



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201111781 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：099128075

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 08 月 23 日

(51)Int. Cl.：

G01N33/574 (2006.01)

G01N33/577 (2006.01)

(30)優先權：2009/08/21 歐洲專利局

09305777.6

2009/08/21 美國

61/235,864

2010/05/25 美國

61/348,005

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

法國

(72)發明人：構特斯區 利萊恩 GOETSCH, LILIANE (FR)；喬安納德 亞歷山卓

JOUHANNEAUD, ALEXANDRA (FR)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：25 項 圖式數：12 共 108 頁

(54)名稱

新穎抗 c M E T 抗體及其用於檢測及診斷癌症的用途

NOVEL ANTI-CMET ANTIBODY AND ITS USE FOR THE DETECTION AND THE DIAGNOSTIC OF CANCER

(57)摘要

本發明係有關於預後及/或診斷一病患的一增生性疾病之領域。更詳細地，本發明係有關於可與人類 cMet 受體以及編碼該抗體的胺基酸與核酸序列特异性結合之一種新穎的抗體。本發明也包括該抗體與對應方法用於檢測及診斷與 cMet 的表現作用相關聯之病理性過度增生型致癌疾患之用途。在特定的實施例中，該疾患係與比正常增加的 cMet 多肽表現作用相關聯之致癌性疾患，或與 cMet 的過度表現作用相關的其他任何病變。本發明最後包括至少包含用於預後或診斷特定癌症的該抗體之產物及/或組成物或套組。



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201111781 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：099128075

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 08 月 23 日

(51)Int. Cl.：

G01N33/574 (2006.01)

G01N33/577 (2006.01)

(30)優先權：2009/08/21 歐洲專利局

09305777.6

2009/08/21 美國

61/235,864

2010/05/25 美國

61/348,005

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

法國

(72)發明人：構特斯區 利萊恩 GOETSCH, LILIANE (FR)；喬安納德 亞歷山卓

JOUHANNEAUD, ALEXANDRA (FR)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：25 項 圖式數：12 共 108 頁

(54)名稱

新穎抗 c M E T 抗體及其用於檢測及診斷癌症的用途

NOVEL ANTI-CMET ANTIBODY AND ITS USE FOR THE DETECTION AND THE DIAGNOSTIC OF CANCER

(57)摘要

本發明係有關於預後及/或診斷一病患的一增生性疾病之領域。更詳細地，本發明係有關於可與人類 cMet 受體以及編碼該抗體的胺基酸與核酸序列特异性結合之一種新穎的抗體。本發明也包括該抗體與對應方法用於檢測及診斷與 cMet 的表現作用相關聯之病理性過度增生型致癌疾患之用途。在特定的實施例中，該疾患係與比正常增加的 cMet 多肽表現作用相關聯之致癌性疾患，或與 cMet 的過度表現作用相關的其他任何病變。本發明最後包括至少包含用於預後或診斷特定癌症的該抗體之產物及/或組成物或套組。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關於預後及/或診斷一病患的一增生性疾病之領域。更詳細地，本發明係有關於可與人類cMet受體以及編碼該抗體的胺基酸與核酸序列特異性結合之一種新穎的抗體。本發明也包括該抗體與對應方法用於檢測及診斷與cMet的表現作用相關聯之病理性過度增生型致癌疾患之用途。在特定的實施例中，該疾患係與相對於正常而言之增加的cMet多肽表現作用相關聯之致癌性疾患，或與cMet的過度表現作用相關之其他任何病變。本發明最後包括至少包含用於預後或診斷特定癌症的該抗體之產物及/或組成物或套組。

【先前技術】

以受體酪胺酸激酶(RTK)為標的之藥劑諸如曲妥珠單株抗體(trastuzumab)、西妥昔單株抗體(cetuximab)、貝伐珠單株抗體(bevacizumab)、伊馬替尼(imatinib)及吉非替尼(gefitinib)抑制劑，已例證以該蛋白類型為標的而用於治療所選定癌症之益處。

cMet係亦包括RON與SEA之RTK次家族的原型成員。CMet RTK家族在結構上不同於其他RTK家族，及係已知對於亦稱作分散因子(SF)的肝細胞生長因子(HGF)具高親和力之唯一受體[D. P. Bottaro等人於1991年期刊“Science”第251期第802-804頁乙文；L. Naldini等人於1991年期刊“Eur. Mol. Biol. Org. J.”第10期第2867-2878頁乙文]。cMet與HGF

在多種組織中廣泛地表現，及其等的表現作用一般分別侷限於上皮與間質來源的細胞[M.F. Di Renzo等人於1991年期刊“Oncogene”第6期第1997-2003頁乙文；E. Sonnenberg等人於1993年期刊“J. Cell. Biol.”第123期第223-235頁乙文]。其等皆為正常的哺乳類動物發育所需，及已顯示在細胞遷移、形態發生分化作用、三維管狀結構的編排以及生長作用與血管生成中特別重要[F. Baladt等人於1995年期刊“Nature”第376期第768-771頁乙文；C. Schmidt等人於1995年期刊“Nature”第373期第699-702頁乙文；Tsarfaty等人於1994年期刊“Science”第263期第98-101頁乙文]。雖然已顯示cMet與HGF的受控型調節作用攸關哺乳類動物的發育、組織維護與修復[Nagayama T、Nagayama M、Kohara S、Kamiguchi H、Shibuya M、Katoh Y、Itoh J、Shinohara Y.於2004年5月期刊“Brain Res.”第999(2)期第155-66頁乙文；Tahara Y、Ido A、Yamamoto S、Miyata Y、Uto H、Hori T、Hayashi K、Tsubouchi H.於2003年期刊“J Pharmacol Exp Ther.”第307(1)期第146-51頁乙文]，其等的失調則涉及癌症的惡化。

由不當的cMet活化作用所驅動之異常的訊息傳遞作用，係在人類癌症中最常觀察到的變化之一，及在腫瘤形成與轉移中扮演一關鍵角色[Birchmeier等人於2003年期刊“Nat. Rev. Mol. Cell Biol.”第4期第915-925頁乙文；L. Trusolino與Comoglio P. M.於2002年期刊“Nat Rev. Cancer”第2(4)期第289-300頁乙文]。

可藉由配體依賴性與非依賴性機制，其包括cMet的過度表現作用及/或旁分泌或自分泌活化作用或經由獲得功能突變，而引發不當的cMet活化作用[J. G. Christensen、Burrows J.及Salgia R.於2005年期刊“Cancer Letters”第226期第1-26頁乙文]。然而，需要在配體存在或不存在下之cMet受體的低聚合作用，以調節激酶對於ATP與含有酪胺酸的肽受質之結合親和力與結合動力學[Hays JL、Watowich SJ於2004年8月17日期刊“Biochemistry”第43期第10570-8頁乙文]。活化型cMet募集訊息受動器至其位於細胞質域中之多重對接位置，造成數種關鍵性訊息傳遞途徑包括Ras-MAPK、PI3K、Src及Stat3的活化作用[Gao CF、Vande Woude GF於2005年期刊“Cell Res”第15(1)期第49-51頁乙文；Furge KA、Zhang YW、Vande Woude GF於2000年期刊“Oncogene”第19(49)期第5582-9頁乙文]。該等途徑係腫瘤細胞增生、入侵及血管生成作用所必需，及為逃避細胞凋亡所必需[Furge KA、Zhang YW、Vande Woude GF於2000年期刊“Oncogene”第19(49)期第5582-9；Gu H、Neel BG於2003年3月期刊“Trends Cell Biol.”第13(3)期第122-30頁乙文；Fan S、Ma YX、Wang JA、Yuan RQ、Meng Q、Cao Y、Lattera JJ、Goldberg ID、Rosen EM於2000年4月27日期刊“Oncogene”第19(18)期第2212-23頁乙文]。此外，cMet訊息傳遞作用相對於其他RTK之一獨特面向，係在於所報導之其與病灶性黏附複合體及非激酶結合對象諸如 $\alpha 6 \beta 4$ 整合素[Trusolino L、Bertotti A、Comoglio PM於2001年期刊“Cell”

第107期第643-54頁乙文]、CD44v6 [Van der Voort R、Taher TE、Wielenga VJ、Spa精胺酸aren M、Prevo R、Smit L、David G、Hartmann G、Gherardi E、Pals ST於1999年期刊“J Biol Chem.”第274(10)期第6499-506頁乙文]、普列辛(Plexin) B1或腦信號蛋白(semaphorin)[Giordano S、Corso S、Conrotto P、Artigiani S、Gilestro G、Barberis D、Tamagnone L、Comoglio PM於2002年期刊“Nat Cell Biol.”第4(9)期第720-4頁乙文；Conrotto P、Valdembri D、Corso S、Serini G、Tamagnone L、Comoglio PM、Bussolino F、Giordano S於2005年期刊“Blood”第105(11)期第4321-9頁乙文；Conrotto P、Corso S、Gamberini S、Comoglio PM、Giordano S於2004年期刊“Oncogene”第23期第5131-7頁乙文]之交互作用，其可進一步增添該受體對於細胞功能的調節作用之複雜性。最後，新近的數據顯示cMet可能涉及腫瘤對於吉非替尼(gefitinib)或厄洛替尼(erlotinib)之抗性，暗示同時以EGFR與cMet為標的之化合物組合物可能具有顯著的益處[Engelman JA等人於2007年期刊“Science”第316期第1039-43頁乙文]。

在過去數年間，已發展出用於減弱癌細胞株中的cMet訊息傳遞作用之多種不同的策略。該等策略包括i)對抗cMet或HGF/SF的中和抗體[Cao B、Su Y、Oskarsson M、Zhao P、Kort EJ、Fisher RJ、Wang LM、Vande Woude GF於2001年期刊“Proc Natl Acad Sci U S A”第98(13)期第7443-8頁乙文；Martens T、Schmidt NO、Eckerich C、Fillbrandt R、

Merchant M、Schwall R、Westphal M、Lamszus K於2006年期刊“Clin Cancer Res.”第12(20)期第6144-52頁乙文]或使用 HGF/SF拮抗劑NK4以阻止配體與cMet結合[Kuba K、Matsumoto K、Date K、Shimura H、Tanaka M、Nakamura T於2000年期刊“Cancer Res.”第60期第6737-43頁乙文]；ii)阻斷激酶活性之針對cMet的小型ATP結合位置抑制劑[Christensen JG、Schreck R、Burrows J、Kuruganti P、Chan E、Le P、Chen J、Wang X、Ruslim L、Blake R、Lipson KE、Ramphal J、Do S、Cui JJ、Cherrington JM、Mendel DB於2003年期刊“Cancer Res.”第63期第7345-55頁乙文]；iii)設計干擾接近多重對接位置與RNAi或核糖核酸酵素之SH2域多肽，該多重對接位置與RNAi或核糖核酸酵素係減少受體或配體表現作用。大部分的該等方法展現對於cMet的選擇性抑制作用而產生腫瘤抑制作用，及顯示cMet可能有益於癌症的治療性處置。

【發明內容】

本發明的目標係提供至少一種試劑，其可使用作為用於檢測及/或監控致癌性疾患之一種診斷或預後生物標記，特別是特徵在於cMet的表現作用之該等疾患或藉由異常的cMet表現作用所媒介之該等疾患。

先前未曾報導試圖研發一種可使用作為一種診斷或預後工具之有價值的抗體。在此所述者係符合該標準之新穎抗體。

自下列之詳細說明與實例，將明瞭本發明的其他特性

與優點。

【實施方式】

就第一方面而言，本發明之一標的係以高親和力與較佳為人類cMet的cMet受體(cMet)結合之一種分離抗體或其功能片段或衍生物中之一者，及因而可適合用於診斷由cMet表現作用所媒介之病理性過度增生型致癌疾患之方法中。

“功能片段及/或衍生物”之詞句，將稍後在本說明書中詳細界定。

在此必須瞭解本發明並非有關於天然形式的抗體，亦即其等並非處於其等的天然環境中，而是其等已藉由純化作用自天然來源分離或製得，或者藉由基因重組或藉由化學合成作用製得，及其等可含有如後所述之非天然胺基酸。

更詳細地，如本發明的另一方面，所申請專利者係可與cMet特異性地結合的一種分離抗體或其功能片段或衍生物中之一者，該抗體之特徵在於其所包含之至少一個互補決定區(CDR)係選自包含序列辨識編號1至12或29至39的胺基酸序列之CDR，或包含其序列在與序列1至12或29至39最佳排比後之相同度係至少80%及較佳地85%、90%、95%及98%之至少一個CDR。

一抗體之一“功能片段”係特別指一抗體片段諸如片段Fv、scFv(sc=簡單鏈)、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc或雙鏈抗體，或半衰期已加長之任一片段。該等功能片段將稍後在本說明書中詳細說明。

一抗體之“衍生化合物”或“衍生物”係特別指一種結合蛋白，其係由一個肽鷹架與用以保留其被辨識的能力之原始抗體的至少一個CDR所組成。嫻熟技藝者所熟知之該等衍生化合物，將稍後在本說明書中更詳細地說明。

更佳，本發明包含如本發明可藉由基因重組或化學合成作用製得之抗體、其等的衍生化合物或其等的功能片段。

依據一個較佳的實施例，如本發明之抗體或其衍生化合物或功能片段之特徵在於其係由一種單株抗體所組成。

據瞭解“單株抗體”係指來自一個近似均質性抗體族群之一抗體。更詳細地，一族群中的個別抗體係相同的，除了能以最小比例發現之一些可能天然發生的突變作用之外。換言之，一單株抗體係由自一種單一細胞殖株(例如一融合瘤、以編碼該均質性抗體的一DNA分子轉染之一真核宿主細胞、以編碼該均質性抗體的一DNA分子轉染之一原核宿主細胞等)生長所產生的一均質性抗體所組成，及其特徵一般在於僅一種類與子類的重鏈及僅一類型的輕鏈。單株抗體具有高度特異性，及係導向對抗單一抗原。此外，不同於典型地包括不同抗體而導向對抗不同決定基或抗原決定位之多株抗體製劑，各單株抗體係導向對抗該抗原的單一抗原決定位。

在此必須瞭解本發明並非有關於天然形式的抗體，亦即其等並非取自其等的天然環境，而是自天然來源藉由純化作用分離或製得或藉由基因重組或化學合成作用製得，及因此其等具有如後述之非天然的胺基酸。

在本發明的第一與較佳的實施例中，抗體的CDR將依據IMGT編號系統而界定。

已界定IMGT的獨特編號，俾比較可變域而不論抗原受體、鏈型或物種為何[Lefranc M.-P.於期刊“Immunology Today”第18期第509頁乙文(1997年)/Lefranc M.-P.於期刊“The Immunologist”第7期第132-136頁乙文(1999年)/Lefranc, M.-P.、Pommié, C.、Ruiz, M.、Giudicelli, V.、Foulquier, E.、Truong, L.、Thouvenin-Contet, V.及Lefranc於期刊“Dev. Comp. Immunol.”第27期第55-77頁乙文(2003年)]。在IMGT的獨特編號中，保留性胺基酸始終位於相同位置，例如半胱胺酸23(第一個半胱胺酸)、色胺酸41(保留性TRP)、疏水性胺基酸89、半胱胺酸104(第二個半胱胺酸)、苯丙胺酸或色胺酸118(J-PHE或J-TRP)。IMGT的獨特編號提供架構區(FR1-IMGT：位置1至26、FR2-IMGT：39至55、FR3-IMGT：66至104及FR4-IMGT：118至128)及互補決定區：CDR1-IMGT：27至38、CDR2-IMGT：56至65及CDR3-IMGT：105至117之標準化定界。因間隔係代表未佔用的位置，CDR-IMGT長度(示於括號中間及以點分開如[8.8.13])成為關鍵資訊。IMGT的獨特編號係用於二維圖示中及稱為IMGT珍珠項鍊(Colliers de Perles)[Ruiz, M.與Lefranc, M.-P.於期刊“Immunogenetics”第53期第857-883頁乙文(2002年)/Kaas,Q.與Lefranc, M.-P.於期刊“Current Bioinformatics”第2期第21-30頁乙文(2007年)]，及用於IMGT/3D結構-DB的3D結構中[Kaas, Q.、Ruiz, M.及Lefranc,

M.-P.於期刊“Nucl. Acids Res.”第32期第D208-D210頁之“T細胞受體與MHC結構資料(T cell receptor and MHC structural data)”乙文(2004年)]。

存在三種重鏈CDR與3種輕鏈CDR。在此所用的CDR或CDRs等詞，係依據個案而指含有藉由抗體對於其所辨識的抗原或抗原決定位之親和力而負責結合的大部分胺基酸殘基之該等區域中之一者或該等區域中之數者或甚至全部。

更詳細地，如第一方面，本發明係有關於可與c-Met蛋白特異性地結合之一種分離抗體或其一功能片段或衍生物，其包括i)包含如IMGT編號系統所界定的下列CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3中之至少一者之一重鏈，其中CDR-H1包含序列辨識編號55之序列，CDR-H2包含序列辨識編號56之序列及CDR-H3包含序列辨識編號57之序列；及/或ii)包含如IMGT編號系統所界定的下列CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3中之至少一者之一輕鏈，其中CDR-L1包含序列辨識編號58之序列，CDR-L2包含序列辨識編號59之序列及CDR-L3包含序列辨識編號60之序列。

在一個較佳實施例中，本發明係有關於可與c-Met蛋白特異性地結合之一種分離抗體或其一功能片段或衍生物，其特徵在於包括i)包含如IMGT編號系統所界定的至少下列三種CDR即CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3之一重鏈，其中CDR-H1包含序列辨識編號55之序列，CDR-H2包含序列辨識編號56之序列及CDR-H3包含序列辨識編號57之序列；及/或ii)包含如IMGT編號系統所界定的至少下列三種CDR即

CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3之一輕鏈，其中CDR-L1包含序列辨識編號58之序列，CDR-L2包含序列辨識編號59之序列及CDR-L3包含序列辨識編號60之序列。

為求清楚明瞭，將本發明之序列辨識編號55至60的相同序列歸納於下列第1表中。

第1表

	序列辨識編號	序列(IMGT)
CDR-H1	55	GYX ₁ X ₂ TSX ₃ YX ₄
CDR-H2	56	INX ₅ X ₆ X ₇ GX ₈ X ₉
CDR-H3	57	X ₁₀ RX ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ Y
CDR-L1	58	X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ Y
CDR-L2	59	X ₂₃ X ₂₄ S
CDR-L3	60	QQX ₂₅ NSX ₂₆ PX ₂₇ T

其中：

- X₁：S 或 T
- X₂：I 或 F
- X₃：A 或-
- X₄：F 或 W
- X₅：Y 或 P
- X₆：D 或 S
- X₇：-或 N
- X₈：T 或 R
- X₉：N 或 T
- X₁₀：T 或 A
- X₁₁：D 或 R
- X₁₂：R 或 V
- X₁₃：T 或 G
- X₁₄：F 或 Y
- X₁₅：A 或 L
- X₁₆：-或 M
- X₁₇：-或 D
- X₁₈：Q 或-
- X₁₉：R 或 S
- X₂₀：I 或 S
- X₂₁：Y 或 V
- X₂₂：N 或 S
- X₂₃：Y 或 D
- X₂₄：A 或 T
- X₂₅：S 或 W
- X₂₆：W 或 N
- X₂₇：L 或 P

“-”係指“缺失”(刪除該位置的胺基酸殘基)

如一特定實施例，本發明的抗體或其功能片段或衍生物中之一者之特徵，在於其所包括之一重鏈係包含如IMGT

所界定的下列三種CDR即分別為CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3，其中CDR-H1包含序列辨識編號7之序列，CDR-H2包含序列辨識編號2之序列及CDR-H3包含序列辨識編號8之序列。

如一特定實施例，本發明的抗體或其功能片段或衍生物中之一者之特徵，在於其所包括之一輕鏈係包含如IMGT所界定的下列三種CDR即分別為CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3，其中CDR-L1包含序列辨識編號4之序列，CDR-L2包含序列辨識編號5之序列及CDR-L3包含序列辨識編號6之序列。

如一特定實施例，本發明的抗體或其功能片段或衍生物中之一者之特徵，在於其所包括之一重鏈係包含如IMGT編號系統所界定的下列三種CDR即分別為CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3，其中CDR-H1包含序列辨識編號29之序列，CDR-H2包含序列辨識編號30之序列及CDR-H3包含序列辨識編號31之序列。

如一特定實施例，本發明的抗體或其功能片段或衍生物中之一者之特徵，在於其包括之一輕鏈係包含如IMGT編號系統所界定的下列三種CDR即分別為CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3，其中CDR-L1包含序列辨識編號32之序列，CDR-L2包含序列辨識編號33之序列及CDR-L3包含序列辨識編號34之序列。

換言之，亦可將本發明述為一抗體或其一功能片段或衍生物，其特徵在於包含選自由下列所組成之群組之一重

鏈：

a) 包含如 IMGT 編號系統所界定的下列三種 CDR 之一重鏈，即分別為具有序列辨識編號 7 的序列之 CDR-H1，具有序列辨識編號 2 的序列之 CDR-H2 及具有序列辨識編號 8 的序列之 CDR-H3；及

b) 包含如 IMGT 編號系統所界定的下列三種 CDR 之一重鏈，即分別為具有序列辨識編號 29 的序列之 CDR-H1，具有序列辨識編號 30 的序列之 CDR-H2 及具有序列辨識編號 31 的序列之 CDR-H3。

亦可將本發明述為一抗體或其一功能片段或衍生物，其特徵在於包含選自由下列所組成之群組之一輕鏈：

a) 包含如 IMGT 編號系統所界定的下列三種 CDR 之一輕鏈，即分別為具有序列辨識編號 4 的序列之 CDR-L1，具有序列辨識編號 5 的序列之 CDR-L2 及具有序列辨識編號 6 的序列之 CDR-L3；及

b) 包含如 IMGT 編號系統所界定的下列三種 CDR 之一輕鏈，即分別為具有序列辨識編號 32 的序列之 CDR-L1，具有序列辨識編號 33 的序列之 CDR-L2 及具有序列辨識編號 34 的序列之 CDR-L3。

在另一實施例中，互補性決定區或 CDR 係指如 Kabat 等人所界定之免疫球蛋白的重鏈與輕鏈之高度變異區域 (美國國家衛生院之衛生福利部 (U.S. Department of Health and Human Services) 於 1991 年出版之 Kabat 等人所著“具免疫益處之蛋白質序列 (Sequences of proteins of

immunological interest)”乙書第5版及更新版本)。存在三種重鏈CDR與三種輕鏈CDR。在此,“CDR”與“CDRs”等詞係依個案而用於指含有負責抗體對於其所辨識之抗原或抗原決定位的結合親和力之大部分胺基酸殘基之該等區域中之一或多者或甚至全部。

如另一個特定實施例,本發明的抗體或其功能片段或衍生物中之一者之特徵,在於其所包括之一重鏈係包含如Kabat所界定的下列三種CDR,即分別為CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3,其中CDR-H1包含序列辨識編號9之序列,CDR-H2包含序列辨識編號10之序列及CDR-H3包含序列辨識編號3之序列。

如另一個特定實施例,本發明的抗體或其功能片段或衍生物中之一者之特徵,在於其所包括之一輕鏈係包含如Kabat所界定的下列三種CDR,即分別為CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3,其中CDR-L1包含序列11,CDR-L2包含序列12及CDR-L3包含序列6。

如另一個特定實施例,本發明的抗體或其功能片段或衍生物中之一者之特徵,在於其所包括之一重鏈係包含如Kabat所界定的下列三種CDR編號系統,即分別為CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3,其中CDR-H1包含序列辨識編號35之序列,CDR-H2包含序列辨識編號36之序列及CDR-H3包含序列辨識編號37之序列。

如另一個特定實施例,本發明的抗體或其功能片段或衍生物中之一者之特徵,在於其所包括之一輕鏈係包含如

Kabat所界定的下列三種CDR編號系統，即分別為CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3，其中CDR-L1包含序列辨識編號38之序列，CDR-L2包含序列辨識編號39之序列及CDR-L3包含序列辨識編號34之序列。

界定如本發明之抗體的CDR之另一種方式，可包括測定如IMGT及如Kabat之各CDR的共同殘基。

如另一個實施例，本發明的抗體或其功能片段或衍生物中之一者之特徵，在於其所包括之一重鏈係包含序列辨識編號1、2或3之序列的三種CDR中之至少一者，或包含在與序列辨識編號1、2或3之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之至少一序列。

更詳細地，本發明的抗體或其功能片段或衍生物中之一者之特徵，在於其所包括之一輕鏈係包含序列辨識編號4、5或6之序列的三種CDR中之至少一者，或包含在與序列辨識編號4、5或6之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之至少一序列。

在一個較佳的情況下，本發明的抗體或其功能片段或衍生物中之一者之特徵，在於其所包括之一重鏈係包含下列三種CDR，即分別為CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3，其中：
-CDR-H1包含序列辨識編號1、7、9、29或35之序列，或包含在與序列辨識編號1、7、9、29或35之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列；
-CDR-H2包含序列辨識編號2、10、30或36之序列，或包含在與序列辨識編號2、10、30或36之序列最佳排比之後的相

同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列；及
-CDR-H3包含序列辨識編號3、8、31或37之序列，或包含
在與序列辨識編號3、8、31或37之序列最佳排比之後的相
同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列。

甚至更佳，本發明的抗體或其功能片段或衍生物中之
一者之特徵，在於其所包括之一輕鏈係包含下列三種
CDR，即分別為CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3，其中：

-CDR-L1包含序列辨識編號4、11、32或38之序列，或包含
在與序列辨識編號4、11、32或38之序列最佳排比之後的相
同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列；

-CDR-L2包含序列辨識編號5、12、33或39之序列，或包含
在與序列辨識編號5、12、33或39之序列最佳排比之後的相
同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列；及

-CDR-L3包含序列辨識編號6或34之序列，或包含在與序列
辨識編號6或34之序列最佳排比之後的相同度至少80%及
較佳85%、90%、95%及98%之一序列。

在又一個實施例中，亦可將本發明述為一抗體或其一
功能片段或衍生物，其特徵在於其係選自由下列所組成之
群組：

a)一抗體或其一功能片段或衍生物，其包括：

-包含如IMGT所界定的下列三種CDR之一重鏈，即分
別為具有序列辨識編號7的序列之CDR-H1，具有序列辨識
編號2的序列之CDR-H2及具有序列辨識編號8的序列之
CDR-H3，及

-包含如IMGT所界定的下列三種CDR之一輕鏈，即分別為具有序列辨識編號4的序列之CDR-L1，具有序列辨識編號5的序列之CDR-L2及具有序列辨識編號6的序列之CDR- L3；及

b)一抗體或其一功能片段或衍生物，其包括：

-包含如IMGT所界定的下列三種CDR之一重鏈，即分別為具有序列辨識編號29的序列之CDR-H1，具有序列辨識編號30的序列之CDR-H2及具有序列辨識編號31的序列之CDR- H3；及

-包含如IMGT所界定的下列三種CDR之一輕鏈，即分別為具有序列辨識編號32的序列之CDR-L1，具有序列辨識編號33的序列之CDR-L2及具有序列辨識編號34的序列之CDR- L3。

在本說明書中，“多肽”、“多肽序列”、“肽”及“與抗體化合物或與其等的序列連接之蛋白質”等詞係可互換的。

在此必須瞭解本發明並非有關於天然形式的抗體，亦即其等並非取自其等的天然環境，而是自天然來源藉由純化作用分離或製得或藉由基因重組或化學合成作用製得，及因此其等具有如後述之非天然的胺基酸。

為求更加清楚明瞭，必需瞭解在下列說明中，及更特別地在第3a與4a表中，將藉由IMGT編號、kabat編號及藉由共同編號界定稱作224D10之抗體的CDR。

共同編號係將藉由IMGT與Kabat編號系統界定的CDR所共同之各CDR的殘基部份重新編組。

IMGT編號系統係依據所界定的IMGT系統界定CDR，而kabat編號系統係依據如上所界定的kabat系統界定CDR。

更詳細地，CDR-H1係由共同編號系統中之序列辨識編號1(TSAYF)、由IMGT編號系統中之序列辨識編號7(GYSITSAYF)及由kabat編號系統中之序列辨識編號9(TSAYFWS)所組成。

CDR-H2係由共同與IMGT編號系統中之序列辨識編號2(INYDGTN)及由kabat編號系統中之序列辨識編號10(FINYDGTNNYNPSLKN)所組成。

CDR-H3係存在於共同與kabat編號系統中之序列辨識編號3(DRTFAY)，然而其係由IMGT編號系統中之序列辨識編號8(TRDRTFAY)所組成。

就輕鏈而言，CDR-L1係由共同與IMGT編號系統中之序列辨識編號4(QRIYNY)及由kabat編號系統中之序列辨識編號11(RASQRIYNYLH)所組成。

關於CDR-L2，其係由共同與IMGT編號系統中之序列辨識編號5(YAS)及由kabat編號系統中之序列辨識編號12(YASQSIG)所組成。

最後，CDR-L3係由三種編號系統中之各者的序列辨識編號6(QQSNSWPLT)所組成。

嫻熟技藝者可輕易地在抗體221C9達成相同者。

平行地，為求更加清楚明瞭，必需瞭解在下列說明中及更特別地在第3b與4b表中，將藉由IMGT編號與藉由kabat編號而界定稱作221C9之抗體的CDR。

在本發明的觀念中，二個核酸或胺基酸序列之間的“相同度百分比”，係指在最佳排比之後在所比較的二個序列之間之所得之相同核苷酸或胺基酸殘基的百分比，該百分比純粹是統計數字及該二序列之間的差異係沿著其等的長度隨機分布。二個核酸或胺基酸序列之比較，習知地係在使該等序列最佳排比之後藉由比較其等而進行，該比較作用可藉由片段或藉由使用一種“排比視窗”進行。除了手動比較之外，可藉由史密斯(Smith)與華特曼(Waterman)的局部相同演算法(1981年)[期刊“Ad. App. Math.”第2期第482頁乙文]、藉由尼德曼(Neddleman)與翁施(Wunsch)的局部相同演算法(1970年)[期刊“J. Mol. Biol.”第48期第443頁乙文]、藉由皮爾遜(Pearson)與李卜曼(Lipman)的相似性搜尋方法(1988年)[期刊“Proc. Natl. Acad. Sci. USA”第85期第2444頁乙文]或藉由使用該等演算法的電腦軟體(美國威斯康辛州麥迪遜(Madison)科學道575號之遺傳學電腦集團(Genetics Computer Group)之威斯康辛遺傳學軟體包(Wisconsin Genetics Software Package)中的GAP、BESTFIT、FASTA及TFASTA，或藉由比較軟體BLAST NR或BLAST P)，進行待比較序列的最佳排比。

二個核酸或胺基酸序列之間的相同度百分比，係藉由比較經最佳排比的二個序列而測定，其中相較於用於該二序列之間的最佳排比之參考序列，所比較的該核酸或胺基酸序列可能具有添加或刪除作用。相同度百分比之計算係藉由測定該二序列之間之具有相同的胺基酸或核苷酸殘基

之位置數目，相同的位置數目除以排比視窗中的位置總數及將結果乘以100，而得該二序列之間的相同度百分比。

例如，能以原設參數(特別是參數“開放間隔罰分”：5及“延伸間隔罰分”：2；所選擇的矩陣例如為該程式所提議之“BLOSUM 62”矩陣)，使用在網址<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>可取得之BLAST程式“BLAST 2序列(BLAST 2 Sequences)”(Tatusova等人於1999年期刊“FEMS Microbiol. Lett.”第174期第247-250頁之“Blast 2序列-用於比較蛋白質與核苷酸序列之一種新工具(BLAST 2 Sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences)”乙文)；所比較的該二序列之間的相同度百分比，係藉由該程式直接計算。

就所展現與一參考胺基酸序列的相同度係至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之胺基酸序列而言，較佳實例係包括該等含有該參考序列、特定的修飾作用及特別是至少一個胺基酸的刪除、添加或取代作用、截斷或延伸作用者。在一或多個相鄰或非相鄰胺基酸的取代作用之情況下，取代作用較佳係其中藉由“等效”胺基酸置換所取代的胺基酸。在此，“等效胺基酸”一詞係意欲指可能取代結構胺基酸中之一者然而不改變對應抗體的生物活性及為下列所界定的該等特定實例中之任一胺基酸。

可在其等與所取代的胺基酸之結構相同性上，或在可能產生的不同抗體之間的生物活性比較試驗之結果上，判定等效胺基酸。

作為一個非限制性實例之下列第2表，係歸納可能進行而不造成對應的改質抗體之生物活性顯著變化的可能取代作用；反取代作用係在相同條件下自然可能發生的。

第2表

原始殘基	取代作用
丙胺酸(A)	纈胺酸、甘胺酸、脯胺酸
精胺酸(R)	離胺酸、組胺酸
天冬醯胺酸(N)	麩醯胺
天門冬胺酸(D)	麩胺酸
半胱胺酸(C)	絲胺酸
麩醯胺(Q)	天冬醯胺酸
麩胺酸(G)	天門冬胺酸
甘胺酸(G)	丙胺酸
組胺酸(H)	精胺酸
異白胺酸(I)	白胺酸
白胺酸(L)	異白胺酸、纈胺酸、甲硫胺酸
離胺酸(K)	精胺酸
甲硫胺酸(M)	白胺酸
苯丙胺酸(F)	酪胺酸
脯胺酸(P)	丙胺酸
絲胺酸(S)	蘇胺酸、半胱胺酸
蘇胺酸(T)	絲胺酸
色胺酸(W)	酪胺酸
酪胺酸(Y)	苯丙胺酸、色胺酸
纈胺酸(V)	白胺酸、丙胺酸

在技藝現況中，嫻熟技藝者已知六種CDR之間的最大變異性(長度與組成)係在於三種重鏈CDR，及更詳細地在於該重鏈的CDR-H3。

在一個特定實施例中，本發明係有關於一種鼠類抗體或其衍生化合物或功能片段。

本發明的另一實施例揭露抗體224D10或其功能片段或衍生物中之一者，其所包括之一重鏈係包含基於CDR的“共同”定義之下列三種CDR：

-序列辨識編號1之序列的CDR-H1，或在與序列辨識編號1之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-H1；

-序列辨識編號2之序列的CDR-H2，或在與序列辨識編號2之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-H2；及

-序列辨識編號3之序列的CDR-H3，或在與序列辨識編號3之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-H3，及

包含下列三種CDR之一輕鏈：

-序列辨識編號4之序列的CDR-L1，或在與序列辨識編號4之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-L1；

-序列辨識編號5之序列的CDR-L2，或在與序列辨識編號5之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-L2；及

-序列辨識編號6之序列的CDR-L3，或在與序列辨識編號6之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-L3。

本發明的又一實施例揭露抗體224D10或其功能片段或衍生物中之一者，其所包括之一輕鏈係包含基於IMGT編號系統之下列三種CDR：

- 序列辨識編號7之序列的CDR-H1，或在與序列辨識編號7之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-H1；

- 序列辨識編號2之序列的CDR-H2，或在與序列辨識編號2之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-H2；及

- 序列辨識編號8之序列的CDR-H3，或在與序列辨識編號8之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-H3，及

包含下列三種CDR之一輕鏈：

- 序列辨識編號4之序列的CDR-L1，或在與序列辨識編號4之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-L1；

- 序列辨識編號5之序列的CDR-L2，或在與序列辨識編號5之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-L2；及

- 序列辨識編號6之序列的CDR-L3，或在與序列辨識編號6之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-L3。

本發明的又一實施例揭露抗體224D10或其功能片段或衍生物中之一者，其所包括之一重鏈係包含基於Kabat編號

系統之下列三種CDR：

-序列辨識編號9之序列的CDR-H1，或在與序列辨識編號9之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-H1；

-序列辨識編號10之序列的CDR-H2，或在與序列辨識編號10之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-H2；及

-序列辨識編號3之序列的CDR-H3，或在與序列辨識編號3之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-H3，及

包含下列三種CDR之一輕鏈：

-序列辨識編號11之序列的CDR-L1，或在與序列辨識編號11之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-L1；

-序列辨識編號12之序列的CDR-L2，或在與序列辨識編號12之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-L2；及

-序列辨識編號6之序列的CDR-L3，或在與序列辨識編號6之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-L3。

如本發明之抗體224D10或其功能片段或衍生物中之一者之特徵，係在於其包含依據“共同”編號系統的下列各者：

-包含序列辨識編號1之序列的CDR-H1、序列辨識編號2之序列的CDR-H2及序列辨識編號3之序列的CDR-H3之一

重鏈；及

-包含序列辨識編號4之序列的CDR-L1、序列辨識編號5之序列的CDR-L2及序列辨識編號6之序列的CDR-L3之一輕鏈。

在另一實施例中，如本發明之抗體224D10或其功能片段或衍生物中之一者之特徵，係在於其包含依據IMGT編號系統之下列各者：

-包含序列辨識編號7之序列的CDR-H1、序列辨識編號2之序列的CDR-H2及序列辨識編號8之序列的CDR-H3之一重鏈；及

-包含序列辨識編號4之序列的CDR-L1、序列辨識編號5之序列的CDR-L2及序列辨識編號6之序列的CDR-L3之一輕鏈。

在另一實施例中，如本發明之抗體224D10或其功能片段或衍生物中之一者之特徵，係在於其包含依據Kabat編號系統之下列各者：

-包含序列辨識編號9之序列的CDR-H1、序列辨識編號10之序列的CDR-H2及序列辨識編號3之序列的CDR-H3之一重鏈；及

-包含序列辨識編號11之序列的CDR-L1、辨識編號12之序列的CDR-L2序列及序列辨識編號6之序列的CDR-L3之一輕鏈。

如又一實施例，本發明的抗體224D10或其衍生化合物或功能片段之特徵，在於其所包括之一重鏈可變域序列係

包含序列辨識編號13之胺基酸序列或在與序列辨識編號13之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列；及/或在於其所包括之一輕鏈可變域序列係包含序列辨識編號14之胺基酸序列或在與序列辨識編號14之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列。

更詳細地，本發明的抗體、其衍生物或其功能片段係包括：

a)其所包含的一胺基酸序列在與序列辨識編號13之序列最佳排比之後具有至少80%及較佳85%、90%、95%及98%的相同度之一重鏈序列可變域及/或在與序列辨識編號14之序列最佳排比之後具有至少80%及較佳85%、90%、95%及98%的相同度之一輕鏈可變域序列；及

b)其特徵在於該抗體或其一功能片段或衍生物

-可與c-Met蛋白特異性地結合，及較佳地

-不阻斷配體HGF與c-Met蛋白的結合作用。

在本發明的另一實施例中，揭露抗體221C9或其功能片段或衍生物中之一者，其所包括之一重鏈係包含下列三種CDR：

-序列辨識編號29之序列的CDR-H1，或在與序列辨識編號29之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-H1；

-序列辨識編號30之序列的CDR-H2，或在與序列辨識編號30之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳

85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-H2；及

-序列辨識編號31之序列的CDR-H3，或在與序列辨識編號31之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-H3，及

包含下列三種CDR之一輕鏈：

-序列辨識編號32之序列的CDR-L1，或在與序列辨識編號32之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-L1；

-序列辨識編號33之序列的CDR-L2，或在與序列辨識編號33之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-L2；及

-序列辨識編號34之序列的CDR-L3，或在與序列辨識編號34之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-L3。

本發明的又一實施例揭露抗體221C9或其功能片段或衍生物中之一者，其所包括之一輕鏈係包含下列三種CDR：

-序列辨識編號35之序列的CDR-H1，或在與序列辨識編號35之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-H1；

-序列辨識編號36之序列的CDR-H2，或在與序列辨識編號36之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-H2；及

-序列辨識編號37之序列的CDR-H3，或在與序列辨識編號37之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳

85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-H3，及

包含下列三種CDR之一輕鏈：

-序列辨識編號38之序列的CDR-L1，或在與序列辨識編號38之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-L1；

-序列辨識編號39之序列的CDR-L2，或在與序列辨識編號39之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-L2；及

-序列辨識編號34之序列的CDR-L3，或在與序列辨識編號34之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列的CDR-L3。

換言之，如本發明之分離抗體221C9或其功能片段或衍生物中之一者之特徵，係在於其包括依據IMGT編號系統之下列各者：

-包含序列辨識編號29之序列的CDR-H1、序列辨識編號30之序列的CDR-H2及序列辨識編號31之序列的CDR-H3之一重鏈；及

-包含序列辨識編號32之序列的CDR-L1、序列辨識編號33之序列的CDR-L2及序列辨識編號34之序列的CDR-L3之一輕鏈。

在另一實施例中，如本發明之分離抗體221C9或其功能片段或衍生物中之一者之特徵，係在於其包括依據Kabat編號系統之下列各者：

-包含序列辨識編號35之序列的CDR-H1、序列辨識編

號36之序列的CDR-H2及序列辨識編號37之序列的CDR-H3之一重鏈；及

-包含序列辨識編號38之序列的CDR-L1、序列辨識編號39之序列的CDR-L2及序列辨識編號34之序列的CDR-L3之一輕鏈。

如又一實施例，本發明的抗體221C9或其衍生物或功能片段之特徵，在於其所包括之一重鏈可變域序列係包含序列辨識編號40之胺基酸序列或在與序列辨識編號40之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列；及/或在於其所包括之一輕鏈可變域序列係包含序列辨識編號41之胺基酸序列或在與序列辨識編號41之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列。

更詳細地，本發明的抗體、其衍生物或其功能片段係包括：

a)所包含的一胺基酸序列在與序列辨識編號40之序列最佳排比之後具有至少80%及較佳85%、90%、95%及98%的相同度之一重鏈可變域序列及/或在與序列辨識編號41之序列最佳排比之後具有至少80%及較佳85%、90%、95%及98%的相同度之一輕鏈可變域序列；及

b)其特徵在於該抗體或其一功能片段或衍生物

-可與c-Met蛋白特異性地結合，及較佳地

-不阻斷配體HGF與c-Met蛋白的結合作用。

換言之，亦可將本發明述為一抗體或其一功能片段或

衍生物，其特徵在於其係選自由下列所組成之群組：

a)一抗體或其一功能片段或衍生物，其包括包含胺基酸序列辨識編號13之序列的一重鏈可變域及包含胺基酸序列辨識編號14之序列的一輕鏈可變域；及

b)一抗體或其一功能片段或衍生物，其包括包含胺基酸序列辨識編號40之序列的一重鏈可變域及包含胺基酸序列辨識編號41之序列的一輕鏈可變域。

自上述可瞭解，本發明亦有關於自述於本發明的一抗體所衍生之任一化合物。

更詳細地，本發明的抗體或其衍生化合物或功能片段之特徵，在於該衍生化合物係由包含一個肽鷹架的一種結合蛋白所組成，在該肽鷹架上接枝至少一個CDR，藉此保留初始抗體之所有或部分的抗原結合位辨識性質。

在本發明所述的六種CDR序列中之一或多種序列，亦可存在於不同的免疫球蛋白之蛋白質鷹架上。在該情況下，該蛋白質序列使其可能產生一個有利於所接枝的CDR摺疊之肽骨架，而得以保留其等的抗原結合位抗原辨識性質。

一般而言，嫻熟技藝者瞭解如何測定在其上接枝來自原始抗體的至少一個CDR之蛋白質鷹架類型。更詳細地，所選擇的該等鷹架必須符合最多項的下列標準(Skerra A.於2000年期刊“J. Mol. Recogn.”第13期第167-187頁乙文)：

- 良好的種系保留作用；
- 已知三維結構(例如藉由結晶學、NMR光譜學或嫻熟

技藝者所知的其他任何技術)；

-小型尺寸；

-很少或全無轉錄後修飾作用；及/或

-容易生產、表現及純化。

該等蛋白質鷹架的來源可為但不限於選自下列各者之結構：纖維連接蛋白及優先為纖維連接蛋白第III型域10；載脂蛋白；抗運轉蛋白 (Skerra A. 於 2001 年期刊 “J. Biotechnol.” 第 74(4) 期第 257-75 頁乙文)；自金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 之蛋白 A 的 B 域所產生之蛋白 Z；硫氧化還原蛋白 A 或具有一個重複基序諸如“錨蛋白重複序列”(Kohl 等人於 2003 年期刊 “PNAS” 第 100 期第 4 號第 1700-1705 頁乙文)、“狢狢蛋白重複序列”、“富含白胺酸的重複序列”及“三十四肽重複序列”之蛋白質。

亦應提及衍生自毒素諸如例如來自蠍、昆蟲、植物、軟體動物等的毒素及神經型一氧化氮合成酶的蛋白質抑制劑(PIN)之鷹架。

該等併合構造之非限制性的一實例，係在 PIN 的一環中插入一種抗 CD4 抗體即 13B8.2 的 CDR-H1(重鏈)，依此方式所得之新的結合蛋白保留與原始抗體相同的結合性質(Bes 等人於 2006 年期刊 “Biochem. Biophys. Res. Commun.” 第 343(1) 期第 334-344 頁乙文)。在純粹說明的基礎上，亦可提及在新抑癌素(neocarzinostatin)的一環上接枝一種抗溶菌酶 VHH 抗體的 CDR-H3(重鏈)(Nicaise 等人於 2004 年期刊 “Protein Science” 第 13(7) 期第 1882-1891 頁乙文)。

最後，如上述，該等肽鷹架可包含來自原始抗體的1至6種CDR。較佳地，但並非一必要條件，嫻熟技藝者將選擇來自重鏈的至少一種CDR，已知重鏈主要負責該抗體的特異性。一或多種相關CDR之選擇作用係嫻熟技藝者所顯而易見的，嫻熟技藝者則將挑選適宜的已知技術(Bes等人於2001年期刊“FEBSletters”第508期第67-74頁乙文)。

本發明因而係有關於一抗體或其衍生化合物或功能片段，其特徵在於該肽鷹架所選自之蛋白質係a)種系保留作用良好，b)具有穩健的結構，c)具有一種熟知的三維分子編排，d)具小型尺寸及/或e)包含可藉由刪除及/或插入作用而修飾但不改變安定性質之區域。

如一個較佳實施例，本發明的抗體或其衍生化合物或功能片段之特徵，在於該肽鷹架係選自i)來自纖維連接蛋白及優先為纖維連接蛋白第3型域10、載脂蛋白、抗運轉蛋白、自金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)蛋白質A的B域所產生之蛋白質Z、硫氧化還原蛋白A或具有一重複基序諸如“錨蛋白重複序列”(Kohl等人於2003年期刊“PNAS”第100期第4號第1700-1705頁乙文)、“狢狢蛋白重複序列”、“富含白胺酸的重複序列”及“三十四肽重複序列”之蛋白質之鷹架，或iii)神經型一氧化氮合成酶的蛋白質抑制劑(PIN)。

本發明的另一方面係有關於上述抗體的功能片段。

更詳細地，本發明係以一抗體或其衍生化合物或功能片段為標的，其特徵在於該功能片段係選自片段Fv、Fab、(Fab')₂、Fab'、scFv、scFv-Fc與雙鏈抗體或半衰期已加長

之任一片段諸如聚乙二醇化片段。

如本發明之抗體的該等功能片段係包括例如片段Fv、scFv(sc為簡單鏈)、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc或雙鏈抗體；或已藉由化學修飾作用諸如添加聚烯烴基二醇諸如聚乙二醇(聚乙二醇化作用)(聚乙二醇化片段係稱作Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEG及Fab'-PEG)，或藉由納入微脂體、微球體或PLGA中，而增長半衰期之任一片段；該片段具有本發明之至少一種特徵性CDR，其值得注意地能展現其所源自的抗體之整體或甚至部份的活性。

較佳地，該等功能片段將包含或包括衍生其等的抗體之可變重鏈或輕鏈的一個部分序列，該部分序列係足以保留與其所源自的抗體相同的結合特異性及充分的親和力，較佳相當於其所源自的抗體之至少1/100，更佳至少1/10。

該功能片段將含有至少五個胺基酸，較佳含有其所源自的抗體之序列的6、7、8、10、15、25、50或100個相鄰胺基酸。

較佳地，該等功能片段將為Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、F(ab')、scFv-Fc類型或雙鏈抗體，其一般具有與其等所源自的抗體相同的結合特異性。如本發明，本發明之抗體的片段可藉由諸如包括胃蛋白酶或木瓜酶的酵素之分解方法，及/或藉由化學還原作用切開雙硫鍵，而自上述抗體製得。亦可藉由亦為嫺熟技藝者所知的重組遺傳學技術，或藉由例如諸如應用生物系統(Applied BioSystems)公司所銷售的該等自動化肽合成儀之肽合成作用等，而製得抗體片

段。

為求更加清楚明瞭，下列第3a表歸納對應於本發明的抗體224D10之各種胺基酸序列。

第3a表(其中Mu.為鼠類)

抗體	CDR 編號	重鏈	輕鏈	序列辨 識編號
224D10	共同	CDR-H1		1
		CDR-H2		2
		CDR-H3		3
			CDR-L1	4
			CDR-L2	5
			CDR-L3	6
	IMGT	CDR-H1		7
		CDR-H2		2
		CDR-H3		8
			CDR-L1	4
			CDR-L2	5
			CDR-L3	6
	Kabat	CDR-H1		9
		CDR-H2		10
		CDR-H3		3
			CDR-L1	11
			CDR-L2	12
			CDR-L3	6
		Mu.可變域		13
			Mu.可變域	14

為求更加清楚明瞭，下列第3b表歸納對應於本發明的抗體221C9之各種胺基酸序列。

第3b表(其中Mu.為鼠類)

抗體	CDR 編號	重鏈	輕鏈	序列辨 識編號
221C9	IMGT	CDR-H1		29
		CDR-H2		30
		CDR-H3		31
			CDR-L1	32
			CDR-L2	33
			CDR-L3	34
	Kabat	CDR-H1		35
		CDR-H2		36
		CDR-H3		37
			CDR-L1	38
			CDR-L2	39
			CDR-L3	34
		Mu.可變域		40
			Mu.可變域	41

如本發明的另一方面係有關於可分泌如本發明的一單株抗體之一種鼠類融合瘤，特別是2008年3月12日寄存在法國巴黎巴斯德研究院(Institut Pasteur)的CNCM之編號I-3949之鼠類來源的融合瘤。該融合瘤係藉由融合Balb/C免疫小鼠脾細胞與骨髓瘤Sp 2/O-Ag 14系的細胞而製得。

此後稱作224D10之單株抗體或其衍生物或功能片段顯然構成本發明的一部份，及其特徵在於該抗體係由2008年3月12日寄存在CNCM之編號I-3949之融合瘤所分泌。

如本發明的另一方面係有關於可分泌如本發明的一單

株抗體之一種鼠類融合瘤，特別是2010年1月14日寄存在法國巴黎巴斯德研究院(Institut Pasteur)的CNCM之編號I-4273之鼠類來源的融合瘤。該融合瘤係藉由融合Balb/C免疫小鼠脾細胞與骨髓瘤Sp 2/O-Ag 14系的細胞而製得。

此後稱作221C9之單株抗體或其衍生化合物或功能片段顯然構成本發明的一部份，及其特徵在於該抗體係由2010年1月14日寄存在CNCM之編號I-4273之融合瘤所分泌。

本發明之一新穎方面係有關於一種分離核酸，其特徵在於其係選自下列核酸：

a)編碼如本發明之一抗體或編碼其一衍生化合物或功能片段之一核酸、DNA或RNA；

b)一核酸，其所包括之一DNA序列係包含選自由序列辨識編號15至26及42至52之序列所組成之群組之一序列，或包含在與序列辨識編號15至26及42至52之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列；

c)一核酸，其所包括之一DNA序列係包含序列辨識編號27、28、53及/或54之序列，或包含在與序列辨識編號27、28、53及/或54之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列；

d)如a)、b)或c)中所界定的核酸之對應的RNA核酸；

e)如a)、b)與c)中所界定的核酸之互補核酸；及

f)一種具有至少18個核苷酸之核酸，其可在高度嚴格的

條件下與序列辨識編號15至28及42至54之序列或在與序列辨識編號15至28及42至54之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列或其一互補序列之至少一種CDR雜交。

下列第4a表歸納有關本發明的抗體224D10之各種核苷酸序列。

第4a表

抗體	CDR 編號	重鏈	輕鏈	序列辨識 編號
224D10	共同	CDR-H1		15
		CDR-H2		16
		CDR-H3		17
			CDR-L1	18
			CDR-L2	19
			CDR-L3	20
	IMGT	CDR-H1		21
		CDR-H2		16
		CDR-H3		22
			CDR-L1	18
			CDR-L2	19
			CDR-L3	20
	Kabat	CDR-H1		23
		CDR-H2		24
		CDR-H3		17
			CDR-L1	25
			CDR-L2	26
			CDR-L3	20
		Mu.可變域		27
			Mu.可變域	28

下列第4b表歸納有關本發明的抗體221C9之各種核苷酸序列。

第4b表

抗體	CDR 編號	重鏈	輕鏈	序列辨 識編號
221C9	IMGT	CDR-H1		42
		CDR-H2		43
		CDR-H3		44
			CDR-L1	45
			CDR-L2	46
			CDR-L3	47
	Kabat	CDR-H1		48
		CDR-H2		49
		CDR-H3		50
			CDR-L1	51
			CDR-L2	52
			CDR-L3	47
		Mu.可變域		53
			Mu.可變域	54

在本說明書中以可互換方式使用之“核酸”、“核序列”、“核酸序列”、“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“多核苷酸序列”及“核苷酸序列”等詞，係指界定含有或不含有非天然的核苷酸之一核酸的一片段或一區域之經修飾或未經修飾之一精確的核苷酸序列，及係一種雙股DNA、一種單股DNA或該DNA的轉錄產物。

在此亦包括者係本發明並非有關於處於其等天然的染色體環境亦即處於天然狀態之核苷酸序列。本發明的序列

業已經分離及/或純化，亦即其等係例如直接地或間接地取樣一複本，其等的環境已至少部份地被改變。在此亦應提及藉由例如宿主細胞的重組遺傳學所製得或藉由化學合成作用製得之分離核酸。

“在與一較佳序列最佳排比之後展現至少80%及較佳85%、90%、95%及98%的相同度百分比之核序列”，係指相對於參考核序列而言，展現特別是點的特定修飾作用之核序列，尤其諸如一種刪除、截斷、延伸、嵌合融合及/或取代作用。較佳地，其等係編碼與參考序列相同的胺基酸序列之序列，其係與遺傳密碼的簡併有關，或與較佳在高度嚴格及特別是如下所界定的條件下可能與參考序列進行特异性雜交之互補序列有關。

在高度嚴格條件下的雜交作用，係指選擇與溫度及離子強度相關的條件，藉此其等促成維持二個互補DNA片段之間的雜交作用。在純粹說明的基礎上，就界定上述多核苷酸片段之目的所用之雜交步驟的高度嚴格條件，係有利地如下。

DNA-DNA或DNA-RNA雜交作用係以二個步驟進行：

(1)在含有5X SSC(1X SSC係對應於0.15 M氯化鈉+0.015 M檸檬酸鈉之一溶液)、50%甲醯胺、7%十二基硫酸鈉(SDS)、10X丹哈特(Denhardt)溶液、5%硫酸葡聚糖及1%鮭魚精子DNA的磷酸鹽緩衝液(20 mM, pH 7.5)中，在42°C預雜交3小時；(2)在依探針長度而定的一溫度(對於長度超過100個核苷酸的探針即為42°C)進行主要的雜交作用20小時，接著

在20°C及在2X SSC+2% SDS中進行20分鐘的清洗作用二次，在20°C及在0.1X SSC+0.1% SDS中進行20分鐘的清洗作用一次。對於長度超過100個核苷酸的探針，最後的清洗作用係在60°C及在0.1X SSC+0.1% SDS中進行30分鐘。依據 Sambrook 等人所述之程序(冷泉港實驗室(Cold Spring Harbor Laboratory)出版公司於2001年出版之"分子選殖：實驗室手冊(Molecular cloning: a laboratory manual)乙書第三版)，嫻熟技藝者可將上述用於具固定大小的多核苷酸之高度嚴格的雜交條件，修改用於更長或更短的寡核苷酸。

本發明亦有關於包含本發明所述的一核酸之一載體。

本發明係特別以含有該核苷酸序列之選殖及/或表現載體為標的。

本發明的載體較佳地含有促成核苷酸序列在一特定宿主細胞中表現及/或分泌之要素。該載體因此必需含有一啟動子、轉譯起始與終止訊號以及適宜的轉錄調節區域。其必須能夠在宿主細胞中以一穩定的方式維持，及可選擇性地具有規定所轉譯蛋白質的分泌作用之特定訊號。嫻熟技藝者可依據所用的宿主細胞而選擇與最佳化該等不同的要素。就該目的而言，該核苷酸序列可插入所選擇的宿主內之自行複製型載體，或為所選擇宿主之整合型載體。

該等載體係藉由嫻熟技藝者典型所用的方法製備，及所產生的殖株可藉由標準方法諸如脂質轉染作用、電穿孔作用、熱休克或化學方法，而導入一適宜的宿主中。

載體例如為質體或病毒來源之載體。其等係用於將宿

主細胞轉形，以選殖或表現本發明的核苷酸序列。

本發明亦包括宿主細胞，其係藉由如本發明所述的一載體轉形或包含該載體。

宿主細胞可選自原核或真核系統諸如例如細菌細胞，但亦包括酵母菌細胞或動物細胞，特別是哺乳類動物細胞。亦可使用昆蟲或植物細胞。

本發明亦有關於具有如本發明的一轉形細胞之人類以外的動物。

本發明的另一方面係有關於用於生產如本發明的一抗體或其一功能片段之一種方法，其特徵在於該方法包含下列步驟：

a)在一培養基及在適宜的培養條件培養如本發明的一宿主細胞；及

b)回收依此方式自培養基或自所培養的細胞所產生之抗體或其一功能片段。

如本發明的轉形細胞，係用於製備如本發明的重組型多肽之方法中。本發明亦包括用於製備如本發明的重組形式多肽之方法，其特徵在於該方法使用一載體及/或藉由如本發明的一載體轉形之一細胞。藉由如本發明的一載體轉形之一細胞，較佳在促成前述多肽的表現作用及該重組型肽的回收作用之條件下培養。

如上所提及，宿主細胞可選自原核或真核系統。尤其，可能辨識在該原核或真核系統中促進分泌作用之本發明的核苷酸序列。如本發明之具有該序列的一載體，因此可有

利地用於生產所分泌的重組蛋白。誠然，其等存在於細胞培養的上清液而非存在於宿主細胞內之事實，將有助於所感興趣的該等重組蛋白質之純化作用。

本發明的多肽亦可藉由化學合成作用製備。該製備作用的一種方法亦為本發明的一目標。嫻熟技藝者知悉用於化學合成之方法，諸如固相技術(特別見美國伊利諾州洛克福德(Rockford)的皮爾斯(Pierce)化學公司於1984年出版之Steward等人所著“固相肽合成作用(Solid phase peptides synthesis)”第二版)或部分固相技術，藉由片段的縮合作用或藉由在溶液中之習用的合成作用。本發明亦包括藉由化學合成作用所製得及可含有對應的非天然胺基酸之多肽。本發明亦包括可能藉由本發明的方法製得之抗體或其衍生化合物或功能片段。

亦揭露本發明的抗體作為生物標記之用途。該方法可用於檢測或診斷與cMet的表現作用相關聯之各種過度增生性致癌疾患，例如但不限於前列腺癌、骨肉瘤、肺癌、乳癌、子宮內膜癌、神經膠母細胞瘤、結腸癌、胃癌、腎癌或與cMet的表現作用相關聯之其他任何癌症。如具一般技藝者所認知，與一特定疾患相關聯之抗體的表現水平，將依先前存在之病況的性質及/或嚴重性而異。

本發明的抗體以嫻熟技藝者所知的任一習用方式(如局部、非經腸、肌內等)之投藥作用，將提供在一試樣中檢測發育不良細胞之一種非常有用的方法，以及協助臨床醫師在進行與cMet表現作用相關聯或藉由cMet表現作用所媒

介的一種過度增生性疾患之治療的一病患中監測該治療性療法。

在另一實施例中，本發明係有關於用於與cMet的表現作用相關聯之一種致癌疾患的活體內成像之一種藥學組成物，其包含加有標記及在活體內與cMet結合之上述單株抗體或其片段；及一種藥學上可接受的載劑。

將在各種醫學或研究目的中，發現本發明的抗體或其一功能片段或衍生物之用途，包括與cMet的表現作用相關聯之各種病變的檢測、診斷及分期。

分期之判定具有潛在的預後價值，及提供用於設計最佳療法之判據。Simpson等人於期刊“J. Clin. Oncology”第18期第2059頁乙文(2000年)。一般而言，例如乳癌的病理分期係優於臨床分期，因前者提供更準確的預後。然而，若臨床分期與病理分期一樣準確，則以臨床分期為較佳者，因其不需仰賴侵入性程序獲得供病理評估用之組織。

當與適宜的標記或其他適當的可檢測型生物分子或化學製品一起使用時，本發明的抗體特別適用於試管中與活體內的診斷及預後應用。

用於免疫檢定法中之標記係該等嫻熟技藝者眾所周知者，及包括酵素、放射性同位素及螢光、發光與產色物質，包括彩色顆粒諸如膠體金或膠乳珠。適宜的免疫檢定法包括酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)。各種標記類型及將標記與本發明的抗體接合之方法，係該等嫻熟技藝者所熟知及諸如下列所說明者。

如用於此之“與cMet的表現作用相關聯之一種致癌疾患”一詞，係意欲包括罹患該疾患的一個體中所存在之高水平或異常低水平的cMet(異常的)已顯示或疑似造成該疾患的病理生理狀態或為促成該疾患惡化的一因素之疾病與其他疾患。任擇地，該等疾患例如可藉由在罹患該疾患的一個體中之細胞表面上的cMet水平之增加或受影響的細胞或組織中的酪胺酸自磷酸化cMet之增加而證明。例如，使用本發明的抗體224D10可檢測到cMet水平之增加。再者，其係指展現相對地自主性生長之細胞，藉此其等展現特徵在於明顯地喪失對於細胞增生作用的控制之一種異常的生長表現型。任擇地，細胞可能表現正常水平的cMet，但具有增生作用異常之特徵。

在特定的實施例中，涉及cMet之“表現作用增加”係指相對於一對照組而言，蛋白質或基因表現水平展現統計上顯著的表現作用增加(如藉由RNA表現作用或蛋白質表現作用測得)。

更詳細地，考量如本發明所述的一抗體或其一功能片段或衍生物，用於在試管中診斷與cMet的表現作用相關聯之一種致癌疾患或在試管中判定發生與cMet的表現作用相關聯之一種致癌疾患例如與cMet的表現作用相關聯之一種癌症之預後之用途。

如本發明之另一廣泛方面，係有關於診斷病理性過度增生型致癌疾患或一個體對於與cMet表現作用相關聯的一病理性病況之易感性之一種方法，其包括測定在一試樣中

存在或不存在帶有cMet的細胞，及基於該帶有cMet的細胞之存在或不存在而診斷一病理性病況或對於一病理性病況的易感性。本發明的抗體之診斷用途包括原發腫瘤、癌症轉移。抗體能以一種免疫偶聯物或一種帶有標記的抗體之形式存在，以獲得一種可檢測及/或可量化的訊號。

更詳細地，如本發明之一個較佳標的，係在試管中檢測一個體中之一種表現cMet的腫瘤之存在及/或位置之一種方法，其中該方法的步驟包括(a)將來自該個體的一試樣與如本發明的一抗體或其一功能片段或衍生物接觸，及(b)檢測該抗體與該試樣的結合作用。該標的之另一方面，係在臨床試驗期間追蹤c-Met表現作用對於一種以c-Met為標的之療法之反應，及更特別當c-Met受體的向下調節及/或降解作用係試驗化合物的作用機制之一部分時。

如嫻熟技藝者將明瞭者，可藉由不同的分析法顯示本發明的抗體結合作用之檢測。雖然用於進行該分析法之任一方式皆適合本發明，可舉例提及FACS、ELISA或IHC。

如用於此之“試樣”一詞，係意欲指包括或可能包括一贅生細胞之任一生物流體、細胞、組織、器官或其部分，諸如來自含有或疑似含有一贅生細胞的結腸、胃、直腸、乳房、卵巢、前列腺、腎、肺、血液、腦或其他器官或組織之一細胞。該詞包括存在於一個體中之試樣，以及自該個體所獲得或衍生之試樣。例如，一試樣可為藉由生檢所獲得的一樣本之組織切片，或置於或適於組織培養之細胞。一試樣另外可為一種次細胞部分或萃取物，或為一種

粗製或實質上純的核酸分子或蛋白質製劑。

臨床試樣係意欲涵蓋自一個體取得及適用於本發明的程序中之多種試樣類型，諸如例如測定或檢測cMet表現水平之一種診斷或監控用試驗。該定義涵蓋藉由手術切除而得之固體組織試樣、一種病變樣本、一種歸檔試樣或一種生檢樣本、組織培養或自其所得的細胞及其子代，及自該等來源中之任一者所製備的切片或抹片。非限制性實例為自乳房組織、淋巴結、結腸、胰臟、前列腺等所得之試樣。該定義亦涵蓋生物來源的液體試樣，及可指懸浮其中的細胞或細胞片段，或指液體基質及其溶質。

如本發明的另一方面係有關於在試管中測定來自一個體之一種表現cMet的腫瘤中的cMet表現水平之一種方法，其中該方法的步驟包括(a')將來自該個體的一試樣與如本發明的一抗體或其一功能片段或衍生物接觸，及(b')量化與該試樣中的cMet結合之抗體水平。

嫻熟技藝者將明瞭，能以數種方式諸如藉由不同的分析法，而量化與cMet結合之抗體水平。雖然用於進行該分析法之任一方式均適合本發明，一種較佳的方法係利用依據ELISA技術的免疫酵素方法、藉由免疫螢光法、藉由免疫組織化學或放射性免疫分析(RIA)技術或等效者。

生物試樣較佳由一種生物流體所形成，諸如血清、全血、細胞、來自人類的一組織試樣或生物檢體。該試樣例如可包括生檢組織，其可方便地分析是否存在一種與cMet的表現作用相關聯之病理性過度增生型致癌疾患。

一旦測定存在於試驗試樣中的cMet量，結果可與對照組試樣相比較，對照組試樣係以與試驗試樣類似的方式但自不具有或存在與cMet的表現作用相關聯之一種過度增生性致癌疾患的個體獲得。若試驗試樣中的cMet水平顯著升高，結論可為該試樣所源自的個體具有或將發生該疾患的可能性增加。

本發明更詳細地係有關於在試管中診斷一種表現cMet的腫瘤或在試管中判定在一個體中發生一種表現cMet的腫瘤之預後之一種方法，其中該方法的步驟包括(i)如上述測定cMet的表現水平，及(ii)比較步驟(i)的表現水平與來自正常組織或一種未表現cMet的組織之cMet參考表現水平。

如申請案中所用之“診斷”一疾病，係意欲包括例如診斷或檢測是否存在一種與cMet表現作用相關聯或藉由cMet表現作用所媒介的病理性過度增生型致癌疾患，監控該疾病的進程，及預示與cMet表現作用相關聯的一疾患之細胞或試樣之辨識或檢測。

如本申請案中所用之“預後”，係指自一疾病恢復的可能性或對於一疾病的可能發展或結果之預測。例如，若來自一個體的一試樣以本發明的抗體染色之結果為陽性，則該個體的“預後”係優於若該試樣的cMet染色作用為陰性之情況。如將更詳細地說明於後者，可在一適當的量表上，就試樣的cMet表現水平進行評分。

然而本發明的另一方面亦有關於針對以引發c-Met降解作為其等的一作用機制之治療性化合物，監控c-Met的表

現作用。在該情況下，追蹤細胞膜上的c-Met表現作用可為評估臨床試驗期間的治療效能及“個人化”療法之一關鍵工具。

有利地相對於亦稱作一“參考水平”或“參考表現水平”之一對照組細胞或試樣的水平，而比較或測量cMet的表現水平。“參考水平”、“參考表現水平”、“對照組水平”及“對照組”係以可互換方式用於說明書中。廣泛而言，一“對照組水平”係指在通常無疾病或癌症之可比較的對照組細胞中所測得之個別基線水平。其可來自同一個體，或來自正常或不存自其獲致罹病或試驗試樣的同一疾病之另一個體。在本發明的上下文中，“參考水平”一詞係指cMet表現作用的一“對照組水平”，其係用於評估一病患之含有癌細胞的一試樣中之Met表現作用的試驗水平。例如，當一病患之生物試樣中的cMet水平高於cMet的參考水平時，該細胞將被視為具有高的cMet表現水平或過度表現。可藉由多種方法測定參考水平。表現水平因此可界定帶有cMet的細胞，或任擇地界定與表現cMet的細胞數目無關之cMet的表現水平。因此，可藉由cMet的一參考比率而指定用於各病患的參考水平，其中該參考比率可藉由此述用於測定參考水平的任一方法測定。

例如，該對照標準可為具有多種形式的一個預定值。其可為一個單一的切點值，諸如中位數或平均值。“參考水平”可為同等適用於每個病患個體的一個單一數值，或該參考水平可依特定的病患亞族群而異。因此，例如，就相同

的癌症而言，較年長的男性之參考水平可能不同於較年輕的男性，就相同的癌症而言，女性的參考水平可能不同於男性。任擇地，當測試贅生細胞的組織時，可藉由測量來自同一組織的非致癌性癌細胞中之cMet表現水平，而測定“參考水平”。同樣地，“參考水平”可為一病患之贅生細胞中的cMet相對於同一病患之非腫瘤細胞中的cMet水平之一特定比率。“參考水平”亦可為試管中所培養的細胞之cMet水平，其可被操控以刺激腫瘤細胞，或能以其他任何方式操控而產生準確測定參考水平之表現水平。另一方面，能以諸如cMet水平未升高的組別及cMet水平升高的組別之比較組為基礎，而設立“參考水平”。比較組的另一實例係具有一特定疾病、病況或症狀之組別及不具有該疾病之組別。可設置預定值，例如，當受測試的一族群被均等地(或不等地)分組時，諸如一個低風險組、一個中等風險組及一個高風險組或分成四分組或五分組，最低的四分組或五分組係具有最低的風險或最高的cMet量之個體，而最高的四分組或五分組係具有最高的風險或最低的cMet量之個體。

亦可藉由比較具有相同癌症的病患族群中之cMet水平，而決定參考水平。例如可藉由其中以圖解方式呈現整個病患世代之直方圖分析達成，其中第一軸係代表cMet水平，及第二軸係代表其腫瘤細胞表現一特定水平的cMet之該世代病患的數目。藉由識別該世代具有相同或類似的cMet水平之子集族群，可測定二或多個不同組別的病患。然後可基於最佳識別該等不同組別之一水平，而決定參考

水平。一參考水平亦可代表二或多個標記之水平，其中一者為cMet。二或多個標記例如能以各標記水平的數值比代表。

同樣地，一個顯然健康的族群所具有的“正常”範圍，將不同於已知患有與cMet的表現作用相關聯之一病況之族群所具有者。因此，所選的預定值可將一個體所屬的類別納入考量。藉由該等具一般技藝者之例行實驗，即可選擇適當的範圍與類別。“升高”、“增加”係指高於所選的對照組。對照組典型地係以位於適當年齡組別之顯然健康的正常個體為基礎。

亦將瞭解除了預定值之外，如本發明的對照組可為與實驗材料平行進行試驗之材料試樣。實例包括在同一時間自同一個體取得之組織或細胞，例如來自該個體之單一生物檢體的一部份或單一細胞試樣的一部份。

當臨床診斷或監控患有一種cMet媒介型疾病之病患時，若相較於來自一正常個體或非癌性組織之對應生物試樣的水平而檢測到表現cMet的細胞或cMet水平之增加，則通常預示一病患具有或疑似存在一種cMet媒介型疾患。

如上述，本發明提供用於預測癌症易感性之一種方法，其包括檢測一組織試樣中的cMet表現水平，其存在則表明癌症易感性，其中cMet表現的程度係與易感性的程度相關。因此，在特定的實施例中，檢視例如前列腺組織、骨肉瘤組織、肺組織、胰臟組織、結腸組織、乳房組織、神經膠母細胞瘤組織、卵巢組織或疑似表現cMet的細胞之

其他任何組織中的cMet表現作用，若試樣中存在cMet，則提供癌症易感性或發生或存在一種組織特異性腫瘤之徵象。

亦提供用於評估腫瘤侵犯性之一種方法。在一實施例中，用於觀察一個體中之惡性腫瘤隨時間的進程之一種方法，係包括測定一腫瘤試樣中之細胞所表現的cMet水平，及將依此方式所測定的水平與在不同時間點自同一個體所取得之等效組織試樣所表現的cMet水平相比較，其中腫瘤試樣中之隨時間的cMet表現程度則提供有關癌症進程之資訊。

在又一實施例中，本申請案提供用於判定一個體的適當治療程序之方法。更詳細地，本發明的抗體將非常適用於監控一個體中之惡性腫瘤改善的進程，特別是在該個體係以一種cMet抗體治療及該抗體不與本發明的抗體競爭結合cMet之該等該情況下。如本發明的cMet水平之存在與否或改變，可能預示該個體可能具有一種與cMet相關聯的復發性或進行性或持續性癌症。因此，藉由測量表現cMet的細胞數目之增加或存在於不同組織或細胞中的cMet濃度之變化，而可能測定以改善與cMet相關聯的一惡性腫瘤為目標之一特定治療方式是否有效。

本發明的另一標的，係與cMet的表現作用相關聯的一種致癌疾患之一種活體內成像方法。例如，該種方法可用於呈現一種致癌疾患症狀的一病患中。例如，若該病患所具有的cMet表現水平增加，則該病患可能罹患一種癌性疾

患。同時，在先前已診斷患有一種cMet媒介型癌症的病患中，該方法可適用於監控進程及/或對於治療的反應。如上述目標，本發明提供一種活體內成像試劑，其包含如本發明之較佳加有標記及特別是加有放射性標記的一抗體或其一功能片段或衍生物，及其在醫學成像之用途。因此，如本發明的一種通用方法之進行，係藉由對於一病患投予一成像有效量之一顯像試劑諸如上述的標記單株抗體與一種藥學上有效的載劑，然後在與存在於該試樣中的cMet結合之後檢測該試劑。在特定的實施例中，該方法係藉由投予一成像有效量之包含一靶向部分與一活性部分的一顯像劑而進行。該顯像劑係以有效用於一哺乳類動物諸如一人類中的診斷用途之一量投予，然後檢測該顯像劑的局部化與累積作用。可藉由放射核酸鹽成像作用、放射性閃爍攝影術、核磁共振成像作用、電腦斷層攝影、正電子發射斷層攝影術、電腦斷層掃描、X光或磁共振成像方法、螢光檢測及化學發光檢測，檢測顯像劑的局部化與累積作用。

有關研發標靶型抗腫瘤療法方面，以免疫組織技術進行之診斷在原位提供有關受體表現水平的資訊，及因此得以依據該治療所需受體的表現水平，挑選對於治療具易感性的病患。

對於使用單株抗體的免疫療法而言，對於治療之反應係依當以曲妥珠單株抗體(trastuzumab)治療時之標的受體的表現水平而定，其中隨著人化抗Her2單株抗體曲妥珠單株抗體(trastuzumab)之出現，在乳癌中測定Her2的過度表現

現今具有重大的臨床重要性。以曲妥珠單株抗體(trastuzumab)進行治療之一先決條件，係確證Her2的過度表現，因該治療係藉由特異性標定過度表現Her2的癌細胞而發揮作用。準確測試Her2之目的，係確保並未在具有非過度表現型腫瘤的病患中施予昂貴與具潛在毒性的曲妥珠單株抗體(trastuzumab)治療，及確保可能受益於曲妥珠單株抗體(trastuzumab)之病患均領受到適當的治療。

有關曲妥珠單株抗體(trastuzumab)選擇過度表現Her2的病患之教導顯示，當使用一種單株抗體療法時，測定受體表現水平及同時研發可用於病患篩選的一種單株抗體而非一種治療性單株抗體之益處。

結果，本發明係有關於在試管中測定一個體之一腫瘤中的cMet狀況之一種方法，其中該方法的步驟包括(1)如上述測定cMet的表現水平，(2)就該腫瘤的cMet表現水平進行評分，及(3)比較該評分與自一對照組試樣所得的評分。

在本發明的意涵中之“cMet狀況”，係有關於將腫瘤分成cMet陽性[cMet(+)]或cMet陰性[cMet(-)]類型之分類作用，其係以藉由諸如免疫組織化學(IHC)、螢光原位雜交法(FISH)、比色原位雜交法(CISH)、基因晶片之任一方法或嫻熟技藝者所知的其他方法測量cMet基因的表現水平之測定作用為基礎。

在一個較佳實施例中，當組織試樣係以福馬林固定及包埋於石蠟中時，用於診斷之抗體必須能與標的受體結合。

更詳細地，藉由免疫組織化學(IHC)測量cMet的表現水

平。

舉例而言，在用於抗體染色水平之一種自0至3⁺的量表上，就試樣的cMet表現水平進行評分，其中0係陰性及1⁺至3⁺代表強度遞增的四個半定量步驟之陽性染色作用。可將1⁺至3⁺的評分記錄為陽性，因為當相較於評分0(陰性)，各陽性評分可能與復發與致命疾病風險的顯著降低相關聯，但陽性評分中之強度遞增可能提供附加的風險降低。可使用任一習用的危害分析方法，以估算cMet的預後值。代表性的分析方法包括考克斯(Cox)迴歸分析，其係在設限個案存在下用於模式化存活或距事件發生的時間數據之一種半參數方法(Hosmer與Lemeshow於1999年乙文；Cox於1972年乙文)。不同於其他存活分析如生命表或卡普蘭-麥爾(Kaplan-Meyer)方法，考克斯(Cox)容許在模式中包含預測變數(共變量)。使用如考克斯(Cox)之一種習用分析方法，可試驗有關一原發腫瘤中的cMet表現作用狀況與距發生疾病復發的時間(無疾病存活時間或距疾病轉移之時間)或距因該疾病死亡的時間(總存活時間)之相關性之假說。考克斯(Cox)迴歸分析亦稱作考克斯(Cox)比例危害分析。該方法係用於測試一腫瘤標記對於病患存活時間的預後值之標準方法。當用於多變量模式時，平行地測試數個共變量的效應，藉此可辨識出具有獨立的預後值之個別共變量，亦即最有效的標記。腫瘤的陽性或陰性“cMet狀況”一詞[亦稱作cMet(+)或cMet(-)]，係分別指評分0或評分1⁺至3⁺。

可在諸如例如乳癌的癌症診斷或監控期間，對於一試

樣進行“評分”。就其最簡單的形式而言，可藉由免疫組織化學目視檢查試樣，而將評分判定為陰性或陽性類型。量化程度較高的評分，係涉及染色強度與所採樣細胞的染色(“陽性”)比例之二種參數之判定。基於該二參數，可指定反映陽性染色的遞增水平之數字。Allred等人(Allred、Harvey等人於1998年乙文)曾述及達成此之一種方式，其涉及在一個自0(陰性)至3⁺的量表上評分該二參數，及將個別參數的評分加總為一個總評分。其產生評分可能為0、2、3、4、5、6、7或8之一量表。(注意在歐雷德(Allred)量表上所獲得的評分不可能為1)。一種較為簡單的評分方法，係將核染色強度與展現染色的核之細胞比例整合成為自0至3⁺的一組合量表。在強度與細胞核中的活化Stat5之染色比例的評分方面，可採用任一種評分方法。用於本說明書中之腫瘤的陽性或陰性“cMet狀況”一詞，係指分別對應於簡化量表上的評分0或1⁺至3⁺之cMet表現水平。

一般而言，如本發明之一試驗或分析法的結果能以多種格式中之任一者呈現。該等結果能以定性方式呈現。例如，該試驗報告可能僅顯示是否檢測出一種特定的多肽，也許亦顯示檢測極限。該等結果可能以半量化方式呈現。例如，可界定不同的範圍，及可對於該等範圍指定一評分(如1⁺至3⁺)，以提供一特定程度的量化資訊。該評分可反映不同的因素，如檢測出cMet的細胞數目、訊號(其可能表示cMet的表現水平或帶有cMet的細胞)的強度等。該等結果可能以量化方式呈現，如以檢測出多肽(cMet)的細胞百分比之

形式、以蛋白質濃度之形式等。如具一般技藝者將瞭解者，一試驗所提供的輸出訊號類型，將依該試驗的技術限制及與多肽檢測作用相關聯的生物顯著性而定。例如，在特定多肽的情況下，一種純定性的輸出訊號(如是否在一特定檢測水平檢測出該多肽)提供顯著的資訊。在其他情況下，則需要一種量化程度較高的輸出訊號(如所測試試樣中之多肽的表現水平相對於正常水平之比值)。

在一個更佳的實施例中，cMet表現水平之評分係基於反應產物的強度與陽性的細胞百分比之評估，而分級為0至3⁺。為求更加清楚明瞭，後述的第5表歸納該等參數。應只考慮侵入性腫瘤之完整的圓周膜反應性，及其通常類似一種“鐵絲網”外觀。依據目前的指導方針，必需將cMet IHC經評分為邊緣(評分2⁺以上)之試樣視為cMet(+)，及需要進行進一步評估。就非限制性實例而言，若對照組並不如預期，大部分的試樣中包含人為產物及該試樣具有正常乳腺管(內部對照組)之強的膜陽性而顯示過量的抗原恢復時，應剔除IHC分析，及藉由FISH或其他任何方法重複或證實。

第5表

c-Met 狀況	IHC 說明
0	無反應性或少於 10%的腫瘤細胞具膜反應性
1 ⁺	在超過 10%的腫瘤細胞中檢測出微弱的/勉強可察知的膜反應性。細胞僅在部分的膜具有免疫反應性。
2 ⁺	在超過 10%的腫瘤細胞中發現弱至中等的完整膜反應性。
3 ⁺	在超過 10%的腫瘤細胞中發現強烈的完整反應性。

在如本發明方法之一個更佳的實施例中，該評分包括使用以二種參數即染色強度與陽性細胞百分比為基礎之一適當量表。

在一個較佳實施例中，如本發明的方法所指之一適當量表係0至3⁺之一量表，其中腫瘤細胞並無膜反應性係評分為0，及在超過10%的腫瘤細胞中之強烈的完整反應性係評分為3⁺。

更詳細地，如上述之該適當量表係0至3之一量表，其中腫瘤細胞並無膜反應性係評分為0；在超過10%的腫瘤細胞中之微弱可察知的膜反應性係評分為1⁺；在超過10%的腫瘤細胞中之弱至中等的完整膜反應性係評分為2⁺；及在超過10%的腫瘤細胞中之強烈的完整反應性係評分為3⁺。

在本發明的一特定方面，一腫瘤係評分為2⁺之cMet(+)。

在本發明的一特定方面，一腫瘤係評分為3⁺之cMet(+)。

在本發明的另一特定方面，一腫瘤係評分為2⁺或3⁺之cMet(+)。

如本發明，亦述及測定一種致癌疾患對於一種抗cMET抗體或其一片段或衍生物之治療是否具易感性之一種方法，其中該方法的步驟包括(a)如上述在試管中測定一個體之一腫瘤中的cMet狀況，及(b)若該狀況為cMet(+)，則判定該致癌疾患對於一種抗cMET抗體或其一片段或衍生物之治療具易感性。

在本發明的另一方面，研究適用於該診斷或預後方法之一套組，該套組包含本發明的抗體。

為方便起見，包含預定量的試劑與用於進行該診斷分析的說明書之包裝組合，如套組，亦位於本發明的範圍內。該套組含有在試管中如在一種ELISA或一種西方墨點法中用於檢測與量化cMet之抗體。在試管中如在一種ELISA或一種西方墨點法中用於檢測與量化cMet之一套組中，可提供本發明的抗體。當該抗體係加有一種酵素標記時，該套組將包括該酵素所需的受質與輔因子(如提供可檢測的發色團或螢光團之一種受質前驅物)。此外，可包括其他添加劑諸如安定劑，緩衝液(如一種阻斷緩衝液或分解緩衝液)等。該套組可包含經間隔化以容納一或多個容器諸如管形瓶、管等之一接受器，該等容器係存放本發明的不同要素。例如，一容器可含有與一種不可溶或部分可溶的載劑結合之第一抗體。第二個容器可含有冷凍乾燥形式或位於溶液中之可溶、具有可檢測的標記之第二抗體。該接受器亦可含有第三個容器，其中存放冷凍乾燥形式或位於溶液中之具有可檢測的標記之第三抗體。具有該性質之套組可用於本發明的三明治分析法中。該標示或仿單可提供有關組成物之敘述，以及有關所預定的試管中或診斷用途之說明。

不同試劑的相對量可大幅地變化，使得所提供之該試劑的溶液中濃度係實質上最佳化該分析法的靈敏度。尤其，該試劑可能以包括賦形劑之通常冷凍乾燥的乾燥粉末形式提供，其在溶解時將提供具有適當濃度的一試劑溶液。

在本發明的又一方面，所提供之如在此所詳述的單株抗體或其結合片段係以一種可檢測部分標記，藉此其等可

包裝成例如套組及用於診斷或辨識具有前述抗原的細胞。該等標記的非限制性實例包括螢光團諸如螢光異硫氰酸鹽；發色團、放射性核種或酵素。該等標記抗體或結合片段可用於抗原的組織定位、ELISA、細胞分選以及用於檢測或量化cMet及例如帶有該抗原的細胞之其他免疫技術。

亦提供適於作為細胞凋亡分析法的陽性對照組、用於自細胞純化或免疫沉澱cMet之套組。為分離與純化cMet，該套組可含有偶合至珠體(如瓊脂糖珠)之此述的抗體或其抗原結合片段。所提供的套組可含有在試管中如在一種ELISA或一種西方墨點法中用於檢測與量化cMet之抗體。就製品而言，該套組包含一容器及關於該容器或與其相關聯之一標示或仿單。該容器係存放包含本發明的至少一種抗cMET抗體或其結合片段之一組成物。可包括含有如稀釋劑與緩衝液、對照組抗體之其他容器。該標示或仿單可提供有關該組成物之敘述，以及有關所預定的試管中或診斷用途之說明。

更詳細地，本發明係有關於藉由嫻熟技藝者所知之任一方法而用於測定一腫瘤的cMet狀況之一套組。在一個較佳實施例中，如將在實例中說明者，本發明係有關於藉由IHC方法而用於測定一腫瘤的cMet狀況之一套組。

在一特定實施例中，本發明包括含有如上述的至少一種抗c-Met抗體或其一功能片段或衍生物之一套組，該抗體較佳加有標記。

必需瞭解嫻熟技藝者可使用任一種加標記之方法，諸

如例如使用上述標記。

在一個較佳實施例中，如本發明適用於在試管中檢測一個體中之表現c-Met的腫瘤之存在及/或位置之套組，係進一步包含適用於檢測該抗c-Met抗體與c-Met之間的結合程度之一種試劑。

在另一較佳實施例中，本發明適用於在試管中測定一種表現c-Met的腫瘤中之c-Met表現水平之套組，係進一步包含適用於量化該標記抗體與c-Met之間的結合水平之一種試劑。

在又一個實施例中，如本發明適用於在試管中測定一腫瘤的c-Met狀況之套組，係進一步包含：

i)適用於檢測該標記抗體與c-Met之間的結合程度之一種試劑；及

ii)適用於c-Met表現水平的評分之陽性與陰性對照組試樣。

用於在試管中測定一腫瘤的c-Met狀況之該套組，可進一步包含對於鼠類抗體具有特異性之一種多株抗體，對於鼠類抗體具有特異性之該多株抗體較佳加有標記。

本發明的其他特徵與優點係持續出現在實例與圖式之說明中，其圖例係闡述如下。

第1A與1B圖：藉由m224D10 Mab的ELISA(第A圖)與FACS(第B圖)之c-Met辨識作用。

第2圖： $[^{125}\text{I}]$ -HGF結合抑制作用實驗。在一個半對數圖上，以作為配體濃度的一函數之方式繪製總特異性 $[^{125}$

碘]-HGF結合作用(以%為單位)。特異性結合數值係以三重複進行的實驗之平均值。

第3A與3B圖：經一種同型對照組(第3A圖)與m224D10 Mab(第3B圖)染色之來自U87-MG異種移植型腫瘤的石蠟包埋切片之IHC分析。

第4圖：藉由m221C9 Mab的FACS之c-Met辨識作用。

第5A與5B圖：對於固定化二聚(A)與單體(B)c-Met蛋白之221C9 Mab滴定曲線。

第6圖：來自表現不同的c-Met水平之乳房(A)與胃(B)腫瘤組織的石蠟包埋切片以m224D10進行之IHC染色作用。

第7圖：來自表現不同的c-Met水平之乳房(A)與胃(B)腫瘤組織的石蠟包埋切片以m221C9進行之IHC染色作用。

第8圖：在藉由一種抗tag-His抗體活化的一種CM5感測晶片之流室2上所捕獲之c-Met-Fc的201.7 RU上循序注射 Mab 11E1與Mab 224D10之感測圖。

第9圖：在藉由一種抗tag-His抗體活化的一種CM5感測晶片之流室2上所捕獲之c-Met-Fc的203.4 RU上循序注射 Mab 224G11與Mab 224D10之感測圖。

第10圖：在藉由一種抗tag-His抗體活化的一種CM5感測晶片之流室2上所捕獲之c-Met-Fc的203.6 RU上循序注射 Mab 5D5與Mab 224D10之感測圖。

第11圖：7種抗cMET抗體之抗原決定位圖譜製作流程圖。箭頭係指針對該研究所進行的三個實驗。灰色方塊係指未經224D10測試之抗體。

第12圖：以m221C9 Mab進行之HGF競爭性分析。

第1例：可用於診斷目的之對抗cMet的抗體之產生與挑選 -免疫作用步驟

為產生抗cMET抗體，8週大的BALB/c小鼠係在皮下以一種經CHO轉染及在其細胞膜上表現cMet的細胞株(20×10^6 個細胞/劑量/小鼠)進行免疫作用3至5次，或以第一次免疫作用混合佛朗氏(Freund)完全佐劑及其餘免疫作用混合佛朗氏(Freund)不完全佐劑之一種cMet細胞外域融合蛋白(10至15微克/劑量/小鼠)(R&D系統(R&D Systems)公司型錄編號358MT)或該重組蛋白的片段進行免疫作2至3次。亦進行其中小鼠領受CHO-cMet細胞與重組蛋白二者之混合式操作程序。在細胞融合之3天前，小鼠經由腹膜內注射或靜脈注射而增加該重組蛋白或片段。然後收集小鼠的脾臟及與SP2/0-Ag14骨髓瘤細胞(ATCC)融合，及進行HAT挑選作用。一般而言，特別是鼠類來源之單株抗體或其等的功能片段之製備作用，尤其可參考述於“抗體”手冊之技術(美國紐約冷泉港(Cold Spring Harbor)的冷泉港實驗室(Cold Spring Harbor Laboratory)出版公司於1988年出版之Harlow與Lane所著“抗體：實驗室手冊(Antibodies: A Laboratory Manual)”乙書第726頁)，或參考Kohler與Milstein所述之融合瘤製備技術(於1975年期刊“Nature”第256期第495-497頁乙文)。

-224D10之篩選步驟

所得的融合瘤最初係藉由在cMet重組型蛋白上之

ELISA進行篩選。簡言之，重組型人類c-Met-Fc蛋白(R&D系統(R&D Systems)公司)在4°C塗覆至96孔式Immulon II平皿過夜，及在以0.5%明膠溶液進行阻斷步驟1小時之後，在37°C另以1小時添加一劑量範圍的m224G10抗體。然後清洗平皿，及在37°C以1小時添加一種山羊抗小鼠(傑克森(Jackson)公司)特異性IgG HRP。使用TMB受質溶液進行反應顯影作用。然後在表現中等至高水平的c-Met之A459與NCI-H441細胞株上，藉由FACS分析進行第二次篩選，以確定所產生的抗體亦將辨識腫瘤細胞上的天然受體。為了該目的， 2×10^5 個細胞在4°C與一濃度範圍的非接合型224D10 Mab或9G4(IgG1同型對照組Mab)培養20分鐘。在增補1% BSA與0.01% NaN_3 之磷酸鹽緩衝液食鹽水(PBS)中清洗三次之後，細胞在4°C與二級抗體山羊抗小鼠Alexa 488(稀釋1/500)培養20分鐘。在增補1% BSA與0.1% NaN_3 之PBS中清洗三次之後，藉由FACS(必帝(Becton-Dickinson)公司之Facscalibur)分析細胞。評估至少5000個細胞，以計算螢光強度的平均值。

將該二試驗的陽性反應者擴增、選殖及回收、純化一組融合瘤，及篩選不與具放射線標記的HGF競爭者。誠然，在病患挑選及作為一種用於追蹤經治療用抗體治療的病患中之標的受體行為之生物標記方面，通常均需要一診斷用抗體。就後者而言，主要的考慮標準係在於診斷用抗體所結合的一個抗原決定位必需不同於治療用抗體所辨識者。導向對抗一種生長因子受體之一種治療用的中和抗體之目

標，係抑制配體結合作用。就該方面而言，在選擇診斷用抗體之期間，該等不干擾配體結合作用者可能被挑選。為測試該性質，設置抗體與具放射線標記的HGF之一種競爭性分析。簡言之，在4°C以重組型c-Met-Fc蛋白(R&D公司)塗覆過夜之前，以PBS中的0.5%明膠(在室溫2小時)阻斷蛋白質A的96孔式FlashPlate微量平皿(珀金埃爾默(Perkin Elmer)公司)。在室溫以一種非關聯hIgG進一步飽和游離的殘餘蛋白質A位址達2小時。在各步驟之後，以PBS清洗平皿。就競爭性分析而言，在不定濃度的待測試抗c-Met單株抗體或在pH 7.4的PBS中之自0.1 pM至1 μ M的HGF(R&D系統(R&D Systems)公司)之存在下，測量200pM的 [125 碘]-HGF(特異性活性約2,000居里/毫莫耳)與固定化c-Met之結合作用。引入已知具有置換HGF的能力之抗體(224G11、11E1及5D5)作為該實驗的陽性對照組。5D5 Mab係由基因科技(Genentech)公司所生成之一抗體，及可在ATCC以一融合瘤形式取得。使用稱作9G4的一種鼠類IgG1作為一種同型對照組。該平皿然後在室溫培養6小時，及在一種派克(Packard) Top Count型微量平皿閃爍計數器上計數。在1 μ M的HGF存在下，測定非特異性結合作用。

最後，選擇符合上述3項標準[i)在一種ELISA試驗中辨識c-Met，ii)與天然c-Met結合及iii)不與具放射線標記的配體競爭]之單株抗體，而用於在來自表現c-Met的腫瘤異種移植植物之石蠟包埋切片上之最終的c-Met辨識作用試驗。就該評估作用而言，將來自U87-MG異種移植植物的腫瘤切片脫

蠟、復水及置於在98°C預熱的沸水浴中之標的檢索緩衝液1X(達科(Dako)公司之S1699)，以在98°C進行熱引發的抗原決定位檢索30分鐘，然後再置於標的檢索緩衝液中30分鐘。在Tris緩衝液食鹽水-0.05%妥文(Tween) 20 (TBS-T) (達科(Dako)公司之S3006)中清洗三次之後，使用過氧化酶阻斷劑(達科(Dako)公司之K4007)阻斷內源性過氧化酶活性達5分鐘。在添加待測試的c-Met小鼠單株抗體(5微克/毫升)之前，以TBS-T清洗切片及與阻斷劑(UltraV阻斷-TA- 125UB-萊博芙晉(LabVision)公司)培養5分鐘。使用一種小鼠IgG1/ κ (5微克/毫升，達科(Dako)公司之X0931)作為陰性對照組。切片然後在4°C培養過夜，以TBS-T清洗，及在室溫與廣用型生物素化連接物(LSAB+，達科(Dako)公司之K0679)培養15分鐘。以TBS-T清洗切片之後，再與廣用型抗生蛋白鏈菌素-過氧化酶複合體(LSAB+，達科(Dako)公司之K0679)培養15分鐘。使用二胺基聯苯胺，以顯影一種褐色反應產物。

在一組融合物之後，辨識出鼠類224D10(m224D10)抗體係用於診斷c-Met陽性腫瘤之一候選者。如第1圖所例示，m224D10可在一種ELISA分析法(第1A圖)及在已知表現c-Met的A549與NCI-H441細胞株之表面(第1B圖)辨識c-Met。

然後在一種具放射線標記的HGF之置換試驗中測試m224D10。在第2圖中，在半對數圖上，以作為配體濃度的一函數之方式繪製總特异性 $[^{125}\text{I}]$ -HGF結合作用百分比；

而抑制放射性配體結合作用達50%(IC₅₀)所需的各種抑制劑濃度，係以圖解方式自所得的S形競爭曲線測定。如所預期地，非放射性標記HGF可以完全置換 [¹²⁵碘]-HGF與固定化c-Met的結合作用，而對照組抗體9G4並未顯示任何的HGF阻斷活性。使用作為陽性對照組之抗c-Met單株抗體224G11、11E1及5D5可抑制 [¹²⁵碘]-HGF與固定化c-Met的結合作用，其IC₅₀值分別為3.6 nM、42 nM及4.4 nM。Mab m224D10無法置換 [¹²⁵碘]-HGF及被選用於免疫組織化學(IHC)研究中。

第3B圖的結果顯示，m224G10可在已知對於一種c-Met標靶治療法特別敏感的U87-MG異種移植型腫瘤上辨識c-Met。如所預期地，在IgG1同型對照組未觀察染色作用(第3A圖)。基於該等結果，設置實驗以測定224D10 Mab是否可用於腫瘤上的c-Met之評分。

- 221C9之篩選步驟

最初藉由在二聚或單體cMet重組蛋白上之ELISA，進行所得的融合瘤之篩選。簡言之，重組型人類c-Met(二聚或單體)蛋白在4℃塗覆至96孔式Immulon II平皿過夜，及在以0.5%明膠溶液進行阻斷步驟1小時之後，在37℃另以1小時添加純的融合瘤上清液。然後清洗平皿，及在37℃以1小時添加一種山羊抗小鼠(傑克森(Jackson)公司)特異性IgG HRP。使用TMB受質溶液進行反應顯影作用。在表現中等至高水平的c-Met之A459細胞株上，藉由FACS分析進行第二次篩選，以確定所產生的抗體將亦能辨識腫瘤細胞上的

天然受體。為了該目的， 2×10^5 個細胞在 4°C 與10微克/毫升的m221C9或m10D9(IgG1同型對照組Mab)培養20分鐘。在增補1% BSA與0.01% NaN_3 之磷酸鹽緩衝液食鹽水(PBS)中清洗三次之後，細胞在 4°C 與二級抗體山羊抗小鼠Alexa 488(稀釋1/500)培養20分鐘。在增補1% BSA與0.1% NaN_3 之PBS中清洗三次之後，藉由FACS(必帝(Becton-Dickinson)公司之Facscalibur)分析細胞。評估至少5000個細胞，以計算螢光強度的平均值。

將該二試驗的陽性融合瘤擴增、選殖、同型化及擴大。然後收集新的融合上清液，測定其等的IgG含量。在5種人類腫瘤細胞株(A549、BXPC3、MCF7、U87MG及HepG2)上進行互補細胞計數分析。所有該等細胞株係由ATCC提供。所得數據係示於第4圖，及MFI值示於後述第6表中。

第6表

在5種腫瘤人類細胞株(ATCC)上以221C9 Mab進行的 細胞計數分析(MFI)之數據					
	A549	BXPC-3	MCF7	U87MG	HepG2
唯獨細胞	13.98	11.87	9.87	9.10	10.52
二級抗體	11.98	13.23	11.10	11.20	15.85
同型對照組	11.83	14.77	12.06	11.56	18.12
221C9	243.59	375.57	31.95	71	233.58

以純化221C9抗體進行互補實驗。在單體c-Met蛋白與二聚c-Met蛋白上進行第一抗體滴定作用。

滴定曲線係示於第5圖。觀察到各c-Met受體形式類似的親和力。為進行ELISA，在 4°C 以PBS中之濃度為0.25微

克/毫升的人類二聚c-Met蛋白(R&D系統(R&D systems)公司型錄編號358MT)塗覆過夜。在37°C以0.5%明膠溶液飽和該平皿(寇斯塔(Costar)公司編號3690)達2小時之後，在37°C培養融合瘤上清液1小時。以PBS沖洗一次，在各孔添加位於ELISA緩衝液(位於PBS中的0.1%明膠/0.05%妥文(Tween)20)中之1/5000稀釋的抗小鼠HRP抗體(傑克森免疫研究(Jackson ImmunoResearch)公司型錄編號115-035-164)，及該平皿在37°C培養1小時。在PBS中清洗三次之後，藉由添加50微升的TMB受質(奧帝瑪(Uptima)公司)而顯示過氧化酶的活性。讓反應在室溫中進行5分鐘。藉由添加50微升/孔的1M硫酸溶液而終止反應，及在450 nm的平皿讀數器進行讀數。在單體c-Met上進行相同的操作程序，但在該情況下係塗覆5微克/毫升的蛋白。

最後，221C9 Mab已符合上述二項標準，即(i)在一種ELISA試驗中辨識c-Met，(ii)與在人類腫瘤細胞株的表面上表現之天然c-Met結合。

第2例：以m224D10與m221C9 Mab就c-Met表現作用進行組織之評分

使用上述的操作程序，分別以m224D10與m221C9 Mab染色表現不同的c-Met水平之一組經石蠟包埋的人類腫瘤組織。

第6圖所示之m224D10的結果及第7圖所示之m221C9 Mab的結果顯示，m224D10與m221C9在二種腫瘤類型中均可辨別具有不定的c-Met水平之人類腫瘤。使用該等抗體，

可依下列方式進行腫瘤之評分：

-0或陰性：陰性腫瘤，其中觀察到並無膜染色作用或少於10%的膜陽性細胞，

-1⁺：在超過10%的腫瘤細胞中之勉強可察知的染色作用，

-2⁺：在超過10%的腫瘤細胞中觀察到中等的完整膜染色作用，

-3⁺：超過10%的腫瘤細胞之強烈的完整染色作用。

第3例：224D10競爭實驗

如上述，診斷用Mab亦可作為引發標的受體之向下調節作用的治療用抗體之“反應標記”。關於該點，可自受治療的病患取出血液或生物檢體，及分析c-Met狀況。為了該目的，待使用的診斷用抗體所辨識之抗原決定位必須不同於該治療用抗體以為標的者。因治療用抗體通常可置換HGF，選擇不會在配體置換作用上競爭之診斷用抗體，可能有助於作為所有治療性Mab的反應標記。

在該實例中，進行224D10與多種治療性Mab之間之競爭實驗，以證明可使用224D10作為一種反應標記。

在生物分子相互作用分析(biacore)實驗中，研究治療性抗c-Met單株抗體11E1、227H1、224G11及可在ATCC以融合瘤形式的商品取得之5D5 Mab即單臂5D5的鼠類形式。簡言之，遵循供應商之說明書使用胺偶合套組，藉由共價偶合抗聚組胺酸Mab而在流室1與2活化CM5感測晶片。電泳緩衝液為HBS-EP緩衝液。該實驗在25°C以30微升/分鐘的流

速進行。在電泳緩衝液中使用濃度為10微克/毫升之HGF-R/Fc嵌合蛋白，及在流室2上注入達1分鐘。典型地，捕獲約190RU的c-Met-Fc。流室1係作為評估Mab的非特異性結合作用之一參考基準。在二個流室注入第一Mab(20微克/毫升)達2分鐘。然後在二個流室注入第二Mab(20微克/毫升)。記錄示差性Fc2-Fc1共振訊號。在各循環的終點，在二個流室注入pH 1.5的甘胺酸再生緩衝液達半分鐘，藉由脫附c-Met與Mab蛋白而將感測晶片再生。

第一個實驗係以11E1作為第一抗體及224D10作為第二抗體而進行(見第8圖)。該實驗顯示11E1與224D10係與c-Met-Fc分子表面之二個遠距離的抗原決定位區域結合。第二個實驗係以224G11作為第一抗體及224D10作為第二抗體而進行(見第9圖)。該實驗顯示224G11與224D10亦與二個遠距離的區域結合。第三個實驗係以5D5作為第一抗體及224D10作為第二抗體而進行(見第10圖)。再次地，該實驗顯示5D5與224D10係與二個遠距離的區域結合。結論為224D10係與c-Met分子上之距11E1、224G11及5D5的結合位址之一個遠距離區域結合。因為以相同類型的生物分子相互作用分析(biacore)操作程序所得之初步數據顯示，來自輝瑞(Pfizer)公司之13.3.2抗c-Met抗體係屬於與11E1相同的抗原決定位圖譜組別(第11圖)，吾等可懷疑224D10與13.3.2可同時與同一c-Met分子結合，即使該組合尚未經測試。類似地，就屬於與224G11相同的原決定位組別之227H1而言(第11圖)，227H1與224D10二抗體可能可同時與c-Met結合。最

後，屬於與5D5相同的抗原決定位圖譜組別之223C4(第11圖)及224D10可能可同時與c-Met結合。

第4例：在221C9抗體存在所進行之HGF競爭實驗

進行HGF競爭性分析法，以進一步分析診斷用Mab的特徵。在一個另外的飽和(PBS中的0.5%明膠1X)平皿上，製備在待測試的Mab存在或不存在下包含c-Met蛋白之第一反應混合物。進行鼠類抗體(參考基準與待研究的Mab)之1：2的稀釋作用(在12個管柱上自40微克/毫升開始)。然後添加0.8微克/毫升的rhc-Met-Fc蛋白(RD系統(RDSystems)公司之查詢編號358-MT/CF)，除了僅含有ELISA稀釋劑(位於PBS1X中之0.1%明膠、0.05%妥文(Tween)20)之陰性對照組系之外。在均質化之後，將競爭試樣添加至具有位於PBS中的0.3微克/毫升rhHGF溶液(RD系統(RDSystems)公司之查詢編號294-HGN/CF)之經HGF-塗覆的平皿。在培養及數次清洗之後，使用一種山羊抗人類IgG-HRP(傑克森(Jackson)公司之查詢編號109-035-098)檢測結合型c-Met蛋白。一旦結合之後，在平皿中添加TMB受質。藉由添加硫酸溶液而終止該反應，及使用一種微量平皿讀數器儀器在450 nm讀取所得的光學密度。

在c-Met-Fc重組蛋白存在或不存在下，以221C9進行該實驗(見第12圖)。該實驗顯示221C9可與c-Met競爭結合其固定化配體受體。然而，在20微克/毫升的221C9存在下，僅觀察到部分的c-Met結合作用。

【圖式簡單說明】

第1A與1B圖：藉由m224D10 Mab的ELISA(第A圖)與FACS(第B圖)之c-Met辨識作用。

第2圖： $[^{125}\text{I}]$ -HGF結合抑制作用實驗。在一個半對數圖上，以作為配體濃度的一函數之方式繪製總特異性 $[^{125}\text{I}]$ -HGF結合作用(以%為單位)。特異性結合數值係以三重複進行的實驗之平均值。

第3A與3B圖：經一種同型對照組(第3A圖)與m224D10 Mab(第3B圖)染色之來自U87-MG異種移植型腫瘤的石蠟包埋切片之IHC分析。

第4圖：藉由m221C9 Mab的FACS之c-Met辨識作用。

第5A與5B圖：對於固定化二聚(A)與單體(B)c-Met蛋白之221C9 Mab滴定曲線。

第6圖：來自表現不同的c-Met水平之乳房(A)與胃(B)腫瘤組織的石蠟包埋切片以m224D10進行之IHC染色作用。

第7圖：來自表現不同的c-Met水平之乳房(A)與胃(B)腫瘤組織的石蠟包埋切片以m221C9進行之IHC染色作用。

第8圖：在藉由一種抗tag-His抗體活化的一種CM5感測晶片之流室2上所捕獲之c-Met-Fc的201.7 RU上循序注射Mab 11E1與Mab 224D10之感測圖。

第9圖：在藉由一種抗tag-His抗體活化的一種CM5感測晶片之流室2上所捕獲之c-Met-Fc的203.4 RU上循序注射Mab 224G11與Mab 224D10之感測圖。

第10圖：在藉由一種抗tag-His抗體活化的一種CM5感測晶片之流室2上所捕獲之c-Met-Fc的203.6 RU上循序注射

Mab 5D5與Mab 224D10之感測圖。

第11圖：7種抗cMET抗體之抗原決定位圖譜製作流程圖。箭頭係指針對該研究所進行的三個實驗。灰色方塊係指未經224D10測試之抗體。

第12圖：以m221C9 Mab進行之HGF競爭性分析。

【主要元件符號說明】

(無)

序列清單

<110> 皮耶法柏(PIERRE FABRE)製藥公司

<120> 新穎抗 cMET 抗體及其用於檢測及診斷癌症的用途

<130> D27752

<150> EP 09305777.6

<151> 2009-08-21

<150> US 61/235,864

<151> 2009-08-21

<150> US 61/348,005

<151> 2010-05-25

<160> 60

<170> PatentIn 第 3.3 版

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 家鼯鼠(mus musculus)

<400> 1

Thr Ser Ala Tyr Phe

1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 家鼯鼠(mus musculus)

<400> 2

Ile Asn Tyr Asp Gly Thr Asn

1 5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> 家鼯鼠(mus musculus)

<400> 3

Asp Arg Thr Phe Ala Tyr

1 5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> 家鼯鼠(mus musculus)

<400> 4

Gln Arg Ile Tyr Asn Tyr
1 5

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> 家鼯鼠(mus musculus)

<400> 5

Tyr Ala Ser
1

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 家鼯鼠(mus musculus)

<400> 6

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 家鼯鼠(mus musculus)

<400> 7

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala Tyr Phe
1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> 家鼯鼠(mus musculus)

<400> 8

Thr Arg Asp Arg Thr Phe Ala Tyr
1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 家鼯鼠(mus musculus)

<400> 9

Thr Ser Ala Tyr Phe Trp Ser
1 5

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> 家鼯鼠(mus musculus)

<400> 10

Phe Ile Asn Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
1 5 10 15

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> 家鼯鼠(mus musculus)

<400> 11

Arg Ala Ser Gln Arg Ile Tyr Asn Tyr Leu His
1 5 10

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 家鼯鼠(mus musculus)

<400> 12

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

<210> 13
<211> 115
<212> PRT
<213> 家鼯鼠(mus musculus)

<400> 13

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala
20 25 30

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

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

Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe

65

70

75

80

Leu Arg Leu Asn Ser Val Thr Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

859095

Thr Arg Asp Arg Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100105110

Val Ser Ala

115

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> 家鼯鼠(mus musculus)

<400> 14

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

151015

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Tyr Asn Tyr

202530

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile

354045

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

505560

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

65707580

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu

859095

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg

100105

<210> 15

<211> 15

<212> DNA

<213> 家鼯鼠(mus musculus)

<400> 15

accagtgc tt atttc

<210>	16	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	家鼯鼠(mus musculus)	
<400>	16	
	ataaactacg acggtaccaa t	21
<210>	17	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	家鼯鼠(mus musculus)	
<400>	17	
	gatcggacct ttgcttat	18
<210>	18	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	家鼯鼠(mus musculus)	
<400>	18	
	caaagaattt acaactac	18
<210>	19	
<211>	9	
<212>	DNA	
<213>	家鼯鼠(mus musculus)	
<400>	19	
	tatgcttcc	9
<210>	20	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	家鼯鼠(mus musculus)	
<400>	20	
	caacagagta acagctggcc tctcacg	27
<210>	21	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	家鼯鼠(mus musculus)	
<400>	21	
	ggctactcca tcaccagtgc ttatttc	27
<210>	22	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	家鼯鼠(mus musculus)	

<400> 22	
acaagagatc ggacctttgc ttat	24
<210> 23	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 家鼯鼠(mus musculus)	
<400> 23	
accagtgcctt atttctggag c	21
<210> 24	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 家鼯鼠(mus musculus)	
<400> 24	
ttcataaact acgacggtac caataactac aacccatctc tcaaaaat	48
<210> 25	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 家鼯鼠(mus musculus)	
<400> 25	
agggccagtc aaagaattta caactaccta cac	33
<210> 26	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 家鼯鼠(mus musculus)	
<400> 26	
tatgcttccc agtccatctc t	21
<210> 27	
<211> 345	
<212> DNA	
<213> 家鼯鼠(mus musculus)	
<400> 27	
gatctacagc ttcaggagtc aggacctggc ctcgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc	60
acctgctctg tcaactggcta ctccatcacc agtgcttatt tctggagctg gatccggcag	120
tttccaggaa acaaactgga atggatgggc ttcataaact acgacggtac caataactac	180
aacccatctc tcaaaaatcg aatctccatc actcgtgata catctaagaa ccagtttttc	240
ctgagggttga atttctgtgac tactgacgac acagctacgt attactgtac aagagatcgg	300
acctttgcctt attggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca	345

<210> 28
<211> 321
<212> DNA
<213> 家鼠(mus musculus)

<400> 28
gatattgtgt taactcagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtcagt 60

ctttcctgca gggccagtc aagaatttac aactacctac actgggtatca acaaaaatca 120

catgagtcctc caaggcttct catcaagtat gcttccagtc ccatctctgg gatcccctcc 180

aggttcagtg gcagtggtc agggacagat ttcatcttca ctatcaacag tgtggagact 240

gaagattttg gaatgtattt ctgtcaacag agtaacagct ggctctcac gttcgggtgt 300

gggaccaagc tggagctgag a 321

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> 家鼠(Mus musculus)

<400> 29

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> 家鼠(Mus musculus)

<400> 30

Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr
1 5

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 家鼠(Mus musculus)

<400> 31

Ala Arg Arg Val Gly Tyr Leu Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> 家鼠(Mus musculus)

<400> 32

Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

<210> 33
<211> 3
<212> PRT
<213> 家鼯鼠(Mus musculus)

<400> 33

Asp Thr Ser
1

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 家鼯鼠(Mus musculus)

<400> 34

Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> 家鼯鼠(Mus musculus)

<400> 35

Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> 家鼯鼠(Mus musculus)

<400> 36

Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe Arg
1 5 10 15

Thr

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> 家鼯鼠(Mus musculus)

<400> 37

Arg Val Gly Tyr Leu Met Asp Tyr
1 5

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> 家鼯鼠(Mus musculus)

<400> 38

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> 家鼯鼠(Mus musculus)

<400> 39

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 40
<211> 117
<212> PRT
<213> 家鼯鼠(Mus musculus)

<400> 40

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Val Gly Tyr Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Ala Pro Gln
115

<210> 41
<211> 106
<212> PRT
<213> 家鼯鼠(Mus musculus)

<400> 41

Gln Ile 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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 42
<211> 24
<212> DNA
<213> 家鼯鼠(Mus musculus)

<400> 42
ggctacacct tcaccagcta ctgg

24

<210> 43
<211> 24
<212> DNA
<213> 家鼯鼠(Mus musculus)

<400> 43
attaatccta gcaacggtcg tact

24

<210>	44	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	家鼯鼠(Mus musculus)	
<400>	44	
	gcaagaaggg ttggttacct catggactac	30
<210>	45	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	家鼯鼠(Mus musculus)	
<400>	45	
	tcaagtgtaa gttac	15
<210>	46	
<211>	9	
<212>	DNA	
<213>	家鼯鼠(Mus musculus)	
<400>	46	
	gacacatcc	9
<210>	47	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	家鼯鼠(Mus musculus)	
<400>	47	
	cagcagtgga atagtaaccc acccagc	27
<210>	48	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	家鼯鼠(Mus musculus)	
<400>	48	
	agctactgga tgcac	15
<210>	49	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	家鼯鼠(Mus musculus)	
<400>	49	
	gagattaatc ctagcaacgg tcgtactcac tacaatgaga agttcaggac c	51
<210>	50	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	家鼯鼠(Mus musculus)	

<400> 50 agggttggtt acctcatgga ctac	24
<210> 51 <211> 30 <212> DNA <213> 家鼯鼠(Mus musculus)	
<400> 51 agtgccagct caagtgaag ttacatgcac	30
<210> 52 <211> 21 <212> DNA <213> 家鼯鼠(Mus musculus)	
<400> 52 gacacatcca aactggcttc t	21
<210> 53 <211> 351 <212> DNA <213> 家鼯鼠(Mus musculus)	
<400> 53 caggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagctg	60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg	120
cctggacaag gccttgagtg gattggagag attaatecta gcaacggtcg tactcactac	180
aatgagaagt tcaggaccaa ggccacactg actgttgcca aatcctccat cacagcctac	240
atgcaactca gcaccctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaagggtt	300
ggttacctca tggactactg ggggtcaagga acctcagtc cgcctcctca g	351
<210> 54 <211> 318 <212> DNA <213> 家鼯鼠(Mus musculus)	
<400> 54 caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc	60
atgacctgca gtgccagctc aagtgtgaag tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc	120
acctccccca aaagattgat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc	180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaca tcagcagcat ggaggctgaa	240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtg aatagtaacc caccacggt cggtgctggg	300
accaagctgg agctgaaa	318

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 來自 CDR-H1 之序列

<220>
<221> 其他特徵
<222> (3)..(3)
<223> Xaa 為 S 或 T

<220>
<221> 其他特徵
<222> (4)..(4)
<223> Xaa 為 I 或 F

<220>
<221> 其他特徵
<222> (7)..(7)
<223> Xaa 為 A 或缺失

<220>
<221> 其他特徵
<222> (9)..(9)
<223> Xaa 為 F 或 W

<400> 55

Gly Tyr Xaa Xaa Thr Ser Xaa Tyr Xaa
1 5

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 來自 CDR-H2 之序列

<220>
<221> 其他特徵
<222> (3)..(3)
<223> Xaa 為 Y 或 P

<220>
<221> 其他特徵
<222> (4)..(4)
<223> Xaa 為 D 或 S

<220>
<221> 其他特徵
<222> (5)..(5)
<223> Xaa 為 N 或缺失

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa 為 T 或 R

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa 為 N 或 T

<400> 56

Ile Asn Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa
 1 5

<210> 57
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人造

<220>
 <223> 來自 CDR-H3 之序列

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 為 T 或 A

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa 為 D 或 R

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa 為 R 或 V

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa 為 T 或 G

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 為 F 或 Y

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa 為 A 或 L

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (8)..(8)

<223> Xaa 為 M 或缺失

<220>

<221> 其他特徵

<222> (9)..(9)

<223> Xaa 為 D 或缺失

<400> 57

Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr
1 5 10

<210> 58

<211> 6

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 來自 CDR-L1 之序列

<220>

<221> 其他特徵

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 為 Q 或缺失

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa 為 R 或 S

<220>

<221> 其他特徵

<222> (3)..(3)

<223> Xaa 為 I 或 S

<220>

<221> 其他特徵

<222> (4)..(4)

<223> Xaa 為 Y 或 V

<220>

<221> 其他特徵

<222> (5)..(5)

<223> Xaa 為 N 或 S

<400> 58

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr
1 5

<210> 59

<211> 3

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 來自 CDR-L2 之序列

<220>

<221> 其他特徵

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 為 Y 或 D

<220>

<221> 其他特徵

<222> (2)..(2)

<223> Xaa 為 A 或 T

<400> 59

Xaa Xaa Ser

1

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造

<220>

<223> 來自 CDR-L3 之序列

<220>

<221> 其他特徵

<222> (3)..(3)

<223> Xaa 為 S 或 W

<220>

<221> 其他特徵

<222> (6)..(6)

<223> Xaa 為 W 或 N

<220>

<221> 其他特徵

<222> (8)..(8)

<223> Xaa 為 L 或 P

<400> 60

Gln Gln Xaa Asn Ser Xaa Pro Xaa Thr

1

5

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99128095

※申請日：99.8.23

※IPC 分類：

GOIN 33/574

GOIN 33/577 (2006.01)
(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

新穎抗cMET抗體及其用於檢測及診斷癌症的用途

NOVEL ANTI-cMET ANTIBODY AND ITS USE FOR THE DETECTION
AND THE DIAGNOSTIC OF CANCER

二、中文發明摘要：

本發明係有關於預後及/或診斷一病患的一增生性疾病之領域。更詳細地，本發明係有關於可與人類cMet受體以及編碼該抗體的胺基酸與核酸序列特异性結合之一種新穎的抗體。本發明也包括該抗體與對應方法用於檢測及診斷與cMet的表現作用相關聯之病理性過度增生型致癌疾患之用途。在特定的實施例中，該疾患係與比正常增加的cMet多肽表現作用相關聯之致癌性疾患，或與cMet的過度表現作用相關的其他任何病變。本發明最後包括至少包含用於預後或診斷特定癌症的該抗體之產物及/或組成物或套組。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to the field of prognosis and/or diagnosis of a proliferative disease in a patient. More particularly, the invention relates to a novel antibody capable of binding specifically to the human cMet receptor, as well as the amino acid and nucleic acid sequences coding for this antibody. The invention likewise comprises the use of said antibody, and corresponding processes, for detecting and diagnosing pathological hyperproliferative oncogenic disorders associated with expression of cMet. In certain embodiments, the disorders are oncogenic disorders associated with increased expression of cMet polypeptide relative to normal or any other pathology connected with the overexpression of cMet. The invention finally comprises products and/or compositions or kits comprising at least such antibody for the prognosis or diagnostic of certain cancers.

七、申請專利範圍：

1. 一種可與c-Met蛋白特異性結合之分離抗體或其一功能片段或衍生物，其特徵在於包含i)包含如IMGT編號系統所界定的至少下列三種CDR即CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3之一重鏈，其中CDR-H1包含序列辨識編號55之序列，CDR-H2包含序列辨識編號56之序列及CDR-H3包含序列辨識編號57之序列；及/或ii)包含如IMGT編號系統所界定的至少下列三種CDR即CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3之一輕鏈，其中CDR-L1包含序列辨識編號58之序列，CDR-L2包含序列辨識編號59之序列及CDR-L3包含序列辨識編號60之序列。
2. 如申請專利範圍第1項之抗體或其一功能片段或衍生物，其特徵在於其所包含之一重鏈係選自由下列所組成之群組：
 - a)包含如IMGT編號系統所界定的下列三種CDR之一重鏈，即分別為具有序列辨識編號7的序列之CDR-H1，具有序列辨識編號2的序列之CDR-H2及具有序列辨識編號8的序列之CDR-H3；及
 - b)包含如IMGT編號系統所界定的下列三種CDR之一重鏈，即分別為具有序列辨識編號29的序列之CDR-H1，具有序列辨識編號30的序列之CDR-H2及具有序列辨識編號31的序列之CDR-H3。
3. 如申請專利範圍第1項之抗體或其一功能片段或衍生物，其特徵在於其所包含之一輕鏈係選自由下列所組成

之群組：

a)包含如IMGT編號系統所界定的下列三種CDR之一輕鏈，即分別為具有序列辨識編號4的序列之CDR-L1，具有序列辨識編號5的序列之CDR-L2及具有序列辨識編號6的序列之CDR-L3；及

b)包含如IMGT編號系統所界定的下列三種CDR之一輕鏈，即分別為具有序列辨識編號32的序列之CDR-L1，具有序列辨識編號33的序列之CDR-L2及具有序列辨識編號34的序列之CDR-L3。

4. 如申請專利範圍第1至3項中之一項之抗體或其一功能片段或衍生物，其特徵在於其係選自由下列所組成之群組：

a)一抗體或其一功能片段或衍生物，其包含：

-包含如IMGT所界定的下列三種CDR之一重鏈，即分別為具有序列辨識編號7的序列之CDR-H1，具有序列辨識編號2的序列之CDR-H2及具有序列辨識編號8的序列之CDR-H3，及

-包含如IMGT所界定的下列三種CDR之一輕鏈，即分別為具有序列辨識編號4的序列之CDR-L1，具有序列辨識編號5的序列之CDR-L2及具有序列辨識編號6的序列之CDR-L3；及

b)一抗體或其一功能片段或衍生物，其包含：

-包含如IMGT所界定的下列三種CDR之一重鏈，即分別為具有序列辨識編號29的序列之CDR-H1，具有序

列辨識編號30的序列之CDR-H2及具有序列辨識編號31的序列之CDR-H3；及

-包含如IMGT所界定的下列三種CDR之一輕鏈，即分別為具有序列辨識編號32的序列之CDR-L1，具有序列辨識編號33的序列之CDR-L2及具有序列辨識編號34的序列之CDR-L3。

5. 如申請專利範圍第1至4項中之一項之抗體或其一功能片段或衍生物，其特徵在於其係選自由下列所組成之群組：

a)一抗體或其一功能片段或衍生物，其包括包含胺基酸序列辨識編號13的序列之一重鏈可變域及包含胺基酸序列辨識編號14的序列之一輕鏈可變域；及

b)一抗體或其一功能片段或衍生物，其包括包含胺基酸序列辨識編號40的序列之一重鏈可變域及包含胺基酸序列辨識編號41的序列之一輕鏈可變域。

6. 如申請專利範圍第1至5項中之一項之抗體或其一功能片段或衍生物，其特徵在於其係一種鼠類抗體。
7. 如申請專利範圍第1至6項中之一項之抗體或其一功能片段或衍生物，其特徵在於其不阻斷配體HGF與c-Met蛋白的結合作用。
8. 一種可分泌如申請專利範圍第1至7項中之一項的抗體之鼠類融合瘤，該鼠類融合瘤係選自2008年3月12日寄存在法國巴黎巴斯德研究院(Institut Pasteur)的CNCM之編號I-3949的融合瘤及2010年1月14日寄存在法國巴黎

巴斯德研究院(Institut Pasteur)的CNCM之編號I-4273的融合瘤。

9. 一種分離核酸，其特徵在於其係選自下列核酸：

a)編碼如申請專利範圍第1至7項中之一項的一抗體之一核酸、DNA或RNA；

b)一核酸，其所包括之一DNA序列係包含選自由序列辨識編號15至26或42至52的序列所組成之群組之一序列；

c)一核酸，其所包括之一DNA序列係包含序列辨識編號27、28、53或54之序列；

d)如a)、b)或c)中所界定的核酸之對應的RNA核酸；

e)如a)、b)與c)中所界定的核酸之互補核酸；及

f)一種具有至少18個核苷酸之核酸，其可在高度嚴格的條件下與序列辨識編號15至28或42至54之序列或其互補序列之至少一個CDR雜交。

10. 如申請專利範圍第1至7項中之一項的一抗體或其一功能片段或衍生物，在試管中診斷一種與c-Met表現作用相關聯的致癌疾患或在試管中判定發生一種與c-Met表現作用相關聯的致癌疾患之預後之用途。

11. 一種在試管中檢測一個體中之表現c-Met的腫瘤之存在及/或位置之方法，其中該方法的步驟包括(a)將來自該個體的一試樣與如申請專利範圍第1至7項中之一項的一抗體或其一功能片段或衍生物接觸，及(b)檢測該抗體與該試樣的結合作用。

12. 一種在試管中測定來自一個體之一種表現c-Met的腫瘤中之c-Met表現水平之方法，其中該方法的步驟包括(a')將來自該個體的一試樣與如申請專利範圍第1至7項中之一項的一抗體或其一功能片段或衍生物接觸，及(b')量化與該試樣中的c-Met結合之抗體水平。
13. 如申請專利範圍第12項之方法，其中藉由免疫組織化學(IHC)測量c-Met的表現水平。
14. 一種在試管中診斷一種表現c-Met的腫瘤或在試管中判定在一個體中發生一種表現c-Met的腫瘤之預後之方法，其中該方法的步驟包括(i)如申請專利範圍第12項測定c-Met的表現水平，及(ii)比較步驟(i)的表現水平與來自正常組織之c-Met的參考表現水平。
15. 一種在試管中測定一個體之一腫瘤的c-Met狀況之方法，其中該方法的步驟包括(1)如申請專利範圍第12項測定c-Met的表現水平，(2)就該腫瘤的c-Met表現水平進行評分，及(3)比較該評分與自一對照組試樣所得的評分。
16. 如申請專利範圍第15項之方法，其中該評分包括使用以二種參數即染色強度與陽性細胞百分比為基礎之一適當量表。
17. 如申請專利範圍第16項之方法，其中該適當量表係一種0至3⁺之量表，其中腫瘤細胞並無膜反應性係評分為0，及在超過10%的腫瘤細胞中之強烈的完整反應性係評分為3⁺。
18. 如申請專利範圍第17項之方法，其中該適當量表係一個

0至3之量表，其中腫瘤細胞並無膜反應性係評分為0；在超過10%的腫瘤細胞中之微弱可察知的膜反應性係評分為1⁺；在超過10%的腫瘤細胞中之弱至中等的完整膜反應性係評分為2⁺；及在超過10%的腫瘤細胞中之強烈的完整反應性係評分為3⁺。

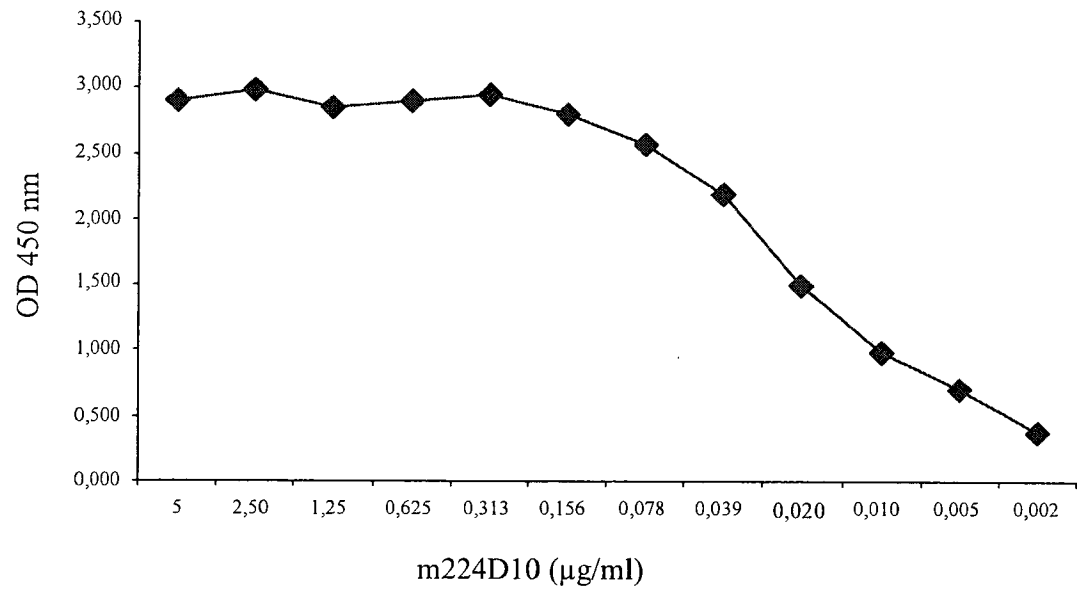
19. 如申請專利範圍第17或18項之方法，其中一腫瘤係評分為2⁺或3⁺之c-Met(+)。
20. 一種測定一種致癌疾患對於一種抗c-Met抗體或其一片段或衍生物之治療是否具易感性之方法，其中該方法的步驟包括(a)如申請專利範圍第19項在試管中測定一個體之一腫瘤的c-Met狀況，及(b)若該狀況為c-Met(+)，則判定該致癌疾患對於一種抗c-Met抗體或其一片段或衍生物之治療具易感性。
21. 一種包含如申請專利範圍第1至7項中之一項之至少一種抗c-Met抗體或其一功能片段或衍生物之套組，該抗體較佳加有標記。
22. 如申請專利範圍第21項之用於在試管中檢測一個體中之表現c-Met的腫瘤之存在及/或位置之一套組，該套組進一步包含適用於檢測該抗c-Met抗體與c-Met之間的結合程度之一種試劑。
23. 如申請專利範圍第21項之用於在試管中測定一種表現c-Met的腫瘤中之c-Met表現水平之一套組，該套組進一步包含適用於量化該抗c-Met抗體與c-Met之間的結合水平之一種試劑。

24. 如申請專利範圍第21或22項之用於在試管中測定一腫瘤的c-Met狀況之一套組，該套組進一步包含：

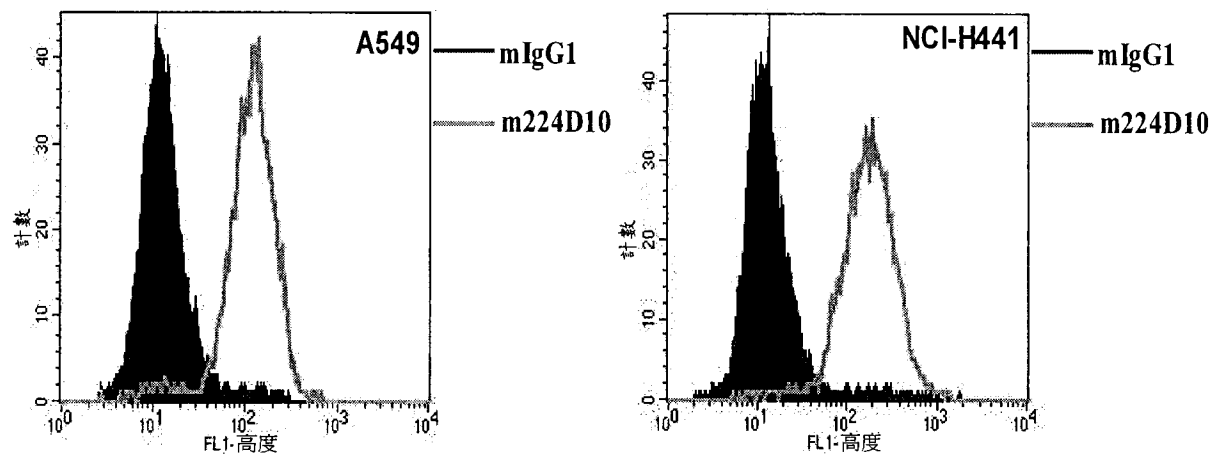
i) 適用於檢測該抗c-Met抗體與c-Met之間的結合程度之一種試劑；及

ii) 適用於c-Met表現水平的評分之陽性與陰性對照組試樣。

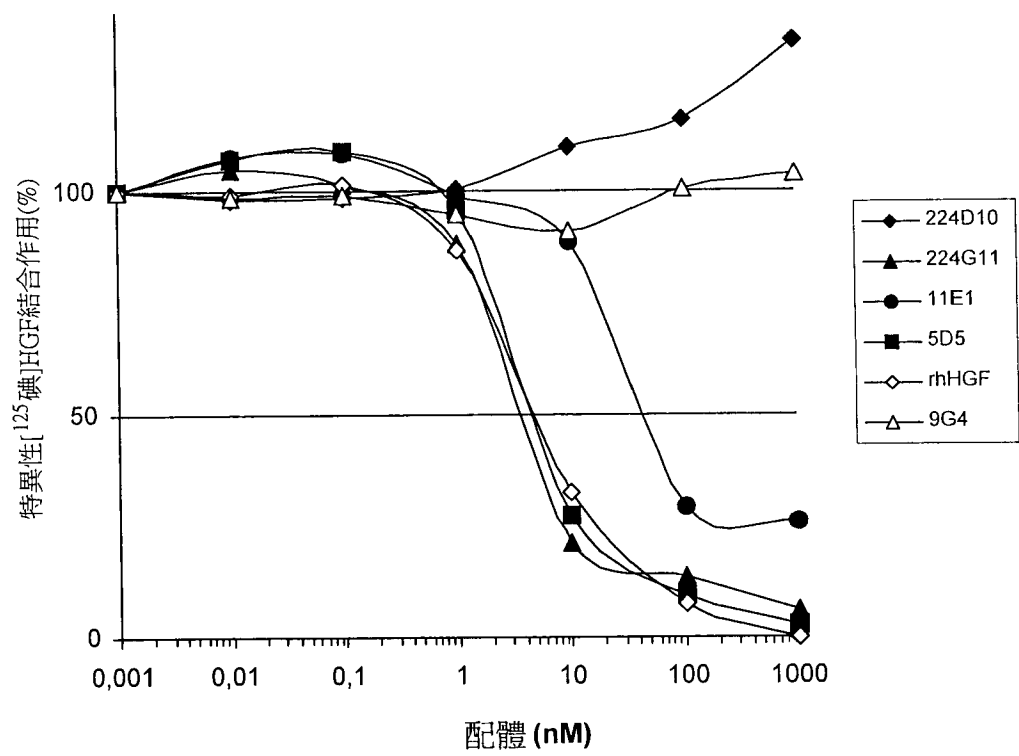
25. 如申請專利範圍第24項之用於在試管中測定一腫瘤的c-Met狀況之一套組，該套組進一步包含對於鼠類抗體具有特異性之一種多株抗體，對於鼠類抗體具有特異性之該多株抗體較佳加有標記。



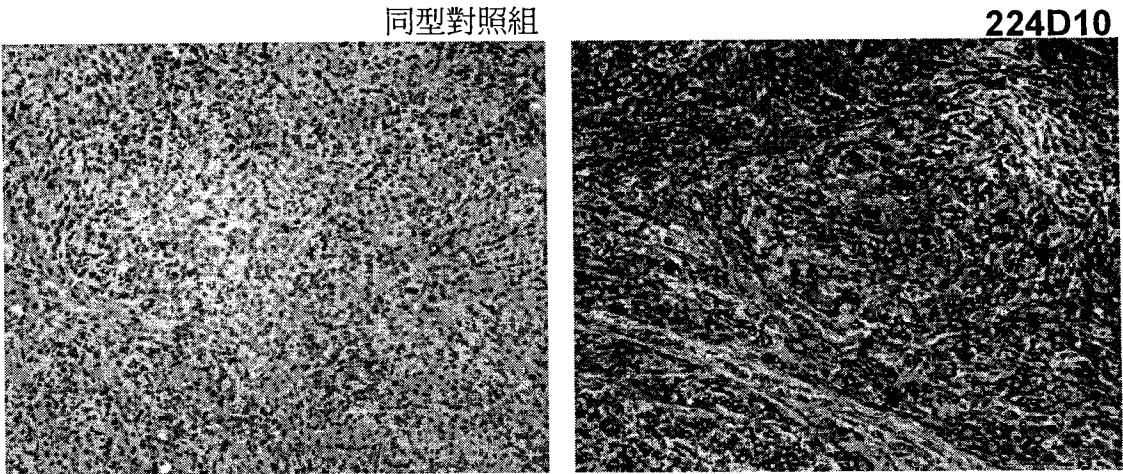
第 1A 圖



第 1B 圖

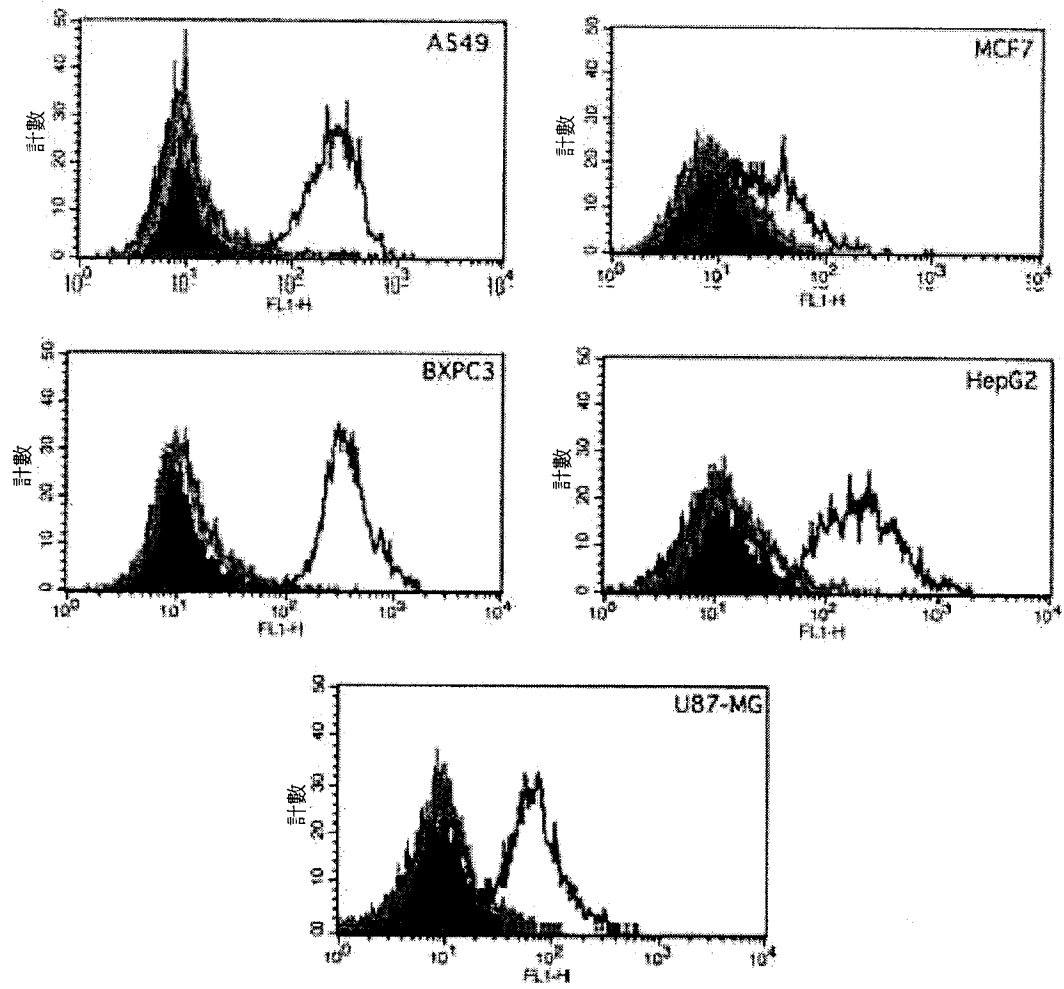


第 2 圖

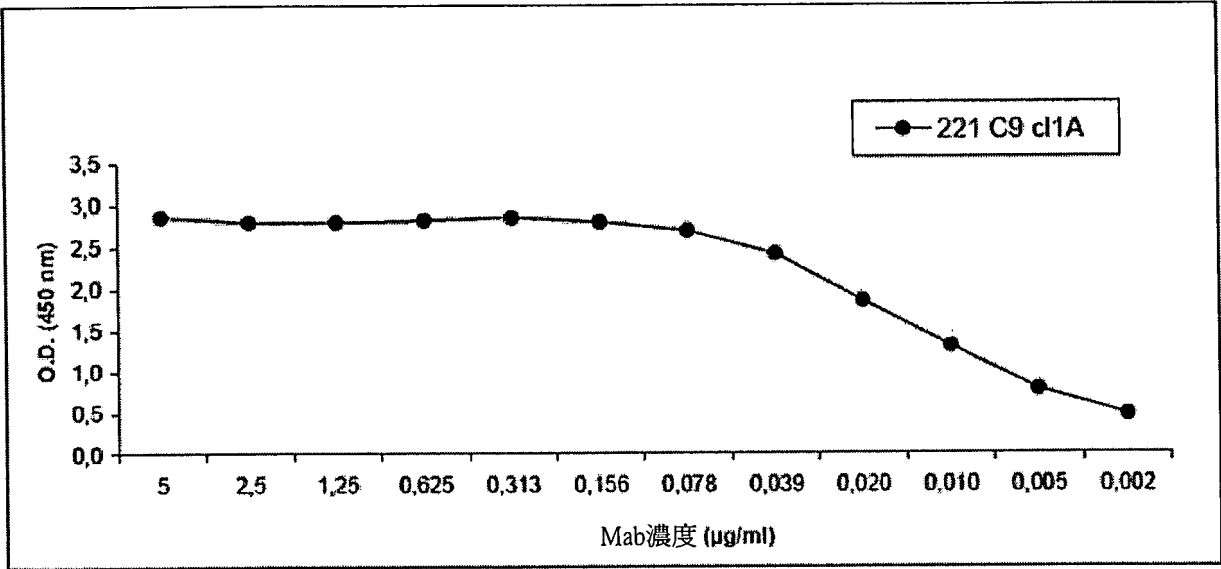


第 3A 圖

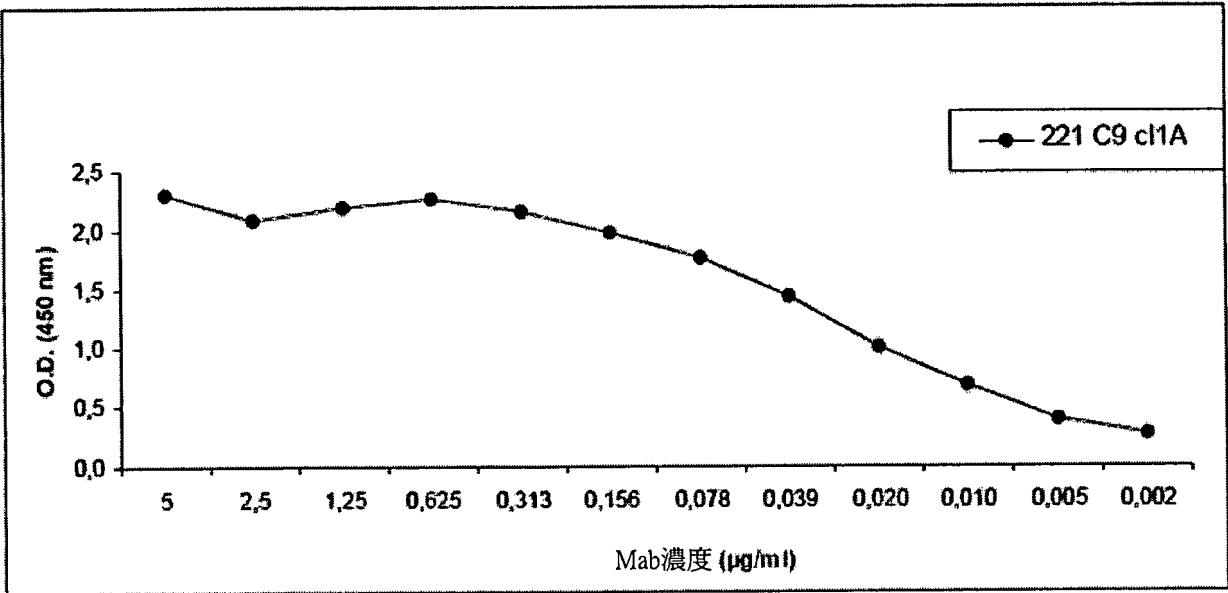
第 3B 圖



第 4 圖

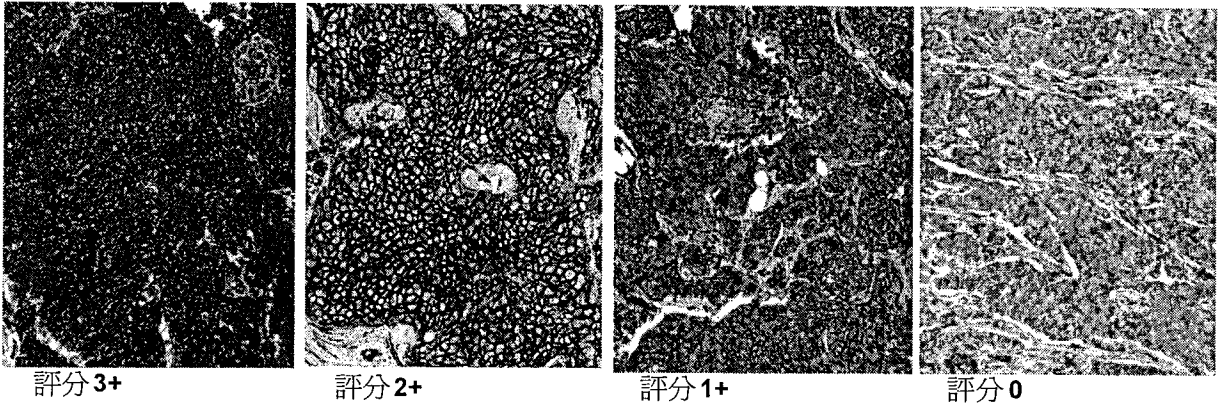


第 5A 圖

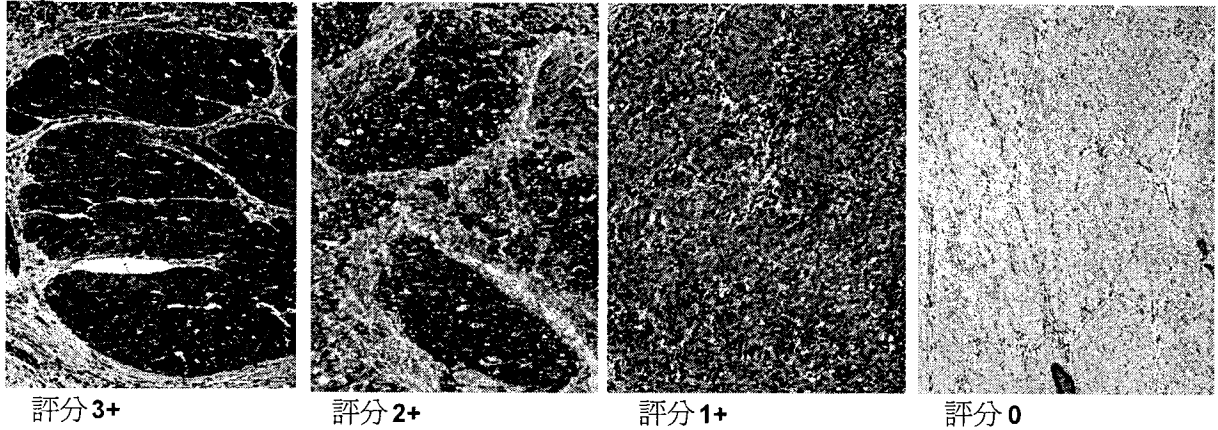


第 5B 圖

A) 乳癌

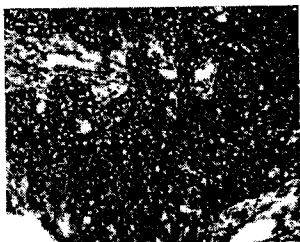


B) 胃癌

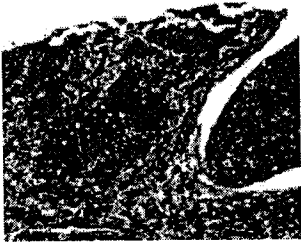


第 6 圖

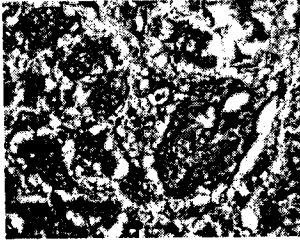
A) 乳癌



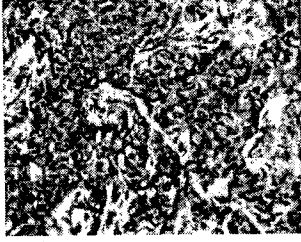
3+



2+

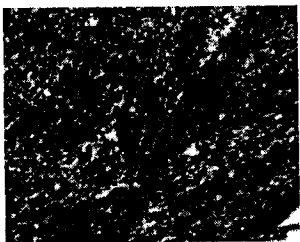


1+

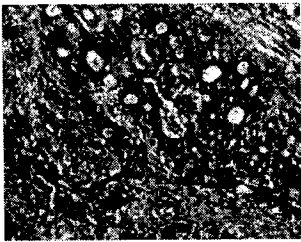


陰性

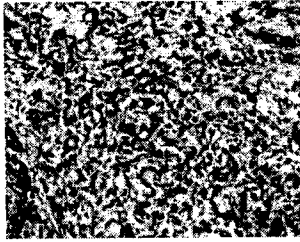
B) 胃癌



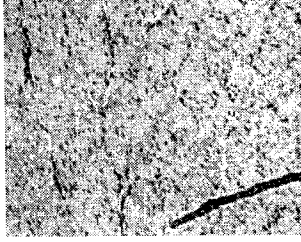
3+



2+

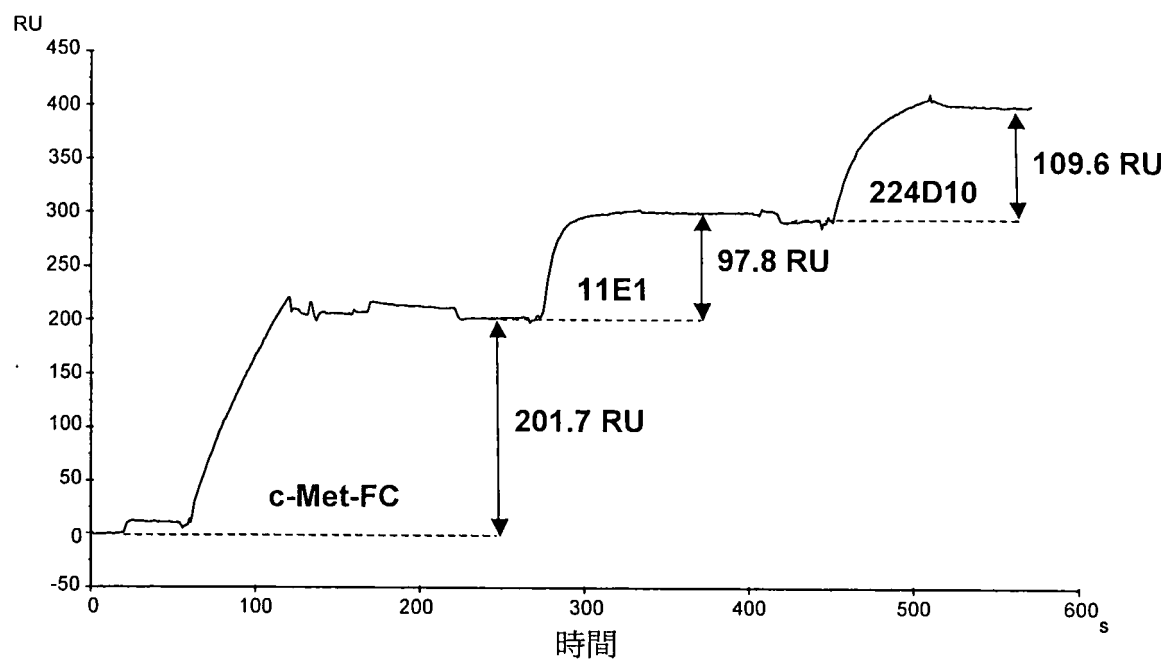


1+

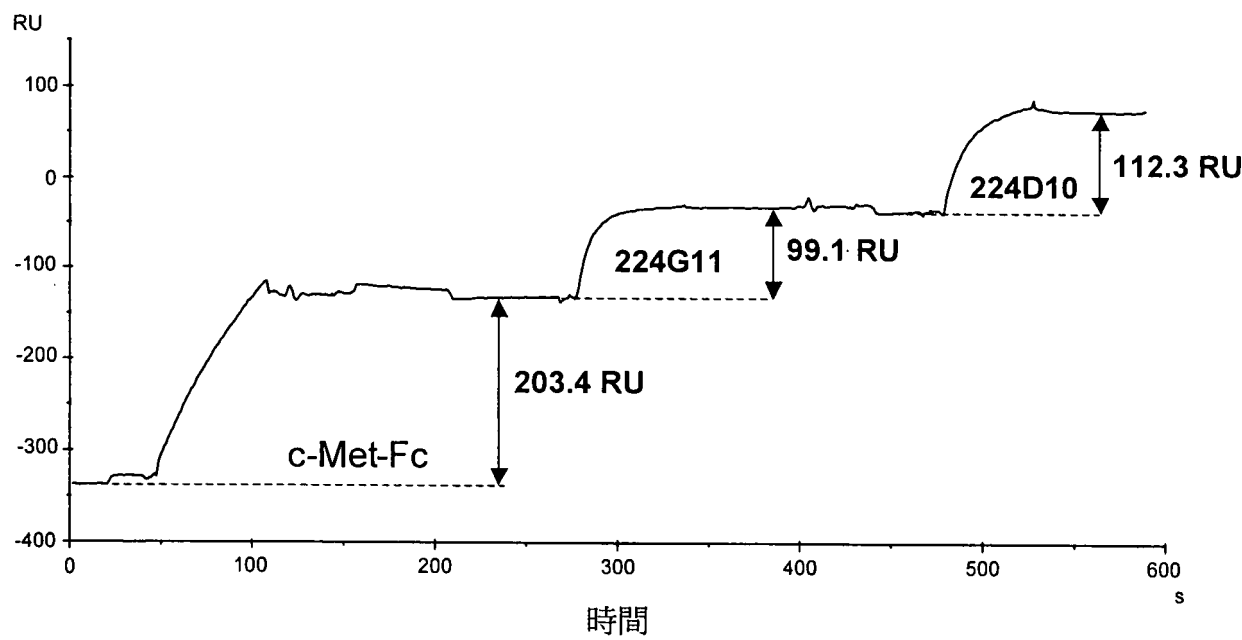


陰性

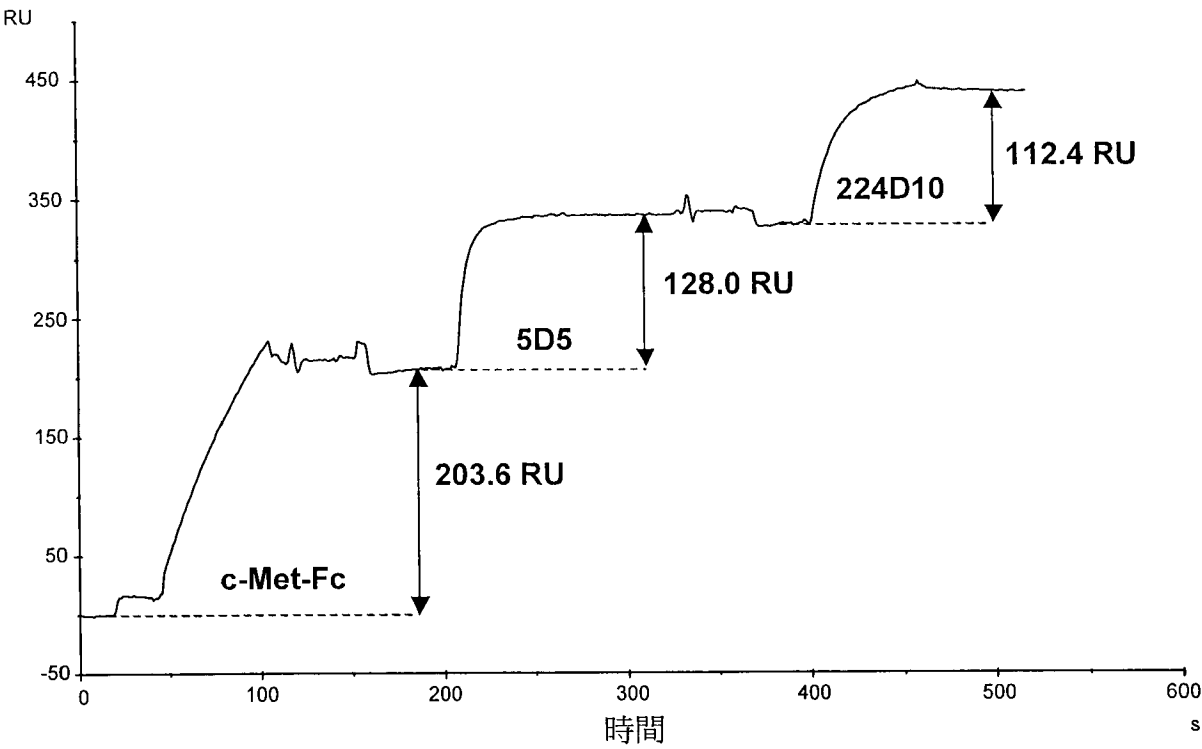
第 7 圖



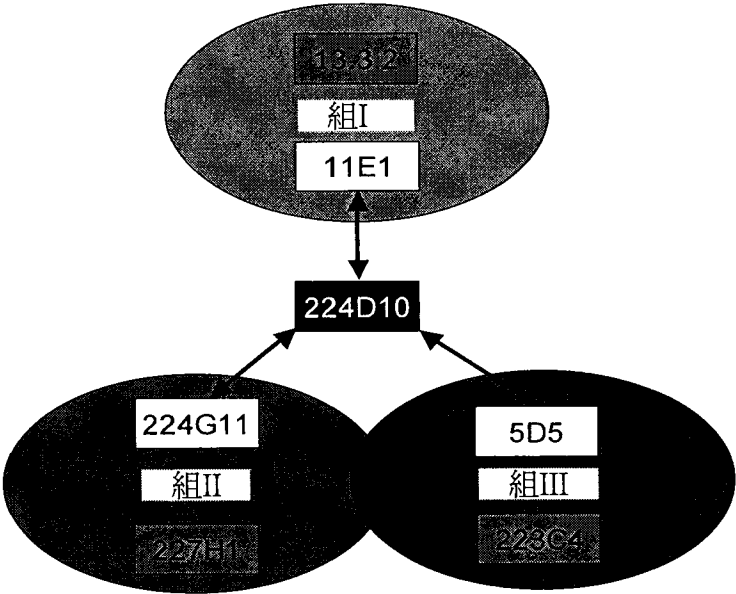
第 8 圖



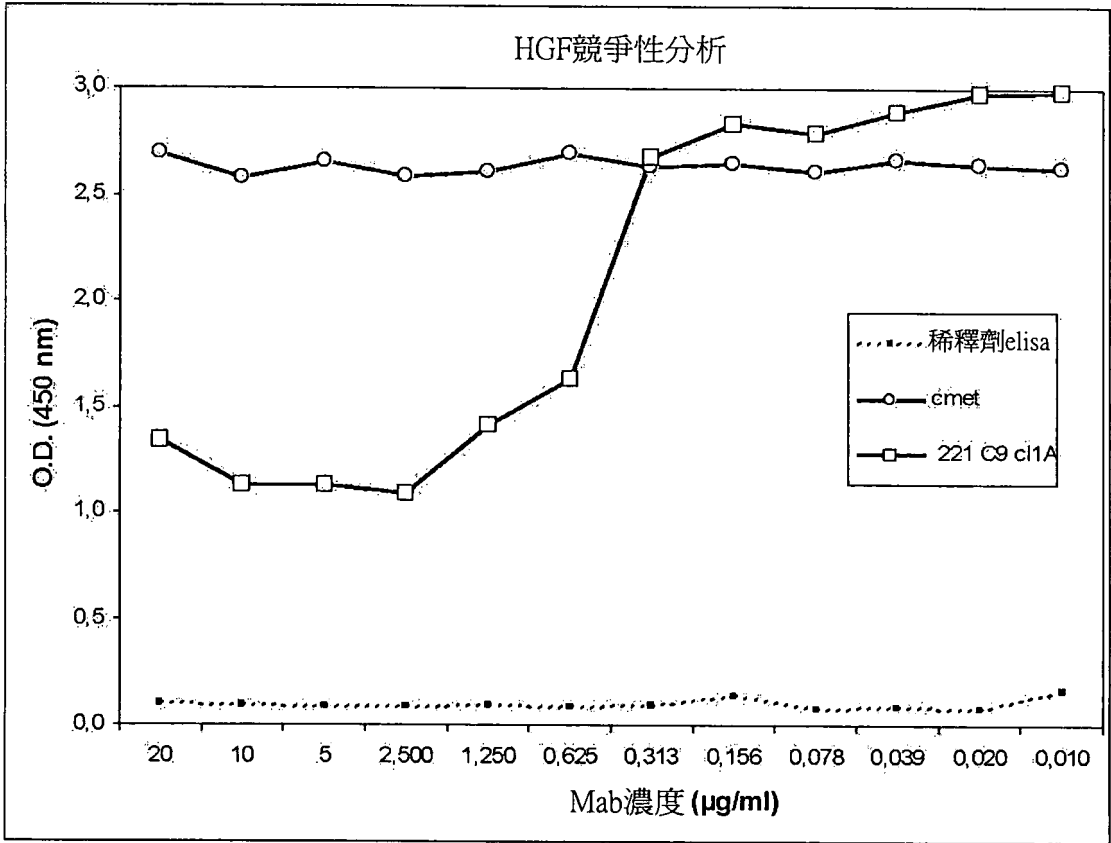
第 9 圖



第 10 圖



第 11 圖



第 12 圖

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ ）圖。（無）

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

段。

為求更加清楚明瞭，下列第3a表歸納對應於本發明的
抗體224D10之各種胺基酸序列。

第3a表(其中Mu.為鼠類)

抗體	CDR 編號	重鏈	輕鏈	序列辨 識編號
224D10	共同	CDR-H1		1
		CDR-H2		2
		CDR-H3		3
			CDR-L1	4
			CDR-L2	5
			CDR-L3	6
	IMGT	CDR-H1		7
		CDR-H2		2
		CDR-H3		8
			CDR-L1	4
			CDR-L2	5
			CDR-L3	6
	Kabat	CDR-H1		9
		CDR-H2		10
		CDR-H3		3
			CDR-L1	11
			CDR-L2	12
			CDR-L3	6
		Mu.可變域		13
			Mu.可變域	14

為求更加清楚明瞭，下列第3b表歸納對應於本發明的
抗體221C9之各種胺基酸序列。

第 3b 表 (其中 Mu. 為鼠類)

抗體	CDR 編號	重鏈	輕鏈	序列辨 識編號
221C9	IMGT	CDR-H1		29
		CDR-H2		30
		CDR-H3		31
			CDR-L1	32
			CDR-L2	33
			CDR-L3	34
	Kabat	CDR-H1		35
		CDR-H2		36
		CDR-H3		37
			CDR-L1	38
			CDR-L2	39
			CDR-L3	34
		Mu. 可變域		40
			Mu. 可變域	41

如本發明的另一方面係有關於可分泌如本發明的一單株抗體之一種鼠類融合瘤。該融合瘤係藉由融合 Balb/C 免疫小鼠脾細胞與骨髓瘤 Sp 2/O-Ag 14 系的細胞而製得。

此後稱作 224D10 之單株抗體或其衍生化合物或功能片

段顯然構成本發明的一部份，及其特徵在於該抗體係由該融合瘤所分泌。

如本發明的另一方面係有關於可分泌如本發明的一單株抗體之一種鼠類融合瘤。該融合瘤係藉由融合Balb/C免疫小鼠脾細胞與骨髓瘤Sp 2/O-Ag 14系的細胞而製得。

此後稱作221C9之單株抗體或其衍生化合物或功能片段顯然構成本發明的一部份，及其特徵在於該抗體係由該融合瘤所分泌。

本發明之一新穎方面係有關於一種分離核酸，其特徵在於其係選自下列核酸：

a)編碼如本發明之一抗體或編碼其一衍生化合物或功能片段之一核酸、DNA或RNA；

b)一核酸，其所包括之一DNA序列係包含選自由序列辨識編號15至26及42至52之序列所組成之群組之一序列，或包含在與序列辨識編號15至26及42至52之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列；

c)一核酸，其所包括之一DNA序列係包含序列辨識編號27、28、53及/或54之序列，或包含在與序列辨識編號27、28、53及/或54之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列；

d)如a)、b)或c)中所界定的核酸之對應的RNA核酸；

e)如a)、b)與c)中所界定的核酸之互補核酸；及

f)一種具有至少18個核苷酸之核酸，其可在高度嚴格的

條件下與序列辨識編號15至28及42至54之序列或在與序列辨識編號15至28及42至54之序列最佳排比之後的相同度至少80%及較佳85%、90%、95%及98%之一序列或其一互補序列之至少一種CDR雜交。

下列第4a表歸納有關本發明的抗體224D10之各種核苷酸序列。

第4a表

抗體	CDR 編號	重鏈	輕鏈	序列 辨識 編號
224D10	共同	CDR-H1		15
		CDR-H2		16
		CDR-H3		17
			CDR-L1	18
			CDR-L2	19
			CDR-L3	20
	IMGT	CDR-H1		21
		CDR-H2		16
		CDR-H3		22
			CDR-L1	18
			CDR-L2	19
			CDR-L3	20
	Kabat	CDR-H1		23
		CDR-H2		24
		CDR-H3		17
			CDR-L1	25
			CDR-L2	26
			CDR-L3	20
		Mu.可變域		27
			Mu.可變域	28

七、申請專利範圍：

1. 一種可與c-Met蛋白特異性結合之分離抗體或其一功能片段或衍生物，其特徵在於包含i)包含如IMGT編號系統所界定的至少下列三種CDR即CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3之一重鏈，其中CDR-H1包含序列辨識編號55之序列，CDR-H2包含序列辨識編號56之序列及CDR-H3包含序列辨識編號57之序列；及/或ii)包含如IMGT編號系統所界定的至少下列三種CDR即CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3之一輕鏈，其中CDR-L1包含序列辨識編號58之序列，CDR-L2包含序列辨識編號59之序列及CDR-L3包含序列辨識編號60之序列。
2. 如申請專利範圍第1項之抗體或其一功能片段或衍生物，其特徵在於其所包含之一重鏈係選自由下列所組成之群組：
 - a) 包含如IMGT編號系統所界定的下列三種CDR之一重鏈，即分別為具有序列辨識編號7的序列之CDR-H1，具有序列辨識編號2的序列之CDR-H2及具有序列辨識編號8的序列之CDR-H3；及
 - b) 包含如IMGT編號系統所界定的下列三種CDR之一重鏈，即分別為具有序列辨識編號29的序列之CDR-H1，具有序列辨識編號30的序列之CDR-H2及具有序列辨識編號31的序列之CDR-H3。
3. 如申請專利範圍第1項之抗體或其一功能片段或衍生物，其特徵在於其所包含之一輕鏈係選自由下列所組成

之群組：

a) 包含如 IMGT 編號系統所界定的下列三種 CDR 之一輕鏈，即分別為具有序列辨識編號 4 的序列之 CDR-L1，具有序列辨識編號 5 的序列之 CDR-L2 及具有序列辨識編號 6 的序列之 CDR-L3；及

b) 包含如 IMGT 編號系統所界定的下列三種 CDR 之一輕鏈，即分別為具有序列辨識編號 32 的序列之 CDR-L1，具有序列辨識編號 33 的序列之 CDR-L2 及具有序列辨識編號 34 的序列之 CDR-L3。

4. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中之一項之抗體或其一功能片段或衍生物，其特徵在於其係選自由下列所組成之群組：

a) 一抗體或其一功能片段或衍生物，其包含：

- 包含如 IMGT 所界定的下列三種 CDR 之一重鏈，即分別為具有序列辨識編號 7 的序列之 CDR-H1，具有序列辨識編號 2 的序列之 CDR-H2 及具有序列辨識編號 8 的序列之 CDR-H3，及

- 包含如 IMGT 所界定的下列三種 CDR 之一輕鏈，即分別為具有序列辨識編號 4 的序列之 CDR-L1，具有序列辨識編號 5 的序列之 CDR-L2 及具有序列辨識編號 6 的序列之 CDR-L3；及

b) 一抗體或其一功能片段或衍生物，其包含：

- 包含如 IMGT 所界定的下列三種 CDR 之一重鏈，即分別為具有序列辨識編號 29 的序列之 CDR-H1，具有序

列辨識編號30的序列之CDR-H2及具有序列辨識編號31的序列之CDR-H3；及

-包含如IMGT所界定的下列三種CDR之一輕鏈，即分別為具有序列辨識編號32的序列之CDR-L1，具有序列辨識編號33的序列之CDR-L2及具有序列辨識編號34的序列之CDR-L3。

5. 如申請專利範圍第1至4項中之一項之抗體或其一功能片段或衍生物，其特徵在於其係選自由下列所組成之群組：

a)一抗體或其一功能片段或衍生物，其包括包含胺基酸序列辨識編號13的序列之一重鏈可變域及包含胺基酸序列辨識編號14的序列之一輕鏈可變域；及

b)一抗體或其一功能片段或衍生物，其包括包含胺基酸序列辨識編號40的序列之一重鏈可變域及包含胺基酸序列辨識編號41的序列之一輕鏈可變域。

6. 如申請專利範圍第1至5項中之一項之抗體或其一功能片段或衍生物，其特徵在於其係一種鼠類抗體。
7. 如申請專利範圍第1至6項中之一項之抗體或其一功能片段或衍生物，其特徵在於其不阻斷配體HGF與c-Met蛋白的結合作用。

8. 一種分離核酸，其特徵在於其係選自下列核酸：

a)編碼如申請專利範圍第1至7項中之一項的一抗體之一核酸、DNA或RNA；

b)一核酸，其所包括之一DNA序列係包含選自由序

列辨識編號15至26或42至52的序列所組成之群組之一序列；

c)一核酸，其所包括之一DNA序列係包含序列辨識編號27、28、53或54之序列；

d)如a)、b)或c)中所界定的核酸之對應的RNA核酸；

e)如a)、b)與c)中所界定的核酸之互補核酸；及

f)一種具有至少18個核苷酸之核酸，其可在高度嚴格的條件下與序列辨識編號15至28或42至54之序列或其互補序列之至少一個CDR雜交。

9. 如申請專利範圍第1至7項中之一項的一抗體或其一功能片段或衍生物，在試管中診斷一種與c-Met表現作用相關聯的致癌疾患或在試管中判定發生一種與c-Met表現作用相關聯的致癌疾患之預後之用途。
10. 一種在試管中檢測一個體中之表現c-Met的腫瘤之存在及/或位置之方法，其中該方法的步驟包括(a)將來自該個體的一試樣與如申請專利範圍第1至7項中之一項的一抗體或其一功能片段或衍生物接觸，及(b)檢測該抗體與該試樣的結合作用。
11. 一種在試管中測定來自一個體之一種表現c-Met的腫瘤中之c-Met表現水平之方法，其中該方法的步驟包括(a')將來自該個體的一試樣與如申請專利範圍第1至7項中之一項的一抗體或其一功能片段或衍生物接觸，及(b')量化與該試樣中的c-Met結合之抗體水平。
12. 如申請專利範圍第11項之方法，其中藉由免疫組織化學

(IHC)測量c-Met的表現水平。

13. 一種在試管中診斷一種表現c-Met的腫瘤或在試管中判定在一個體中發生一種表現c-Met的腫瘤之預後之方法，其中該方法的步驟包括(i)如申請專利範圍第11項測定c-Met的表現水平，及(ii)比較步驟(i)的表現水平與來自正常組織之c-Met的參考表現水平。
14. 一種在試管中測定一個體之一腫瘤的c-Met狀況之方法，其中該方法的步驟包括(1)如申請專利範圍第11項測定c-Met的表現水平，(2)就該腫瘤的c-Met表現水平進行評分，及(3)比較該評分與自一對照組試樣所得的評分。
15. 如申請專利範圍第14項之方法，其中該評分包括使用以二種參數即染色強度與陽性細胞百分比為基礎之一適當量表。
16. 如申請專利範圍第15項之方法，其中該適當量表係一種0至3⁺之量表，其中腫瘤細胞並無膜反應性係評分為0，及在超過10%的腫瘤細胞中之強烈的完整反應性係評分為3⁺。
17. 如申請專利範圍第16項之方法，其中該適當量表係一個0至3之量表，其中腫瘤細胞並無膜反應性係評分為0；在超過10%的腫瘤細胞中之微弱可察知的膜反應性係評分為1⁺；在超過10%的腫瘤細胞中之弱至中等的完整膜反應性係評分為2⁺；及在超過10%的腫瘤細胞中之強烈的完整反應性係評分為3⁺。
18. 如申請專利範圍第16或17項之方法，其中一腫瘤係評分

為 2^+ 或 3^+ 之c-Met(+)

19. 一種測定一種致癌疾患對於一種抗c-Met抗體或其一段或衍生物之治療是否具易感性之方法，其中該方法的步驟包括(a)如申請專利範圍第18項在試管中測定一個體之一腫瘤的c-Met狀況，及(b)若該狀況為c-Met(+)，則判定該致癌疾患對於一種抗c-Met抗體或其一段或衍生物之治療具易感性。
20. 一種包含如申請專利範圍第1至7項中之一項之至少一種抗c-Met抗體或其一功能片段或衍生物之套組，該抗體較佳加有標記。
21. 如申請專利範圍第20項之用於在試管中檢測一個體中之表現c-Met的腫瘤之存在及/或位置之一套組，該套組進一步包含適用於檢測該抗c-Met抗體與c-Met之間的結合程度之一種試劑。
22. 如申請專利範圍第20項之用於在試管中測定一種表現c-Met的腫瘤中之c-Met表現水平之一套組，該套組進一步包含適用於量化該抗c-Met抗體與c-Met之間的結合水平之一種試劑。
23. 如申請專利範圍第20或21項之用於在試管中測定一腫瘤的c-Met狀況之一套組，該套組進一步包含：
 - i)適用於檢測該抗c-Met抗體與c-Met之間的結合程度之一種試劑；及
 - ii)適用於c-Met表現水平的評分之陽性與陰性對照組試樣。

24. 如申請專利範圍第23項之用於在試管中測定一腫瘤的
c-Met狀況之一套組，該套組進一步包含對於鼠類抗體
具有特異性之一種多株抗體，對於鼠類抗體具有特異性
之該多株抗體較佳加有標記。