(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0130755
(43) 공개일자 2021년11월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) *A61K 31/5365* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6879 (2017.08)
A61K 31/5365 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7029569
(22) 출원일자(국제) 2020년02월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년09월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/019126
(87) 국제공개번호 WO 2020/172475
국제공개일자 2020년08월27일
(30) 우선권주장
62/808,839 2019년02월21일 미국(US)
62/823,788 2019년03월26일 미국(US)

(71) 출원인
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 울드 소우 밀 리버 로드 777
(72) 발명자
슈왈츠 개리
미국 뉴욕 10027 뉴욕 클레어몬트 애비뉴 91 스위트 516 콜럼비아 유니버시티 내
수리가 올리버
미국 뉴욕 10027 뉴욕 클레어몬트 애비뉴 91 스위트 516 콜럼비아 유니버시티 내
(74) 대리인
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 **항-MET 항체 및 MET에 결합하는 이중특이적 항원 결합 분자를 사용하여 안구암을 치료하는 방법**

(57) 요 약

MET에 결합하는 항체 및 이중특이적 항원 결합 분자를 사용하거나 항체 또는 이중특이적 항원 결합 분자를 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)를 사용해 포도막 흑색종, 안와 림프종, 망막아종, 및 수질상피종과 같은 안암을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 이중특이적 항원 결합 분자는 제1 및 제2 항원 결합 도메인을 포함하되, 제1 및 제2 항원 결합 도메인은 인간 MET의 세포외 도메인의 2개의 상이한 에피토프에 결합한다. ADC는 세포독성제, 방사성 핵종, 또는 다른 모이어티에 연결된 본원에 제공된 항체 또는 이중특이적 항원 결합 분자를 포함한다. 항체 및 이중특이적 항원 결합 분자는 인간 MET와 이의 리간드 HGF 사이의 상호작용을 차단할 수 있다. 안구암, 예를 들어 c-Met를 발현하는 포도막 흑색종을 가진 대상체는 항체, 이중특이적 항원 결합 분자, 또는 이의 ADC를 대상체에게 투여함으로써 치료될 수 있다.

(52) CPC특허분류
A61K 47/6817 (2017.08)
A61K 47/6849 (2017.08)
A61K 47/6851 (2017.08)
A61K 47/6889 (2017.08)
A61P 27/02 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2863 (2013.01)
C07K 16/3023 (2013.01)
C07K 16/3046 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

대상체에서 포도막 흑색종을 치료하고, 포도막 흑색종 종양 성장을 감소시키고/시키거나, 포도막 흑색종의 퇴행을 유발하는 방법으로서, 상기 방법은 이중특이적 항원 결합 분자 및 세포독소를 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하되, 이중특이적 항원 결합 분자는:

제1 항원 결합 도메인(D1); 및

제2 항원 결합 도메인(D2)을 포함하고;

D1은 인간 MET의 제1 에피토프에 특이적으로 결합하고;

D2는 인간 MET의 제2 에피토프에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 포도막 흑색종은 MET를 발현하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, D1은 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR) 내의 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 내의 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)을 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, D2는 서열번호 82의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR) 내의 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 내의 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)을 포함하는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 이중특이적 항원 결합 분자는 서열번호 58의 D1-HCVR 아미노산 서열 내의 CDR 및 서열번호 82의 D2-HCVR 아미노산 서열 내의 CDR을 포함하는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 인간 MET의 제1 에피토프는 서열번호 155의 아미노산 192~204를 포함하는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 인간 MET의 제2 에피토프는 서열번호 155의 아미노산 305~315 및 421~455를 포함하는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 인간 MET의 제1 에피토프는 서열번호 155의 아미노산 192~204를 포함하고; 인간 MET의 제2 에피토프는 서열번호 155의 아미노산 305~315 및 421~455를 포함하는, 방법.

청구항 9

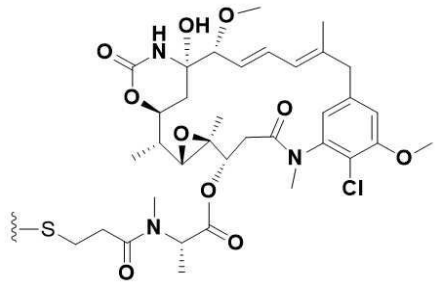
제1항에 있어서, 세포독소는 바이오독소(biotoxin), 화학요법제(chemotherapeutic agent), 및 방사성 동위원소(radioisotope)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 세포독소는 메이탄시노이드, 아우리스타틴, 토메이마이신, 듀오카마이신, ^{225}Ac, ^{227}Th, 및 이들의 임의의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 11

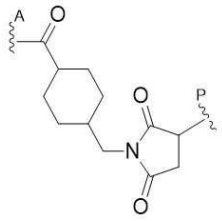
제1항에 있어서, 세포독소는 링커를 통해 이중특이적 항원 결합 분자에 접합되고, 세포독소는:



이고, 식 중 ~ 는 링커에 대한 결합인, 방법.

청구항 12

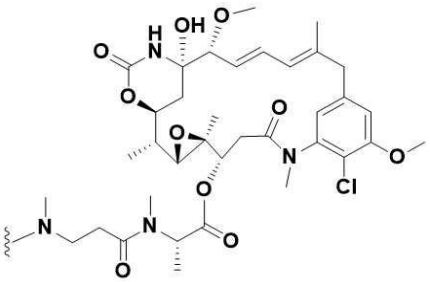
제11항에 있어서, 링커는:



이고, 식 중, ~A 로 표시된 결합은 이중특이적 항원 결합 분자에 대한 결합을 나타내고, ~P 로 표시된 결합은 세포독소에 대한 결합을 나타내는, 방법.

청구항 13

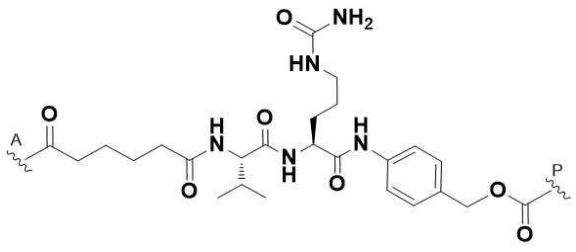
제1항에 있어서, 세포독소는 링커를 통해 이중특이적 항원 결합 분자에 접합되고, 세포독소는:



이고, 식 중 ~ 는 링커에 대한 결합인, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 링커는:



이고, 식 중,  로 표시된 결합은 이중특이적 항원 결합 분자에 대한 결합을 나타내고, 로 표시된 결합은 세포독소에 대한 결합을 나타내는, 방법.

청구항 15

포도막 흑색종 세포의 증식을 억제하고, 침윤을 억제하고, 세포자멸사를 유발하고/하거나, 생존율을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 이중특이적 항원 결합 분자 및 세포독소를 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하되, 이중특이적 항원 결합 분자는:

제1 항원 결합 도메인(D1); 및

제2 항원 결합 도메인(D2)을 포함하고;

D1은 인간 MET의 제1 에피토프에 특이적으로 결합하고;

D2는 인간 MET의 제2 에피토프에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 16

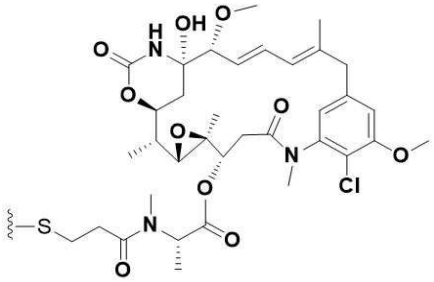
제15항에 있어서, D1은 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR) 내의 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 내의 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)을 포함하는, 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, D2는 서열번호 82의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR) 내의 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 내의 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)을 포함하는, 방법.

청구항 18

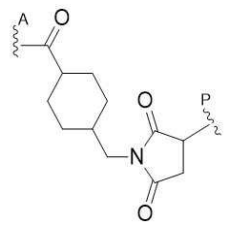
제15항에 있어서, 세포독소는 링커를 통해 이중특이적 항원 결합 분자에 접합되고, 세포독소는:



이고, 식 중  는 링커에 대한 결합인, 방법.

청구항 19

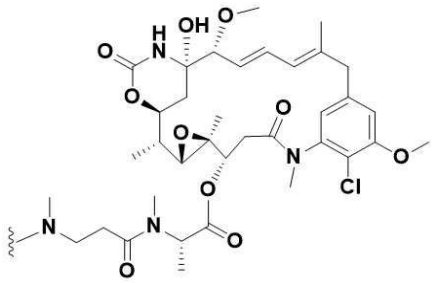
제18항에 있어서, 링커는:



이고, 식 중  로 표시된 결합은 이중특이적 항원 결합 분자에 대한 결합을 나타내고,  로 표시된 결합은 세포독소에 대한 결합을 나타내는, 방법.

청구항 20

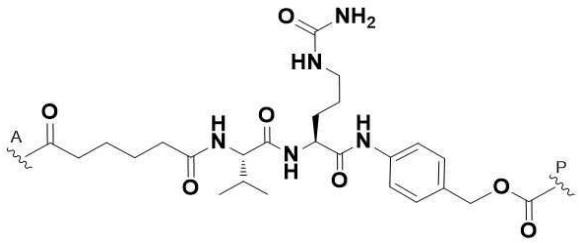
제15항에 있어서, 세포독소는 링커를 통해 이중특이적 항원 결합 분자에 접합되고, 세포독소는:



이고, 식 중 ~ 는 링커에 대한 결합인, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 링커는:



이고, 식 중 ~A 로 표시된 결합은 이중특이적 항원 결합 분자에 대한 결합을 나타내고, ~P 로 표시된 결합은 세포독소에 대한 결합을 나타내는, 방법.

청구항 22

포도막 흑색종 세포의 유사분열 정지를 유도하는 방법으로서, 상기 방법은 이중특이적 항원 결합 분자 및 세포독소를 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)와 세포를 생체 내에서 접촉시키는 단계를 포함하되, 이중특이적 항원 결합 분자는:

제1 항원 결합 도메인(D1); 및

제2 항원 결합 도메인(D2)을 포함하고;

D1은 인간 MET의 제1 에피토프에 특이적으로 결합하고;

D2는 인간 MET의 제2 에피토프에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 23

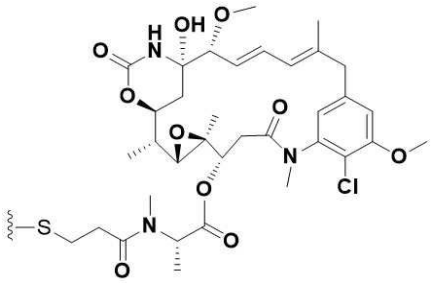
제22항에 있어서, D1은 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR) 내의 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 내의 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)을 포함하는, 방법.

청구항 24

제22항에 있어서, D2는 서열번호 82의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR) 내의 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 내의 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)을 포함하는, 방법.

청구항 25

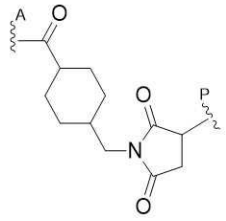
제22항에 있어서, 세포독소는 링커를 통해 이중특이적 항원 결합 분자에 접합되고, 세포독소는:



이고, 식 중 ~ 는 링커에 대한 결합인, 방법.

청구항 26

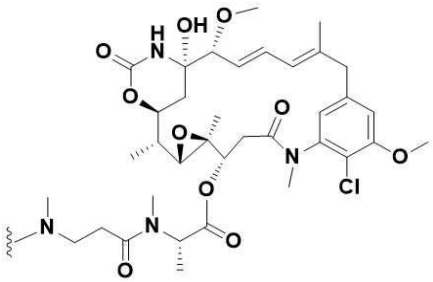
제25항에 있어서, 링커는:



이고, 식 중 ~A 로 표시된 결합은 이중특이적 항원 결합 분자에 대한 결합을 나타내고, ~P 로 표시된 결합은 세포독소에 대한 결합을 나타내는, 방법.

청구항 27

제22항에 있어서, 세포독소는 링커를 통해 이중특이적 항원 결합 분자에 접합되고, 세포독소는:



이고, 식 중 ~ 는 링커에 대한 결합인, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 링커는:



이고, 식 중 ~A 로 표시된 결합은 이중특이적 항원 결합 분자에 대한 결합을 나타내고, ~P 로 표시된 결합은 세포

독소에 대한 결합을 나타내는, 방법.

청구항 29

c-Met 발현 종양을 앓고 있는 대상체에서 안암을 치료하거나 전이를 억제하는 방법으로서, 상기 방법은

제1 항원 결합 도메인(D1); 및

제2 항원 결합 도메인(D2)을 포함하는 이중특이적 항원 결합 분자를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하되;

D1은 인간 MET의 제1 에피토프에 특이적으로 결합하고;

D2는 인간 MET의 제2 에피토프에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 안암은 포도막 흑색종, 안와 림프종, 망막아종, 및 수질상피종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 31

제29항에 있어서, 제2 항암 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 32

제29항에 있어서, D1 및 D2는 인간 MET에 결합하기 위해 서로 경쟁하지 않는, 방법.

청구항 33

제29항에 있어서, D1은 서열번호 58의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR) 내의 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 서열번호 138의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 내의 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)을 포함하는, 방법.

청구항 34

제29항에 있어서, HCDR1은 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하고; HCDR2는 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하고; HCDR3은 서열번호 64의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR1은 서열번호 140의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR2는 서열번호 142의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR3은 서열번호 144의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 이중특이적 항원 결합 분자는 서열번호 58의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 138의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 LCVR을 포함하는, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 이중특이적 항원 결합 분자는 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하는 LCVR을 포함하는, 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, D2는 서열번호 82의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR) 내의 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 서열번호 138의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 내의 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)을 포함하는, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, HCDR1은 서열번호 84의 아미노산 서열을 포함하고; HCDR2는 서열번호 86의 아미노산 서열을

포함하고; HCDR3은 서열번호 88의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR1은 서열번호 140의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR2는 서열번호 142의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR3은 서열번호 144의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 이중특이적 항원 결합 분자는 서열번호 82의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 138의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 LCVR을 포함하는, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 이중특이적 항원 결합 분자는 서열번호 82의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하는 LCVR을 포함하는, 방법.

청구항 41

제29항에 있어서, 이중특이적 항원 결합 분자는 세포독소에 접합되어 항체-약물 접합체(ADC)를 형성하고, 세포독소는 메이탄시노이드인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **기술 분야**

[0002] 본 발명은 간세포 성장 인자 수용체(c-Met 또는 MET)에 특이적으로 결합하여 MET 신호 전달을 조절하는 항체, 이중특이적 항체, 및 이들의 항원 결합 단편을 비롯하여 이러한 항체의 항체-약물 접합체를 사용해 포도막 흑색종을 포함하는 안구암을 치료하는 것에 관한 것이다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 서열 목록의 공식 사본은, 2020년 2월 20일자로 생성되고 10548WO01_SEQ_LIST_ST25.TXT의 파일명을 가진 약 140 킬로바이트 크기의 ASCII 형식의 서열 목록으로서, EFS-Web을 통해 전자 방식으로 명세서와 함께 동시에 제출된다. 본 ASCII 형식의 문헌에 포함된 서열 목록은 본 명세서의 일부이며 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

배 경 기 술

[0005] 포도막 흑색종은 성인에서 가장 흔한 원발성 안구내 악성 종양으로서, 안구 흑색종의 79~81%를 차지한다. 미국에서의 발생률은 인구 백만명 당 5명으로 추정되는 반면, 유럽에서의 발생률은 인구 백만명 당 2 내지 8명의 범위로, 위도에 따라 달라지며 북에서 남으로 갈수록 발생률이 감소한다. 포도막 흑색종은 전이 경향이 높아서 장기 예후가 좋지 않으며, 50%를 초과하는 증례에서 사망이 발생한다.

[0006] 간세포 성장 인자(HGF)(산란 인자[SF]로도 알려짐)는 HGF 수용체(HGFR)와 상호작용함으로써 그 활성을 발휘하는 이종이량체 파라크린 성장 인자이다. HGFR은 c-Met 종양유전자의 산물이며 MET로도 알려져 있다. MET는 이황화 브릿지를 통해 세포외 알파 사슬에 연결된 막관통 베타 사슬로 이루어진 수용체 티로신 키나아제이다. MET에 대한 HGF의 결합은 MET의 키나아제 촉매 활성을 활성화시켜, 베타 사슬의 Tyr 1234 및 Tyr 1235를 인산화시키고 이어서 하류 신호 전달 경로를 활성화시킨다.

[0007] MET 유전자 증폭을 갖는 종양 세포주는 성장 및 생존에 대해 MET에 높이 의존한다. 다양한 암의 치료를 위해 다양한 1가 MET 차단 항체가 임상 개발 중이다(미국 특허 제5,686,292호; 제5,646,036호; 제6,099,841호; 제7,476,724호; 제9,260,531호; 및 제9,328,173호; 및 미국 특허 출원 공개 제2014/0349310호 및 제2005/0233960호 참조). 이들 항체는 오나투주맙(MetMab) 및 에미베투주맙을 포함한다(2016년 10월 10일에 출간된 Xiang 등의 문헌[Clin. Cancer Res. 19(18): 5068-78, 2013], 및 Rosen 등의 문헌[Clin. Cancer Res.], 및 doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1418). 이들 항체 중 일부는 리간드 의존적 MET 신호 전달을 차단하지만, 리간드 독

립적 MET 활성화를 차단하는 것만큼 효과적이지는 않다.

[0008] 포도막 흑색종 종양은 G-단백질에서의 돌연변이(*GNAQ* 및 *GNA11*) 및 c-Met의 높은 발현을 특징으로 한다. 포도막 흑색종에서 c-Met를 표적화하면 세포 침윤 및 전이를 억제하지만, 종양 성장을 억제하지는 않는다. 국소 종양 조절 및 안구 구제 비율은 시간이 지남에 따라 개선되어 왔지만, 생존율은 상대적으로 변하지 않았다. 항체-약물 접합체(ADC)는 지난 몇 년 동안 진전되었고, 그 중 몇 가지는 FDA에 의해 사용 승인을 받았지만 지금까지 포도막 흑색종용으로 개발된 것은 없다. 포도막 흑색종을 포함하는 안암을 치료하는 데 사용하기 위한 개선된 항암제로서 리간드 의존적 및 리간드 독립적 MET 신호 전달 모두를 강력하게 차단하는 개선된 항암제에 대한 충족되지 않은 상당한 의학적 요구가 남아 있다.

발명의 내용

[0009] 포도막 흑색종 안와 림프종, 망막아종, 및 속질상피종과 같은 안구암을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 상기 방법은 인간 c-Met 수용체 단백질(MET x MET)에 결합하는 항체, 항체의 항원 결합 단편, 2가 단일특이적 항체의 조합, 또는 이중특이적 항체로 치료하는 단계를 포함한다. 항-MET 항체 및 이의 항원 결합 부분은 변형되지 않은 형태로 단독으로 사용될 수 있거나, 항체-약물 접합체(ADC) 또는 이중특이적 항체의 일부로서 포함될 수 있다. 항체 및 ADC는 MET를 발현하는 종양 세포를 표적화하는 데 특히 유용하며, 따라서 본원에 개시된 바와 같은 안구암을 치료하는 방법에 유용하다.

[0010] 다른 실시예는 다음의 상세한 설명을 검토함으로써 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0011] **도 1**은 본원에 개시된 272개의 예시적인 MET x MET 이중특이적 항체의 성분을 도시하는 매트릭스이다. 번호가 매겨진 매트릭스의 각 셀은 "D1" 항원 결합 도메인 및 "D2" 항원 결합 도메인을 포함하는 고유한 이중특이적 항체를 식별하며, 여기서 D1 항원 결합 도메인은 Y-축을 따라 열거된 상응하는 항-MET 항체 유래의 면역글로불린 가변 도메인(HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍) 또는 CDR을 포함하고, D2 항원 결합 도메인은 X-축을 따라 열거된 상응하는 항-MET 항체 유래의 면역글로불린 가변 도메인(HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍) 또는 CDR을 포함한다.

도 2는 SRE-루시페라아제 리포터 유전자 작제물을 함유하는 HEK293T 세포에서 항체-유도 MET 경로 활성화를 평가하거나 HGF-유도 경로 활성화의 항체 차단을 평가하는 데 사용된 루시페라아제-기반 리포터 검정의 개략도이다.

도 3은 SRE-루시페라아제 발현을 항체 농도(리터당 로그 몰 단위)의 함수로서 나타내는 상대 발광 단위(RLU)를 도시하는 선 그래프이다. 채워진 사각형(■)은 부모 2가 단일특이적 항체 H4H13306P2를 나타내고, 채워진 삼각형(▲은 부모 2가 단일특이적 항체 H4H13312P2를 나타내고, 채워진 원(●)은 1가 항체를 나타내고, 채워진 마름모(◆)는 이소형 대조군을 나타내고, 채워진 역삼각형(▲)은 리간드가 없음을 나타낸다. **도 3a**는 HGF 리간드가 없는 항체만을 도시한다. **도 3b**는 항체 + HGF 리간드를 도시한다.

도 4는 SRE-루시페라아제 발현을 항체 농도(리터당 로그 몰 단위)의 함수로서 나타내는 상대 발광 단위(RLU)를 도시하는 선 그래프이다. 채워진 사각형(■)은 항-MET 1가 항체를 나타내고, 채워진 원(●)은 MET x MET 이중특이적 항체를 나타내고, 채워진 마름모(◆)는 부모 항체 H4H13312P2를 나타낸다. **도 4a**는 HGF 리간드가 없는 항체만을 도시한다. **도 4b**는 항체 + HGF 리간드를 도시한다.

도 5는 MET-증폭 위암 SNU5 세포의 상대적인 세포 성장을 인간 2가 단일특이적 항-MET 항체 1~18, 대조군 항체, 및 항-MET 1가 항체를 이용한 치료의 함수로서 도시하는 막대 차트이다. 비교를 위해, 항체 8(가로 좌표)은 부모 항체 H4H13306P2이고, 항체 11(가로 좌표)은 부모 항체 H4H13312P2이다.

도 6은 MET-증폭 세포의 상대적인 세포 성장을 MET x MET 이중특이적 항체, 대조군 항체, 및 항-MET 1가 항체를 이용한 치료의 함수로서 도시하는 막대 차트들을 포함한다. **도 6a**는 SNU5 세포의 상대적인 성장을 대조군 항체, 0.1, 1, 및 10 μg/mL의 1가 항체, 및 0.1, 1, 및 10 μg/mL의 MET x MET 이중특이적 항체를 이용한 치료의 함수로서 도시한다. **도 6b**는 EBC-1 세포의 상대적인 성장을 대조군 항체, 및 0.1, 및 1 μg/mL의 MET x MET 이중특이적 항체를 이용한 치료의 함수로서 도시한다.

도 7은 대조군 항체 및 MET x MET 이중특이적 항체로 치료한 후 Hs746T 세포로부터 추출한 pMET(인산화 MET), MET, pErk(인산화 Erk), 및 (로딩 대조군으로서의) 튜불린의 면역블롯(**도 7a**); 및 MET x MET 이중특이적 항체로 0, 2, 및 6시간 동안 치료한 후 Hs746T 세포에서 MET (및 로딩 대조군으로서의 튜불린)의 발현에 대한 면역블롯

을 도시한다(**도 7b**).

도 8은 대조군 항체, MET x MET 이중특이적 항체, 항-MET 단일특이적 2가 부모 항체 1, 항-MET 단일특이적 2가 부모 항체 2, 및 부모 항체 1과 2의 조합으로 치료한 후 Hs746T 세포로부터 추출한 pMET, MET, pErk, 및 (로딩 대조군으로서의) 튜불린의 면역블롯을 도시한다.

도 9는 대조군 항체 및 MET x MET 이중특이적 항체로 2, 6, 및 18시간 동안 치료한 후 Hs746T 세포에서 MET(및 로딩 대조군으로서 튜불린)의 발현에 대한 면역블롯을 도시한다.

도 10은 대조군 항체 및 MET x MET 이중특이적 항체로 치료한 후 SNU5 세포로부터 추출한 pMET(인산화 MET), MET, pErk, 및 (로딩 대조군으로서의) 튜불린의 면역블롯(**도 10a**); 및 대조군 항체 및 항-MET 1가 항체로 치료한 후 SNU5 세포에서 MET (및 로딩 대조군으로서의 튜불린)의 발현에 대한 면역블롯을 도시한다(**도 10b**).

도 11은 대조군 항체 및 MET x MET 이중특이적 항체로 치료한 후 EBC-1 세포에서 추출한 pMET, MET, pErk, 및 (로딩 대조군으로서의) 튜불린의 면역블롯을 도시한다.

도 12는 EBC-1 세포를 이식한 동물을 대상으로 대조군 항체(채워진 사각형 ■), MET 1가 항체(채워진 원 ●), 또는 MET x MET 이중특이적 항체(채워진 마름모 ◆)로 치료한 후 EBC-1 종양 부피의 변화(mm^3 단위)를 이식 후 경과 시간(일 단위)의 함수로서 도시한 선 그래프이다.

도 13은 MET-증폭 세포의 상대적인 성장을 MET x MET 이중특이적 항체, 대조군 항체, 및 항-MET 1가 항체를 이용한 치료의 함수로서 도시하는 막대 차트들을 포함한다. **도 13a**는 Hs746T 세포의 상대적인 성장을 대조군 항체, MET x MET 이중특이적 항체, MET x MET 부모 단일특이적 항체 1, MET x MET 부모 단일특이적 항체 2, 및 부모 항체 1과 2의 조합을 이용한 치료의 함수로서 도시한다. **도 13b**는 Hs746T 세포의 상대적인 성장을 대조군 항체, 1, 10, 및 25 μg/mL의 1가 항체, 및 1, 10, 및 25 μg/mL의 MET x MET 이중특이적 항체를 이용한 치료의 함수로서 도시한다.

도 14는 NCI-H596 세포의 상대적인 성장을 대조군 항체(C), MET x MET 이중특이적 항체(MM), MET x MET 부모 단일특이적 항체 1(M1), MET x MET 부모 단일특이적 항체 2(M2), 부모 항체 1과 2의 조합(M1M2), 및 MET-작용제 간세포 성장 인자(HGF)를 이용한 치료의 함수로서 도시하는 막대 차트이다.

도 15는 Hs746T 세포를 이식한 동물을 대상으로 대조군 항체(채워진 사각형 ■), MET 1가 항체(채워진 원 ●), 또는 MET x MET 이중특이적 항체(채워진 마름모 ◆)로 치료한 후 Hs746T 종양 부피의 변화(mm^3 단위)를 이식 후 경과 시간(일 단위)의 함수로서 도시한 선 그래프이다.

도 16a는 SNU5 세포를 이식한 동물을 대상으로 대조군 항체(채워진 사각형 ■), 1 mg/mL의 MET 1가 항체(채워진 원 ●), 10 mg/mL의 MET 1가 항체(빈 원 ○), 1 mg/mL의 MET x MET 이중특이적 항체(채워진 마름모 ◆), 또는 10 mg/mL의 MET x MET 이중특이적 항체(빈 마름모 ◇)로 치료한 후 SNU5 종양 부피의 변화(mm^3 단위)를 이식 후 경과 시간(일 단위)의 함수로서 도시한 선 그래프이다.

도 16b는 대조군 항체, 10 mg/kg의 항-MET 1가 항체, 및 10 mg/kg의 MET x MET 이중특이적 항체로 치료한 후 마우스 이종이식 모델에서 제거한 SNU5 종양으로부터 추출한 pMET, MET, 및 튜불린(로딩 대조군)의 면역블롯이다.

도 17은 U87-MG 세포를 이식한 동물을 대상으로 대조군 항체(채워진 사각형 ■), MET 1가 항체(채워진 원 ●), 또는 MET x MET 이중특이적 항체(채워진 마름모 ◆)로 치료한 후 U87-MG 종양 부피의 변화(mm^3 단위)를 이식 후 경과 시간(일 단위)의 함수로서 도시한 선 그래프이다.

도 18은 U118-MG 세포를 이식한 동물을 대상으로 대조군 항체(채워진 사각형 ■), MET 1가 항체(채워진 원 ●), 또는 MET x MET 이중특이적 항체(빈 마름모 ◇)로 치료한 후 U118-MG 종양 부피의 변화(mm^3 단위)를 이식 후 경과 시간(일 단위)의 함수로서 도시한 선 그래프이다.

도 19는 메이탄시노이드 6의 합성을 도시하는 개략도이다.

도 20은 메이탄시노이드 중간체 1의 합성을 도시하는 개략도이다.

도 21a, 도 21b, 도 21c, 및 도 21d는 메이탄시노이드 B와 접합된 이소형 항체(채워진 삼각형 ▲) 및 메이탄시노이드 B에 접합된 2가지 상이한 농도의 이중특이적 c-Met 항체(채워진 원 ●)로 7일에 걸쳐 치료한 4개의 c-

Met 발현 포도막 흑색종 세포에서 세포 생존율의 변화를 비교하여 도시하는 선 그래프이다.

도 22a 및 도 22b는 메이탄시노이드 B에 접합된 이중특이적 c-Met 항체(0.3 내지 10 nM)(**X** 표시) 또는 메이탄시노이드 B와 접합된 이소형 항체(채워진 사각형 ■)으로 7일에 걸쳐 치료했을 때, c-Met 발현 OMM1.3 세포 및 c-Met 음성 OCM3 세포를 대상으로 한 세포 생존율을 대비하여 도시하는 선 그래프이다.

도 23 및 도 24는 메이탄시노이드 B에 접합된 상이한 두 가지 농도의 이중특이적 c-Met 항체(1.25 nM, 도 23; 2.5 nM, 도 24) 및 메이탄시노이드 B와 접합된 이소형 항체로 치료한 포도막 흑색종 세포의 치료로 인한 세포자멸사율(%)을 비교하여 도시한 막대 그래프이다.

도 25, 도 26, 및 도 27은 메이탄시노이드 B와 접합된 이중특이적 c-Met 항체 및 메이탄시노이드 B와 접합된 이소형 항체로 치료한 후 성장 단계 각각에서의 세포 분포를 나타내는 히스토그램이다(삽입된 것은 산포도임). 2개의 c-Met 양성 세포주인 OMM1.3(도 25) 및 Mel202(도 26)를 시험하였고, c-Met 음성 세포주인 OCM3(도 27)과 비교하였다.

도 28은 여러 가지 포도막 흑색종 세포주를 비롯하여 c-Met를 고도로 발현하는 것으로 알려진 양성 대조군 위암종 세포주인 SNU-5, 및 c-Met를 또한 발현하는 폐 암종 세포주인 A549의 c-Met 발현 수준을 보여주는 웨스턴 블롯의 이미지이다.

도 29는 메이탄시노이드 B에 접합된 이중특이적 c-Met 항체 및 메이탄시노이드 B와 접합된 이소형 항체로 24시간 동안 치료한 후 3개의 포도막 흑색종 세포주에서 PARP 절단 및 히스톤 H3 인산화를 비교해 보여주는 웨스턴 블롯의 이미지이다.

도 30은 메이탄시노이드 B에 접합된 이중특이적 c-Met 항체 및 메이탄시노이드 B와 접합된 이소형 항체로 치료한 후, c-Met 음성 세포주인 OCM3 대비 c-Met 양성 세포주인 OMM1.3에서 PARP 절단, c-Met 단백질 발현, 및 히스톤 H3 인산화의 시간 의존적 유도를 비교해 보여주는 웨스턴 블롯의 이미지이다.

도 31은 메이탄신-3-N-메틸-L-알라닌-프로판아미딜-3-티오-3-숙신이미딜-N-메틸시클로헥실-4-트랜스-카복시숙시네이트의 'H-NMR 스펙트럼을 도시한다. 스펙트럼은 혼합물에 기인하는 공명에 의해 복잡해지지 않으며, 적어도 95%의 부분 입체이성질체적 과량으로 존재하는 단일 부분 입체이성질체와 일치한다.

도 32는 50 ng/ml HGF를 화학유인제로 사용하면서, 대조군 항체, 대조군-ADC, MET x MET, 및 MET x MET-ADC의 투여량을 증가시키면서 치료한 OMM1.3 세포에서 세포 침윤의 억제를 입증하는 이미지를 제공한다. MET x MET 항체와 MET x MET-ADC는 세포 생존력에 영향을 미치지 않는 피코몰 투여량에서 세포 침윤을 강력하게 억제하였다.

도 33은 메이탄시노이드 B에 접합된 이중특이적 c-Met 항체 및 메이탄시노이드 B와 접합된 이소형 항체로 치료한 포도막 흑색종 세포의 투여량 의존적인 세포 생존율 감소를 비교해 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명을 기술하기 전에, 본 개시는 기술된 특정 방법 및 실험 조건에 한정되지 않는다는 것을 이해해야 하며, 이는 이러한 방법 및 조건이 다양할 수 있기 때문이다. 또한 본 개시의 범위는 첨부된 청구항에 의해서만 한정되므로 본원에서 사용된 용어는 단지 특정 구현예를 기술하기 위한 목적이며, 한정하는 것으로 의도되지 않음을 이해해야 한다.

[0013] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 기술이 속하는 당업계의 당업자에 의해 널리 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 설명에 사용된 용어 "약"은 인용된 특정 수치와 관련하여 사용될 때, 이러한 값이 인용된 값과 1% 이내에서 다를 수 있음을 의미한다. 예를 들어 본 설명에 사용된 바와 같이, 표현 "약 100"은 99와 101을 포함하고 그 사이의 모든 값(예를 들어, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4 등)을 포함한다.

[0014] 본 발명에 기재된 방법 및 재료와 유사 또는 동등한 어떠한 방법 및 재료도 본 발명의 실시 또는 검사에 사용될 수 있으나, 바람직한 방법 및 재료를 지금부터 설명한다. 본 명세서에 언급된 모든 특허, 출원 및 비 특허 공개 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0015] **MET 단백질**

[0016] 본원에서 사용된 것과 같은 "MET", "c-Met" 등의 표현은 (1) 가공되지 않은 프리프로단백질(preproprotein)의 이소형 "a"를 나타내는, 서열번호 145에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함하고/하거나 NCBI 수탁번호

NM_001127500.2에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 갖고/갖거나, (2) 가공되지 않은 프리프로단백질의 이소형 "b"를 나타내는, 서열번호 146에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함하고/하거나 NCBI 수탁번호 NM_000236.2에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 갖고/갖거나, (3) 가공되지 않은 프리프로단백질의 이소형 "c"를 나타내는, 서열번호 147에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함하고/하거나 NCBI 수탁번호 NM_001311330.1에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 갖고/갖거나, (3) 3개의 이소형 모두에 의해 공유되는 세포질 알파 서브유닛(서열번호 148) 및 막관통 베타 서브유닛(이소형 a, b, 및 c 각각의 서열번호 149, 150, 또는 151)을 포함하는 성숙한 단백질을 포함하는, 인간 세포막에 존재하는 수용체 티로신 키나아제를 지칭한다. "MET"란 표현은 단량체 및 다량체 MET 분자 모두를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "단량체 인간 MET"란 표현은, 임의의 다량체화 도메인을 함유하거나 갖지 않으며, 또 다른 MET 분자에 대한 직접적인 물리적 연결 없이 단일 MET 분자로서 정상적인 조건 하에 존재하는 MET 단백질 또는 이의 일부를 의미한다. 예시적인 단량체 MET 분자는 서열번호 152의 아미노산 서열을 포함하는 "hMET.mmh"로서 본원에서 지칭되는 분자이다(예를 들어, 본원의 실시예 3 참조). 본원에서 사용되는 바와 같이, "이량체 인간 MET"란 표현은 링커, 공유 결합, 비공유 결합을 통해 서로 연결되거나 항체 Fc 도메인과 같은 다량체화 도메인을 통해 서로 연결된 2개의 MET 분자를 포함하는 작제물을 의미한다. 예시적인 이량체 MET 분자는 서열번호 153의 아미노산 서열을 포함하는 "hMET.mFc"로서 본원에서 지칭되는 분자이다(예를 들어, 본원의 실시예 3 참조).

[0017] 본원의 단백질, 폴리펩티드 및 단백질 단편에 대한 모든 언급은, 비인간-종에서 유래된 것으로서 명시적으로 달리 명시되지 않는 한, 각각의 단백질, 폴리펩티드 또는 단백질 단편의 인간 버전을 지칭하도록 의도된다. 따라서, "MET"란 표현은 비인간 종에서 유래된 것, 예를 들어, "마우스 MET", "원숭이 MET" 등으로서 달리 명시되지 않는 한 인간 MET를 의미한다.

[0018] 본원에서 사용되는 바와 같이, "세포 표면-발현 MET"란 표현은, MET 단백질의 적어도 일부가 세포막의 세포 외측에 노출되고 항체의 항원 결합 부분에 접근할 수 있도록, 시험관 내 또는 생체 내에서 세포의 표면에서 발현되는 하나 이상의 MET 단백질(들) 또는 이의 세포외 도메인을 의미한다. "세포 표면-발현 MET"는 정상적으로 MET 단백질을 발현하는 세포의 표면에서 발현된 MET 단백질을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, "세포 표면-발현 MET"는, 정상적으로는 표면에서 인간 MET를 발현하지 않지만 표면에서 MET를 발현하도록 인공적으로 조작된 세포의 표면에서 발현된 GP130 단백질을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.

[0019] **안구암을 치료하는 치료적 방법**

[0020] 예를 들어, 포도막 흑색종, 안와 림프종, 망막아종, 및 속질상피종과 같은 안구암을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 양태에서, 상기 방법은 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자(예를 들어, 본원의 표 1에 제시된 것과 같은 HCVR/LCVR 또는 CDR 서열 중 어느 하나를 포함하는 항-MET, 또는 본원의 표 5에 제시된 것과 같은 D1 및 D2 성분 중 어느 하나를 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자, 또는 오나투주맙, 에미베투주맙, 텔리소투주맙, SAIT301, ARGX-111, Sym015, HuMax-cMet, 및 CE-355621로 이루어진 군으로부터 선택된 항-MET 항체)를 포함하는 치료 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자는 아래에 상세히 기술된 것과 같이, 메이탄시노이드와 같은 세포독성 화합물에 접합된다. 치료 조성물은, 세포독성제에 접합된 항-MET ADC 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자를 포함하여, 본원에 개시된 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자 중 어느 하나, 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함할 수 있다.

[0021] 포도막 흑색종은 성인에서 가장 흔한 원발성 안구내 악성 종양이다. 이러한 종양은 맥락막, 홍채, 및 섬모체에서 발생할 수 있으며, 때로는 홍채 흑색종 또는 섬모체 흑색종으로 불린다. 포도막 흑색종은 전이성이 높다. 다른 안구암은 안와 림프종, 망막아종, 및 속질상피종을 포함하며, 이 중 후자는 섬모체와 포도막에서 발생할 수 있다. 본원에 개시된 방법은 안와 림프종, 망막아종, 및 속질상피종과 같은 안구암을 치료하는 데 유용한 것으로 고려된다. 일부 양태에서, 치료는 원발성 종양으로부터의 침윤 및/또는 전이를 억제하거나 완화하는 것을 포함한다.

[0022] 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자, 및 이들의 약물 접합체는, 특히: MET 발현, 신호 전달 또는 활성과 연관되거나 이에 의해 매개되는 임의의 질환 또는 장애를 치료, 예방 및/또는 완화시키는 데 유용하거나; MET와 HGF 간의 상호작용을 차단하거나 달리 MET 활성 및/또는 신호 전달을 억제하고/하거나 수용체 내재화를 촉진하고/하거나 세포 표면 수용체 수를 감소시킴으로써 치료할 수 있는 임의의 질환 또는 장애를 치료, 예방 및/또는 완화시키는 데 유용하다. 특히, 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자, 및 이들의 약물 접합체는 포도막 흑색종을 치료하는 데 유용하다. 치료는 대상체에서 포도막 흑색종 종양 성장을 감소시키

고/감소시키거나 포도막 흑색종의 퇴행을 유발하는 것을 포함한다. 치료는 포도막 흑색종 세포의 침윤을 억제 또는 완화시키는 것, 또는 원발성 종양으로부터 포도막 흑색종의 전이를 억제 또는 완화시키는 것을 또한 포함한다.

[0023] 예를 들어, 본 개시의 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자는 MET를 발현(또는 과발현)하는 포도막 흑색종 종양의 치료에 유용하다. 예를 들어, 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자는 눈에서 발생하는 원발성 및/또는 전이성 종양을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0024] 이와 같이, 대상체에서 안암을 치료하고, 안암의 성장을 감소시키고, 침윤 및/또는 전이를 억제 또는 완화하고/하거나, 안암의 퇴행을 유발하는 방법이 본원에 제공된다. 예를 들어, 대상체에서 포도막 흑색종을 치료하고, 포도막 흑색종 종양 성장을 감소시키고, 침윤 및/또는 전이를 억제하거나 완화하고/하거나, 포도막 흑색종의 퇴행을 유발하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 양태에서, 안암, 예를 들어, 포도막 흑색종은 MET를 발현한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 이중특이적 항원 결합 분자 및 세포독소를 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 이중특이적 항원 결합 분자는 제1 항원 결합 도메인(D1) 및 제2 항원 결합 도메인(D2)을 포함하며, D1은 인간 MET의 제1 에피토프에 특이적으로 결합하고, D2는 인간 MET의 제2 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0025] 추가로, 포도막 흑색종 세포의 증식을 억제하고, 침윤을 억제하고, 세포자멸사를 유발하고/하거나, 생존력을 감소시키는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 이중특이적 항원 결합 분자 및 세포독소를 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)와 세포를 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항원 결합 분자는: 제1 항원 결합 도메인(D1); 및 제2 항원 결합 도메인(D2)을 포함하고; 여기서 D1은 인간 MET의 제1 에피토프에 특이적으로 결합하고; D2는 인간 MET의 제2 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0026] 또한, 포도막 흑색종 세포의 유사분열 정지를 유도하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 이중특이적 항원 결합 분자 및 세포독소를 포함하는 항체-약물 접합체(ADC)를 세포와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 이중특이적 항원 결합 분자는 제1 항원 결합 도메인(D1) 및 제2 항원 결합 도메인(D2)을 포함하며, D1은 인간 MET의 제1 에피토프에 특이적으로 결합하고, D2는 인간 MET의 제2 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0027] 또한, c-Met 발현 종양을 앓고 있는 대상체에서 안암을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 제1 항원 결합 도메인(D1) 및 제2 항원 결합 도메인(D2)을 포함하는 이중특이적 항원 결합 분자를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 D1은 인간 MET의 제1 에피토프에 특이적으로 결합하고, D2는 인간 MET의 제2 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 양태에서, 이중특이적 항원 결합 분자는 세포독소에 접합되어 항체-약물 접합체(ADC)를 형성한다. 일부 양태에서, 세포독소는 메이탄시노이드이다.

[0028] 이중특이적 항원 결합 분자의 다양한 양태 및 세포독소의 다양한 양태는 다음의 단락에서 제공되지만, 본원의 다른 곳에서 더 상세히 기술된다.

[0029] 일부 양태에서, D1 및 D2는 인간 MET에 결합하기 위해 서로 경쟁하지 않는다. 일부 양태에서, 인간 MET의 제1 에피토프는 서열번호 155의 아미노산 192~204를 포함한다. 일부 양태에서, 인간 MET의 제2 에피토프는 서열번호 155의 아미노산 305~315 및 421~455를 포함한다. 일부 양태에서, 인간 MET의 제1 에피토프는 서열번호 155의 아미노산 192~204를 포함하고; 인간 MET의 제2 에피토프는 서열번호 155의 아미노산 305~315 및 421~455를 포함한다.

[0030] 일부 구현예에서, D1은 서열번호 58 또는 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR) 내의 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 내의 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)을 포함한다. 일부 구현예에서, D2는 서열번호 82의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR) 내의 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 내의 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)을 포함한다.

[0031] 일부 구현예에서, 이중특이적 항원 결합 분자는 서열번호 58의 D1-HCVR 아미노산 서열 내의 CDR 및 서열번호 82의 D2-HCVR 아미노산 서열 내의 CDR을 포함한다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항원 결합 분자는 서열번호 18의 D1-HCVR 아미노산 서열 내의 CDR 및 서열번호 82의 D2-HCVR 아미노산 서열 내의 CDR을 포함한다.

[0032] 일부 양태에서, 이중특이적 항원 결합 분자 D1은 서열번호 58의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR) 내의 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및

서열번호 138의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 내의 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)을 포함한다.

[0033] 일부 양태에서, D1의 HCDR1은 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하고; HCDR2는 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하고; HCDR3은 서열번호 64의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR1은 서열번호 140의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR2는 서열번호 142의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR3은 서열번호 144의 아미노산 서열을 포함한다.

[0034] 일부 양태에서, 이중특이적 항원 결합 분자 D1은 서열번호 58의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 138의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 LCVR을 포함한다.

[0035] 일부 양태에서, 이중특이적 항원 결합 분자 D1은 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하는 LCVR을 포함한다.

[0036] 일부 양태에서, 이중특이적 항원 결합 분자 D2는 서열번호 82의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR) 내의 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 서열번호 138의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 내의 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)을 포함한다.

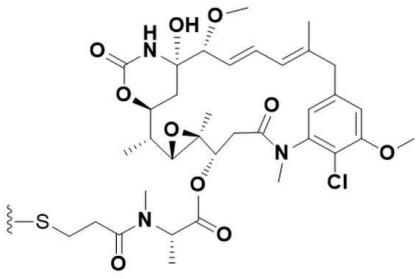
[0037] 일부 양태에서, 이중특이적 항원 결합 분자 D2의 HCDR1은 서열번호 84의 아미노산 서열을 포함하고; HCDR2는 서열번호 86의 아미노산 서열을 포함하고; HCDR3은 서열번호 88의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR1은 서열번호 140의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR2는 서열번호 142의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR3은 서열번호 144의 아미노산 서열을 포함한다.

[0038] 일부 양태에서, 이중특이적 항원 결합 분자 D2는 서열번호 82의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 138의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 LCVR을 포함한다.

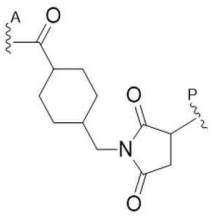
[0039] 일부 양태에서, 이중특이적 항원 결합 분자 D2는 서열번호 82의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함하는 LCVR을 포함한다.

[0040] 본원에 제공된 방법의 일부 구현예에서, 세포독소는 바이오독소(biotoxin), 화학요법제(chemotherapeutic agent), 및 방사성 동위원소(radioisotope)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예를 들어, 세포독소는 메이탄시노이드, 아우리스타틴, 토메이마이신, 듀오카마이신, ^{225}Ac, ^{227}Th, 및 이들의 임의의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 양태에서, 세포독소는 링커를 통해 이중특이적 항원 결합 분자에 접합된다.

[0041] 예시적인 세포독소는 다음과 같으며:

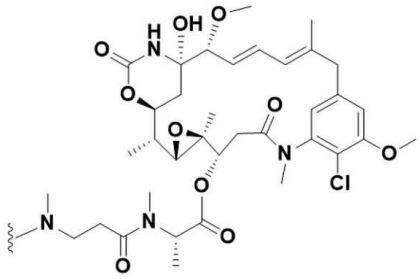
[0042] 

[0043] 식 중,  는 링커에 대한 결합이다. 일부 양태에서, 링커는 다음과 같으며:

[0044] 

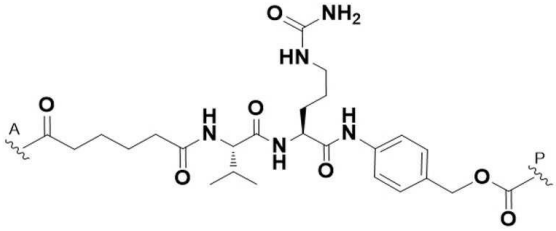
[0045] 식 중 A 로 표시된 결합은 이중특이적 항원 결합 분자에 대한 결합을 나타내고, P 로 표시된 결합은 세포독소에 대한 결합을 나타낸다.

[0046] 추가의 예시적인 세포독소는 다음과 같으며:



[0047]

[0048] 식 중, — 는 링커에 대한 결합이다. 일부 양태에서, 링커는 다음과 같으며:



[0049]

[0050] 식 중 A 로 표시된 결합은 이중특이적 항원 결합 분자에 대한 결합을 나타내고, P 로 표시된 결합은 세포독소에 대한 결합을 나타낸다.

[0051] 본원에 제공된 방법은 안구암(ocular cancer) 또는 안암(eye cancer)을 치료하는 데 유용하다. 일부 구현예에서, 안암은 포도막 흑색종, 안와 림프종, 망막아종, 및 수질상피종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0052] 본원에 기술된 치료 방법의 맥락에서, 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자, 및 이들의 약물 접합체는 단일 요법(즉, 유일한 치료제)으로서 투여되거나 하나 이상의 추가적인 치료제(이의 예는 본원의 다른 곳에서 기술됨)와 병용으로 투여될 수 있다.

[0053] **항-MET 항체 및 이의 항원 결합 단편**

[0054] 보다 상세하게, 그리고 일 양태에 따르면, 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 항-MET 항체는 본원의 표 1 및 표 2에 열거되어 있다. 표 1은 본원에 개시된 이중특이적 항원 결합 분자(이중특이적 항원 결합 단백질과 상호 교환적으로 본원에서 사용됨)가 유래될 수 있는 예시적인 항-MET 항체의 중쇄 가변 영역(HCVR), 경쇄 가변 영역(LCVR), 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3), 및 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)의 아미노산 서열 식별자를 제시한다. 표 2는 예시적인 항-MET 항체의 HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3의 핵산 서열 식별자를 제시한다.

[0055] 또한 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 오나투주맙, 에미베투주맙, 텔리소투주맙, SAIT301, ARGX-111, Sym015, HuMax-cMet, 및 CE-355621로 이루어진 군으로부터 선택된 항-MET 항체이다.

[0056] 또한 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 세포에서 MET에 특이적으로 결합하여 MET 신호 전달 경로를 작동시키는 (예를 들어, 활성화시키는) 항체 또는 이의 항원 결합 단편뿐만 아니라, MET 신호 전달의 활성화가 유익하거나 치료적으로 유용한 치료 환경에서 이러한 항체의 용도이다. 이러한 작용제 항-MET 항체의 비제한적인 예는 본원에서 "H4H14636D"로서 지칭되는 항체뿐만 아니라 중쇄 및 경쇄 CDR(서열번호 28, 30, 32, 140, 142, 144) 및/또는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인(서열번호 26/138)을 포함하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0057] 본원에서 유용한 것은, MET에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 표 1에 열거된 HCVR 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적

어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 HCVR을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0058] 본원에서 유용한 것은, MET에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 표 1에 열거된 LCVR 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 LCVR을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0059] 본원에서 유용한 것은, MET에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 표 1에 열거된 LCVR 아미노산 서열 중 어느 하나 및 이와 쌍을 이룬 표 1에 열거된 HCVR 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 HCVR과 LCVR 아미노산 서열 쌍(HCVR/LCVR)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 특정 구현예에 따르면, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표 1에 열거된 예시적인 항-MET 항체 중 어느 하나에 함유된 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍을 포함한다. 특정 구현예에서, HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍은 서열번호 2/138, 10/138, 18/138, 26/138, 34/138, 42/138, 50/138, 58/138, 66/138, 74/138, 82/138, 90/138, 98/138, 106/138, 114/138, 122/138, 및 130/138으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0060] 또한 유용한 것은, MET에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 표 1에 열거된 HCDR1 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이와 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 중쇄 CDR1(HCDR1)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0061] 또한 유용한 것은, MET에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 표 1에 열거된 HCDR2 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이와 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 중쇄 CDR2(HCDR2)를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0062] 또한 유용한 것은, MET에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 표 1에 열거된 HCDR3 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이와 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 중쇄 CDR3(HCDR3)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0063] 또한 유용한 것은, MET에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 표 1에 열거된 LCDR1 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이와 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 경쇄 CDR1(LCDR1)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0064] 또한 유용한 것은, MET에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 표 1에 열거된 LCDR1 아미노산 서열 중 어느 하나 및 이와 쌍을 이룬 표 1에 열거된 HCDR1 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 HCDR1 및 LCDR1 아미노산 서열 쌍(HCDR1/LCDR1)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 특정 구현예에 따르면, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표 1에 열거된 예시적인 항-MET 항체 중 어느 하나에 함유된 HCDR3/LCDR3 아미노산 서열 쌍을 포함한다. 특정 구현예에서, HCDR1/LCDR1 아미노산 서열 쌍은 서열번호 4/140, 12/140, 20/140, 28/140, 36/140, 44/140, 52/140, 60/140, 68/140, 76/140, 84/140, 92/140, 100/140, 108/140, 116/140, 124/140, 및 132/140으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0065] 또한 유용한 것은, MET에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 표 1에 열거된 LCDR2 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이와 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 경쇄 CDR2(LCDR2)를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0066] 또한 유용한 것은, MET에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 표 1에 열거된 LCDR2 아미노산 서열 중 어느 하나 및 이와 쌍을 이룬 표 1에 열거된 HCDR2 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 HCDR2 및 LCDR2 아미노산 서열 쌍(HCDR2/LCDR2)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 특정 구현예에 따르면, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표 1에 열거된 예시적인 항-MET 항체 중 어느 하나에 함유된 HCDR2/LCDR2 아미노산 서열 쌍을 포함한다. 특정 구현예에서, HCDR2/LCDR2 아미노산 서열 쌍은 서열번호 6/142, 14/142, 22/142, 30/142, 38/142, 46/142, 54/142, 62/142, 70/142, 78/142, 86/142, 94/142, 102/142, 110/142, 118/142, 126/142, 및 134/142로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0067] 또한 유용한 것은, MET에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 표 1에 열거된 LCDR3 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이와 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 경쇄 CDR3(LCDR3)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0068] 또한 유용한 것은, MET에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 표 1에 열거된 LCDR3 아미노산 서열 중 어느 하나 및 이와 쌍을 이룬 표 1에 열거된 HCDR3 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 HCDR3 및 LCDR3 아미노산 서열 쌍(HCDR3/LCDR3)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 특정 구현예에 따르면, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표 1에 열거된 예시적인 항-MET 항체 중 어느 하나에 함유된 HCDR3/LCDR3 아미노산 서열 쌍을 포함한다. 특정 구현예에서, HCDR3/LCDR3 아미노산 서열 쌍은 서열번호 8/144, 16/144, 24/144, 32/144, 40/144, 48/144, 56/144, 64/144, 72/144, 80/144, 88/144, 96/144, 104/144, 112/144, 120/144, 128/144, 및 136/144로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0069] 또한 유용한 것은, MET에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 표 1에 열거된 예시적인 항-MET 항체 중 어느 하나에 함유된 6개의 CDR 세트(즉, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 특정 구현예에서, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 아미노산 서열 세트는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: 서열번호 4-6-8-140-142-144, 12-14-16-140-142-144, 20-22-24-140-142-144, 28-30-32-140-142-144, 36-38-40-140-142-144, 44-44-48-140-142-144, 52-54-56-140-142-144, 60-62-64-140-142-144, 68-70-72-140-142-144, 76-78-80-140-142-144, 84-86-88-140-142-144, 92-94-96-140-142-144, 100-102-104-140-142-144, 108-110-112-140-142-144, 116-118-120-140-142-144, 124-126-128-140-142-144, 및 132-134-136-140-142-144.

[0070] 관련 구현예에서, MET에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편으로서, 표 1에 열거된 예시적인 항-MET 항체 중 어느 하나에 의해 정의된 것과 같은 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍에 함유된 6개의 CDR 세트(즉, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 본원에 개시된 방법에 유용하다. 예를 들어, MET에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍에 함유된 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 아미노산 서열 세트를 포함한다: 서열번호 4-6-8-140-142-144, 12-14-16-140-142-144, 20-22-24-140-142-144, 28-30-32-140-142-144, 36-38-40-140-142-144, 44-44-48-140-142-144, 52-54-56-140-142-144, 60-62-64-140-142-144, 68-70-72-140-142-144, 76-78-80-140-142-144, 84-86-88-140-142-144, 92-94-96-140-142-144, 100-102-104-140-142-144, 108-110-112-140-142-144, 116-118-120-140-142-144, 124-126-128-140-142-144, 및 132-134-136-140-142-144.

[0071] HCVR 및 LCVR 아미노산 서열 내의 CDR을 확인하기 위한 방법 및 기술은 당업계에 잘 알려져 있고, 본원에 개시된 특정 HCVR 및/또는 LCVR 아미노산 서열 내의 CDR을 확인하는 데 사용될 수 있다. CDR의 경계를 식별하는 데 사용될 수 있는 예시적인 규정은, 예를 들어, Kabat 정의, Chothia 정의, 및 AbM 정의를 포함한다. 일반적인 조건에서, Kabat 정의는 서열 변동성에 기초하고, Chothia 정의는 구조적 루프 영역의 위치에 기초하며, AbM 정의는 Kabat 및 Chothia 접근법을 절충한 것이다. 예를 들어, Kabat의 문헌["Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]; Al-Lazikani 등의 문헌[*J. Mol. Biol. 273*:927-948 (1997)]; 및 Martin 등의 문헌[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86*:9268-9272 (1989)]을 참조한다. 공공 데이터베이스도 항체 내에서 CDR 서열을 확인하는 데 이용할 수 있다.

[0072] 본원에 제공된 방법에 따라 또한 유용한 것은, 변형된 글리코실화 패턴을 갖는 항-MET 항체이다. 일부 구현예에서, 예를 들어, 항체 의존적 세포 독성(ADCC) 기능을 증가시키기 위해 바람직하지 않은 글리코실화 부위를 제거하는 변형이 유용하거나, 올리고당 사슬에 존재하는 푸코오스 모이어티가 결여된 항체가 유용할 수 있다(Shield 외, JBC 277:26733(2002) 참조). 다른 응용예에서, 보체 의존적 세포독성(CDC)을 변형시키기 위해 갈락토실화 변형이 이루어질 수 있다.

[0073] **MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자**

[0074] 본 발명자들은 MET에 대한 HGF 결합을 차단하는 특정 단일특이적 항-MET 항원 결합 분자가 MET 신호 전달을 강력하게 활성화하는(치료 분자의 경우, 바람직하지 않은 결과임) 경향이 있음을 관찰하였다. 그러나, 본 발명자들은 놀랍게도, MET 단백질 세포외 도메인 상의 2개의 별개 에피토프에 동시에 결합하는 이중특이적 항원 결합 분자가 MET 신호 전달을 거의 활성화시키지 않으면서 MET에 대한 리간드 결합을 차단하는 데 효과적임을 발견하였다. 또한, 본 발명자들은 놀랍게도, 이중특이적 항원 결합 분자가 포도막 흑색종, 안와 림프종, 망막아종, 및

수질상피종과 같은 안구암을 치료하고/하거나 전이를 억제 또는 완화하는 데 매우 적합함을 발견하였다.

[0075] 따라서, 본원에 기술된 방법에 따라 유용한 것은, 제1 항원 결합 도메인(본원에서 "D1"로도 지칭됨) 및 제2 항원 결합 도메인(본원에서 "D2"로도 지칭됨)을 포함하는 이중특이적 항원 결합 분자이다. 이중특이적 항원 결합 분자가 2개의 별개 MET 에피토프에 동시 결합하면 MET 신호 전달을 최소한으로 활성화하면서 리간드가 효과적으로 차단된다.

[0076] 인간 MET의 제1 에피토프에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인(D1) 및 인간 MET의 제2 에피토프에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인(D2)을 포함하는 이중특이적 항원 결합 분자는 "MET x MET 이중특이적 항체", "MET x MET" 또는 다른 관련 용어로서 본원에서 지칭될 수 있다. 일부 구현예에서, 인간 MET의 제1 에피토프는 서열번호 155의 아미노산 192~204를 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 MET의 제2 에피토프는 서열번호 155의 아미노산 305~315 및 421~455를 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 MET의 제1 에피토프는 서열번호 155의 아미노산 192~204를 포함하고; 인간 MET의 제2 에피토프는 서열번호 155의 아미노산 305~315 및 421~455를 포함한다.

[0077] 특정 구현예에서, MET x MET 이중특이적 항체의 D1 및 D2 도메인은 서로 경쟁하지 않는다. MET에 결합하기 위해 D1과 D2 간의 경쟁이 없다는 것은, D1과 D2가 유래된 각각의 단일특이적 항원 결합 단백질이 인간 MET에 결합하기 위해 서로 경쟁하지 않는다는 것을 의미한다. 예시적인 항원 결합 단백질 경쟁 검정은 당업계에 공지되어 있으며, 이의 비제한적인 예는 본원의 다른 곳에서 기술된다.

[0078] 특정 구현예에서, D1 및 D2는 본원의 다른 곳에서 기술된 바와 같이, MET 상의 상이한 (예를 들어, 중첩되지 않거나 부분적으로 중첩되는) 에피토프에 결합한다.

[0079] MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자는 2개의 별개 단일특이적 항-MET 항체로 이루어진 항원 결합 도메인을 사용해 작제될 수 있다. 예를 들어, 단클론 단일특이적 항-MET 항체의 집합체는 당업계에 공지된 표준 방법을 사용하여 생산될 수 있다. 이렇게 생산된 개별 항체는 MET 단백질에 대한 교차 경쟁에 대해 서로에 대해 쌍으로 시험될 수 있다. 2개의 상이한 항-MET 항체가 동시에 MET에 결합할 수 있다면(즉, 서로 경쟁하지 않는다면), 제1 항-MET 항체로부터의 항원 결합 도메인 및 제2 비경쟁 항-MET 항체로부터의 항원 결합 도메인을 본 개시에 따라 단일 MET x MET 이중특이적 항체로 조작할 수 있다.

[0080] 본 개시에 따르면, 이중특이적 항원 결합 분자는 단일 다기능성 폴리펩티드일 수 있거나, 서로 공유 결합되거나 비공유 결합되는 2개 이상의 폴리펩티드로 이루어진 다량체 복합체일 수 있다. 본 개시에 의해 명백해지는 바와 같이, MET 분자의 동일하지 않은 2개의 별개 에피토프에 동시에 결합하는 능력을 갖는 임의의 항원 결합 작제물은 이중특이적 항원 결합 분자로서 간주된다. 본원에 기술된 이중특이적 항원 결합 분자 중 어느 하나 또는 이의 변이체는, 당업자가 알게되는 바와 같이, 표준 분자 생물학적 기술(예를 들어, 재조합 DNA 및 단백질 발현 기술)을 사용해 작제될 수 있다.

[0081] **항원 결합 도메인**

[0082] 본원에 개시된 방법에 유용한 이중특이적 항원 결합 분자는 2개의 별도 항원 결합 도메인(D1 및 D2)을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "항원 결합 도메인"이란 표현은 특정 관심 항원(예: 인간 MET)에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 펩티드, 폴리펩티드, 핵산 분자, 스캐폴드형 분자, 펩티드 디스플레이 분자, 또는 폴리펩티드를 함유하는 작제물을 의미한다. 본원에서 사용된 용어 "특이적으로 결합하는" 등은 이러한 항원 결합 도메인이 500 pM 이하의 해리 상수(K_D)를 특징으로 하는 특정 항원과 복합체를 형성하고, 통상적인 시험 조건 하에서 다른 무연 항원과는 결합하지 않음을 의미한다. "무연 항원(unrelated antigen)"은 서로에 대해 95% 미만의 아미노산 동일성을 갖는 단백질, 펩티드, 또는 폴리펩티드이다.

[0083] 본 개시의 맥락에 사용될 수 있는 항원 결합 도메인의 예시적인 범주는 항체, 항체의 항원 결합 부분, 특정 항원(예를 들어, 펩티바디)과 특이적으로 상호 작용하는 펩티드, 특정 항원과 특이적으로 상호 작용하는 수용체 분자, 특정 항원에 특이적으로 결합하는 수용체의 리간드 결합 부분을 포함하는 단백질, 항원 결합 스캐폴드(예를 들어, 설계된 안키린 반복 단백질(DARPin), HEAT 반복 단백질, ARM 반복 단백질, 테트라트라이코펩티드 반복 단백질 및 자연 발생적인 반복 단백질을 토대로 한 다른 스캐폴드 등[예를 들어, Boersma 및 Pluckthun의 2011 문헌 "*Curr. Opin. Biotechnol.* 22:849-857", 및 해당 문헌에 인용된 참고 문헌 참조]) 및 앱타머 또는 이의 부분들을 포함한다.

[0084] 두 개의 분자가 특이적으로 상호 간에 결합하는지를 결정하는 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있으며, 예를

들어, 평형 투석, 표면 플라스몬 공명 등을 포함한다. 예를 들어, 본 개시의 맥락에서 사용된 항원 결합 도메인은 특별한 항원(예컨대 표적 분자[T] 또는 내재화 이펙터 단백질[E]) 또는 그것의 부분에, 표면 플라스몬 공명 분석으로 결정되는 바, 약 500 pM 미만, 약 400 pM 미만, 약 300 pM 미만, 약 200 pM 미만, 약 100 pM 미만, 약 90 pM 미만, 약 80 pM 미만, 약 70 pM 미만, 약 60 pM 미만, 약 50 pM 미만, 약 40 pM 미만, 약 30 pM 미만, 약 20 pM 미만, 약 10 pM 미만, 약 5 pM 미만, 약 4 pM 미만, 약 2 pM 미만, 약 1 pM 미만, 약 0.5 pM 미만, 약 0.2 pM 미만, 약 0.1 pM 미만, 또는 약 0.05 pM 미만의 K_D로 결합하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0085] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "표면 플라스몬 공명"은 예컨대 BIAcore™ 시스템(Biacore Life Sciences division of GE Healthcare, Piscataway, NJ)을 사용하여 바이오센서 매트릭스 내의 단백질 농도 변경을 검출함으로써 실시간 상호 작용의 분석을 가능하게 하는 광학 현상을 지칭한다.

[0086] 본원에서 사용된 용어 "K_D"는 특별한 단백질-단백질 상호 작용(예를 들어, 항체-항원 상호 작용)의 평형 해리 상수를 의미한다. 달리 표시되지 않는 한, 본원에 개시된 K_D 값은 25℃에서 표면 플라스몬 공명 분석에 의해 결정된 K_D 값을 나타낸다.

[0087] 위에서 나타낸 바와 같이, "항원 결합 도메인"(D1 및/또는 D2)은 항체 또는 항체의 항원 결합 단편을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "항체"는 특정 항원(예: 인간 MET)과 특이적으로 결합하거나 상호 작용하는 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 임의의 항원 결합 분자 또는 분자 복합체를 의미한다. 용어 "항체"는 4개의 폴리펩티드 사슬, 즉 이황화 결합에 의해 상호 연결된 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함하는 면역글로불린 분자뿐만 아니라 이의 다량체(예를 들어, IgM)를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 HCVR 또는 V_H로 약칭됨)과 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인 C_H1, C_H2 및 C_H3을 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 LCVR 또는 V_L로 약칭됨)과 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인을 포함한다(C_L1). V_H와 V_L 영역은, 더 보존적인 영역(프레임워크 영역(FR)으로 지칭됨)이 중간에 끼어 있는 초가변 영역(상보성 결정 영역(CDR)으로 지칭됨)으로 추가로 세분화될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L은 아미노 말단에서 카르복시 말단의 방향으로 다음 순서로 배열된 3개의 CDR과 4개의 FR을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 다른 구현예에서, 본원에 제공된 항체의 FR(또는 항체의 항원 결합 부분)은 인간 생식선 서열과 동일하거나, 자연적으로 또는 인공적으로 변형될 수 있다. 아미노산 공통 서열은 둘 이상의 CDR의 병렬 분석에 기초하여 정의될 수 있다.

[0088] 본원에 제공된 이중특이적 항원 결합 분자의 D1 및/또는 D2 성분은 전체 항체 분자의 항원 결합 단편을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 항체의 "항원 결합 부분", 항체의 "항원 결합 단편" 등의 용어는 항원에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 임의의 자연 발생적인, 또는 효소에 의해 수득할 수 있는, 또는 합성, 또는 유전자 조작된 폴리펩티드 또는 당단백질을 포함한다. 항체의 항원 결합 단편은 임의의 적합한 표준 기법, 예를 들어, 단백질 가수분해성 소화 또는 항체 가변 도메인 및 임의로 불변 도메인을 암호화하는 DNA의 조작 및 발현을 포함하는 재조합 유전자 조작 기법을 사용하여 전체 항체 분자로부터 유도될 수 있다. 이러한 DNA는 공지되어 있고/있거나, 예를 들어 상업적인 공급원, (예를 들어, 파지-항체 라이브러리 포함하는) DNA 라이브러리로부터 쉽게 이용할 수 있거나, 합성될 수 있다. 이러한 DNA는 서열화될 수 있고, 예를 들면 하나 또는 이상의 가변 및/또는 불변 도메인을 적당한 구성으로 배열하기 위해, 또는 코돈을 도입하고, 시스테인 잔기를 생성하며, 아미노산을 변형, 첨가 또는 결실시키기 위해서 등, 화학적으로 또는 분자 생물학 기법을 사용하여 조작될 수 있다.

[0089] 항원 결합 단편의 비제한적 실시예는: (i) Fab 단편; (ii) F(ab')2 단편; (iii) Fd 단편; (iv) Fv 단편; (v) 단쇄 Fv(scFv) 분자; (vi) dAb 단편; 및 (vii) 항체의 초가변 영역(예를 들어, CDR3 펩티드와 같은 단리된 상보성 결정 영역(CDR))을 모방하는 아미노산 잔기, 또는 제한된 FR3-CDR3-FR4 펩티드로 이루어진 최소 인지 단위를 포함한다. 다른 조작된 분자, 예를 들어, 도메인 특이적 항체, 단일 도메인 항체, 도메인-결실 항체, 키메라 항체, CDR-이식 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, 나노바디(예를 들어, 1가 나노바디, 2가 나노바디 등), 작은 모듈형 면역치료제(SMIP), 및 상어 가변 IgNAR 도메인 등 또한 본원에서 사용되는 "항원 결합 단편"이란 표현에 포함된다.

[0090] 항체의 항원 결합 단편은 일반적으로 적어도 하나의 가변 도메인을 포함하게 된다. 이러한 가변 도메인은 임의의 크기 또는 아미노산 조성일 수 있고, 일반적으로 하나 이상의 프레임워크 서열에 인접하거나 그것과 한 프레임에 있는 적어도 하나의 CDR을 포함할 것이다. V_L 도메인과 결합된 V_H 도메인을 갖는 항원 결합 단편에서, V_H

및 V_L 도메인은 임의의 적절한 배열로 서로에 대해 위치할 수 있다. 예를 들어, 가변 영역은 이량체로서, V_H-V_H, V_H V_L 또는 V_L-V_L 이량체를 포함할 수 있다. 대안적으로, 항체의 항원 결합 단편은 단량체 V_H 또는 V_L 도메인을 포함할 수 있다.

[0091] 특정 구현예에서, 항체의 항원 결합 단편은 적어도 하나의 불변 도메인에 공유 결합된 적어도 하나의 가변 도메인을 포함할 수 있다. 본 개시의 항체의 항원 결합 단편 내에서 발견될 수 있는 가변 및 불변 도메인의 비제한적인 예시적 구성은 다음을 포함한다: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; 및 (xiv) V_L-C_L. 위에서 열거된 임의의 예시적인 구성을 포함하는 가변 및 불변 도메인의 임의의 구성에서, 이러한 가변 및 불변 도메인은 직접적으로 상호간에 연결되거나 또는 전체 또는 부분적인 힌지 또는 링커 영역에 의해 연결될 수 있다. 힌지 영역은 단일 폴리펩티드 분자의 인접한 가변 및/또는 불변 도메인 사이에 가요성 또는 반 가요성 연결을 초래하는 적어도 2개(예를 들어, 5, 10, 15, 20, 40, 60개 또는 그 이상)의 아미노산으로 구성될 수 있다. 또한, 항원 결합 단편은 위에서 열거된 임의의 가변 및 불변 도메인 구성의 동종-이량체 또는 이종-이량체 (또는 다른 다량체)를 상호 간에 및/또는 하나 이상의 단량체 V_H 또는 V_L 도메인과의 (예를 들어, 이황화 결합(들)에 의한) 비공유 결합으로 포함할 수 있다.

[0092] 본원에 제공된 방법에 유용한 이중특이적 항원 결합 분자는 인간 항체 및/또는 재조합 인간 항체 또는 이들의 단편을 포함하거나 이들로 이루어질 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함한다. 그렇지만, 인간 항체는 인간 생식선 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기(예컨대, 시험관 내 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체 내 체세포성 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 예를 들어 CDR에 포함할 수 있고, 특히 CDR3에 포함할 수 있다. 그러나 본원에서 사용되는 용어 "인간 항체"는 또 다른 포유류 종, 예를 들면 마우스의 생식선으로부터 유도된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 위로 그래프트되어 있는 항체를 포함하도록 의도되지는 않는다.

[0093] 본원에 제공된 방법에 유용한 이중특이적 항원 결합 분자는 재조합 인간 항체 또는 이의 단편을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 또는 분리된 모든 인간 항체, 예를 들어 숙주 세포 안에 형질전환된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체(아래에서 상세하게 설명됨), 재조합된 조합 인간 항체 라이브러리로부터 분리된 항체(아래에서 상세하게 설명됨), 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자가 도입된 동물(예를 들어, 마우스)로부터 분리된 항체(예를 들어, Taylor 등의 (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295 참조) 또는 다른 DNA 서열에 대해 인간 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 또는 분리된 항체를 포함하도록 의도된다. 이러한 재조합 인간 항체는 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나 일부 구현예에서, 이러한 재조합 인간 항체는 시험관 내 돌연변이 유발(또는 인간 Ig 서열에 대해 유전자 도입된 동물이 사용되는 경우에서의, 생체 내 체세포성 돌연변이 유발)을 거치므로, 재조합 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열은 인간 생식선 V_H 및 V_L 서열로부터 유래되고 이들과 관련되지만, 생체 내에서 인간 항체 생식선 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있다.

[0094] 이중특이적 항체를 제조하는 방법은 당업계에 알려져 있으며, 본원에 개시된 이중특이적 항원 결합 분자를 작제하는 데 사용될 수 있다. 본 개시의 맥락에서 사용될 수 있는 예시적인 이중특이적 포맷으로는, 예를 들어, scFv-계열 또는 디아바디 이중특이적 포맷, IgG-scFv 융합, 이중 가변 도메인(DVD)-Ig, 콰드로마, 놉-인투-홀(knobs-into-holes), 공통 경쇄(예컨대 놉-인투-홀을 가지는 공통 경쇄 등), CrossMab, CrossFab, (SEED)바디, 류신 지퍼, 듀오바디, IgG1/IgG2, 이중으로 작용하는 Fab (DAF)-IgG, 및 Mab^2 이중특이적 포맷을 포함하되 이들로 한정되지는 않는다(전술한 포맷을 검토하려면, 예를 들어 Klein 등의 문헌[2012, mAbs 4:6, 1-11] 및 동 문헌에 인용된 참고문헌을 참조한다).

[0095] 본원에 제공된 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자에 포함될 수 있는 예시적인 항원 결합 도메인(D1 및 D2)은 본원에 개시된 항-MET 항체 중 어느 하나로부터 유래된 항원 결합 도메인을 포함한다. 예를 들어, 표 1에 열거된 HCVR 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이와 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 HCVR을 포함하는 D1 또는 D2 항원 결합 도메인을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자는 본원에 기술된 것과 같은 포도막 흑색종

을 치료하는 방법에 유용하다.

[0096] 또한 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 표 1에 열거된 HCVR 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이와 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 LCVR을 포함하는 D1 또는 D2 항원 결합 도메인을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자이다.

[0097] 또한 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 표 1에 열거된 LCVR 아미노산 서열 중 어느 하나 및 이와 쌍을 이룬 표 1에 열거된 HCVR 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 HCVR 및 LCVR 아미노산 서열 쌍(HCVR/LCVR)을 포함하는 D1 또는 D2 항원 결합 도메인을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자이다. 특정 구현예에 따르면, 유용한 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자는 표 1에 열거된 예시적인 항-MET 항체 중 어느 하나에 함유된 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍을 포함하는 D1 또는 D2 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0098] 또한 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 표 1에 열거된 HCDR1 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이와 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 중쇄 CDR1(HCDR1)을 포함하는 D1 또는 D2 항원 결합 도메인을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자이다.

[0099] 또한 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 표 1에 열거된 HCDR2 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이와 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 중쇄 CDR2(HCDR2)을 포함하는 D1 또는 D2 항원 결합 도메인을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자이다.

[0100] 또한 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 표 1에 열거된 HCDR3 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이와 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 중쇄 CDR3(HCDR3)을 포함하는 D1 또는 D2 항원 결합 도메인을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자이다.

[0101] 또한 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 표 1에 열거된 LCDR1 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이와 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 경쇄 CDR1(LCDR1)을 포함하는 D1 또는 D2 항원 결합 도메인을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자이다.

[0102] 또한 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 표 1에 열거된 LCDR2 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이와 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 경쇄 CDR2(LCDR2)를 포함하는 D1 또는 D2 항원 결합 도메인을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자이다.

[0103] 또한 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 표 1에 열거된 LCDR3 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이와 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 경쇄 CDR3(LCDR3)을 포함하는 D1 또는 D2 항원 결합 도메인을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자이다.

[0104] 또한 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 표 1에 열거된 LCDR3 아미노산 서열 중 어느 하나 및 이와 쌍을 이룬 표 1에 열거된 HCDR3 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 HCDR3 및 LCDR3 아미노산 서열 쌍(HCDR3/LCDR3)을 포함하는 D1 또는 D2 항원 결합 도메인을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자이다. 특정 구현예에 따르면, 본 개시는 표 1에 열거된 예시적인 항-MET 항체 중 어느 하나에 함유된 HCDR3/LCDR3 아미노산 서열 쌍을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0105] 또한 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 표 1에 열거된 예시적인 항-MET 항체 중 어느 하나에 함유된 6개의 CDR 세트(즉, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)를 포함하는 D1 또는 D2 항원 결합 도메인을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자이다.

[0106] 또한 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 표 1에 열거된 예시적인 항-MET 항체 중 어느 하나에 의해 정의된 것과 같은 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍에 함유된 6개의 CDR 세트(즉, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)를 포함하는 D1 또는 D2 항원 결합 도메인을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자이다.

[0107] 본원에 제공된 방법에 유용한 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자는 표 1의 항-MET 항체 중 어느 하나로부터

유래된 D1 항원 결합 도메인 및 표 1의 임의의 다른 항-MET 항체로부터 유래된 D2 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. MET x MET 이중특이적 항체의 비제한적인 예는 도 1에 도시되어 있다. 도 1은 272개의 예시적인 MET x MET 이중특이적 항체의 성분을 도시하는 매트릭스이다. (1에서 272까지) 번호가 매겨진 매트릭스의 각 셀은 "D1" 항원 결합 도메인 및 "D2" 항원 결합 도메인을 포함하는 고유한 이중특이적 항체를 식별하며, 여기서 D1 항원 결합 도메인은 Y-축을 따라 열거된 상응하는 항-MET 항체 유래의 면역글로불린 가변 도메인(HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍) 또는 CDR을 포함하고, D2 항원 결합 도메인은 X-축을 따라 열거된 상응하는 항-MET 항체 유래의 면역글로불린 가변 도메인(HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍) 또는 CDR을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 매트릭스에 표시된 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자 "번호 10"은 예시적인 항-MET 항체 H4H13290P2 유래의 HCVR/LCVR 쌍 또는 6-CDR 세트를 포함하는 D1 항원 결합 도메인, 또는 예시적인 항-MET 항체 H4H13321P2 유래의 HCVR/LCVR 쌍 또는 6-CDR 세트를 포함하는 D2 항원 결합 도메인을 포함한다. 본원에 제공된 MET x MET 이중특이적 항체의 추가 예는 본원의 실시예 4에 기술된다.

[0108] 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 예시적인 MET x MET 이중특이적 분자는 D1 항원 결합 도메인 및 D2 항원 결합 도메인을 포함하며, 여기서 D1 항원 결합 도메인은 서열번호 58/138의 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍 또는 서열번호 60-62-64-140-142-144를 포함하는 중쇄 및 경쇄 CDR 세트(HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)를 포함하고, D2 항원 결합 도메인은 서열번호 82/138의 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍 또는 서열번호 84-86-88-140-142-144를 포함하는 중쇄 및 경쇄 CDR 세트(HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)를 포함한다. 이러한 서열 특성들을 갖는 예시적인 MET x MET 이중특이적 항체는 H4H14639D로 지정된(이중특이적 항체이중특이적 항체 번호 122로도 지칭됨)이며, 이는 H4H13306P2로부터 유래된 D1 및 H4H13312P2로부터 유래된 D2를 포함한다(본원의 실시예 4, 표 5 참조).

[0109] 비제한적 예시를 위한 추가 예로서, 본원에서 유용한 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자는 D1 항원 결합 도메인 및 D2 항원 결합 도메인을 포함하며, 여기서 D1 항원 결합 도메인은 서열번호 18/138의 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍 또는 서열번호 20-22-24-140-142-144를 포함하는 중쇄 및 경쇄 CDR 세트(HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)를 포함하고, D2 항원 결합 도메인은 서열번호 82/138의 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍 또는 서열번호 84-86-88-140-142-144를 포함하는 중쇄 및 경쇄 CDR 세트(HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)를 포함한다. 이러한 서열 특성들을 갖는 예시적인 MET x MET 이중특이적 항체는 H4H14635D로 지정된 이중특이적 항체(이중특이적 항체 번호 42로도 지칭됨)이며, 이는 H4H13295P2로부터 유래된 D1 및 H4H13312P2로부터 유래된 D2를 포함한다(본원의 실시예 4, 표 5 참조).

[0110] **다량체화 성분**

[0111] 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 이중특이적 항원 결합 분자는, 특정 구현예에서, 하나 이상의 다량체화 성분(들)을 포함할 수도 있다. 다량체화 성분은 항원 결합 도메인들(D1 및 D2) 사이의 결합을 유지하는 기능을 할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "다량체화 성분"은 동일하거나 유사한 구조 또는 구성의 제2의 다량체화 성분과 결합하는 능력을 가진 임의의 거대분자, 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 또는 아미노산이다. 예를 들어, 다량체화 성분은 면역글로불린 C_H3 도메인을 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. 다량체화 성분의 비 제한적 예는 면역글로불린의 Fc 부분, 예컨대 이소형 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4, 및 각 이소형 그룹 내의 임의의 동종이인자형으로부터 선택된 IgG의 Fc 도메인이다. 특정 구현예에서, 다량체화 성분은 Fc 단편 또는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 함유하는 1 내지 약 200개 아미노산 길이의 아미노산 서열이다. 다른 구현예에서, 다량체화 성분 은 시스테인 잔기, 또는 짧은 시스테인을 함유하는 펩티드이다. 다른 다량체화 도메인은 류신 지퍼, 나선-루프 모티프 또는 이중 코일 모티프를 포함하거나 이들로 구성된 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다.

[0112] 특정 구현예에서, 이중특이적 항원 결합 분자는 두 개의 다량체화 도메인 M1 및 M2를 포함하며, 여기서 D1은 M1에 부착되고 D2는 M2에 부착되며, M2와 M1의 결합은 단일 이중특이적 항원 결합 분자에서 D1 및 D2의 서로에 대한 물리적 연결을 촉진한다. 특정 구현예에서, M1과 M2는 서로 동일하다. 예를 들어, M1은 특정 아미노산 서열을 갖는 Fc 도메인일 수 있고, M2는 M1과 동일한 아미노산 서열을 갖는 Fc 도메인이다. 대안적으로, M1과 M2는 하나 이상의 아미노산 위치에서 서로 다를 수 있다. 예를 들어 M1은 제1 면역글로불린(Ig) C_H3 도메인을 포함할 수 있고, M2는 제2 Ig C_H3 도메인을 포함할 수 있 는데, 이때 제1 및 제2 Ig C_H3 도메인은 서로 적어도 하나의 아미노산이 상이하고, 적어도 하나의 아미노산 차이는 동일한 M1과 M2 서열을 갖는 참조 구성체와 비교하여 단백질 A에 대한 표적화 구성체의 결합을 감소시킨다. 일 구현예에서, M1의 Ig C_H3 도메인은 단백질 A에 결합하고, M2의 Ig C_H3 도메인은 H95R 변경(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R)과 같은 단백

질 A 결합을 감소시키거나 없애는 돌연변이를 함유한다. M2의 C_H3은 Y96F 변경(IMGT에 의함; EU에 의하면 Y436F)을 추가로 포함할 수 있다. M2의 C_H3 내에서 발견될 수 있는 추가적인 변경은 다음을 포함한다: IgG1 Fc 도메인의 경우 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M 및 V82I (IMGT에 의함; EU에 의하면 D356E, L358M, N384S, K392N, V397M 및 V422I); IgG2 Fc 도메인의 경우 N44S, K52N 및 V82I (IMGT에 의함; EU에 의하면 N384S, K392N 및 V422I); 및 IgG4 Fc 도메인의 경우 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q 및 V82I (IMGT에 의함; EU에 의하면 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V422I).

[0113] 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 이중특이적 항원 결합 분자는 "단리(isolated)"될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "단리된 이중특이적 항원 결합 분자"는 자연 환경의 적어도 하나의 성분으로부터 식별되어 분리되었고/되었거나 회수된 이중특이적 항원 결합 분자를 의미한다. 예를 들어, 유기체의 적어도 하나의 성분으로부터, 또는 항체가 생산되는 조직이나 세포로부터 분리되었거나 제거된 이중특이적 항체가 본 발명의 목적에 맞는 "단리된 이중특이적 항체"이다. 단리된 이중특이적 항원 결합 분자는 재조합 세포 내의 인 시튜(in situ) 분자를 또한 포함한다. 단리된 이중특이적 항원 결합 분자는 적어도 하나의 정제 또는 단리 단계를 거친 분자이다. 특정 구현예에 따르면, 단리된 이중특이적 항원 결합 분자는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질을 실질적으로 갖지 않을 수 있다.

[0114] 본원에 개시된 방법에 따라 유용한 이중특이적 항원 결합 분자 또는 이의 항원 결합 도메인(D1 및/또는 D2)은 항원 결합 단백질 또는 항원 결합 도메인이 유래된 상응하는 생식선 서열과 비교했을 때 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 프레임워크 및/또는 CDR 영역에서 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 이러한 돌연변이는 본원에 개시된 아미노산 서열을, 예를 들어, 공개된 항체 서열 데이터베이스로부터 이용할 수 있는 생식선 서열과 비교함으로써 쉽게 확인할 수 있다. 이중특이적 항원 결합 분자 또는 이의 항원 결합 도메인(D1 및/또는 D2)은 본원에 개시된 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 유래되며, 여기서 하나 이상의 프레임워크 영역 및/또는 CDR 영역 내의 하나 이상의 아미노산은 항체가 유래된 생식선 서열의 상응하는 잔기(들)로 돌연변이되거나, 또 다른 인간 생식선 서열의 상응하는 잔기(들)로 돌연변이되거나, 상응하는 생식선 잔기(들)의 보존적 아미노산 치환으로 돌연변이될 수 있다(이러한 서열 변화는 본원에서 "생식선 돌연변이"로서 통칭한다).

[0115] 당업자는, 본원에 개시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열에서 출발하여, 하나 이상의 개별 생식선 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함하는 다수의 이중특이적 항원 결합 분자 또는 이의 항원 결합 도메인(D1 및/또는 D2)을 쉽게 생산할 수 있다. 특정 구현예에서, V_H 및/또는 V_L 도메인 내의 프레임워크 및/또는 CDR 잔기의 전부는, 항체가 유래된 원래의 생식선 서열에서 발견되는 잔기로 다시 돌연변이된다. 다른 구현예에서, 특정한 잔기만이, 예를 들어, FR1의 처음 8개의 아미노산 또는 FR4의 마지막 8개의 아미노산 내에서 발견되는 돌연변이된 잔기, 또는 CDR1, CDR2 또는 CDR3에서 발견되는 돌연변이된 잔기만이 원래의 생식선 서열로 다시 돌연변이 된다. 다른 구현예에서, 프레임워크 및/또는 CDR 잔기(들) 중 하나 이상은 상이한 생식선 서열(예를 들어, 항체가 유래된 원래의 생식선 서열과 상이한 생식선 서열)의 상응하는 잔기(들)로 돌연변이 된다.

[0116] 또한, 본원에서 유용한 이중특이적 항원 결합 분자 또는 이의 항원 결합 도메인(D1 및/또는 D2)은 프레임워크 및/또는 CDR 영역 내의 2개 이상의 생식선 돌연변이의 임의의 조합을 함유할 수 있는데, 예를 들어, 특정 개별 잔기는 특정 생식선 서열의 상응하는 잔기로 돌연변이되는 반면, 원래의 생식선 서열과 상이한 특정한 다른 잔기는 유지되거나, 상이한 생식선 서열의 상응하는 잔기로 돌연변이된다. 일단 수득되면, 하나 이상의 생식선 돌연변이를 함유하는 이중특이적 항원 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편(D1 및/또는 D2)은, 개선된 결합 특이성, 증가된 결합 친화도, (경우에 따라) 개선되거나 강화된 길항성 또는 작용성 생물학적 특성, 감소된 면역원성 등과 같은 하나 이상의 원하는 특성에 대해 쉽게 시험될 수 있다. 이러한 일반적인 방식으로 수득된 이중특이적 항원 결합 분자 또는 이의 항원 결합 도메인(D1 및/또는 D2)은 본원에서 유용한 것으로 고려된다.

[0117] **변이체**

[0118] 또한 본원에 유용한 것은, 본원에 개시된 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 아미노산 서열 중 어느 하나의 변이체를 포함하는 항-MET 항체 및 이중특이적 항원 결합 분자이다. 이러한 양태에 포함된 예시적인 변이체는 하나 이상의 보존적 치환을 갖는, 본원에 개시된 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 아미노산 서열 중 어느 하나의 변이체를 포함한다. 예를 들어, 본 개시는 본원의 표 1에 제시된 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 아미노산 서열에 비해, 예를 들어, 10개 이하, 8개 이하, 6개 이하, 4개 이하 등의 보존적 아미노산 치환을 갖는 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 아미노산 서열을 갖는 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자를 포함한다.

[0119] 예시적인 변이체는 본원에 개시된 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 아미노산 서열 중 어느 하나에 대해 실질적인 서열

동일성을 갖는 변이체를 포함한다. 아미노산 서열의 맥락에서 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "실질적 동일성" 또는 "실질적으로 동일한"은, 예컨대 디폴트 갭 가중치(default gap weight)를 사용하여 GAP 또는 BESTFIT 프로그램에 의해 최적으로 정렬되었을 때, 2개의 아미노산 서열이 적어도 95%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 공유함을 의미한다. 특정 구현예에서, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환만큼 상이하다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 화학적 성질(예: 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄(R기)를 갖는 또 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 것이다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 기능적 성질을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 2개 이상의 아미노산 서열이 보존적 치환만큼 서로 상이한 경우, 서열 동일성 백분율 또는 유사성의 정도는 상향으로 조정되어 치환의 보존적 성질을 보정할 수 있다. 이러한 조정을 만드는 수단은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 본원에 참조로서 통합된 Pearson의 문헌[(1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331] 참조. 화학적 성질이 유사한 측쇄를 갖는 아미노산의 군의 예는 다음을 포함한다: (1) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신; (2) 지방족-히드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌; (3) 아미드 함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; (4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판; (5) 염기성 측쇄: 리신, 아르기닌, 및 히스티딘; (6) 산성 측쇄: 아스파르트산염 및 글루탐산염; 및 (7) 황 함유 측쇄: 시스테인 및 메티오닌. 바람직한 보존적 아미노산 치환기는: 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 리신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루탐산염-아스파르트산염, 및 아스파라긴-글루타민이다. 대안적으로, 보존적 치환은 본원에 참조로서 통합된 Gonnet 등의 문헌[(1992) Science 256: 1443-1445]에 개시된 PAM250 로그 우도 매트릭스에서 양의 값을 갖는 임의의 변화이다. "적당한 보존적" 치환은 PAM250 로그 우도 매트릭스에서 음의 값을 갖는 임의의 변화이다.

[0120] 2개의 상이한 아미노산 서열 간의 서열 동일성은 서열 분석 소프트웨어를 사용하여 일반적으로 측정된다. 서열 분석 소프트웨어는 보존적 아미노산 치환을 포함하는 다양한 치환, 결실 및 기타 변형에 배정된 유사성 측정치를 사용하여 유사한 서열들을 대조한다. 예를 들어, GCG 소프트웨어는, 상이한 종의 유기체 유래의 상동성 폴리펩티드와 같은 밀접하게 연관된 폴리펩티드 간의 서열 상동성이나 서열 동일성, 또는 야생형 단백질과 이의 뮤테인 사이의 서열 상동성이나 서열 동일성을 결정하기 위한 디폴트 파라미터와 함께 사용될 수 있는 Gap 및 Bestfit과 같은 프로그램을 포함한다. (예를 들어, GCG 버전 6.1 참조) 폴리펩티드 서열은 GCG 버전 6.1의 프로그램인 FASTA를 사용해, 디폴트 파라미터 또는 권장 파라미터를 사용해 비교할 수도 있다. FASTA(예를 들어, FASTA2 및 FASTA3)는 쿼리 및 검색 서열 사이의 가장 중첩된 영역의 정렬 및 서열 동일성 백분율을 제공한다(전술한 Pearson(2000) 참조). 본원에 제공된 서열을 상이한 유기체의 다수의 서열이 포함된 데이터베이스와 비교할 때 바람직한 또 다른 알고리즘은 디폴트 파라미터를 사용하는 컴퓨터 프로그램인 BLAST, 특히 BLASTP 또는 TBLASTN이다. 예를 들어, Altschul 등의 문헌[(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410] 및 Altschul 등의 문헌[(1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402]을 참조하고, 이들 각각은 참조로서 본원에 통합된다.

[0121] **Fc 변이체를 포함하는 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자**

[0122] 본원에 제공된 특정 구현예에 따르면, 본원에서 유용한 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질은, 예를 들어 중성 pH에 비해 산성 pH에서, FcRn 수용체에 대한 항체 결합을 강화시키거나 감쇠시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인을 포함한다. 예를 들어, 이러한 변이체는 Fc 도메인의 C_H2 또는 C_H3 영역에서 돌연변이를 포함하는 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질을 포함하며, 여기서 돌연변이(들)는 산성 환경에서(예를 들어, pH가 약 5.5 내지 6.0 범위인 엔도솜에서) FcRn에 대한 Fc 도메인의 친화도를 증가시킨다. 이러한 돌연변이는, 동물에게 투여되는 경우 항체의 혈청 반감기를 증가시킬 수 있다. 이러한 Fc 변형의 비제한적인 예는, 예를 들어, 위치 250(예: E 또는 Q)에서의 변형; 250 및 428(예: L 또는 F)에서의 변형; 252(예: L/Y/F/W 또는 T), 254(예: S 또는 T), 및 256(예: S/R/Q/E/D 또는 T)에서의 변형; 또는 위치 428 및/또는 433(예: H/L/R/S/P/Q 또는 K) 및/또는 434(예: H/F 또는 Y)에서의 변형; 또는 위치 250 및/또는 428에서의 변형; 또는 위치 307 또는 308(예: 308F, V308F) 및 434에서의 변형을 포함한다. 일 실시예에서, 변형은 428L(예: M428L) 및 434S(예: N434S) 변형; 428L, 259I(예: V259I), 및 308F(예: V308F) 변형; 433K(예: H433K) 및 434(예: 434Y) 변형; 252, 254, 및 256(예: 252Y, 254T, 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형(예: T250Q 및 M428L); 및 307 및/또는 308 변형(예: 308F 또는 308P)을 포함한다.

[0123] 따라서, 본원에서 유용한 것은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이의 하나 이상의 쌍 또는 군을 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질이다: 250Q 및 248L(예: T250Q 및 M248L); 252Y, 254T 및 256E(예: M252Y, S254T 및 T256E); 428L 및 434S(예: M428L 및 N434S); 및 433K 및 434F(예: H433K 및 N434F). 전술한 Fc 도메인 돌연변이 및 본원에 개시된 항체 가변 도메인 내의 다른 돌연변이의 모든 가능한 조합은 본 개시의 범위 내에 있는 것으로 고려된다.

[0124] **본원에서 유용한 항원 결합 분자의 생물학적 특징**

[0125] 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 포도막 흑색종 세포의 증식을 억제하고, 침윤을 억제하고, 세포자멸사를 유발하고/하거나, 생존율을 감소시키는 항체 및 이의 항원 결합 단편뿐만 아니라 이들 항체 및 항원 결합 단편을 포함하는 ADC이다.

[0126] 또한, 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 포도막 흑색종 세포의 세포 주기에 영향을 미치는 항체 및 이의 항원 결합 단편뿐만 아니라 이들 항체 및 항원 결합 단편을 포함하는 ADC이다. 일부 양태에서, 세포는 유사분열 정지를 겪는다. 일부 양태에서, 세포는 SubG1 기(phase)에 머물며, 이는 세포가 세포자멸사를 겪고 있음을 나타낸다.

[0127] 또한, 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 포도막 흑색종 세포에서 세포자멸사를 유발하는 항체 및 이의 항원 결합 단편뿐만 아니라 이들 항체 및 항원 결합 단편을 포함하는 ADC이다. 일부 양태에서, 포도막 흑색종 세포는 PARP 절단을 나타낸다. 일부 양태에서, 포도막 흑색종 세포는 히스톤 H3 인산화를 나타낸다.

[0128] 또한, 본원에서 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 높은 친화도로 단량체 인간 MET에 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편이다. 예를 들어, 본 개시는, 예를 들어 본원의 실시예 3에 정의된 바와 같은 검정 포맷 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용해 25℃ 또는 37℃에서 표면 플라스몬 공명에 의해 측정했을 때, 약 230 nM 미만의 K_D로 단량체 인간 LEPR(예: hMET.mmh)에 결합하는 항-MET 항체를 포함한다. 특정 구현예에 따르면, 예를 들어 본원의 실시예 3에 정의된 바와 같은 검정 포맷 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용해 표면 플라스몬 공명에 의해 측정했을 때, 37℃에서 약 230 nM 미만, 약 200 nM 미만, 약 150 nM 미만, 약 100 nM 미만, 약 50 nM 미만, 약 25 nM 미만, 약 20 nM 미만, 약 10 nM 미만, 약 8 nM 미만, 약 6 nM 미만, 약 5 nM 미만, 약 4 nM 미만, 또는 약 3 nM 미만의 K_D로 이량체 인간 MET에 결합하는 항-MET 항체가 제공된다.

[0129] 이러한 항체 및 이의 항원 결합 단편은, 예를 들어 본원의 실시예 3에 정의된 바와 같은 검정 포맷 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용해 25℃ 또는 37℃에서 표면 플라스몬 공명에 의해 측정했을 때, 약 1분을 초과하는 해리 반감기(t½)로 단량체 인간 MET(예: hMET.mmh)에 결합한다. 이러한 항-MET 항체는, 예를 들어 본원의 실시예 3에 정의된 바와 같은 검정 포맷 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용해 표면 플라스몬 공명에 의해 측정했을 때, 37℃에서 약 1분 초과, 약 2분 초과, 약 4분 초과, 약 6분 초과, 약 8분 초과, 약 10분 초과, 약 12분 초과, 약 14분 초과, 약 16분 초과, 약 18분 초과, 또는 약 20분 초과 또는 그 이상의 t½로 단량체 인간 MET에 결합한다.

[0130] 이러한 항체 및 이의 항원 결합 단편은 높은 친화도로 이량체 인간 MET(예: hMET.mFc)에 결합한다. 예를 들어, 항-MET 항체는, 예를 들어 본원의 실시예 3에 정의된 바와 같은 검정 포맷 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용해 25℃ 또는 37℃에서 표면 플라스몬 공명에 의해 측정했을 때, 약 3 nM 미만의 K_D로 이량체 인간 MET에 결합한다. 특정 구현예에 따르면, 항-MET 항체는, 예를 들어 본원의 실시예 3에 정의된 바와 같은 검정 포맷 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용해 표면 플라스몬 공명에 측정했을 때, 37℃에서 약 3 nM 미만, 약 2 nM 미만, 약 1 nM 미만, 약 0.9 nM 미만, 약 0.8 nM 미만, 약 0.7 nM 미만, 약 0.6 nM 미만, 약 0.5 nM 미만, 약 0.4 nM 미만, 약 0.3 nM 미만, 또는 약 0.25 nM 미만의 K_D로 이량체 인간 MET에 결합한다.

[0131] 이러한 항체 및 이의 항원 결합 단편은, 예를 들어 본원의 실시예 3에 정의된 바와 같은 검정 포맷 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용해 25℃ 또는 37℃에서 표면 플라스몬 공명에 의해 측정했을 때, 약 4분을 초과하는 해리 반감기(t½)로 이량체 인간 MET(예: hMET.mFc)에 결합할 수 있다. 특정 구현예에 따르면, 항-MET 항체는, 예를 들어 본원의 실시예 3에 정의된 바와 같은 검정 포맷 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용해 표면 플라스몬 공명에 의해 측정했을 때, 37℃에서 약 4분 초과, 약 5분 초과, 약 10분 초과, 약 20분 초과, 약 30분 초과, 약 40분 초과, 약 50분 초과, 약 60분 초과, 약 70분 초과, 약 80분 초과, 약 90분 초과, 약 100분 초과, 약 105분 초과 또는 그 이상의 t½로 단량체 인간 MET에 결합할 수 있다.

[0132] 또한, 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 예를 들어 본원의 실시예 5에 정의된 바와 같은 검정 포맷 또는 실질적으로 유사한 검정을 25℃ 또는 37℃에서 표면 플라스몬 공명에 의해 측정했을 때, 약 10분을 초과하는 해리 반감기(t½)로 이량체 인간 MET(예: hMET.mFc)에 결합하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질이다. 특정 구현예에 따르면, MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질은 본원의 실시예 5에서 정의된 바와 같은 검정 포맷 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용해 표면 플라스몬 공명에 의해 측정했을 때 37℃에서 약 10분 초과, 약 20분 초과, 약 30분 초과, 약 40분 초과, 약 50분 초과, 약 60분 초과, 약 70분 초과, 약 80분 초과, 약 90분

초과, 약 100분 초과, 약 200분 초과, 약 300분 초과, 약 400분 초과, 약 500분 초과, 약 600분 초과, 약 700분 초과, 또는 약 800분 초과, 약 900분 초과, 약 1000분 초과, 약 1100분 초과 또는 그 이상의 t½로 이량체 인간 MET에 결합한다.

[0133] 또한, 본원에 제공된 방법에 따르면, 예를 들어, 시험관 내 리간드 결합 검정에서 HGF와 MET 사이의 상호작용을 차단하는 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질이 있다. 본원에 제공된 특정 구현예에 따르면, MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질은 인간 MET를 발현하는 세포에 대한 HGF 결합을 차단하고, HGF 신호전달의 부재 시 MET 활성화를 최소로 유도하거나 유도하지 않는다. 예를 들어, MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질은 세포 기반 MET 활성 리포터 검정에서 일정 정도의 MET 작용제 활성을 나타내며, 그 정도는 D1 또는 D2 만을 포함하는 단일특이적 항체를 사용하는 동등한 활성 리포터 검정에서 관찰된 MET 작용제 활성의 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 3% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만이다.

[0134] 본 개시에 따라 유용한 항체 및 항원 결합 단백질은 전술한 생물학적 특징 중 하나 이상 또는 이들의 임의의 조합을 가질 수 있다. 항체의 생물학적 특징에 대한 전술한 목록은 포괄적인 것으로 의도되지는 않는다. 본원에 제공된 항체의 다른 생물학적 특징은 본원의 실제 실시예를 포함하여 본 개시를 검토함으로써 당업자에게 명백해질 것이다.

[0135] **항체-약물 접합체(ADC)**

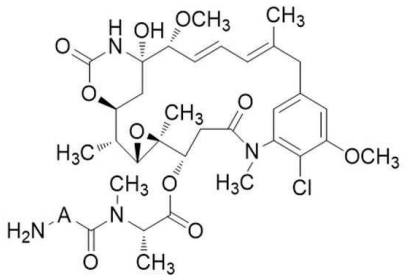
[0136] 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 세포독성제, 화학요법제, 또는 방사성 동위원소와 같은 치료 모이어티에 접합된 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질을 포함하는 항체 약물 접합체(ADC)이다.

[0137] 세포독성제는 세포의 성장, 생존율, 또는 전파에 유해한 임의의 제제를 포함하며, 이에는 튜불린-상호작용제 및 DNA-손상제가 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 본 개시의 이러한 양태에 따라 항-MET 항체에 접합될 수 있는 적절한 세포독성제 및 화학요법제의 예는 예를 들어 다음을 포함한다: 1-(2클로로에틸)-1,2-디메틸설포닐 하이드라지드(1-(2chloroethyl)-1,2-dimethanesulfonyl hydrazide), 1,8-디하이드록시-바이시클로[7.3.1]트리데카-4,9-디엔-2,6-디인-13-온(1,8-dihydroxy-bicyclo[7.3.1]trideca-4,9-diene-2,6-diyne-13-one), 1-데하이드로테스토스테론(1-dehydrotestosterone), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 6-머캅토퓨린(6-mercaptopurine), 6-티오구아닌(6-thioguanine), 9-아미노 캄프토테신(9-amino camptothecin), 액티노마이신 D(actinomycin D), 아마니틴(amanitins), 아미노프테린(aminopterin), 안구이딘(anguidine), 안트라시클릭(anthracycline), 안트라마이신(anthramycin, AMC), 아우리스타틴(auristatins), 블레오마이신(bleomycin), 부설판(busulfan), 부티르산(butyric acid), 칼리키마이신(calicheamicins)(예: 칼리키마이신 γ_1), 캄프토테신(camptothecin), 카르미노마이신(carminomycins), 카르무스틴(carmustine), 세마도틴(cemadotins), 시스플라틴(cisplatin), 콜키친(colchicin), 콤브레타스타틴(combretastatins), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 시타라빈(cytarabine), 사이토칼라신 B(cytochalasin B), 닥티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 다카바진(decarbazine), 디아세톡시펜틸독소루비신(diacetoxypentyldoxorubicin), 디브로모만니톨(dibromomannitol), 디하이드록시 안트라신 디온(dihydroxy anthracin dione), 디소라졸(disorazoles), 돌라스타틴(dolastatin)(예: 돌라스타틴 10), 독소루비신(doxorubicin), 듀오카마이신(duocarmycin), 에키모마이신(echinomycins), 엘류테로빈(eleutherobins), 에메틴(emetine), 에포틸론(epothilones), 에스페라마이신(esperamicin), 에스트라머스틴(estramustines), 에티듐 브로미드(ethidium bromide), 에토포시드(etoposide), 플루오로우라실(fluorouracils), 겔다나마이신(geldanamycins), 그라미시딘 D(gramicidin D), 글루코코르티코이드(glucocorticoids), 이리노테칸(irinotecans), 키네신 스핀들 단백질(kinesin spindle protein, KSP) 억제제, 렙토마이신(leptomycins), 류로신(leurosines), 리도카인(lidocaine), 로무스틴(lomustine 또는 CCNU), 메이탄시노이드(maytansinoids), 메클로르에타민(mechlorethamine), 멜팔란(melphalan), 머캅토퓨린(mercatopurines), 메토프테린(methopterins), 메토트렉세이트(methotrexate), 미트라마이신(mithramycin), 미토마이신(mitomycin), 미톡산트론(mitoxantrone), N8-아세틸 스페르미딘(N8-acetyl spermidine), 포도필로톡신(podophyllotoxins), 프로카인(procaine), 프로프라놀론(propranolol), 프테리딘(pteridines), 퓨로마이신(puromycin), 피롤로벤조디아제핀(pyrrolobenzodiazepines, PBD), 리족신(rhizoxins), 스트렙토조토신(streptozotocin), 탈리소마이신(tallysomycins), 탁솔(taxol), 테노포시드(tenoposide), 테트라카인(tetracaine), 티오에파 클로람부실(thioepa chlorambucil), 토메이마이신(tomaymycins), 토포테칸(topotecans), 투불리신(tubulysin), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine), 비노렐빈(vinorelbines), 및 전술한 것 중 어느 하나의 유도체. 특정 구현예에 따르면, 항-MET 항체에 접합되는 세포독성제는 메이탄시노이드(예: DM1 또는 DM4), 토메이마이신 유도체, 또는 돌라스타틴 유도체이다. 특정 구

현예에 따르면, 항-MET 항체에 접합되는 세포독성제는 아우리스타틴(예: MMAE, MMAF, 또는 이의 유도체)이다. 당업계에 공지된 다른 세포독성제가 본 개시의 범주 내에서 고려되며, 이에는 예를 들어, 리신(ricin)과 같은 단백질 독소, 클로스트리듐 디피실(*C. difficile*)독소, 슈도모나스 외독소(pseudomonas exotoxin), 리신, 디프테리아 독소, 보툴리눔 독소, 브리오딘, 사포린, 포크위드 독소(즉, 피톨락카톡신 및 피톨락시게닌), 및 Sharma 등의 문헌[*Pharmacol. & Therapeutics*, 2013, 138:452-469]에서 제시된 것들과 같은 다른 것들을 포함한다.

[0138] 특정 구현예에서, 세포독성제는 메이탄시노이드, 예를 들어, 메이탄신의 유도체이다. 적합한 메이탄시노이드는 DM1, DM4, 또는 이들의 유도체, 입체이성질체, 또는 동위원소(isotopologues)를 포함한다. 적합한 메이탄시노이드는 또한 WO 2014/145090A1, WO 2015/031396A1, US 2016/0375147A1, 및 US 2017/0209591A1에 개시된 것들을 포함하지만 이들로 한정되지는 않으며, 이들 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

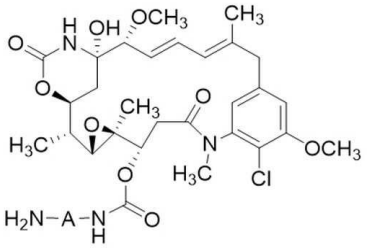
[0139] 일부 구현예에서, 메이탄시노이드는 다음의 구조를 가지며:



[0140]

[0141] 식 중 A는 임의 치환된 아릴렌 또는 헤테로아릴렌이다.

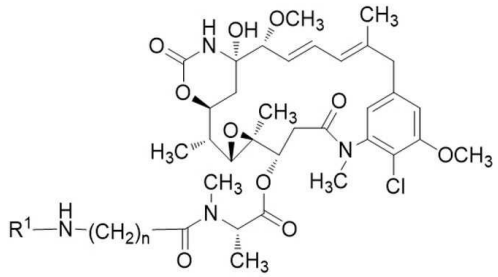
[0142] 일부 구현예에서, 메이탄시노이드는 다음의 구조를 가지며:



[0143]

[0144] 식 중 A는 임의 치환된 아릴렌 또는 헤테로아릴렌이다.

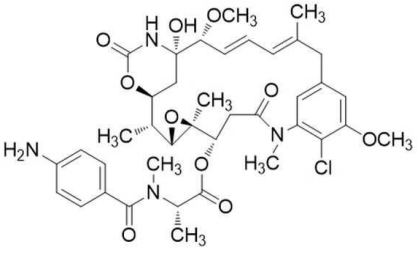
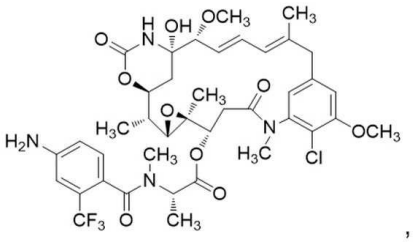
[0145] 일부 구현예에서, 메이탄시노이드는 다음의 구조를 가지며:

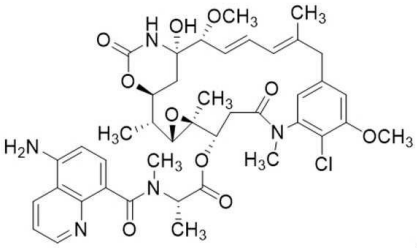
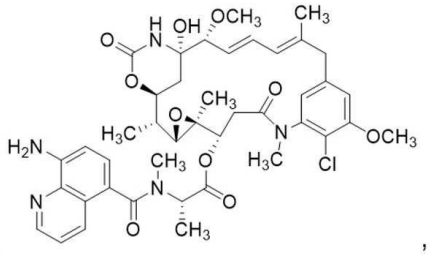


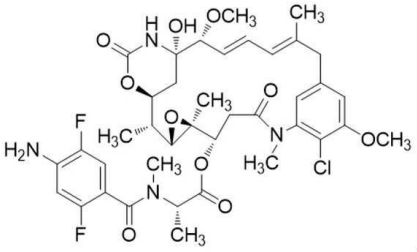
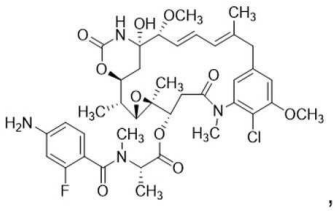
[0146]

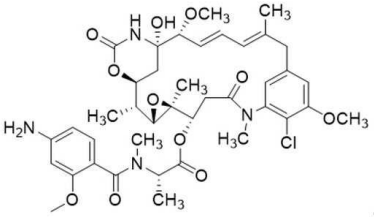
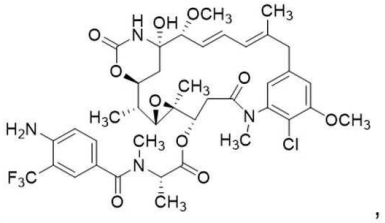
[0147] 식 중 n은 1 내지 12의 정수이고 R^1은 알킬이다.

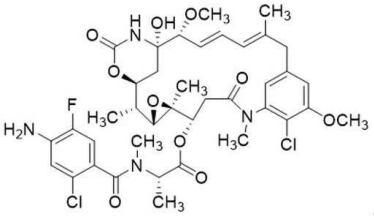
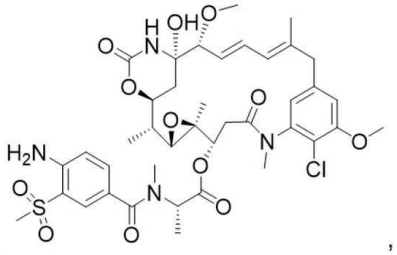
[0148] 일부 구현예에서, 메이탄시노이드는 다음과 같다:

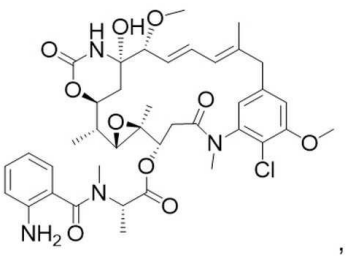
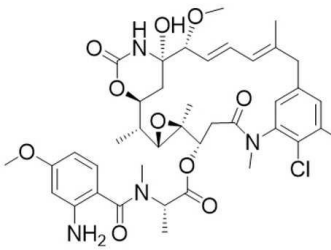
[0149] , ,

, ,

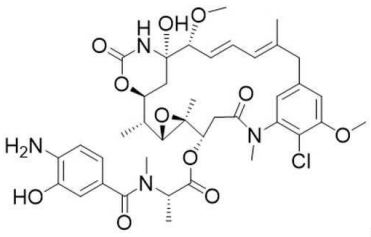
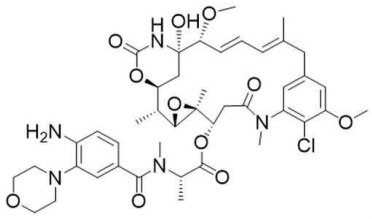
, ,

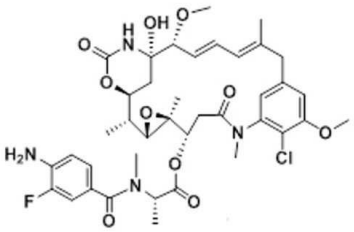
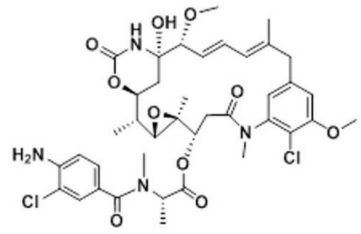
, ,

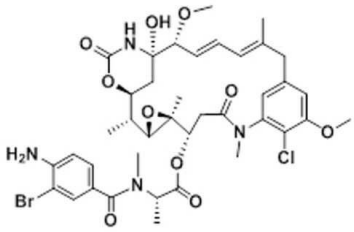
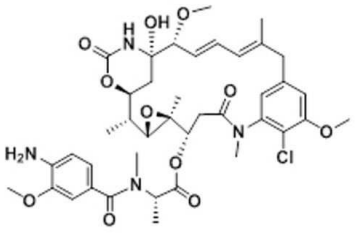
, ,

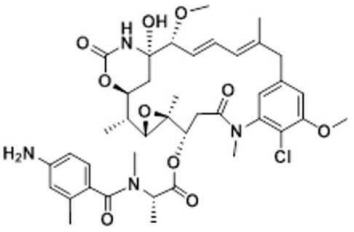
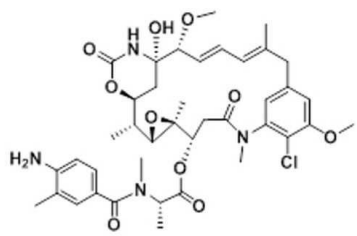
, ,

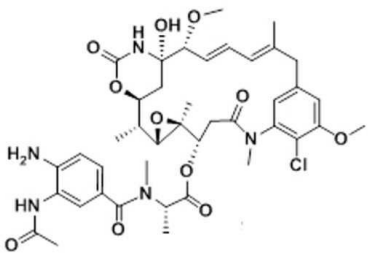
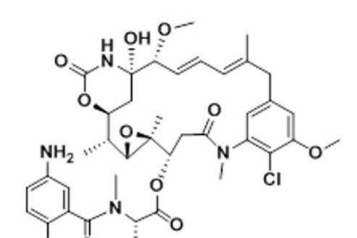
[0150] , ,


,

.


,

,


,

,

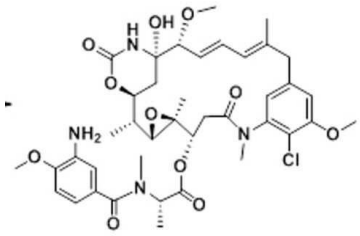
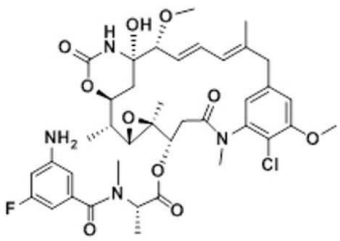
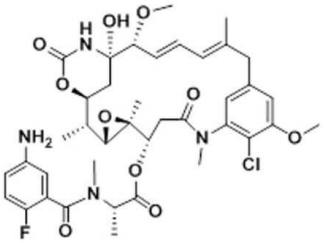
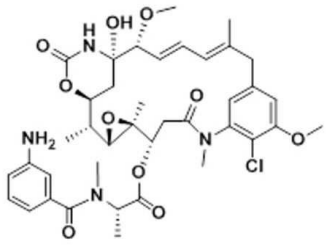
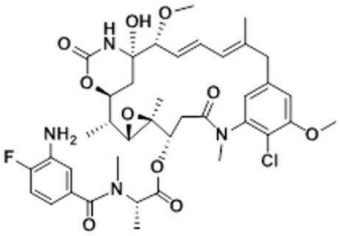
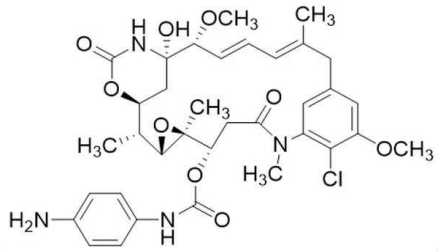
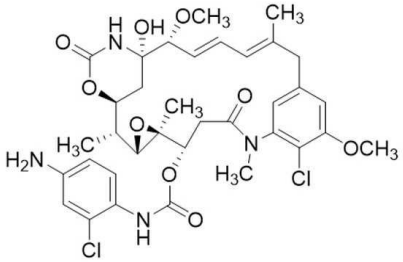
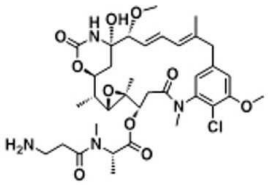
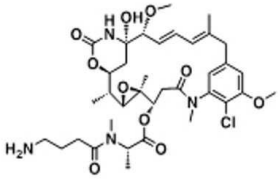
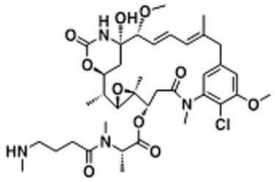
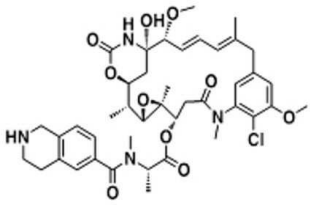
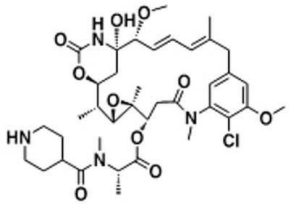

,

,


,

,

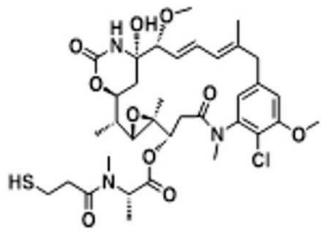
,

,

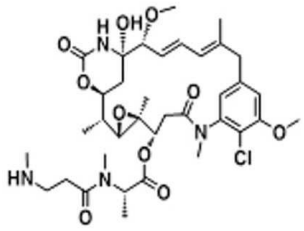
[0151]


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

[0152]

[0153] 또는 .

[0154] 일부 구현예에서, 메이탄시노이드는 다음과 같다:

[0155] 
.

[0156] 일부 구현예에서, 메이탄시노이드는 다음과 같다:

[0157] 
.

[0158] 또한, 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 하나 이상의 방사성 핵종(radionuclides)에 접합된 항-MET 항체를 포함하는 항체 방사성 핵종 접합체(ARC)이다. 본 개시의 이러한 양태의 맥락에서 사용될 수 있는 예시적인 방사성 핵종은, 예를 들어, ^{225}Ac, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{131}I, ^{186}Re, ^{227}Th, ^{222}Rn, ^{223}Ra, ^{224}Ra, 및 ^{90}Y를 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다.

[0159] 특정 구현예에서, ADC는 링커 분자를 통해 세포독성제(예를 들어, 전술한 세포독성제 중 어느 하나)에 접합된 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질을 포함한다. 링커는 본원에 기술된 항체 또는 항원 결합 단백질을 세포독성제와 같은 치료 모이어티와 링크시키거나, 연결하거나, 결합시키는 임의의 기 또는 모이어티이다. 적절한 링커는, 예를 들어, *Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins*; Phillips, G. L., Ed.; Springer Verlag: New York, 2013; *Antibody-Drug Conjugates*; Ducry, L., Ed.; Humana Press, 2013; *Antibody-Drug Conjugates*; Wang, J., Shen, W.-C., 및 Zaro, J. L., Eds.; Springer International Publishing, 2015에서 확인할 수 있으며, 이들 각 문헌의 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 일반적으로, 본원에 기술된 항체 접합체에 적합한 결합제 링커는 항체의 순환 반감기를 이용하기에 충분히 안정적이고, 동시에 접합체의 항원 매개 내재화 후 페이로드를 방출할 수 있는 것들이다. 링커는 절단성이거나 비절단성일 수 있다. 절단성 링커는 내재화 후의 세포내 대사에 의해, 예를 들어, 가수분해, 환원, 또는 효소 반응을 통한 절단에 의해 절단되는 링커를 포함한다. 비절단성 링커는 내재화 후에 항체의 리소좀 분해를 통해 부착된 페이로드를 방출하는 링커를 포함한다. 적절한 링커는 산-반응성 링커, 가수분해-반응성 링커, 효소 절단성 링커, 환원 반응성 링커, 자가-희생 링커, 및 비절단성 링커를 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 적절한 링커는 펩티드, 글루쿠로니드, 숙신이미드-티오에테르, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 단위, 하이드라존, 말-카프로일 단위, 디펩티드 단위, 발린-시트룰린 단위, 및 파라-아미노벤질(PAB) 단위이거나 이를 포함하는 것들을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다.

[0160] 당업계에 공지된 임의의 링커 분자 또는 링커 기술을 사용하여 본 개시에 따라 유용한 ADC를 생성하거나 작제할 수 있다. 특정 구현예에서, 링커는 절단성 링커이다. 다른 구현예에 따르면, 링커는 비절단성 링커이다. 본 개시의 맥락에서 사용될 수 있는 예시적인 링커는, 예를 들어, MC (6-말레이미도카프로일), MP (말레이미도프로파노일), val-cit (발린-시트룰린), val-alr (발린-알라닌), 프로테아제 절단성 링커의 디펩티드 부위, ala-phe (알라닌-페닐알라닌), 프로테아제 절단성 링커의 디펩티드 부위, PAB (p-아미노벤질옥시카보닐), SPP (N-숙신이미딜 4-(2-피리딜티오)펜타노에이트), SMCC (N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1 카복실레이트), SIAB (N-숙신이미딜 (4-요오드-아세틸)아미노벤조에이트), 및 이들의 변이체 및 조합을 포함하거나 이들로 이루어지는 링커를 포함한다. 본 개시의 맥락에서 사용될 수 있는 링커의 추가 예가, 예를 들어, 미국 특허 제7,754,681호 및 Ducry의 문헌[Bioconjugate Chem., 2010, *21*:5-13], 및 본원에 인용된 참조 문헌에서 제공되며, 그 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0161] 특정 구현예에서, 링커는 생리학적 조건에서 안정적이다. 특정 구현예에서, 링커는 절단성이며, 예를 들어, 효소의 존재 하에 또는 특정 pH 범위 또는 값에서 적어도 페이로드 부분을 방출할 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 효소 절단성 모이어티를 포함한다. 예시적인 효소 절단성 모이어티는 펩티드 결합, 에스테르 연결, 하이드

라존, 및 이황화 연결을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 일부 구현예에서, 링커는 카텝신 절단성 링커를 포함한다.

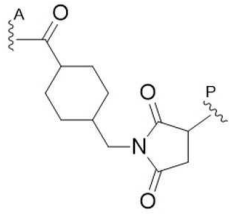
[0162] 일부 구현예에서, 링커는 비절단성 모이어티를 포함한다.

[0163] 적절한 링커는 단일 결합제(예: 항체)의 2개의 시스테인 잔기에 화학적으로 결합되는 것들을 또한 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 이러한 링커는 접합 과정의 결과로서 파괴되는 항체의 이황화 결합을 모방하는 역할을 할 수 있다.

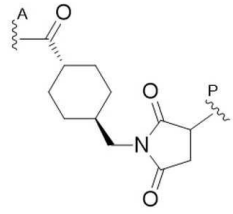
[0164] 일부 구현예에서, 링커는 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 적절한 아미노산은 천연, 비천연, 표준, 비표준, 단백질원성, 비단백질원성, 및 L- 또는 D-α-아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 알라닌, 발린, 글리신, 류신, 이소류신, 메티오닌, 트립토판, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산, 글루탐산, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 또는 시트룰린, 이들의 유도체, 또는 이들의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 아미노산의 하나 이상의 측쇄는 후술하는 측쇄기에 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 발린 및 시트룰린을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 라이신, 발린, 및 시트룰린을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 라이신, 발린, 및 알라닌을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 발린 및 알라닌을 포함한다.

[0165] 일부 구현예에서, 링커는 자가-희생 기를 포함한다. 자가-희생 기는 당업자에게 공지된 임의의 이러한 기일 수 있다. 특정 구현예에서, 자가-희생 기는 *p*-아미노벤질(PAB), 또는 이의 유도체이다. 유용한 유도체는 *p*-아미노벤질옥시카보닐(PABC)을 포함한다. 당업자는 자가-희생 기가 링커의 나머지 원자를 페이로드로부터 방출하는 화학 반응을 수행할 수 있다는 것을 인식할 것이다.

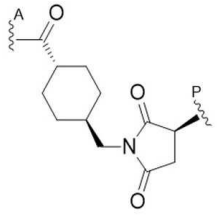
[0166] 일부 구현예에서, 링커는 다음과 같으며:

[0167] 

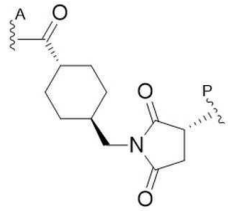
[0168] 식 중 는 (예를 들어, 라이신 잔기를 통한) 항체 또는 항원 결합 단백질에 대한 결합이고, 은 세포독성제(예를 들어, DM1)에 대한 결합이다. 일부 구현예에서, 링커는 다음과 같으며:

[0169] 

[0170] 식 중 는 (예를 들어, 라이신 잔기를 통한) 항체 또는 항원 결합 단백질에 대한 결합이고, 은 세포독성제(예를 들어, DM1)에 대한 결합이다. 특정 구현예에서, 링커는 다음과 같다:

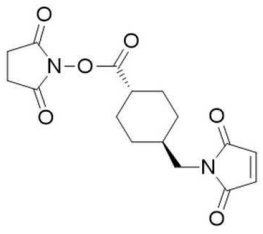
[0171] .

[0172] 특정 구현예에서, 링커는 다음과 같다:



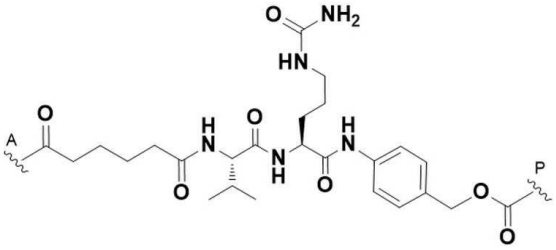
[0173]

[0174] 일부 구현예에서, 링커는 말레이미딜메틸-4-트랜스-시클로헥산카복시숙시네이트에서 유래된다:



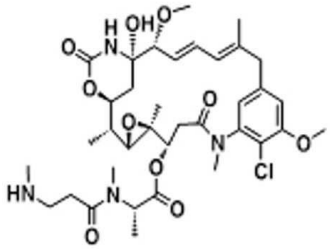
[0175] .

[0176] 일부 구현예에서, 링커는 다음과 같으며:



[0177]

[0178] 식 중 $\overset{A}{\sim}$ 는 (예를 들어, 라이신 잔기를 통한) 항체 또는 항원 결합 단백질에 대한 결합이고, $\sim\!\!\overset{P}{}$ 은 세포독성제(예를 들어, 다음 화학식을 갖는 화합물)에 대한 결합이다.

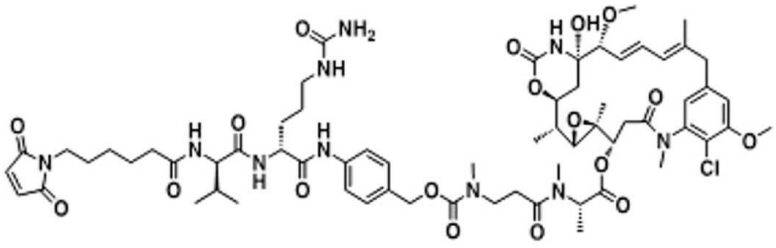


[0179] .

[0180] 개시된 방법에 따라 유용한 분자는, 항체 또는 항원 결합 분자 내의 특정 아미노산에서 부착 물질을 통해 링커가 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질을 약물 또는 세포독소에 연결하는 ADC를 포함한다. 본 양태의 맥락에서 사용될 수 있는 예시적인 아미노산 부착 물질은, 예를 들어, 라이신(예를 들어, 미국 특허 제5,208,020호; 미국 특허 공개 제2010/0129314호; Hollander 등의 문헌[*Bioconjugate Chem.*, 2008, 19:358-361]; WO 2005/089808; 미국 특허 제5,714,586호; 미국 특허 공개 제2013/0101546호; 및 미국 특허 공개 제2012/0585592호 참조), 시스테인(예를 들어, 미국 특허 공개 제2007/0258987호; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; 미국 특허 공개 제2013/0101546호; 및 미국 특허 제7,750,116호 참조), 셀레노시스테인(예를 들어, WO 2008/122039; 및 Hofer 등의 문헌[*Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2008, 105*:12451-12456] 참조), 포르밀 글리신(예를 들어, Carrico 등의 문헌[*Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3:321-322]; Agarwal 등의 문헌[*Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2013, 110*:46-51], 및 Rabuka 등의 문헌[*Nat. Protocols*, 2012, *10*:1052-1067] 참조), 비천연 아미노산(예를 들어, WO 2013/068874, 및 WO 2012/166559 참조), 및 산성 아미노산(예를 들어, WO 2012/05982 참조)이다. 링커는 탄수화물에 대한 부착(예를 들어, 미국 특허 공개 제2008/0305497호, WO 2014/065661, 및 Ryan 등의 문헌[*Food & Agriculture Immunol.*, 2001, *13*:127-130] 참조) 및 이황화 링커(예를 들어, WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611, 및 Shaunt 등의 문헌[*Nat. Chem. Biol.*, 2006, *2*:312-313] 참조)를 통해 항원 결합 단백질에 접합될 수도 있다.

부위 특이적 접합 기술을 사용해 항체 또는 항원 결합 단백질의 특정 잔기에 대한 접합을 유도할 수도 있다(예를 들어, Schumacher 등의 문헌[*J Clin Immunol* (2016) 36(Suppl 1): 100] 참조). 부위 특이적 접합 기술은 트랜스글루타미나제를 통한 글루타민 접합을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다(예를 들어, Schibli, Angew Chemie Inter Ed. 2010, 49,9995 참조).

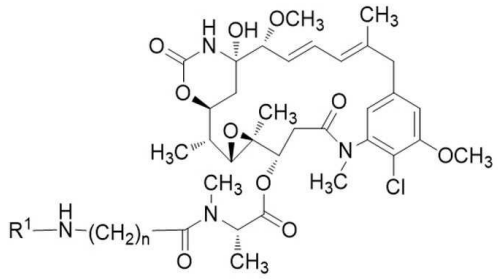
[0181] 특정 구현예에 따르면, 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 ADC는 국제 특허 공개 WO2014/145090에 제시된 것과 같은 링커-약물 조성물에 접합된 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질(예를 들어, 본원에서 "M0026"으로도 지칭되고 아래에 도시된 화합물 "7")을 포함하며, 상기 특허 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.



7

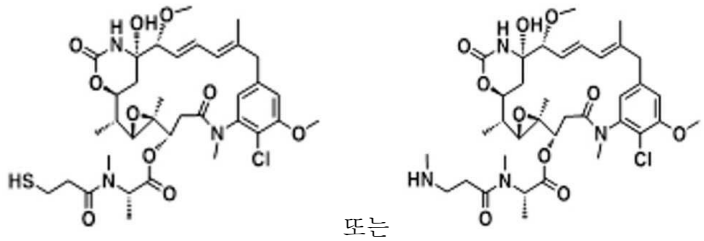
[0182] .

[0183] 또한, 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 단일특이적 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항체를 포함하는 항체-약물 접합체이며, 여기서 상기 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항체는 세포독성제에 접합된다. 특정 구현예에서, 세포독성제는 메이탄시노이드이다. 특정 구현예에서, 메이탄시노이드는 다음의 화학식을 갖는 화합물이며:



[0184]

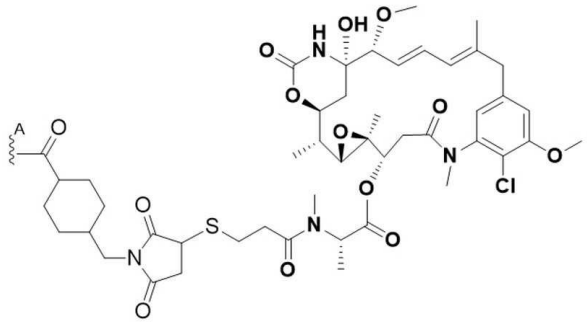
[0185] 식 중 n은 1 내지 12의 정수이고 R^1은 알킬이다. 특정 구현예에서, 메이탄시노이드는 다음과 같다:



[0186] 또는 .

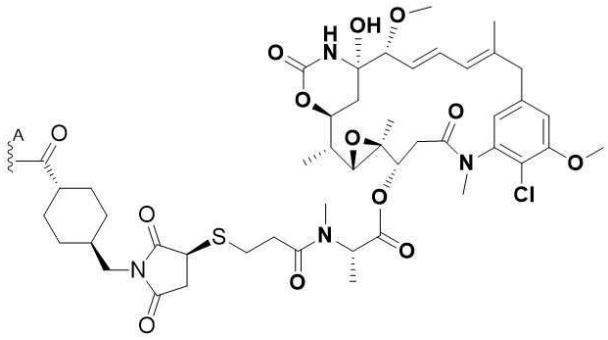
[0187] 특정 구현예에서, 세포독성제는 메이탄시노이드이고, 메이탄시노이드는 비절단성 링커를 통해 항체에 공유 부착된다. 특정 구현예에서, 세포독성제는 메이탄시노이드이고, 메이탄시노이드는 절단성 링커를 통해 항체에 공유 부착된다.

[0188] 일 구현예에서, 항체는 다음에 접합되며:

[0189] 

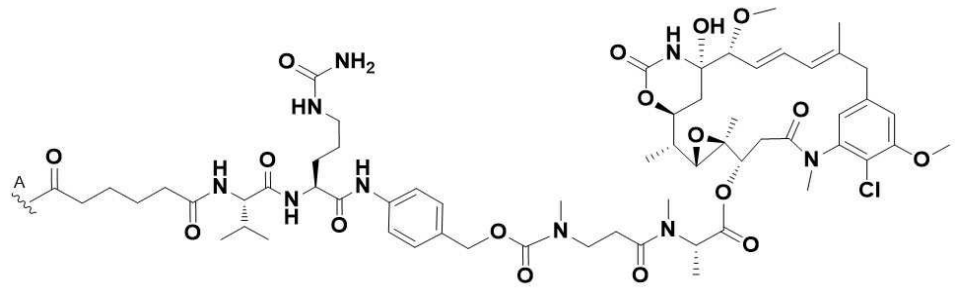
[0190] 식 중 는 항체에 대한 결합이다.

[0191] 일 구현예에서, 항체는 다음에 접합되며:

[0192] 

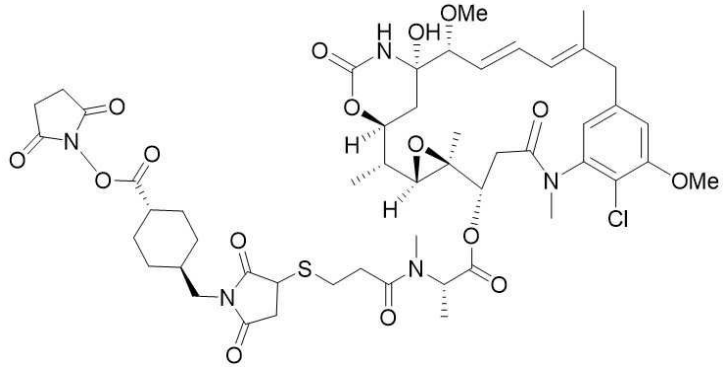
[0193] 식 중 는 항체에 대한 결합이다.

[0194] 일 구현예에서, 항체는 다음에 접합되며:

[0195] 

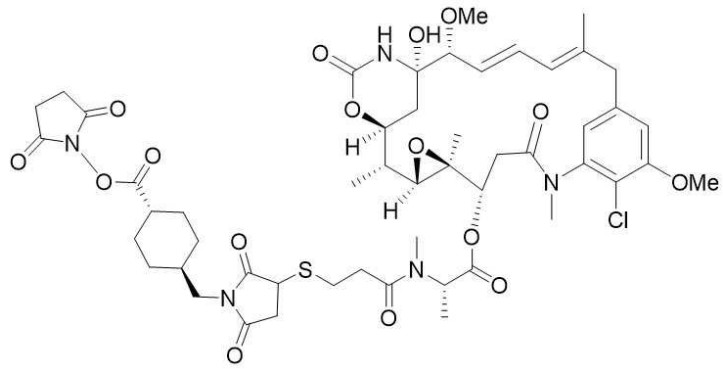
[0196] 식 중 는 항체에 대한 결합이다.

[0197] 일 구현예에서, 항체는 다음의 구조를 갖는 화합물의 부분 입체이성질체에 접합되며:

[0198] 

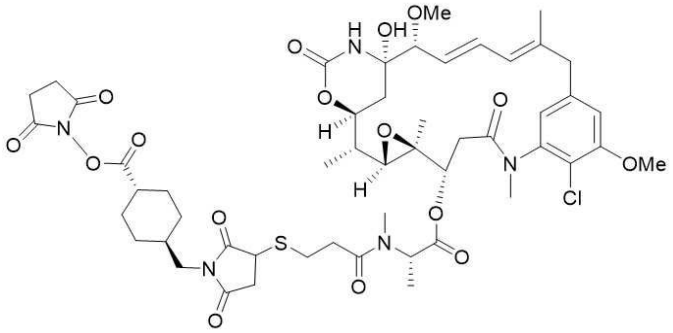
[0199] 여기서, 부분 입체이성질체는 (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.85 (d, 1H, *J* = 4 Hz), 6.72 (m, 1H), 6.65 (d, 1H, *J* = 4 Hz), 6.44 (dd, 1H, *J* = 15 Hz, 11 Hz), 6.25 (s, 1H), 5.67 (dd, 1H, *J* = 16 Hz, 9 Hz), 5.41 (m, 1H), 4.79 (d, 1H, *J* = 11 Hz), 4.30 (t, 1H, *J* = 11 Hz), 3.72 (m, 2H), 3.51 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 3.37 (m, 4H), 3.27 (m, 1H), 3.23 (s, 3H), 3.16 - 2.99 (m, 4H), 2.85 (m, 7H), 2.62 (m, 3H), 2.39 (ddd, 1H, *J* = 19 Hz, 12 Hz, 4 Hz), 2.18 (br m, 2H), 1.77 (br m, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.60 - 1.47 (m, 4H), 1.31 (m, 6H), 1.05 (m, 2H), 및 0.82 (s, 3H)의 델타 이동을 특징으로 하는 ^{1}H NMR을 특징으로 한다.

[0200] 일 구현예에서, 항체는 다음의 구조를 갖는 화합물의 부분 입체이성질체에 접합되며:

[0201] 

[0202] 여기서, 부분 입체이성질체는 실질적으로 도 31에 도시된 바와 같이 ^{1}H NMR을 특징으로 한다.

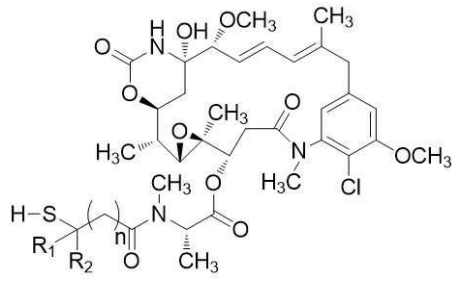
[0203] 일 구현예에서, 항체는 다음의 구조를 갖는 화합물에 접합되며:

[0204] 

[0205] 화학식 (I);

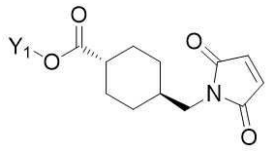
[0206] 상기 화합물은

[0207] (i) 화학식 (III)의 화합물:

[0208] 

[0209] 화학식 (III);

[0210] (ii) 화학식 (IV)의 화합물;



[0211]

[0212] 화학식 (IV)

[0213] (iii) 실리카 겔; 및

[0214] (iv) 유기 용매 및 물을 포함하는 희석제를 접촉시키는 단계에 의해 제조된다.

[0215] 일부 구현예에서, 접합체는 다음의 구조를 가지며:

[0216] $Ab-[L-Pay]_n$

[0217] 식 중:

[0218] Ab는 본원에 기술된 것과 같은 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질이고;

[0219] L은 링커이고;

[0220] Pay는 세포독성제이고;

[0221] n은 1 내지 10의 정수이다.

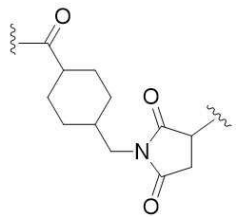
[0222] 일부 구현예에서, Ab는 서열번호 82/138의 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍 내에 CDR을 포함하는 항-MET 항체이다. 일부 구현예에서, Ab는 서열번호 82의 HCVR 아미노산 서열 및 서열번호 138의 LCVR 아미노산 서열을 포함하는 항-MET 항체이다.

[0223] 일부 구현예에서, Ab는 서열번호 58의 D1-HCVR 아미노산 서열 내의 CDR 및 서열번호 82의 D2-HCVR 아미노산 서열 내의 CDR을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질이다. 일부 양태에서, MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질은 서열번호 138의 LCVR 아미노산 서열 내의 CDR을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, Ab는 서열번호 58의 D1-HCVR 아미노산 서열 및 서열번호 82의 D2-HCVR 아미노산 서열을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질이다. 일부 양태에서, MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질은 서열번호 138의 LCVR 아미노산 서열을 추가로 포함한다.

[0224] 일부 구현예에서, Ab는 서열번호 18의 D1-HCVR 아미노산 서열 내의 CDR 및 서열번호 82의 D2-HCVR 아미노산 서열 내의 CDR을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질이다. 일부 양태에서, MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질은 서열번호 138의 LCVR 아미노산 서열 내의 CDR을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, Ab는 서열번호 18의 D1-HCVR 아미노산 서열 및 서열번호 82의 D2-HCVR 아미노산 서열을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질이다.

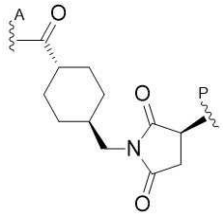
[0225] 일부 구현예에서, L은 절단성 링커이다. 일부 구현예에서, L은 비절단성 링커이다. 일부 구현예에서, L은 디펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, L은 PAB 모이어티를 포함한다.

[0226] 일부 구현예에서, L은 다음 구조를 갖는 모이어티를 포함한다:



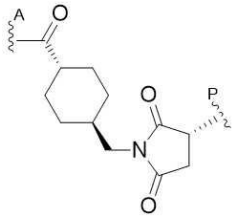
[0227] .

[0228] 일부 구현예에서, L은 다음 구조를 갖는 모이어티를 포함한다:

[0229] 

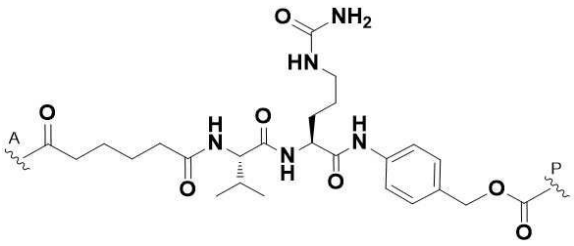
.

[0230] 일부 구현예에서, L은 다음 구조를 갖는 모이어티를 포함한다:

[0231] 

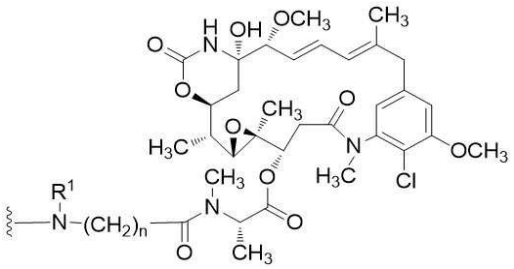
.

[0232] 일부 구현예에서, L은 다음 구조를 갖는 모이어티를 포함한다:

[0233] 

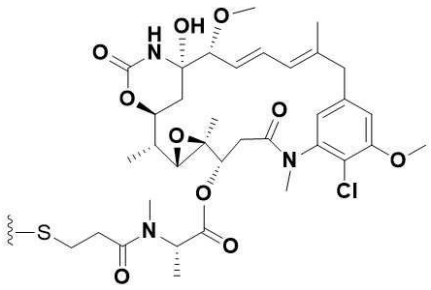
[0234] 일부 구현예에서, Pay는 메이탄시노이드이다.

[0235] 일부 구현예에서, Pay는 다음과 같으며:

[0236] 

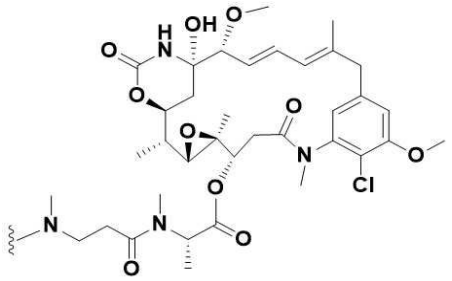
[0237] 식 중 R^1은 알킬이다.

[0238] 일부 구현예에서, Pay는 다음과 같다:

[0239] 

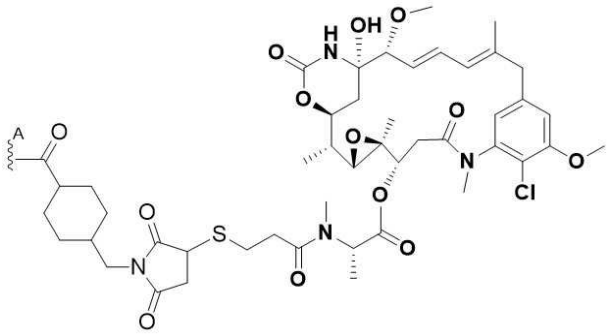
.

[0240] 일부 구현예에서, Pay는 다음과 같다:

[0241] 
.

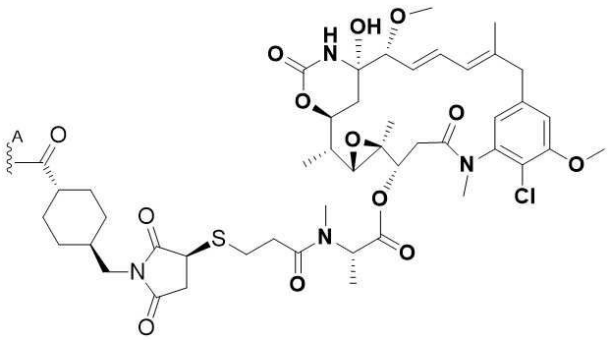
[0242] 일부 구현예에서, n은 2 내지 5의 정수이다.

[0243] 일부 구현예에서, -L-Pay는 다음과 같으며:

[0244] 

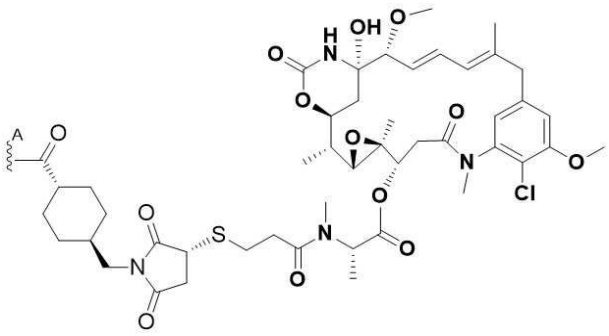
[0245] 식 중 는 항체에 대한 결합이다.

[0246] 일부 구현예에서, -L-Pay는 다음과 같으며:

[0247] 

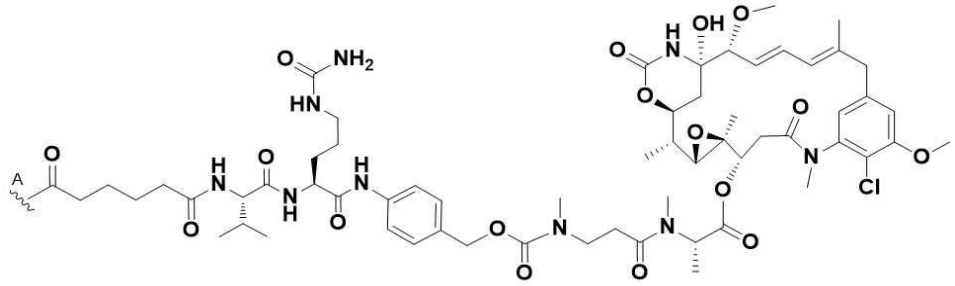
[0248] 식 중 는 항체에 대한 결합이다.

[0249] 일부 구현예에서, L은 다음과 같으며:

[0250] 

[0251] 식 중 는 항체에 대한 결합이다.

[0252] 일부 구현예에서, -L-Pay는 다음과 같으며:



[0253]

[0254] 식 중  는 항체에 대한 결합이다.

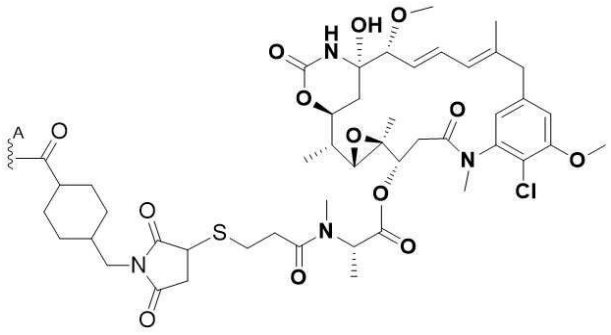
[0255] 일부 구현예에서, 접합체는 다음의 구조를 가지며:

[0256] $Ab-[L-Pay]_n$

[0257] 식 중:

[0258] Ab는 서열번호 82의 HCVR 아미노산 서열 및 서열번호 138의 LCVR 아미노산 서열을 포함하는 항-MET 항체이고;

[0259] L-Pay는 다음과 같으며



[0260]

[0261] 식 중  는 항체에 대한 결합이고; n은 2 내지 5의 정수이다.

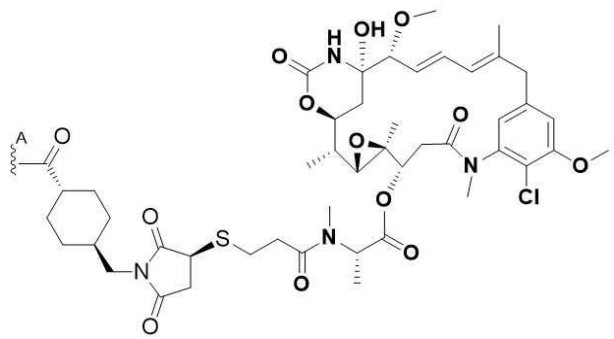
[0262] 일부 구현예에서, 접합체는 다음의 구조를 가지며:

[0263] $Ab-[L-Pay]_n$

[0264] 식 중:

[0265] Ab는 서열번호 82의 HCVR 아미노산 서열 및 서열번호 138의 LCVR 아미노산 서열을 포함하는 항-MET 항체이고;

[0266] L-Pay는 다음과 같으며



[0267]

[0268] 식 중  는 항체에 대한 결합이고; n은 2 내지 5의 정수이다.

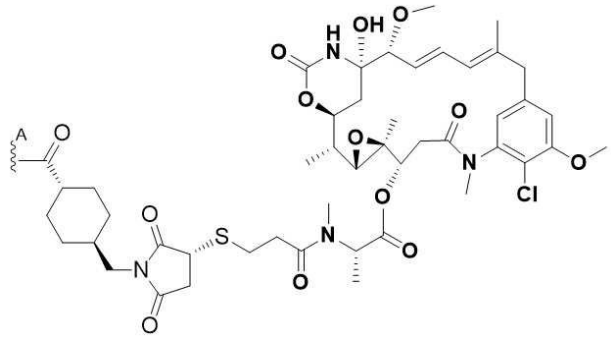
[0269] 일부 구현예에서, 접합체는 다음의 구조를 가지며:

[0270] $Ab-[L-Pay]_n$

[0271] 식 중:

[0272] Ab는 서열번호 82의 HCVR 아미노산 서열 및 서열번호 138의 LCVR 아미노산 서열을 포함하는 항-MET 항체이고;

[0273] L-Pay는 다음과 같으며

[0274] 

[0275] 식 중 는 항체에 대한 결합이고; n은 2 내지 5의 정수이다.

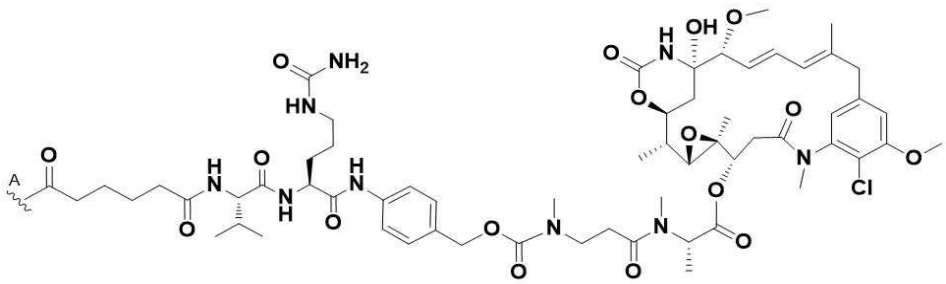
[0276] 일부 구현예에서, 접합체는 다음의 구조를 가지며:

[0277] $Ab-[L-Pay]_n$

[0278] 식 중:

[0279] Ab는 서열번호 82의 HCVR 아미노산 서열 및 서열번호 138의 LCVR 아미노산 서열을 포함하는 항-MET 항체이고;

[0280] L-Pay는 다음과 같으며

[0281] 

[0282] 식 중 는 항체에 대한 결합이고; n은 2 내지 5의 정수이다.

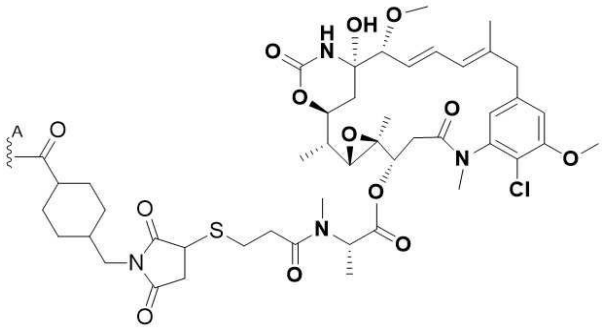
[0283] 일부 구현예에서, 접합체는 다음의 구조를 가지며:

[0284] $Ab-[L-Pay]_n$

[0285] 식 중:

[0286] Ab는 서열번호 58의 D1-HCVR 아미노산 서열 및 서열번호 82의 D2-HCVR 아미노산 서열을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질이고;

[0287] L-Pay는 다음과 같으며

[0288] 

[0289] 식 중 는 항원 결합 단백질에 대한 결합이고; n은 2 내지 5의 정수이다.

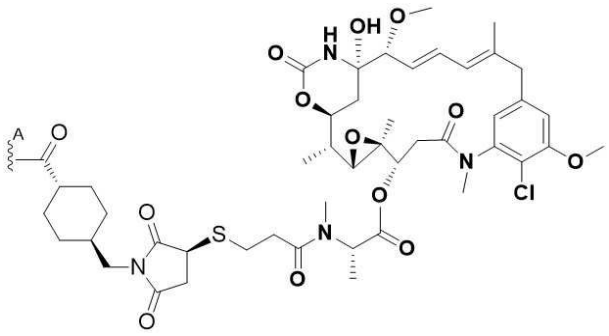
[0290] 일부 구현예에서, 접합체는 다음의 구조를 가지며:

[0291] $Ab-[L-Pay]_n$

[0292] 식 중:

[0293] Ab는 서열번호 58의 D1-HCVR 아미노산 서열 및 서열번호 82의 D2-HCVR 아미노산 서열을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질이고;

[0294] L-Pay는 다음과 같으며

[0295] 

[0296] 식 중 는 항원 결합 단백질에 대한 결합이고; n은 2 내지 5의 정수이다.

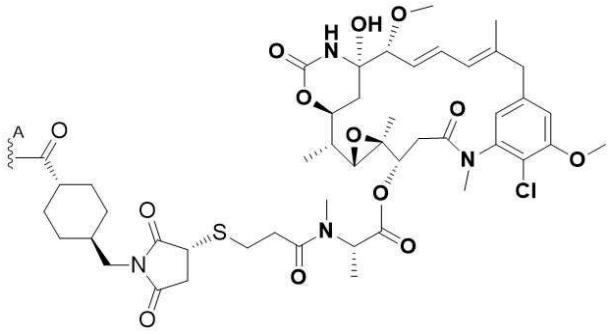
[0297] 일부 구현예에서, 접합체는 다음의 구조를 가지며:

[0298] $Ab-[L-Pay]_n$

[0299] 식 중:

[0300] Ab는 서열번호 58의 D1-HCVR 아미노산 서열 및 서열번호 82의 D2-HCVR 아미노산 서열을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질이고;

[0301] L-Pay는 다음과 같으며



[0302]

[0303] 식 중 는 항원 결합 단백질에 대한 결합이고; n은 2 내지 5의 정수이다.

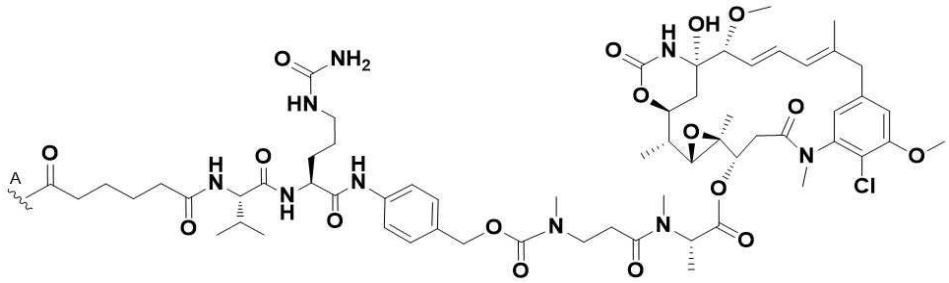
[0304] 일부 구현예에서, 접합체는 다음의 구조를 가지며:

[0305] $Ab-[L-Pay]_n$

[0306] 식 중:

[0307] Ab는 서열번호 58의 D1-HCVR 아미노산 서열 및 서열번호 82의 D2-HCVR 아미노산 서열을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질이고;

[0308] L-Pay는 다음과 같으며



[0309]

[0310] 식 중 는 항원 결합 단백질에 대한 결합이고; n은 2 내지 5의 정수이다.

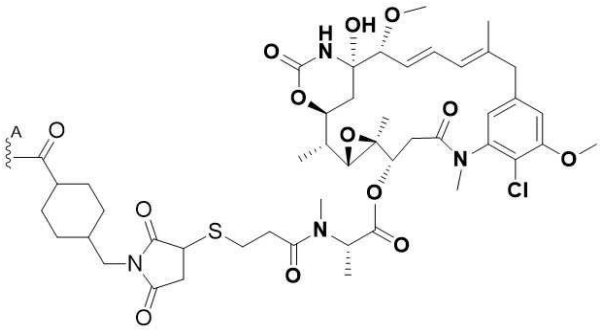
[0311] 일부 구현예에서, 접합체는 다음의 구조를 가지며:

[0312] $Ab-[L-Pay]_n$

[0313] 식 중:

[0314] Ab는 서열번호 18의 D1-HCVR 아미노산 서열 및 서열번호 82의 D2-HCVR 아미노산 서열을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질이고;

[0315] L-Pay는 다음과 같으며



[0316]

[0317] 식 중  는 항원 결합 단백질에 대한 결합이고; n은 2 내지 5의 정수이다.

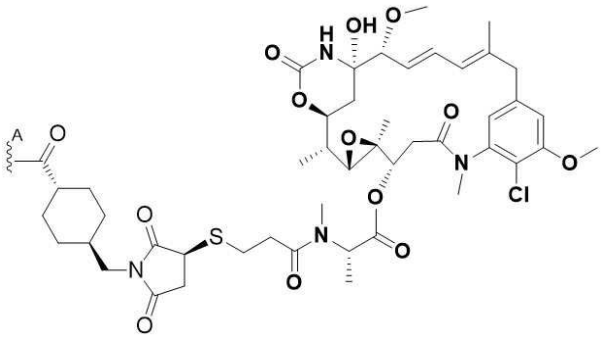
[0318] 일부 구현예에서, 접합체는 다음의 구조를 가지며:

[0319] $Ab-[L-Pay]_n$

[0320] 식 중:

[0321] Ab는 서열번호 18의 D1-HCVR 아미노산 서열 및 서열번호 82의 D2-HCVR 아미노산 서열을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질이고;

[0322] L-Pay는 다음과 같으며

[0323] 

[0324] 식 중  는 항원 결합 단백질에 대한 결합이고; n은 2 내지 5의 정수이다.

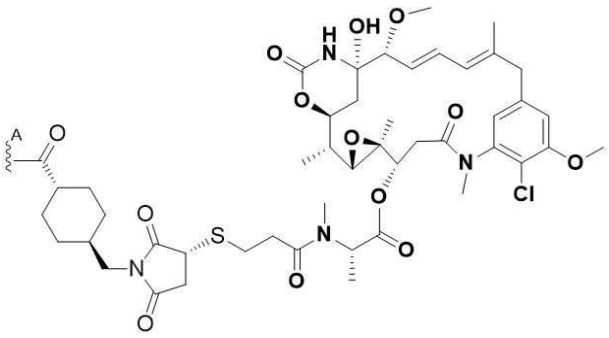
[0325] 일부 구현예에서, 접합체는 다음의 구조를 가지며:

[0326] $Ab-[L-Pay]_n$

[0327] 식 중:

[0328] Ab는 서열번호 18의 D1-HCVR 아미노산 서열 및 서열번호 82의 D2-HCVR 아미노산 서열을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질이고;

[0329] L-Pay는 다음과 같으며

[0330] 

[0331] 식 중  는 항원 결합 단백질에 대한 결합이고; n은 2 내지 5의 정수이다.

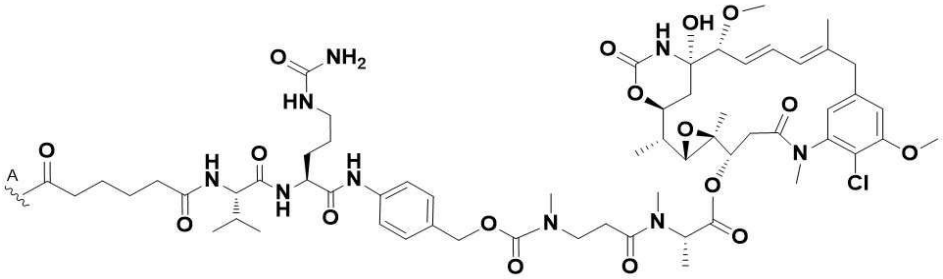
[0332] 일부 구현예에서, 접합체는 다음의 구조를 가지며:

[0333] $Ab-[L-Pay]_n$

[0334] 식 중:

[0335] Ab는 서열번호 18의 D1-HCVR 아미노산 서열 및 서열번호 82의 D2-HCVR 아미노산 서열을 포함하는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질이고;

[0336] L-Pay는 다음과 같으며

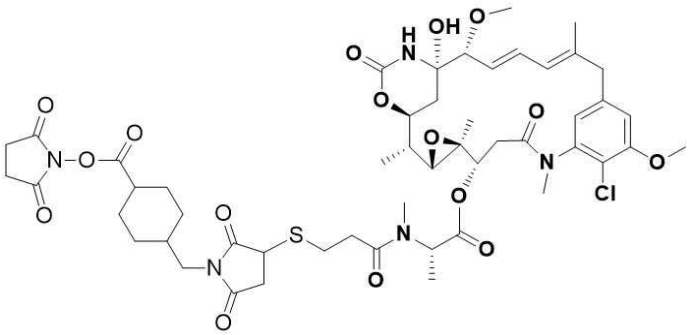


[0337]

[0338] 식 중  는 항원 결합 단백질에 대한 결합이고; n은 2 내지 5의 정수이다.

[0339] 본원에서 유용한 항체 약물 접합체는 당업자에게 공지된 접합 조건을 사용하여 제조될 수 있다(예를 들어, Doronina 등의 문헌[*Nature Biotechnology* 2003, 21, 7, 778을 참조하고, 그 전체는 참조로서 본원에 통합됨). 일부 구현예에서, 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질 항체 약물 접합체는, 본원에 기술된 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질을 원하는 링커 및 세포독성제를 포함하는 화합물과 접촉시킴으로써 제조되며, 여기서 상기 링커는, 예를 들어 항체 또는 항원 결합 단백질의 원하는 잔기에서, 항체 또는 항원 결합 단백질과 반응하는 모이어티를 보유한다.

[0340] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 항체-약물 접합체를 제조하는 방법은 본원에 기술된 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질을 다음의 화학식 A^1을 갖는 화합물:



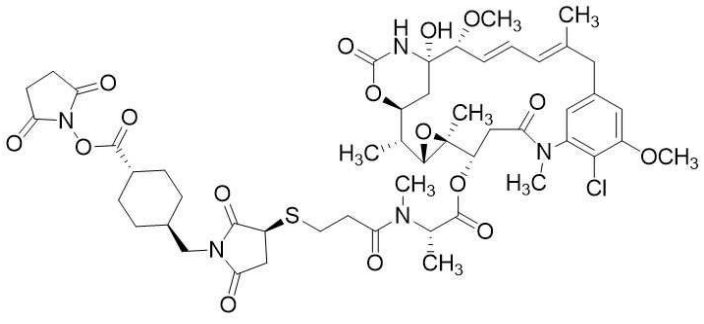
[0341]

[0342] A^1

[0343] 및 수성 희석제와 접촉시키는 단계를 포함한다.

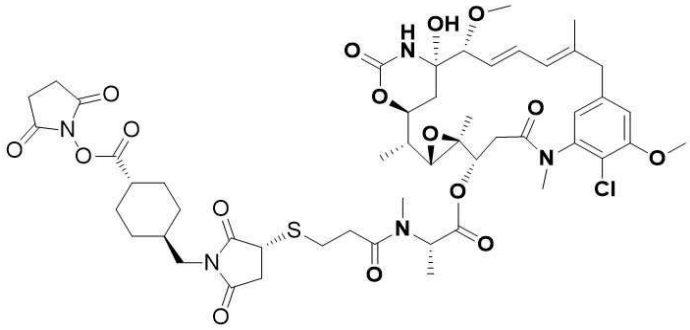
[0344] 일부 구현예에서, 화학식 A^1의 화합물은 화학량론적 과량으로 존재한다. 일부 구현예에서, 화학식 A^1의 화합물은 5~6배의 화학량론적 과량으로 존재한다. 일부 구현예에서, 수성 희석제는 HEPES를 포함한다. 일부 구현예에서, 수성 희석제는 DMA를 포함한다.

[0345] 일부 구현예에서, 화학식 A^1의 화합물은 화학식 A^2 또는 A^3의 화합물이다:



[0346]

[0347] A^2



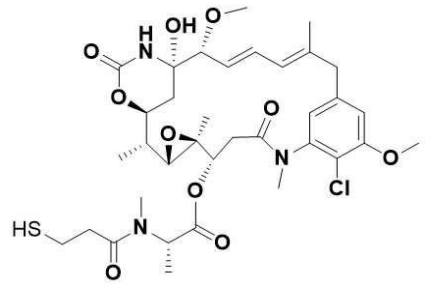
[0348]

[0349] A^3.

[0350] 일부 구현예에서, 화학식 A^2 또는 A^3의 화합물은 체적 측정 상으로(stereometrically) 순수하다. 일부 구현예에서, 화학식 A^1의 화합물은 화학식 A^2 또는 A^3의 화합물을 포함하되, A^2 또는 A^3의 화합물은 50% 초과의 부분 입체이성질체 과량으로 존재한다. 특정 구현예에서, 부분 입체이성질체 과량은 70% 초과이다. 특정 구현예에서, 부분 입체이성질체 과량은 90% 초과이다. 특정 구현예에서, 부분 입체이성질체 과량은 95% 초과이다.

[0351] 용어 "부분 입체이성질체 과량(diastereomeric excess)"은 조성물 중 원하는 단일 입체이성질체의 몰 분율을 나머지 부분 입체이성질체의 몰 분율과 비교했을 때 이들 간의 차이를 지칭한다. 부분 입체이성질체 과량은 다음과 같이 계산된다: (단일 부분 입체이성질체의 양-다른 부분 입체이성질체의 양)/1. 예를 들어, 1을 90%로 함유하고 2, 3, 4 또는 이들의 혼합물을 10%로 함유하는 조성물은 80%[(90-10)/1]의 부분 입체이성질체 과량을 갖는다. 1을 95%로 함유하고 2, 3, 4 또는 이들의 혼합물을 5%로 함유하는 조성물은 90%[(95-5)/1]의 부분 입체이성질체 과량을 갖는다. 1을 99%로 함유하고 2, 3, 4 또는 이들의 혼합물을 1%로 함유하는 조성물은 98%[(99-1)/1]의 부분 입체이성질체 과량을 갖는다. 부분 입체이성질체 과량은 1, 2, 3, 또는 4 중 어느 하나에 대해 유사하게 계산될 수 있다.

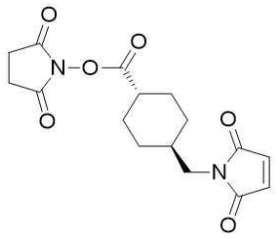
[0352] 일부 구현예에서, 화학식 A^1의 화합물은 실리카 겔 및 희석제가 존재하는 가운데 화학식 (a)의 화합물을:



[0353]

[0354] (a)

[0355] 화학식 (b)의 화합물과 접촉시켜 제조된다:



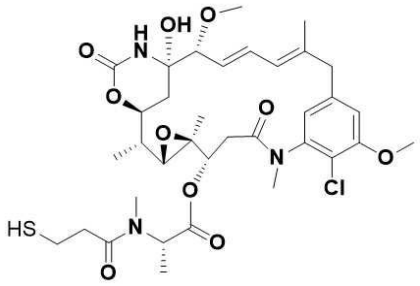
[0356]

[0357] (b).

[0358] 일부 구현예에서, 희석제는 유기 용매 및 물을 포함한다.

[0359] 또한, 다음 단계에 의해 제조된 생성물이 본원에 제공된다:

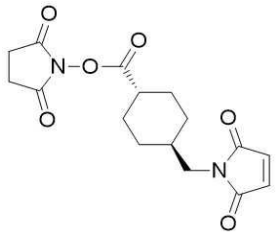
[0360] (i) 실리카 겔이 존재하는 가운데, 화학식 (a)의 화합물을:



[0361]

[0362] (a)

[0363] 화학식 (b)의 화합물:



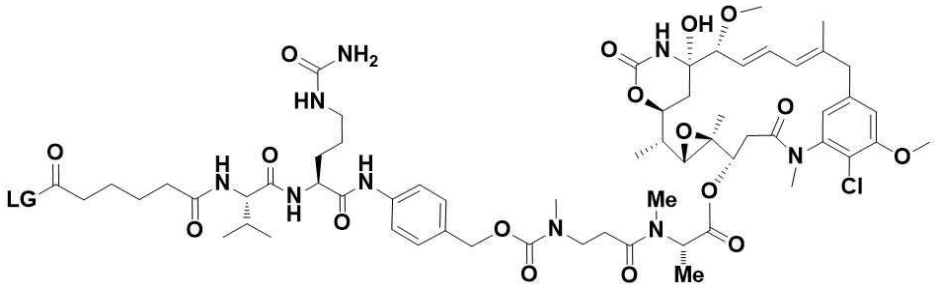
[0364]

[0365] (b)

[0366] 및 희석제와 접촉시켜 중간체를 합성하는 단계; 및

[0367] (ii) 본원에 기술된 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질을 상기 중간체 및 수성 희석제와 접촉시키는 단계.

[0368] 일부 구현예에서, 항체-약물 접합체를 제조하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 본원에 기술된 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 단백질을 다음의 화학식 B를 갖는 화합물:



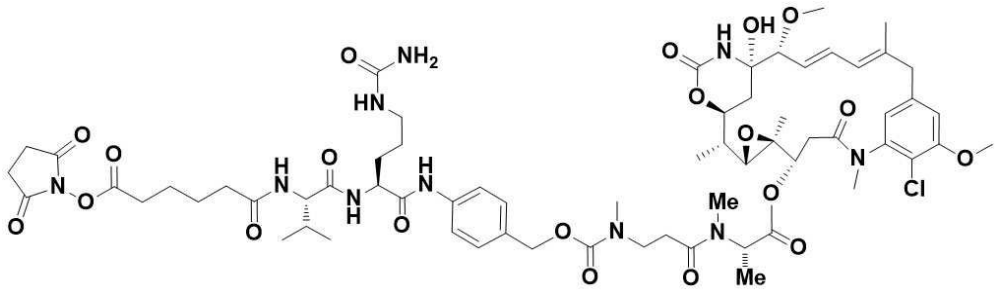
[0369]

[0370] B

[0371] (식 중 LG는 이탈기임), 및 수성 희석제와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0372] 일부 구현예에서, 화학식 B의 화합물은 화학량론적 과량으로 존재한다. 일부 구현예에서, 화학식 B의 화합물은 5~6배의 화학량론적 과량으로 존재한다. 일부 구현예에서, 수성 희석제는 HEPES를 포함한다. 일부 구현예에서, 수성 희석제는 DMA를 포함한다. 일부 구현예에서, -C(O)-LG는 에스테르, 예를 들어, NHS 또는 트리플루오로페닐 에스테르이다.

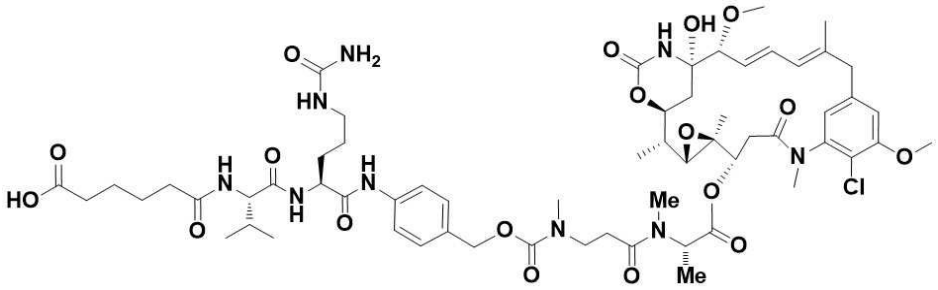
[0373] 일부 구현예에서, 화학식 B의 화합물은 화학식 B^1의 화합물이다:



[0374]

[0375] B^1.

[0376] 일부 구현예에서, 화학식 B^1의 화합물은 실리카 겔이 존재하는 가운데 화학식 C의 화합물을:

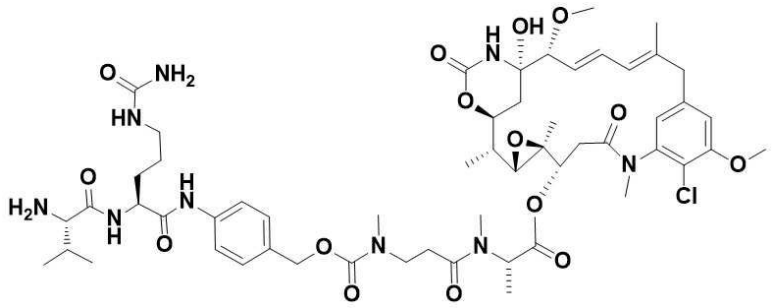


[0377]

[0378] C

[0379] N-하이드록시숙신이미드(NHS), 펩티드 결합 시약, 및 유기 희석제와 접촉시켜 제조된다. 적절한 펩티드 결합 시약은 친핵체와의 반응하도록 카르복시산 모이어티를 활성화시키는(즉, 반응성을 부여하는) 것들을 포함한다. 특정 구현예에서, 펩티드 결합 시약은 N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC)이다. 일부 구현예에서, 유기 용매는 디클로로메탄이다.

[0380] 일부 구현예에서, 화학식 C의 화합물은 화학식 D의 화합물을:



[0381]

[0382] D

[0383] 아디프산, 펩티드 결합제, 및 유기 용매와 접촉시켜 제조된다. 특정 구현예에서, 펩티드 결합제는 2-에톡시-1-에톡시카보닐-1,2-디하이드로퀴놀린(EEDQ)이다. 특정 구현예에서, 유기 용매는 디클로로메탄을 포함한다. 화합물 D는 WO2014/145090에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0384] **에피토프 맵핑 및 관련 기술**

[0385] 항체 및 항원 결합 도메인이 결합하는 에피토프는 MET 단백질의 3개 이상의 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의) 아미노산으로 이루어진 단일 연속 서열로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 연관 에피토프는 MET의 복수의 비연속 아미노산(또는 아미노산 서열)으로 이루어질 수 있다. 일부 구현예에서, 에피토프는 MET의 리간드-결합 도메인 상에 위치하거나 그 근처에 위치한다. 다른 구현예에서, 에피토프는 MET의 리간드-결합 도메인의 외부에, 예를 들어 항체가 이러한 에피토프에 결합할

때 MET에 대한 HGF 결합을 방해하지 않는 MET 표면 상의 위치에 위치한다.

[0386] 본원의 다른 곳에서 기술된 바와 같이, MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자의 개별 항원 결합 도메인(D1 및 D2)은 서로에 대해 구별되거나, 중첩되지 않거나, 부분적으로 중첩되는 에피토프에 결합할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "부분적으로 중첩되는 에피토프"는 당업계에 공지된 임의의 에피토프 맵핑 방법론(예: X-선 결정학, 알라닌-스캔 돌연변이 유발, 수소/중수소 교환[HDX], 도메인 스와핑 등)에 의해 결정했을 때 제1 및 제2 에피토프가 5 미만, 4 미만, 3 미만의 아미노산을 공유하거나, 하나의 공통 아미노산만을 공유한다는 것을 의미한다. D1 및 D2 도메인은 서로 비경쟁적일 수 있다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 특정 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자의 D1 도메인이 MET 상의 이의 에피토프에 결합하는 것은 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자의 D2 도메인이 MET 상의 이의 에피토프에 결합하는 것을 억제하지 않는다(또는 거의 억제하지 않는다). D1 및 D2 성분의 각각의 에피토프의 중첩되지 않는 (또는 최대한 부분적으로 중첩되는) 성질로 인해, MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자는 세포 표면 상의 단일 MET 분자에 결합할 수 있다.

[0387] 당업자에게 공지된 다양한 기술을 사용하여 본원에서 유용한 항체 및 항원 결합 도메인이 상호 작용하는 MET 상의 에피토프를 결정할 수 있다. 특정 항체 또는 항원 결합 도메인의 에피토프 또는 결합 도메인을 결정하는 데 사용될 수 있는 예시적인 기술은, 예를 들어, 점 돌연변이유발(예: 알라닌 스캐닝 돌연변이유발, 아르기닌 스캐닝 돌연변이유발 등), 펩티드 블롯 분석(Reineke의 문헌[2004, Methods Mol Biol 248:443-463] 참조), 프로테아제 보호, 및 펩티드 절단 분석을 포함한다. 또한, 에피토프 절제, 에피토프 추출 및 항원의 화학적 변형과 같은 방법이 사용될 수 있다(Tomer의 문헌[2000, Protein Science 9:487-496] 참조). 항체가 상호 작용하는 폴리펩티드 내의 아미노산을 식별하는데 사용될 수 있는 또 다른 방법은 질량 분석법에 의해 검출되는 수소/중수소 교환이다. 일반적으로 말하자면, 수소/중수소 교환 방법은 관심 단백질을 중수소-표지하는 단계, 이어서 항체를 중수소-표지된 단백질에 결합시키는 단계를 포함한다. 다음으로, 단백질/항체 복합체가 물로 옮겨져 (중수소 표지된 상태의) 항체에 의해 보호되는 잔기를 제외한 모든 잔기에서 수소-중수소 교환을 일어나게 한다. 항체 해리 후, 표적 단백질을 대상으로 프로테아제 절단 및 질량 분광 분석을 수행하여, 항체가 상호 작용하는 특정 아미노산에 상응하는 중수소-표지된 잔기를 밝혀낸다. 예를 들어, Ehring의 문헌[(1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259]; Engen 및 Smith의 문헌[(2001) *Anal. Chem. 73*:256A-265A]를 참조한다. X-선 결정 구조 분석을 사용하여 항체가 상호 작용하는 폴리펩티드 내의 아미노산을 식별할 수도 있다.

[0388] 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 본원에 기술된 특정 예시적인 항체 또는 항원 결합 도메인 중 어느 하나와 동일한 에피토프에 결합하는 항-MET 항체(이중특이적 항체 포함)(예를 들어, 본원의 표 1에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 항체)이다. 마찬가지로, MET에 결합하기 위해 본원에 기술된 특정 예시적인 항체 중 어느 하나(예를 들어, 본원의 표 1에 제시된 것과 같은 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 항체)와 경쟁하는 항-MET 항체가 또한 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 항-MET 항체가 결합하는 인간 MET 에피토프는 서열번호 155의 아미노산 192~204, 아미노산 305~315, 및/또는 아미노산 421~455를 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 MET의 제1 에피토프는 서열번호 155의 아미노산 192~204를 포함하고; 인간 MET의 제2 에피토프는 서열번호 155의 아미노산 305~315 및 421~455를 포함한다.

[0389] 당업자는, 당업계에 알려져 있고 본원에 예시된 일상적인 방법을 사용해 항체가 기준 항-MET 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지, 또는 결합을 위해 기준 항-MET 항체와 경쟁하는지 여부를 쉽게 결정할 수 있다. 예를 들어, 시험 항체가 본원에 제공된 기준 항-MET 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지 여부를 결정하기 위해, 기준 항체를 MET 단백질에 결합시킬 수 있다. 이어서, NET 분자에 결합하는 시험 항체의 능력을 평가한다. 기준 항-MET 항체와의 포화 결합 후에 시험 항체가 MET에 결합할 수 있다면, 시험 항체가 기준 항-MET 항체와 다른 에피토프에 결합하는 것으로 결론을 내릴 수 있다. 반면, 기준 항-MET 항체와의 포화 결합 후에 시험 항체가 MET에 결합할 수 없다면, 시험 항체는 기준 항-MET 항체가 결합된 에피토프와 동일한 에피토프에 결합할 수 있다. 그런 다음, 추가의 일상적인 실험(*예*, 펩티드 돌연변이 및 결합 분석)을 수행하여, 시험 항체의 관찰된 결합 결여가 실제로 기준 항체와 동일한 에피토프에 대한 결합으로 인한 것인지, 또는 입체적 차단(또는 다른 현상)이 관찰된 결합 결여의 원인인지 여부를 확인할 수 있다. 이러한 정렬 실험은 ELISA, RIA, Biacore, 유세포 계측법 또는 당업계에서 이용할 수 있는 임의의 다른 정량적 또는 정성적 항체 결합 분석법을 사용하여 수행될 수 있다. 특정 구현예에 따르면, 경쟁 결합 검정에서 측정했을 때, 예를 들어 하나의 1, 5, 10, 20 또는 100배 과량의 일 항체가 다른 하나의 결합을 적어도 50%, 바람직하게는 75%, 90% 또는 심지어 99%만큼 억제하는 경우, 2개의 항체는 동일한 (또는 중첩하는) 에피토프에 결합한다(예를 들어, Junghans 등의 문헌[Cancer Res. 1990:50:1495-1502] 참조). 대안적으로, 항원에서 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 본질적으로 모든 아미노산 돌연변이가 다른 하나의 결합을 감소시키거나 제거하는 경우, 2개의 항체는 동일한 에피토프에 결

합하는 것으로 간주된다. 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 아미노산 돌연변이의 서브세트만이 다른 하나의 결합을 감소시키거나 제거하는 경우, 2개의 항체는 "중첩하는 에피토프"를 갖는 것으로 간주된다.

[0390] 항체가 결합을 위해 기준 항-MET 항체와 경쟁하는지 (또는 결합을 위해 교차 경쟁하는지) 여부를 결정하기 위해, 전술한 결합 방법론은 다음의 2가지 배향에서 수행된다: 제1 배향에서, 포화 조건 하에서 기준 항체를 MET 단백질에 결합시키고, 이어서 MET 분자에 대한 시험 항체의 결합을 평가한다. 제2 배향에서, 포화 조건 하에서 시험 항체를 MET 분자에 결합시키고, 이어서 MET 분자에 대한 기준 항체의 결합을 평가한다. 2가지 배향 모두에서, 제1 (포화) 항체만이 MET 분자에 결합할 수 있다면, 시험 항체 및 기준 항체가 MET에 결합하기 위해 경쟁하는 것으로 결론을 내린다. 당업자가 이해할 수 있듯이, 결합을 위해 기준 항체와 경쟁하는 항체는 기준 항체와 동일한 에피토프에 결합할 필요는 없지만, 중첩 또는 인접한 에피토프에 결합함으로써 기준 항체의 결합을 입체적으로 차단할 수 있다.

[0391] **인간 항체의 제조**

[0392] 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항체는 완전한 인간 항체일 수 있다. 완전한 인간 단클론 항체를 포함하여 단클론 항체를 생성하는 방법이 당업계에 공지되어 있다. 이러한 임의의 공지된 방법을 본 개시의 맥락에서 사용하여 인간 MET에 특이적으로 결합하는 인간 항체를 제조할 수 있다.

[0393] 예를 들어, 완전한 인간 단클론 항체를 생성하기 위한 VELOCIMMUNE™ 기술 또는 임의의 다른 유사한 알려진 방법을 사용해 MET에 대한 고친화도 키메라 항체(인간 가변 영역과 마우스 불변 영역을 가짐)를 먼저 단리한다. 하기 실험 섹션에서와 같이, 친화도, 리간드 차단 활성, 선택도, 에피토프 등을 포함하는 바람직한 특성에 대해 항체의 특성을 분석하고 이에 대해 항체를 선택한다. 필요에 따라, 마우스 불변 영역을 원하는 인간 불변 영역(예를 들어 야생형 또는 변형된 IgG1 또는 IgG4)와 치환하여 완전한 인간 항-MET 항체를 생성한다. 선택된 불변 영역은 특이적 용도에 따라 매우 다양할 수 있지만, 고친화도 항원 결합 특성 및 표적 특이성 특성은 가변 영역에 존재한다. 특정한 경우에, 완전한 인간 항-MET 항체는 항원-양성 B 세포로부터 직접 단리된다.

[0394] **생물학적 동등물**

[0395] 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 항-MET 항체 및 항체 단편은 기술된 항체의 아미노산 서열과는 다르지만 인간 MET에 결합하는 능력을 보유하는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 포함한다. 이러한 변이체 항체 및 항체 단편은 부모 서열과 비교했을 때 아미노산의 하나 이상의 추가, 결실 또는 치환을 포함하지만, 기술된 항체와 본질적으로 동등한 생물학적 활성을 나타낸다. 마찬가지로, 본 개시의 항-MET 항체를 암호화하는 DNA 서열은 개시된 서열과 비교했을 때, 뉴클레오티드의 하나 이상의 추가, 결실, 또는 치환을 포함하되 본 개시의 항-MET 항체 또는 항체 단편과 본질적으로 생물학적으로 동등한 항-MET 항체 또는 항체 단편을 암호화하는 서열을 포함한다. 이러한 변이체 아미노산 및 DNA 서열의 예는 위에서 논의된다.

[0396] 2개의 항원 결합 단백질 또는 항체가, 예를 들어, 유사한 실험 조건 하에 동일한 몰 투여량(1회 투여량 또는 다회 투여량)으로 투여되었을 때, 흡수 속도 및 정도에 있어서 유의한 차이를 보이지 않는 약학적 등가물 또는 약학적 대안인 경우, 이들은 생물학적으로 동등한 것으로 간주된다. 일부 항체가 흡수 정도에 있어서는 동등하지만 흡수 속도가 다른 경우, 이들은 등가물 또는 약학적 대안으로서 간주될 것이고, 여전히 생물학적으로 동등한 것으로 간주될 수 있는데, 그 이유는, 흡수 속도에 있어서의 이러한 차이는 의도적이고 표지에 반영되어 있으며, *예를 들어*, 만성적으로 사용될 때 효과적인 신체 약물 농도를 달성하는 데 반드시 필요하지 않으며, 특정한 연구 의약품에 대해 의학적으로 유의하지 않은 것으로 간주되기 때문이다.

[0397] 일 구현예에서, 2개의 항원 결합 단백질이 안전성, 순도 및 효능에 있어서 임상적으로 의미 있는 차이가 없는 경우, 이들은 생물학적으로 동등하다.

[0398] 일 구현예에서, 환자가 기준 생성물을 사용하는 치료와 생물학적 생성물을 사용하는 치료 사이에서 1회 이상 전환할 수 있고, 이러한 전환이 없는 연속 요법과 비교했을 때 면역원성에 있어서의 임상적으로 유의한 변화를 포함하여 예상되는 이상 반응의 위험 증가 또는 효과의 감소가 없는 경우, 2개의 항원 결합 단백질은 생물학적으로 동등하다.

[0399] 일 구현예에서, 2개의 항원 결합 단백질 둘 모두가 사용 조건(들)에 대한 공통의 메커니즘 또는 공통의 작용 메커니즘(들)에 의해 이러한 메커니즘이 알려진 정도까지 작용하는 경우, 이들은 생물학적으로 동등하다.

[0400] 생물학적 동등성은 생체내 방법 및 시험관내 방법에 의해 입증될 수 있다. 생물학적 동등성의 척도는, 예를 들어: (a) 인간 또는 다른 포유동물을 대상으로 혈액, 혈장, 혈청, 또는 기타 생물학적 유체에서 항체 또는 이의

대사물의 농도를 시간의 함수로서 측정하는 생체내 시험; (b) 인간의 생체내 생체이용율 데이터와 상관되어 있고 이를 합리적으로 예측할 수 있게 하는 시험관내 시험; (c) 인간 또는 다른 포유동물을 대상으로 항체(또는 이의 표적)의 적절한 급성 약리학적 효과를 시간의 함수로서 측정하는 생체내 시험; 및 (d) 항체의 안전성, 효능, 또는 생체이용률이나 생물학적 동등성을 확립하는 잘 제어된 임상 시험을 포함한다.

[0401] 본원에 제공된 항-MET 항체의 생물학적으로 동등한 변이체는, 예를 들어, 잔기 또는 서열의 다양한 치환을 만들거나 생물학적 활성에 필요하지 않은 말단 또는 내부 잔기 또는 서열을 결실함으로써 작제할 수 있다. 예를 들어, 생물학적 활성에 필수적인 시스테인 잔기를 결실시키거나 다른 아미노산과 치환하여, 변성 시에 불필요하거나 부정확한 분자내 이황화 브리지가 형성되는 것을 방지할 수 있다. 다른 맥락에서, 생물학적으로 등등한 항체는 항체의 글리코실화 특성을 바꾸는 아미노산 변화, 예를 들어, 글리코실화를 제거하거나 없애는 돌연변이를 포함하는 항-MET 항체 변이체를 포함할 수 있다.

[0402] **종 선택도 및 종 교차 반응성**

[0403] 특정 구현예에 따르면 본 개시는, 인간 MET에 결합하지만 다른 종의 MET에는 결합하지 않으며, 포도막 흑색종, 안와 림프종, 망막아종, 및 수질상피종과 같은 안암을 치료하는 데 유용한 항-MET 항체(및 항-MET 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)를 제공한다. 본 개시는 또한, 인간 MET 및 하나 이상의 비인간 종의 MET에 결합하며, 포도막 흑색종, 안와 림프종, 망막아종, 및 수질상피종과 같은 안암을 치료하는 데 유용한 항-MET 항체(및 항-MET 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)를 제공한다. 예를 들어, 항-MET 항체 및 항원 결합 분자는 인간 MET에 결합할 수 있고, 경우에 따라 마우스, 랫트, 기니피그, 햄스터, 저빌 쥐, 돼지, 고양이, 개, 토끼, 염소, 양, 소, 말, 낙타, 시노몰구스, 마모셋, 붉은털 원숭이, 또는 침팬지 MET 중 하나 이상에 결합할 수 있다. 특정 예시적 구현예에 따르면, 인간 MET 및 시노몰구스 원숭이(예를 들어, 필리핀 원숭이(*Macaca fascicularis*)) MET에 특이적으로 결합하는 항-MET 항체가 제공된다. 다른 항-MET 항체 및 항원 결합 분자는 인간 MET에 결합하지만 시노몰구스 원숭이 MET에는 결합하지 않거나 약하게만 결합한다.

[0404] **다중특이적 항체**

[0405] 본원의 다른 곳에서 기술된 바와 같이, 본 개시에 따라 유용한 것은, 2개의 상이한 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항원 결합 분자이며, 여기서 제1 항원 결합 도메인(D1)은 MET 상의 제1 에피토프에 결합하고, 제2 항원 결합 도메인(D2)은 MET 상의 제2 에피토프에 결합한다. 특정 구현예에서, D1 및 D2 도메인이 결합하는 MET 상의 제1 및 제2 에피토프는 구별되거나, 중첩되지 않거나, 부분적으로 중첩된다. 이 양태에 따르면, D1 도메인은 본원의 표 1에 제시된 HCVR/LCVR 또는 CDR 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함할 수 있고, D2 도메인은 본원의 표 1에 제시된 HCVR/LCVR 또는 CDR 아미노산 서열 중 임의의 다른 서열을 포함할 수 있다(단, D1 도메인의 결합 특이성이 D2 도메인의 결합 특이성과 상이하고/하거나, D1이 수득된 항원 결합 단백질은 D2가 수득된 항원 결합 단백질과 MET에 대한 결합을 위해 경쟁하지 않음). 일부 구현예에서, 항-MET 항체가 결합하는 인간 MET 에피토프는 서열번호 155의 아미노산 192~204, 아미노산 305~315, 및/또는 아미노산 421~455를 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 MET의 제1 에피토프는 서열번호 155의 아미노산 192~204를 포함하고; 인간 MET의 제2 에피토프는 서열번호 155의 아미노산 305~315 및 421~455를 포함한다.

[0406] 별도의 양태에 따르면, 이중특이적 항체의 하나의 아암이 인간 MET 상의 에피토프에 결합하고 이중특이적 항체의 다른 아암은 MET 이외의 제2 항원에 결합하는 종래의 이중특이적 항체도 본원에서 유용한 것으로 제공된다. MET-결합 아암은 본원의 표 1에 제시된 것과 같은 HCVR/LCVR 또는 CDR 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, MET-결합 아암은 인간 MET에 결합하여 MET에 대한 HGF 결합을 차단한다. 다른 구현예에서, MET-결합 아암은 인간 MET에 결합하지만 MET에 대한 HGF 결합을 차단하지는 않는다.

[0407] 본 개시의 맥락에서 사용될 수 있는 예시적인 이중특이적 항체 포맷은 제1 면역글로불린(Ig) C_H3 도메인 및 제2 Ig C_H3 도메인을 사용하는 것을 포함하며, 여기서 제1 및 제2 Ig C_H3 도메인은 적어도 하나의 아미노산만큼 서로 상이하며, 적어도 하나의 아미노산 차이는 아미노산 차이가 없는 이중특이적 항체와 비교했을 때 단백질 A에 대한 이중특이적 항체의 결합을 감소시킨다. 일 실시예에서, 제1 Ig C_H3 도메인은 단백질 A에 결합하고, 제2 Ig C_H3 도메인은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R임)과 같이 단백질 A 결합을 감소시키거나 제거하는 돌연변이를 함유한다. 제2 C_H3은 Y96F 변형(IMGT 넘버링에 의함; EU 넘버링은 Y436F)을 추가로 포함할 수 있다. 제2 C_H3에서 발견할 수 있는 추가의 변형은 다음을 포함한다: IgG1 항체의 경우 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M 및 V82I(IMGT에 의함; EU에 의하면 D356E, L358M, N384S, K392N, V397M 및 V422I);

IgG2 항체의 경우 N44S, K52N 및 V82I(IMGT에 의함; EU에 의하면 N384S, K392N 및 V422I); 및 IgG4 항체의 경우 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q 및 V82I(IMGT에 의함; EU에 의하면 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V422I). 전술한 이중특이적 항체 포맷에 대한 변형은 본 개시의 범위에 포함되는 것으로 고려된다.

[0408] 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 다른 예시적인 이중특이적 포맷으로는, 예를 들어, scFv-계열 또는 디아바디 이중특이적 포맷, IgG-scFv 융합, 이중 가변 도메인(DVD)-Ig, 콰드로마, 놉-인투-홀(knobs-into-holes), 공통 경쇄(예컨대 놉-인투-홀을 가지는 공통 경쇄 등), CrossMab, CrossFab, (SEED)바디, 류신 지퍼, 듀오바디, IgG1/IgG2, 이중으로 작용하는 Fab (DAF)-IgG 및 Mab2 이중특이적 포맷을 포함하되 이들로 한정되지는 않는다(전술한 포맷을 검토하려면, 예를 들어 Klein 등의 문헌[2012, mAbs 4:6, 1-11] 및 동 문헌에 인용된 참고문헌을 참조한다). 이중특이적 항체는 펩티드/핵산 접합을 사용해 작제될 수도 있는데, *예를 들어*, 여기서 직교 화학 반응성을 갖는 비천연 아미노산은 부위특이적 항체-올리고뉴클레오티드 접합체를 생성하는 데 사용되고, 이는 정의된 조성, 원자가 및 기하학적 구조를 갖는 다량체 복합체로 자기 조립된다. (예를 들어, Kazane 등의 문헌[*J. Am. Chem. Soc.* [*Epub*: *Dec. 4, 2012*]] 참조).

[0409] **치료 제형 및 투여**

[0410] 본원에 기술된 방법에 따라 유용한 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 제공된다. 약학적 조성물은 적절한 담체, 부형제, 및 수송, 전달, 내성 등을 개선하는 기타 제제와 함께 제형화될 수 있다.

[0411] 일부 양태에서, 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자를 포함하는 약학적 조성물은 포도막 흑색종, 안와 림프종, 망막아종, 또는 수질상피종과 같은 안암을 치료하기 위해 눈에 투여할 수 있도록 제형화된다.

[0412] 약학적 제형 내에 함유된 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자를 환자에게 투여하는 방법이 본원에 제공된다. 약학적 제형은 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자를, 예를 들어 약학적으로 허용 가능한 담체와 같은 적어도 하나의 비활성 성분과 함께 포함할 수 있다. 수송, 전달, 내성 등을 개선하기 위한 다른 제제가 약학적 조성물에 혼입될 수 있다. "약학적으로 허용 가능한"이라는 용어는 동물, 보다 구체적으로는 인간을 대상으로한 사용이 연방 또는 주정부의 규제기관에 의해 승인되었거나, 미국 약전 또는 일반적으로 인정된 다른 약전에 열거되어 있음을 의미한다. 용어 "담체"는 항체와 함께 투여되는 희석제(diluent), 보조제(adjuvant), 부형제(excipient), 또는 비히클(vehicle)을 지칭한다. 다수의 적절한 제형은 모든 약사들에게 알려진 처방서[Blaug, Seymour의 Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1975), 특히 동 처방서 내의 Chapter 87]에서 확인할 수 있다. 이러한 제형은, 예를 들어, 분말, 고약(paste), 연고, 젤리, 왁스, 오일, 지질, 소포체가 포함된 (양이온성 또는 음이온성) 지질(예: LIPOFECTIN™), DNA 접합체, 무수 흡수 연고제, 수중유 및 유중수 유화제, 카보왁스 유화제(다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜), 반고형성 겔, 및 카보왁스를 함유하는 반고형성 혼합물을 포함한다. 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자가 제형에 의해 불활성화되지 않고 제형이 투여 경로와 생리학적으로 호환되고 견딜 수 있다면, 전술한 혼합물 중 어느 하나는 본 개시의 방법의 맥락에서 적절할 수 있다. 약사들에게 잘 알려진 부형제 및 담체와 관련된 추가 정보는 Powell 등의 문헌[PDA (1998) J Pharm Sci Technol. 52:238-311] 및 동 문헌 내의 인용 문헌을 또한 참조한다.

[0413] 본 개시의 맥락에서 주사에 의해 투여하는 데 유용한 약학적 제형은, 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자를 주사에 통상적으로 사용되는 멸균 수성 매질 또는 유성 매질에 용해, 현탁, 또는 유화시켜 제조할 수 있다. 주사용 수성 매질로서는, 예를 들어, 생리 식염수, 알코올(예를 들어, 에탄올)과 같은 적절한 가용화제와 조합하여 사용할 수 있고 글루코오스 및 기타 보조제 등을 함유하는 등장성 용액, 다가알코올(예: 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜), 비이온성 계면활성제[예를 들어, 폴리소르베이트 80, HCO-50(수소 첨가 피마자유의 폴리옥시에틸렌 (50 몰) 부가물)] 등이 있다. 유성 매질로서는, 예를 들어, 벤질 벤조에이트, 벤질 알코올 등과 같은 가용화제와 조합하여 사용할 수 있는 참기름, 대두유 등이 사용될 수 있다. 이렇게 제조된 주사제는 필요에 따라 적절한 앰플에 담을 수 있다.

[0414] **투여 방법**

[0415] 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자(또는 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자를 포함하는 약학적 제형)는 임의의 공지된 전달 시스템 및/또는 투여 방법에 의해 환자에게 투여될 수 있다.

특정 구현예에서, 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자는 안구, 안구내, 유리체내, 또는 결막하 주사에 의해 환자에게 투여된다. 다른 구현예에서, 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자는 국소 투여에 의해, 예를 들어, 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자를 함유하는 점안액 또는 다른 액체, 겔, 연고, 또는 유체를 통해 환자에게 투여될 수 있고, 눈에 직접 도포될 수 있다. 가능한 다른 투여 방법은, 예를 들어, 피내, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비강내, 경막외, 및 경구를 포함한다.

[0416] **병용 요법 및 제형**

[0417] 본원에 기술된 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자 중 어느 하나를 하나 이상의 추가적인 치료 활성 성분과 조합으로 포함하는 조성물 및 치료 제형, 및 이러한 조합물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법이 본원에 제공된다.

[0418] 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자는 MET 길항제(예: 항-MET 항체[예를 들어, 오나투주맙, 에미베투주맙, 텔리소투주맙, SAIT301, ARGX-111, Sym015, HuMax-cMet, CE-355621, 및 H4H14639D] 또는 MET의 저분자 억제제), EGFR 길항제(예: 항-EGFR 항체[예를 들어, 세툭시맙 또는 파니투무맙] 또는 EGFR의 저분자 억제제[예를 들어, 게피티닙 또는 에를로티닙]), Her2/ErbB2, ErbB3, 또는 ErbB4와 같은 또 다른 EGFR 계열 구성원의 길항제(예: 항-ErbB2 [예를 들어, 트라스투주맙 또는 T-DM1 {KADCYLA®}], 항-ErbB3, 또는 항-ErbB4 항체 또는 ErbB2, ErbB3, 또는 ErbB4 활성의 저분자 억제제), EGFRvIII의 길항제(예: 항-EGFRvIII 항체), IGF1R 길항제(예: 항-IGF1R 항체), B-raf 억제제(예: 베무라페닙, 소라페닙, GDC-0879, PLX-4720), PDGFR-α 억제제(예: 항-PDGFR-α 항체), PDGFR-β 억제제(예: 항-PDGFR-β 항체, 또는 예를 들어, 이미티닙 메실레이트 또는 수니티닙 말레이트와 같은 저분자 키나아제 억제제), PDGF 리간드 억제제(예: 항-PDGF-A, -B, -C, 또는 -D 항체, 앱타머, siRNA, 등), VEGF 길항제(예: 아플리버셉트와 같은 VEGF-Trap; 미국 특허 제7,087,411호 참조("VEGF-억제성 융합 단백질"로도 본원에서 지칭됨), 항-VEGF 항체(예: 베바시주맙), VEGF 수용체의 저분자 키나아제 억제제(예: 수니티닙, 소라페닙, 또는 파조파닙)), DLL4 길항제(예: 미국 특허 공개 제2009/0142354호에 개시된 REGN421과 같은 항-DLL4 항체), Ang2 길항제(예: 미국 특허 공개 제2011/0027286호에 개시된 H1H685P와 같은 항-Ang2 항체), FOLH1 길항제(예: 항-FOLH1 항체), STEAP1 또는 STEAP2 길항제(예: 항-STEAP1 항체 또는 항-STEAP2 항체), TMPRSS2 길항제(예: 항-TMPRSS2 항체), MSLN 길항제(예: 항-MSLN 항체), CA9 길항제(예: 항-CA9 항체), 유로플라킨(uroplakin) 길항제(예: 항-유로플라킨[예를 들어, 항-UPK3A] 항체), MUC16 길항제(예: 항-MUC16 항체), Tn 항원 길항제(예: 항-Tn 항체), CLEC12A 길항제(예: 항-CLEC12A 항체), TNFRSF17 길항제(예: 항-TNFRSF17 항체), LGR5 길항제(예: 항-LGR5 항체), 1가 CD20 길항제(예: 리툭시맙과 같은 1가 항-CD20 항체), CD20 x CD3 이중특이적 항체, PD-1 차단제(예: 펨브롤리주맙 또는 니볼루맙과 가타은 항-PD-1 항체), 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 추가 치료 활성 성분(들)과 공동으로 제형화되고/되거나 이들과 병용 투여될 수 있다 본원에 제공된 항체와 유익하게 병용 투여할 수 있는 다른 제제는, 예를 들어, 타목시펜, 아로마타제 억제제, 및 사이토카인 억제제를 포함하며, 사이토카인 억제제에는 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18과 같이 사이토카인에 결합하거나 이들 각각의 수용체에 결합하는 저분자 사이토카인 억제제 및 항체가 포함된다.

[0419] 예시적으로, 항-PD-1 항체와 같은 PD-1 억제제는 본원에 기술된 바와 같은 항-Met 항체-약물 접합체와 조합될 수 있다. 표적 환자 모집단은 c-Met-발현 포도막 흑색종 또는 c-Met-발현 비소세포 폐암 환자와 같이, c-Met 돌연변이를 과발현하는 종양을 가진 환자를 구체적으로 포함한다.

[0420] 본원에 기술된 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자 중 어느 하나를 하나 이상의 화학요법제와 조합하여 포함하는 조성물 및 치료 제형이 본원에 제공된다. 화학요법제의 예는: 티오테파(thiotepa) 및 시클로포스파미드(cyclosphosphamide)(Cytoxan™)와 같은 알킬화제; 부설판(busulfan), 임프로설판(improsulfan), 및 피포설판(piposulfan)과 같은 알킬 설폰네이트; 벤조도파(benzodopa), 카보쿠온(carboquone), 메투레도파(meturedopa), 및 우레도파(uredopa)와 같은 아지리딘(aziridines); 알트레타민(altretamine), 트리에틸렌멜라민(triethylenemelamine), 트리에틸렌포스포라미드(trietylenephosphoramide), 트리에틸렌티오포스포라미드(triethylenethiophosphaoramide), 및 트리메틸롤멜라민(trimethylolomelamine)을 포함하는 에틸렌이민(ethylenimines) 및 메틸라멜라민(methylamelamines); 클로람부실(chlorambucil), 클로르나파진(chlornaphazine), 클로로포스파미드(cholophosphamide), 에스트라머스틴(estramustine), 이포스파미드(ifosfamide), 메클로르에타민(mechlorethamine), 메클로르에타민 옥사이드 하이드로클로라이드(mechlorethamine oxide hydrochloride), 멜팔란(melphalan), 노벰비친(novembichin), 펜에스테린(phenesterine), 프레드시머스틴(prednimustine), 트로포스파미드(trofosfamide), 우라실 머스타드(uracil mustard)와 같은 질소 머스타드(nitrogen mustards); 카머스틴(carmustine), 클로로조토신(chlorozotocin), 포

테머스틴(fotemustine), 로머스틴(lomustine), 니머스틴(nimustine), 라니머스틴(ranimustine)와 같은 니트로소우레아(nitrosureas); 아클리시노마이신(aclacinomysins), 액티노마이신(actinomycin), 안트라마이신(authramycin), 아자세린(azaserine), 블레오마이신(bleomycins), 칵티노마이신(cactinomycin), 칼리키마이신(calicheamicin), 카라비신(carabicin), 카미노마이신(carminomycin), 카지노필린(carzinophilin), 크로노마이신(chromomycins), 닥티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 데토루비신(detorubicin), 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 에소루비신(esorubicin), 이다루비신(idarubicin), 마셀로마이신(marcellomycin), 미토마이신(mitomycins), 마이코페놀산(mycophenolic acid), 노갈라마이신(nogalamycin), 올리보마이신(olivomycins), 페플로마이신(peplomycin), 포트피로마이신(potfiromycin), 퓨로마이신(puromycin), ?quot;라마이신(quelamycin), 로도루비신(rodorubicin), 스트렙토니그린(streptonigrin), 스트렙토조신(streptozocin), 투베르시딘(tubercidin), 우베니멕스(ubenimex), 지노스타틴(zinostatin), 조루비신(zorubicin)과 같은 항생제; 메토트렉세이트(methotrexate) 및 5-플루오로우라실(5-FU)과 같은 항대사물질(anti-metabolites); 데노프테린(denopterin), 메토트렉세이트, 프테로프테린(pteropterin), 트리메트렉세이트(trimetrexate)와 같은 엽산 유사체; 플루다라빈(fludarabine), 6-메캅토퓨린(mercaptopurine), 티아미프린(thiamiprine), 티오구아닌(thioguanine)과 같은 퓨린 유사체; 안시타빈(ancitabine), 아자시티딘(azacitidine), 6-아자우리딘(azauridine), 카모푸르(carmofur), 시타라빈(cytarabine), 디데옥시우리딘(dideoxyuridine), 독시플루리딘(doxifluridine), 에노시타빈(enocitabine), 플록스우리딘(floxuridine)과 같은 피리미딘 유사체; 칼루스테론(calusterone), 드로모스타놀론 프로피오네이트(dromostanolone propionate), 에피티오스타놀(epitiostanol), 메피티오스탄(mepitiostane), 테스토락톤(testolactone)과 같은 안드로겐(androgen); anti-adrenals such as 아미노글루테티미드(aminoglutethimide), 미토탄(mitotane), 트릴로스탄(trilostane)과 같은 항부신제; 프롤린산(frolinic acid)과 같은 엽산 보충제; 아세글라톤(aceglatone); 알도포스파미드 글리코시드(aldophosphamide glycoside); 아미노레불린산(aminolevulinic acid); 암사크린(amsacrine); 베스트라부실(bestrabucil); 비산트렌(bisantrene); 에다트렉세이트(edatraxate); 데포파민(defofamine); 데메콜신(demecolcine); 디자이쿠온(diaziquone); 에플로르니틴(elfornithine); 엘립티늄 아세테이트(elliptinium acetate); 에토글루시드(etoglucid); 질산갈륨(gallium nitrate); 하이드록시우레아(hydroxyurea); 렌티난(lentinan); 로니다민(lonidamine); 미토구아존(mitoguazone); 미톡산트론(mitoxantrone); 모피다몰(mopidamol); 니트라크린(nitracrine); 펜토스타틴(pentostatin); 페나메트(phenamet); 피라루비신(pirarubicin); 포도필린산(podophyllinic acid); 2-에틸하이드라지드; 프로카바진(procarbazine); PSK™; 라족산(razoxane); 시조피란(sizofiran); 스피로게르마늄(spirogermanium); 테누아존산(tenuazonic acid); 트리아지쿠온(triaziquone); 2,2',2''-트리클로로트리에틸아민; 우레탄(urethan); 빈데신(vindesine); 다카바진(dacarbazine); 만노머스틴(mannomustine); 미토브로니톨(mitobronitol); 미토락톨(mitolactol); 피포브로만(pipobroman); 가시토신(gacytosine); 아라비노시드(arabinoside)("Ara-C"); 시클로포스파미드(cyclophosphamide); 티오테파(thiotepa); 파클리탁셀(paclitaxel)(Taxol™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 및 도세탁셀(Taxotere™; Aventis Antony, France)과 같은 탁산(taxanes); 클로람부실(chlorambucil); 젬시타빈(gemcitabine); 6-티오구아닌; 머캅토퓨린(mercaptopurine); 메토트렉세이트; 시스플라틴(cisplatin) 및 카보플라틴(carboplatin)과 같은 백금 유사체; 빈블라스틴(vinblastine); 백금(platinum); 에토포시드(etoposide)(VP-16); 이포스파미드(ifosfamide); 미토마이신 C; 미톡산트론(mitoxantrone); 빈크리스틴(vincristine); 비노렐빈(vinorelbine); 나벨빈(navelbine); 노반트론(novantrone); 테니포시드(teniposide); 다우노마이신(daunomycin); 아미노프테린(aminopterin); 젤로다(xeloda); 이반드로네이트(ibandronate); CPT-11; 토포이소머라아제 억제제(topoisomerase inhibitor) RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(difluoromethylornithine, DMFO); 레티노산(retinoic acid); 에스페라마이신(esperamicins); 카페시타빈(capecitabine); 및 전술한 것 중 어느 하나의 약학적으로 허용 가능한 염, 산, 또는 유도체를 포함한다. 또한, 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하도록 작용하는 항-호르몬제, 예컨대, 예를 들어, 타목시펜(tamoxifen), 랄록시펜(raloxifene), 아로마타아제 억제 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜(trioxifene), 케옥시펜(keoxifene), LY 117018, 오나프리스톤(onapristone), 및 토레미펜(toremifene)(Fareston)을 포함하는 항-에스트로겐제; 및 플루타미드(flutamide), 닐루타미드(nilutamide), 비칼루타미드(bicalutamide), 류프롤리드(leuprolide), 및 고세렐린(goserelin)과 같은 항-안드로겐제; 및 전술한 것 중 어느 하나의 약학적으로 허용 가능한 염, 산, 또는 유도체가 본 정의에 포함된다.

[0421] 항-MET 항체 및 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자는 항바이러스제, 항생제, 진통제, 코르티코스테로이드, 스테로이드, 산소, 항산화제, COX 억제제, 심장 보호제, 금속 킬레이트제, IFN-감마, 및/또는 NSAID와 조합하여

투여되고/되거나 공동 제형화될 수도 있다.

[0422] 추가적인 치료적 활성 성분(들), 예를 들어, 위에 열거된 제제 중 어느 하나 또는 이의 변이체는 본 발명의 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자의 투여 직전에, 동시에, 또는 직후에 투여될 수 있다(본 개시의 목적을 위해, 이러한 투여 처방은 항체가 추가적인 치료적 활성 성분과 "병용(in combination with)" 투여되는 것으로 간주된다). 본 개시는, 항-MET 항체 또는 MET x MET 항원 결합 분자가 본 개시의 다른 곳에 기술된 것과 같은 추가적인 치료적 활성 성분(들) 중 하나 이상과 공동으로 제형화되는 약학적 조성물을 포함한다.

[0423] **투여 처방**

[0424] 특정 구현예에 따르면, 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자(또는 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자 및 본원에서 언급된 추가적인 치료적 활성제 중 어느 하나의 조합을 포함하는 약학적 조성물)의 다회 투여량이 정의된 시간 과정에 걸쳐 대상체에게 투여될 수 있다. 본 양태에 따른 방법은 본원에 제공된 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자의 다회 투여량을 대상체에게 순차적으로 투여하는 단계를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "순차적 투여"는 항체의 각 투여량이 상이한 시점에, 예를 들어, 소정의 간격(예: 시간, 일, 주, 또는 월)으로 이격된 상이한 날에 대상체에게 투여됨을 의미한다. 본 개시는, 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자의 1회 최초 투여량, 이어서 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자의 1회 이상의 2차 투여량, 및 이어서 임의로 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자의 1회 이상의 3차 투여량을 순차적으로 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다.

[0425] 용어 "최초 투여량", "2차 투여량" 및 "3차 투여량"은 본 발명의 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자의 시간적 투여 순서를 지칭한다. 따라서, "최초 투여량"은 치료 처방의 시작 시 투여되는 투여량("베이스라인 투여량"으로도 지칭됨)이고; "2차 투여량"은 최초 투여향 이후에 투여되는 투여량이고; "3차 투여량"은 2차 투여향 이후에 투여되는 투여량이다. 최초 투여량, 2차 투여량, 및 3차 투여량은 모두 동일한 양의 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자를 함유할 수 있지만, 투여 빈도에 있어서는 일반적으로 서로 다를 수 있다. 그러나, 특정 구현예에서, 최초 투여량, 2차 투여량, 및/또는 3차 투여량에 함유된 항체의 양은 치료 과정 동안 서로 다를 수 있다(예를 들어, 적절하게 상향 또는 하향 조절될 수 있다). 특정 구현예에서, 2회 이상의 (예: 2, 3, 4, 또는 5회) 투여량이 치료 처방 시작 시 "로딩 투여량"으로서 투여되고, 적은 빈도 기준으로 투여되는 후속 투여량(예: "유지 투여량")이 이어진다.

[0426] **항체의 진단적 사용**

[0427] 본 개시의 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자는 샘플에서 MET, 또는 MET-발현 세포를 검출하고/하거나 측정하기 위해, 예를 들어, 진단 목적으로 사용될 수도 있다. 예를 들어, 항-MET 항체 또는 이의 단편은 MET의 비정상 발현(예: 과다 발현, 과소 부족, 발현 결여 등)을 특징으로 하는 병태 또는 질환을 진단하는 데 사용될 수 있다. MET에 대한 예시적인 진단적 검정은, 예를 들어, 환자로부터 수득된 샘플을 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 항체는 검출 가능한 표지 또는 리포터 분자로 표지된다. 대안적으로, 표지되지 않은 항-MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항원 결합 분자가 검출 가능하게 자체적으로 표지된 보조 항체와 함께 진단 용도에 사용될 수 있다. 검출 가능한 표지 또는 리포터 분자는 ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, 또는 ^{125}I와 같은 방사성 동위원소; 플루오레세인 또는 로다민과 같은 형광 모이어티 또는 화학발광 모이어티; 또는 알칼라인 포스파타아제, 베타-갈락토시다아제, 서양 고추냉이 퍼옥시다아제, 또는 루시페라아제와 같은 효소일 수 있다. 샘플에서 MET를 검출하거나 측정하는 데 사용할 수 있는 특정 예시적인 검정은 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 방사성 면역검정(RIA), 면역-PET(예: ^{89}Zr, ^{64}Cu 등), 및 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 포함한다.

[0428] 본 개시에 따른 MET 진단 검정에 사용할 수 있는 샘플은 대상체로부터 수득 가능한 임의의 조직 또는 유체 샘플, 특히 눈 또는 안구 공동에서 발견되는 조직 또는 유체를 포함한다. 일반적으로, 건강한 대상체(예: 비정상적인 MET 수준 또는 활성과 관련이 있는 질환 또는 병태를 앓지 않는 환자)로부터 수득한 특정 샘플에서 MET의 수준을 측정하여 MET의 베이스라인 수준 또는 표준 수준을 먼저 확립하게 된다. 그런 다음, MET의 이러한 베이스라인 수준을 MET 관련 질환이나 병태를 가진 것으로 의심되는 개체로부터 수득된 샘플에서 측정한 MET의 수준과 비교할 수 있다.

[0429] **실시예**

[0430] 다음 실시예들은 당업자에게 본원에 제공된 조성물을 제조하고 이를 사용하는 방법을 완전하게 개시하고 설명하기 위해 제시된 것으로서, 본 발명자들이 발명으로 간주하는 것의 범주를 제한하고자 하는 것이 아니다. 사용된 숫자(예를 들어, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위한 노력을 기울였으나 약간의 실험 오차와 편차에 대해서는 설명되어야 한다. 달리 표시되지 않는 한, 부(parts)는 중량 부(parts by weight)이고, 분자량은 평균 분자량이며, 온도는 섭씨 온도이고, 압력은 대기압이거나 거의 대기압이다.

[0431] **실시예 1. 항-MET 항체의 생성**

[0432] 인간 면역글로불린 중쇄 및 카파 경쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA를 포함하는 유전자 조작된 마우스를 인간 Fc(R&D Systems, Catalog # 358-MT, Minneapolis, MN)에 융합된 재조합 인간 MET 세포외 도메인을 포함하는 면역원으로 면역화하여 항-MET 항체를 수득하였다. 면역화에 사용된 마우스는 "범용 경쇄"를 발현한다. 즉, 이러한 마우스에서 생산된 항체는 상이한 중쇄 가변 영역을 갖지만 본질적으로 동일한 경쇄 가변 도메인을 갖는다.

[0433] 항체 면역 반응은 MET 특이적 면역 검정으로 모니터링하였다. 원하는 면역 반응이 달성되면 비장 세포를 채취하고, 마우스 골수종 세포와 융합시켜 이들의 생존력을 보존하고 불멸 하이브리도마 세포주를 형성하였다. 하이브리도마 세포주를 스크리닝하고 선별하여 MET-특이적 항체를 생산하는 세포주를 동정하였다. 이러한 기술을 사용하여, 여러가지 항-MET 키메라 항체(즉, 인간 가변 도메인 및 설치류 불변 도메인을 갖는 항체)를 수득하였다. 추가로, 미국 특허 공개 제2007/0280945A1호에 기술된 바와 같이, 여러 개의 완전한 인간 항-MET 항체를 골수종 세포와 융합시키지 않고 항원-양성 B 세포로부터 직접 단리하였다.

[0434] 본 실시예의 방법에 따라 생성된 예시적인 항-MET 항체 및 이로부터 작제한 이중특이적 항체의 특정 생물학적 특성은 아래에 제시된 실시예에서 상세히 기술된다.

[0435] **실시예 2. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 및 핵산 서열**

[0436] 표 1은 본원에 기술된 선택된 항-MET 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 및 CDR의 아미노산 서열 식별자를 제시한다. (전술한 바와 같이, 실시예 1에서 생성된 모든 항체는 동일한 경쇄 가변 영역을 가지므로, 동일한 경쇄 CDR 서열도 갖는다). 상응하는 핵산 서열 식별자들은 표 2에 제시되어 있다.

표 1

[0437]

아미노산 서열 식별자								
	서열번호							
항체 명칭	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H13290P2	2	4	6	8	138	140	142	144
H4H13291P2	10	12	14	16	138	140	142	144
H4H13295P2	18	20	22	24	138	140	142	144
H4H13299P2	26	28	30	32	138	140	142	144
H4H13300P2	34	36	38	40	138	140	142	144
H4H13301P2	42	44	46	48	138	140	142	144
H4H13302P2	50	52	54	56	138	140	142	144
H4H13306P2	58	60	62	64	138	140	142	144
H4H13309P2	66	68	70	72	138	140	142	144
H4H13311P2	74	76	78	80	138	140	142	144
H4H13312P2	82	84	86	88	138	140	142	144
H4H13313P2	90	92	94	96	138	140	142	144
H4H13316P2	98	100	102	104	138	140	142	144
H4H13318P2	106	108	110	112	138	140	142	144
H4H13319P2	114	116	118	120	138	140	142	144
H4H13325P2	122	124	126	128	138	140	142	144
H4H13331P2	130	132	134	136	138	140	142	144

표 2

[0438]

핵산 서열 식별자								
	서열번호							
항체 명칭	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3

H4H13290P2	1	3	5	7	137	139	141	143
H4H13291P2	9	11	13	15	137	139	141	143
H4H13295P2	17	19	21	23	137	139	141	143
H4H13299P2	25	27	29	31	137	139	141	143
H4H13300P2	33	35	37	39	137	139	141	143
H4H13301P2	41	43	45	47	137	139	141	143
H4H13302P2	49	51	53	55	137	139	141	143
H4H13306P2	57	59	61	63	137	139	141	143
H4H13309P2	65	67	69	71	137	139	141	143
H4H13311P2	73	75	77	79	137	139	141	143
H4H13312P2	81	83	85	87	137	139	141	143
H4H13313P2	89	91	93	95	137	139	141	143
H4H13316P2	97	99	101	103	137	139	141	143
H4H13318P2	105	107	109	111	137	139	141	143
H4H13319P2	113	115	117	119	137	139	141	143
H4H13325P2	121	123	125	127	137	139	141	143
H4H13331P2	129	131	133	135	137	139	141	143

[0439] 표 1 및 표 2에 표시된 바와 같이 항체는 일반적으로 다음의 명명법에 따라 본원에서 지칭된다: Fc 접두어(예: "H4H")에 수치 식별자(예: "13290", "13291", "13295" 등)이 이어지고, 접미어 "P2"가 이어짐. 따라서, 이러한 명명법에 따라 항체는 본원에서, 예를 들어, "H4H13290P2", "H4H13291P2", "H4H13295P2" 등으로 지칭될 수 있다. 본원에서 사용된 항체 명칭에 대한 접두어는 항체의 특정 Fc 영역 이소형을 나타낸다. 특히, "H4H" 항체는 인간 IgG4 Fc를 갖는다(모든 가변 영역은 항체 명칭이 'H'로 시작하는 것과 같이 완전한 인간이다). 당업자가 이해할 수 있듯이, 특정 Fc 이소형을 갖는 항체는 다른 Fc 이소형을 갖는 항체로 변환될 수 있지만(예를 들어, 마우스 IgG4 Fc를 갖는 항체는 인간 IgG1 등을 갖는 항체로 변환될 수 있지만), 어떤 경우에도, 표 1 및 표 2에 나타낸 수치 식별자에 의해 표시되는 가변 도메인(CDR 포함)은 동일하게 유지될 것이고, 결합 특성은 Fc 도메인의 성질에 상관 없이 동일하거나 실질적으로 유사할 것으로 예상된다.

[0440] **실시예 3. 표면 플라스몬 공명으로 유도한 인간 단클론 항-MET (단일특이적) 항체의 결합 친화도 및 동역학 상수**

[0441] 인간 항-MET 항체의 결합 친화도 및 동역학 상수는 37℃에서 표면 플라스몬 공명(Biacore 4000 또는 T-200)에 의해 결정하였다. 본 실시예에서 시험된 항-Met 항체는 MET의 2가 단일특이적 결합제였다. 인간 IgG4("H4H"로 지칭됨)로서 표현된 항체를 단클론 마우스 항-인간 Fc 항체(GE, BR-1008-39)와의 아민 결합을 통해 유도체화된 CM4 또는 CM5 Biacore 센서 표면 상에 포획하였다. 다양한 농도의 가용성 단량체(인간 (h) Met.mmh; 서열번호 152; 필리핀 원숭이(*macaca fascicularis*)(mf) Met.mmh; 서열번호 154) 또는 이량체(hMet.mFc; 서열번호 153) Met 단백질을 30 또는 50 μL/분의 유속으로 항-MET-항체 포획 표면에 주입하였다. 포획된 단클론 항체에 대한 hMET.mmh 또는 hMET.mFc의 결합을 4분 또는 5분 동안 모니터링하고, HBS-ET(0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% v/v 계면활성제 P20) 또는 PBS-P(0.01M 인산나트륨 pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.05% v/v 계면활성제 P20) 영동 완충액 중에서 hMET.mmh 또는 hMET.mFc의 해리를 10분 동안 모니터링하였다.

[0442] 동역학 결합 속도 상수(k_a) 및 해리 속도 상수(k_d)는 Scrubber 2.0c 곡선 피팅 소프트웨어를 사용해 실시간 센서그램을 1:1 결합 모델에 피팅하여 결정하였다. 결합 해리 평형 상수(K_D) 및 해리 반감기(t½)를 동적 속도 상수로부터 다음과 같이 계산하였다:

[0443] $$K_D\,(\mathrm{M}) = \frac{kd}{ka}, \text{ 및 } t_{\frac{1}{2}}\,(\text{분}) = \frac{\ln(2)}{60 * kd}$$

[0444] 단량체 및 이량체 Met 단백질에 대한 단일특이적 항-Met 항체의 결합 동역학 파라미터는 아래 표 3에 나타나 있다.

표 3

[0445]

37℃에서 단일특이적 항-MET mAb의 Biacore 결합 친화도	
37℃에서의 결합 / 항체-캡처 포맷	

항체	분석물질	ka (Ms^{-1})	kd (s^{-1})	K_D (몰)	T½ (분)
H4H13290P2	hMet.mmh	2.53E+05	8.03E-04	3.17E-09	14.4
	hMET.mFc	6.15E+05	3.15E-04	5.13E-10	36.6
	mfMet.mmh	1.23E+05	6.33E-04	5.16E-09	18.2
H4H13291P2	hMet.mmh	2.55E+04	2.38E-03	9.34E-08	4.8
	hMET.mFc	3.33E+05	3.39E-04	1.02E-09	34
	mfMet.mmh	3.70E+04	1.39E-03	3.76E-08	8.3
H4H13295P2	hMet.mmh	1.67E+04	5.40E-04	3.24E-08	21.4
	hMET.mFc	2.28E+05	2.64E-04	1.16E-09	43.8
	mfMet.mmh	1.65E+04	9.79E-04	5.93E-08	11.8
H4H13299P2	hMet.mmh	9.10E+04	7.80E-04	8.57E-09	14.8
	hMET.mFc	3.57E+05	3.14E-04	8.78E-10	36.8
	mfMet.mmh	1.13E+05	8.84E-04	7.86E-09	13.1
H4H13300P2	hMet.mmh	3.35E+04	2.43E-03	7.25E-08	4.8
	hMET.mFc	2.65E+05	2.95E-04	1.12E-09	39.1
	mfMet.mmh	5.13E+04	1.94E-03	3.77E-08	6.0
H4H13301P2	hMet.mmh	7.57E+04	6.22E-03	8.22E-08	1.9
	hMET.mFc	7.05E+05	1.14E-03	1.62E-09	10.1
	mfMet.mmh	6.85E+04	5.30E-03	7.74E-08	2.2
H4H13302P2	hMet.mmh	5.24E+04	2.46E-03	4.70E-08	4.7
	hMET.mFc	2.51E+05	5.84E-04	2.33E-09	19.8
	mfMet.mmh	3.56E+04	2.92E-03	8.20E-08	4.0
H4H13306P2	hMet.mmh	1.52E+05	1.66E-02	1.09E-07	0.7
	hMET.mFc	1.21E+06	2.60E-03	2.15E-09	4.4
	mfMet.mmh	1.21E+06	3.11E-02	2.58E-08	0.4
H4H13309P2	hMet.mmh	9.20E+04	5.87E-04	6.38E-09	19.7
	hMET.mFc	4.06E+05	2.67E-04	6.57E-10	43.3
	mfMet.mmh	1.23E+05	6.33E-04	5.16E-09	18.2
H4H13311P2	hMet.mmh	4.48E+04	5.19E-03	1.16E-07	2.2
	hMET.mFc	3.02E+05	4.68E-04	1.55E-09	24.7
	mfMet.mmh	7.61E+04	6.04E-03	7.94E-08	1.9
H4H13312P2	hMet.mmh	7.19E+04	1.63E-02	2.27E-07	0.7
	hMET.mFc	6.14E+05	1.71E-03	2.79E-09	6.7
	mfMet.mmh	1.47E+05	7.72E-03	5.24E-08	1.5
H4H13313P2	hMet.mmh	8.78E+04	5.70E-03	6.49E-08	2
	hMET.mFc	7.50E+05	8.93E-04	1.19E-09	12.9
	mfMet.mmh	5.10E+04	4.08E-03	8.00E-08	2.8
H4H13316P2	hMet.mmh	7.82E+04	1.51E-03	1.93E-08	7.6
	hMET.mFc	2.93E+05	1.08E-04	3.67E-10	107.4
	mfMet.mmh	NB	NB	NB	NB
H4H13318P2	hMet.mmh	3.30E+04	2.92E-03	8.83E-08	4
	hMET.mFc	3.52E+05	1.65E-04	4.67E-10	70.2
	mfMet.mmh	NB	NB	NB	NB
H4H13319P2	hMet.mmh	3.11E+04	2.38E-03	7.65E-08	4.9
	hMET.mFc	3.82E+05	5.42E-04	1.42E-09	21.3
	mfMet.mmh	2.66E+04	1.15E-03	4.33E-08	10.0
H4H13325P2	hMet.mmh	9.53E+04	2.36E-03	2.48E-08	4.9
	hMET.mFc	3.06E+05	1.85E-04	6.05E-10	62.4
	mfMet.mmh	NB	NB	NB	NB
H4H13331P2	hMet.mmh	2.61E+05	8.73E-04	3.35E-09	13.2
	hMET.mFc	6.39E+05	1.56E-04	2.44E-10	74.1
	mfMet.mmh	1.61E+05	1.04E-03	6.47E-09	11.1

[0446] NB= 사용된 조건 하에서 결합이 관찰되지 않음

[0447] 표 3에 나타낸 바와 같이, 몇몇 항체는 인간 및 원숭이 MET 단백질에 대한 높은 친화도의 결합을 나타냈다.

[0448] **실시예 4. 항-Met 항체는 Met 수용체 상의 구별되는 에피토프에 결합한다**

[0449] 2개의 항-Met 항체가 MET 상에서 이들 각각의 에피토프에 결합하기 위해 서로 경쟁할 수 있는지 여부를 평가하기 위해, OCTET® HTX 바이오센서(Fortιbio Corp., Menlo Park, CA)를 이용한 실시간, 비표지 바이오층 간섭계(BLI)를 사용하여 결합 경쟁 검정을 수행하였다.

[0450] 요약하자면, C-말단 myc-myc-헥사히스티딘 태그(hMet.mmh)와 함께 발현된 약 0.25 nM의 인간 MET 세포외 도메인을, 항-펜타-His 항체로 코팅된 OCTET® 바이오센서(Fortιbio Corp., # 18-5079)(20 μg/mL의 hMET.mmh 용액이 담긴 웰에 5분 동안 침지시켜 코팅함) 상에 먼저 포획하였다. 그런 다음, 항원이 포획된 바이오센서를 50 μg/mL의 제1 항-MET 단클론 항체(이하 mAb-1로 지칭함) 용액이 담긴 웰에 5분 동안 침지하여 mAb-1로 포화시켰다. 그런 다음, 바이오센서를 50 μg/mL의 제2 항-MET 단클론 항체(이하 mAb-2로 지칭함) 용액이 담긴 웰에 3분 동안 침지하였다. 실험의 각 단계 사이에, 모든 바이오센서를 OCTET® HEPES로 완충된 식염수-EDTA 폴리소르베이트 20(HBS-EP) 완충액으로 세척하였다. 실험 과정 동안 실시간 결합 반응을 모니터링하고, 모든 단계가 끝난 후 결합 반응을 기록하였다. mAb-1과 미리 복합체화된 항-MET에 대한 mAb-2의 결합 반응을 비교하고, 상이한 항-MET 단클론 항체의 경쟁적/비경쟁적 거동을 50% 억제 임계치를 사용해 결정하였다. 표 4는 양 방향으로 경쟁하는 항체의 관계를 결합 순서와 무관하게 명시적으로 정의한다.

표 4

[0451]

hMET.mmh에 결합하기 위한 항-MET 항체들의 교차 경쟁			
제1 mAb (mAb-1) 항-Penta-His Octet Biosensor를 사용해 캡처됨	mAb-1과 경쟁하는 mAb-2 항체	제1 mAb (mAb-1) 항-Penta-His Octet Biosensor를 사용해 캡처됨	mAb-1과 경쟁하는 mAb-2 항체
H4H13301P2	H4H13302P2	H4H13300P2	H4H13291P2
H4H13302P2	H4H13301P2		H4H13295P2
H4H13290P2	H4H13306P2		H4H13311P2
	H4H13316P2		H4H13318P2
H4H13306P2	H4H13290P2		H4H13319P2
	H4H13316P2	H4H13311P2	H4H13291P2
H4H13316P2	H4H13290P2		H4H13295P2
	H4H13306P2		H4H13300P2
	H4H13325P2		H4H13318P2
	H4H13331P2		H4H13319P2
H4H13325P2	H4H13316P2	H4H13318P2	H4H13291P2
	H4H13331P2		H4H13295P2
H4H13312P2	H4H13331P2		H4H13300P2
H4H13291P2	H4H13295P2		H4H13311P2
	H4H13300P2		H4H13319P2
	H4H13311P2	H4H13319P2	H4H13291P2
	H4H13318P2		H4H13295P2
	H4H13319P2		H4H13300P2
H4H13295P2	H4H13291P2		H4H13311P2
	H4H13300P2		H4H13318P2
	H4H13311P2	H4H13331P2	H4H13316P2
	H4H13318P2		H4H13325P2
	H4H13319P2		H4H13312P2

[0452] **실시예 5. MET의 상이한 에피토프에 특이적인 2개의 상이한 항원 결합 도메인을 갖는 이중특이적 항체의 작제**

[0453] 본 실시예는 2개의 상이한 항원 결합 도메인(D1 및 D2)을 포함하는 이중특이적 항체의 작제에 대해 기술하며, 여기서 D1 및 D2 는 상이한 항-MET 항체로부터 유래되고, 궁극적으로 MET 세포외 도메인 상의 별도의 에피토프에 결합한다.

[0454] 본 실시예의 이중특이적 항체를 작제하는 데 사용된 개별적인 항-MET 항원 결합 도메인은 본원의 실시예 1 내지 3에 기술된 다양한 2가, 단일 특이적 항-MET 항체로부터 유래된 것이다. 본원에 기술된 모든 항-MET 항체는 동일한 ("공통") 경쇄(서열번호 138의 경쇄 가변 영역[LCVR] 아미노산 서열, 및 서열번호 140, 142, 및 144의 경

쇄 CDR[LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3] 아미노산 서열을 포함함)를 포함한다. 또한, 본 실시예에 도시된 모든 이중특이적 항체는 예시적인 항-MET 항체 H4H13312P2로부터 유래된 "D2" 아암을 함유한다. 따라서, 본 실시예에 기술된 모든 이중특이적 항체의 항원 결합 도메인(D1 및 D2) 둘 다는 이러한 공통 경쇄 가변 영역을 포함하고, 모든 D2 결합 아암은 H4H13312P2 유래의 중쇄 가변 영역을 포함하지만; 이중특이적 항체는 이들의 D1 중쇄 가변 영역(HCVR) 및 중쇄 CDR(HCDR)에 있어서 서로 다르다. 본 실시예의 이중특이적 항체의 성분은 표 5에 요약되어 있다.

표 5

[0455]

MET x MET 이중특이적 항체 성분 요약								
	서열번호 (아미노산 서열)							
이중특이적 항체	제1 항원 결합 도메인(D1)				제2 항원 결합 도메인(D2)			
	D1-HCVR	D1-HCDR1	D1-HCDR2	D1-HCDR3	D2-HCVR	D2-HCDR1	D2-HCDR2	D2-HCDR3
H4H14634D	H4H13290P2				H4H13312P2			
(번호 10)	2	4	6	8	82	84	86	88
H4H14635D	H4H13295P2				H4H13312P2			
(번호 42)	18	20	22	24	82	84	86	88
H4H14636D	H4H13299P2				H4H13312P2			
(번호 74)	26	28	30	32	82	84	86	88
H4H14637D	H4H13301P2				H4H13312P2			
(번호 90)	42	44	46	48	82	84	86	88
H4H14638D	H4H13302P2				H4H13312P2			
(번호 106)	50	52	54	56	82	84	86	88
H4H14639D	H4H13306P2				H4H13312P2			
(번호 122)	58	60	62	64	82	84	86	88
H4H14640D	H4H13309P2				H4H13312P2			
(번호 138)	66	68	70	72	82	84	86	88
H4H14641D	H4H13313P2				H4H13312P2			
(번호 187)	90	92	94	96	82	84	86	88
H4H16445D	H4H13291P2				H4H13312P2			
(번호 26)	10	12	14	16	82	84	86	88
H4H16446D	H4H13300P2				H4H13312P2			
(번호 58)	34	36	38	40	82	84	86	88
H4H16447D	H4H13311P2				H4H13312P2			
(번호 154)	74	76	78	80	82	84	86	88
H4H16448D	H4H13318P2				H4H13312P2			
(번호 219)	106	108	110	112	82	84	86	88
H4H16449D	H4H13319P2				H4H13312P2			
(번호 235)	114	116	118	120	82	84	86	88

[0456] * 이중특이적 항체 식별자 아래 괄호 안에 지정된 번호(예: "번호 10")는 도 1의 MET x MET 이중특이적 항체 매트릭스에 도시된 이중특이적 항체 번호를 나타낸다.

[0457] **실시예 6. 표면 플라스몬 공명으로 유도한 MET x MET 인간 이중특이적 단클론 항체의 결합 친화도 및 동역학 상수**

[0458] 본원의 실시예 4에 따라 작제한 MET x MET 이중특이적 항체의 결합 친화도 및 동역학 상수는 37℃에서 표면 플라스몬 공명(Biacore 4000 또는 T-200)에 의해 결정하였다. 인간 IgG4("H4H"로 지칭됨)로서 발현된 이중특이적 항체를 단클론 마우스 항-인간 Fc 항체(GE, BR-1008-39)와의 아민 결합을 통해 유도체화된 CM4 또는 CM5 Biacore 센서 표면 상에 포획하였다. 항-MET x MET 이중특이적 항체가 포획된 표면 위에 다양한 농도의 가용성 단량체 MET 단백질(hMet.mmh, 서열번호 152)를 30 또는 50 μL/분의 유속으로 주입하였다. 포획된 이중특이적 항체에 대한 분석물의 결합을 4분 또는 5분 동안 모니터링하고, HBS-ET(0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% v/v 계면활성제 P20) 또는 PBS-P(0.01M 인산나트륨 pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.05% v/v 계면활성제 P20) 영동 완충액 중 분석물의 해리를 10분 동안 모니터링하였다.

[0459] 동역학 결합 속도 상수(k_a) 및 해리 속도 상수(k_d)를 실시예 3에 기술된 바와 같이 결정하였다.

[0460] 단량체 Met 단백질(hMET.mmh)에 대한 이중특이적 항-Met 항체의 결합 동역학 파라미터는 표 6에 나타나 있다.

표 6

[0461]

37℃에서 이중특이적 항-MET mAb의 Biacore 결합 친화도					
37℃에서의 결합 / 항체-캡처 포맷					
이중특이적 항체	분석물질	ka (Ms^{-1})	kd (s^{-1})	K_D (몰)	T½ (분)
H4H14634D	hMet.mmh	N/A	≤ 1E-5	N/A	≥ 1155
H4H14635D	hMet.mmh	N/A	8.21E-05	N/A	140.6
H4H14636D	hMet.mmh	N/A	≤ 1E-5	N/A	≥ 1155
H4H14637D	hMet.mmh	N/A	3.26E-04	N/A	35.4
H4H14638D	hMet.mmh	N/A	1.65E-04	N/A	70.2
H4H14639D	hMet.mmh	N/A	1.63E-04	N/A	70.8
H4H14640D	hMet.mmh	N/A	≤ 1E-5	N/A	≥ 1155
H4H14641D	hMet.mmh	N/A	3.27E-04	N/A	35.3
H4H16445D	hMet.mmh	N/A	3.93E-04	N/A	29.4
H4H16446D	hMet.mmh	N/A	1.03E-04	N/A	111.8
H4H16447D	hMet.mmh	N/A	8.48E-04	N/A	13.6
H4H16448D	hMet.mmh	N/A	5.92E-04	N/A	19.5
H4H16449D	hMet.mmh	N/A	2.94E-04	N/A	39.3

[0462] 표 6에 나타낸 바와 같이, 본원에 기술된 이중특이적 "MET x MET" 항체는 최대 1155분을 초과하는 T ½ 값을 나타냈다.

[0463] 표 7에 나타낸 바와 같이, 이중특이적 항체 H4H14639D에 대한 해리 속도는 이의 부모 항체인 H4H13306P2 및 H4H13312P2 각각의 해리 속도보다 상당히 낮다.

표 7

[0464]

37℃에서 이중특이적 항-MET mAb 및 단일특이적 부모의 Biacore 결합 친화도			
37℃에서의 결합 / 항체-캡처 포맷			
항체	분석물질	kd (s^{-1})	T½ (분)
H4H13306P2	hMet.mmh	1.66E-02	0.7
H4H13312P2	hMet.mmh	8.40E-03	1.4
H4H14639D	hMet.mmh	1.63E-04	70.8

[0465] **실시예 7: SRE-루시퍼라아제 리포터 생물검정에서 항-Met 항체는 HFG 매개 Met 활성화를 차단한다**

[0466] 간세포 성장 인자(HGF) 매개 MET 활성화를 차단하는 항-MET 항체의 능력을 루시페라아제 기반 리포터 검정에서 조사하였다. 성장 인자 HGF는 이의 수용체 c-Met(MET)의 세포외 도메인에 결합하여, 신속한 동종이량체화를 유발하고 여러 하류 신호전달 캐스케이드를 활성화한다. 본 실시예에서 시험한 항-MET 항체는 MET의 2가 단일특이적 결합제이거나, 항-MET "이중특이적" 항체였으며, 여기서 이중특이적 항체의 각 아암은 MET 상의 상이하고 구별되는 에피토프에 결합하였다.

[0467] 조작된 세포 기반 루시페라아제 리포터 검정(도 2)을 사용하여 MET 신호 전달을 활성화하고(도 3, 패널 A; 표 8, 열 3 및 4), MET의 리간드 매개 활성화를 차단하는(도 3, 패널 B; 표 8, 열 1 및 2) 항-MET 항체의 능력을 결정하였다. 요약하자면, CIGNAL™ Lenti SRE 리포터 (luc) 키트(SABiosciences, Hilden, DE)를 사용하여 HEK293/SRE-Luc 세포를 생성하였다. HEK293(인간 배아 신장) 세포를 선택한 이유는 c-Met를 내인성으로 발현하기 때문이었다. HEK293/SRE-Luc 세포는 혈청 반응 요소(SRE) 의존성 루시페라아제(Luc) 리포터를 안정적으로 통합하였다(Dinter 등의 문헌[PLoS ONE 10(2): e0117774, 2015] 참조). HEK293/SRE-Luc 세포를 10% 소태아 혈청(FBS), 페니실린/스트렙토마이신/글루타민, 및 1 μg/ml 퓨로마이신이 보충된 DMEM에서 배양하였다.

[0468] 다음으로, 2.0 x 10^5개의 HEK293/SRE-Luc 세포를 96웰 플레이트에 담긴 루시페라아제 검정 배지에 시딩하고 5% CO_2 하에 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 간세포 성장 인자(HGF) 투여량 반응 곡선은, 연속 희석된 HGF(0.01 pM 내지 1.0 nM)를 세포에 첨가하고, 항체가 없는 상태에서 37℃에서 4 내지 6시간 동안 인큐베이션한 후 루시페라아제 신호를 기록함으로써 생성하였다. 항체 억제 곡선을 생성하기 위해, 세포를 연속 희석된 항-인간 MET 항체(1.1 pM 내지 200 nM)와 함께 37℃에서 1시간 동안 미리 인큐베이션하였다. 그런 다음, 73 pM 또는 100 pM 농도의 HGF를 4 내지 6시간 동안 추가로 첨가한 후 신호를 기록하였다. 별도로, 리간드가 없는 상태에서 c-Met를 활성화하는 항체의 능력도 평가하였다.

[0469] ONE-Glo™ 루시페라아제 검정 시스템(Promega, Madison, WI)을 사용하여 루시페라아제 활성을 검출하고, Victor 발광계 또는 Envision 발광계(Perkin Elmer, Shelton, CT)를 이용해 발광을 측정하고, 상대 광 단위(RLU)로서 표현하였다. EC50/IC50 값은 GRAPHPAD PRISM®을 사용해 12-점 반응 곡선(GraphPad Prism)에 걸쳐 4-파라미터 로지스틱 방정식에서 결정하였다. HGF 차단율 및 MET 활성화 배수(mAb 단독)는 가장 높은 항체 투여량에 대해 보고하였다. 결과를 표 8에 나타냈다.

표 8

[0470]

항-Met 항체의 HGF-매개 신호 전달 차단 및 리간드 부재 시 SRE-Luc 활성화의 차단				
	HEK293/SRE-Luc 차단 활성 (1시간 mAb 사전 결합)		리간드(HGF)-독립적인 HEK293/SRE-Luc 활성화	
항체 ID	억제 (%)	IC_{50} (M)	배수 반응	EC_{50} (M)
항-MET 2가 단일특이적 항체				
*hIgG1-Fc*로 발현된 항체				
H1H13301P2	42	3.3E-09	1.4	ND
H1H13316P2	86	4.0E-11	1.7	ND
*hIgG4-Fc*로 발현된 항체				
H4H13312P2	48	7.7E-11	10.9	1.2E-10
H4H13325P2	69	1.3E-11	4.3	1.9E-10
H4H13316P2	74	7.8E-12	2.3	4.7E-11
H4H13302P2	45	1.6E-09	1.8	ND
H4H13313P2	47	2.3E-09	1.2	ND
H4H13301P2	40	1.5E-09	1.6	ND
H4H13295P2	70	5.5E-11	2.8	3.0E-10
H4H13306P2	67	ND	9.8	1.3E-11
H4H13291P2	61	1.3E-10	2.7	3.9E-10
H4H13319P2	67	5.2E-11	4.8	1.8E-10
H4H13309P2	77	2.0E-10	9.2	3.9E-10
H4H13318P2	77	1.0E-10	3.1	ND
H4H13300P2	69	1.2E-10	2.8	4.8E-10
H4H13290P2	56	< 2.0E-12	9.8	< 2.0E-12
H4H13311P2	62	3.5E-11	5.2	3.0E-10
H4H13331P2	75	< 1.0E-11	7.1	2.3E-12
H4H13299P2	51	ND	14.4	3.7E-12
항-MET 이중특이적 항체 (hIgG4-Fc)				
H4H14639D	95	2.4E-11	1.8	5.7E-11
H4H14640D	89	5.2E-10	2.5	6.8E-09
H4H14634D	85	9.7E-12	3.4	9.0E-11
H4H14635D	85	1.9E-10	2.2	1.4E-09
H4H14638D	79	1.1E-09	2.6	5.9E-09
H4H14641D	75	2.7E-09	4.4	8.4E-08
H4H14636D	74	ND	2.8	2.8E-10
H4H14637D	73	ND	2.1	4.1E-09
H4H16445D	81	5.2E-10	4.3	1.0E-09
H4H16446D	83	1.0E-09	4.0	1.4E-09
H4H16447D	76	8.6E-10	5.8	1.4E-09

H4H16448D	87	6.2E-10	4.3	9.1E-10
H4H16449D	85	3.2E-10	4.2	4.2E-10

[0471] NT = 미시험; ND = 비-S자 곡선 또는 불완전한 차단으로 인해 EC50/IC50이 결정되지 않음.

[0472] 표 8에 요약된 바와 같이, 대부분의 항체는 < 2.0 pM 내지 약 1.0 nM 범위의 IC50 값으로 SRE 리포터의 활성화를 억제하였다. H4H13306P2 및 H H4H13309P2와 같은 몇몇 예시적인 단일특이적 2가 항-MET 항체는 SRE-luc 활성화의 강력한 억제제였으며, 억제율 값은 각각 67% 및 77%였다. 항-MET 이중특이적 항체(MET x MET)는 전반적으로 SRE-luc 활성화를 더 많이 억제하였다. 예를 들어, MET x MET 이중특이적 항체 H4H14639D는 95% 억제율을 나타냈다. 또한, 몇몇 차단 항체는 리간드가 없는 상태에서 활성화를 약화시켰으며, 배수 활성화 반응은 베이스라인 수준 대비 0.8 내지 14.4 범위였다.

[0473] 또한 도 3에 도시된 바와 같이, 2가 단일특이적 항체 H41413306P2 및 H4H13312P2는 각각 HGF 리간드가 없는 상태에서 Met 경로를 활성화시키고(패널 A), Met의 HGF 활성화도 차단한다(패널 B).

[0474] HGF-의존성 및 HGF-독립적 MET 활성화에 이중특이적 MET x MET 항체(예: H4H14639D)가 미치는 효과도 HEK293/SRE-Luc 시스템을 사용하여 평가하였다. 다양한 농도의 MET 항체 H4H14639D(MET x MET 이중특이적 항체), 1가 항-MET 항체, 및 H4H14639D 부모 항체 H4H13312P2로 치료한 HEK293T 세포에서 SRE로 유도한 루시페라아제 활성을 측정하여 HGF-독립적 MET 작용의 수준을 확인하였다. 부모 항-MET 단일특이적 2가 항체는 MET 작용제 활성을 나타냈지만, 1가 또는 MET x MET 이중특이적 항체는 MET 작용제 활성을 나타내지 않았다(도 4, 패널 A).

[0475] 다양한 농도의 MET 항체 H4H14639D(MET x MET 이중특이적 항체), 1가 항-MET 항체, 및 H4H14639D 부모 항체 H4H13312P2로 치료한 HEK293T 세포에서 SRE로 유도한 루시페라아제 활성을 측정하여 HGF-독립적 MET 작용의 억제 또는 차단 수준을 확인하였다. 부모 항-MET 단일특이적 2가 항체는 약간의 HGF 차단 활성을 나타냈지만, 1가 항체와 MET x MET 이중특이적 항체 둘 다는 더 큰 HGF 차단을 나타냈다(도 4, 패널 B).

[0476] MET x MET 이중특이적 항체는 HGF 신호 전달을 차단하고 낮은 MET 작용제 활성을 나타낸다.

[0477] **실시예 8: 항-Met 항체는 Met-증폭 세포의 성장을 억제한다**

[0478] 다음으로, 선택된 항-Met 항체를 MET-증폭 SNU5 세포의 성장을 억제하는 이들의 능력에 대해 시험하였다. 간략하게, 2.5 x 10^3개의 인간 위 암종(SNU5) 세포를 1.5 pM 내지 100 nM 범위의 농도로 항-MET 항체가 존재하는 완전 성장 배지에 시딩하였다. SNU5 완전 성장 배지에는 Iscove의 변형된 Dulbecco 배지, 10% FBS, 및 페니실린/스트렙토마이신/글루타민을 포함시켰다. 세포를 5일 동안 인큐베이션하고, 제조사 지침에 따라 CELLTITER-GLO® 발광 세포 생존력 검정 키트(Promega, Madison, WI)를 사용하여 생존 세포의 수를 결정하였다.

[0479] 표 9에 요약된 바와 같이, H4H13312P2 및 H4H13325P2와 같은 몇몇 항-MET 항체는 SNU5 성장을 50% 넘게 차단하였으며, 전체 IC50은 44 pM 내지 780 pM 범위였다.

[0480] 도 5는 다양한 항-MET 2가 단일특이적 항체(즉, 종래의 항체)로 치료한 SNU5 세포의 상대 세포 성장을 도시한다. 종래의 MET 항체의 하위 집합은 SNU5 MET-증폭 위암 세포의 성장을 억제한다(도 5). 96 웰 플레이트 내의 SNU5 세포를 10 μg/ml의 각 항체로 치료하고, 5일 후 alamarBlue® 시약(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)의 환원에 의해 세포 성장을 결정하였다. 미국 특허 제7,892,550 B2호(그 전체가 참조로서 본원에 통합됨)에 제시된 것과 같이 MetMab의 중쇄 및 경쇄 가변 서열을 사용해 1가 MET 항체(컬럼 2, 도 5)를 생성하였다. 종래의 항체 8은 H4H13306P2이고, 종래의 항체 11은 H4H13312P2이며, 이들을 사용해 MET x MET 이중특이적 항체 H4H14639D를 작제하였다.

[0481] 별도의 성장 검정에서, SNU5 및 비소세포 폐암(NSCLC) 세포주 EBC-1 둘 다에서 MET x MET 이중특이적 항체(즉, H4H14639D)의 차단 활성을 평가하였는데, 이 또한 증폭된 MET 유전자를 나타내고 MET를 과발현한다(Lutterbach 등의 문헌[Cancer Res. 67(5): 2081-2088, 2007] 참조). EBC-1 세포를 위한 완전 성장 배지에는 MEM Earle's Salts, 10% 소태아혈청(FBS), 페니실린/스트렙토마이신/글루타민, 및 MEM을 위한 비필수 아미노산을 포함시켰다. H4H14369D는 SRE-루시페라아제 판독에 따르면 MET 활성에서 가장 큰 억제율을 나타냈다. 본 실험에서, 3.0 x 10^3개의 SNU5 또는 EBC-1 세포를 H4H14639D가 15 pM 내지 100 nM 범위의 농도로 존재하는 완전 성장 배지에 시딩하였다. 세포를 5% CO_2 하에 37℃에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음, 세포를 4% 포름알데히

드에 고정시키고 3 μg/ml의 Hoechst 33342로 염색하여 핵을 표지하였다. IMAGEXPRESS® Micro XL(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용해 이미지를 획득하였고, METAXPRESS® 이미지 분석 소프트웨어(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 통해 핵 계수(counts)를 결정하였다. 40 nM 디지토닌으로 치료한 세포의 백그라운드 핵 계수를 모든 웰로부터 차감하고, 생존율을 미치료 대조군의 백분율로서 표현하였다. IC50 값은 10-점 반응 곡선(GRAPHPAD PRISM®)에 걸쳐 4-파라미터 로지스틱 방정식에서 결정하였다. IC50 값 및 세포 사멸율은 표 9에 나타냈다.

표 9

[0482]

항-MET 항체의 SNU5 성장 차단					
항체	성장 억제 (%)	IC_{50} (M)	항체	성장 억제 (%)	IC_{50} (M)
H4H13312P2	69	7.8E-10	H4H13291P2	24	ND
H4H13325P2	57	4.4E-11	H4H13319P2	23	1.0E-10
H4H13316P2	53	1.0E-10	H4H13309P2	22	1.0E-10
H4H13302P2	40	1.1E-10	H4H13318P2	18	5.1E-11
H4H13313P2	34	4.4E-11	H4H13300P2	16	ND
H4H13301P2	33	7.4E-11	H4H13290P2	12	ND
H1H13301P2	33	1.0E-10	H4H13311P2	8	ND
H1H13316P2	30	2.0E-10	H4H13331P2	5	ND
H4H13295P2	30	ND	H4H13299P2	-8	ND
H4H13306P2	28	7.1E-11			

[0483] ND = 비-S자 곡선 또는 불완전한 차단으로 인해 IC_{50}이 결정되지 않음

[0484] 하기 표 10에 요약된 바와 같이, MET x MET 이중특이적 항체 H4H14639D는 EBC-1 및 SNU5 세포의 성장을 각각 37% 및 40%만큼 억제하였고, IC50은 각각 0.82 nM 및 0.3 nM이었다.

표 10

[0485]

항-Met 이중특이적 항체에 의한 EBC-1 및 SNU5 성장의 차단				
mAb	IC_{50} (nM)		성장 억제 (%)	
	EBC-1	SNU5	EBC-1	SNU5
H4H14639D	0.82	0.30	37	40

[0486] 96 웰 플레이트 내의 SNU5 세포(위 세포)를 0.1 μg/mL, 1 μg/mL, 또는 10 μg/mL의 대조군 항체, 1가 MET 항체, 또는 MET x MET 이중특이적 항체로 치료하였다. 5일 후, ALAMARBLUE® 시약(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)의 환원에 의해 세포 성장을 결정하였다. MET x MET 이중특이적 항체는 대조군 및 1가 항체와 비교하여 SNU5 세포의 상대 세포 성장을 유의하게 감소시켰다(도 6, 패널 A).

[0487] 마찬가지로, EBC-1 세포의 성장에 MET x MET 이중특이적 항체가 미치는 효과를 평가하였다. 2,500개의 EBC-1 세포를 96 웰 플레이트에 시딩하고, 10% FBS가 보충된 Dulbecco 배지에서 배양하였다. 세포를 0.1 μg/mL 또는 1 μg/mL의 대조군 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항체로 치료하고, 이어서 5% CO_2가 있는 가운데 37℃에서 인큐베이션하였다. 5일 후, Spectramax® M3 플레이트 판독기(Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA)에서 지시 염료 ALAMARBLUE®가 이의 고 형광성 형태로 환원하는 것을 측정하여 상대 세포 성장을 결정하였다. 결과를 표 11 및 도 6의 패널 B에 나타냈다. MET x MET 이중특이적 항체(H4H14639D)는 대조군 항체와 비교하여 EBC-1 세포의 상대 세포 성장을 상당히 감소시켰다(도 6의 패널 B).

[0488] 몇몇 항-MET 항체(2가 단일특이적 및 MET x MET 2가 모두)는 SRE-Luc 활성화의 강력한 억제제이며, MET-증폭 및 MET-과발현 세포주의 성장을 억제한다.

표 11

항-Met 이중특이적 항체에 의한 EBC-1 세포 성장의 차단

[0489]

	상대적인 세포 성장 (n = 3)	표준 편차
대조군	1.000	0.045
0.1 μg/mL H4H14639D	0.397	0.032
1 μg/mL H4H14639D	0.462	0.028

[0490] **실시예 9. NCI-H596 NSCLC 세포에서 MET x MET 이중특이적 항체는 중간 정도의 일시적 MET 경로 활성을 유도한다**

[0491] 인간 폐 선편평세포암종 세포에서 MET 경로에 MET x MET 이중특이적 항체가 미치는 효과를 시험관 내에서 평가하였다.

[0492] 250,000개의 NCI-H596 세포를 12 웰 플레이트에 시딩하고, 10% FBS가 보충된 RPMI 배지에서 배양하였다. 세포를 50 ng/ml의 간세포 성장 인자(HGF) 또는 10 μg/ml의 MET x MET 이중특이적 항체 H4H14639D로 2회 치료하였다. 이어서, 세포를 5% CO_2 하에 37℃에서 인큐베이션하였다. 0, 2, 6, 또는 18시간 후, 세포 용해물을 제조하고, 단백질 함량을 정규화하고, 면역블롯 분석을 수행하였다. MET 인산화 및 ERK 인산화를 ImageJ 이미지 처리 프로그램으로 정량화하였다(T. Collins, BioTechniques 43: S25-S30, 2007). 인산화 수준을 튜불린 로딩 대조군에 대해 정규화하고, 대조군 치료 대비 배수 변화로서 표현하였다. 결과를 표 12에 요약하였다.

표 12

[0493]

MET 및 ERK의 인산화		
치료 (시간)	인산화-MET (평균 ± SD)	인산화-ERK (평균 ± SD)
대조군 (hFc) (18)	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.3
HGF (2)	202.3 ± 38.7	16.7 ± 1.6
HGF (6)	38.9 ± 4.9	12.4 ± 3.9
HGF (18)	59.2 ± 24.4	12.4 ± 0.9
H4H14639D (2)	69.7 ± 7.0	2.2 ± 0.9
H4H14639D (6)	9.9 ± 7.4	0.3 ± 0.4
H4H14639D (18)	1.4 ± 0.1	0.1 ± 0.1

[0494] NCI-H596 세포의 HGF 치료로 MET 및 ERK의 강한 활성화를 유도하였는데, 활성화는 2시간차에 피크에 도달하였고 18시간 후에도 유지되었다. H4H14636D 이중특이적 항체 치료로 중간 정도의 MET 및 ERK 인산화가 검출되었는데, 이는 각각 18시간 또는 6시간만에 베이스라인 수준으로 회복되었다.

[0495] **실시예 10. Hs746T 위암 세포에서 MET x MET 이중특이적 항체는 단일특이적 항체보다 더 강력하게 MET 분해를 유도하고 경로 활성을 억제한다**

[0496] 인간 위 암종 세포의 MET 활성에 MET x MET 이중특이적 항체가 미치는 효과를 시험관 내에서 평가하였다. 250,000개의 Hs746T 인간 위 암종 세포(H. Smith, J. Nat'l. Cancer Inst. 62(2): 225-230, 1979)를 12-웰 플레이트에 시딩하고, 10% FBS가 보충된 변형된 Dulbecco 배지에서 배양하였다. 세포를 (1) 5 μg/ml의 hFc 대조군 분자, (2) 5 μg/ml의 부모 2가 단일특이적 항-MET 항체 H4H13306P2, (3) 5 μg/ml의 부모 2가 단일특이적 항-MET 항체 H4H13312P2, (4) 2.5 μg/mL의 H4H13306P2 및 2.5 μg/mL의 H4H13312P2의 조합, 또는 (5) 5 μg/ml의 MET x MET 이중특이적 항체 H4H14639D로 치료하였다. 이어서, 세포를 5% CO_2 하에 37℃에서 인큐베이션하였다. 18시간 후, 세포 용해물을 제조하고, 단백질 함량을 정규화하고, 면역블롯 분석을 수행하였다. MET 발현, MET 인산화, 및 ERK 인산화를 ImageJ 이미지 처리 프로그램으로 정량화하였다(T. Collins, BioTechniques 43: S25-S30, 2007). 결과는 표 13 및 도 7, 패널 A에 요약되어 있는데, 이는 원시 면역블롯 데이터를 도시한다. 도 7의 패널 B는 10 μg/ml의 MET x MET 이중특이적 항체로 0, 2, 또는 6시간 동안 치료한 세포에서 MET 단백질 발현을 도시한다. Hs747T 세포에서의 총 MET 수준은 MET x MET 이중특이적 항체로 치료한 후 시간

경과에 따라 감소하였다. MET 증폭 인간 유두상 선암종 NCI-H820 세포주에 대해서도 유사한 결과를 얻었다(Bean 등의 문헌["MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to getfitnib or erlotinib," Proc. Natl. Acad. Sci. 2007 Dec 26, 104(52): 20932-20937] 참조).

표 13

[0497]

MET 단백질 및 MET/ERK 경로 활성화의 상대 수준			
분자	MET 단백질 상대 수준 (평균 ± SD)	인산화-MET 상대 수준 (평균 ± SD)	인산화-ERK 상대 수준 (평균 ± SD)
대조군 (hFc)	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.03
H4H13306P2	0.61 ± 0.09	0.57 ± 0.02	0.41 ± 0.03
H4H13312P2	1.15 ± 0.19	0.93 ± 0.04	0.39 ± 0.11
H4H13306P2+H4H13312P2	1.06 ± 0.02	1.07 ± 0.10	1.04 ± 0.23
H4H14639D	0.41 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.04 ± 0.01

[0498] 이중특이적 항체인 H4H14639D는 이의 종래 부모 항체보다 더 강력하게 MET 분해를 유도하였다. MET 인산화와 ERK 인산화 모두는 부모 항체 또는 부모 항체의 조합으로 치료한 것보다 H4H14636D로 치료함으로써 더 효과적으로 억제되었다.

[0499] Hs746T 위암 세포를 대조군 항체, MET x MET 이중특이적 항체 H4H14639D, 항-MET 부모 항체 H4H13306P2, 항-MET 부모 항체 H4H13312P2, 및 부모 항체 1과 2의 조합(각각 10 μg/ml씩 또는 5 μg/ml의 부모 항체의 조합)으로 18시간 동안 치료하였다. MET 발현(MET) 및 경로 활성화(pMET 및 pErk)는 표시된 항체를 이용한 면역블로팅으로 결정하였다(도 8). Hs746T 위암 세포에서, MET x MET 이중특이적 항체는 부모 항체보다 더 효과적으로 MET 경로 활성화를 억제한다.

[0500] **실시예 11. NCI-H596 폐암 세포에서 MET x MET 이중특이적 항체는 단일특이적 항체보다 더 강력하게 MET 분해를 유도한다**

[0501] 인간 폐 선편평세포 암종 세포 상의 간세포 성장 인자 수용체(HGFR 또는 MET)의 발현 수준에 MET x MET 이중특이적 항체 및 부모 2가 단일특이적 항-MET 항체가 미치는 효과를 평가하였다. 250,000개의 NCI-H596 인간 폐 선편평세포 세포를 12 웰 플레이트에 시딩하고, 10% FBS가 보충된 RPMI 배지에서 배양하였다. 세포를 (1) 5 μg/ml의 hFc 대조군 분자, (2) 5 μg/ml의 부모 2가 단일특이적 항-MET 항체 H4H13306P2, (3) 5 μg/ml의 부모 2가 단일특이적 항-MET 항체 H4H13312P2, (4) 2.5 μg/mL의 H4H13306P2 및 2.5 μg/mL의 H4H13312P2의 조합, 또는 (5) 5 μg/ml의 MET x MET 이중특이적 항체 H4H14639D로 치료하였다. 이어서, 세포를 5% CO_2 하에 37℃에서 인큐베이션하였다. 18시간 후, 세포 용해물을 제조하고, 단백질 함량을 정규화하고, 면역블롯 분석을 수행하였다. MET 발현을 ImageJ 이미지 처리 프로그램으로 정량화하였다(T. Collins, BioTechniques 43: S25-S30, 2007). 결과를 표 14에 요약하였다.

표 14

[0502]

MET 단백질의 상대 수준	
분자	MET 상대 수준
대조군 (hFc)	1 ± 0.03
H4H13306P2	0.50 ± 0.01
H4H13312P2	0.35 ± 0.04
H4H13306P2+H4H13312P2	0.61 ± 0.04
H4H14639D	0.24 ± 0.01

[0503] NCI-H596(MET 엑손 14 스키핑 돌연변이) 폐암 세포도 10 μg/ml의 대조군 또는 MET x MET 이중특이적 항체로 2, 6, 또는 18시간 동안 치료하였다. MET 발현을 면역블로팅으로 결정하였는데(도 9), 이는 치료 시간이 늘어남에 따라 MET x MET 이중특이적 항체에 의해 MET의 분해가 유도됨을 보여준다.

[0504] NCI-H596 폐암 세포에서, 이중특이적 항체인 H4H14636D는 이의 종래 부모 항체보다 더 강력하게 MET 분해를 유

도한다.

[0505] **실시예 12. SNU5 위암 세포에서 MET x MET 이중특이적 항체는 단일특이적 항체보다 더 강력하게 MET 분해를 유도하고 경로 활성을 억제한다**

[0506] 위 암종 세포 상의 간세포 성장 인자 수용체(HGFR 또는 MET)의 발현 수준에 2차 단일특이적 항-MET 항체 및 여러 가지 MET x MET 이중특이적 항체가 미치는 효과를 평가하였다. 인간 위암 SNU5 세포를 20% FBS + 페니실린-스트렙토마이신-글루타민이 담긴 Iscove 배지에 도말하였다. 시딩 후 24시간차에, 세포를 대조군 hFc, 항-MET 부모 2가 단일특이적 항체 H4H13312P2, 또는 MET x MET 이중특이적 항체(H4H14634D, H4H14635D, H4H14636D, H4H14637D, H4H14638D, H4H14639D, H4H14640D, H4H14641D)로 18시간 동안 치료하였다. 그런 다음, 세포 용해물을 제조하고, 웨스턴 블롯팅에 의해 분석하였다. 면역블롯을 MET 및 튜불린에 대해 프로브하였다. MET 단백질 발현 수준을 정량화하고 튜불린 로딩 대조군에 대해 정규화하였다. 결과는 표 15 및 도 10의 패널 B에 제시되어 있다.

표 15

[0507]

MET 단백질의 상대 수준			
분자	**MET 상대 수준**	**분자**	**MET 상대 수준**
대조군 (hFc)	1	H4H14637D	0.49
H4H13312P2	0.62	H4H14638D	0.35
H4H14634D	0.45	H4H14639D	0.27
H4H14635D	0.27	H4H14640D	0.18
H4H14636D	0.50	H4H14641D	0.31

[0508] 전술한 바와 같이, SNU5 암세포를 10 μg/ml의 대조군 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항체 또는 1가 MET 항체로 18시간 동안 치료하였다. MET 발현(도 10, 패널 A 및 B) 및 경로 활성화(즉, pMET 및 pERK; 패널 A)는 표시된 항체를 이용한 면역블로팅으로 결정하였다. 면역블롯은 도 10에 도시되어 있다.

[0509] MET x MET 이중특이적 항체로 SNU5 세포를 치료한 결과, 2가 단일특이적 항-MET 항체(H4H13312P2)(도 10, 패널 B), 1가 MET 항체, 또는 대조군 hFc로 치료한 것보다 더 강력한 MET 분해가 유도되었다. MET x MET 이중특이적 항체를 이용한 SNU5 세포의 치료는 MET 경로의 하류 효과기를 억제하였다. MET 증폭 비소세포 폐암 선암종 세포주 NCI-H1993에 대해서도 유사한 결과를 얻었다(Kubo 등의 문헌["MET gene amplification or EGFR mutation activate MET in lung cancers untreated with EGFR tyrosine kinase inhibitors," Int. J. Cancer 2009 Apr 15; 124(8): 1778-1784] 참조).

[0510] **실시예 13. EBC-1 세포에서 MET x MET 이중특이적 항체는 단일특이적 항체보다 더 강력하게 MET 분해를 유도하고, 경로 활성을 억제하고, 종양 성장을 억제한다**

[0511] MET-증폭 인간 폐 편평세포 암종 EBC-1 세포(Lutterbach 등의 문헌["Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival," Cancer Res. 2007 Mar 1;67(5):2081-8])를 전술한 바와 같이 대조군 항체 또는 10 μg/ml의 MET x MET 이중특이적 항체로 18시간 동안 치료하였다. pMET 및 pErk 발현에 의해 확인된 MET 발현 및 MET 경로 활성화는 표시된 항체를 이용한 면역블로팅으로 결정하였다. 면역블롯은 도 11에 도시되어 있다.

[0512] MET 유전자 증폭을 보유한 EBC-1 세포를 MET x MET 이중특이적 항체로 치료한 결과, 대조군 항체로 치료한 것보다 더 강력한 MET 분해가 유도되었다. MET x MET 이중특이적 항체를 이용한 EBC-1 세포의 치료는 MET 경로의 하류 효과기를 억제하였다.

[0513] 또 다른 실험에서, 500만 개의 EBC-1 세포를 C.B.-17 SCID 마우스의 옆구리에 피하 이식하였다. 종양 부피가 약 150 mm^3에 도달하면, 마우스를 6개의 군으로 무작위 배정하고, 25 mg/kg의 대조군 항체 또는 25 mg/kg의 MET x MET 이중특이적 항체 H4H14639D로 주 2회 치료하였다. 이식 후 30일 동안 종양 성장을 모니터링하고, 시간 경과에 따라 각 실험군에 대해 종양 부피(mm^3)를 측정하였다. 결과는 표 16 및 도 12에 나타나 있는데, 이는 MET x MET 이중특이적 항체가 EBC-1 종양의 성장을 유의하게 억제함을 보여준다.

표 16

[0514]

상대적인 EBC-1 종양 성장	
치료	치료 시작 대비 종양 성장(mm^3) (평균 ± SEM)
25 mg/kg 대조군	1394 ± 226
25 mg/kg H4H14639D	89 ± 47

[0515] **실시예 14 MET x MET 이중특이적 항체는 단일 특이적 항체보다 더 강력하게 Hs746T 위암 세포의 시험관내 성장을 억제한다**

[0516] 인간 위암종 세포의 성장에 MET x MET 이중특이적 항체가 미치는 효과를 시험관 내에서 평가하였다. 2,500개의 Hs746T 인간 위암종 세포(H. Smith, J. Nat'l. Cancer Inst. 62(2): 225-230, 1979)를 96 웰 플레이트에 시딩하고, 10% FBS가 보충된 변형된 Dulbecco 배지에서 배양하였다. 세포를 (1) 5 μg/ml의 각각의 2가 단일 특이적 항-MET 항체(H4H13306P2 또는 H4H13312P2), (2) 2개의 2가 단일특이적 항-MET 부모 항체(H4H13306P2 및 H4H13312P2, 각각 2.5 μg/ml)의 조합, 또는 (3) H4H13306P2 유래의 하나의 아암 및 H4H13312P2 유래의 다른 하나의 아암을 함유하는 5 μg/ml의 이중특이적 항체(H4H14639D)로 치료하였다. 이어서, 5% CO_2 하에 37℃에서 세포를 인큐베이션하였다. 5일 후, Spectramax® M3 플레이트 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)에서 지시 염료 Alamar blue®(ThermoFischer Scientific, Waltham, MA)가 이의 고 형광성 형태로 환원하는 것을 측정하여 상대 세포 성장을 결정하였다. 형광의 증가는 세포 성장과 상관된다. 표 17은 대조군(미치료) Hs746T 세포 성장에 대해 정규화된 각 항체 치료에 대한 상대적인 Hs746T 세포 성장을 도시한 것이다. 이중특이적 항체인 H4H14639D는 이의 부모 단일특이적 항체보다 더 강력하게 Hs746T 세포의 증식을 개별적으로 또는 조합하여 억제한다.

표 17

[0517]

정규화된 Hs746T 세포 성장		
	상대적인 세포 성장 (n = 3)	표준 편차
대조군	1	0.133497801
H4H14639D	0.647408139	0.019090432
H4H13306P2	1.623312821	0.189647479
H4H13312P2	0.852680493	0.01728527
H4H13306P2+H4H13312P2	1.767720125	0.077445717

[0518] Hs746T 위암 세포를 대조군 항체, MET x MET 이중특이적 항체 H4H14639D, 항-MET 부모 항체 H4H13306P2, 항-MET 부모 항체 H4H13312P2, 및 부모 항체 1과 2의 조합(각 항체 2 μg/ml씩)으로 치료하였다. 5일 후, ALAMAR BLUE® 시약의 환원에 의해 세포 성장을 결정하였다(도 13, 패널 A). Hs746T 위암 세포에서, MET x MET 이중특이적 항체는 부모 항체 단독 또는 이들의 조합에 비해 세포 성장을 억제하였고, 이의 부모 항체보다 더 효과적으로 MET 경로 활성화를 억제하였다.

[0519] 96 웰 플레이트 내의 Hs746T 세포를 25 μg/mL 대조군 항체, 1 μg/mL, 10 μg/mL 또는 25 μg/mL 1가 MET 항체, 또는 1 μg/mL, 10 μg/mL 또는 25 μg/mL MET x MET 이중특이적 항체로 치료하였다. 5일 후, alamarBlue® 시약의 환원에 의해 Hs746T 위암 세포의 성장을 결정하였다(도 13, 패널 B). MET x MET 이중특이적 항체는 MET-증폭 세포의 성장을 강력하게 억제한다.

[0520] **실시예 15. MET x MET 이중특이적 항체는 시험관 내에서 NCI-H596 폐암 세포의 성장을 유도하지 않는다**

[0521] 인간 비소세포 폐암(NSCLC) 세포(NCI-H596)의 성장에 MET x MET 이중특이적 항체가 미치는 효과를 시험관 내에서 평가하였다. 10,000개의 NCI-H596 폐 선편평세포 암종 세포(Nair 등의 문헌[J. Nat'l. Cancer Inst. 86(5): 378-383, 1994])를 96 웰 플레이트 내에, 1% 소태아혈청(FBS)이 보충된 배지 중 0.66% 한천 층에 시딩하였다. 0.3% 아가로오스와 함께 1% FBS가 보충된 RPMI 1640 배지에서 세포를 배양하였다. 세포를 (1) 5 μg/ml의 각각의 부모 2가 단일 특이적 항-MET 항체(H4H13306P2 또는 H4H13312P2), (2) 2개의 2가 단일특이적 항-MET 항체(H4H13306P2 및 H4H13312P2, 각각 2.5 μg/ml)의 조합, (3) H4H13306P2 유래의 하나의 아암 및 H4H13312P2 유

래의 다른 하나의 아암을 함유하는 5 μg/ml의 이중특이적 항체(H4H14639D), 또는 (4) 100 ng/mL의 간세포 성장 인자(HFG)로 치료하였다. 이어서, 5% CO_2 하에 37℃에서 세포를 인큐베이션하였다. 2주 일 후, Spectramax® M3 플레이트 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)에서 지시 염료 Alamar blue®(Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA)가 이의 고 형광성 형태로 환원하는 것을 측정하여 상대 세포 성장을 결정하였다. 형광의 증가는 세포 성장과 상관된다. 표 18 및 도 14는 대조군(미치료) NCI-H596 세포 성장에 대해 정규화된 각 항체 치료에 대한 상대적인 NCI-H596 세포 성장을 도시한 것이다. HGF로 NCI-H596 폐암 세포를 치료한 결과, 연질 한천에서 성장이 강하게 유도되었다. MET x MET (도 14의 MM) 이중특이적 항체 H4H14639D는 대조군 치료 세포에 비해 성장을 유의하게 변화시키지 않았다. 각각의 부모 2가 단일특이적 항체 H4H13306P2(M1) 또는 H4H13312P2(M2)를 개별적으로, 또는 조합하여(H4H13306P2 및 H4H13312P2)(M1M2) 이용한 경우 세포 성장의 적당한 유도가 관찰되었다.

표 18

[0522]

정규화된 NCI-H596 세포 성장		
	상대적인 세포 성장 (n = 3)	표준 편차
대조군	1	0.030074808
H4H14639D	1.070339237	0.075103746
H4H13306P2	2.9593578	0.337877264
H4H13312P2	1.686580346	0.145670753
H4H13306P2+H4H13312P2	1.693724668	0.168651046
HGF	7.87655937	0.46057617

[0523] **실시예 16. MET x MET 이중특이적 항체는 단일 특이적 항체보다 더 강력하게 SNU5 위암 세포의 시험관 내 성장을 억제한다**

[0524] 인간 위암종 세포의 성장에 MET x MET 이중특이적 항체가 미치는 효과를 시험관 내에서 평가하였다. 2,500개의 SNU5 인간 위 암종 세포(Ku와 Park의 문헌[Cancer Res. Treat. 37(1): 1-19, 2005])를 96 웰 플레이트에 시딩하고, 20% FBS가 보충된 Iscove의 변형된 Dulbecco 배지에서 배양하였다. 세포를 (1) 5 μg/ml의 각각의 2가 단일 특이적 항-MET 항체(H4H13306P2 또는 H4H13312P2), (2) 2개의 2가 단일특이적 항-MET 항체(H4H13306P2 및 H4H13312P2, 각각 2.5 μg/ml)의 조합, 또는 (3) H4H13306P2 유래의 하나의 아암 및 H4H13312P2 유래의 다른 하나의 아암을 함유하는 5 μg/ml의 이중특이적 항체(H4H14639D)로 치료하였다. 이어서, 5% CO_2 하에 37℃에서 세포를 인큐베이션하였다. 5일 후, Spectramax® M3 플레이트 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)에서 지시 염료 Alamar blue®(Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA)가 이의 고 형광성 형태로 환원하는 것을 측정하여 상대 세포 성장을 결정하였다. 형광의 증가는 세포 성장과 상관된다. 표 19는 대조군(미치료) SNU5 세포 성장에 대해 정규화된 각 항체 치료에 대한 상대적인 SNU5 세포 성장을 도시한 것이다. 이중특이적 항체인 H4H14639D는 이의 부모 단일특이적 항체보다 더 강력하게 SNU5 세포의 증식을 억제한다.

표 19

[0525]

정규화된 SNU5 세포 성장		
	상대적인 세포 성장 (n = 3)	표준 편차
대조군	1	0.070814765
H4H14639D	0.271100069	0.01324024
H4H13306P2	0.766317547	0.061930288
H4H13312P2	0.431990234	0.033183065
H4H13306P2+H4H13312P2	0.331287005	0.012042949

[0526] **실시예 17. MET x MET 이중특이적 항체는 Hs746T 종양 이종이식편의 퇴행을 유도한다**

[0527] 면역손상 마우스 모델에서 인간 위 암종 종양에 MET x MET 이중특이적 항체가 미치는 효과를 평가하였다. 3백만 개의 Hs746T 인간 위 암종 세포를 CB-17 SCID 마우스의 옆구리에 피하 이식하였다(Bancroft 등의 문헌[J. Immunol. 137(1): 4-9, 1986] 참조). 종양 부피가 약 200 mm^3에 도달하면, 마우스를 6개의 군으로 무작위 배정하고, 25 mg/kg의 대조군 항체 또는 25 mg/kg의 MET x MET 이중특이적 항체(H4H14639D)로 주 2회 치료하였다.

대조군을 대상으로 이식 후 16일 동안 종양 성장을 모니터링하여, 대조군으로 치료한 종양이 언제 임상시험 한계 크기에 도달하는지를 모니터링하였다. H4H14639-치료군의 경우, 이식 후 30일 동안 종양 성장을 모니터링하였다.

[0528] MET x MET 이중특이적 항체로 종양을 치료한 경우, 치료 시작에 비해 21일에 걸쳐 종양 크기의 퇴행이 유도되었다. 대조군-치료 종양은 16일의 성장 기간에 걸쳐 약 12배의 평균 부피 증가를 나타냈다(표 20). MET x MET 이중특이적 항체로 인한 Hs746T 종양 퇴행을 보여주는, 시간 경과에 따른 종양 부피는 도 15에 도시되어 있다.

표 20

[0529]

Hs746T 위 종양 성장	
항체 (mg/kg)	**치료 시작 대비 종양 성장(mm^3) (평균 ± SEM)**
대조군 (10)	1164 ± 138
H4H14639D (25)	-215 ± 8.3

[0530] **실시예 18. MET x MET 이중특이적 항체는 SNU5 종양 이종이식편의 퇴행을 유도한다**

[0531] 면역손상 마우스 모델에서 인간 위 암종 종양에 MET x MET 이중특이적 항체가 미치는 효과를 평가하였다. 1000만 개의 SNU5 인간 위 암종 세포를 CB-17 SCID 마우스의 옆구리에 피하 이식하였다. 종양 부피가 약 500 mm^3에 도달하면, 마우스를 5개의 군으로 무작위 배정하고, 10 mg/kg의 대조군 항체 또는 1 mg/kg 또는 10 mg/kg의 MET x MET 이중특이적 항체(H4H14639D)로 주 2회 치료하였다. 이식 후 81일 동안 종양 성장을 모니터링하여, 대조군으로 치료한 종양이 언제 임상시험 한계 크기에 도달하는지를 모니터링하였다.

[0532] 1 mg/kg 또는 10 mg/kg의 MET x MET 항체로 치료한 마우스의 종양은 각각 약 95% 또는 98%의 평균 크기 감소를 나타냈다. 대조군-치료 종양은 치료 시작 대비 약 12배의 평균 부피 증가를 나타냈다(표 21).

표 21

[0533]

SNU5 위 종양 성장	
항체 (mg/kg)	**치료 시작 대비 종양 성장(mm^3) (평균 ± SEM)**
대조군 (10)	1123 ± 194
H4H14639D (1)	-477 ± 43
H4H14639D (10)	-492 ± 18

[0534] 피하 이식된 SNU5 종양을 대조군 항체, 1 mg/kg 또는 10 mg/kg의 1가 MET 항체, 또는 1 mg/kg 또는 10 mg/kg의 MET x MET 이중특이적 항체로 주 2회 치료하였다. MET x MET 이중특이적 항체로 치료한 마우스들에서는 시간 경과에 따라 MET-증폭 SNU5 종양의 강력하고 지속적인 퇴행(즉, 종양 부피의 감소)이 관찰되었다(도 16, 패널 A). 연구 종료 종양에서 단백질을 추출하고, MET 인산화(pMET 발현)으로 표시된 것과 같은 MET 발현 및 경로 활성화를 면역블로팅에 의해 결정하였다. MET x MET로 치료한 마우스(종양)는 대조군에 비해 MET 및 pMET 발현의 감소를 나타냈다(도 16, 패널 B). MET x MET 이중특이적 항체는 MET 증폭을 보유한 종양의 강력한 억제제이다.

[0535] **실시예 19: MET x MET 이중특이적 항체는 U87-MG 종양 이종이식편의 퇴행을 유도한다**

[0536] 면역손상 마우스 모델에서 인간 교아종 종양에 MET x MET 이중특이적 항체가 미치는 효과를 평가하였다. 500만 개의 U87-MG 인간 교아종 세포(Vordermark와 Brown의 문헌[Int. J. Radiation Biol. 56(4): 1184-1193, 2003])를 CB-17 SCID 마우스의 옆구리에 피하 이식하였다. U87-MG 교아종 이종이식 모델은 자가분비 HGF 신호 전달에 의해 유도된다. 종양 부피가 약 100 mm^3에 도달하면, 마우스를 6개의 군으로 무작위 배정하고, 대조군 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항체(H4H14639D)로 치료하였다. 25 mg/kg의 항체(대조군 또는 MET x MET)를 각 마우스에게 주 2회 투여하였다. 이식 후 29일 동안 종양 성장을 모니터링하여, 대조군으로 치료한 종양이 언제 임상시험 한계 크기에 도달하는지를 모니터링하였다.

[0537] MET x MET 항체로 치료한 마우스의 종양은 약 38%의 크기의 평균 감소를 나타낸 반면, 대조군 치료 종양은 29일의 성장 기간에 걸쳐 약 19배의 평균 부피 증가를 나타냈다(표 22). MET x MET 이중특이적 항체로 인한 U87-MG

종양 퇴행을 보여주는, 시간 경과에 따른 종양 부피는 도 17에 도시되어 있다.

표 22

[0538]

교아세포종 종양 성장	
항체 (mg/kg)	치료 시작 대비 종양 성장(mm^3) (평균 ± SEM)
대조군 (25)	1777 ± 98
H4H14639D (25)	-38 ± 18

[0539] **실시예 20. MET x MET 이중특이적 항체는 U118-MG 종양 이종이식편의 성장을 억제한다**

[0540] 면역손상 마우스 모델에서 인간 교아종 종양에 MET x MET 이중특이적 항체가 미치는 효과를 평가하였다. U118-MG 교아종 이종이식 모델은 자가분비 HGF 신호 전달에 의해 유도된다. 5백만 개의 U118-MG 인간 교아종 세포(Olopade 등의 문헌[Cancer Research 52: 2523-2529, 1992])를 CB-17 SCID 마우스의 옆구리에 피하 이식하였다. 종양 부피가 약 100 mm^3에 도달하면, 마우스를 6개의 군으로 무작위 배정하고, 대조군 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항체(H4H14639D)로 치료하였다. 25 mg/kg의 항체(대조군 또는 MET x MET)를 각 마우스에게 주 2회 투여하였다. 이식 후 72일 동안 종양 성장을 모니터링하였다.

[0541] MET 항체는 72일의 기간에 걸쳐 99%만큼 종양 성장을 억제하였다(표 23).

표 23

[0542]

교아세포종 종양 성장		
항체 (mg/kg)	치료 시작 대비 종양 성장(mm^3) (평균 ± SEM)	대조군 대비 종양 성장 감소율 (%)
대조군 (25)	1228 ± 123	-
H4H14639D (25)	11 ± 18	99.1

[0543] 또 다른 실험에서, 마우스에서 피하 이식된 U118-MG 교아세포종 종양을 25 mg/kg 대조군 항체, 1가 MET 항체 또는 MET x MET 이중특이적 항체로 주 2회 치료하였다. 각 실험군에 대해 시간 경과에 따른 종양 부피(mm^3)를 측정하였다. 결과는 표 18에 나타나 있는데, 이는 MET x MET 이중특이적 항체가 U118-MG 종양의 성장을 억제함을 보여준다.

[0544] **실시예 21: 메이탄시노이드 합성**

[0545] 아래에 기술된 바와 같이 메이탄신-3-N-메틸-L-알라닌-N-Me-베타-알라닌-카바밀-(p-아미노)벤질-시트룰린-발린-아디포일-숙시네이트(도 20의 화합물 **1**)를 화합물 **2**로부터 합성하였다(도 19).

[0546] ***메이탄신-3-N-메틸-L-알라닌-Fmoc-N-Me-베타-알라닌 (화합물 3, 도 19).*** Des-아세틸-메이탄신(화합물 **2**, 도 19, 0.433 g, 0.666 mmol), Fmoc-N-Me-베타-Ala(0.434 g, 1.33 mmol), 및 HATU(0.757 g, 1.99 mmol)를 칭량하여 건조 플라스크에 넣고, 무수 DMF(9 mL)에 용해시키고, 4-메틸모르폴린(0.300 mL, 2.73 mmol)으로 처리하였다. 플라스크를 고무 격막으로 밀봉하고, 아르곤으로 퍼징하고, 반응물을 주변 온도에서 교반하였다. 3일 후, 혼합물을 증발시켜 오일로 만들고, 아세토니트릴 및 물에 용해시키고, 275 g의 C18 실리카 컬럼(20분에 걸쳐 물 중 30~90% 아세토니트릴, 2가지 이동상 모두에서 0.05% 아세트산)을 이용해 플래시 크로마토그래피로 정제하였다. 생성물 분획을 동결건조시켜 표제 화합물을 백색 고형분으로서 수득하였다. 미정제물을 80 g 실리카 겔 컬럼(17분에 걸쳐 EtOAc~5:5:1 EtOAc:DCM:MeOH)을 이용해 정제하였다. 순수 분획을 합치고, 증발시키고, 진공에서 밤새 건조시켜 표제 화합물을 백색 고형분으로서 수득하였다(0.424 g, 66%). MS (ESI, pos.): $C_{51}H_{61}ClN_4O_{12}$에 대해 계산된 값 956.4; 확인된 값 956.9 (M+H), 979.0 (M+Na), 939.0 (M-H_2O+H).

[0547] ***N-터트-부톡시카보닐-N-메틸-베타-알라닌 숙시네이트 에스테르 (화합물 4, 도 19).*** 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 상업적 Boc-N-Me-베타-Ala-OH로부터 표제 화합물을 제조하였다(Widdison 등의 문헌[*J. Med.* Chem., **2006**, *49* (14), 4401] 참조). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 3.62 (bm, 2H), 2.88 (m, 9H), 1.47 (s, 9H).

[0548] ***메이탄신-3-N-메틸-L-알라닌-Boc-N-Me-베타-알라닌 (화합물 5, 도 19).*** *방법 A:* 선행 단계의 생성물(화합물 **4**, 도 19, 0.453 g, 1.51 mmol) 및 des-아세틸-메이탄신(화합물 **2**, 도 19, 0.304 g, 0.468 mmol)의 생성물을 3:1의 아세토니트릴:물(8 mL)에 용해시키고, 1M 수성 $NaHCO_3$(0.5 mL)으로 처리하고, 주변 온도에서 18시간 동안 교반하였다. TLC에 의해 결정된 바와 같이 반응이 완료되면, 반응물을 염수와 함께 10분 동안 교반하고 에틸 아세테이트(EtOAc)로 3회 추출하였다. 그런 다음, 합쳐진 유기층을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 여액을 진공에서 농축시키고 건조시켜 황금색 시럽을 만들고, 이를 20 g 실리카 겔 카트리지(15분에 걸쳐 EtOAc 중 0~10% MeOH)를 이용해 플래시 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 백색 고형분으로서 수득하였다(0.084 g, 43%). MS (ESI, pos.): $C_{41}H_{59}ClN_4O_{12}$에 대해 계산된 값 834.4; 확인된 값 835.2 (M+H), 857.2 (M+Na), 817.4 (M-H_2O+H).

[0549] *방법 B:* Boc-N-Me-베타-Ala-OH(0.294 g, 1.45 mmol)를 무수 DMF(5 mL)에 용해시키고, 펜타플루오로페닐 디페닐포스피네이트(FDPP, 0.555 g, 1.44 mmol)로 처리하고, 반응물을 주변 온도에서 30분 동안 교반하였다. 그런 다음, 혼합물을 무수 DMF(7 mL) 중 des-아세틸-메이탄신(화합물 **2**, 도 19, 0.462 g, 0.711 mmol) 및 디이소프로필에틸아민(DIEA, 0.250 mL, 1.44 mmol)의 혼합물이 담긴 더 큰 플라스크에 옮기고, 고무 격막으로 플라스크를 밀봉하고, 아르곤으로 퍼징하고, 반응물을 주변 온도에서 다시 교반하였다. 24시간 후, 반응물을 진공 하에 농축시켜 오일로 만들고, 아세트산에틸(EtOAc, 2 mL)에 용해시키고, 40 g 실리카 겔 카트리지(15분에 걸쳐 EtOAc~5:5:1의 EtOAc/DCM/MeOH)를 이용해 정제하여 표제 화합물을 연황색 고형분으로서 수득하였다(0.468 g, 79%). MS (ESI, pos.): $C_{41}H_{59}ClN_4O_{12}$에 대해 계산된 값 834.4; 확인된 값 857.2 (M+Na), 817.2 (M-H_2O+H).

[0550] ***메이탄신-3-N-메틸-L-알라닌-N-Me-베타-알라닌 (화합물 6, 도 19).*** *방법 A:* 메이탄신-N-Me-L-Ala-Boc-N-Me-베타-Ala(화합물 **5**, 도 19, 0.464 g, 0.555 mmol)를 아세토니트릴/물/트리플루오로아세트산(7 mL)의 3:1:1 혼합물에 용해시키고, 고무 격막으로 플라스크를 밀봉하고, 아르곤으로 퍼징하고, 반응물을 상온에서 24시간 동안 교반한 다음, 캡핑하고, 3일 동안 -20℃에서 보관하였다. 미정제 반응 혼합물을 2시간 동안 주변 온도로 가온시키고, 진공에서 잠시 농축시키고, 100 g의 C18 RediSep Gold 컬럼(25분에 걸쳐 물 중 20~80% 아세토니트릴, 2가지 용매 모두에서 0.1% TFA)을 이용해 정제하고, 합쳐진 순수 분획을 주변 온도에서 부분적으로 증발시키고, 드라이아이스 조에서 냉동시키고, 동결 건조시켜 표제 화합물을 연황색 고형분으로서 수득하였다(0.295 g, 63%). MS (ESI, pos.): $C_{36}H_{51}ClN_4O_{10}$에 대해 계산된 값 734.3; 확인된 값 735.7 (M+H), 1471.3 (2M+H).

[0551] *방법 B:*메이탄신-N-Me-L-Ala-Fmoc-베타-Ala(화합물 **3**, 도 19, 0.422 g, 0.441 mmol)를 DMF 중 5% 피페리딘(6.00 mL, 3.04 mmol)에 용해시키고, 반응 플라스크를 고무 격막으로 밀봉하고, 아르곤으로 퍼징하고, 혼합물을 주변 온도에서 교반하였다. 3시간 후, LCMS에 의해 반응 완료를 확인되면, 반응물을 진공에서 농축시키고, 밀봉하여, -20℃에서 밤새 보관하였다. 미정제 생성물을 주변 온도로 가온시키고, 아세토니트릴 및 10% 아세트산 용액(각각 3 mL)으로 처리하고, 275 g의 C18 실리카 컬럼(20분에 걸쳐 물 중 10~90% 아세토니트릴, 양 용매 중 0.05% 아세트산)을 이용해 플래시 크로마토그래피로 정제하였다. 생성물 분획을 동결건조시켜 표제 화합물을 백색 고형분으로서 수득하였다. 고형분을 건식 디에틸 에테르와 함께 3회 분쇄하고, 여과하고, DCM으로 고형분에서 프릿(frit)을 씻어내고, 여액을 증발시키고 진공에서 건조시켜 표제 화합물을 백색 고형분으로서 수득하였다(0.311 g, 89%). MS (ESI, pos.): $C_{36}H_{51}ClN_4O_{10}$에 대해 계산된 값 734.3; 확인된 값 735.0 (M+H).

[0552] ***메이탄신-3-N-메틸-L-알라닌-N-Me-베타-알라닌-카바밀-(p-아미노)벤질-시트룰린-발린-Fmoc (화합물 7, 도 20).*** *단계 1:* 이전 단계의 생성물(화합물 **6**, 도 19, 0.310 g, 0.390 mmol), 1-하이드록시-7-아자벤조트리아졸(HOAT, 0.164 g, 1.20 mmol), 중탄산나트륨(0.138 g, 1.64 mmol), 및 Fmoc-발린-시트룰린-(p-아미노)벤질-(p-니트로페닐)카보네이트(0.595 g, 0.776 mmol, 당업계에 공지된 방법에 의해 제조됨, Gangwar 등의 미국 특허 제7,714,016 B2호 참조)를 무수 DMF(10 mL)에 용해시키고, 고무 격막으로 반응 플라스크를 밀봉하고, 아르곤으로 퍼징하고, 혼합물을 주변 온도에서 교반하였다. 24시간 후, 반응물을 진공에서 부분적으로 증발시켜 약 2~3 mL로 만들고, 10% 아세트산 용액과 물(각각 약 1 mL)로 처리하고, 아세토니트릴(약 6 mL)에 용해시키고, 275 g의 C18 실리카 컬럼(20분에 걸쳐 물 중 30~90% 아세토니트릴, 양 용매 중 0.05% 아세트산)을 이용해 플래시 크로마토그래피로 정제하였다. 부분 증발, 동결, 및 동결 건조를 통해 표제 화합물을 백색 고형분으로서 수득하였다(0.362 g, 68%). MS (ESI, pos.): $C_{70}H_{88}ClN_9O_{17}$에 대해 계산된 값 1361.6; 확인된 값 1362.1 (M+H), 1384.1 (M+Na), 1344.1 (M-H_2O+H).

[0553] *단계 2:*이전 단계의 생성물(0.360 g, 0.264 mmol)을 DMF(7 mL) 중 5% 피페리딘에 용해시키고, 반응 플라스크를

고무 격막으로 밀봉하고, 아르곤으로 퍼징하고, 혼합물을 주변 온도에서 교반하였다. 3시간 후, 반응물을 진공에서 증발시키고, 잔류물을 10% 아세트산 용액(2 mL)로 처리하고, 아세토니트릴(4 mL)에 용해시키고, 275 g의 C18 실리카 컬럼(20분에 걸쳐 물 중 10~70% 아세토니트릴, 양 용매 중 0.05% 아세트산)을 이용해 플래시 크로마토그래피로 정제하였다. 순수 분획을 합치고, -20℃에서 밤새 보관하고, 25~30℃에서 진공에서 부분적으로 증발시키고, 드라이아이스 상에서 냉동시키고, 6일 동안 동결 건조시켜 표제 화합물을 연황색 고형분으로서 수득하였다(0.303 g, 95%). MS (ESI, pos.): $C_{15}H_{78}ClN_9O_{15}$에 대해 계산된 값 1139.5; 확인된 값 1140.1 (M+H), 1162.0 (M+Na).

[0554] ***메이탄신-3-N-메틸-L-알라닌-N-Me-베타-알라닌-카바밀-(p-아미노)벤질-시트룰린-발린-아디프산 (화합물 8, 도 20).*** 이전 단계의 생성물(화합물 **7**, 도 20, 0.205 g, 0.171 mmol), 아디프산(0.258 g, 1.77 mmol), 및 2-에톡시-1-에톡시카보닐-1,2-디하이드로퀴놀린(EEDQ, 0.215 g, 0.869 mmol)을 건조 DCM(10 mL) 및 무수 메탄올(5 mL)에 용해시키고, 반응 플라스크를 고무 격막으로 밀봉하고, 아르곤으로 퍼징하고, 혼합물을 주변 온도에서 교반하였다. 21시간 후, 반응물을 진공에서 증발시키고, 잔류물을 약간의(수 mL) 아세토니트릴/물에 용해시키고, 150 g의 C18 실리카 컬럼(17분에 걸쳐 물 중 20~80% 아세토니트릴, 양 용매 중 0.05% 아세트산)을 이용해 플래시 크로마토그래피로 정제하였다. 18시간 동안 순수 분획의 부분 증발, 동결, 및 동결 건조를 통해 표제 화합물을 백색 고형분으로서 수득하였다(0.140 g, 65%). MS (ESI, pos.): $C_{61}H_{86}ClN_9O_{18}$에 대해 계산된 값 1267.6; 확인된 값 1268.9 (M+H), 1290.9 (M+Na).

[0555] ***메이탄신-3-N-메틸-L-알라닌-N-Me-베타-알라닌-카바밀-(p-아미노)벤질-시트룰린-발린-아디포일-숙시네이트 (화합물 1, 도 20).*** 이전 단계의 생성물(화합물 **8**, 도 20, 0.061 g, 0.048 mmol), N-하이드록시숙신이미드(0.063 g, 0.55 mmol), 및 N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카보디이미드 염산염(EDC-HCl, 0.071 g, 0.37 mmol)을 건조 DCM(7 mL)에 용해시키고, 반응 플라스크를 고무 격막으로 밀봉하고, 아르곤으로 퍼징하고, 혼합물을 주변 온도에서 교반하였다. 5일 후, 반응물을 진공에서 증발시키고, 잔류물을 약간의(수 mL) 아세토니트릴/물에 용해시키고, 100 g의 C18 실리카 컬럼(15분에 걸쳐 물 중 30~90% 아세토니트릴, 양 용매 중 0.05% 아세트산)을 이용해 플래시 크로마토그래피로 정제하였다. 18시간 동안 가장 깨끗한 생성물 분획의 부분 증발, 동결, 및 동결 건조를 통해 표제 화합물을 백색 고형분으로서 수득하였다(0.044 g, 67%). MS (ESI, pos.): $C_{65}H_{89}ClN_{10}O_{20}$에 대해 계산된 값 1364.6; 확인된 값 1365.7 (M+H), 1387.7 (M+Na), 1347.7 (M-H_2O+H). ^{1}H-NMR (500 MHz; $CDCl_3$): δ 7.56 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.20 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.71 (m, 1H), 6.62 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 6.39 (dd, *J* = 15.1, 11.3 Hz, 1H), 5.68 (dd, *J* = 15.3, 9.1 Hz, 1H), 5.38-5.32 (m, 1H), 5.03 (t, *J* = 15.1 Hz, 1H), 4.88 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.73 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 4.61 (dd, *J* = 9.1, 3.6 Hz, 1H), 4.26 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.17 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.61 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 3.57 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 3.46 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 3.33 (s, 3H), 3.27 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 3.17-3.07 (m, 5H), 2.97 (dd, *J* = 16.6, 9.9 Hz, 1H), 2.88 (d, *J* = 11.7 Hz, 3H), 2.84 (s, 4H), 2.77 (s, 2H), 2.66 (s, 2H), 2.62 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 2.56 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H), 2.32 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.15 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 2.10 (q, *J* = 6.8 Hz, 1H), 1.92 (s, 4H), 1.75 (m, 5H), 1.61 (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 1.27 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.22 (dt, *J* = 12.7, 6.3 Hz, 6H), 0.95 (t, *J* = 5.9 Hz, 7H), 0.78 (s, 3H).

[0556] 그 전체가 참조로서 본원에 통합된 WO 2015/031396(예를 들어, 단락 [00106]의 실시예 2)에 기술된 절차에 기초하여 DM1을 단일 부분 입체이성질체로서 합성하였다.

[0557] **실시예 22: 항체 접합, 및 접합체의 특성 분석**

[0558] 항체 접합

[0559] 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 8.0, 및 10~15%(v/v) DMA 중 항체(H4H14639D, H4H13312P, H4H14635D, 및 이소형 대조군; 10~20 mg/ml)를 실시예 21에 기술된 것과 같이 제조한 5~6배 과량의 SMCC-DM1 부분 입체이성질체(메이탄시노이드 A) 또는 메이탄신-3-N-메틸-L-알라닌-N-Me-베타-알라닌-카바밀-(p-아미노)벤질-시트룰린-발린-아디포일-숙시네이트(화합물 1, 도 20)(메이탄시노이드 B)와 주변 온도에서 2시간 동안 접합시켰다. 크기 배제 크로마토그래피 또는 광범위한 한외여과에 의해 접합체를 정제하고 멸균 여과하였다. 단백질 농도는 UV 스펙트럼 분석에 의해 결정하였다. 크기-배제 HPLC를 통해 사용된 모든 접합체의 90% 초과가 단량체인 것을 확인하였고, RP-HPLC를 통해 1% 미만의 미접합 링커 페이로드가 있음을 확인하였다. 모든 접합된 항체를 Hamblett 등의 문헌 [American Association for Cancer Research. 2004 Oct 15;10(20):7063-70]에 따라 UV에 의해 및/또는 원래 질량과 접합 후 질량 간의 차이에 의해 링커 페이로드 로딩 값에 대해 분석하였다. 항체에 대한 페이로드 비율은

표 24에 보고되어 있다.

표 24

[0560]

항체 약물 접합체 각각의 수율 및 항체에 대한 페이로드 비율			
항체	수율 (%)	DAR (MS)	DAR (UV)
H4H14639D-메이탄시노이드 A	60	3.8	3.7
H4H14639D-메이탄시노이드 B	50	2.4	2.4
H4H13312P-메이탄시노이드 A	60	4.1	4.1
H4H13312P-메이탄시노이드 B	50	2.3	2.5
이소형 대조군 REGN1945-메이탄시노이드 B	70	2.3	2.5
이소형 대조군 REGN1945-메이탄시노이드 A	80	3.7	3.7

[0561] 액체 크로마토그래피-질량 분석에 의한 접합체의 특성 분석

[0562] 항체에 대한 링커-페이로드의 로딩을 결정하기 위해, 접합체를 탈당화하고 LC-MS에 의해 분석하였다.

[0563] 검정을 위해, 50 μg의 접합체를 milli-Q 물로 1 mg/mL의 최종 농도까지 희석하였다. 10 μL의 PNGase F 용액[PNGase F 용액은 150 μL의 PNGase F 모액(New England Biolabs, Cat#P0704L)을 850 μL의 milli-Q 물에 첨가하고 잘 혼합하여 제조하였음]을 희석된 접합체 용액에 첨가한 다음 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 5 μL의 각 샘플을 LC-MS(Waters Synat G2-Si) 상에 주입하고, 25분에 걸쳐 0.1 mL/분의 구배와 이동상 20~40%로 용리하였다(이동상 A: H_2O 중 0.1% v/v FA; 이동상 B: 아세토니트릴 중 0.1% v/v FA). LC 분리는 80℃에서 Waters Acquity BEH C4 컬럼(1.0 X 50 mM, 1.7 μM)을 이용해 달성하였다.

[0564] 질량 분석 스펙트럼을 Masslynx 소프트웨어를 사용하여 디컨볼루션하고, 다음의 식을 사용하여 약물 대 항체 비율(DAR)을 계산하였다:

[0565] 1. 분포 피크 강도(PI)에 의한 약물(Dn)의 상대 백분율(%):

[0566] Dn% = PIn /∑(PI0+PI1+PI2.....+PIi)X100

[0567] (n= 0,1,2,3,...,i)

[0568] 2. 평균 DAR 계산:

[0569] DAR=∑(1XD1%+2XD2%+3XD3%+.....+iXDi%)

[0570] **실시예 23: 표면 플라스몬 공명으로 유도한, 접합된 인간 단클론 항-MET (단일특이적 및 이중특이적) 항체의 결합 친화도 및 동역학 상수**

[0571] MCC-DM1 부분 입체이성질체(메이탄시노이드 A) 또는 메이탄신-3-N-메틸-L-알라닌-N-Me-베타-알라닌-카바밀-(p-아미노)벤질-시트룰린-발린-아디포일-숙시네이트(화합물 1, 도 20)(메이탄시노이드 B) 중 어느 하나와 접합된 항-MET 항체에 대한 MET 결합의 평형 해리 상수(K_D 값)를 Biacore 2000 기기를 이용한 실시간 표면 플라스몬 바이오센서 검정을 사용해 결정하였다. Biacore 센서 표면을 먼저 단클론 마우스 항-인간 Fc 항체(GE, # BR-1008-39)와의 아민 결합에 의해 유도체화하여 항-MET ADC 및, 인간 불변 영역으로 발현된 미변형 부모 항체를 포획하였다. Biacore 결합 연구는 HEPES 완충 식염수(HBS)-EP 영동 완충액(0.01M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% v/v 계면활성제 P20)에서 수행하였다. 인간 MET는 C-말단 myc-myc-헥사히스티딘 태그(hMET-mmh)를 발현시켜 연구소 내에서 제조하였다. HBS-EP 영동 완충액 중에서 제조한 상이한 농도(3배 희석물)의 hMET-mmh(30nM 내지 1nM 범위)를 항-MET ADC 또는 항체가 포획된 표면 위에 40 μL/분의 유속으로 주입하였다. 포획된 ADC 및 단클론 항체 각각에 대한 hMET-mmh의 결합을 4분 동안 모니터링하였다. 이어서, HBS-EP 영동 완충액에서 hMET-mmh 해리를 6분 동안 모니터링하였다. 20mM H_3PO_4를 짧게 주입하여 항-인간 Fc 표면을 재생시켰다. 모든 결합 동역학 실험은 25℃에서 수행하였다.

[0572] 동역학 결합 속도 상수(k_a) 및 해리 속도 상수(k_d)는 Scrubber 2.0c 곡선 피팅 소프트웨어를 사용해 실시간 센서그램을 1:1 결합 모델에 피팅하여 결정하였다. 모든 센서그램은, 상응하는 분석물 센서그램에서 완충액 주입 센

서그램 신호를 차감하여 항체의 해리에 의해 야기된 인공물을 포획 표면으로부터 제거함으로써 이중으로 참조하였다. 결합 해리 평형 상수(K_D) 및 해리 반감기(t½)를 동적 속도 상수로부터 다음과 같이 계산하였다:

[0573] $$KD\,(M) = \frac{kd}{ka}, \quad \text{및} \quad t½\,(\text{분}) = \frac{\ln(2)}{60 * kd}$$

[0574] 메이탄시노이드 A 또는 메이탄시노이드 B가 접합된 항-Met 단일특이적 항체 및 이중특이적 항체에 대한 결합 동역학 파라미터가 아래 표 25에 나타나 있으며, 일부 실험은 2회 실행하였다.

표 25

[0575]

25℃에서, 접합된 단일특이적 및 이중특이적 단클론 항-MET 항체의 Biacore 결합 친화도						
항체	포획된 mAb (RU)	결합된 항원 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (M)	t½ (분)
H4H13312P2	148.1±1.2	12.3	2.59E+05	5.35E-03	2.07E-08	2.2
H4H13312P2	142.7±0.3	12.1	1.87E+05	4.85E-03	2.59E-08	2.4
H4H13312P2-메이탄시노이드 A	232.6±0.5	11.9	1.82E+05	7.18E-03	3.94E-08	1.6
H4H13312P2-메이탄시노이드 B	263.0±2.6	10.9	1.80E+05	6.32E-03	3.51E-08	1.8
H4H14639D	283.6±4.4	82.8	5.90E+05	1.56E-03	2.64E-09	7.4
H4H14639D-메이탄시노이드 A	207.7±0.8	55.8	4.95E+05	1.81E-03	3.65E-09	6.4
H4H14639D-메이탄시노이드 B	227.5±0.4	55.4	4.83E+05	1.87E-03	3.86E-09	6.2
H4H14639D-메이탄시노이드 A	284.0±1.1	62.8	4.70E+05	1.76E-03	3.74E-09	6.6
H4H14639D-메이탄시노이드 B	268.7±0.7	72.8	4.91E+05	1.45E-03	2.95E-09	8.0

[0576] **실시예 24. 항-MET 항체 약물 접합체(ADC)의 시험관 내 효능**

[0577] 본원에 기술된 항-MET 항체 약물 접합체(ADC)의 상대적 세포 사멸 효능을 결정하기 위해, 다양한 수준의 내인성 MET를 발현하는 다수의 세포주를 이용해 세포 사멸 검정을 수행하였다. EBC-1(Riken Cell Bank; # RBRC-RCB1965), MKN-45(JCRB; # JCRB0254), NCI-H1993(ATCC; # CRL-5909), 및 J.RT3(ATCC; # TIB-153) 세포주는 10% FBS + 1X 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민(P/S/G)이 포함된 RPMI 배지에서 유지시켰고, SNU-5(ATCC; # CRL-5973)는 10% FBS + 1X P/S/G가 포함된 Iscove 배지에서 유지시켰고, Hs746t(ATCC; # HTB-135) 및 HEK293(ATCC; # 003041)은 DME + 10% FBS + 1X P/S/G에서 유지시켰고, MDA-MB-231(ATCC; # HTB-26)은 10% FBS + 1X P/S/G + 1X 비필수 아미노산(NEAA)이 포함된 Liebowitz's L-15 배지에서 CO_2 없이 유지시켰고, U87MG(ATCC; # HTB-14)는 15% FBS + 1X P/S/G + 1X NEAA가 포함된 MEM Earle's Salts 배지에서 유지시켰고, T47D(ATCC; # HTB-133)는 10% FBS + 1X P/S/G + 10mM HEPES + 1mM 피루브산나트륨 + 10 ug/ml 소 인슐린이 포함된 RPM1 1640 배지에서 유지시켰고, A549(ATCC; # CCL-185)는 10% FBS + 1X P/S/G가 포함된 Kaighn's Nutrient Mixture F-12(HAM's F-12K) 배지에서 유지시켰다.

[0578] 초기에, 항-MET 항체의 상대 결합은 세포주의 전체 패널에 걸쳐 미접합 H4H14635D, H4H14639D, 및 H4H13312P2 항체를 이용해 유세포 계측법으로 평가하였다. 간략하게, $1x10^6$개의 세포를 10 μg/ml의 H4H14635D, H4H14639D, H4H13312P2, 또는 이소형 대조군 항체(REGN1945)와 함께 PBS + 2% FBS(FACS 완충액) 중에서 차가운 상태로 30분 동안 인큐베이션하였다. FACS 완충액으로 1회 세척한 후, 세포를 10 μg/ml의 Alexa647 접합 항-인간 이차 항체(Jackson ImmunoResearch, # 109-606-170)와 함께 차가운 상태로 30분 동안 인큐베이션하였다. FACS 완충액으로 1회 추가로 세척한 후, 샘플을 Cytofix(BD Biosciences, # 554655)로 고정시키고, FACS 완충액으로 여과하고, iQue 유세포 계측기(Intelicyte) 위에 흘렸다. 평균 형광 강도(MFI) 데이터는 FlowJo 소프트웨어(FlowJo LLC)를 사용하여 결정하였다. FACS 결합은 이소형 대조군 수준을 초과하는 배수 MFI 결합으로서 표현되며, 결과는 표 26에 요약되어 있다. 3개의 항-Met 항체의 상대 결합은 각 세포주 별로 유사하였고, 이소형 대조군보다는 447배 내지 7배 더 높았다. T47D, HEK293, 또는 J.RT3 세포에서는, 시험된 3개의 항-MET 항체 중 어느 하나의 검출 가능한 결합이 관찰되지 않았다.

[0579] 항-MET ADC의 시험관내 세포독성을 측정하기 위해, ADC로 3일 또는 6일 치료 후 핵 계수를 평가하였다. 요약하자면, 콜라겐이 코팅된 96 웰 플레이트(Greiner, VWR; # 82050-812)에 담긴 완전 성장 배지에 세포를 750~3000개/웰로 시딩하고, 37℃, 5% CO_2에서 밤새 성장시켰다. 세포 생존율 곡선의 경우, 연속 희석된 ADC, 미접합 항체, 또는 유리 페이로드를 (독소 농도를 기준으로) 100 nM 내지 0.01 nM 범위의 최종 농도로 세포에 첨가하고, 5% CO_2 하에 37℃에서 3일 또는 6일 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 4% 포름알데히드로 고정시킨 상태로 3 ug/ml Hoechst 33342 핵 염색제(Invitrogen, # H3570)로 처리하였다. ImageXpress micro XL(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)을 이용해 이미지를 획득하고, MetaXpress 이미지 분석 소프트웨어(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 통해 핵 계수를 결정하였다. 40 nM 디지토닌으로 치료한 세포의 백그라운드 핵 계수를 모든 웰로부터 차감하고, 생존율을 미치료 대조군의 백분율로서 표현하였다. IC_{50} 값은 10-점 반응 곡선(GraphPad Prism)에 대한 4-파라미터 로지스틱 방정식으로 결정하였다. 각 투여량-반응 곡선에 대한 미치료 조건도 분석에 포함되며, 최저 투여량으로 표시된다. IC_{50} 값 및 세포 사멸율을 표 27 및 28에 나타냈다.

[0580] 표 27에 요약된 바와 같이, 항-MET 항체-약물 접합체 H4H14639D-메이탄시노이드 A는 0.35 nM 내지 0.96 nM 범위의 IC_{50} 값으로 Met 증폭 EBC-1, SNU-5, MKN-45, NCI-H1993, 및 Hs746t 세포 배경에서 세포 생존력을 특이적으로 감소시켰다. 사멸된 세포의 백분율(최대 사멸율(%))은 73% 내지 100% 범위였다. H4H14639D-메이탄시노이드 A도 13.91 nM의 IC_{50} 값으로 A549 세포의 84%를 특이적으로 사멸시켰다. H4H14639D-메이탄시노이드 A의 IC_{50} 값은 저발현 세포주(MDA-MB-231 및 U87MG) 및 미발현 세포주(T47D, HEK293 및 J.RT3)에서 37 nM보다 높았다. 유사하게 접합된 이소형 대조군 항체는 35 nM보다 큰 IC_{50} 값으로 모든 세포주를 사멸시켰다. DM1의 이황화메틸 버전(MeS-DM1)은 0.07 nM 내지 2.86 nM 범위의 IC_{50} 값으로 모든 시험된 세포주를 사멸시켰다.

[0581] 별도의 실험에서, 3개의 항-Met 항체(H4H14639D, H4H14635D, 및 H4H13312P2)를 메이탄시노이드 A 또는 메이탄시노이드 B 메이탄시노이드 페이로드에 접합시키고, 6일간 치료 후 EBC-1, Hs746t, A549, Ant T47D 세포에서 시험관내 세포독성을 평가하였다. 표 28에 요약된 바와 같이, 모든 항-Met 항체-약물 접합체는 Met 양성 세포에서 세포 생존력을 강력하게 및 특이적으로 감소시켰으며, IC_{50} 값은 낮게는 EBC-1 세포에서 10 pM, Hs746t 세포에서 0.82 nM, A549 세포에서 3.5 nM이었다. 사멸된 세포의 백분율은 EBC-1 세포에서 95% 초과, Hs746t 세포에서 86% 초과, A549 세포에서 72% 초과였다. T47D 세포(Met 음성)는 항-Met ADC에 의해 특이적으로 사멸되지 않았다. 유사하게 접합된 이소형 대조군 항체는 시험된 세포주 모두에서 세포 생존율을 감소시켰는데, IC_{50} 값은 EBC-1 세포에서 5 nM 초과, Hs746t 세포에서 33 nM 초과, A549 및 T47D 세포에서 90 nM 초과였다. 미접합 H4H14639D는 EBC-1, Hs746t, 및 A549 세포에서 세포 생존율을 감소시켰지만, 접합된 항체보다 백분율이 더 낮았다. 미접합 H4H14635D 및 H4H13312P2는 시험된 모든 세포주에서 생존력에 영향을 미치지 않거나 거의 미치지 않았다. DM1의 이황화메틸 버전(MeS-DM1)은 0.12 nM 내지 1.39 nM 범위의 IC_{50} 값으로 모든 시험된 세포주를 사멸시켰다. 대조적으로, M24(메이탄시노이드 B로부터 방출된 페이로드)는 100nM을 초과하는 IC_{50}으로 세포를 사멸시켰다.

표 26

[0582]

종양 세포주에 대한 미접합 MET 항체의 FACS 결합.						
세포주	FACS 결합 (이소형 대조군을 초과하는 MFI 배수)					
	미염색	이차 항체 단독	REGN1945 (이소형 대조군)	H4H14635D	H4H14639D	H4H13312P2
EBC-1	0.7	0.6	1	263	252	147
SNU-5	1	1.2	1	477	454	235
MKN-45	1	0.8	1	183	156	94
NCI-H1993*	1	2	ND	ND	188	188
Hs746t	0.8	1.1	1	39	34	27
MDA-MB-231	3	5.6	1	11	12	7
U87MG	1.6	1.7	1	18	18	10
T47D	1	0.9	1	1.3	1	1.4
A549	0.7	0.5	1	12	10	7

HEK293	0.2	0.2	1	1.8	1.8	1.2
J.RT3	0.8	1	1	1.6	1.4	1.1

[0583] * NCI-H1993의 경우 미염색을 초과하는 배수로서 표현됨.

표 27

[0584]

3일 동안의 시험관 내 세포독성 검정에서 항-MET ADC의 IC_{50} 및 최대 사멸율 (%)								
항체-약물 접합체	EBC-1		SNU-5		MKN-45		NCI-H1993	
	IC_{50} (nM)	최대 사멸율 (%)	IC_{50} (nM)	최대 사멸율 (%)	IC_{50} (nM)	최대 사멸율 (%)	IC_{50} (nM)	최대 사멸율 (%)
DM1 (MeS-DM1)	2.22	90	1.22	99	2.73	85	2.86	81
H4H14639D	0.82	37	0.30	40	ND	0	ND	0
H4H14639D-메이탄시노이드 A	0.96	89	0.40	100	0.35	86	0.41	94
REGN1945-메이탄시노이드 A	35.06	65	>100	14	>100	39	49.42	68

항체-약물 접합체	Hs746t		MDA-MB-231		U87MG			
	IC_{50} (nM)	최대 사멸율 (%)	IC_{50} (nM)	최대 사멸율 (%)	IC_{50} (nM)	최대 사멸율 (%)		
DM1 (약물 무함유)	1.46	81	1.53	89	0.61	89		
H4H14639D	0.42	7	>100	6	>100	6		
H4H14639D-메이탄시노이드 A	0.56	73	>100	48	100	58		
REGN1945-메이탄시노이드 A	33.22	44	>100	42	94.71	58		

항체-약물 접합체	T47D		A549		HEK293		J.RT3	
	IC_{50} (nM)	최대 사멸율 (%)	IC_{50} (nM)	최대 사멸율 (%)	IC_{50} (nM)	최대 사멸율 (%)	IC_{50} (nM)	최대 사멸율 (%)
DM1 (약물 무함유)	1.33	91	2.56	97	0.15	95	0.07	100
H4H14639D	>100	0	>100	37	ND	0	>100	5
H4H14639D-메이탄시노이드 A	>100	6	13.91	84	40.90	65	37.82	59
REGN1945-메이탄시노이드 A	>100	1	>100	63	>100	44	39.79	70

표 28

[0585]

6일 동안의 시험관 내 세포독성 검정에서 항-MET ADC의 IC_{50} 및 최대 사멸율 (%)								
항체-약물 접합체	EBC-1		Hs746t		T47D		A549	
	IC_{50} (nM)	최대 사멸율 (%)	IC_{50} (nM)	최대 사멸율 (%)	IC_{50} (nM)	최대 사멸율 (%)	IC_{50} (nM)	최대 사멸율 (%)
DM1 (MeS-DM1)	0.12	62	1.39	88	0.24	96	0.49	90
M24 (메이탄시노이드 B 방출 페이로드)	>100	32	>100	10	>100	0	>100	10
H4H14639D	0.37	66	0.44	35	>100	0	0.17	29
H4H14639D-메이탄시노이드 A	0.27	97	0.82	87	>100	3	6.01	86
H4H14639D-메이탄시노이드 B	0.01	96	0.86	90	>100	0	3.54	80
H4H13312P2	>100	30	>100	0	>100	0	>100	7

H4H13312P2-메이탄시노이드 A	0.39	95	1.59	87	>100	6	18.30	89
H4H13312P2-메이탄시노이드 B	0.07	95	0.89	90	>100	3	27.10	85
H4H14635D	>100	11	>100	7	>100	7	>100	0
H4H14635D-메이탄시노이드 A	0.76	96	1.76	86	>100	92	6.78	91
H4H14635D-메이탄시노이드 B	0.26	96	2.32	89	>100	2	21.40	72
REGN1945	>100	0	>100	0	>100	0	>100	1
REGN1945-메이탄시노이드 A	28.08	93	33.06	76	>100	14	93.40	49
REGN1945-메이탄시노이드 B	5.01	97	>100	0	>100	1	>100	15

[0586] **실시예 25: 위암 세포에 대한 생체 내 효능**

[0587] 300만 개의 Hs746T 위암 세포를 C.B.-17 SCID 마우스의 옆구리에 피하 이식하였다. 종양 부피가 약 150 mm^3에 도달하면, 마우스를 6개의 군으로 무작위 배정하고 10 mg/kg의 대조군 항체 REGN1945-메이탄시노이드 B 또는 REGN1945-메이탄시노이드 A, 또는 3 또는 10 mg/kg의 H4H14639D-메이탄시노이드 A 또는 H4H14639D-메이탄시노이드 B로 치료하였다. 모든 항체를 주 1회의 빈도로 3회 투여하였다. 이식 후 37일 동안 종양 성장을 모니터링하였다.

[0588] 면역손상 마우스에서 인간 종양 이종이식편의 성장에 H4H14639D-메이탄시노이드 A 또는 H4H14639D-메이탄시노이드 B가 미치는 효과를 평가하였고, 그 결과는 표 29에 나타나 있다. 대조군 항체인 REGN1945-메이탄시노이드 B 또는 REGN1945-메이탄시노이드 A로 치료한 종양은 20일 이내에 임상시험 한계 크기까지 성장하였다. 3 mg/kg의 H4H14639D-메이탄시노이드 A로 치료한 종양은 27일 이내에 임상시험 한계 크기까지 성장하였다. 3 mg/kg의 H4H14639D-메이탄시노이드 B로 치료한 종양의 성장을 실험 기간 동안 억제하였다. 10 mg/kg의 H4H14639D-메이탄시노이드 A 또는 H4H14639D-메이탄시노이드 B를 이용한 종양 치료는 치료 시작 대비 종양 크기의 퇴행을 유도하였다.

표 29

[0589]

항-Met-C 항체 접합체로 치료한 SCID 마우스에서의 종양 성장	
항체 (mg/kg)	**치료 시작 대비 종양 성장(mm^3) (평균 ± SD)**
REGN1945-메이탄시노이드 A 10 mg/kg	1244 ± 199
REGN1945-메이탄시노이드 B 10 mg/kg	1345 ± 121
H4H14639D-메이탄시노이드 A 3 mg/kg	832 ± 15
H4H14639D-메이탄시노이드 A 10 mg/kg	-148 ± 0.17
H4H14639D-메이탄시노이드 B 3 mg/kg	19 ± 147
H4H14639D-메이탄시노이드 B 10 mg/kg	-137 ± 0

[0590] **실시예 26: 폐암 세포에 대한 생체 내 효능**

[0591] 500만 개의 EBC1 폐암 세포를 C.B.-17 SCID 마우스의 옆구리에 피하 이식하였다. 종양 부피가 약 170 mm^3에 도달하면, 마우스를 6개의 군으로 무작위 배정하고 15 mg/kg의 대조군 항체 REGN1945-메이탄시노이드 B 또는 2.5, 5, 10, 또는 15 mg/kg의 REGN1945-메이탄시노이드 B로 치료하였다. 항체를 주 1회의 빈도로 2회 투여하였다. 이식 후 73일 동안 종양 성장을 모니터링하였다.

[0592] 면역손상 마우스에서 인간 종양 이종이식편의 성장에 H4H14639D가 미치는 효과를 평가하였다. 대조군 항체인

REGN1945-메이탄시노이드 B로 치료한 종양은 24일 이내에 임상시험 한계 크기까지 성장하였다(IACUC 프로토콜은 직경이 2 cm, 대략 1500 mm^3를 초과하는 종양을 가진 동물은 희생시킬 것을 요구함). 2.5, 5, 10, 또는 15 mg/kg의 H4H14639D-메이탄시노이드 B를 이용한 종양 치료는 치료 시작 대비 종양 크기의 퇴행을 유도하였다. 결과를 표 30에 나타냈다.

표 30

[0593]

항-Met-C 항체 접합체로 치료한 SCID 마우스에서의 종양 성장	
항체 (mg/kg)	**치료 시작 대비 종양 성장(mm^3) (평균 ± SD)**
REGN1945-메이탄시노이드 B 15 mg/kg	1106 ± 165
H4H14639D-메이탄시노이드 B 2.5 mg/kg	-142 ± 24
H4H14639D-메이탄시노이드 B 5 mg/kg	-163 ± 0
H4H14639D-메이탄시노이드 B 10 mg/kg	-173 ± 0
H4H14639D-메이탄시노이드 B 15 mg/kg	-179 ± 0

[0594] **실시예 27: 환자 유래 NSCLC 종양에 대한 생체 내 효능**

[0595] Met-발현 NSCLC CTG-0165 환자 유래 종양을 nu/nu Nude 마우스의 옆구리에 피하 이식하였다. 종양 부피가 약 150 mm^3에 도달하면, 마우스를 6개의 군으로 무작위 배정하고 10 mg/kg의 대조군 항체 REGN1945-메이탄시노이드 B 또는 REGN1945-메이탄시노이드 A, 또는 3 또는 10 mg/kg의 H4H14639D-메이탄시노이드 A 또는 H4H14639D-메이탄시노이드 B로 치료하였다. 모든 항체를 주 1회의 빈도로 3회 투여하였다. 이식 후 61일 동안 종양 성장을 모니터링하였다.

[0596] 면역손상 마우스에서 인간 종양 이종이식편의 성장에 H4H14639D-메이탄시노이드 A 또는 H4H14639D-메이탄시노이드 B가 미치는 효과를 평가하였다. 대조군 항체인 REGN1945-메이탄시노이드 A 또는 REGN1945-메이탄시노이드 B로 치료한 종양은 27일 이내에 임상시험 한계 크기까지 성장하였다. 3 mg/kg의 H4H14639D-메이탄시노이드 A 또는 H4H14639D-메이탄시노이드 B로 치료한 종양의 성장을 27일 동안 억제하였다. 10 mg/kg의 H4H14639D-메이탄시노이드 A 또는 H4H14639D-메이탄시노이드 B를 이용한 종양 치료는 치료 시작 대비 종양 크기의 퇴행을 유도하였다. 데이터는 표 31에 제공되어 있다.

표 31

[0597]

항-Met-C 항체 접합체로 치료한 누드 마우스에서의 종양 성장	
항체 (mg/kg)	**치료 시작 대비 종양 성장(mm^3) (평균 ± SD)**
REGN1945-메이탄시노이드 A 10mg/kg	967± 136
REGN1945-메이탄시노이드 B 10mg/kg	1537 ± 373
H4H14639D-메이탄시노이드 A 3mg/kg	154 ± 227
H4H14639D-메이탄시노이드 A 10mg/kg	"-141 ± 2.3
H4H14639D-메이탄시노이드 B 3mg/kg	517 ± 362
H4H14639D-메이탄시노이드 B 10mg/kg	"-145 ± 2

[0598] **실시예 28: 인간 MET에 대한 항-Met 항체 H4H13312P2, H4H13306P2, 및 H4H14639D의 결합에 대한 수소/중수소 (H/D) 교환 기반 에피토프 맵핑**

[0599] 항-Met 항체 H4H13312P2, H4H13306P2, 및 H4H14639D와 상호작용하는 인간 간세포 성장 인자 수용체 엑토도메인(서열번호 155: myc-myc-헥사히스티딘(.mmh) 태그에 의해 발현된 인간 Met 이소형 1(Uniprot ID: P08581); 이하 hMet로서 지칭함)의 특이적 영역을 결정하기 위해 실험을 수행하였다. H4H13312P2 및 H4H13306P2는 2가 단일 특이적 항-Met 항체이고; H4H14639D는 Met 상의 구별되는 에피토프에 각각 결합하는 2개의 중쇄(각각 H4H13312P2 및 H4H13306P2에서 유래됨) 및 범용 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체이다. (실시예 5 참조).

[0600] 질량 분광분석과 조합된 수소/중수소(H/D) 교환(HDX-MS) 에피토프 맵핑을 이용하여 전술한 항체의 결합 에피토프를 결정하였다. HDX 방법의 일반적인 설명은, 예를 들어, Ehring의 문헌[(1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259]; 및 Engen 및 Smith의 문헌[(2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A]에 제시되어 있다.

[0601] **실험 절차**

[0602] HDX를 통해 hMET 상에서 항-Met 항체 H4H13312P2, H4H13306P2, 및 H4H14639D의 결합 에피토프(들)를 맵핑하기 위해, 개별 항체를 NHS-활성화된 Sepharose 4 Fast Flow 비드(GE Healthcare, Pittsburgh, PA)에 개별적으로 공유 부착하였다. 후술하는 바와 같이, 2가지 방법 "온-항원(On-Antigen)" 및 "온-복합체(On-Complex)"을 사용하여 항-Met 항체의 결합 에피토프를 확인하였다.

[0603] '온-항원' 실험 조건에서, D_2O로 제조한 PBS 완충액 중에서 hMET를 5.0분 또는 10.0분 동안 중수소화하였다. 중수소화된 항원을 짧은 인큐베이션을 통해 H4H13312P2 또는 H4H13306P2 항체 비드에 결합시킨 다음, 얼음처럼 차가운 저 pH 퀀칭 완충액으로 비드로부터 용리시켰다. 용출된 샘플을 통합 온라인 펩티드 소화, 포획, 9.0분 액체 크로마토그래피(LC) 분리, 및 Synapt G2-Si MS 데이터 획득으로 이루어진 Waters H/DX-MS 시스템에 수동으로 로딩하였다.

[0604] '온-복합체' 실험 조건에서, hMET를 H4H13312P2 또는 H4H13306P2 비드에 먼저 결합시킨 다음, D_2O로 제조한 PBS 완충액 중에서 인큐베이션하여 5.0분 또는 10.0분 동안 중수소화하였다. 중수소화된 hMET를 용리하고 전술한 바와 같이 Waters H/DX-MS 시스템에 의해 분석하였다.

[0605] hMET로부터 펩신 펩티드를 식별하기 위해, 중수소화되지 않은 샘플의 LC-MS^E 데이터를 Waters ProteinLynx Global Server(PLGS) 소프트웨어를 사용하여 처리하고 인간 MET에 대해 검색하였다. 식별된 펩티드를 DynamX 3.0 소프트웨어로 가져온 다음 2개의 기준에 따라 여과하였다: 1) 아미노산 당 최소 생성물은 0.3일 것; 2) 복제 파일 임계 값은 3.0일 것. 이어서, DynamX 3.0 소프트웨어가 5분 및 10분 중수소화 시점 모두에 걸쳐 '온-항원' 및 '온-복합체' 간에 식별된 각 펩티드의 중수소 흡수 차이를 자동으로 계산하였다. 또한, 중심 값 계산을 위해 DynamX 소프트웨어에 의해 선택된 개별 펩티드의 개별 동위원소 피크를 수동으로 검사하여 중수소 흡수 계산의 정확성을 보장하였다.

[0606] 일반적으로, 0.2를 초과하는 중수소화 델타 값을 특정 결합 에피토프를 결정하기 위한 컷오프 포이트로서 사용하였다.

[0607] **결과:**

[0608] H4H13312P2 항체 비드를 사용했을 때, 9.0분 LC-MS^E 데이터 획득과 결합된 Waters Enzymate™ BEH 펩신 컬럼(2.1 x 30 mm, 5 μm)을 통한 온라인 펩신 분해를 사용해 인간 MET로부터 총 162개의 펩신 펩티드를 '온-항원' 및 '온-복합체' 실험 모두에 대해 추적 가능한 중수소 흡수로 재현 가능하게 식별하였다. 이들 펩티드는 55.7% 서열 커버리지를 나타낸다. 이들 펩티드 중, 단 5개만이 H4H13312P2에 결합된 경우('온-복합체')에 항원을 중수소화만 한 경우('온-항원') 보다 중수소화 흡수를 상당히 감소시킨 것으로 밝혀졌다. 두 실험 조건 하에서 이들 5개의 펩티드의 중심 값을 표 32에 예시하였다. HDX 데이터에 기초하여 이들 5개의 펩티드에 의해 커버된 잔기 192~204에 상응하는 영역을 항체 H4H13312P2에 대한 결합 에피토프로서 정의하였다.

표 32

[0609]

H4H13312P2에 결합 시 중수소 흡수가 감소되는 hMET 펩신 펩티드						
hMET의 잔기	5분 중수소화			10분 중수소화		
	온-복합체 *중심 MH+*	온-항원 *중심 MH+*	Δ	온-복합체 *중심 MH+*	온-항원 *중심 MH+*	Δ
192-202	1351.25	1351.83	-0.58	1351.39	1352.27	-0.88
192-203	1482.34	1482.94	-0.60	1482.50	1483.40	-0.90
192-204	1629.84	1630.71	-0.87	1630.01	1631.10	-1.09
193-202	1252.07	1252.79	-0.72	1252.25	1253.08	-0.83
193-203	1383.22	1383.79	-0.57	1383.40	1384.17	-0.77

[0610] H4H13306P2 항체 비드를 사용하여 수행한 HDX 실험의 경우, hMET로부터 총 98개의 펩티드를 '항원상' 및 '복제

상' 실험 모두에서 추적 가능한 중수소 흡수로 재현 가능하게 식별하였다. 이들 98개의 펩티드는 52.1% 서열 커버리지를 나타낸다. 이러한 모든 펩티드 중, 12개는 H4H13306P2에 결합된 경우('온-복합체') 항원을 중수소화만 한 경우('온-항원')보다 중수소화 흡수를 상당히 감소시킨 것으로 관찰되었다. 두 실험 조건 하에서 이들 12개의 펩티드의 중심 값을 표 33에 예시하였다. HDX 데이터에 기초하여 이들 펩티드에 의해 커버되는 잔기 305~315 및 잔기 421~455에 상응하는 영역을 항체 H4H13306P2에 대한 결합 에피토프로서 정의하였다.

표 33

[0611]

H4H13306P2에 결합 시 중수소 흡수가 감소되는 hMET 펩신 펩티드						
hMET의 잔기	5분 중수소화			10분 중수소화		
	온-복합체 중심 MH+	온-항원 중심 MH+	Δ	온-복합체 중심 MH+	온-항원 중심 MH+	Δ
305-312	818.20	818.83	-0.63	818.31	819.13	-0.82
305-315	1161.50	1162.58	-1.08	1161.80	1162.95	-1.15
306-313	818.48	818.97	-0.49	818.71	819.28	-0.57
421-431	1206.24	1206.75	-0.51	1206.28	1206.95	-0.67
421-435	1581.28	1581.84	-0.56	1581.41	1582.09	-0.68
421-438	1941.58	1942.15	-0.57	1941.71	1942.39	-0.68
422-438	1794.58	1795.04	-0.46	1794.72	1795.34	-0.62
439-447	963.90	964.83	-0.93	963.97	965.24	-1.27
439-455	1846.58	1847.79	-1.21	1847.24	1847.85	-0.61
439-456	1960.24	1961.32	-1.08	1960.83	1961.42	-0.59

[0612] 위에서 개략한 것과 같은 방법론을 사용해 이중특이적 항-Met 항체 H4H14639D에 대한 결합 에피토프를 결정하였다. 이러한 방법론에 의해 결정된, hMET 상의 H4H14639D 결합 에피토프는 부모 항체에 대해 결정된 에피토프에 상응한다.

[0613] 항-Met 항체 H4H13312P2의 결합 에피토프: AA 192~204: 서열번호 155의 VRRLKETKDGFMF (서열번호 156).

[0614] 항-Met 항체 H4H13306P2의 결합 에피토프: AA 305~315: 서열번호 155의 LARQIGASLND (서열번호 157), 및 AA 421~455: 서열번호 155의 FIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNF (서열번호 158).

[0615] **실시예 29: 포도막 흑색종 세포주에서 MET x MET 이중특이적 항체 ADC에 의한 세포 증식 및 세포 생존력의 억제**

[0616] H4H14639D-메이탄시노이드 A 및 H4H14639D-메이탄시노이드 B로 지정된 2개의 메이탄시노이드 페이로드 중 하나에 접합된 이중특이적 c-Met 항체 H4H14639D를 포도막 흑색종 세포주에서 시험하여, 이 세포주에서 c-Met 발현에 대한 세포 증식 및 세포 생존력에 상기 항체가 미치는 효과를 결정하였다.

[0617] 제1 실험에서, c-Met, OMM1.3, Mel202, Mel270, 및 MP65를 발현하는 포도막 흑색종 세포를 10% FBS가 포함된 RPMI 배지가 담긴 96 웰 플레이트에 웰 당 1,000개의 세포를 밤새 시딩하고, 5% CO_2와 함께 37℃에서 인큐베이션하였다. 투여량을 0.01 nM에서 100 nM까지 증가시키면서 REGN1945, REGN1945-메이탄시노이드 A, REGN1945-메이탄시노이드 B, H4H14639D, H4H14639D-메이탄시노이드 A, 및 H4H14639D-메이탄시노이드 B로 7일 동안 세포를 치료하였다. 7일 후, Emax Plus 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices)를 사용하여 비색 검정, Dojindo 세포 계수 키트 8에서 WST-8의 감소를 측정함으로써 상대 세포 생존율을 결정하였다.

[0618] 제2 실험에서, c-Met 음성 OCM3 세포를 비롯하여 c-Met, OMM1.3을 발현하는 포도막 흑색종 세포를 10% FBS가 포함된 RPMI 배지가 담긴 96 웰 플레이트에 웰 당 1,000개의 세포를 밤새 시딩하고, 5% CO_2와 함께 37℃에서 인큐베이션하였다. 투여량을 0.3125 nM에서 최대 10 nM까지 증가시키면서 REGN1945, REGN1945-메이탄시노이드 B, H4H14639D, H4H14639D-메이탄시노이드 B로 세포를 치료하였다. 7일 후, Emax Plus 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices)를 사용하여 비색 검정, Dojindo 세포 계수 키트 8에서 WST-8의 감소를 측정함으로써 상대 세포 생존율을 결정하였다.

[0619] 표 34~38 및 도 21 및 22는 메이탄시노이드 페이로드 H4H14639D-메이탄시노이드 B에 접합된 이중특이적 c-Met 항체가 c-Met 단백질을 발현하는 포도막 흑색종 세포의 생존율을 대조군 치료에 비해 감소시킨다는 것을 보여준다. H4H14639D-메이탄시노이드 B는 c-Met 음성 세포주의 생존력에 영향을 미치지 않았다. 도 21은 더 낮은 ADC 농도에서 세포의 생존율에 미치는 영향을 로그 단위로 도시한다. H4H14639D-메이탄시노이드 A 데이터도 도 21에

표시되어 있다. 미접합 항체 H4H14639D는 c-Met 발현 포도막 흑색종 세포의 생존율을 유의하게 감소시키지 않았는데, 이는 이들 세포가 생존을 위한 Met 신호전달에 의존하지 않음을 나타낸다. 13개의 세포주를 REGN1945, REGN1945-메이탄시노이드 B, H4H14639D, 및 H4H14639D-메이탄시노이드 B의 투여량을 증가시켜가며 3일에 걸쳐 치료한 제3 실험의 데이터가 도 33에 표시되어 있다. H4H14639D-메이탄시노이드 B는 MET 발현 포도막 흑색종 세포주의 생존력을 투여량 의존적 방식으로 감소시키며, IC_{50}은 1 nM 미만이다.

표 34

[0620]

H4H14639D-메이탄시노이드 B 치료 후 Mel270 세포의 생존율(%)	
Mel270	**세포 생존율(%) (n=3)**
REGN1945 1 nM	100.13±3.46
REGN1945 10 nM	98.20±4.38
REGN1945-메이탄시노이드 B 1 nM	84.35±10.79
REGN1945-메이탄시노이드 B 10 nM	92.26±4.86
H4H14639D 1 nM	92.77±4.49
H4H14639D 10 nM	89.61±5.06
H4H14639D-메이탄시노이드 B 1 nM	11.96±0.51
H4H14639D-메이탄시노이드 B 10 nM	3.59±0.33

표 35

[0621]

H4H14639D-메이탄시노이드 B 치료 후 Mel202 세포의 생존율(%)	
Mel202	**세포 생존율(%) (n=3)**
REGN1945 1 nM	98.80±99.46
REGN1945 10 nM	90.74±9.03
REGN1945-메이탄시노이드 B 1 nM	96.86±5.29
REGN1945-메이탄시노이드 B 10 nM	95.90±8.12
H4H14639D 1nM	91.36±10.57
H4H14639D 10 nM	87.74±5.43
H4H14639D-메이탄시노이드 B 1 nM	25.82±0.36
H4H14639D-메이탄시노이드 B 10 nM	5.80±0.21

표 36

[0622]

H4H14639D-메이탄시노이드 B 치료 후 OMM1.3 세포의 생존율(%)	
OMM1.3	**세포 생존율(%) (n=3)**
REGN1945 1nM	86.86±4.46
REGN1945 10 nM	81.89±5.13
REGN1945-메이탄시노이드 B 1 nM	87.37±12.49
REGN1945-메이탄시노이드 B 10 nM	93.66±11.17
H4H14639D 1 nM	106.30±4.76
H4H14639D 10 nM	109.87±20.36
H4H14639D-메이탄시노이드 B 1 nM	12.60±0.60
H4H14639D-메이탄시노이드 B 10 nM	3.66±0.65

표 37

[0623]

H4H14639D-메이탄시노이드 B 치료 후 MP65 세포의 생존율(%)	
MP65	**세포 생존율(%) (n=3)**
REGN1945 1 nM	101.40±33.52
REGN1945 10 nM	99.58±11.88
REGN1945-메이탄시노이드 B 1 nM	81.21±27.03
REGN1945-메이탄시노이드 B 10 nM	135.27±54.14
H4H14639D 1 nM	101.10±28.58
H4H14639D 10 nM	92.87±40.98

H4H14639D-메이탄시노이드 B 1 nM	48.43±14.45
H4H14639D-메이탄시노이드 B 10 nM	40.00±7.10

표 38

[0624]

H4H14639D-메이탄시노이드 B 치료 후 OCM3 세포의 생존율(%)	
OCM3	**세포 생존율(%) (n=3)**
REGN1945 1.25 nM	104.25±6.73
REGN1945 10 nM	89.64±7.83
REGN1945-메이탄시노이드 B 1.25 nM	88.16±15.49
REGN1945-메이탄시노이드 B 10 nM	87.56±15.08
H4H14639D 1.25 nM	89.65±9.52
H4H14639D 10 nM	95.02±7.51
H4H14639D-메이탄시노이드 B 1.25 nM	94.36±4.61
H4H14639D-메이탄시노이드 B 10 nM	86.93±3.95

[0625] **실시예 30: MET x MET 이중특이적 항체 ADC는 포도막 흑색종 세포에서 세포자멸사를 유도한다**

[0626] c-Met 음성 OCM3 세포를 비롯하여 c-Met, OMM1.3, 및 Mel202를 발현하는 포도막 흑색종 세포를 10% FBS가 포함된 RPMI 배지가 담긴 60 mm^3 플레이트에 웰 당 800,000개씩 밤새 시딩하고, 5% CO_2와 함께 37℃에서 인큐베이션하였다. 세포를 1.25, 2.5 nM, 또는 10 nM REGN1945(이소형 대조군 항체), REGN1945-메이탄시노이드 A, H4H14639D, 또는 H4H14639D-메이탄시노이드 B로 48시간 동안 치료하였다. 그런 다음, 트립신으로 세포를 수확하고, PBS로 세척하고, 실온에서 30분 동안 4% 파라포름알데히드로 고정시키고, 4℃에서 DAPI로 밤새 염색하였다. 세포를 현미경 슬라이드에 놓고, Cytoseal 40으로 밀봉하였다. 현미경을 이용해 DAPI 형광을 여기하는 UV 광으로 세포자멸성 세포를 정량화하였다.

[0627] 메이탄시노이드 페이로드, H4H14639D-메이탄시노이드 B에 접합된 이중특이적 c-Met 항체는 c-Met 단백질을 발현하는 포도막 흑색종 세포의 세포자멸사를 대조군 치료 및 c-Met 음성 세포주(표 41 참조)에 비해 유의하게 투여량 의존적 방식으로 유도하였다(표 39 및 40 참조). 참조: 도 23 및 24. 또 다른 실험에서, 48시간 동안 10 nM의 METxMET-ADC로 치료했을 때, c-Met-발현 세포주인 OMM1.3 및 Mel202에서 최대 40%의 세포자멸사가 유도되었지만, OCM3에서는 유도되지 않았다(데이터 미도시). c-Met-특이적 항체를 세포독성 화합물과 접합시키면, 포도막 흑색종 세포를 세포자멸사를 위해 선택적으로 표적화할 수 있다.

표 39

[0628]

OMM1.3 세포에서 H4H14639D-메이탄시노이드 B에 의해 유도된 세포자멸사	
OMM1.3	**세포자멸사율(%) (n=1)**
미치료	1
REGN1945 1.25 nM	1.67
REGN1945 2.5 nM	1.67
REGN1945-메이탄시노이드 B 1.25 nM	0.67
REGN1945-메이탄시노이드 B 2.5 nM	0.33
H4H14639D 1.25 nM	0.67
H4H14639D 2.5 nM	0.67
H4H14639D-메이탄시노이드 B 1.25 nM	15.00
H4H14639D-메이탄시노이드 B 2.5 nM	28.33

표 40

[0629]

Mel202 세포에서 H4H14639D-메이탄시노이드 B에 의해 유도된 세포자멸사	
Mel202	**세포자멸사율(%) (n=1)**
미치료	0.00
REGN1945 1.25 nM	0.00
REGN1945 2.5 nM	0.67

REGN1945-메이탄시노이드 B 1.25 nM	0.33
REGN1945-메이탄시노이드 B 2.5 nM	0.67
H4H14639D 1.25 nM	0.00
H4H14639D 2.5 nM	0.33
H4H14639D-메이탄시노이드 B 1.25 nM	18.33
H4H14639D-메이탄시노이드 B 2.5 nM	22.33

표 41

[0630]

OCM3 세포에서 H4H14639D-메이탄시노이드 B에 의해 유도된 세포자멸사	
OCM3	**세포자멸사율(%) (n=1)**
미치료	0.67
REGN1945 1.25 nM	1.00
REGN1945 2.5 nM	0.33
REGN1945-메이탄시노이드 B 1.25 nM	0.67
REGN1945-메이탄시노이드 B 2.5 nM	0.67
H4H14639D 1.25 nM	2.00
H4H14639D 2.5 nM	1.67
H4H14639D-메이탄시노이드 B 1.25 nM	1.33
H4H14639D-메이탄시노이드 B 2.5 nM	2.67

[0631] **실시예 31: MET x MET 이중특이적 항체 ADC는 포도막 흑색종 세포에서 세포 주기를 변경시킨다**

[0632] c-Met 음성 OCM3 세포를 비롯하여 c-Met, OMM1.3, 및 Mel202를 발현하는 포도막 흑색종 세포를 10% FBS가 포함된 RPMI 배지가 담긴 60 mm^3 플레이트에 웰 당 800,000개씩 밤새 시딩하고, 5% CO_2와 함께 37℃에서 인큐베이션하였다. 세포를 치료하지 않거나 10 nM H4H14639D-메이탄시노이드 B로 1, 3, 6, 24 및 48시간 동안 치료하였다. 그런 다음, 트립신으로 세포를 수확하고, PBS로 세척하고, -20℃에서 차가운 70% 에탄올로 밤새 고정시키고, Millipore 항-MPM2 항체에서 2시간 동안 인큐베이션하고, PBS로 세척하고, Alexa Fluor 488(Invitrogen)과 접합된 Invitrogen 항-마우스 IgG에서 인큐베이션하고, PBS로 다시 세척하였다. 그런 다음, 세포를 500 μg/ml의 프로피듐 요오드화물로 염색하고 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 그런 다음, 세포를 세포-스트레이너를 통과시킨 후 BD Bioscience LSR II 유세포 계측기를 통해 흘렸다. 데이터는 De Novo 소프트웨어의 FCS Express 6을 사용하여 분석하였다.

[0633] 메이탄시노이드 페이로드인 H4H14639D-메이탄시노이드 B에 접합된 이중특이적 c-Met 항체는 6~24시간의 치료 후 OMM1.3 및 Mel202 세포에서 유사분열 정지를 유의하게 유도하였지만(각각 도 25 및 도 26), OCM3 세포에서는 유사분열 정지를 유도하지 않았다(도 27). H4H14639D-메이탄시노이드 B로 치료한 c-Met 발현 세포에서 24~48시간 사이에 세포자멸사의 유도를 나타내는 SubG1 집단이 증가하였지만, c-Met 음성 세포의 SubG1 집단에서는 증가가 관찰되지 않았다. 표 42~44 참조. 세포 주기 분석을 통해 메이탄시노이드 페이로드의 도입이 유사분열 정지를 유도하여 결과적으로 세포자멸사를 유도하였음을 c-Met 발현 세포주인 OMM1.3 및 Mel202에서만 확인하였으며, c-Met 음성 OCM3 세포주에서는 확인되지 않았다.

표 42

[0634]

24시간 H4H14639D-메이탄시노이드 B 치료 후 OMM1.3 세포 주기 분포			
미치료	**세포 (%) (n=1)**	**H4H14639D-메이탄시노이드 B**	**세포 (%) (n=1)**
SubG1		**SubG1**	
1시간	0.11	1시간	0.03
2시간	0.15	2시간	0.08
6시간	0.09	6시간	0.20
24시간	0.12	24시간	6.68
48시간	0.21	48시간	14.80
G1		**G1**	
1시간	59.21	1시간	56.80
2시간	55.82	2시간	53.79

6시간	57.12	6시간	49.82
24시간	57.45	24시간	29.97
48시간	56.14	48시간	31.05
S		S	
1시간	16.59	1시간	17.51
2시간	17.29	2시간	17.76
6시간	15.71	6시간	16.51
24시간	16.49	24시간	13.16
48시간	18.80	48시간	14.70
G2/M		G2/M	
1시간	22.54	1시간	24.34
2시간	24.64	2시간	26.99
6시간	25.79	6시간	31.64
24시간	23.74	24시간	47.16
48시간	22.76	48시간	35.60
M		M	
1시간	1.44	1시간	0.95
2시간	1.55	2시간	2.41
6시간	1.82	6시간	7.26
24시간	1.67	24시간	25.12
48시간	1.33	48시간	11.06

표 43

[0635]

미치료	세포 (%) (n=1)	H4H14639D-메이탄시노이드 B	세포 (%) (n=1)
SubG1		SubG1	
1시간	0.37	1시간	0.45
2시간	0.25	2시간	0.61
6시간	0.41	6시간	0.57
24시간	0.63	24시간	25.82
48시간	1.42	48시간	62.93
G1		G1	
1시간	25.98	1시간	24.85
2시간	23.45	2시간	23.30
6시간	26.27	6시간	21.06
24시간	24.47	24시간	19.81
48시간	26.81	48시간	6.34
S		S	
1시간	10.27	1시간	9.27
2시간	9.45	2시간	10.03
6시간	7.76	6시간	10.03
24시간	9.68	24시간	25.38
48시간	4.20	48시간	9.29
G2/M		G2/M	
1시간	50.56	1시간	52.45
2시간	50.94	2시간	52.36
6시간	54.72	6시간	59.96
24시간	57.40	24시간	23.87
48시간	60.32	48시간	13.02
M		M	
1시간	0.32	1시간	0.09
2시간	0.53	2시간	1.06
6시간	1.00	6시간	6.79
24시간	0.73	24시간	2.95
48시간	0.17	48시간	0.02

표 44

[0636]

24시간 H4H14639D-메이탄시노이드 B 치료 후 OCM3 세포 주기 분포			
미치료	**세포 (%) (n=1)**	**H4H14639D-메이탄시노이드 B**	**세포 (%) (n=1)**
SubG1		**SubG1**	
1시간	0.62	1시간	0.47
2시간	0.64	2시간	0.51
6시간	0.82	6시간	0.97
24시간	0.91	24시간	1.01
48시간	0.85	48시간	2.02
G1		**G1**	
1시간	62.65	1시간	62.71
2시간	67.37	2시간	66.79
6시간	69.06	6시간	70.32
24시간	68.31	24시간	64.57
48시간	72.85	48시간	68.62
S		**S**	
1시간	15.53	1시간	16.01
2시간	13.92	2시간	14.30
6시간	13.66	6시간	13.41
24시간	14.55	24시간	16.28
48시간	12.52	48시간	13.14
G2/M		**G2/M**	
1시간	19.47	1시간	18.64
2시간	16.44	2시간	16.51
6시간	15.17	6시간	13.92
24시간	14.83	24시간	16.64
48시간	12.22	48시간	14.35
M		**M**	
1시간	1.59	1시간	1.34
2시간	1.69	2시간	2.03
6시간	1.53	6시간	1.72
24시간	1.30	24시간	2.99
48시간	0.81	48시간	1.74

[0637] **실시예 32: 포도막 흑색종 세포주에서의 c-Met 발현**

[0638] 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 위 암종 세포주와 폐 암종 세포주를 비롯하여 여러 가지 포도막 흑색종 세포주에서 c-Met 단백질 발현 수준의 차이를 평가하였다.

[0639] SNU-5, 위 암종 세포주, A549 폐 암종 세포주뿐만 아니라 포도막 흑색종 세포주인 Mel290, 92.1, OMM1.3, OMM1, Mel285, Mel202, Mel270, OCM1A, OCM3, MP41, MP65, MP46 및 UM004를 포함하여, 다양한 수준으로 c-Met를 발현하는 세포주를 10% FBS가 포함된 RPMI 배지가 담긴 60 mm^3 플레이트에 플레이트 당 1,000,000개씩 도말하고, 5% CO_2와 함께 37℃에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음, 트립신으로 세포를 수확하고, PBS로 세척하고, RIPA 완충액으로 용해시켰다. 단백질 용해물을 20-웰 Novex 미디 겔 4~12%(Invitrogen) 상에 흘린 다음, PVDF 막으로 옮겼다. 그런 다음, 5% 무지방 분유로 막을 차단하고, c-Met(Cell Signaling) 및 튜불린(Cell Signaling)에 대한 일차 항체 중에서 쉐이커를 이용해 밤새 4℃에서 인큐베이션하고, TBST로 세척하고, HRP와 접합된 적절한 이차 항체(GE Healthcare)에서 인큐베이션하고, TBST로 세척하였다. ECL HRP 기질을 막 상에 첨가하고, Fujifilm XA-2 카메라를 사용하여 형광 이미지를 촬영하였다.

[0640] 결과

[0641] 포도막 흑색종 세포주는 GNAQ 또는 GNA11과 같은 G 단백질 내의 돌연변이로 흔히 일컬어지지만, 이들은 차등 c-

Met 발현도 나타낸다. 도 28에 도시된 바와 같이, 포도막 흑색종 세포주 각각은, *BRAFV*^{V600E} 돌연변이 세포가 되는 OCM1A 및 OCM3 세포주를 제외하고는, 일정 수준으로 c-Met 수용체를 발현한다. SNU-5는 c-Met를 고도로 발현하는 것으로 알려진 양성 대조군 위 암종 세포주인 반면, A549는 c-Met를 또한 발현하는 폐 암종 세포주이다.

[0642] **실시예 33: MET x MET 이중특이적 항체 ADC는 PARP 절단 및 히스톤 H3 인산화를 유도한다**

[0643] 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 여러 포도막 흑색종 세포주를 H4H14639D-메이탄시노이드 B로 치료한 후, 이들을 대상으로 c-Met 단백질 수준, PARP 절단, 및 히스톤 H3 인산화를 평가하였다.

[0644] c-Met 음성 세포주인 OCM3을 비롯하여 c-Met, OMM1.3, 및 Mel202를 발현하는 포도막 흑색종 세포를 10% FBS가 포함된 RPMI 배지가 담긴 60 mm^3 플레이트에 웰 당 800,000개씩 밤새 시딩하고, 5% CO_2와 함께 37℃에서 인큐베이션하였다. 세포를 치료하지 않거나, 투여량을 0.5에서 10 nM까지 증가시키면서 REGN1945, REGN1945-메이탄시노이드 B, H4H14639D, H4H14639D-메이탄시노이드 B로 24시간 동안 치료하였다. 그런 다음, 트립신으로 세포를 수확하고, PBS로 세척하고, RIPA 완충액으로 용해시켰다. 단백질 용해물을 20-웰 Novex 미디 겔 4~12%(Invitrogen) 상에 흘린 다음, PVDF 막으로 옮겼다. 그런 다음, 5% 무지방 분유로 막을 차단하고, PARP(Cell Signaling), 인산화된 히스톤-H3(Cell Signaling), 및 튜불린(Cell Signaling)에 대한 일차 항체 중에서 쉐이커를 이용해 밤새 4℃에서 인큐베이션하고, TBST로 세척하고, HRP와 접합된 적절한 이차 항체(GE Healthcare)에서 인큐베이션하고, TBST로 세척하였다. ECL HRP 기질을 막 상에 첨가하고, Fujifilm XA-2 카메라를 사용하여 형광 이미지를 촬영하였다.

[0645] 또 다른 실험에서, c-Met 음성 세포주인 OCM3을 비롯하여 c-Met, OMM1.3을 발현하는 포도막 흑색종 세포를 10% FBS가 포함된 RPMI 배지가 담긴 60 mm^3 플레이트에 웰 당 800,000개씩 밤새 시딩하고, 5% CO_2와 함께 37℃에서 인큐베이션하였다. 그러나, 본 실험에서는 세포를 치료하지 않거나, 10 nM REGN1945-메이탄시노이드 B, H4H14639D, 및 H4H14639D-메이탄시노이드 B로 24, 48, 및 72시간의 더 긴 기간동안 치료하였다. 그런 다음, 트립신으로 세포를 수확하고, PBS로 세척하고, RIPA 완충액으로 용해시켰다. 단백질 용해물을 20-웰 Novex 미디 겔 4~12%(Invitrogen) 상에 흘린 다음, PVDF 막으로 옮겼다. 그런 다음, 5% 무지방 분유로 막을 차단하고, c-Met(Cell Signaling), PARP(Cell Signaling), 인산화된 히스톤-H3(Cell Signaling), 및 튜불린(Cell Signaling)에 대한 일차 항체 중에서 쉐이커를 이용해 밤새 4℃에서 인큐베이션하고, TBST로 세척하고, HRP와 접합된 적절한 이차 항체(GE Healthcare)에서 인큐베이션하고, TBST로 세척하였다. ECL HRP 기질을 막 상에 첨가하고, Fujifilm XA-2 카메라를 사용하여 형광 이미지를 촬영하였다.

[0646] 결과

[0647] 도 29는 H4H14639D-메이탄시노이드 B가 24시간의 치료 후 OMM1.3 세포 및 Mel202 세포에서 PARP 절단(세포자멸사의 마커)을 유도함을 보여주는 웨스턴 블롯의 이미지이다. REGN1945-메이탄시노이드 B는 물론이고 H4H14639D도 PARP 절단을 유도하지 않았다. c-Met 양성 세포주와 달리, OCM3 세포는 H4H14639D-메이탄시노이드 B 치료 후 PARP 절단을 나타내지 않았다. 도 29는 또한, REGN1945-메이탄시노이드 B 및 H4H14639D와 비교하여 H4H14639D-메이탄시노이드 B로 치료한 OMM1.3 및 Mel202 세포에서 히스톤 H3 인산화가 유의하게 증가하지만, OCM3 세포에서는 그렇지 않음을 보여준다. 히스톤 H3 인산화는 유사분열 중에 유도되며, 세포에서 메이탄시노이드-유도 유사분열 정지의 증거이다. 도 29에서, 히스톤 H3 인산화는 c-Met 발현 세포(OMM1.3 및 Mel202)에서만 나타나고 OCM3에서는 나타나지 않으며, 이는 메이탄시노이드가 c-Met 항체에 의해 세포 내로 수송된다는 증거이다. 이 데이터는 c-Met ADC의 특이성과 유효성을 추가로 입증한다.

[0648] 도 30은 H4H14639D-메이탄시노이드 B로 치료한 OMM1.3 세포에서 PARP 절단이 시간 의존적으로 유도되지만, REGN1945-메이탄시노이드 B 또는 H4H14639D로 치료한 OMM1.3 세포에서는 유도되지 않음을 보여주는 웨스턴 블롯의 이미지이다. PARP 단백질은 OCM3 세포에서 H4H14639D-메이탄시노이드 B 치료에 의해 영향을 받지 않았다. 또한, 총 Met 단백질 발현은, 치료하지 않거나 REGN1945-M114로 치료했을 때보다 H4H14639D 및 H4H14639D-M114로 치료했을 때 감소하는데, 이는 항체 또는 ADC로 치료한 후 수용체가 내재화됨을 나타낸다. 마지막으로, (REGN1945-메이탄시노이드 B 또는 H4H14639D로 치료했을 때보다) H4H14639D-메이탄시노이드 B로 치료했을 때 OMM1.3 세포에서 히스톤 H3 인산화가 유의하게 증가하였지만, 반복하건데, 이러한 증가는 OCM3 세포에서는 관찰되지 않았다.

[0649] 결론적으로, 예시적인 이중특이적 항-c-Met 항체인 H4H14639D 항체는 이러한 수용체를 발현하는 세포에서 c-Met를 특이적으로 표적화한다. 이러한 항체를 메이탄시노이드에 접합함으로써(H4H14639D-메이탄시노이드 B), c-Met

를 발현하는 포도막 흑색종 세포주에서 세포자멸사를 특이적으로 및 강력하게 유도할 수 있다.

[0650] **실시예 34: MET x MET 이중특이적 항체 ADC는 c-Met 발현 포도막 흑색종 세포의 침윤을 억제한다**

[0651] c-Met을 발현하는 포도막 흑색종 세포 OMM1.3을 다음의 치료제와 함께, 0.1% FBS가 포함된 RPMI 배지가 담긴 24-웰 플레이트 내의 매트리겔 삽입체에 삽입체 당 120,000개씩 밤새 시딩하였다: 미치료 대조군; 125, 250 및 500 pM R1945, R1945-메이탄시노이드 B, H4H14639D, 및 H4H14639D-메이탄시노이드 B. 10% FBS 및 50 ng/ml HGF가 포함된 RPMI를 화학유인물질로서 웰에 넣었다. 대략 24시간 후, 매트리겔 삽입체에서 미이동 세포로 제거하였다. 이동된 세포를 2분 동안 메탄올로 고정시키고, 1% 톨루이딘으로 2분 동안 염색한 다음, ddH_2O로 2회 세척하였다. 그런 다음, 건조된 매트리겔을 현미경 슬라이드에 놓고 Cytoseal 60으로 밀봉하였다. Nikon TE-2000-U 현미경을 사용하여 이미지를 촬영하였다.

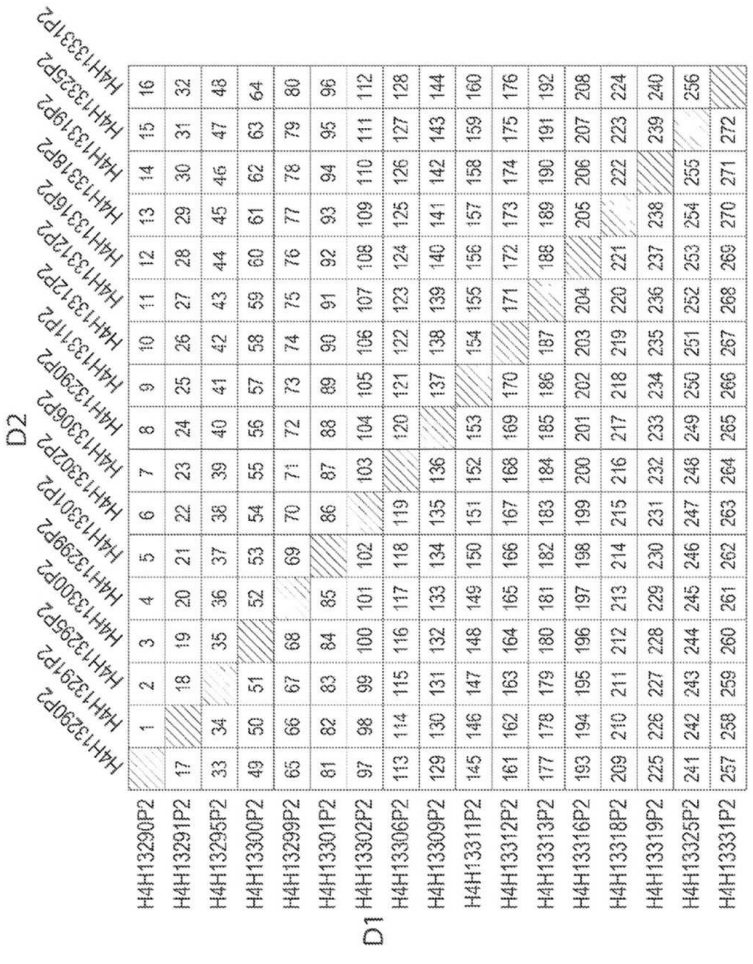
[0652] 결과

[0653] 이중특이적 c-Met 항체 H4H14639D-메이탄시노이드 B는 c-Met 단백질을 발현하는 OMM1.3 포도막 흑색종 세포의 침윤을 대조군 치료제(R1945 및 R1945-메이탄시노이드 B)보다 (250 pM에서부터) 유의하게 억제하였다. 또한 H4H14639D로 치료한 세포에서 세포 침윤은 (250 pM에서부터) 유의하게 억제되었다. 그러나, 접합된 메이탄시노이드 페이로드인 H4H14639D-메이탄시노이드 B는 이 투여량에서는 세포 생존율에 영향을 미치지 않는다. 도 32 참조.

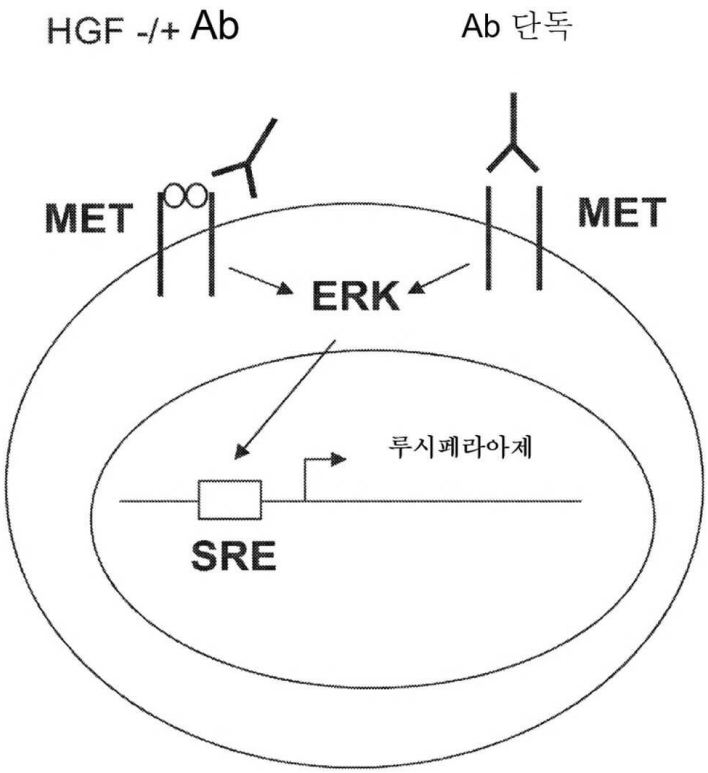
[0654] 본 개시는 본원에 기술된 특정 구현예에 의해 그 범위가 제한되지 않는다. 실제로, 본원에 기술된 것들 외에, 본 발명의 다양한 변형은 전술된 설명 및 첨부된 도면으로부터 당업자에게 명백해질 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구범위의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

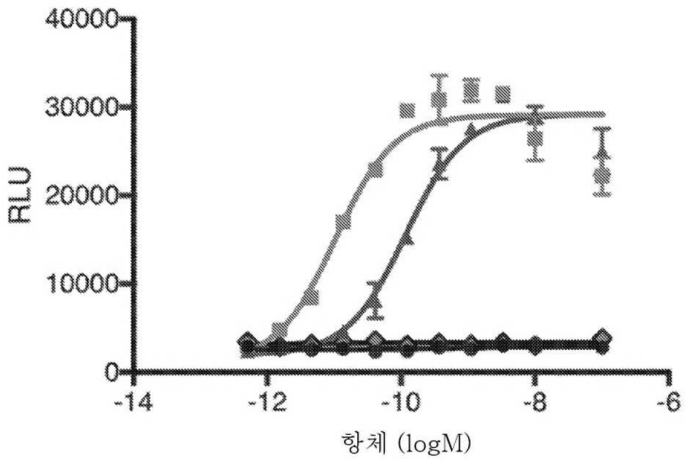
도면1



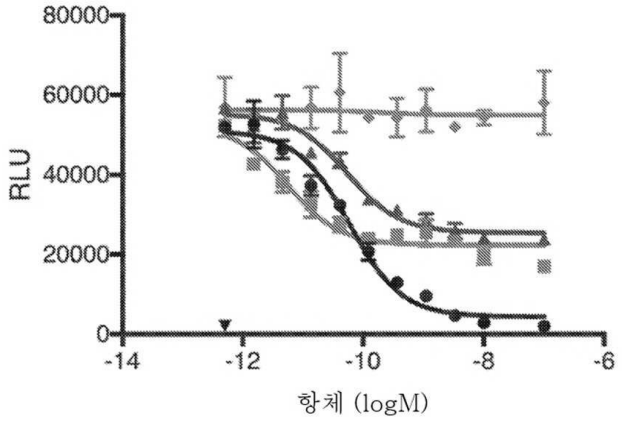
도면2


HGF -/+ Ab
Ab 단독
MET
MET
ERK
루시페라아제
SRE

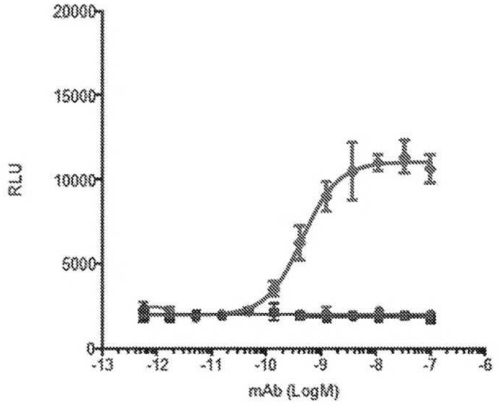
도면3a


40000
30000
20000
10000
0
RLU
-14
-12
-10
-8
-6
항체 (logM)

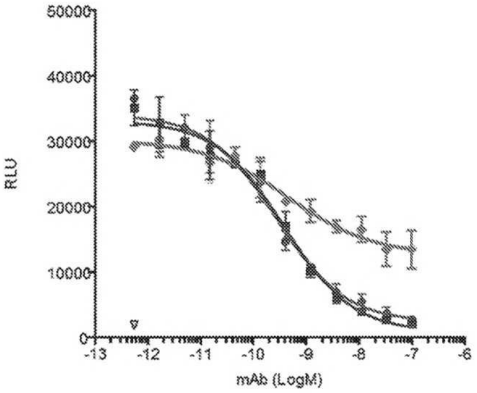
도면3b



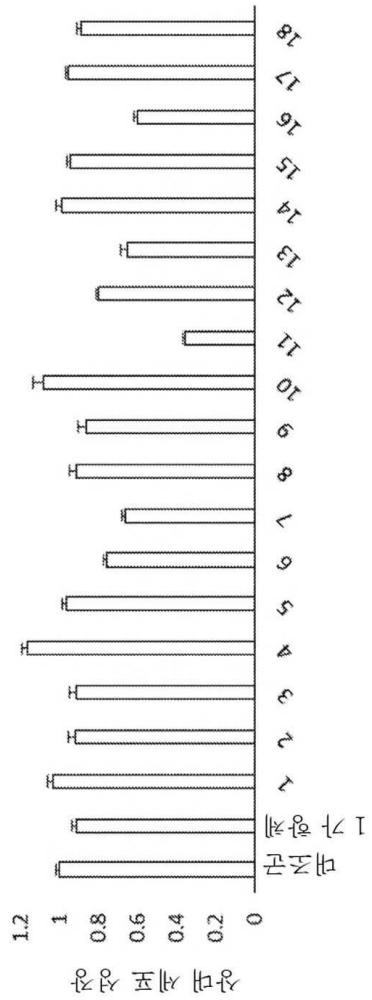
도면4a



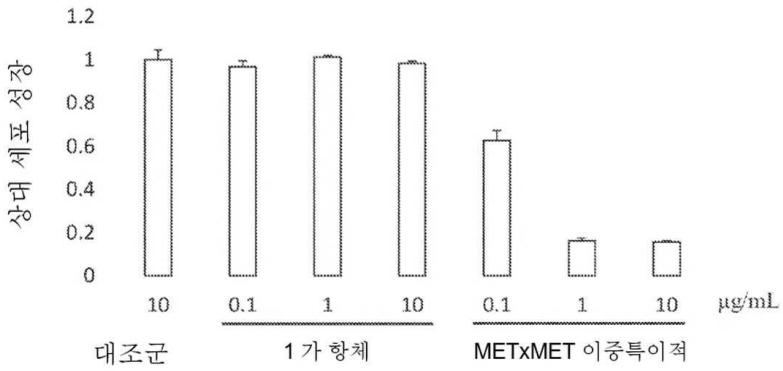
도면4b



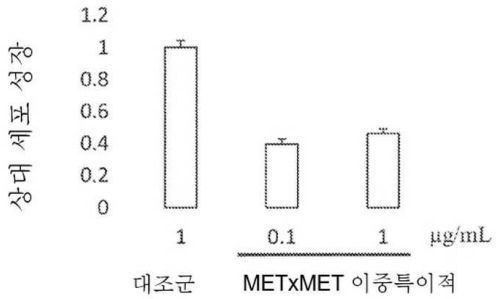
도면5


상대 세포 성장
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
대조군
1 가 항체
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

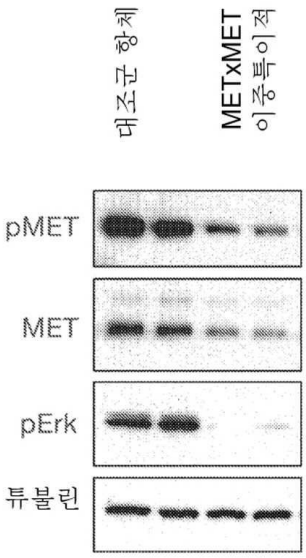
도면6a


상대 세포 성장
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
10
0.1
1
10
0.1
1
10
μg/mL
대조군
1 가 항체
METxMET 이중특이적

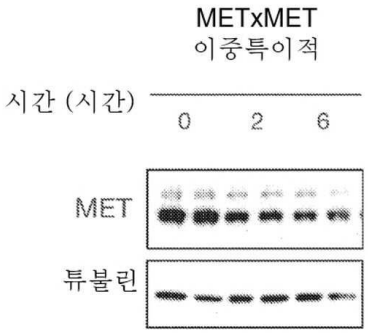
도면6b



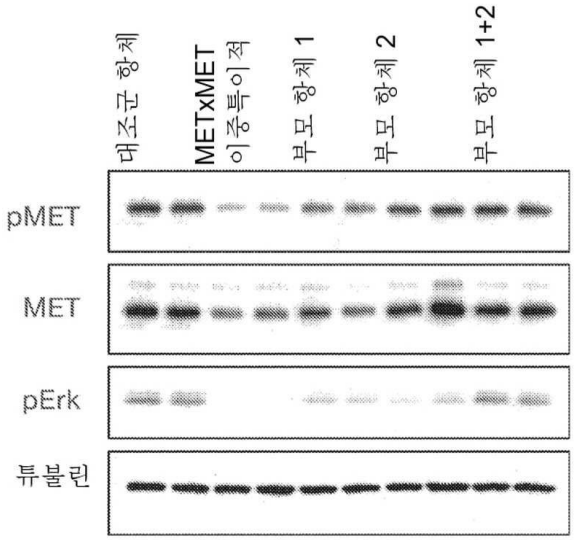
도면7a



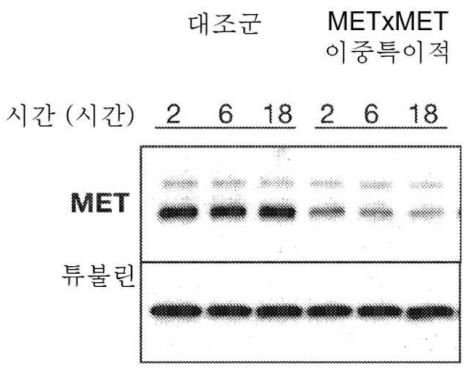
도면7b



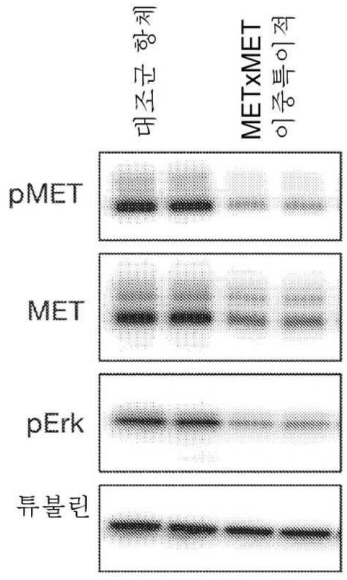
도면8



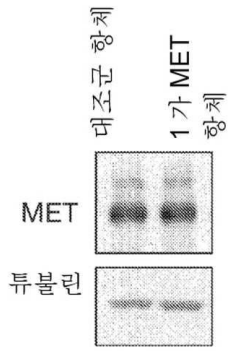
도면9



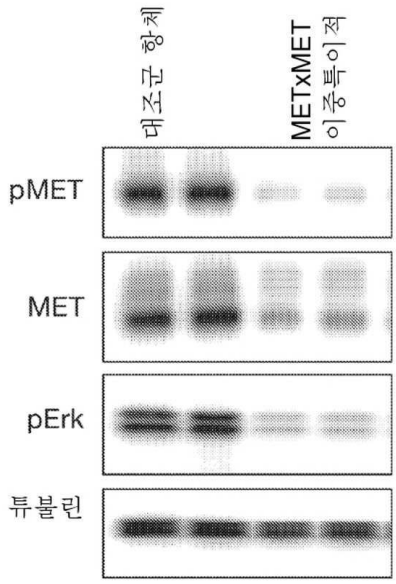
도면10a



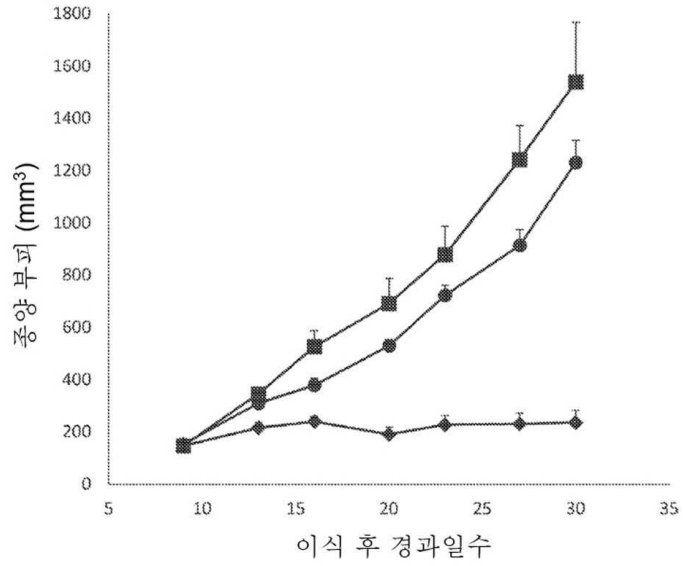
도면10b



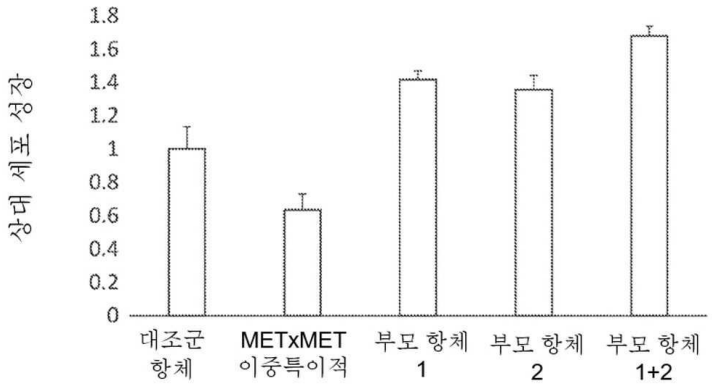
도면11



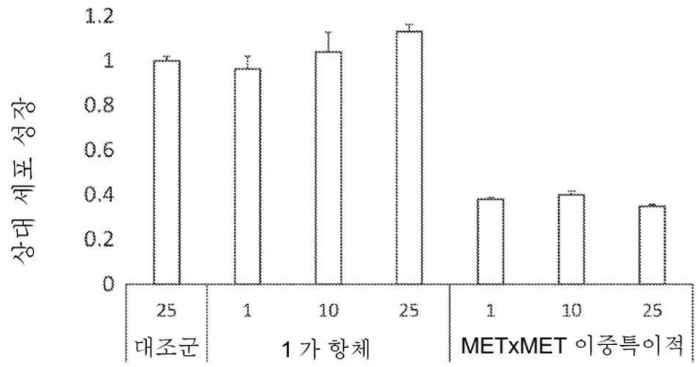
도면12



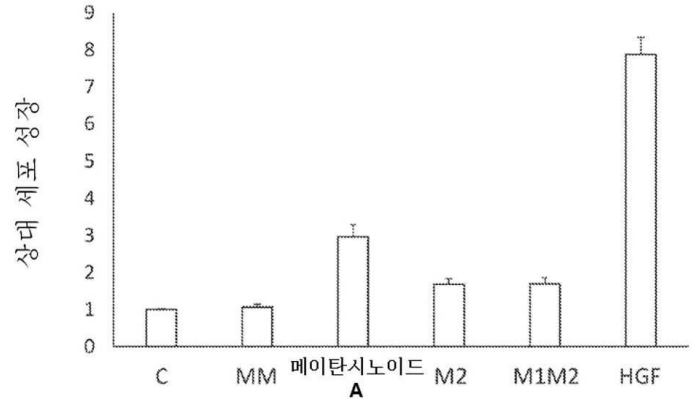
도면13a



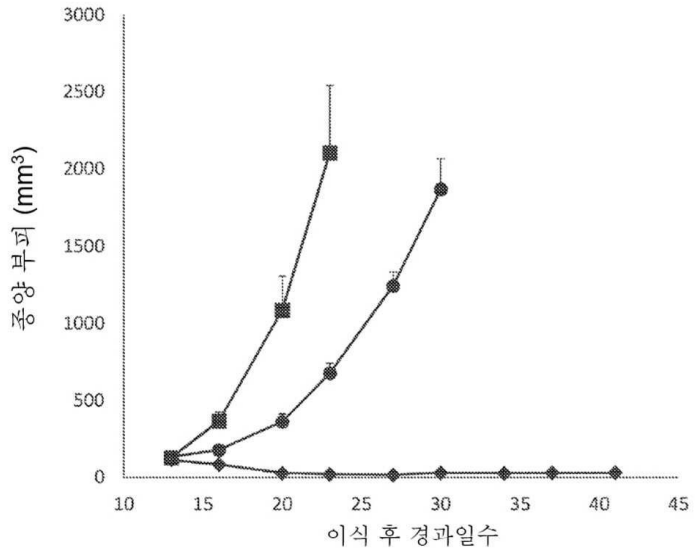
도면13b



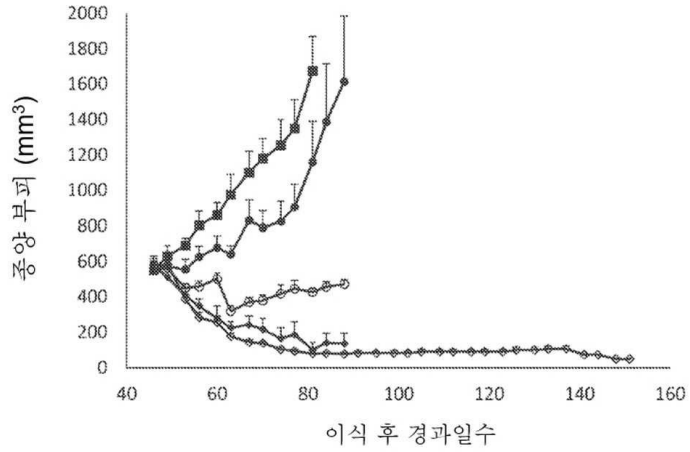
도면14



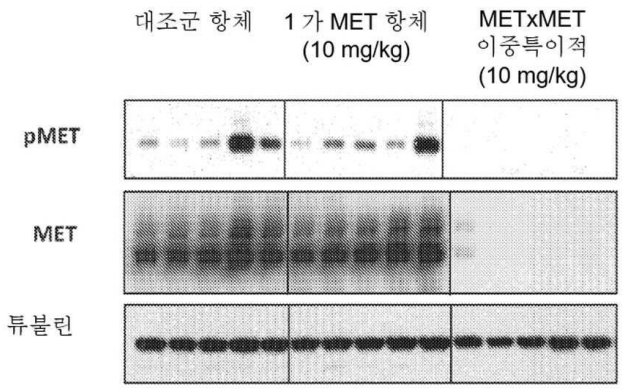
도면15



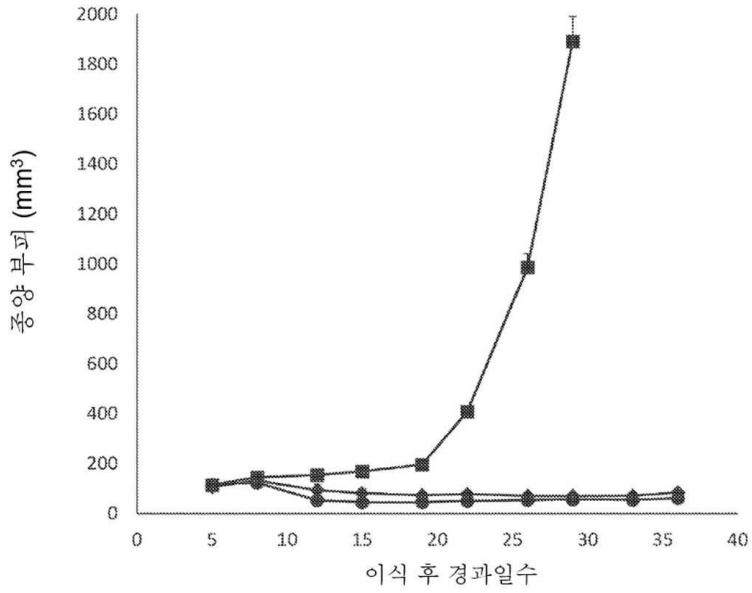
도면16a



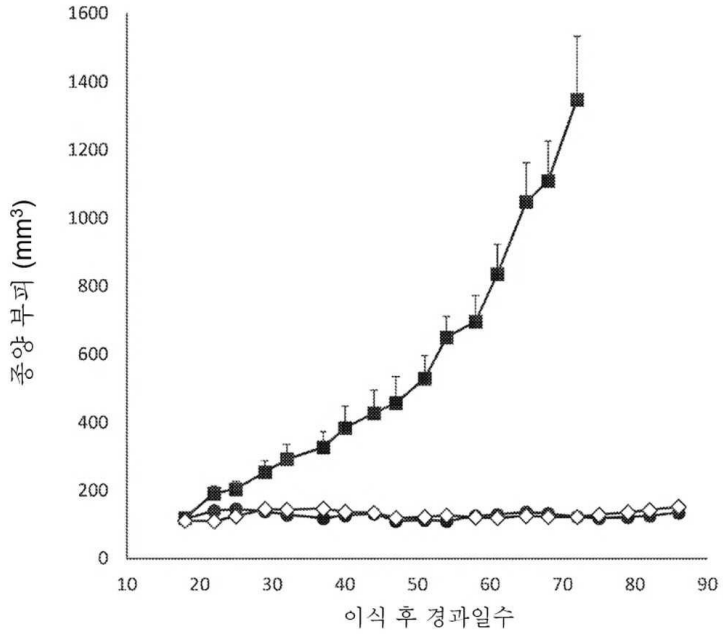
도면16b



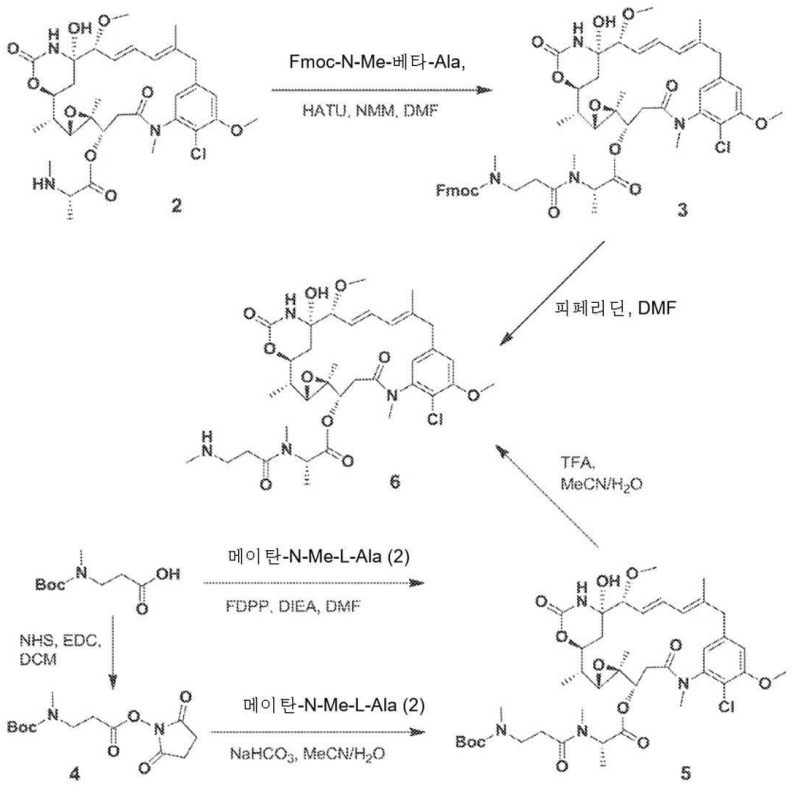
도면17


2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
종양 부피 (mm3)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
이식 후 경과일수

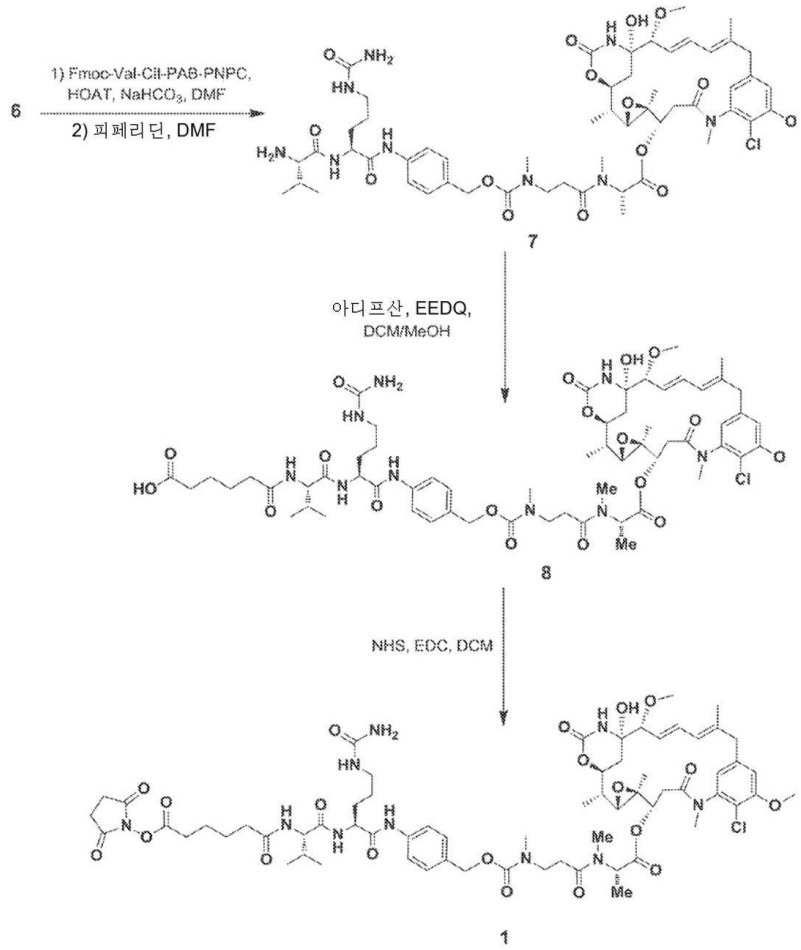
도면18


1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
종양 부피 (mm3)
10
20
30
40
50
60
70
80
90
이식 후 경과일수

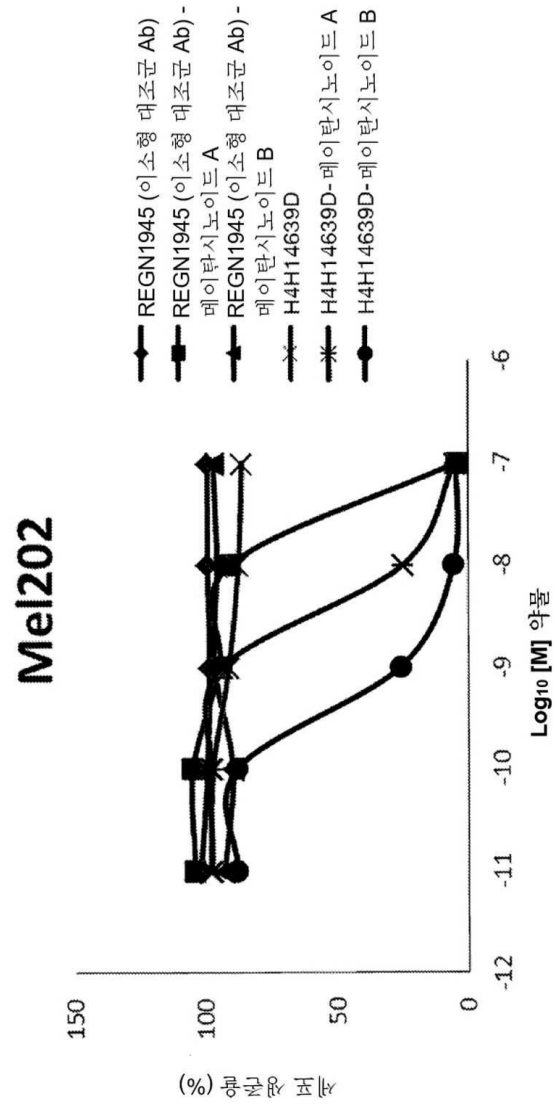
도면19


Fmoc-N-Me-베타-Ala,
HATU, NMM, DMF
피페리딘, DMF
TFA,
MeCN/H2O
메이탄-N-Me-L-Ala (2)
FDPP, DIEA, DMF
NHS, EDC,
DCM
메이탄-N-Me-L-Ala (2)
NaHCO3, MeCN/H2O
2
3
4
5
6

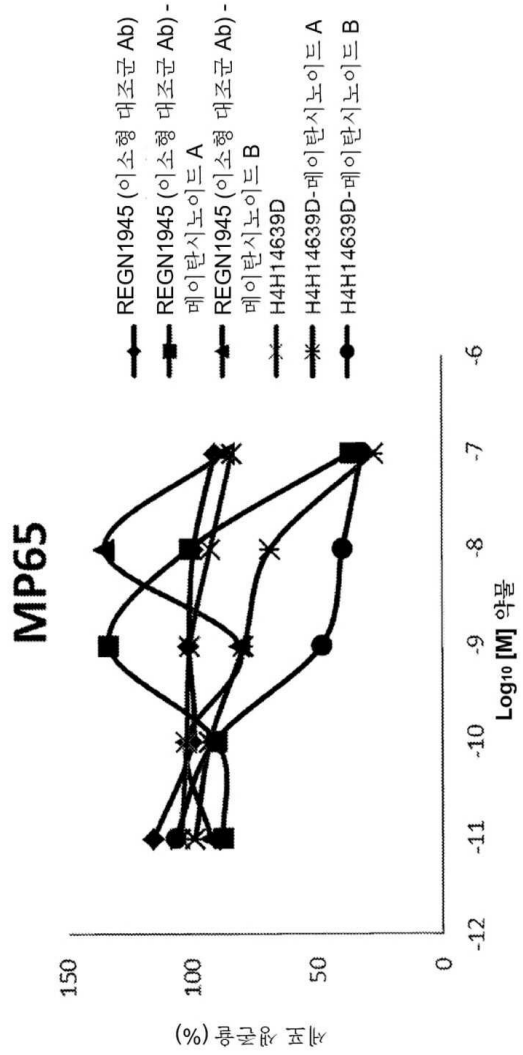
도면20


1) Fmoc-Val-Cit-PAB-PNPC,
HOAT, NaHCO3, DMF
2) 피페리딘, DMF
6
7
아디프산, EEDQ,
DCM/MeOH
8
NHS, EDC, DCM
1

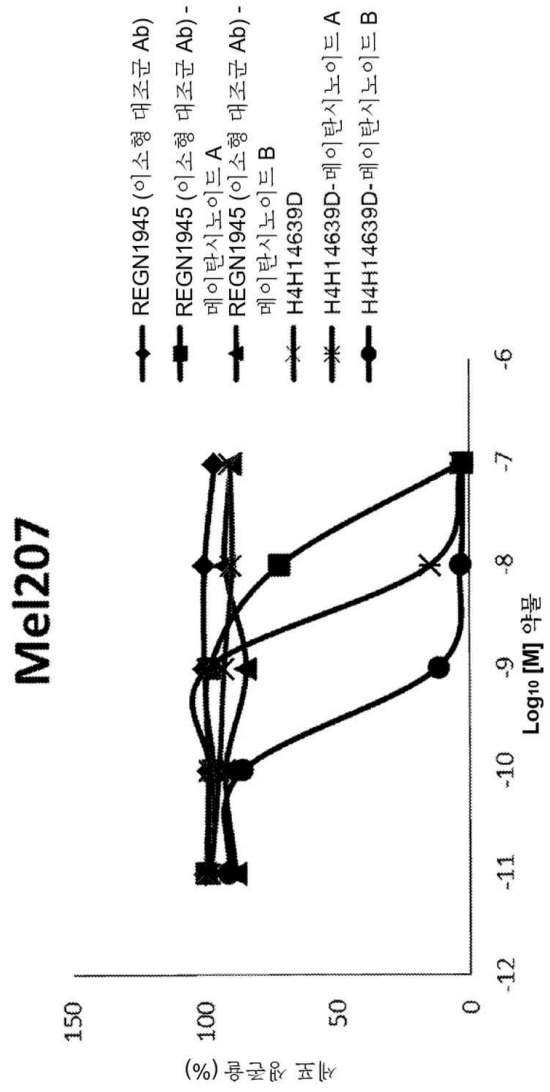
도면21a


Mel202
REGN1945 (이소형 대조군 Ab)
REGN1945 (이소형 대조군 Ab) - 메이탄시노이드 A
REGN1945 (이소형 대조군 Ab) - 메이탄시노이드 B
H4H14639D
H4H14639D-메이탄시노이드 A
H4H14639D-메이탄시노이드 B
세포 생존율 (%)
150
100
50
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log10 [M] 약물

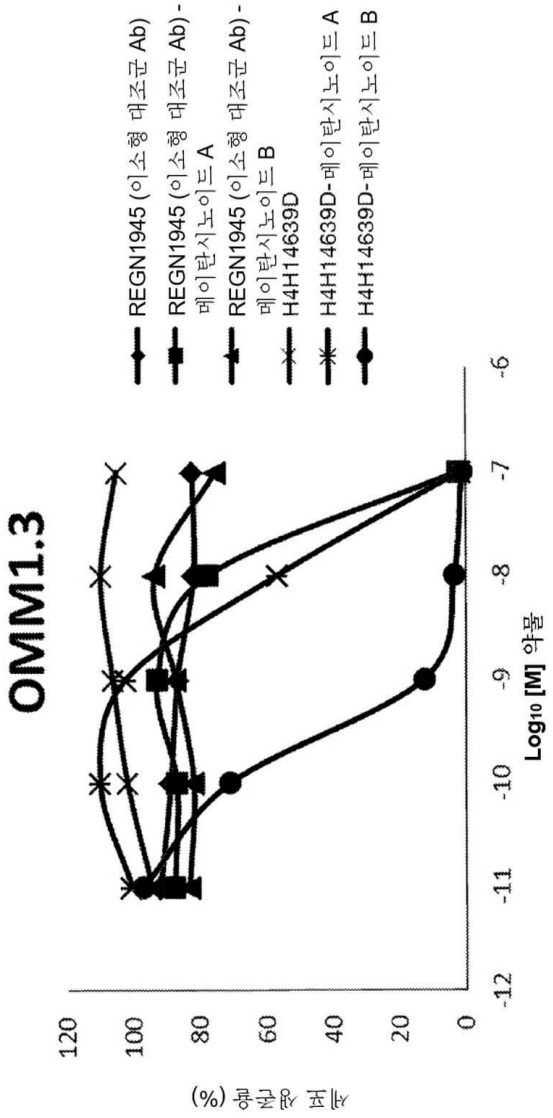
도면21b


MP65
REGN1945 (이소형 대조군 Ab)
REGN1945 (이소형 대조군 Ab) - 메이탄시노이드 A
REGN1945 (이소형 대조군 Ab) - 메이탄시노이드 B
H4H14639D
H4H14639D-메이탄시노이드 A
H4H14639D-메이탄시노이드 B
세포 생존율 (%)
150
100
50
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log10 [M] 약물

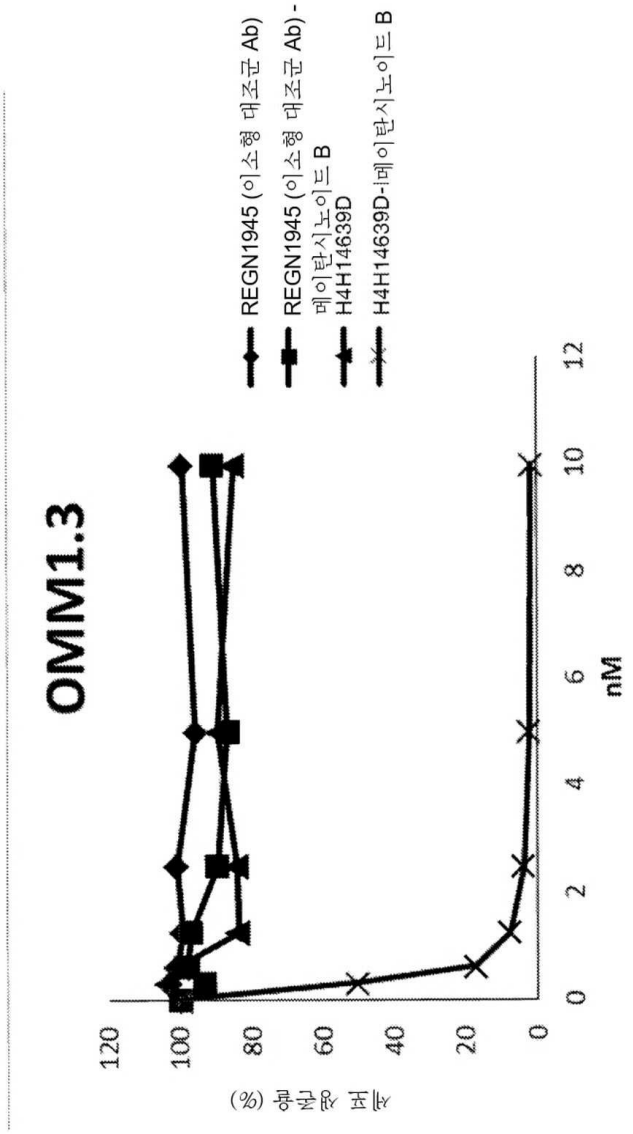
도면21c


Mel207
REGN1945 (이소형 대조군 Ab)
REGN1945 (이소형 대조군 Ab) - 메이탄시노이드 A
REGN1945 (이소형 대조군 Ab) - 메이탄시노이드 B
H4H14639D
H4H14639D-메이탄시노이드 A
H4H14639D-메이탄시노이드 B
세포 생존율 (%)
150
100
50
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log10 [M] 약물

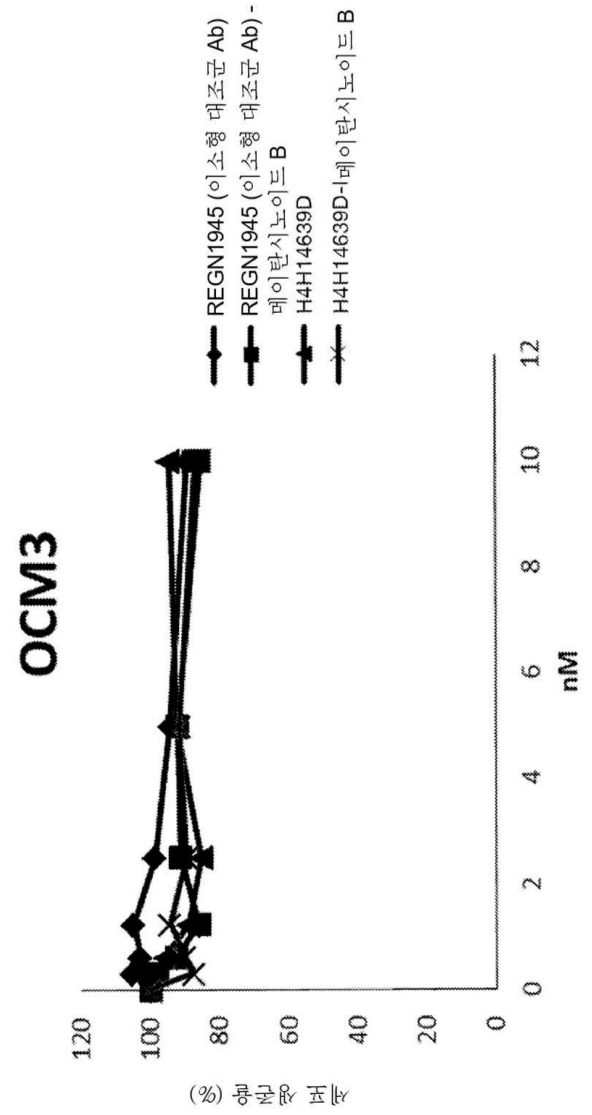
도면21d


OMM1.3
REGN1945 (이소형 대조군 Ab)
REGN1945 (이소형 대조군 Ab) - 메이탄시노이드 A
REGN1945 (이소형 대조군 Ab) - 메이탄시노이드 B
H4H14639D
H4H14639D-메이탄시노이드 A
H4H14639D-메이탄시노이드 B
세포 생존율 (%)
120
100
80
60
40
20
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log10 [M] 약물

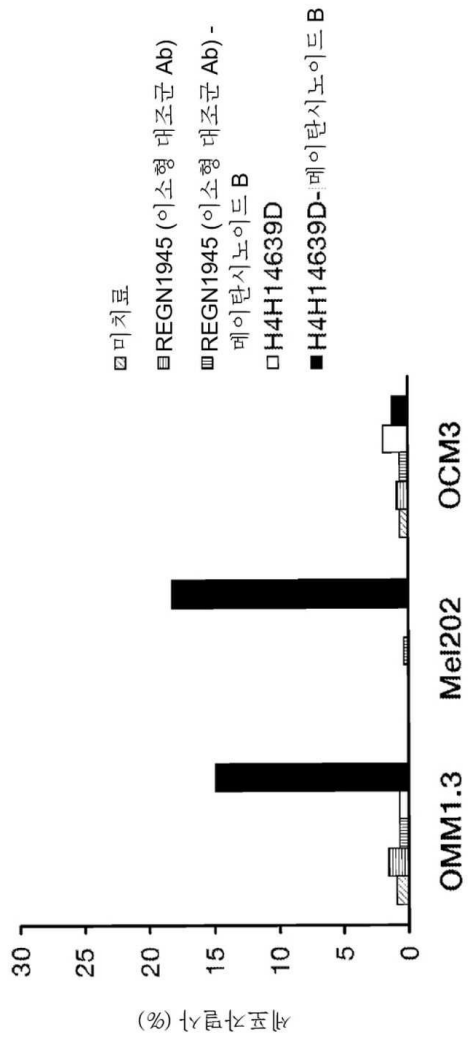
도면22a


OMM1.3
REGN1945 (이소형 대조군 Ab)
REGN1945 (이소형 대조군 Ab) - 메이탄시노이드 B
H4H14639D
H4H14639D-메이탄시노이드 B
세포 생존율 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
nM

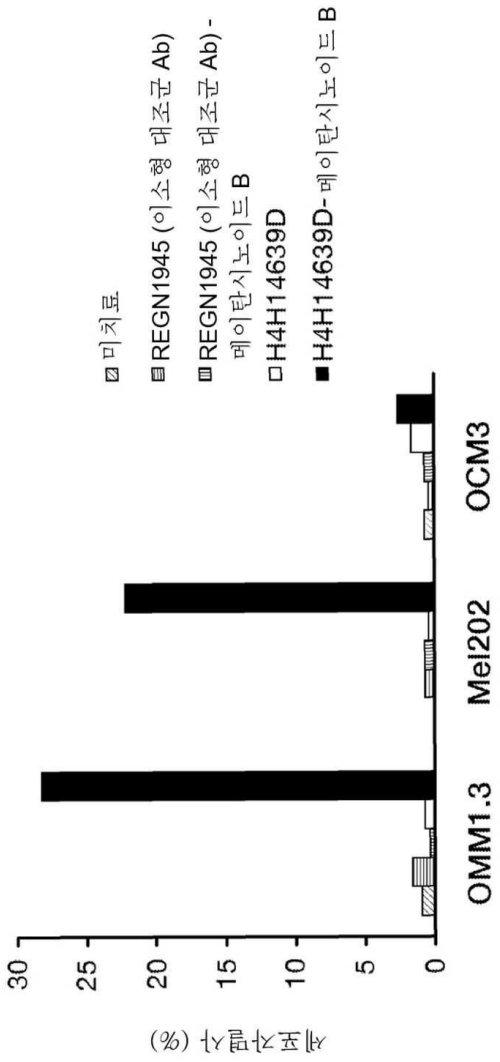
도면22b


OCM3
REGN1945 (이소형 대조군 Ab)
REGN1945 (이소형 대조군 Ab) - 메이탄시노이드 B
H4H14639D
H4H14639D-l메이탄시노이드 B
세포 생존율 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
nM

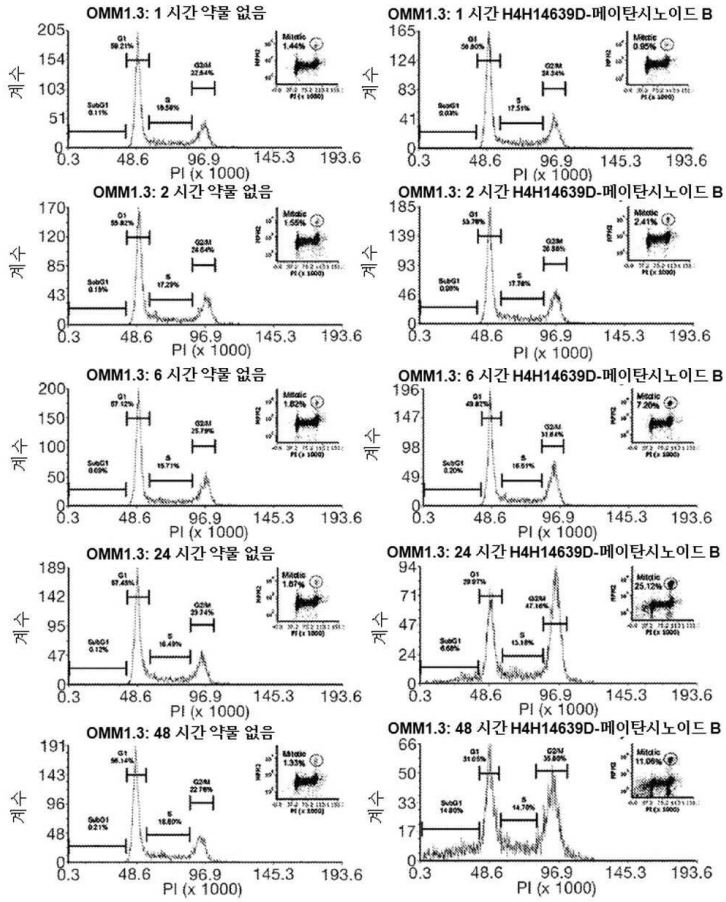
도면23


미치료
REGN1945 (이소형 대조군 Ab)
REGN1945 (이소형 대조군 Ab) - 메이탄시노이드 B
H4H14639D
H4H14639D-메이탄시노이드 B
세포자멸사 (%)
30
25
20
15
10
5
0
OMM1.3
Mel202
OCM3

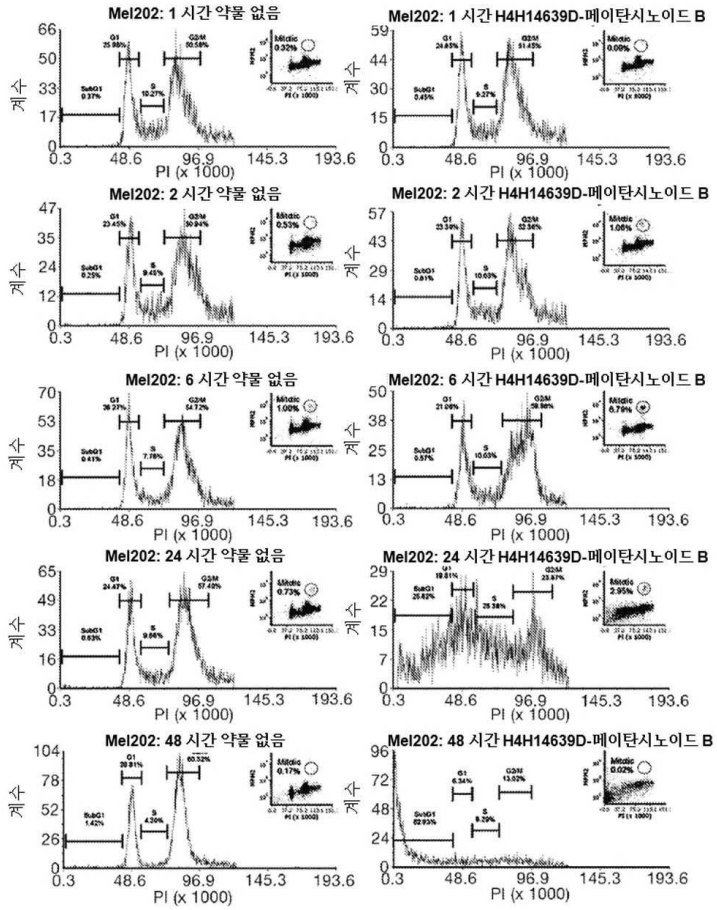
도면24


미치료
REGN1945 (이소형 대조군 Ab)
REGN1945 (이소형 대조군 Ab) - 메이탄시노이드 B
H4H14639D
H4H14639D- 메이탄시노이드 B
세포자멸사 (%)
30
25
20
15
10
5
0
OMM1.3
Mel202
OCM3

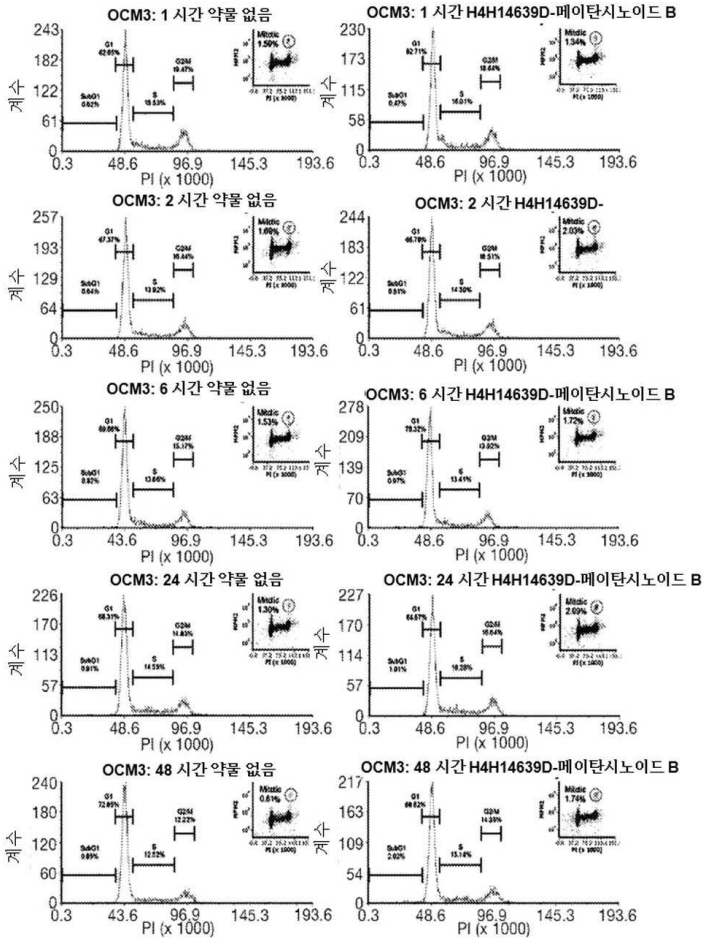
도면25


OMM1.3: 1 시간 약물 없음
OMM1.3: 1 시간 H4H14639D-메이탄시노이드 B
OMM1.3: 2 시간 약물 없음
OMM1.3: 2 시간 H4H14639D-메이탄시노이드 B
OMM1.3: 6 시간 약물 없음
OMM1.3: 6 시간 H4H14639D-메이탄시노이드 B
OMM1.3: 24 시간 약물 없음
OMM1.3: 24 시간 H4H14639D-메이탄시노이드 B
OMM1.3: 48 시간 약물 없음
OMM1.3: 48 시간 H4H14639D-메이탄시노이드 B
계수
PI (x 1000)
0.3
48.6
96.9
145.3
193.6

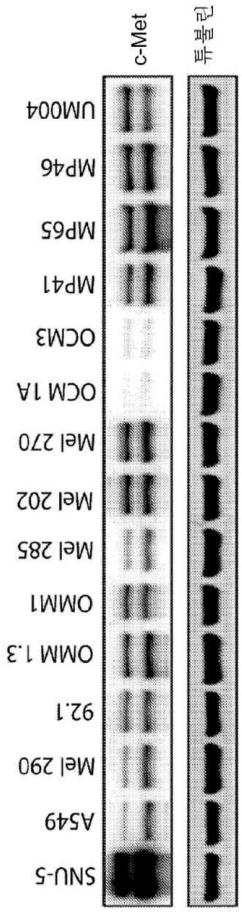
도면26


Mel202: 1 시간 약물 없음
Mel202: 1 시간 H4H14639D-메이탄시노이드 B
Mel202: 2 시간 약물 없음
Mel202: 2 시간 H4H14639D-메이탄시노이드 B
Mel202: 6 시간 약물 없음
Mel202: 6 시간 H4H14639D-메이탄시노이드 B
Mel202: 24 시간 약물 없음
Mel202: 24 시간 H4H14639D-메이탄시노이드 B
Mel202: 48 시간 약물 없음
Mel202: 48 시간 H4H14639D-메이탄시노이드 B
계수
PI (x 1000)
0.3
48.6
96.9
145.3
193.6

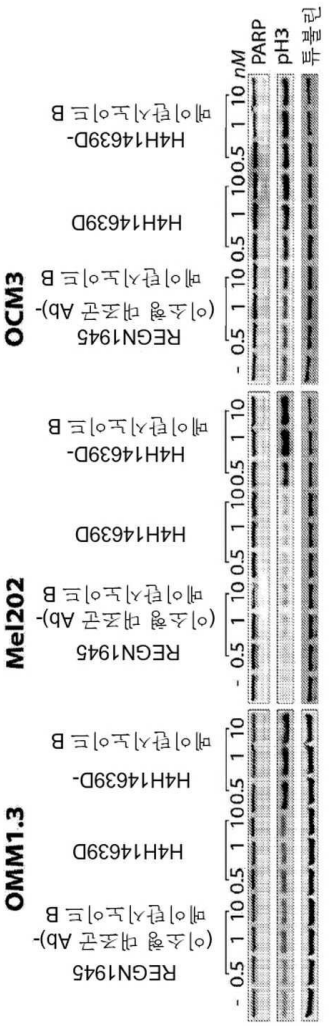
도면27


OCM3: 1 시간 약물 없음
OCM3: 1 시간 H4H14639D-메이탄시노이드 B
OCM3: 2 시간 약물 없음
OCM3: 2 시간 H4H14639D-
OCM3: 6 시간 약물 없음
OCM3: 6 시간 H4H14639D-메이탄시노이드 B
OCM3: 24 시간 약물 없음
OCM3: 24 시간 H4H14639D-메이탄시노이드 B
OCM3: 48 시간 약물 없음
OCM3: 48 시간 H4H14639D-메이탄시노이드 B
계수
PI (x 1000)

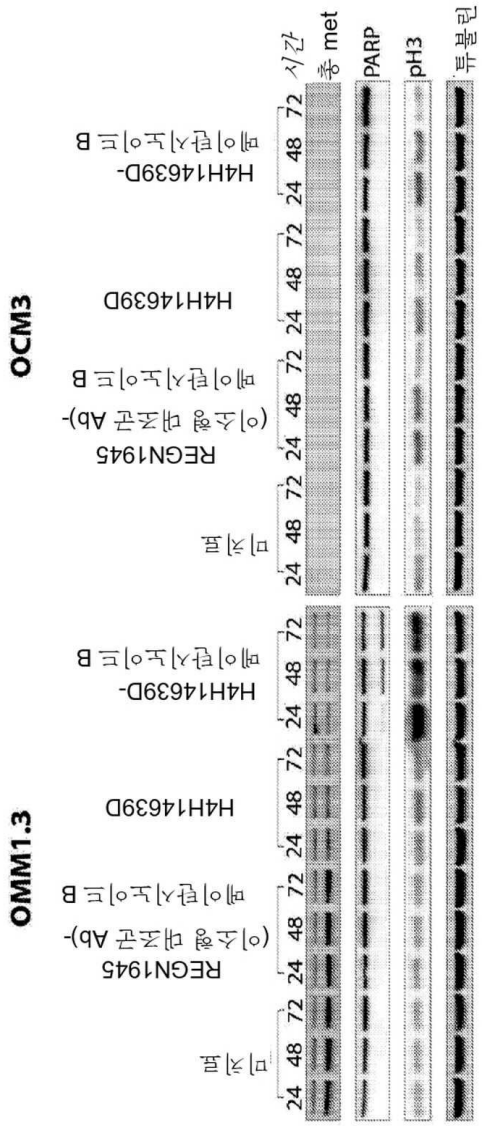
도면28


c-Met
튜불린
UM004
MP46
MP65
MP41
OCM3
OCM 1A
Mel 270
Mel 202
Mel 285
OMM1
OMM 1.3
92.1
Mel 290
A549
SNU-5

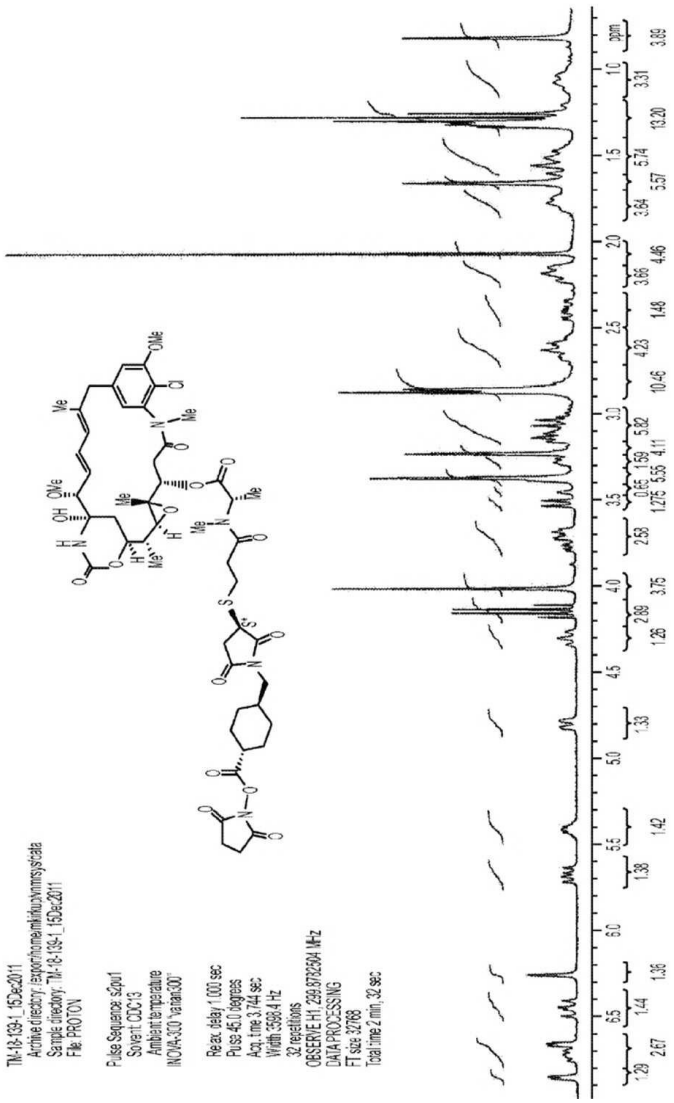
도면29


OMM1.3
Mel202
OCM3
REGN1945
(이소형 대조군 Ab)-
메이탄시노이드 B
H4H14639D
H4H14639D-
메이탄시노이드 B
nM
PARP
pH3
튜불린
- 0.5 1 10

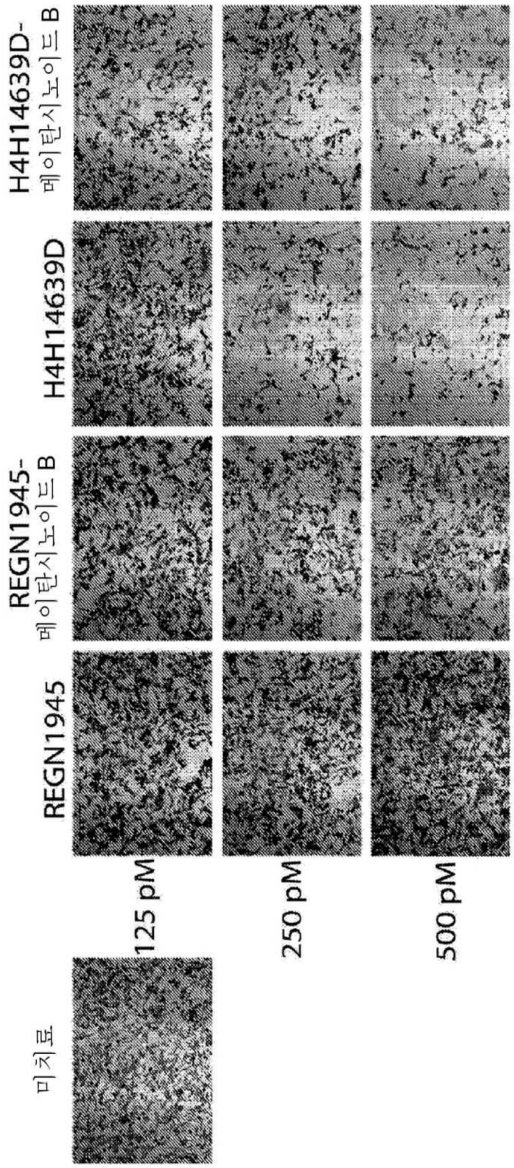
도면30


OMM1.3
OCM3
미처리
REGN1945 (이소형 대조군 Ab)
메이탄시노이드 B
H4H14639D
H4H14639D-메이탄시노이드 B
시간
총 met
PARP
pH3
튜불린
24
48
72

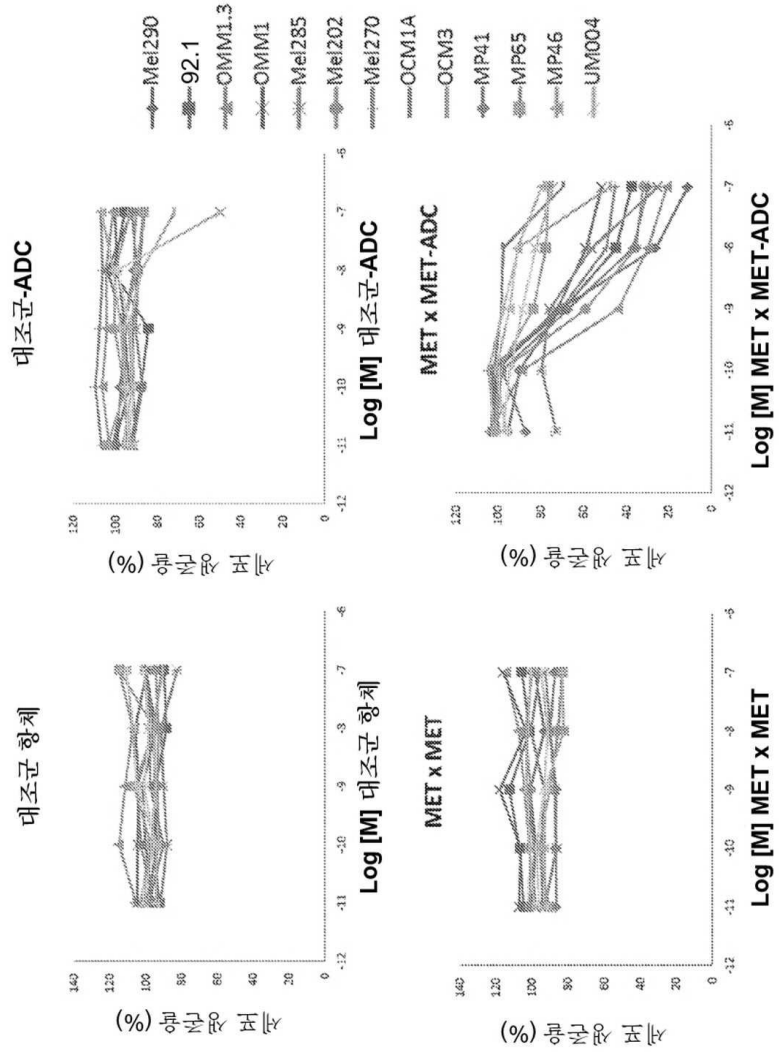
도면31


TM-18-139-1 15Dec2011
Archive directory: /export/home/mkhuzyw/mnsys/data
Sample directory: TM-18-139-1_15Dec2011
File: PROTON
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
INOVA-500 "varian500"
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.744 sec
Width 5500.4 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1, 299.973250 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 2 min, 32 sec
ppm

도면32


미치료
125 pM
250 pM
500 pM
REGN1945
REGN1945-
메이탄시노이드 B
H4H14639D
H4H14639D-
메이탄시노이드 B

도면33



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

Schwartz, Gary

Surriga, Oliver

<120> METHODS OF TREATING OCULAR CANCER USING ANTI-MET ANTIBODIES AND BISPECIFIC ANTIGEN BINDING MOLECULES THAT BIND MET

<130> 10548WO01

<140> TBD

<141> 2020-02-20

<150> 62/808,839

<151> 2019-02-21

<150> 62/823,788

<151> 2019-03-26

<160> 158

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtga ctccatcagt agttactatt ggacctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atcttttaca ggggggggcac cacctacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagttgaggt ctgtgaccgc cgcagacacg gccgtgtatt actgtgcgag gggagacgat 300

cttttagtgg tgacaagtgt ctactggtac atcgatctct ggggccgtgg caccctggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Phe Tyr Arg Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Gly Asp Asp Leu Leu Val Val Thr Ser Val Tyr Trp Tyr Ile Asp

100 105 110

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

ggtgactcca tcagtagtta ctat 24

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

Gly Asp Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr

1 5

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

atcttttaca gggggggcac c 21

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

Ile Phe Tyr Arg Gly Gly Thr

1 5

<210> 7

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

gcgaggggag acgatctttt agtggtgaca agtgtctact ggtacatcga tctc 54

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

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

1 5 10 15

Asp Leu

<210> 9

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtccggatt caccttcagt ggctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg gatggcagtt atatggtatg atggaagtaa tgattactat 180

ccagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agtcgaggac acggctgtgt attactgtgc gcgagatgcg 300

tgggacctac tacgttcctt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 10

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 10

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Asp Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Ala Trp Asp Leu Leu Arg Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 11

ggattcacct tcagtggcta tggc 24

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 12

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly

1 5

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 13

atatggtatg atggaagtaa tgat 24

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Asp

1 5

<210> 15

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

gcgcgagatg cgtgggacct actacgttcc tttgactac 39

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 16

Ala Arg Asp Ala Trp Asp Leu Leu Arg Ser Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 17

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 17

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagagtc 60

tcttgtgtag tgtctggatt caccttcagc agctttggca tgcattgggt ccgccaggct 120

ccagacaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa tgattactat 180

tcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240

ctacaaatga accgcctgag agccgaagac acggctgttt attactgtgc gcgagctaat 300

aactggaacc gttttgatgc ctttgatctc tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360

tca 363

<210> 18

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Val Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Asn Asn Trp Asn Arg Phe Asp Ala Phe Asp Leu Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 19

ggattcacct tcagcagctt tggc 24

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 20

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly

1 5

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 21

atatggtatg atggaagtaa tgat 24

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 22

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Asp

1 5

<210> 23

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 23

gcgcgagcta ataactggaa ccgttttgat gcctttgatc tc 42

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Synthetic

<400> 24

Ala Arg Ala Asn Asn Trp Asn Arg Phe Asp Ala Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 25

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 25

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggttcagc ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt catcttcagt aattatgaaa tgaactgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg gactggaatg gatttcatac attactagta gtggtaatat gaaatattac 180

gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgacaagaa ttcactgtat 240

ctgcaaatga gtagtctgag agtcgaggac acggctgttt attattgtgt gagaggaggg 300

cgatttttgg agtggttgac ctactacgtt atggtcgtct ggggccaagg gaccacggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 26

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr

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

85 90 95
Val Arg Gly Gly Arg Phe Leu Glu Trp Leu Thr Tyr Tyr Val Met Val
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 27

ggattcatct tcagtaatta tgaa 24

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 28

Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr Glu
1 5

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

attactagta gtggtaatat gaaa 24

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 30

Ile Thr Ser Ser Gly Asn Met Lys

1 5

<210> 31

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 31

gtgagaggag ggcgattttt ggagtggttg acctactacg ttatggtcgt c 51

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 32

Val Arg Gly Gly Arg Phe Leu Glu Trp Leu Thr Tyr Tyr Val Met Val

1 5 10 15

Val

<210> 33

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 33

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag tgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcaaat atttggtatg atggaactaa tgattactat 180

ccatactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attcccagaa cacactatat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtat attactgtgc gagagaggac 300

ttcattaact accggtcttt tgactattgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 34

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 34

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Asn Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Asp Tyr Tyr Pro Tyr Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 35

ggattcacct tcagtagcta tggc 24

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1 5

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 37

atttggtatg atggaactaa tgat 24

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 38

Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Asp

1 5

<210> 39

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 39

gcgagagagg acttcattaa ctaccggtct tttgactat 39

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 40

Ala Arg Glu Asp Phe Ile Asn Tyr Arg Ser Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 41

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 41

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc cagggacgtc cctgagactc 60

tcctgtgtcg cgtctggatt caccttcaga aattttggaa tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcaaat atatggtttg acggaagtaa tgagaactat 180

gtcgagtcca ttcagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgaat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac tcggctgtct attactgtgt gagagaggga 300

atcctaggaa ctactaatcc ttatgatgct tttgatgtct ggggccaagg gacaatggtc 360

accgtctctt ca 372

<210> 42

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 42

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

1 5 10 15

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

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

<210> 43

<

211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 43

ggattcacct tcagaaattt tgga 24

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 44

Gly Phe Thr Phe Arg Asn Phe Gly
1 5

<210> 45

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 45

atatggtttg acggaagtaa tgag 24

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 46

Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu

1 5

<210> 47

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 47

gtgagagagg gaatcctagg aactactaat ccttatgatg cttttgatgt c 51

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 48

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

1 5 10 15

Val

<210> 49

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 49

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt cacctttagt aactttggaa tgcactgggt ccgccaggcg 120

ccaggcaagg gactggagtg ggtggcaggt atatggtttg atggaagtaa taaaaactat 180

atagactccg tgaagggccg attcaccatc tcaagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagggc 300

tatgattcgg ggactgatta tatcccctat gatatttttg atatttgggg ccaagggaca 360

atggtcaccg tctcttca 378

<210> 50

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 50

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

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

Ala Gly Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Lys Asn Tyr Ile Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Tyr Asp Ser Gly Thr Asp Tyr Ile Pro Tyr Asp Ile
100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 51

ggattcacct ttagtaactt tgga 24

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Gly

1 5

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 53

atatggtttg atggaagtaa taaa 24

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 54

Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Lys

1 5

<210> 55

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 55

gcgagagagg gctatgattc ggggactgat tatatcccct atgatatttt tgatatt 57

<210> 56

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 56

Ala Arg Glu Gly Tyr Asp Ser Gly Thr Asp Tyr Ile Pro Tyr Asp Ile
1 5 10 15

Phe Asp Ile

<210> 57

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 57

gaagtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcacgtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120

ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attacttgga atagttataa catagactat 180

gctgactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240

ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagatgat 300

gactacagta actacgttta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 58

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 58

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Thr
1 5 10 15

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

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

<210> 59
<211> 24
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 59
ggattcacct ttgatgatta tgcc 24

<210> 60
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 60
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
1 5

<210> 61
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 61

attacttgga atagttataa cata 24

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 62

Ile Thr Trp Asn Ser Tyr Asn Ile

1 5

<210> 63

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 63

gcaaaagatg atgactacag taactacgtt tactttgact ac 42

<210> 64

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 64

Ala Lys Asp Asp Asp Tyr Ser Asn Tyr Val Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 65

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 65

caggttcagc tggtgcagtc cggaactgag gtgaaggagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgtaagg cctctggtta ctcctttacc acctatggta tcagctggct gcgacaggcc 120

cctggacaag gacttgagtg gatgggatgg atcagcactt acaatggtga cacaatctct 180

gcacagatgc tccaggacag agtcaccctg accgcagaca catccacgcg cacagcctac 240

atggaactga gaagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaggtcat 300

gagtatgata gtcttgttta ttcttactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 66

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 66

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ile Ser Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Ile Ser Ala Gln Met Leu

50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Arg Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly His Glu Tyr Asp Ser Leu Val Tyr Ser Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 67

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 67

ggttactcct ttaccaccta tggt 24

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 68

Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr Gly

1 5

<210> 69

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 69

atcagcactt acaatggtga caca 24

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 70

Ile Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr

1 5

<210> 71

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 71

gcgagaggtc atgagtatga tagtcttgtt tattcttac 39

<210> 72

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 72

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

1 5 10

<210> 73

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 73

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatgcca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaggg ggctggagtg ggtggcggtt atatggcatg atggagatgt tgaatactat 180

gtagactccg tgaaggaccg attcaccatc tccagagaca attccaagag cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaagat acggctttat attattgtgc gagagaggcg 300

tgggacctac tacgtccctt tgactattgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 74

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 74

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Trp His Asp Gly Asp Val Glu Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

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

<210> 75
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 75
ggattcacct tcagtagtta tgcc 24

<210> 76
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 76
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 77
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 77
atatggcatg atggagatgt tgaa 24

<210> 78
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 78

Ile Trp His Asp Gly Asp Val Glu

1 5

<210> 79

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 79

gcgagagagg cgtgggacct actacgtccc tttgactat 39

<210> 80

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 80

Ala Arg Glu Ala Trp Asp Leu Leu Arg Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 81

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 81

gaggtgcagc tggtggagtc tggaggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctgggtt catcgtcacc accaactaca tgacctggct ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcactt atttatagca gtggtcacac atactacgca 180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agacacaatt ccaagaacac actgtatcta 240

caaatggaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag tgctttcgca 300

gcggatgttt ttgatatctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcttc a 351

<210> 82

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 82

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Val Thr Thr Asn

20 25 30

Tyr Met Thr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ala Phe Ala Ala Asp Val Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210

> 83

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 83

gggttcatcg tcaccaccaa ctac 24

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 84

Gly Phe Ile Val Thr Thr Asn Tyr

1 5

<210> 85

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 85

atttatagca gtggtcacac a 21

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 86

Ile Tyr Ser Ser Gly His Thr

1 5

<210> 87

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 87

gcgagtgctt tcgcagcgga tgtttttgat atc 33

<210> 88

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 88

Ala Ser Ala Phe Ala Ala Asp Val Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 89

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 89

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgttcag cgtctggatt ctccttcagt cactttggca tgcactgggt ccgccaggtt 120

ccaggcgggg gcctggagtg ggtgacaagt atatggtttg atggaagtaa tagatattat 180

gcagactcct tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa tactctgtat 240

ctggaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt gagagagggg 300

atactgggaa ctactaatcc ttatgatgtt tttgatgtct ggggtcaggg gacaatggtc 360

accgtctctt ca 372

<210> 90

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 90

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser His Phe
20 25 30

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

Thr Ser Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Val Arg Glu Gly Ile Leu Gly Thr Thr Asn Pro Tyr Asp Val Phe Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 91

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 91

ggattctcct tcagtcactt tggc 24

<210> 92

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 92

Gly Phe Ser Phe Ser His Phe Gly

1 5

<210> 93

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 93

atatggtttg atggaagtaa taga 24

<210> 94

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 94

Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Arg

1 5

<210> 95

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 95

gtgagagagg ggatactggg aactactaat ccttatgatg tttttgatgt c 51

<210> 96

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 96

Val Arg Glu Gly Ile Leu Gly Thr Thr Asn Pro Tyr Asp Val Phe Asp

1 5 10 15

Val

<210> 97

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 97

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc cgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttaga agctatgtca tgagctggtt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagga atgagtggga gtggtggaag cacatcctac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attcaaagaa tacgctgtat 240

ctgctaatga acagcctgag aaccgaggac acggccgtat attattgtgc gaaagaaaac 300

ggggctaact ggaactacgg ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 98

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 98

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
20 25 30

Val Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Met Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Glu Asn Gly Ala Asn Trp Asn Tyr Gly Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 99

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 99

ggattcacct ttagaagcta tgtc 24

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 100

Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Val

1 5

<210> 101

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 101

atgagtggga gtggtggaag caca 24

<210> 102

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 102

Met Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr

1 5

<210> 103

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 103

gcgaaagaaa acggggctaa ctggaactac ggctactacg gtatggacgt c 51

<210> 104

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 104

Ala Lys Glu Asn Gly Ala Asn Trp Asn Tyr Gly Tyr Tyr Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 105

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 105

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgtag cgtctggatt ctccttcagt aactttggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcaatt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180

tcagactccg tgaagggccg cttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agtcgacgac acggctgtgt attactgtgc gagattcgat 300

cgctggaaat ttgacgcttt tgatatctgg ggccaaggga caatggtcac cgtctcttca 360

<210> 106

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 106

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asn Phe

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ser Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Phe Asp Arg Trp Lys Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 107
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 107
ggattctcct tcagtaactt tggc 24

<210> 108
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 108
Gly Phe Ser Phe Ser Asn Phe Gly
1 5

<210> 109
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 109
atatggtatg atggaagtaa taaa 24

<210> 110
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 110
Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 111

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 111

gcgagattcg atcgctggaa atttgacgct tttgatatc 39

<210> 112

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 112

Ala Arg Phe Asp Arg Trp Lys Phe Asp Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 113

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 113

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctttgcca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa tgattactat 180

gcagcctccg tgaagggccg tttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctggaaatga acagactgag agccgaggac acggctgtgt atcactgtgc gagagataac 300

tggaattact gggggggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 114

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 114

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Asp Tyr Tyr Ala Ala Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Asn Trp Asn Tyr Trp Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 115

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 115

ggattcacct tcagtagctt tgcc 24

<210> 116

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 116

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala

1 5

<210> 117

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 117

atatggtatg atggaagtaa tgat 24

<210> 118

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 118

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Asp

1 5

<210> 119

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 119

gcgagagata actggaatta ctgggggggt atggacgtc 39

<210> 120

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 120

Ala Arg Asp Asn Trp Asn Tyr Trp Gly Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 121

<211> 375

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 121

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc tgggtgcagc cgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cgcctttagt aattatgcca tgaactgggt ccgccagact 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attagtagta gtggtggaaa cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcgccatc tccagagaca attccaggga tacgctgcat 240

ctgcaaatga acagactgag agtcgaggac acggccgtct attactgtgc gaaagaaata 300

cgtccgtatt acgatctttc ctactattac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 122

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 122

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Val Ile Ser Ser Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asp Thr Leu His

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Glu Ile Arg Pro Tyr Tyr Asp Leu Ser Tyr Tyr Tyr Gly Met

100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 123

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 123

ggattcgcct ttagtaatta tgcc 24

<210> 124

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 124

Gly Phe Ala Phe Ser Asn Tyr Ala

1 5

<210> 125

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 125

attagtagta gtggtggaaa caca 24

<210> 126

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 126

Ile Ser Ser Ser Gly Gly Asn Thr

1 5

<210> 127

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 127

gcgaaagaaa tacgtccgta ttacgatctt tcctactatt acggtatgga cgtc 54

<210> 128

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 128

Ala Lys Glu Ile Arg Pro Tyr Tyr Asp Leu Ser Tyr Tyr Tyr Gly Met

1 5 10 15

Asp Val

<210> 129

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 129

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagt cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcaga aatttctact ggagctggct ccggcagccc 120

ccagggaagg gactagagtg gattgggcac atcaattaca atgggggcac cgactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaatca gttctccctg 240

aatttgaact ctgtgaccgc cgcagacacg gccgtgtatt actgtgcgag acagagattc 300

tacggtatgg acgtctgggg tccagggacc acggtcaccg tctcctca 348

<210> 130

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 130

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly His Ile Asn Tyr Asn Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Gln Arg Phe Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Pro Gly Thr Thr Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 131

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 131

ggtggctcca tcagaaattt ctac 24

<210> 132

<211> 8

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 132

Gly Gly Ser Ile Arg Asn Phe Tyr

1 5

<210> 133

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 133

atcaattaca atgggggcac c 21

<210> 134

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 134

Ile Asn Tyr Asn Gly Gly Thr

1 5

<210> 135

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 135

gcgagacaga gattctacgg tatggacgtc 30

<210> 136

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 136

Ala Arg Gln Arg Phe Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 137

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 137

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 138

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 138

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro

85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 139

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 139

cagagcatta gcagctat 18

<210> 140

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 140

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

1 5

<210> 141

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 141

gctgcatcc 9

<210> 142

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 142

Ala Ala Ser

1

<210> 143

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 143

caacagagtt acagtacccc tccgatcacc 30

<210> 144

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 144

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 145

<211> 1408

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 145

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
1 5 10 15

Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys
20 25 30

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys
65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
100 105 110

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
130 135 140

Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
145 150 155 160

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys

355 360 365

Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg

370 375 380

Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg

385 390 395 400

Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr

405 410 415

Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly

420 425 430

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg
580 585 590

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

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

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

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

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

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

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

740 745 750

Phe Ile Ser Thr Trp Trp Lys Glu Pro Leu Asn Ile Val Ser Phe Leu

755 760 765

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

770 775 780

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

785 790 795 800

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

805 810 815

Ile Cys Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro

820 825 830

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

835 840 845

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

850 855 860

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

865 870 875 880

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

885 890 895

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

900 905 910

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

915 920 925

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

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

Cys Arg Gln Val Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu
1040 1045 1050
Thr Ser Gly Asp Ser Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr
1055 1060 1065
Val His Ile Asp Leu Ser Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala
1070 1075 1080
Val Gln His Val Val Ile Gly Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe
1085 1090 1095

Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys Val Tyr His Gly
1100 1105 1110
Thr Leu Leu Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile His Cys Ala Val Lys
1115 1120 1125
Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val Ser Gln Phe Leu
1130 1135 1140
Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val Leu
1145 1150 1155

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

1160 1165 1170

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

1175 1180 1185

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

1190 1195 1200

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

1205 1210 1215

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

1220 1225 1230

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

1235 1240 1245

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

1250 1255 1260

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

1265 1270 1275

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

1280 1285 1290

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

1295 1300 1305

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

1310 1315 1320

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

1325 1330 1335

His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser

1340 1345 1350

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

1355 1360 1365

His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr

1370 1375 1380

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

1385 1390 1395

Thr Arg Pro Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser

1400 1405

<210> 146

<211> 1390

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 146

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
195 200 205
His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
210 215 220
Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu

225 230 235 240
Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
245 250 255
Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
260 265 270
Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
275 280 285
His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg

290 295 300
Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
305 310 315 320
Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
325 330 335
Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
340 345 350
Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys

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

420 425 430
Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly

435 440 445

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

450 455 460

Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu

465 470 475 480

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

485 490 495

Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys

500 505 510

Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln

515 520 525

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

530 535 540

Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile

545 550 555 560

Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
690 695 700
Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
705 710 715 720
Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
725 730 735
Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser

740 745 750
Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn
755 760 765
Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg
770 775 780
Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys
785 790 795 800
Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys

805 810 815
Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp
820 825 830
Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val
835 840 845
Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp
850 855 860
Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys

865 870 875 880
Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val
885 890 895
Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys
900 905 910
Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp
915 920 925
Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Thr Ala

930 935 940

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

945 950 955 960

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

965 970 975

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

980 985 990

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

995 1000 1005

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

1010 1015 1020

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

1025 1030 1035

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

1040 1045 1050

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

1055 1060 1065

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

1070 1075 1080

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

1085 1090 1095

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

1100 1105 1110

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

1115 1120 1125

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

1130 1135 1140

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

1145 1150 1155

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

1160 1165 1170

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

1175 1180 1185

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

1190 1195 1200

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

1205 1210 1215

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

1220 1225 1230

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

1235 1240 1245

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

1250 1255 1260

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

1265 1270 1275

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

1280 1285 1290

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

1295 1300 1305

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

1310 1315 1320

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

1325 1330 1335

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

1340 1345 1350

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

1355 1360 1365

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

1370 1375 1380

Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser

1385 1390

<210> 147

<211> 934

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 147

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

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

85 90 95
Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
100 105 110
Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
115 120 125
Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
130 135 140
Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys

145 150 155 160
Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
165 170 175
Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
180 185 190
Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys

355 360 365

Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg

370 375 380

Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg

385 390 395 400

Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr

405 410 415

Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu

465 470 475 480

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

485 490 495

Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys

500 505 510

Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln

515 520 525

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

530 535 540

Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile

545 550 555 560

Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
705 710 715 720
Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe

725 730 735
Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
740 745 750
Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn
755 760 765
Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg
770 775 780
Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys

785 790 795 800
Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys
805 810 815
Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp
820 825 830
Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val
835 840 845
Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp

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

915 920 925
Leu Phe Ser Gly Leu Lys
930
<210> 148

<211> 281

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 148

Lys Glu Ala Leu Ala Lys Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln
1 5 10 15

Leu Pro Asn Phe Thr Ala Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His
20 25 30

Glu His His Ile Phe Leu Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn
35 40 45

Glu Glu Asp Leu Gln Lys Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu
50 55 60

Glu His Pro Asp Cys Phe Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn
65 70 75 80

Leu Ser Gly Gly Val Trp Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val
85 90 95

Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg
100 105 110

Gly Thr Cys Gln Arg His Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile
115 120 125

Gln Ser Glu Val His Cys Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser
130 135 140

Gln Cys Pro Asp Cys Val Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser
145 150 155 160

Ser Val Lys Asp Arg Phe Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn
165 170 175

Ser Ser Tyr Phe Pro Asp His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg
180 185 190

Leu Lys Glu Thr Lys Asp Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr
195 200 205

Ile Asp Val Leu Pro Glu Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val

210 215 220

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

225 230 235 240

Glu Thr Leu Asp Ala Gln Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys

245 250 255

Ser Ile Asn Ser Gly Leu His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys

260 265 270

Ile Leu Thr Glu Lys Arg Lys Lys Arg

275 280

<210> 149

<211> 1101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 149

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

1 5 10 15

Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp

20 25 30

Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu

35 40 45

Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys Tyr Val Asn

50 55 60

Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg Cys Leu Gln

65 70 75 80

His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg Thr Leu Leu

85 90 95

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

100 105 110

Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly Gln Phe Ser

115 120 125

Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly Asp Leu Thr
130 135 140
Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln Val Val Val
145 150 155 160
Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu Leu Asp Ser
165 170 175
His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu Asn Gln Asn
180 185 190

Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile Pro Leu
195 200 205
Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln Cys Leu Ser
210 215 220
Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys Cys Val Arg
225 230 235 240
Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile Cys Leu Pro
245 250 255

Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu Gly Gly Thr
260 265 270
Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg Asn Asn Lys
275 280 285
Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser Cys Thr
290 295 300
Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys Thr Val Gly
305 310 315 320

Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile Ser Asn Gly
325 330 335
His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Val Ile
340 345 350
Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly Thr Leu Leu
355 360 365
Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg His Ile Ser

370 375 380

Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn Ser Ile Leu
385 390 395 400
Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe Ala Val Lys
405 410 415
Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe Ser Tyr Arg
420 425 430
Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser Phe Ile Ser
435 440 445

Thr Trp Trp Lys Glu Pro Leu Asn Ile Val Ser Phe Leu Phe Cys Phe
450 455 460
Ala Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn Ser
465 470 475 480
Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg Asn
485 490 495
Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys Cys
500 505 510

Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys Thr
515 520 525
Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp Leu
530 535 540
Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val Met
545 550 555 560
Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp Ile
565 570 575

Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys Ser
580 585 590
Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val Pro
595 600 605
Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys Gln
610 615 620

Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp Gln
625 630 635 640

Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Thr Ala Leu
645 650 655

Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln Ile
660 665 670

Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His Thr
675 680 685

Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro Thr Thr
690 695 700

Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala Thr Phe Pro Glu
705 710 715 720

Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln Val Gln
725 730 735

Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu Thr Ser Gly Asp Ser Asp
740 745 750

Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val His Ile Asp Leu Ser Ala
755 760 765

Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His Val Val Ile Gly Pro
770 775 780

Ser Ser Leu Ile Val His Phe Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly His Phe
785 790 795 800

Gly Cys Val Tyr His Gly Thr Leu Leu Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile
805 810 815

His Cys Ala Val Lys Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val
820 825 830

Ser Gln Phe Leu Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro
835 840 845

Asn Val Leu Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro
850 855 860

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

865 870 875 880

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

885 890 895

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

900 905 910

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

915 920 925

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

930 935 940

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

945 950 955 960

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

965 970 975

Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr Arg Gly Ala

980 985 990

Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr Val Tyr Leu Leu

995 1000 1005

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

1010 1015 1020

Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys Ala Glu Met Arg

1025 1030 1035

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

1040 1045 1050

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

1055 1060 1065

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

1070 1075 1080

Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp Thr Arg Pro Ala Ser Phe Trp

1085 1090 1095

Glu Thr Ser

1100

<210> 150

<211> 1082

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 150

Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala Tyr Val Ser Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp Asp
20 25 30

Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu Pro
35 40 45

Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys Tyr Val Asn Asp
50 55 60

Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg Cys Leu Gln His
65 70 75 80

Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg Thr Leu Leu Arg
85 90 95

Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr Arg Thr Glu Phe
100 105 110

Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly Gln Phe Ser Glu
115 120 125

Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly Asp Leu Thr Ile
130 135 140

Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln Val Val Val Ser
145 150 155 160

Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu Leu Asp Ser His
165 170 175

Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu Asn Gln Asn Gly
180 185 190

Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile Pro Leu Asn
195 200 205

Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln Cys Leu Ser Ala
210 215 220

Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys Cys Val Arg Ser
225 230 235 240
Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile Cys Leu Pro Ala
245 250 255
Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu Gly Gly Thr Arg
260 265 270
Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg Asn Asn Lys Phe
275 280 285

Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser Cys Thr Leu
290 295 300
Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys Thr Val Gly Pro
305 310 315 320
Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile Ser Asn Gly His
325 330 335
Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr
340 345 350

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

Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe Ser Tyr Arg Glu
420 425 430
Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser Phe Ile Ser Gly
435 440 445
Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn Ser Val Ser Val

450 455 460

Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg Asn Phe Thr Val

465 470 475 480

Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys Cys Thr Thr Pro

485 490 495

Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys Thr Lys Ala Phe

500 505 510

Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp Leu Ile Tyr Val

515 520 525

His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val Met Ile Ser Met

530 535 540

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

545 550 555 560

Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys Ser Cys Glu Asn

565 570 575

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

580 585 590

Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys Gln Ala Ile Ser

595 600 605

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

610 615 620

Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Thr Ala Leu Leu Leu Leu

625 630 635 640

Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln Ile Lys Asp Leu

645 650 655

Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His Thr Pro His Leu

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln Val Gln Tyr Pro Leu
705 710 715 720
Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu Thr Ser Gly Asp Ser Asp Ile Ser Ser
725 730 735

Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val His Ile Asp Leu Ser Ala Leu Asn Pro
740 745 750
Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His Val Val Ile Gly Pro Ser Ser Leu
755 760 765
Ile Val His Phe Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys Val
770 775 780
Tyr His Gly Thr Leu Leu Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile His Cys Ala
785 790 795 800

Val Lys Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val Ser Gln Phe
805 810 815
Leu Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val Leu
820 825 830
Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro Leu Val Val
835 840 845
Leu Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile Arg Asn Glu
850 855 860

Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly Leu Gln Val
865 870 875 880
Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe Val His Arg Asp
885 890 895
Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys Phe Thr Val Lys Val
900 905 910
Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr Asp Lys Glu Tyr Tyr Ser
915 920 925

Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Leu
930 935 940
Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys Ser Asp Val Trp Ser

945 950 955 960

Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr Arg Gly Ala Pro Pro Tyr

965 970 975

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

980 985 990

Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met

995 1000 1005

Leu Lys Cys Trp His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser

1010 1015 1020

Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly

1025 1030 1035

Glu His Tyr Val His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys

1040 1045 1050

Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp

1055 1060 1065

Asp Glu Val Asp Thr Arg Pro Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser

1070 1075 1080

<210> 151

<211> 626

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 151

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

1 5 10 15

Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp Asp

20 25 30

Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu Pro

35 40 45

Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys Tyr Val Asn Asp

50 55 60

Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg Cys Leu Gln His

65 70 75 80

Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg Thr Leu Leu Arg

85 90 95

Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr Arg Thr Glu Phe

100 105 110

Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly Gln Phe Ser Glu

115 120 125

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

130 135 140

Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln Val Val Val Ser

145 150 155 160

Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu Leu Asp Ser His

165 170 175

Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu Asn Gln Asn Gly

180 185 190

Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile Pro Leu Asn

195 200 205

Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln Cys Leu Ser Ala

210 215 220

Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys Cys Val Arg Ser

225 230 235 240

Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile Cys Leu Pro Ala

245 250 255

Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu Gly Gly Thr Arg

260 265 270

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

275 280 285

Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser Cys Thr Leu

290 295 300

Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys Thr Val Gly Pro

305 310 315 320

Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile Ser Asn Gly His
325 330 335
Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr

340 345 350
Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly Thr Leu Leu Thr
355 360 365
Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg His Ile Ser Ile
370 375 380
Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn Ser Ile Leu Glu
385 390 395 400
Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe Ala Val Lys Leu

405 410 415
Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe Ser Tyr Arg Glu
420 425 430
Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser Phe Ile Ser Gly
435 440 445
Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn Ser Val Ser Val
450 455 460
Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg Asn Phe Thr Val

465 470 475 480
Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys Cys Thr Thr Pro
485 490 495
Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys Thr Lys Ala Phe
500 505 510
Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp Leu Ile Tyr Val
515 520 525
His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val Met Ile Ser Met

530 535 540
Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp Ile Asp Pro Glu
545 550 555 560
Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys Ser Cys Glu Asn

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

Leu Lys

625

<210> 152

<211> 650

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 152

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

1 5 10 15

Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp Asp

20 25 30

Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu Pro

35 40 45

Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys Tyr Val Asn Asp

50 55 60

Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg Cys Leu Gln His

65 70 75 80

Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg Thr Leu Leu Arg

85 90 95

Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr Arg Thr Glu Phe

100 105 110

Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly Gln Phe Ser Glu

115 120 125

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

130 135 140

Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln Val Val Val Ser

145 150 155 160

Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu Leu Asp Ser His

165 170 175

Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu Asn Gln Asn Gly

180 185 190

Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile Pro Leu Asn

195 200 205

Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln Cys Leu Ser Ala

210 215 220

Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys Cys Val Arg Ser

225 230 235 240

Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile Cys Leu Pro Ala

245 250 255

Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu Gly Gly Thr Arg

260 265 270

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

275 280 285

Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser Cys Thr Leu

290 295 300

Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys Thr Val Gly Pro

305 310 315 320

Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile Ser Asn Gly His

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg His Ile Ser Ile

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Trp Trp Lys Glu Pro Leu Asn Ile Val Ser Phe Leu Phe Cys Phe Ala

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys Ser Cys

580 585 590

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

595 600 605

Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys Gln Ala

610 615 620

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser

625 630 635 640

Glu Glu Asp Leu His His His His His His

645 650

<210> 153

<211> 838

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400>

153

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

1 5 10 15

Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp Asp

20 25 30

Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu Pro

35 40 45

Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys Tyr Val Asn Asp

50 55 60

Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg Cys Leu Gln His

65 70 75 80

Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg Thr Leu Leu Arg

85 90 95

Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr Arg Thr Glu Phe

100 105 110

Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly Gln Phe Ser Glu

115 120 125

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

130 135 140

Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln Val Val Val Ser

145 150 155 160

Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu Leu Asp Ser His

165 170 175

Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu Asn Gln Asn Gly

180 185 190

Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile Pro Leu Asn
195 200 205

Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln Cys Leu Ser Ala
210 215 220

Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys Cys Val Arg Ser
225 230 235 240

Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile Cys Leu Pro Ala
245 250 255

Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu Gly Gly Thr Arg
260 265 270

Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg Asn Asn Lys Phe
275 280 285

Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser Cys Thr Leu
290 295 300

Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys Thr Val Gly Pro
305 310 315 320

Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile Ser Asn Gly His
325 330 335

Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr
340 345 350

Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly Thr Leu Leu Thr
355 360 365

Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg His Ile Ser Ile
370 375 380

Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn Ser Ile Leu Glu
385 390 395 400

Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe Ala Val Lys Leu
405 410 415

Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe Ser Tyr Arg Glu
420 425 430

Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser Phe Ile Ser Thr
435 440 445

Trp Trp Lys Glu Pro Leu Asn Ile Val Ser Phe Leu Phe Cys Phe Ala
450 455 460
Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn Ser Val
465 470 475 480
Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg Asn Phe
485 490 495
Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys Cys Thr
500 505 510

Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys Thr Lys
515 520 525
Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp Leu Ile
530 535 540
Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val Met Ile
545 550 555 560
Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp Ile Asp
565 570 575

Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys Ser Cys
580 585 590
Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val Pro Asn
595 600 605
Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys Gln Ala
610 615 620
Met Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val
625 630 635 640

Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile
645 650 655
Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val
660 665 670
Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

675 680 685

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

690 695 700

Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala

705 710 715 720

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

725 730 735

Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys

740 745 750

Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr

755 760 765

Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr

770 775 780

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

785 790 795 800

Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser

805 810 815

Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser

820 825 830

His Ser Pro Gly Lys Glu

835

<210> 154

<211> 1100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 154

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

1 5 10 15

Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp

20 25 30

Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu

35 40 45

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

Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly Gln Phe Ser
115 120 125
Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Val Lys Gly Asp Leu Thr
130 135 140
Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln Val Val Val
145 150 155 160
Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu Leu Asp Ser
165 170 175

His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Pro Leu Asn Gln Asn
180 185 190
Gly Tyr Thr Leu Val Val Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile Pro Leu
195 200 205
Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln Cys Leu Ser
210 215 220
Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys Cys Val Arg
225 230 235 240

Ser Glu Glu Cys Pro Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile Cys Leu Pro
245 250 255
Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Thr Ser Ala Pro Leu Glu Gly Gly Thr
260 265 270
Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg Asn Asn Lys
275 280 285

Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser Cys Thr
290 295 300

Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys Thr Val Gly
305 310 315 320
Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile Ser Asn Gly
325 330 335
His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Ile Ile
340 345 350
Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly Thr Leu Leu
355 360 365

Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg His Ile Ser
370 375 380
Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn Ser Ile Leu
385 390 395 400
Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe Ala Val Lys
405 410 415
Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe Ser Tyr Arg
420 425 430

Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser Phe Ile Ser
435 440 445
Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu His Ser Val Ser
450 455 460
Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg Asn Phe Thr
465 470 475 480
Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys Cys Thr Thr
485 490 495

Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys Thr Lys Ala
500 505 510
Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp Leu Ile Tyr
515 520 525
Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val Met Ile Ser

530 535 540

Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp Ile Asp Pro
545 550 555 560

Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys Ser Cys Glu
565 570 575

Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val Pro Asn Asp
580 585 590

Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys Gln Ala Ile
595 600 605

Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp Gln Asn Phe
610 615 620

Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Ile Ala Leu Leu Leu
625 630 635 640

Leu Leu Gly Leu Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln Ile Lys Asp
645 650 655

Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His Thr Pro His
660 665 670

Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro Thr Thr Glu Met
675 680 685

Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala Thr Phe Pro Glu Asp Gln
690 695 700

Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln Val Gln Tyr Pro
705 710 715 720

Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu Thr Ser Gly Asp Ser Asp Ile Ser
725 730 735

Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val His Ile Asp Leu Ser Ala Leu Asn
740 745 750

Pro Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His Val Val Ile Gly Pro Ser Ser
755 760 765

Leu Ile Val His Phe Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys
770 775 780

Val Tyr His Gly Thr Leu Leu Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile His Cys
785 790 795 800
Ala Val Lys Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val Ser Gln
805 810 815

Phe Leu Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val
820 825 830
Leu Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro Leu Val
835 840 845
Val Leu Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile Arg Asn
850 855 860
Glu Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly Leu Gln
865 870 875 880

Val Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe Val His Arg
885 890 895
Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys Phe Thr Val Lys
900 905 910
Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr Asp Lys Glu Tyr Tyr
915 920 925
Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val Lys Trp Met Ala
930 935 940

Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys Ser Asp Val Trp
945 950 955 960
Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr Arg Gly Ala Pro Pro
965 970 975
Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr Val Tyr Leu Leu Gln Gly
980 985 990
Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val
995 1000 1005

Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe
1010 1015 1020
Ser Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile

1025 1030 1035

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

1040 1045 1050

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

1055 1060 1065

Asp Asp Glu Val Asp Thr Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp

1070 1075 1080

Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His

1085 1090 1095

His His

1100

<210> 155

<211> 936

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 155

Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys

65 70 75 80

Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu

85 90 95

Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val

100 105 110

Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His Val Phe Pro His Asn His Thr Ala

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp His Pro Leu His Ser Ile Ser Val

180 185 190

Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln

195 200 205

Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys

210 215 220

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

225 230 235 240

Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg

245 250 255

Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu

260 265 270

Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu

275 280 285

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

290 295 300

Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly

305 310 315 320

Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser

325 330 335

Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys

340 345 350

Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro

355 360 365

Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly
370 375 380
Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu
385 390 395 400

Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr
405 410 415
Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly
420 425 430
Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro
435 440 445
Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro
450 455 460

Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val
465 470 475 480
Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys
485 490 495
Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val
500 505 510
Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu
515 520 525

Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val
530 535 540
Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys
545 550 555 560
Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys
565 570 575
Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu
580 585 590

Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys
595 600 605
His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln

610 615 620

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

625 630 635 640

Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn

645 650 655

Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr

660 665 670

Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro

675 680 685

Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu

690 695 700

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

705 710 715 720

Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile

725 730 735

Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val

740 745 750

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

755 760 765

Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln

770 775 780

Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp

785 790 795 800

Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val

805 810 815

Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn

820 825 830

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

835 840 845

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

850 855 860

Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn
865 870 875 880
Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu
885 890 895
Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp Gln Asn Phe Thr Glu Gln Lys Leu
900 905 910

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
915 920 925
Asp Leu His His His His His His
930 935

<210> 156
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 156
Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp Gly Phe Met Phe
1 5 10

<210> 157
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 157

Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp
1 5 10

<210> 158
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 158
Phe Ile Lys Gly Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly

1 5 10 15

Arg Phe Met Gln Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His

20 25 30

Val Asn Phe

35