 VKWMALESLQ TQKFTTKSDV WSFGVLLWEL MTRGAPPYPD VNTFDITVYL
1301 LQGRRLLQPE YCPDPLYEVM LKCWHPKAEM RPSFSELVSR ISAIFSTFIG
1351 EHYVHVNATY VNVKCVAPYP SLLSSEDNAD DEVDT

서열번호 26(HC CDR1 - 카바트)

1 DYYLN

서열번호 27(HC CDR2 - 카바트)

1 LIFPGNDKTE YSEKFKG

서열번호 28(HC CDR3 - 카바트)

1 GDYGGFVY

서열번호 29 (LC CDR1 - 카바트)

1 GASENIYGAL N

서열번호 30(LC CDR2 - 카바트)

1 GATNLAD

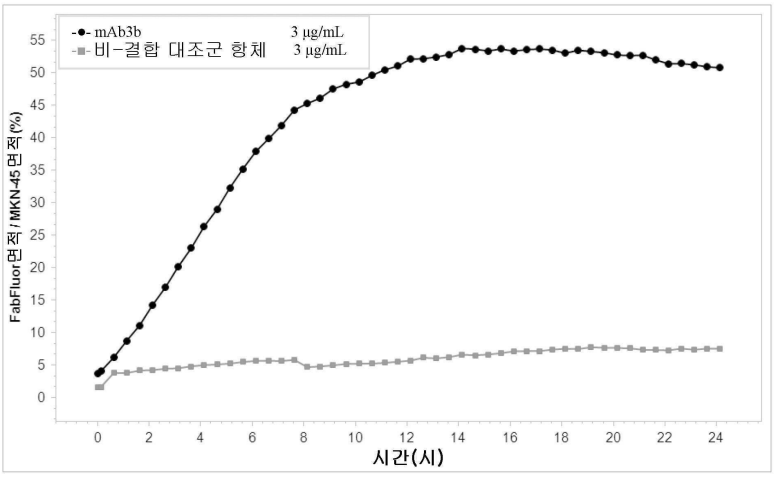
서열번호 31(LC CDR3 - 카바트)

[0230] 1 QNVLSSPLT

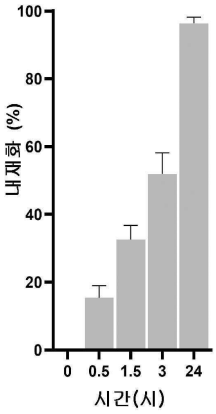
도면

도면1

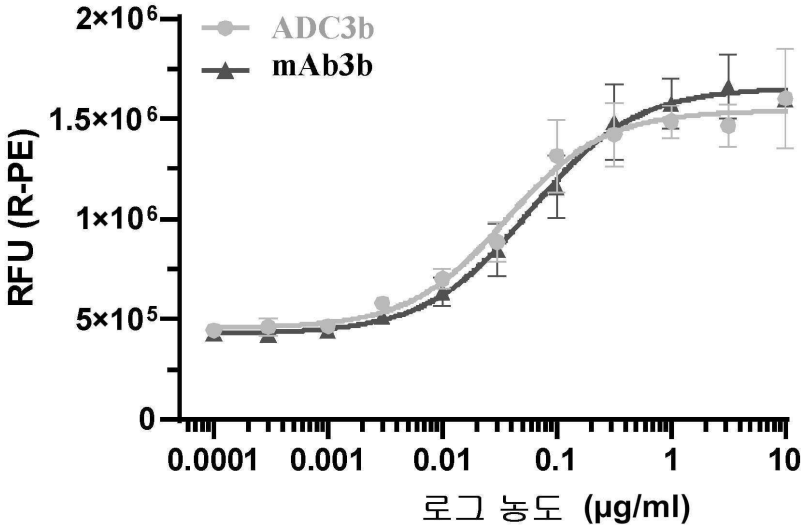
A


mAb3b 3 μg/mL
비-결합 대조군 항체 3 μg/mL
FabFluor면적 / MKN-45 면적(%)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
시간(시)

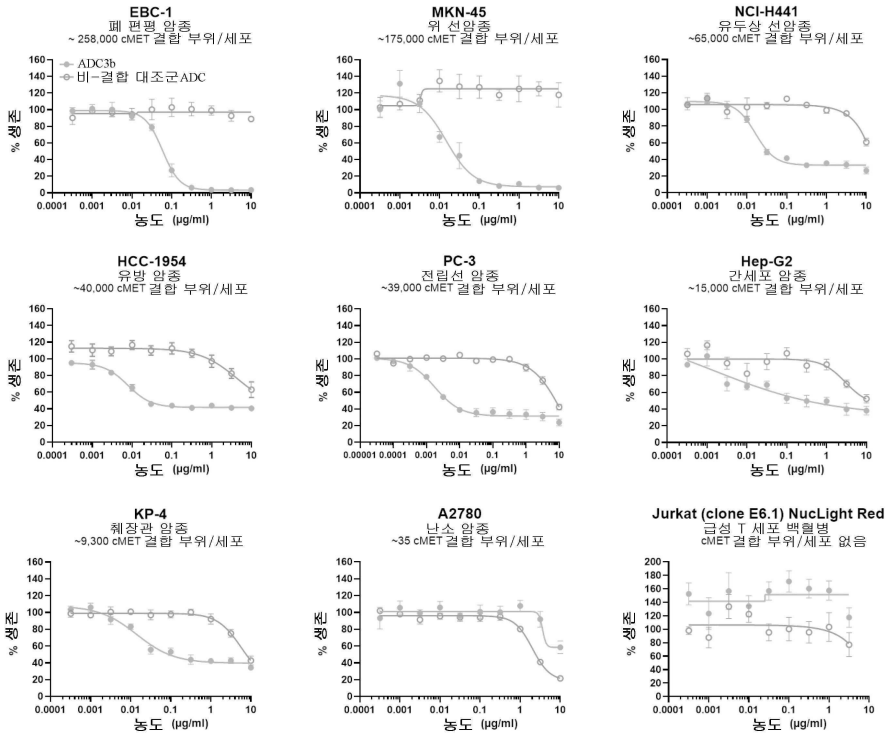
B


내재화 (%)
0
20
40
60
80
100
0
0.5
1.5
3
24
시간(시)

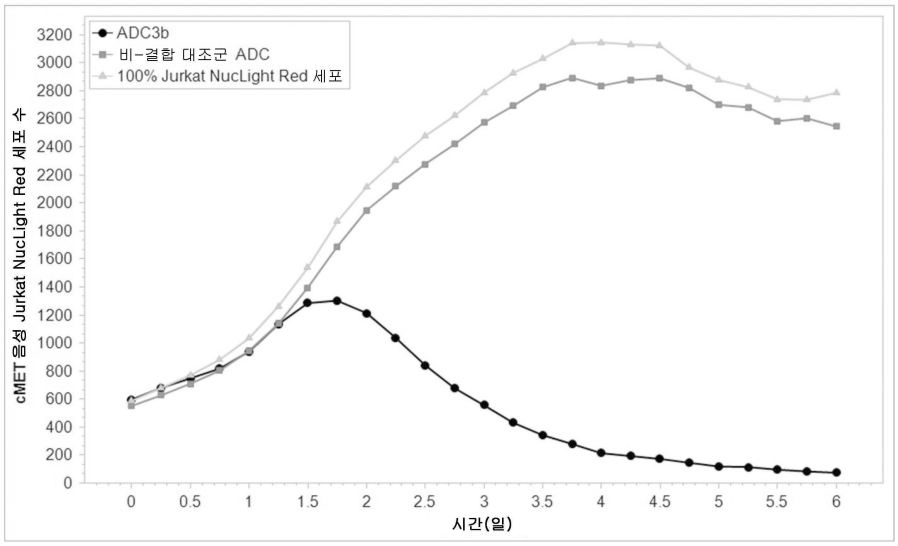
도면2


ADC3b
mAb3b
RFU (R-PE)
2×10⁶
1.5×10⁶
1×10⁶
5×10⁵
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
로그 농도 (μg/ml)

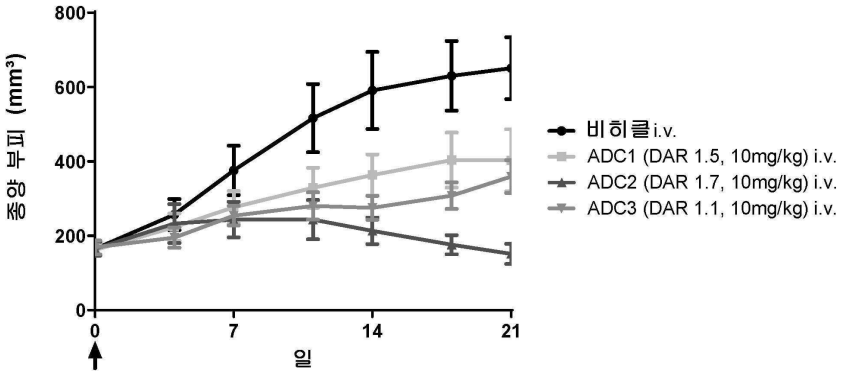
도면3


EBC-1
폐 편평 암종
~ 258,000 cMET 결합 부위/세포
ADC3b
비-결합 대조군ADC
MKN-45
위 선암종
~175,000 cMET 결합 부위/세포
NCI-H441
유두상 선암종
~65,000 cMET 결합 부위/세포
HCC-1954
유방 암종
~40,000 cMET 결합 부위/세포
PC-3
전립선 암종
~39,000 cMET 결합 부위/세포
Hep-G2
간세포 암종
~15,000 cMET 결합 부위/세포
KP-4
췌장관 암종
~9,300 cMET 결합 부위/세포
A2780
난소 암종
~35 cMET 결합 부위/세포
Jurkat (clone E6.1) NucLight Red
급성 T 세포 백혈병
cMET 결합 부위/세포 없음
% 생존
농도 (μg/ml)

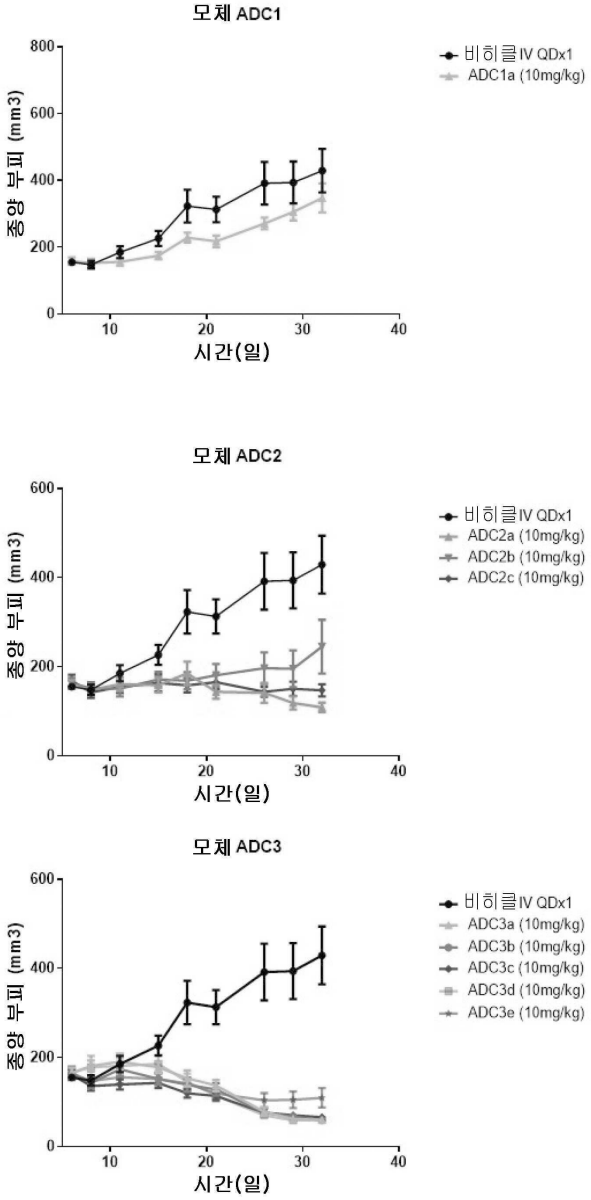
도면4


ADC3b
비-결합 대조군 ADC
100% Jurkat NucLight Red 세포
cMET 음성 Jurkat NucLight Red 세포 수
시간(일)

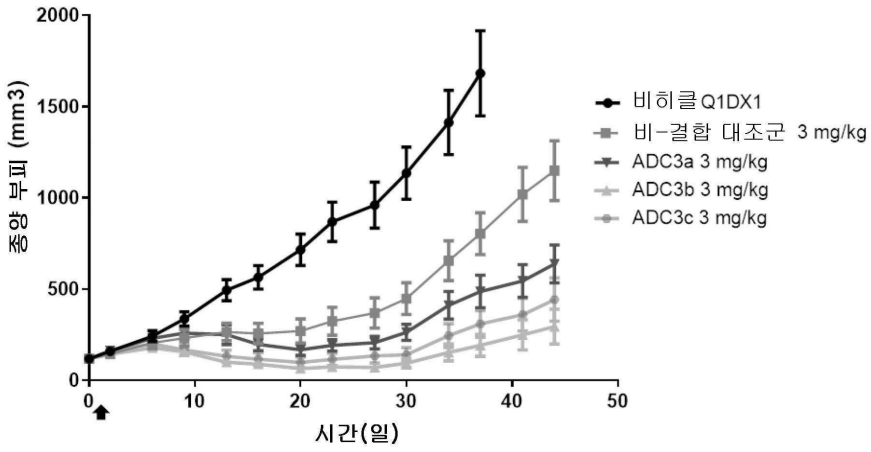
도면5


종양 부피 (mm³)
일
비히클 i.v.
ADC1 (DAR 1.5, 10mg/kg) i.v.
ADC2 (DAR 1.7, 10mg/kg) i.v.
ADC3 (DAR 1.1, 10mg/kg) i.v.

도면6

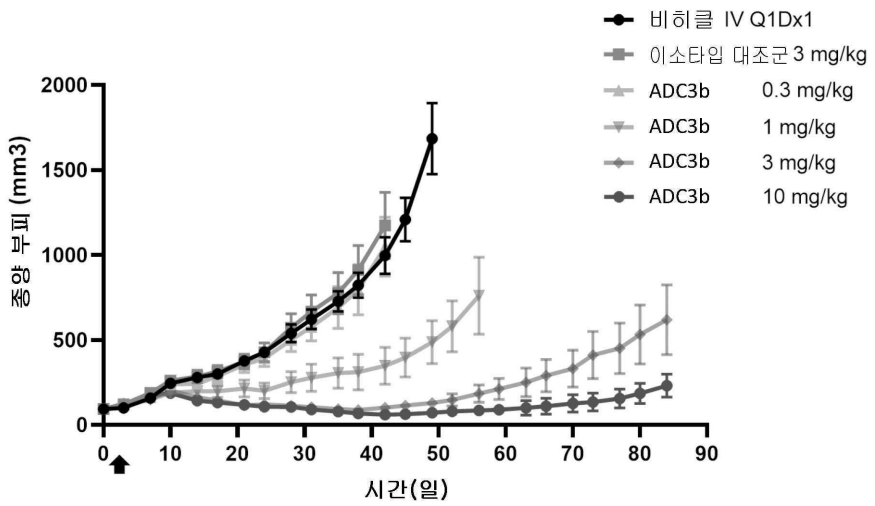

모체 ADC1
종양 부피 (mm3)
시간(일)
비히클IV QDx1
ADC1a (10mg/kg)
모체 ADC2
종양 부피 (mm3)
시간(일)
비히클IV QDx1
ADC2a (10mg/kg)
ADC2b (10mg/kg)
ADC2c (10mg/kg)
모체 ADC3
종양 부피 (mm3)
시간(일)
비히클IV QDx1
ADC3a (10mg/kg)
ADC3b (10mg/kg)
ADC3c (10mg/kg)
ADC3d (10mg/kg)
ADC3e (10mg/kg)

도면7

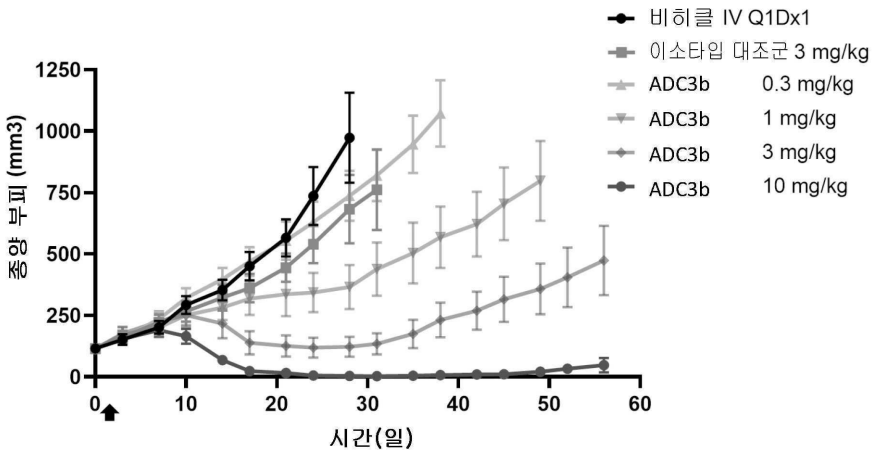

종양 부피 (mm3)
시간(일)
비히클Q1DX1
비-결합 대조군 3 mg/kg
ADC3a 3 mg/kg
ADC3b 3 mg/kg
ADC3c 3 mg/kg

도면8

A



B



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Byondis B.V.

<120> ANTI-C-MET ANTIBODIES AND ANTIBODY-DRUG CONJUGATES

<130> P1758PC00

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCVR

<400> 1

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Val Asn Pro Lys Asn Gly Asp Ile Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Leu Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asp Gly Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCVR

<400> 2

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Asn Ser Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ala Ser Pro Lys Leu Trp
35 40 45

Ile Ser Ser Thr Ser Asn Leu Ala Phe Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser
50 55 60

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

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 3
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> HCVR
<400> 3
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Pro Asp Tyr
20 25 30
Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile

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

100 105 110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> LCVR

<400> 4

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Ile Thr Ser Ser
20 25 30

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

35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Arg Arg Ser Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 5

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCVR

<400> 5

Gln Ile 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 Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Phe Pro Gly Asn Asp Lys Thr Glu Tyr Ser Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Ile Gln Leu Ser Arg Leu Ser Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys
85 90 95
Ser Gly Gly Asp Tyr Gly Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> LCVR
<400> 6

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

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

<210> 7
<211> 118

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> HCVR - VH H41C
<400> 7

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

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

<210> 8
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> HCVR - VH P41C
<400> 8
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Pro Asp Tyr
20 25 30
Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Cys Val His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ala Phe Asp Pro Glu Thr Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Asn Phe

50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ala Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Gly Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Tyr Lys Tyr Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> HCVR - VH P41C
<400> 9
Gln Ile 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 Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Cys Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Leu Ile Phe Pro Gly Asn Asp Lys Thr Glu Tyr Ser Glu Lys Phe

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

<210
> 10
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized HCVR

<400> 10

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

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

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized LCVR

<400> 11

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

50 55 60

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

<210> 12
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> humanized HCVR

<400> 12
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Arg Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Val Phe Pro Asp Tyr
20 25 30
Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Cys Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ala Phe Asp Pro Glu Thr Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ala Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Tyr Lys Tyr Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 121
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized HCVR

<400> 13

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

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

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized LCVR

<400> 14

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

50 55 60

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

<210> 15
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> humanized LCVR

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

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

<210> 16
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> humanized HCVR
<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Cys Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Leu Ile Phe Pro Gly Asn Asp Lys Thr Glu Tyr Ser Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gly Gly Asp Tyr Gly Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 17

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized HCVR

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Cys Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Leu Ile Phe Pro Gly Asn Asp Lys Thr Glu Tyr Ser Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gly Gly Asp Tyr Gly Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized LCVR

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized LCVR

<400> 19

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> humanized LCVR
<400> 20
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala

20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45
Phe Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Ser Ser Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 21

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HAVT20 leader

<400> 21

Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu

1 5 10 15

Glu Phe Ser Met Ala

20

<210> 22

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> human IgG1 antibody HC constant region

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human IgG antibody LC-kappa constant region

<400> 23

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 24

<211> 1390

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human c-Met

<400> 24

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

35 40 45
Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
50 55 60
Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys

65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe

85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp

100 105 110

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp

115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His

130 135 140

Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys

145 150 155 160

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val

165 170 175

Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe

180 185 190

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

195 200 205

His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp

210 215 220

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu

225 230 235 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn

245 250 255

Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln

260 265 270

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu

275 280 285

His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg

290 295 300

Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala

305 310 315 320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
325 330 335
Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
340 345 350
Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys

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

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

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

545 550 555 560
Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu

565 570 575

Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg

580 585 590

Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu

595 600 605

Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys

610 615 620

Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile

625 630 635 640

Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp

645 650 655

Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly

660 665 670

Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg

675 680 685

His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser

740 745 750

Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn

755 760 765

Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg

770 775 780

Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys

785 790 795 800

Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys

805 810 815

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

820 825 830

Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val

835 840 845

Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp

850 855 860

Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys

865 870 875 880

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

885 890 895

Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys

900 905 910

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

915 920 925

Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Thr Ala

930 935 940

Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln

945 950 955 960

Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His

965 970 975

Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro Thr

980 985 990

Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala Thr Phe Pro

995 1000 1005

Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln

1010 1015 1020

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

1025 1030 1035

Asp Ser Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val His Ile

1040 1045 1050

Asp Leu Ser Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His

1055 1060 1065

Val Val Ile Gly Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe Asn Glu Val

1070 1075 1080

Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys Val Tyr His Gly Thr Leu Leu

1085 1090 1095

Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile His Cys Ala Val Lys Ser Leu Asn

1100 1105 1110

Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val Ser Gln Phe Leu Thr Glu Gly

1115 1120 1125

Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val Leu Ser Leu Leu

1130 1135 1140

Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro Leu Val Val Leu Pro

1145 1150 1155

Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile Arg Asn Glu Thr

1160 1165 1170

His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly Leu Gln Val

1175 1180 1185

Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe Val His Arg

1190 1195 1200

Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys Phe Thr Val

1205 1210 1215

Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr Asp Lys Glu

1220 1225 1230

Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val Lys

1235 1240 1245

Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys

1250 1255 1260

Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr

1265 1270 1275

Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr

1280 1285 1290

Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys

1295 1300 1305

Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys

1310 1315 1320

Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser

1325 1330 1335

Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val His Val Asn

1340 1345 1350

Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu

1355 1360 1365

Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp Thr Arg Pro

1370 1375 1380

Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser

1385 1390

<210> 25

<211> 1385

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cynomolgus monkey c-Met

<400> 25

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Val Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala

35 40 45

Glu Thr Ala Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu

50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys

65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe

85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp

100 105 110

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp

115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His

130 135 140

Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys

145 150 155 160

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Asn Gln Cys Pro Asp Cys Val

165 170 175

Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe

180 185 190

Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro His

195 200 205

His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp

210 215 220

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu

225 230 235 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Ile His Ala Phe Glu Ser Asn

245 250 255

Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asn Ala Gln

260 265 270

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Leu Asn Ser Gly Leu

275 280 285

His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg

290 295 300

Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala

305 310 315 320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser

325 330 335

Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
340 345 350

Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
355 360 365

Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
370 375 380

Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg
385 390 395 400

Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
405 410 415

Arg Ala Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
420 425 430

Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Val Lys Gly
435 440 445

Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
450 455 460

Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
465 470 475 480

Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Pro Leu
485 490 495

Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Val Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
500 505 510

Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
515 520 525

Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys
530 535 540

Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Pro Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile
545 550 555 560

Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Thr Ser Ala Pro Leu Glu
565 570 575

Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg

580 585 590

Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu
595 600 605

Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys
610 615 620

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp
850 855 860
Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys
865 870 875 880
Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val
885 890 895
Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys
900 905 910

Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp
915 920 925
Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Ile Ala
930 935 940
Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln
945 950 955 960
Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His
965 970 975

Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro Thr
980 985 990
Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala Thr Phe Pro
995 1000 1005
Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln
1010 1015 1020
Val Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu Thr Ser Gly
1025 1030 1035

Asp Ser Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val His Ile
1040 1045 1050
Asp Leu Ser Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His
1055 1060 1065
Val Val Ile Gly Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe Asn Glu Val

1070 1075 1080

Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys Val Tyr His Gly Thr Leu Leu

1085 1090 1095

Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile His Cys Ala Leu Met Ser Pro Pro

1100 1105 1110

Leu Asp Phe Leu Gly Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val Ser Gln Phe

1115 1120 1125

Leu Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val

1130 1135 1140

Leu Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro Leu

1145 1150 1155

Val Val Leu Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile

1160 1165 1170

Arg Asn Glu Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe

1175 1180 1185

Gly Leu Gln Val Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys

1190 1195 1200

Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu

1205 1210 1215

Lys Phe Thr Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met

1220 1225 1230

Tyr Asp Lys Glu Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys

1235 1240 1245

Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys

1250 1255 1260

Phe Thr Thr Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp

1265 1270 1275

Glu Leu Met Thr Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr

1280 1285 1290

Phe Asp Ile Thr Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln

1295 1300 1305

Pro Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys
1310 1315 1320
Trp His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val
1325 1330 1335

Ser Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr
1340 1345 1350
Val His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro
1355 1360 1365
Tyr Pro Ser Leu Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val
1370 1375 1380
Asp Thr
1385

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> HC CDR1
<400> 26

Asp Tyr Tyr Leu Asn
1 5

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> HC CDR2
<400> 27
Leu Ile Phe Pro Gly Asn Asp Lys Thr Glu Tyr Ser Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 28
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HC CDR3

<400> 28

Gly Asp Tyr Gly Gly Phe Val Tyr

1 5

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC CDR1

<400> 29

Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn

1 5 10

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC CDR2

<400> 30

Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC CDR3

<400> 31

Gln Asn Val Leu Ser Ser Pro Leu Thr

1 5