



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년08월06일

(11) 등록번호 10-1540838

(24) 등록일자 2015년07월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0025311

(22) 출원일자 2012년03월13일

심사청구일자 2012년12월21일

(65) 공개번호 10-2012-0106582

(43) 공개일자 2012년09월26일

(30) 우선권주장

11158861.2 2011년03월18일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

논문 1 : J. Biol. Chem.

Maria Prat 등. Journal of Cell Science. Vol. 111, No. 2, 페이지 237-247 (1998.)

(73) 특허권자

메테레시스 트랜스레이셔널 리서치 에스.에이.

스위스, 루가노 체하-6900, 비아 알라 캄파그나 2/에이

(72) 발명자

보카치오, 카를라

이탈리아, 아이-10133 토리노, 스트라다 델라 크레우사 86

코모글리오, 파올로 마리아

이탈리아, 아이-10133 토리노, 스트라다 발 살릭 183/8

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강명구, 이경민

전체 청구항 수 : 총 18 항

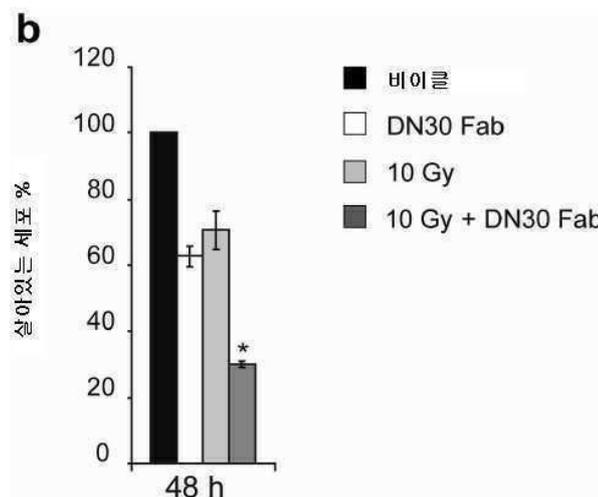
심사관 : 이영기

(54) 발명의 명칭 방사선치료 효능을 강화시키는 MET 억제제

(57) 요약

방사선 치료에대한 환자의 저항을 감소 및/또는 없애기 위하여 암 환자의 치료에 사용하기 위한 Met 억제제 및/또는 이를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 이때 Met 억제제는 다음에서 선택된다: i) 항-Met 단일클론 항체, ii) 항-Met 단일클론 항체의 상보성 결정 영역(CDRs)을 포함하는 유전공학적으로 조작된 항체, 그리고 iii) 항-Met 단일클론 항체의 상보성 결정 영역(CDRs)을 포함하는 (i) 또는 (ii)의 단편, 또는 이의 조합들.

대표도 - 도5



(72) 발명자

**페트론젤리, 피오렐라**

이탈리아, 아이-00128 로마, 비아 루이지 키아리니  
317

**데 산티스, 리타**

이탈리아, 아이-00040 포메지아 (로마), 비아 카사  
세레나 56

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

방사선치료의 효능을 강화시키고, 방사선치료에 대한 환자의 저항을 줄이거나 또는 없애기 위한 용도로 사용을 위한 다음에서 선택되는 Met 억제제:

- i) DN30 항-Met 단일클론 항체,
  - ii) DN30 항-Met 단일클론 항체의 6개 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하는 유전공학적으로 조작된 항체, 상기 CDR은 서열 번호: 12 내지 14 및 20 내지 22에서 제시된 아미노산 서열을 가지며, 그리고
  - iii) DN30 항-Met 단일클론 항체의 6개 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하는 (i) 또는 (ii)의 단편, 상기 CDR은 서열 번호: 12 내지 14 및 20 내지 22에서 제시된 아미노산 서열을 가지며,
- 또는 이들의 조합,

여기서 상기 DN30 항-Met 단일클론 항체는 하이브리도마 세포계 ICLC PD 05006에 의해 생산되고,

여기서 상기 Met 억제제는 Met 유전자에 의해 인코딩되는 수용체의 하향-조절을 유도할 수 있고, 그리고 방사선에 의해 유도된 종양 침습성에 대항할 수 있다.

**청구항 2**

청구항 1에 있어서, 주사 또는 주입에 의해 가용성 단백질의 형태로 투여되는, Met 억제제.

**청구항 3**

청구항 1항에 있어서, Met 억제제는 환자가 방사선치료를 받기 최소한 1주일 전에 투여되는, Met 억제제.

**청구항 4**

청구항 1에 있어서, Met 억제제는 환자가 방사선치료를 받기 최소한 하루 전에 투여되는, Met 억제제.

**청구항 5**

청구항 1에 있어서, Met 억제제는 방사선치료 종료후 최소 1주일까지 투여되는, Met 억제제.

**청구항 6**

청구항 1에 있어서, Met 억제제는 방사선치료 종료후 6 내지 48시간까지 투여되는, Met 억제제.

**청구항 7**

청구항 1에 있어서, 종양은 암종(carcinoma), 골근육 육종, 연조직 육종, 조혈성 악성, 뇌 종양, 흑색종, 중피종, Wilms 종양에서 선택되는, Met 억제제.

**청구항 8**

방사선치료의 효능을 강화시키고, 방사선치료에 대한 환자의 저항을 줄이거나 또는 없애기 위한 용도로 사용을 위한 다음에서 선택되는 Met 억제제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드:

- i) DN30 항-Met 단일클론 항체,
- ii) DN30 항-Met 단일클론 항체의 6개 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하는 유전공학적으로 조작된 항체, 상기 CDR은 서열 번호: 12 내지 14 및 20 내지 22에서 제시된 아미노산 서열을 가지며, 그리고
- iii) DN30 항-Met 단일클론 항체의 6개 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하는 (i) 또는 (ii)의 단편, 상기 CDR은 서열 번호: 12 내지 14 및 20 내지 22에서 제시된 아미노산 서열을 가지며,

또는 이들의 조합,

여기서 상기 DN30 항-Met 단일클론 항체는 하이브리도마 세포계 ICLC PD 05006에 의해 생산되고,

여기서 상기 Met 억제제는 Met 유전자에 의해 인코딩되는 수용체의 하향-조절을 유도할 수 있고, 그리고 방사선에 의해 유도된 종양 침습성에 대항할 수 있다.

**청구항 9**

청구항 8에 있어서, 상기 Met 억제제를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 벡터에 의해 투여되는, Met 억제제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 10**

청구항 9에 있어서, 벡터는 종양 또는 종양-연합된 세포를 표적으로 하는, Met 억제제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 11**

청구항 9에 있어서, 벡터는 전신 또는 종양내 투여되는, Met 억제제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 12**

청구항 9에 있어서, 상기 벡터는 주사에 의해 투여되는, Met 억제제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 13**

청구항 8에 있어서, 주사 또는 주입에 의해 가용성 단백질의 형태로 투여되는, Met 억제제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 14**

청구항 9항에 있어서, Met 억제제는 환자가 방사선치료를 받기 최소한 1주일 전에 투여되는, Met 억제제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 15**

청구항 8에 있어서, Met 억제제는 환자가 방사선치료를 받기 최소한 하루 전에 투여되는, Met 억제제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 16**

청구항 8에 있어서, Met 억제제는 방사선치료 종료후 최소 1주일까지 투여되는, Met 억제제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 17**

청구항 8에 있어서, Met 억제제는 방사선치료 종료후 6 내지 48시간까지 투여되는, Met 억제제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 18**

청구항 9에 있어서, 종양은 암종(carcinoma), 골근육 육종, 연조직 육종, 조혈성 악성, 뇌 종양, 흑색종, 증피종, Wilms 종양에서 선택되는, Met 억제제를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**발명의 설명**

**기술 분야**

본 내용은 암으로 고통을 받는 환자에게서 방사선치료의 효능을 강화시키는 MET 억제제의 이용에 관계한다.

[0001]

**배경 기술**

[0002] 방사선치료는 암 환자들을 치료하는데 성공적으로 이용되지만, 방사선치료는 종양을 근절시키는데 실패할 수 있고, 종양은 좀더 호전적인 표현형으로 재발한다. 시중일관적으로, 동물 모델에서 전통적인 연구에 의해 전리 방사선 (IR)의 역설적인 사전-전이 효과를 밝혔다. 방사선 치료후 종양 진행은 본질적으로 방사선저항성인 “암 줄기 세포” 부집단의 적극적인 선택으로 야기된 것일 수 있다. 그러나, 놀라운 증거는 선택을 제외하고, IR은 조직 재생을 목적으로 하는 적응성 표현형을 촉진시키고, 이는 결국 전이적 거동으로 일어날 수 있다. 이러한 표현형은 단일 세포 및 조직 수준에서 모두 일어나는 DNA 손상에 대한 “스트레스-및-회복” 반응으로 특징된다. 단일 세포에서, DNA 손상의 탐지는 ATM-p53 축에 의해 대부분 편성된 특이적 분자 기전을 유도하는데, 이 기전은 복제를 차단하고, DNA 복구를 활성화시킨다. 손상이 비가역적인 경우, 정상 세포는 아팍토시스를 실행하거나, 또는 노화를 통하여 세포의 증식성 능력을 중지시키도록 예정되어 있다. 그러나, 돌연변이 세포의 사멸 후, 조직은 원래 구조 및 기능을 회복하기 위하여 적절한 세포 수 및 패턴으로 복귀시켜야만 한다. 따라서, 재생(또는 “상처 치유”)은 정상적인 또는 새로 형성된 세포의 생존에 의해 시작된다. 시험관에서 관찰하였을 때, 이러한 과정은 상처 경계로부터 분리, 섬유아세포 표현형의 획득, 상처난 부위로의 이동, 그리고 아마도, 증식과 같은 단계들을 포함한다. 이러한 전체적인 프로그램은 형태학적 특징을 강조한 용어인 “상피-간엽성 전이(EMT)” 라고 불렀다. 좀더 최근에, 이 프로그램은 또한 암에 대해 관련된 기능적 측면을 강조한 단어인 “침략적 성장(IG)” 으로 특정하였다. EMT/IG는 조직 발생 및 재생을 위한 생리학적 프로그램이지만, 침투 및 전이를 실행하기 위하여 암 세포가 불법적으로 사용하는 것으로 광범위하게 알려져 있다. EMT/IG는 (a) 때때로 클론 선택을 뒷받침하는 유전적 병소의 결과로; 그리고 (b) 더 빈번하게는 불리한 환경 조건에 대한 적응 반응의 결과로 암 세포에서 활성화된다.

[0003] 따라서, EMT/IG는 몇 가지 특이적 전사 인자들에 의해 조절되고, 그리고 소량의 세포의 신호에 의해 편성된 유전적 프로그램이다. 세포의 신호는 간세포 성장 인자(HGF) 및 대식세포 자극 단백질(MSP)와 같은 분산 인자들(scatter factors)을 포함하는데, 이는 Met 과(family)에 속하는 티로신 키나제 수용체들에 결합한다.

**[0004] 발명의 목적 및 요약**

[0005] 따라서, 종양을 앓고 있는 환자들에게서 방사선치료의 효능을 강화시키기 위한 개선된 해결책이 필요하다.

[0006] 본 내용의 목적은 이러한 개선된 해결책을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명에 따르면, 상기 목적은 본 내용의 통합 부분으로 형성된 것으로 인지된 청구범위에서 특별히 제기된 사상에 의해 이루어진다.

[0008] 본 발명의 구체예는 종양, 바람직하게는 통제되지 않은(deregulated) Met 경로를 제공하는 종양을 앓는 환자의 치료에 Met 억제제를 사용하는 것을 제공하는데, 이때 Met 억제제는 다음에서 선택된다:

[0009] i) 항-Met 단일클론 항체,

[0010] ii) 항-Met 단일클론 항체의 상보성 결정 영역(CDRs)을 포함하는 유전학적으로 조작된 항체, 그리고

[0011] iii) 항-Met 단일클론 항체의 상보성 결정 영역(CDRs)을 포함하는 (i) 또는 (ii)의 단편들, 또는 이의 조합들, 여기에서 Met 억제제는 Met 유전자에 인코딩된수용체의 하향-조절을 유도할 수 있고, 그리고 방사선치료에 대한 환자의 저항을 줄이거나 및/또는 없앨 수 있다.

[0012] 바람직한 구체예에서, 항-Met 단일클론 항체는 하이브리도마 세포계 ICLC PD 05006에 의해 만들어지는 DN30 항-Met 단일클론 항체다.

[0013] 더 바람직한 구체예에서, a) 유전학적으로 조작된 항체 또는 b) 항-Met 단일클론 항체의 단편들 또는 유전학적으로 조작된 항체의 단편들에 포함된 상보성 결정 영역(CDRs)은 DN30 항-Met 단일클론 항체의 CDRs이며, 이의 아미노산 서열은 서열 번호: 12 내지 14 그리고 20 내지 22에 제시된다.

[0014] 본 발명의 또다른 구체예는 종양, 바람직하게는 통제되지 않은 Met 경로를 제공하는 종양을 앓는 환자의 치료에 사용(가령, 유전자-요법으로)을 위한 Met 억제제를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 관한 것이며, 이때 Met 억제제는 다음에서 선택된다:

[0015] i) 항-Met 단일클론 항체,

[0016] ii) 항-Met 단일클론 항체의 상보성 결정 영역(CDRs)을 포함하는 유전학적으로 조작된 항체, 그리고

- [0017] iii) 항-Met 단일클론 항체의 상보성 결정 영역 (CDRs)을 포함하는 (i) 또는 (ii)의 단편들, 또는 이의 조합들,
- [0018] 여기에서 Met 억제제는 Met 유전자에 인코딩된 수용체의 하향-조절을 유도할 수 있고, 그리고 방사선치료에 대한 환자의 저항을 줄이거나 및/또는 없앨 수 있다.
- [0019] 바람직한 구체예에서, 항-Met 단일클론 항체는 하이브리도마 세포계 ICLC PD 05006에 의해 만들어지는 DN30 항-Met 단일클론 항체다.
- [0020] 바람직한 구체예에서, a) 유전학적으로 조작된 항체 또는 b) 항-Met 단일클론 항체의 단편들 또는 유전학적으로 조작된 항체의 단편들에 포함된 상보성 결정 영역 (CDRs)은 DN30 항-Met 단일클론 항체의 CDRs이며, 이의 아미노산 서열은 서열 번호: 12 내지 14 그리고 20 내지 22에 제시된다.
- [0021] 바람직한 구체예에 따르면, Met 억제제는 i) 주사 또는 주입을 위한 가용성 단백질형으로 또는 ii) 전신 또는 종양내 투여를 위한 벡터 수준으로 투여된다.
- [0022] 더 바람직한 구체예에 따르면, Met 억제제는 최소한 하나의 안정화 분자와 선택적으로 콘쥬게이트된 Fab 단편 형태이며, 여기에서 안정화 분자는 폴리에틸렌글리콜, 알부민 결합 도메인, 알부민으로부터 선택된다.
- [0023] 본 내용은 MET 발현(암의 "침습성 성장" 을 조정하는 것으로 알려진 종양유전자)을 상향조절하며, 다시 세포 침투를 촉진하고, 방사선에 의해 유도된 아팍토시스로부터 세포를 보호한다는 것을 공개한다. 따라서, 가령, 특이적 Met 억제제와 같은 특정 화합물에 의해 MET 발현의 제거 또는 이의 키나제 활성의 억제는 아팍토시스를 촉진시키고, 방사선에 의해 유도된 침습성에 대항하고, 따라서 방사선치료의 효능을 강화시킨다.

**도면의 간단한 설명**

[0024] 본 발명은 동봉된 도면을 참고하여 실시예를 통하여 설명할 것이며, 이때 도면은 다음과 같다:

도 1. IR은 MET 전사를 유도한다.

- a, 방사선 조사 (10 Gy)후 지정된 시점에서 MDA-MB-435S내 Met 단백질. ctrl(대조군), 0 시점에서 Met.
- b, 방사선 조사 (1-10 Gy)후 MDA-MB-435S내 Met 단백질.
- c, 방사선 조사 (10 Gy)후 지정된 시점에서 MDA-MB-435S내 MET 전사체.
- d, 방사선 조사 (10 Gy; 기준(ctrl), 비-조사된 세포)후 지정된 시점에서 MDA-MB-435S내 Met 프로모터(기본, 프로모터없는 구조체)에 의해 구동된 루시퍼라제 활성.

컬럼: 두 가지 별도의 실험의 3중 분석의 평균 ± s.e.m. (\* p<0.05, n = 6, paired t-test). a.u., 임의 유닛 (arbitrary units).

도 2. IR-유도된 MET 전사는 NF-κB를 요구한다.

- a, 방사선 조사 (10 Gy)후, 또는 저산소 (1% O<sub>2</sub>)에서 배양 24시간 후 명시된 시점에서 분석된 MDA-MB-435S내 단백질 핵 추적. ctrl, 0 시점에서 비-조사된 세포.
- b, 방사선 조사된(irradiated) MDA-MB-231 (10 Gy; ctrl, 비-조사된 세포)에서 크로마틴 면역침전. 컬럼은 항-p65/RelA와 Met 프로모터에서 각 NF-κB 결합 서열(κB1 또는 κB2)의 비-특이적 IgG 면역침전 간의 비율을 나타낸다(평균 ± 3중 분석의 s.e.m.). NFKBIA (IκBα) 프로모터는 양성 기준으로 이용되었다.
- c, p65/RelA 발현 (siRELA; siCTRL, 대조군)에 대해 침묵하고, 그리고 방사선 조사된(10 Gy; ctrl, 방사선조사 안된 세포) MDA-MB-231에서 MET 프로모터 활성. 컬럼은 MET 프로모터-구동된 루시퍼라제 발현과 프로모터없는 (기본) 루시퍼라제 발현 (3가지 별도 실험에서 3중 분석의 평균± s.e.m) 사이의 비율을 나타낸다. 삽입그림: siRNA 형질감염후 p65/RelA 단백질.
- d, 방사선조사후 지정된 시점에서 p65/RelA 발현 (siRELA; siCTRL, 대조군)에 대해 침묵한 MDA-MB-435S내 Met 단백질 추적(ctrl, 0 시점에서 방사선 조사안된 세포).

도 3. IR-유도된 MET 발현은 ATM 키나제 활성화를 요구한다.

ATM 키나제 억제제 CGK733 로 처리되고, 그리고 방사선 조사후 명시된 시점에서 추출한 MDA-MB-435S에서 Met 단백질 발현, Chk2 포스포릴화 (p-Chk2) 및 p65/RelA 핵 전위. ctrl, 0 시점에서 방사선 조사안된 세포.

도 4. IR-유도된 침습성 성장은 Met를 요구한다.

a, 방사선 조사된 MDA-MB-231 또는 U-251 (10 Gy; ctrl, 대조군)에 의한 기저막 침습. 트랜스웰(transwell) 필터(10X)의 현미경 사진.

b, 명시된 HGF 농도와 함께, 또는 이것 없이(-) 배양된 방사선 조사된 MDA-MB-435S (10 Gy; ctrl, 대조군)에서 비정상적인 Met-유도된 분기 형태형성(branching morphogenesis). 눈금자: 100  $\mu$ m.

도 5. Met 억제제는 IR-유도된 아팍토시스 및 증식성 억제에 대해 세포를 민감하게 한다.

10 Gy으로 방사선 조사된 및/또는 DN30 항-Met 항체의 Fab 단편 존재하에 48시간 동안 배양된 U-251의 생존능 (비이클: 방사선조사안된 세포들).

컬럼: 3가지 별도 실험에서 3중 분석의 평균  $\pm$  s.e.m (\*  $p < 0.05$ , Fab-DN30 또는 10 Gy 단독에 대해 상당히 감소된 생존능,  $n = 9$ , paired t-test).

컬럼: 세포 생성 클론의 비율(2가지 별도 실험의 3중 분석의 평균  $\pm$  s.e.m, \*  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ , paired t-test).

도 6. IR은 Met 포스포릴화를 유도한다.

HGF (50 nM) 및/또는 IR (10 Gy)로 처리된 MDA-MB-231에서 Met 포스포릴화. 명시한 시점에서 세포를 항-Met 항체로 면역침전시켰고, 항-포스포-Tyr 항체(p-Tyr)로 웨스턴 블랏에 의해 분석하였다(p-Tyr). Met는 단백질 면역침전의 대조군으로 나타내었다. ctrl, HGF 음성 대조군으로 처리된 세포(방법 참고)

도 7. 마우스 및 인간 MET 프로모터의 배열.

인간 MET 프로모터 (GenBank accession N° : AF046925)는 전사 인자 결합 부위 확인을 위하여 TRANSFAC 7.0 소프트웨어(Biobase Biological Database GmbH, Wolfenbuttel, Germany)로 분석하였다. 2가지 추정 NF- $\kappa$ B 결합 부위 ( $\kappa$ B1 및  $\kappa$ B2)를 찾았다. 인간 및 마우스 (유전자 ID: 17295) MET 프로모터의 배열로  $\kappa$ B2 부위 (인간 서열에서 -1149/-1136, □)가 두 종간에 매우 보존된다는 것을 나타낸다.

도 8: DN30 단일클론 항체 중쇄의 핵산(a)과 아미노산(b) 서열. 뉴클레오티드 및 아미노산 서열 모두에서 CDR 영역은 밑줄로 표시한다.

도 9: DN30 단일클론 항체 경쇄의 핵산(a)과 아미노산(b) 서열. 뉴클레오티드 및 아미노산 서열 모두에서 CDR 영역은 밑줄로 표시한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0025] 본 발명은 비-제한적 실시예를 통하여 일부 바람직한 구체예와 관련하여 상세하게 설명될 것이다.
- [0026] 다음의 설명에서, 구체예들의 완전한 이해를 제공하기 위하여 몇가지 특정 설명이 제공된다. 구체예들은 하나 이상의 특정 설명없이도 실시할 수 있거나, 또는 기타 방법, 성분, 재료 등으로 실시할 수 있다. 다른 경우에서, 구체예들의 애매한 측면을 회피하기 위하여, 잘-알려진 구조, 재료 또는 작업은 나타내지 않거나 상세하게 설명하지 않는다.
- [0027] 여기에서 제공하는 표제는 오로지 편의를 위해서 제시된 것이며, 구체예의 범위 또는 의미로 해석해서는 안된다.
- [0028] 세포내 표적 손상 이외에, 전리 방사선 (주로 반응성 산소 종의 생성을 통하여) 조절 분자의 활성을 조정하고, 이는 스트레스-및-회복 생물학적 반응을 조절한다.
- [0029] Met 암유전자의 전사 상향 조절은 이 반응에서 결정적인 사건으로 드러나, 방사선에 의해 유도된 손상에 대항하는 사전-생존 및 재생 프로그램을 실행하게 된다. 본 내용에서 IR-유도된 MET 상향조절(upregulation)은 DNA 병소들의 탐지후 단백질 키나제 ATM에 의해 도출되는 신호 변환 경로에 의해 조절된다는 것을 보여준다. 이 경로는 ATM 키나제의 핵 수출과 억제로부터 전사 인자 NF- $\kappa$ B의 방출을 포함한다. 눈에 띄는 것으로, DNA 손상에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화는 방사선에 대항하는 방어 기전에 주요 역할을 하는 것으로 알려지는데, NF- $\kappa$ B는 항-아팍토시스성 유전자들의 주요 조절물질이기 때문이다. NF- $\kappa$ B에 의해 촉진된 세포 생존은 방사선 치료에 대한 암 세포들의 “적응적 저항성(adaptive resistance)”을 유도하는데 효과적인 것으로 제안되었다. 본 발명자들은 NF- $\kappa$ B에 의해 지속되는 방사선에 대한 적응적 반응은 결정적으로 Met 원암유전자(proto-oncogene)와 관련된

다는 것을 지금 보여준다.

- [0030] IR에 의한 MET 유도는 Met 프로모터 내에 위치한 2가지  $\kappa$ B 특이적 반응 요소들에 NF- $\kappa$ B의 결합에 의해 증재되는 이중단계 전사 사건이다. 조사후 1-2시간 안에 발생하는 초기 전사 반응은 DNA 손상 센서-ATM에 의해 구동되는 고유 경로에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화에 의존하는 것으로 보인다. 아마도, 저산소증-유도된 Met 과발현의 경우에서 볼 수 있는 것과 같이, 산재된 리간드 HGF의 생리학적 농도 존재하에서 신호 변환을 유도하는데 IR-유도된 Met 과발현 자체로 충분하다. 늦은 그리고 지속된 MET 상향조절 -24 h이상 연장된-은 NF- $\kappa$ B에 영향을 미치는 외부 신호발생 다중 경로에 의해 또한 뒷받침될 것이다. 사실, 방사선 조사는 TNF- $\alpha$ , IL-1 및 IL-10을 포함하는 사이토키의 발현을 촉진시키는데, 사이토키들은 한편으로는 NF- $\kappa$ B 표적들이며, 다른 한편으로는 NF- $\kappa$ B 전사적 활성을 촉진한다. 본 발명자들은 살아있는 조직에서, 방사선 조사는 손상된 조직을 통하여 생존 신호의 과장을 증식시키는, NF- $\kappa$ B에서 반향되는 오토크린/파라크린 루프를 유도한다.
- [0031] 눈에 띄게, NF- $\kappa$ B에 대한 전사적 반응은 유전자들의 사전-생존에 추가하여, EMT/IG를 담당하는 분자를 포함하는 것으로 알려져 있다. 사전-생존(pro-survival) 및 EMT/IG 유전적 프로그램의 복합 실행은 양날 칼로 작용하여: 정상 조직에서, 이러한 프로그램은 손상후 생존 및 재생을 야기하고; 암 세포에서는 악성으로의 진행을 촉진시킨다.
- [0032] Met 전암유전자는 스트레스-와-회복 반응들의 밝은 면과 어두운 면 모두를 조정하는데 요구되는 결정적 NF- $\kappa$ B 표적이 되기 위하여 기준에 부합되어야 한다. 본 내용에서 나타난 것과 같이, 한편으로, IR-유도된 Met 과발현은 세포가 상처를 입은 단층을 치유할 수 있게 한다. 다른 한편으로, IR은 악성 종양의 전형적 특징인 기저막을 통과하도록 세포를 자극한다. 더욱 놀라운 것은, IR은 Met-유도된 분기(branching) 형태 발생의 생리학적 과정을 3차원 매트릭스를 통하여 무질서화된 세포 보급으로 전환시킨다고 보고하였다. 모든 경우에서, 비록 몇몇 NF- $\kappa$ B 표적 유전자들이 조사된(irradiated) 세포들에서 발현되지만, MET 녹-다운 또는 기능적 억제를 통하여, 본 발명자들은 생리학적 침습성 성장 (상처 치유) 및 악성 침습성 성장 (침습성)에 모두 Met를 필요로 한다. 따라서, 조사후 종양 재발의 보고된 공격성은 Met 암유전자의 엄격한 조절하에 EMT/IG 프로그램의 활성화에 관여할 수 있다.
- [0033] IR에 대한 항-아팍토시스성, 재생성 그리고 침습성 반응에 수반된다는 관찰은 중요한 치료 결과를 가진다: Met 억제와 방사선 치료의 조합으로 암 세포를 방사선에 민감하도록 만들고, 사전-침습성(pro-invasive) 병행 효과를 예방한다. 실제로, 본 내용은 Met 억제가 치료량의 IR에 노출된 후 세포의 생존 및 콜로니생성 능력(clonogenic ability)을 심각하게 손상시킨다. 가장 중요한 것은, 몇몇 정상 조직의 줄기/선조 격실에서 발현되고, MET는 암세포에서도 발현된다고 생각되며, 이는 정상 줄기 세포 또는 증식성 선조세포의 직접적인 형질변환으로부터 대개 구동된다. IR-유도된 Met 발현 및 활성화는 암 (줄기) 세포 방사선 저항성 및 침습성 능력을 뒷받침하고, 따라서 이들의 양성적 선택 및 유포 기회를 증가시킨다.
- [0034] 따라서, 전통적인 치료, 가령, 방사선 치료와 복합하여 Met 억제 (가용성 단백질 형태의 Met 억제제의 투여에 의해 또는 유전자-요법 가령, 다음에서 정의된 것과 같이 Met 억제제를 인코드하는 벡터의 투여에 의해)는 암을 근절시키기 위한 추가 전략이다.
- [0035] 본 내용에서, “Met 억제제” 라는 표현은 Met 유전자에 의해 인코드된 수용체의 하향-조절을 유도할 수 있는 항-Met 단일클론 항체, 유도체 및/또는 이의 단편을 의미한다. 바람직한 구체예에서, “Met 억제제” 는 Met 유전자에 의해 인코드된 수용체의 하향-조절을 유도할 수 있는 DN30 항-Met 단일클론 항체, 유도체 및/또는 이의 단편을 의미한다.
- [0036] “항체 유도체” 라는 표현은 항체의 CDRs을 포함하는 유전공학적으로 조작된 또는 인간화된 항체와 같은 항체의 상보성 결정 영역(CDRs)을 포함하는 분자 또는 항체의 CDR을 포함하는 펩티드를 의미한다.
- [0037] “항체 단편” 이란 표현은 i) 항-Met 단일클론 항체 및 ii) 항-Met 단일클론 항체의 상보성 결정 영역(CDRs)을 포함하는 유전공학적으로 조작된 또는 인간화된 항체의 Fv, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 단편으로부터 선택된 단편을 의미한다.
- [0038] 약리학적 관점에서, Fab 단편의 이용시 장점 및 단점이 모두 있다. Fab 분자들은 저등 진핵생물 및 원핵생물을 포함하는 단순한 발현계를 이용하여 용이하게 만들 수 있다(Chambers RS. *Curr Opin Chem Biol* 2005 9:46-50). Fab 분자들은 전체 항체와 비교하였을 때 또한 면역원성이 약하고, 이들의 낮은 분자량은 조직 침투를 개선시킨다.

- [0039] 임상에서 Fab 단편의 사용에 있어서 문제점은 신장에서의 더 높은 제거로 인하여 Fab 단편들의 짧은 혈장 반감기와 관련된다. 이 문제점은 종양 부위로 Fab 분자를 국소 투여하면 극복될 수 있다. 조직적 전달과 연장된 치료를 요구하는 치료 적용에서, Fab 반감기를 증가시키는 작용은 필수적이다. 증강된 Fab 반감기를 얻기 위하여, 안정화 분자 (Fab 단편의 항원 결합 성질을 변형시키지 않은)와의 접합에 의해 수득된 Fab의 안정화된 형태를 실현하였다.
- [0040] 페길화(pegylation)가 가장 잘 확립된 기술이기는 하지만(*Chapman AP. Adv Drug Deliv Rev 2002 54:531-545.*), 페길화가 치료 단백질들의 안정성을 개선시키는 유일한 방법은 아니다.
- [0041] 화학적 변형(modification)에 대안으로, 재조합 Fab 분자들은 혈청 알부민에 높은 친화력으로 결합할 수 있는 펩티드 또는 도메인을 인코딩하는 서열에 통합되도록 1차 뉴클레오티드 서열 수준에서 변형될 수 있거나(*Dennis MS, et al., J Biol Chem 2002 277:35035-35043; Stork R, et al. Proteins Eng Des Sel 2007 20:569-576*) 또는 Fab를 인코딩하는쇄 중 하나가 생물학적으로 비활성인 단백질(가령, 혈청 알부민)을 인코딩하는 서열과 틀내(in frame) 융합된 키메라 분자로 만들어질 수 있다(*Subramanian GM, et al. Nat Biotechnol 2007 25:1411-1419*). 폴리에틸렌글리콜, 알부민 결합 도메인, 알부민, 또는 Fab 단편의 항원 결합 성질을 변형시키지 않는 임의의 다른 서열은 Fab 단편의 생체내 혈장 반감기를 증가시킬 수 있는 안정화 분자로 이용할 수 있다.
- [0042] DN30 항-cMet 단일클론 항체는 *Advanced Biotechnology Center (ABC), Interlab Cell Line Collection (ICLC), S.S. Banca Cellule e Colture in GMP, Largo Rosanna Benzi 10, Genova, Italy*에 수탁번호 ICLC PD 05006로 기탁된 하이브리도마 세포계에 의해 생산된다.
- [0043] 본 내용에 따른 방사선치료 저항성을 감소 및/또는 없애기 위하여 Met 억제제를 투여하는데 적합한 종양은 i) 방광, 유방, 담관암, 결장, 자궁내막, 식도, 위, 머리 및 목, 신장, 간, 폐, 비인두, 난소, 췌장/담낭, 전립선, 갑상선으로부터 선호적으로 선택된 암종(carcinomas), ii) Kaposi 육종, 평활근육종, MFH/섬유육종에서 선호적으로 선택된 연조직 육종, iii) 골육종, 횡문근육종, 활액육종에서 선호적으로 선택된 골근육 육종, iv) 급성 골수성 백혈병, 성인 T 세포 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 림프종, 다발성 골수종에서 선호적으로 선택된 조혈성 악성, v) 뇌 종양, 흑색종, 중피종, Wilms 종양에서 선호적으로 선택된 기타 신생물을 포함한다.
- [0044] 이러한 모든 종양들은 실제로 “해제된(deregulated) Met 경로”를 제공하며, 여기에서 이 표현은 이들 종양이 i) Met 돌연변이, ii) Met 단백질 과발현, iii) Met 유전자 증폭, iv) 순환하는 HGF의 상승된 수준중 최소 하나로 인하여 이상 Met 신호생성을 특징으로 한다는 의미다.
- [0045] **인간 환자들에게 Met 억제제를 투여**
- [0046] 인간 악성에 관련된 다른 수용체 키나제를 표적으로 하는 항체(가령 HER-2에 대항하는 항체, 트라스투주마브(Trastuzumab))에 채택된 것과 유사한 섭생을 통하여 항-Met 항체를 투여할 수 있다. 전형적으로, 항체 또는 이의 유도체 또는 단편은 5-10 mg/kg, 바람직하게는 4-8 mg/kg 범위의 약량으로 매주 정맥 주입으로 투여한다. 방사선치료와 복합하기 위하여, 항-Met 항체의 투여는 방사선 조사전 한 주, 더욱 바람직하게는 하루에 시작하고, 그리고 방사선 치료가 끝난 후, 한 주, 바람직하게는 6 내지 48시간 지속할 것이다.
- [0047] 항-Met 항체, 또는 이의 유도체들 또는 이의 단편들을 인코딩하는 cDNA 서열은 “유전자 치료” 과정을 통하여 인간 환자에게 또한 투여할 수 있다. cDNA 서열은 바이러스성 원점(렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 등)의 형질전환 벡터 안에 클론되고, 특이적 표면 결합 단백질에 의해 종양 또는 종양-연관된 세포를 특이적으로 표적화할 수 있는 바이러스 입자로 어셈블리된다. 이러한 제조물은 단일 또는 다중 주사를 통하여 전신으로 또는 종양내로 운반될 수 있다. 바이러스 벡터에 의해 형질도입된 종양 조직은 항-Met 항체, 또는 이의 유도체들 또는 이의 단편들의 서열에 의해 인코딩된 단백질을 발현시켜, 자가-억제 회로를 제공할 것이다.
- [0048] 다음은 실험 데이터를 제공한다; 본 발명의 임의의 제한적인 목적 없이, 실험들은 일부 바람직한 구체예들의 상세한 설명을 제공하기 위하여, DN30 단일클론 항체 및/또는 이의 유도체들 및/또는 단편들을 이용하여 실행하였다.
- [0049] **재료 및 방법들**
- [0050] **세포계 및 siRNA.** 세포계 (A549, MDA-MB-231, LoVo, MDAMB- 435S, U-87MG, U-251, PC3, SF295, DLD1, SK-N-

SH)는 ATCC로부터 구하였다. ATM 키나제 억제를 위하여, 세포들은 조사전 4시간 동안 사전-처리하였고, CGK733 (10  $\mu$ M/DMSO) 존재하여 유지시켰다. RELA를 표적으로 하는 siRNAs (ON-TARGET plus SMART pool L-003533-00 인간 RELA, NM\_021975, Dharmacon, 100 nM), 또는 기준 siRNAs (ON-TARGET plus SMART pool, siCONTROL 비-표적화 siRNA, Dharmacon)를 일시적으로 형질감염시켰다.

[0051]

siRNA 서열들은 다음과 같다.

[0052]

“SMART pool L-003533-00 인간 RELA NM\_021975”는 다음의 듀플렉스 서열의 1:1:1:1 혼합물이다:

[0053]

(1) 센스: GGAUUGAGGAGAAACGUAAUU (서열 번호:1),

[0054]

안티센스: 5'-NUUCCUACAAGCUCGUGGGUU (서열 번호:2),

[0055]

(2) 센스: CCCACGAGCUUGUAGGAAAUU (서열 번호:3),

[0056]

안티센스: 5'-NUUCCUACAAGCUCGUGGGUU (서열 번호:4),

[0057]

(3) 센스: GGCUAUAACUCGCCUAGUGUU (서열 번호:5),

[0058]

안티센스: 5'-NCACUAGGCAGUUUAUAGCCUU (서열 번호:6),

[0059]

(4) 센스: CCACACAACUGAGCCCAUGUU (서열 번호:7),

[0060]

안티센스: 5'-NCAUGGGCUCAGUUGUGUGUU (서열 번호:8).

[0061]

SMART pool, siCONTROL 비표적 siRNA (하나의 단일 듀플렉스 서열):

[0062]

센스: AUGUAUUGGCCUGUAUUAG (서열 번호:9).

[0063]

**DN30 항체 및 DN30 Fab 단편 생산.** *Prat M. et al., 1998, J. Cell Sci 111:237247*에서 설명된 것과 같이, DN30 단일클론 항체를 만들었고, Advanced Biotechnology Center에 기탁번호 ICLC PD 05006로 기탁되었다. DN30 Fab 단편은 DN30 과과인 절단와 친화력 정제를 통하여 획득하였다(*Immunopure Fab Preparation Kit, Pierce*).

[0064]

DN30 중쇄의 아미노산 서열은 도면 8b에서 설명하고, 서열 번호:10으로 제공하며, DN30 중쇄 뉴클레오티드 서열은 도면 8a에서 설명하고, 서열 번호:11로 제공한다.

[0065]

DN30 중쇄 CDR 영역에 상응하는 아미노산 서열은 다음과 같다:

[0066]

CDR-H1: GYTFTSYW (서열 번호:12);

[0067]

CDR-H2: INPSSGRT (서열 번호:13);

[0068]

CDR-H3: ASRGY (서열 번호:14).

[0069]

DN30 중쇄 CDR 영역에 상응하는 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

[0070]

CDR-H1: GGCTACACCTCACCAGTTACTGGA (서열 번호:15);

[0071]

CDR-H2: ATTAATCCTAGCAGCGGTCGTACT (서열 번호:16);

[0072]

CDR-H3: GCAAGTAGG (서열 번호:17).

[0073]

DN30 경쇄의 아미노산 서열은 도면 9b에서 설명하고, 서열 번호:18로 제공하며; DN30 경쇄 뉴클레오티드 서열은 도면 9a에서 설명하고, 서열 번호:19로 제공한다.

- [0074] DN30 경쇄 CDR 영역에 상응하는 아미노산 서열은 다음과 같다:
- [0075] CDR-L1: QSVVDYDGGSY (서열 번호:20);
- [0076] CDR-L2: AAS (서열 번호:21);
- [0077] CDR-L3: QQSYEDPLT (서열 번호:22).
- [0078] DN30 경쇄 CDR 영역에 상응하는 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:
- [0079] CDR-L1: AAAGTGTGATTATGATGGTGGTAGTTATAT (서열 번호:23);
- [0080] CDR-L2: GCTGCATCC (서열 번호:24);
- [0081] CDR-L3: CAGCAAAGTTATGAGGATCCGCTCACG (서열 번호:25).
- [0082] **시험관(In vitro) 조사.** X-선은 6 MV에서 작용하는 선형 입자 가속기(Clinac 600C/D, Varian)에 의해 방출되었다.
- [0083] **웨스턴 블랏(Western Blot).** 단백질 발현은 조사된 합류, 혈청-부족한 세포에서 조사하였다. 세포질 및 핵 부분들에서 분획화를 위하여, 세포를 세척하였고, “완충액 A” (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM 디티오프레톨, 1 mM 페닐메틸술폰닐 플로라이드 및 프로테아제 억제제의 콕테일)에서 10분간 얼음위에서 항온처리하였다. 세포질 추출물을 포함하는 상청액은 원심분리에 의해 분리시켰다. 펠렛은 “완충액 B” (20 mM HEPES pH 7.9, 400 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM 디티오프레톨, 10% 글리세롤, 1 mM 페닐메틸술폰닐 플로라이드 및 프로테아제 억제제의 콕테일)에 재현탁시키고, 그리고 활발하게 혼합시키면서 4° C에서 1시간 동안 항온처리하였다. 생성된 핵 용해물은 고속 원심분리에 의해 정화하였다. 동량의 단백질은 SDS-PAGE로 해리시키고, 1차 항체로 다음을 이용하여 웨스턴 블랏으로 분석하였다: 마우스 항-인간 Met (*Prat et al., Int. J. Cancer 49, 323-328 (1991)*)에 공개된 DL21, 마우스 항-p65/RelA 및 마우스 항-HIF-1 $\alpha$  (BD Biosciences), 토끼 항-포스포-Ser276 및 토끼 항-카스파제-3 (Cell Signaling), 토끼 항-포스포-Chk2 (T68, R&D Systems), 염소 항-악틴 (C-11; Santa Cruz Biotechnology) 및 마우스 항-라민 B (Calbiochem)는 동등한 세포질 또는 핵 단백질 로딩에 대한 대조군으로 각각 이용되었다. 분자 영상기(GelDoc XR; Bio-Rad Laboratories)를 이용하여 블랏 영상을 얻었다. 밀도 분석(Densitometric analysis)은 Quantity One 1-D (Bio-Rad Laboratories)으로 실행하였다. 나타난 웨스턴 블랏은 최소한 3가지 독립적인 실험에서 수득할 결과를 대표한다.
- [0084] **노던 블랏(Northern Blot).** 합류(Confluent) 세포들은 48시간 동안 혈청을 공급하지 않았고(starved), 방사선을 조사하였다. 총 RNA는 0.8% 아가로스-포름알데히드 겔에서 해리시켰고, 표준 과정에 따라 나일론 막(Amersham)으로 옮겼다. 전체 코딩 서열 (GenBank Accession N. J02958)을 포함하는 Met 프로브는 pCEV-MET 플라스미드(*Michieli et al., Oncogene 18, 5221-5231 (1999)*)로부터 수득하였고, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Megaprime, Amersham)로 라벨하였다. 50% 포름아미드 존재하에 16시간 동안 42°C에서 혼성화를 실행하였다. 나일론 막은 42°C에서 2X SSC-0.1% SDS로 2회 세척하였고, 0.1X SSC-0.1% SDS로 2회 세척하고, 방사능사진을 찍었다.
- [0085] **ROS 탐지.** 제조업자의 지시에 따라 5-(및 6)-카르복시-2'-7'-디클로로플루오르레신 디아세테이트(카르복시-H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes)를 이용하여 세포내 ROS 생성을 평가하였다. 간략하게 설명하자면, 세포를 블랙 96-웰 플레이트(3 x 10<sup>4</sup> 세포/웰)에 처리 24시간 전에 접종한 후, 처리하였다(IR: 10 Gy; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 100  $\mu$ M 대조군으로). 세포는 37° C에서 1 시간 동안 페놀 레드-없는 DMEM에서 카르복시-H<sub>2</sub>DCFDA (10  $\mu$ M) 존재하에서 항온처리하였다. 세포를 세척하였고, 카르복시-H<sub>2</sub>DCFDA 없이, 페놀 레드-없는 DMEM에서 추가 30분간 항온처리하였고, 그 다음 방사능 조사하였다. 형광 플레이트 판독기( $\lambda_{ex}$  = 485 nm,  $\lambda_{em}$  = 535 nm) (DTX 880 Multimode Detector)를 이용하여 15분간 ROS 생성을 측정하였다.

- [0086] **염색질(Chromatin) 면역침전 (ChIP).** 방사선 조사된 또는 대조군 세포의 10 ChIP를 위하여  $4 \times 10^7$  세포를 이용하였다. 방사선 조사 후 (10 Gy), 세포는 실온에서 15분간 1% 포름알데히드에 고정시켰고, 반응은 글리신 (0.125M)으로 중단시켰다. 고정된 세포를 세척하였고, 프로테아제 억제제 카테일이 보충된 빙냉 PBS에 수거하였고, 원심분리하였다. 세포질 분획물은 상기와 같은 추출하여 폐기하였고, 핵을 펠렛화시키고, 1 ml SDS-용해 완충액(1% SDS, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8, 그리고 프로테아제 억제제 카테일)에 재현탁시켰다. 그 다음 초음파파쇄로 핵을 파괴하여, 400-1000 bp의 큰 크기(bulk size)의 DNA 단편을 얻었다. 세포 찌꺼기는 4° C, 14,000rpm에서 10분간 원심분리에 의해 제거하였다. 염색질 조제물을 함유하는 상청액은 희석 완충액 10X (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8, 167 mM NaCl)으로 희석시켰다. 그 다음 염색질은 단백질 G-sepharose (Amersham, 0.2 mg/ml의 연어 정자 DNA, 0.1% BSA 및 0.05%  $\text{NaN}_3$ 이 보충된 50% 겔 슬러리)를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 사전-정제하였다. 비드는 4° C, 4000rpm에서 간단한 원심분리에 의해 펠렛화시켰고, 상청액은 수거하였다. 3%의 염색질 제조물은 ChIP 표준화를 위한 유입물(Input)로 이용하였다. ChIP는 4 $\mu\text{g}$ 의 항체(항-p65/RelA, Santa Cruz; 전체 마우스 IgG, Chemicon)로 4°C에서 하룻밤 동안 실행하였고, 50 $\mu\text{l}$ 의 단백질 G-sepharose 비드로 3시간 동안 항온처리하였다. 다음의 용액으로 4°C에서 회전 플랫폼에서 비드를 순차적으로 세척하였다 (10 min/each): 저염 완충액(0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl)으로 2회, 고염 완충액(0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl)으로 2회, LiCl 완충액(0.25 M LiCl, 1% 테옥시콜린산, 0.5% NP-40, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8)으로 1회, 그리고 TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA)로 2회. ChIPs는 EB (1% SDS, 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ )에서 2회 용리시키고, 65° C에서 하룻밤 동안 유지시켜, 포름알데히드 가교를 역전시켰다. RNase (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 37° C, 30분) 및 프로테아제-K (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 45° C, 2시간)으로 처리하였다. 각 시료는 페놀/클로로포름 추출물로 정제시키고, 40 $\mu\text{l}$ 의 멸균수에 최종적으로 재현탁하였다. 각 시료 2 $\mu\text{l}$ 는 ABI PRISM 7900HT 서열 탐지 시스템(Applied Biosystems) 상에서 SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems)와 함께 실시제 PCR의 주형으로 이용하였다.
- [0087] 이용된 프라이머는 다음과 같았다:
- [0088] - NFKBIA
- [0089] (fw: GAACCCAGCTCAGGGTTTAG - 서열 번호:26;
- [0090] rev: GGGAATTTCCAAGCCAGTCA - 서열 번호:27);
- [0091] -  $\kappa$ B1
- [0092] (fw: AGGCCAGTGCCTTATTACCA - 서열 번호:28;
- [0093] rev: GCGGCCTGACTGGAGATTT - 서열 번호:29);
- [0094] -  $\kappa$ B2
- [0095] (fw: GGGACTCAGTTTCTTTACCTGCAA - 서열 번호:30;
- [0096] rev: GGGACTCAGTTTCTTTACCTGCAA - 서열 번호:31).
- [0097] **상처 치유 분석.** 세포를 24-웰 플레이트에 함유되도록 성장시키고, 24시간 동안 굵긴 후, 플라스틱 팁으로 긁었다. 배양 배지는 1% FBS 및 비이클 단독(DMSO)을 포함하는 새로운 배지로 대체하였고, 바로 방사선 조사하였다. 24시간 후, 세포를 11% 글루타알데히드(Sigma)로 고정시켰고, 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 착색시켰다. 역 광현미경(DM IRB, Leica)에 연결된 Leica 광카메라(Leica DFC320, Leica)로 영상을 얻었다. 영상은 최소 3가지 독립적인 실험에서 얻은 결과를 대표한다.
- [0098] **트랜스웰 분석(Transwell assay).** 세포 침입을 Transwell™ 챔버(BD Falcon)에서 측정하였다. MDA-MB-231 및

MDA-MB-435S 세포( $5 \times 10^5$ /transwell)를  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 재구성된 Matrigel 기저막(Collaborative Research)으로 피복된 필터 위쪽 측면에 접종하였다. U-251 (104/transwell)는  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 피복된 필터에 접종하였다. 1% FBS가 보충된 배양 배지를 두 챔버 모두에 추가하였다. 접종 1시간 후, 세포에게 방사능 조사하였고, 37°C에서 24시간 동안 항온처리하였다. 필터 위쪽 측면에 있는 세포들을 기계적으로 제거하였고, 아래 측면으로 이동된 세포들은 상기에서 설명한 것과 같이 고정시키고, 착색시키고, 사진을 찍었다. 세포 침투를 정량화하기 위하여, 실험 조건당 10군데를 무작위로 선택하였고, 10X 대물렌즈로 상기에서 설명한 것과 같이, 현미경사진을 찍었다. MetaMorph 7.1 소프트웨어를 이용하여 형태학적 분석을 실시하였다. 영상은 최소한 3가지 독립적 실험을 대표한다.

[0099]

**분기 형태학적 분석(Branching morphogenesis assay).** MDA-MB-435S 회진타원체(spheroids)는 240mg/ml 메틸셀룰로오스(Sigma)에서 단일-세포 재현탁과 24시간 동안 비-흡착 96-웰 플레이트(Greiner)에서 배양으로 실시하였다. 스페로이드는 쥐 꼬리의 유형 I 콜라겐(BD Biosciences) 1.3mg/ml, 10% FBS 및 240mg/ml 메틸셀룰로오스를 함유하는 매트릭스로 이동시켰다. 24시간 후, 세포에게 방사능을 조사하였고 및/또는 7일간 HGF 존재하에 배양하였다. HGF는 SF9 세포에서 벡로마이더스 재조합 단백질로 수득되었다. 감염안된 세포로부터 얻은 조건화 배지를 음성 기준으로 이용하였다. 영상은 최소한 3가지 독립적 실험을 대표한다.

[0100]

**DN30 Fab로 세포 생존능 분석.**  $10^3$  세포를 96-웰 플레이트에 접종하였고, 24시간 생장시켰다. 배양 배지는 1% FBS 및 DN30 Fab ( $28 \mu\text{g}/\text{ml}$ )을 포함하는 배지 또는 비이클(PBS)만 함유된 배지로 대체하였다. 24시간 후, 세포에게 방사선을 조사하였다(10 Gy). 세포 생존능은 상기와 같이 평가하였다.

[0101]

**결과**

[0102]

**IR은 MET 전사를 유도한다.**

[0103]

Met 전암유전자가 성장 인자 및 산소 센서를 포함하는 세포외 및 세포내 특이적 신호에 의해 전사적으로 조절된다는 것을 본 발명자들은 이미 보여주었다. 여기에서 치료 수준의 IR (최대 10 Gy까지)에 노출됨으로써 Met 발현의 조절에 대해 연구하였다.

[0104]

상기한 조직학적 유형의 신형성 세포(유방, 폐, 전립선 및 결장 암종; 흑색종; 교아종; 신경아종)로부터 유도한 10가지 세포계에서, 방사선 조사후 Met 단백질 수준이 상당히 증가되었다는 것을 발견하였다. 대표적 세포계(가령, MDA-MB-435S 및 MDA-MB-231)에서, 상세한 노출 시간 실험에서 이중 상 프로파일의 Met 단백질 축적이 드러났다. 이것은 1-2시간의 Met 유도 (~5배)의 초기 피크에 이어, 방사선 조사후 6시간 시점에서 나타나서 24시간 시점에서 감소되는 유사한 후기 피크 또는 고원 상태(plateau)로 이어지는 특징이 있다(도 1a). 약량-반응 실험에서 Met 유도는 1 Gy후에 시작하여, 5 Gy에서 고원 상태에 도달하는 것으로 나타났다(도 1b). 조사된 세포에서, MET mRNA 축적 및 전장 MET 프로모터의 활성화 또한 관찰되었는데(도 1c-d), 이는 IR-유도된 MET 과발현이 전사적 기전과 관련있음을 나타낸다. 흥미로운 것은, MDA-MB-231에서, IR에 노출 후 10분 이내에 일시적인 그리고 리간드-독립적인 Met 자가포스포릴화 또한 탐지되었다(도 6). IR-유도된 Met 포스포릴화의 강도는 HGF의 비-포화 농도( $50 \text{ ng}/\text{ml}$ )에 의해 유도된 것과 필적하였다. 그러나, 포스포릴화의 역학은 달랐고, 그 이유는 IR에 의해 유도된 피크는 10분 후에 도달하였지만, HGF에 의해 유도된 피크는 30분 후에 도달하였기 때문이다. IR 및 HGF에 의한 동시 자극은 공조효과가 아니었다(도 6).

[0105]

**IR-유도된 MET 전사는 NF- $\kappa$ B를 필요로 한다.**

[0106]

IR은 NF- $\kappa$ B를 포함하는 몇 가지 전사 인자들을 조절하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 검사된 세포계에서, IR은 중요한 초기 NF- $\kappa$ B 반응을 유도하는 것으로 계놈-와이드 발현 프로파일링에서 나타났다. 예를 들면, MDA-MB-231에서, 방사능 조사후 조정된 33개 유전자중 9개는 NF- $\kappa$ B 표적들이었고, 예상보다 ~20배 더 높은 빈도를 나타낸다. 더욱이, MDA-MB-231, MDA-MB-435S 또는 U-251 세포를 이용한 시간-과정 실험에서, IR (10 Gy)은 NF- $\kappa$ B 활성화의 특징인, NF- $\kappa$ B 하위단위 p65/RelA의 신속하고(30분 이내) 그리고 지속적인(24시간 까지) 핵 축적을 유도하였다(도 2a). 더욱이, 방사선 조사 후 초기 시점에서, 핵 p65/RelA는 Ser<sup>276</sup>에서 일시적으로 포스포릴

화되었다(도 2a). 이러한 포스포릴화는 단백질 키나제 A를 통하여 활성 산소 중(ROS)에 의해 유도되며, 그리고 전사적 공동활성물질 CBP/p300과 p65/RelA 상호작용을 촉진하고, 초기 표적 유전자들의 부분집합의 상향 조절을 위하여 요구된다. IR은 p65/RelA 하위 단위의 핵 축적과 초기 일시적 포스포릴화를 통하여 NF-κB의 기능적 활성화를 촉진시킨다는 것을 이들 데이터에서 나타낸다.

[0107]

Met 인간 프로모터에서, 서열(GenBank accession No. AF046925)의 전사 시작 부위에 대해 2개의 가상 NF-κB 결합 부위, -1349/-1340 bp에 위치한 κB1과 -1149/-1136 bp에 위치한 κB2는 실리코 분석을 통하여 확인하였다. 흥미로운 것은, κB2 부위는 Met 마우스 프로모터에서 상당히 보존되었다(도 7; met 마우스 (*mus musculus*) 프로모터 서열-서열 번호:32와 met 인간 (*homo sapiens*) 프로모터 서열-서열 번호:33). 염색질 (Chromatin) 면역침전 실험에서, 이들 부위중 하나에 p65/RelA의 연합이 10 Gy에 노출된 세포에서 상당히 증가되었다는 것이 나타났고(도 2b), 이는 방사능 조사된 세포에서 NF-κB에 의해 전사적으로 조절된다는 것을 나타낸다. 이러한 발견들은 NF-κB가 IR에 의한 MET 유도에 절대적 필수 요건인지를 발명자들이 조사하도록 촉진시켰다. p65/RelA는 몇가지 NF-κB 이종이량체 각각 형성에 관련되어, 전체적인 NF-κB-구동된 전사적 활성화에 중요하기 때문에, RNA 간섭에 의해 p65/RelA 발현은 중단되었다. p65/RelA (SMART pool L-003533-00 인간 RELA, 서열 번호: 1 내지 8)에 대항하는 siRNA로 처리된 MDA-MB-231 또는 MDA-MB-435S에서, IR는 전장의 MET 프로모터 활성화 (도 2c)을 더 이상 유도하지 못하였고, Met 단백질의 축적도 유도하지 못하였다. 이를 함께 고려하면, 이들 데이터들은 IR-유도된 MET 상향조절이 전사 인자 NF-κB의 활성화를 요구한다는 납득할만한 증거를 제공한다.

[0108]

IR-유도된 MET 전사에서 저산소증 유도성 인자-1 (HIF-1)의 관련성도 또한 고려되는데, 그 이유는 (a) HIF-1은 ROS 형성으로 인하여 방사선 조사된 세포에서 활성화된 것으로 나타났고, 그리고 (b) HIF-1은 MET 발현의 중요한 조절물질이기 때문이다. 그러나, 상보적 접근방법에 의해 나타난 바와 같이, HIF-1의 관련은 최소화였다. 첫째, MDA-MB-231 및 MDA-MB-435S에서, IR은 HIF-1 활성화의 특징인, HIF-1α 하위단위의 핵 전위를 유도하지 않았는데, 이는 저산소 농도에서 세포를 배양할 때 관찰되었다(도 2a). HIF-1 활성화의 부족은 방사능 조사된 세포에서 모자라는 ROS 생산때문은 아닌데, 그 이유는 10 Gy에 노출후 15분에 평균 25 ± 3.5%로 증가되었기 때문이다. 이는 1-10 Gy에 노출된 세포계에서 이미 관찰된 것과 같이, 방사능 조사후 2-5분에 평균 80% ROS 유도에 대응하는 것으로 예측되었다. 더욱이, IR은 저산소증-유도된 MET 상향 조절을 담당하는 두 가지 기능성 저산소증 반응 요소들 (HRE)과 Ap-1 부위를 포함하는 소위 “최소(minimal)” MET 프로모터를 활성화시킬 수 없다는 것을 알았다. 이를 함께 고려할 때, 이들 데이터는 HIF-1이 IR에 의한 MET 상향 조절에 관계하지 않음을 나타낸다. 그러나, 저산소증 유도된 p65/RelA 핵 전위 및 세린 포스포릴화는 관찰되었다(도 2a). 끝으로, 중요한 IR-표적인 전사 인자 p53의 관련성 또한 배제하였다. 사실, MDA-MB-435S 및 MDA-MB-231 (IR에 의한 최대 MET 유도를 나타내는 2가지 세포계)은 p53 비활성화 돌연변이 (각각 G266E 및 R280K)를 품고 있다. 더욱이, 마우스 프로모터와는 달리, 인간 MET 프로모터는 p53의 구성적 활성 형에 의해 상향조절되지 않는다.

[0109]

**IR-유도된 MET 발현은 ATM 키나제 활성화에 의해 중재된다**

[0110]

NF-κB는 세포외 및 세포내 신호 모두에 의해 개시되는 몇 가지 경로의 교차로다. 세포내 신호는 DNA 손상을 탐지후 단백질 키나제 ATM에 의해 유도된 것들을 포함한다. IR에 의한 MET 유도가 ATM 키나제의 활성화에 의존하는 지를 조사하기 하여, MDA-MB-435S 또는 MDA-MB-231은 10 μM의 특이적소-분자 억제제 CGK733으로 처리하였다. 시간 과정 실험에서, CGK733은 특이적 ATM 기질 Chk2의 IR-유도된 포스포릴화를 억제하였고, 뿐만 아니라 p65/RelA 핵 전치(translocation), 및 Met 단백질 과발현을 억제하였다. 이들 데이터에서 ATM 키나제는 IR-유도된 MET 상향조절에 요구된다는 것을 나타낸다 (도 3).

[0111]

**IR-유도된 침습성 성장은 Met를 요구한다.**

[0112]

Met 과발현은 세포외 리간드 HGF 부재하에 키나제 활성화를 수반하지 않는다. 그러나, 리간드-의존적 신호생성 활성화 (가량, 감각화(sensitization))에서 상당한 증가를 수반한다. 저산소증이 Met 발현을 방사능 조사에 의해 유도된 수준에 필적하는 수준 또는 이보다 더 낮은 수준으로 상향조절된 세포들에서 이러한 것들이 관찰되었다.

[0113]

따라서, 본 발명자들은 IR-유도된 Met 과발현은 Met-의존적 생물학적 반응들을 유도하거나 강화시킬 수 있는 지를 조사하였다. 여기에는 침습성 성장의 생리학적 그리고 병리학적 측면들도 포함된다. 세포가 손상된 조직(가령, 생리학적으로 침습성 성장)을 재생시키는지를 평가하는 상처-치료 분석에서, 방사선 조사된 MDA-MB-231, 뿐

만 아니라 MDA-MB-435S는 상처 가장자리로부터 분리되고, 굽힌 지역을 통하여 이동함으로써 자발적으로 치유 프로그램을 실행하였다. 24시간 동안 모니터링한 이 반응은 HGF에 의해 자극된 것과 중첩되었고, 이는 세포 분리와 이동을 촉진하기 때문에 “분산(Scatter) 인자” 로도 알려져 있다. 그러나, IR에 의해 유도된 치유 반응은 HGF 오토크린 루프의 유도 때문은 아니었는데, 그 이유는 방사선 조사된 세포들은 정량적 PCR에 의해 평가하였을 때 HGF를 발현하지 않았기 때문이다. 본 발명자들은 IR-유도된 Met 과발현이 1% 혈청이 공급된 배양 배지에 존재하는 소량의 HGF에 대해 세포를 민감하게 한다는 결론을 내렸다. 이러한 조건은 세포의 매트릭스에 편재된 생체 내 HGF의 생리학적 존재를 모방하는 것 같다.

[0114] 그 다음 방사선 조사된 세포를 트랜스웰(transwell) 분석에서 평가하는데, 이 분석은 시험관에서 인공적인 기저막을 침입하는 능력을 측정하는 것으로, 생체내 침습성, 가령, 악성 침습성 성장과 밀접하게 관련된다. 실제로, 방사선 조사된 세포(MDA-MB-231, MDA-MB-435S, 또는 U-251)는 저농도 혈청(1%) 존재하에 트랜스웰 기저막을 자발적으로 건넜고(도 4a), 이는 HGF에 의해 야기되는 거동을 닮았다.

[0115] **IR은 Met-유도된 형태발생을 침습성 공정으로 전환시킨다.**

[0116] 분기 형태발생(Branching morphogenesis)은 발생동안 3차원적 장기를 만들기 위하여 HGF에 의해 유도되는 복잡한 생리학적 과정이다. 이러한 다단계 프로그램은 세포 이동, 증식 및 공간적 재조직화를 수반하고, 분극화된 세포에 의해 연결된 증공 분기화된 세관의 생성으로 종료된다. MDA-MB-435S와 같은 연구된 일부 세포계는 시험관에서 분기 형태학적 생성을 충분히 실행할 수 있다.

[0117] IR 민감화된 이들 세포를 외생성 단독 HGF의 차선 농도(5nM)에 노출시키면 분기 형태학적 생성이 유도될 수 없다(도 4b). 중요한 것은 HGF로 자극된 방사선 조사된 세포는 세포가 알부미날 표면(abluminal surface)으로부터 해방되어, 주변 매트릭스로 퍼져갈 때 두드러진 구조적 변경을 가진 세관을 만들었다(도 4b). 이러한 거동은 TNF $\alpha$ 에 대한 반응으로 발생하는 이상 형태발생의 형태로 설명된 “3차원적 분산(tridimensional scatter)”을 연상하게 한다. IR의 치료약량은 생리학적 분기 형태학적 생성을 비정상적인 사전-침습성 공정으로 전환시킬 수 있다고 결론내렸다.

[0118] **Met 억제는 세포를 IR-유도된 아폽토시스와 증식성 억제에 민감하도록 한다.**

[0119] EMT/IG 프로그램의 일부분으로, Met는 PI3-키나제/AKT를 포함하는 하류 경로의 지속적인 활성화를 통하여 강력한 항-아폽토시스성 신호를 발산한다. 따라서, 본 발명자들은 MET 상향조절이 방사선 조사에 의해 유도된 세포 사멸을 예방할 수 있다고 결론을 내렸고, 그리고 바꾸어말하면, Met 억제는 방사선치료의 효능을 증가시킬 수 있다고 결론을 내렸다.

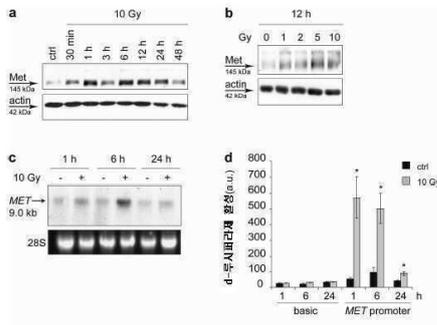
[0120] MET 하향-조절을 유도하여, MET 신호발생을 억제시키고, 생물학적 활성을 억제시키는 것으로 알려진 DN30 항-Met 항체의 Fab 단편 존재하에 유지시킨 방사선 조사된 세포에서 세포 생존능 감소(최대 75%)가 관찰되었다 (Petrelli et al., *PNAS* 103: 5090-5, 2006) (도 5).

[0121] 이러한 결과들은 Met 억제 활성은 세포가 방사선치료에 민감하도록 하여 세포 사멸을 증가시키고, 치료후 증식을 재개하는 능력을 감소시킴으로써, 방사선치료에 민감하도록 만든다는 것을 나타낸다.

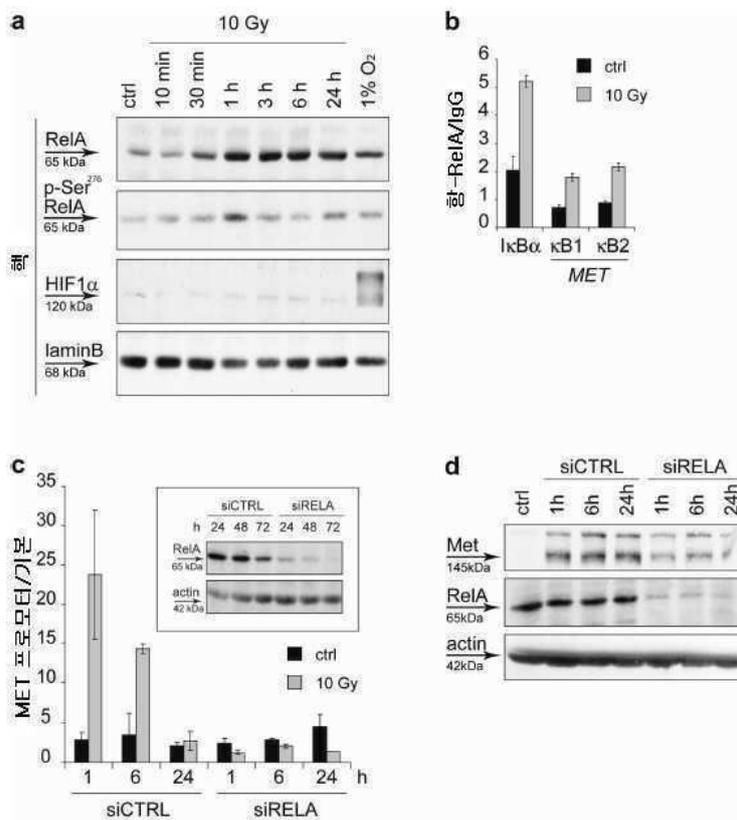
[0122] 본 발명의 원리는 동일하면서, 구성 및 구체예들의 세부적인 사항들은 본 발명의 범위를 벗어나지 않고, 실시예를 통하여 단순히 설명된 것에 대해 광범위하게 변화될 수 있다.

도면

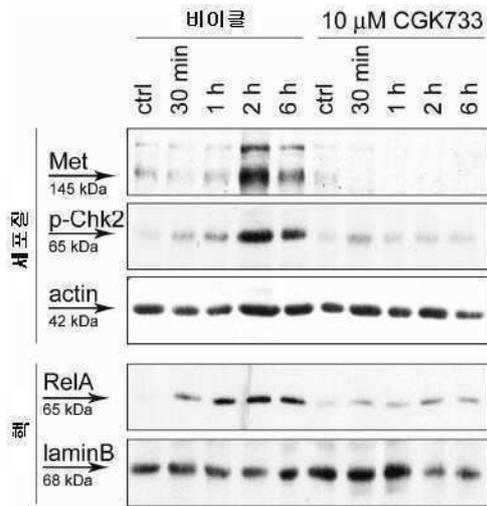
도면1



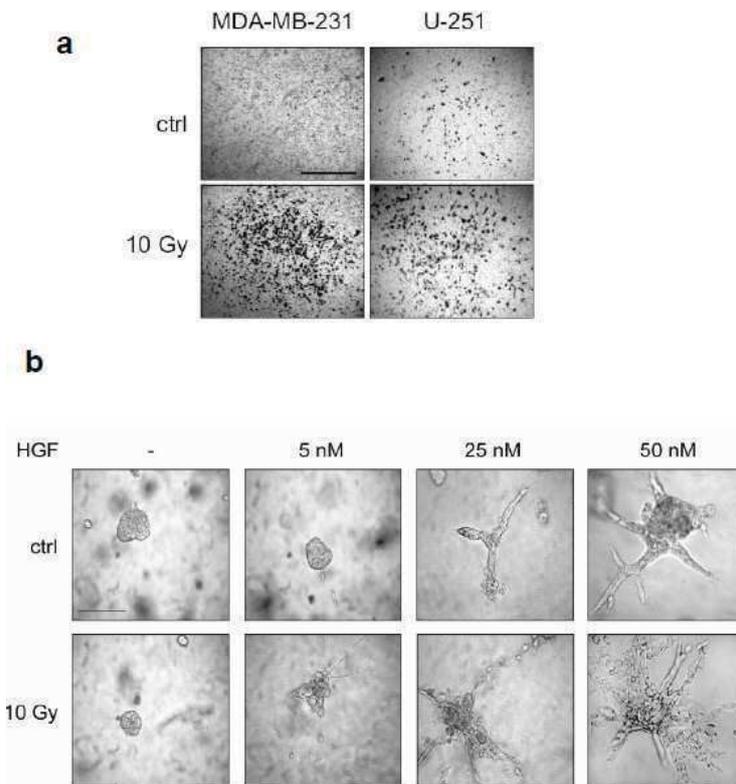
도면2



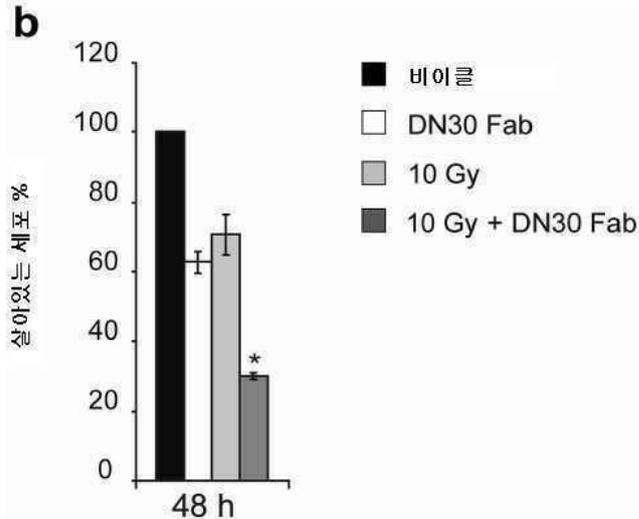
도면3



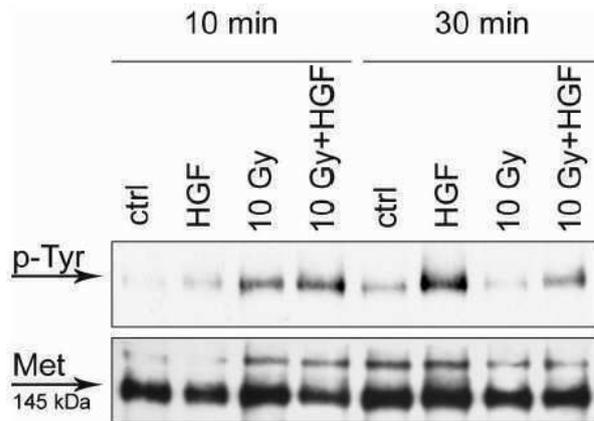
도면4



도면5



도면6



도면7

<i>Mus musculus</i>		-----
<i>Homo sapiens</i>	-1285	ATGGTGTGAAGGACACCTGACTGGGCTGAAAGCTAAGTTCTAACTTTGCC
<i>Mus musculus</i>	-714	-----CGTACGGGCT-GT
<i>Homo sapiens</i>	-1235	CCTCTTACTAACCAGCTATGTGACTCTCCTGGGAACTTTATAGGACTCAG
<i>Mus musculus</i>	-702	TTTATTTCATCTGCAAAAT-GATTCCGTGCAGGCCTCCAAAACTGTAAATAG
<i>Homo sapiens</i>	-1185	TTTCTTACCTGCAAAAT-GGTTCAATGCAAGACTTTAGTAACGTAAATGG
<i>Mus musculus</i>	-653	GAACTTTCCTTTTCCATCAAACCTGAGGAGTGGTGAGGTAACCGCTCTTG
<i>Homo sapiens</i>	-1087	GAACTTTCCTTTTCCATAAACTGGGGAATCAAGAGGTAATCTCTTTTGA

도면8

a) - SEQ ID No. :11

```

atgggatgga gctatatcat cctctctttg gtagcaaaag ctacagatgg ccactcccag 60
gtccaaactgc agcagcctgg gactgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagctgtcc 120
tgcaaggcttt ctggctacac ctccaccagt tactggatcc actgggtgaa gtagaggcct 180
ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aabcttagca ggggpcgtac taactacaac 240
gagaaattca agaacaaggt cacagtgact gtagacaaat ctccaccacc agcttacatg 300
caactcagca acctgacatc tgaggactct gcggctctatt actgtgcaag taggggttac 360
tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacagcccc atcggtctat 420
ccactggccc ctgtgtgtgg aatataaact ggctcctogg tgactctagg atgctctgtc 480
aagggttatb tccctgagcc agtgaccttg acctggaact ctggatccct gtcagtggtt 540
gtgcacacct tcccagctgt cctgcagctt gacctctaca cctccagcag ctcagtgact 600
gtaacctcga gcacctggcc cagccagctc atcaacctga atgtggccca cccggcaagc 660
agcaccaaag tggacaagaa aabtgagccc agagggccca caatcaagcc ctgtctctca 720
tgcaaatgcc cagcaccctaa cctcctgggt ggaccatccg tcttcaacct cctccaaaag 780
atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc cccatagcca catgtgggtt ggtggatgtg 840
agcagggatg acccagatgt ccagatcagc tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca 900
gctcagacac aaacccatag agaggattac aacagtactc tccgggtggt cagtgccttc 960
cccctccagc accaggactg gatgagtggc aaggagtcca aatgcaaggt caacaacaaa 1020
gacctcccag cgcacatcga gagaaccatc tcaaaaccca aagggtcagt aagagctcca 1080
caggtatatg tcttgctccc accagaagaa gagatgacta agaaacaggt cactctgacc 1140
tgcatggtca cagacttcat gcttgaagac atttactgtg agtggacca caacgggaaa 1200
acagagctaa actacaagaa cactgaacca gtcttgact ctgatggttc ttactctatg 1260
tacagcaagc tgagagtgga aaagaagAAC tgggtggaaa gaaatagcta ctctgttcca 1320
gtggtccacg agggctctga caatcaccac acgactaaga gctctctccg gactccgggt 1380
aaatga 1386
    
```

b) - SEQ ID No. :10

```

MGWSYIILFLVATIDGHSQVLQQPTELKPKGASVRLSCKASGYTFTSYWIHWVKRPGQGLEWIGEINBSSGRIN
YNEKFNKIVTVVDKSSITAYMQLSNLISEDSAVYYCAASRGYWGQGITLLVSSAKITAPSVIPLAPVCNITGSSVIL
GCLVKGYFPEFPTLITWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVYVTSSTWPSQSIICNVVAHPASSIKVDKRIEPRGPT
IKPCPPKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLSPVTCVVVDVSEDDPDQISWFWVNNVVEVHIAQTQTHREDYNS
ILRVVSALEPQHQDWSGKREKFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSSVRAPQVTVLPPPEEMTKKQVLTICMVTDFMPED
IYVEWINNGKTELNYKNTIEFVLDSGSIYFMYSKLVRKKNWVERNSISCSVVHEGLNHHITKSFRIIPGK
    
```

도면9

a) - SEQ ID No. :19

```

atggagacag acacaactcc gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60
gacattgtgc tgacccaatc tccagcctct ttgctgtgtt ctctaggcca gaggccacc 120
atctctctgca agccacgcca aagtcttgat tatgatgggq gtagttatat gagtgggttc 180
caacagagac caggacagcc acccaaaact ctctctctct ctgcaccca tctagaactc 240
gggatcccag ccaggtttag tggcagtggc tctgggacag acttcaacct caatatccat 300
cctgtggagg aggaggatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtatcga ggtcccgctc 360
acgtctcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 420
atcttcccac catccagtga gcagttaaac tctggagggg cctcagctgt gctgctcttg 480
aaacaactct accccaaaaga catcaatgtc aagtgggaaga ttgatggcag tgaacgacaa 540
aatggcgctc tgaacagtgt gactgabcag gacacgaaa acagacacta cagcatgagc 600
agcaccctca cgttgaccaa ggaagagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660
acctacaaga cactcacttc acccaatgct aagagctcca acaggaatga gctgttag 717
    
```

b) - SEQ ID No. :18

```

MEIDTILLWULLLVPGSTGDIVLIQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVYDGGSYMSWFQQRPGQPKLLISAASNL
ESGIPARFSGSGGTDFTLNIHPVEEDVATYYCQQSYEDPLTFGAGTKLELNRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASV
YCFLLNNFYPKDINRWKLDGSEKQVGLNSWTDQSDKSTYSMSSTLILTKDEYERHNSYTCATEHTKISTSPIVKSFN
RNEC
    
```

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Methersis Translational Research SA

<120> MET inhibitors for enhancing radiotherapy efficacy

<130> BEP14021-CF

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial

<220><223> siRNA 1 against p65/RelA

<400> 1

ggauugagga gaaacguaau u 21

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> artificial

<220><223> siRNA 2 rev. against p65/RelA

<220><221

> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> n is a, c, g, or u

<400> 2

nuuuccuaca agcucguggg uu 22

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial

<220><223> siRNA 3 - against p65/RelA

<400> 3

cccacgagcu uguaggaaau u 21

<210> 4

<211> 22

<212> RNA

<213> artificial

<220><223> siRNA 4 - rev - against p65/RelA  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> n is a, c, g, or u  
  
 <400> 4  
 nuuuccuaca agcucguggg uu 22  
 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> artificial  
 <220><223> siRNA 5 - against p65/RelA  
 <400> 5  
 ggcuauaacu cgccuagugu u 21  
 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> artificial  
 <220><223> siRNA 6 - rev. against p65/RelA  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> n is a, c, g, or u  
 <400> 6  
 ncacuaggcg aguauagcc uu 22  
  
 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> artificial  
 <220><223> siRNA 7 - against p65/RelA  
 <400> 7  
 ccacacaacu gagcccaugu u 21  
 <210> 8  
 <211> 22  
 <212> RNA

<213> artificial  
 <220><223> siRNA 8 - rev- against p65/RelA  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> n is a, c, g, or u  
 <400> 8  
 ncaugggcuc aguugugugg uu 22  
 <210> 9  
 <211> 19  
 <212> RNA  
 <213> artificial  
 <220><223>  
 > siRNA - control sequence  
 <400> 9  
 auguauuggc cuguauuag 19  
 <210> 10  
 <211> 461  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220><223> DN30 heavy chain  
 <400> 10  
 Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp  
 1 5 10 15  
 Gly His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Lys  
 20 25 30  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45  
 Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60  
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn  
 65 70 75 80  
 Glu Lys Phe Lys Asn Lys Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr  
 85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Val Cys Gly Asn Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val

145 150 155 160

Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser

165 170 175

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

180 185 190

Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser

195 200 205

Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val

210 215 220

Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro

225 230 235 240

Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile

245 250 255

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

260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln

275 280 285

Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln

290 295 300

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

305 310 315 320

Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys

325 330 335

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



gtaacctcga gcacctggcc cagccagtcc atcacctgca atgtggccca cccggcaagc 660  
 agcaccaagg tggacaagaa aattgagccc agagggccca caatcaagcc ctgtcctcca 720  
 tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttgggt ggaccatccg tcttcatttt ccttccaag 780  
 atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc cccatagtca catgtgtggt ggtggatgtg 840  
 agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca 900  
 gctcagacac aaacccatag agaggattac aacagtactc tccgggtggt cagtgcctc 960

cccatccagc accaggactg gatgagtggc aaggagtcca aatgcaaggt caacaacaaa 1020  
 gacctcccag cgcccatcga gagaaccatc tcaaaaccca aagggtcagt aagagctcca 1080  
 caggtatatg tcttgcctcc accagaagaa gagatgacta agaaacaggt cactctgacc 1140  
 tgcattgtca cagacttcat gcctgaagac atttactggg agtggacca caacgggaaa 1200  
 acagagctaa actacaagaa cactgaacca gtcctggact ctgatgggtc ttacttcatg 1260  
 tacagcaagc tgagagtgga aaagaagaac tgggtggaaa gaaatagcta ctctgttca 1320  
 gtgttccacg aggttctgca caatcaccac acgactaaga gcttctcccg gactccgggt 1380

aaatga 1386

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> DN30 heavy chain - CDR-H1

<400> 12

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> DN30 heavy chain - CDR-H2

<400> 13

Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr

1 5

<210> 14

<211> 5

<212> PRT



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

<210> 19

<211> 717

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> DN30 light chain

<400> 19

atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60  
gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggca gagggccacc 120  
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg gtagttatat gagtgggttc 180  
caacagagac caggacagcc acccaaaactc ctcatctctg ctgcatccaa tctagaatct 240  
gggatcccag ccaggtttag tggcagtggc tctgggacag acttcacct caatatccat 300  
cctgtggagg aggaggatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagttatga ggatccgctc 360

acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 420  
atcttccac catccagtga gcagttaaca tctggagtg cctcagtcgt gtgcttcttg 480  
aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtgaaga ttgatggcag tgaacgacaa 540  
aatggcgtcc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc 600  
agcacctca cgttgaccaa ggacagatga gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660  
actcacaaga catctacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgttag 717

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> DN30 light chain - CDR-L1

<400> 20

Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Gly Ser Tyr

1                    5                    10

<210> 21

<211> 3

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> DN30 light chain - CDR-L2

<400> 21

Ala Ala Ser

1

<210> 22

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220><223> DN30 light chain - CDR-L3  
 <400> 22  
 Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Leu Thr  
 1                    5  
 <210> 23  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
  
 <220><223> CDR-L1 nucleotide  
 <400> 23  
 aaagtgttga ttatgatggt gtagttata t                    31  
 <210> 24  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220><223> CDR-L2 nucleotide  
 <400> 24  
 gctgcatcc                    9  
 <210> 25  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220><223> CDR-L3 nucleotide  
 <400> 25  
 cagcaaagtt atgaggatcc gctcacg                    27  
 <210> 26  
 <211> 21  
 <212> DNA  
  
 <213> artificial  
 <220><223> primer NFKBIA

<400> 26  
 gaaccccagc tcagggttta g 21  
 <210> 27  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220><223> primer rev. NFKBIA  
 <400> 27  
 gggaatttcc aagccagtca 20  
 <210> 28  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220><223> primer kB1  
 <400> 28  
 aggcccagtg ccttattacc a 21  
 <210> 29  
 <211> 19  
 <212>  
 > DNA  
 <213> artificial  
 <220><223> primer kB1 rev.  
 <400> 29  
 gcggcctgac tggagattt 19  
 <210> 30  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220><223> primer kB2  
 <400> 30  
 gggactcagt ttctttacct gcaa 24  
 <210> 31  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<220><223> primer kB2 rev.  
 <400> 31  
 gggactcagt ttccttacct gcaa 24  
 <210> 32  
 <211> 199  
  
 <212> DNA  
 <213> homo sapiens  
 <400> 32  
 atggtgtgaa ggacacctga ctgggctgaa agctaagttc taactttgcc cctcttacta 60  
 accagctatg tgaactctct gggaactttt agggactcag tttctttacc tgcaaaatgg 120  
 ttcaatgcaa gacttttagta acgtaatggg aactttcctt ttccataaaa ctggggaatc 180  
 aagaggtaat ctcttttga 199  
 <210> 33  
 <211> 111  
 <212> DNA  
 <213> mus musculus  
 <400> 33  
 cgtacgggct gttttattca tctgcaaaat gattccgtgc aggcctcaa aactgtaata 60  
 ggaactttcc ttttccatca aactgaggag tggtgaggta aaccgctctt g 111

**【심사관 직권보정사항】**  
**【직권보정 1】**  
**【보정항목】** 청구범위  
**【보정세부항목】** 청구항 제10-12항  
**【변경전】**  
 청구항 8에 있어서  
**【변경후】**  
 청구항 9에 있어서