



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0170835  
(43) 공개일자 2024년12월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61K 47/68 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)  
C07K 14/725 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/2863 (2013.01)  
A61K 39/4611 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2024-7036670
- (22) 출원일자(국제) 2023년03월31일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년11월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2023/085417
- (87) 국제공개번호 WO 2023/186078  
국제공개일자 2023년10월05일
- (30) 우선권주장  
202210345737.1 2022년04월02일 중국(CN)

- (71) 출원인  
바이오세우스 인크.  
중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완  
타운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비
- (72) 발명자  
우 판  
중국, 광둥 519080, 주하이, 상저우 디스트릭트,  
탕지아완 타운, 넘버 1 케지 7 로드, 빌딩 4, 10  
비  
마오 샤오니우  
중국, 광둥 519080, 주하이, 상저우 디스트릭트,  
탕지아완 타운, 넘버 1 케지 7 로드, 빌딩 4, 10  
비  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인한얼

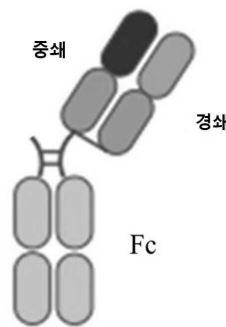
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 c-Met에 대한 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 출원은 c-Met에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 이를 포함하는 면역접합체, 약제학적 조성물 및 키트에 관한 것이다. 본 출원은 또한 키트 또는 약물의 제조에서의, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도에 관한 것이다. 항체는 c-Met를 발현하거나 과발현하는 세포에 대한 상대적으로 높은 친화도를 갖고, 또한 일부 열적 안정성을 갖는다. 또한, 항체는 HGF-c-Met 신호 경로를 억제할 수 있어서 암세포가 세포사멸을 거치도록 유발하고 따라서 암세포의 증식을 억제할 수 있다. 항체는 종양에 대한 표적 요법에 적용할 큰 잠재력을 갖는다.

대표도



(52) CPC특허분류

*A61K 39/4631* (2023.05)  
*A61K 39/46441* (2023.05)  
*A61K 47/6803* (2023.08)  
*A61P 35/00* (2018.01)  
*C07K 14/7051* (2013.01)  
*C07K 2317/31* (2013.01)  
*C07K 2317/55* (2013.01)  
*C07K 2317/622* (2013.01)  
*C07K 2319/02* (2013.01)

(72) 발명자

**루오 이**

중국, 광둥 519080, 주하이, 상저우 디스트릭트,  
탕지아완 타운, 넘버 1 케지 7 로드, 빌딩 4, 10비

**왕 평**

중국, 광둥 519080, 주하이, 상저우 디스트릭트,  
탕지아완 타운, 넘버 1 케지 7 로드, 빌딩 4, 10비

**자오 쟈팅**

중국, 광둥 519080, 주하이, 상저우 디스트릭트,  
탕지아완 타운, 넘버 1 케지 7 로드, 빌딩 4, 10비

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

c-Met에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이

(a) 다음의 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH):

(i) 서열번호 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 또는 35 중 어느 하나에 제시된 서열, 또는 이와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예: 1, 2 또는 3개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열로 구성된 VH CDR1,

(ii) 서열번호 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51 또는 53 중 어느 하나에 제시된 서열, 또는 이와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예: 1, 2 또는 3개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열로 구성된 VH CDR2, 및

(iii) 서열번호 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69 또는 71 중 어느 하나에 제시된 서열, 또는 이와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예: 1, 2 또는 3개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열로 구성된 VH CDR3;

및/또는,

(b) 다음의 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL):

(iv) 서열번호 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 또는 36 중 어느 하나에 제시된 서열, 또는 이와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예: 1, 2 또는 3개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열로 구성된 VL CDR1,

(v) 서열번호 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 또는 54 중 어느 하나에 제시된 서열, 또는 이와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예: 1, 2 또는 3개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열로 구성된 VL CDR2, 및

(vi) 서열번호 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70 또는 72 중 어느 하나에 제시된 서열, 또는 이와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예: 1, 2 또는 3개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열로 구성된 VL CDR3을 포함하고;

바람직하게는, 상기 (i) 내지 (vi) 중 어느 하나에 기재된 치환이 보존적 치환(conservative substitution)이고;

바람직하게는, 상기 (i) 내지 (vi) 중 어느 하나에 기재된 CDR이 카바트(Kabat), IMGT 또는 초티아 넘버링 시스템(Chothia numbering systems)에 따라 정의되고;

바람직하게는, 상기 (i) 내지 (vi) 중 어느 하나에 기재된 CDR이 IMGT 넘버링 시스템에 따라 정의되는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

(1) 다음의 3개의 중쇄 CDR: 서열번호 19에 제시된 VH CDR1, 서열번호 37에 제시된 VH CDR2, 서열번호 55에 제시된 VH CDR3; 및/또는, 다음의 3개의 경쇄 CDR: 서열번호 20에 제시된 VL CDR1, 서열번호 38에 제시된 VL CDR2, 서열번호 56에 제시된 VL CDR3;

(2) 다음의 3개의 중쇄 CDR: 서열번호 21에 제시된 VH CDR1, 서열번호 39에 제시된 VH CDR2, 서열번호 57에 제시된 VH CDR3; 및/또는, 다음의 3개의 경쇄 CDR: 서열번호 22에 제시된 VL CDR1, 서열번호 40에 제시된 VL CDR2, 서열번호 58에 제시된 VL CDR3;

(3) 다음의 3개의 중쇄 CDR: 서열번호 23에 제시된 VH CDR1, 서열번호 41에 제시된 VH CDR2, 서열번호 59에 제시된 VH CDR3; 및/또는, 다음의 3개의 경쇄 CDR: 서열번호 24에 제시된 VL CDR1, 서열번호 42에 제시된 VL CDR2, 서열번호 60에 제시된 VL CDR3;

(4) 다음의 3개의 중쇄 CDR: 서열번호 25에 제시된 VH CDR1, 서열번호 43에 제시된 VH CDR2, 서열번호 61에 제시된 VH CDR3; 및/또는, 다음의 3개의 경쇄 CDR: 서열번호 26에 제시된 VL CDR1, 서열번호 44에 제시된 VL CDR2, 서열번호 62에 제시된 VL CDR3;

(5) 다음의 3개의 중쇄 CDR: 서열번호 27에 제시된 VH CDR1, 서열번호 45에 제시된 VH CDR2, 서열번호 63에 제시된 VH CDR3; 및/또는, 다음의 3개의 경쇄 CDR: 서열번호 28에 제시된 VL CDR1, 서열번호 46에 제시된 VL CDR2, 서열번호 64에 제시된 VL CDR3;

(6) 다음의 3개의 중쇄 CDR: 서열번호 29에 제시된 VH CDR1, 서열번호 47에 제시된 VH CDR2, 서열번호 65에 제시된 VH CDR3; 및/또는, 다음의 3개의 경쇄 CDR: 서열번호 30에 제시된 VL CDR1, 서열번호 48에 제시된 VL CDR2, 서열번호 66에 제시된 VL CDR3;

(7) 다음의 3개의 중쇄 CDR: 서열번호 31에 제시된 VH CDR1, 서열번호 49에 제시된 VH CDR2, 서열번호 67에 제시된 VH CDR3; 및/또는, 다음의 3개의 경쇄 CDR: 서열번호 32에 제시된 VL CDR1, 서열번호 50에 제시된 VL CDR2, 서열번호 68에 제시된 VL CDR3;

(8) 다음의 3개의 중쇄 CDR: 서열번호 33에 제시된 VH CDR1, 서열번호 51에 제시된 VH CDR2, 서열번호 69에 제시된 VH CDR3; 및/또는, 다음의 3개의 경쇄 CDR: 서열번호 34에 제시된 VL CDR1, 서열번호 52에 제시된 VL CDR2, 서열번호 70에 제시된 VL CDR3; 또는

(9) 다음의 3개의 중쇄 CDR: 서열번호 35에 제시된 VH CDR1, 서열번호 53에 제시된 VH CDR2, 서열번호 71에 제시된 VH CDR3; 및/또는, 다음의 3개의 경쇄 CDR: 서열번호 36에 제시된 VL CDR1, 서열번호 54에 제시된 VL CDR2, 서열번호 72에 제시된 VL CDR3을 포함하고;

바람직하게는, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 인간 면역글로불린(human immunoglobulin)의 프레임워크 영역을 추가로 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이

(a) (i) 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 또는 17 중 어느 하나에 제시된 서열;

(ii) 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 또는 17 중 어느 하나에 제시된 서열과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예: 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열; 또는

(iii) 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 또는 17 중 어느 하나에 제시된 서열과 비교하여 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성(sequence identity)을 갖는 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH);

및/또는

(b) (iv) 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 또는 18에 제시된 서열;

(v) 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 또는 18에 제시된 서열과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예: 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열; 또는

(vi) 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 또는 18에 제시된 서열과 비교하여 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고;

바람직하게는, 상기 (ii) 또는 (v)에 기재된 치환이 보존적 치환이고;

바람직하게는, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이

- (1) 서열번호 1에 제시된 서열을 갖는 VH와 서열번호 2에 제시된 서열을 갖는 VL;
- (2) 서열번호 3에 제시된 서열을 갖는 VH와 서열번호 4에 제시된 서열을 갖는 VL;
- (3) 서열번호 5에 제시된 서열을 갖는 VH와 서열번호 6에 제시된 서열을 갖는 VL;
- (4) 서열번호 7에 제시된 서열을 갖는 VH와 서열번호 8에 제시된 서열을 갖는 VL;
- (5) 서열번호 9에 제시된 서열을 갖는 VH와 서열번호 10에 제시된 서열을 갖는 VL;
- (6) 서열번호 11에 제시된 서열을 갖는 VH와 서열번호 12에 제시된 서열을 갖는 VL;
- (7) 서열번호 13에 제시된 서열을 갖는 VH와 서열번호 14에 제시된 서열을 갖는 VL;
- (8) 서열번호 15에 제시된 서열을 갖는 VH와 서열번호 16에 제시된 서열을 갖는 VL; 또는
- (9) 서열번호 17에 제시된 서열을 갖는 VH와 서열번호 18에 제시된 서열을 갖는 VL을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이

(a) 인간 면역글로불린 또는 이의 변이체의 중쇄 불변 영역(CH)으로서, 상기 변이체가 변이체가 유래되는 서열과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 또는 이들의 임의의 조합의 치환, 결실 또는 첨가(예: 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개의 아미노산 또는 이들의 임의의 조합의 치환, 결실 또는 첨가; 예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 또는 이들의 임의의 조합의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는, 인간 면역글로불린 또는 이의 변이체의 중쇄 불변 영역(CH); 및/또는

(b) 인간 면역글로불린 또는 이의 변이체의 경쇄 불변 영역(CL)으로서, 상기 변이체가 변이체가 유래되는 서열과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 또는 이들의 임의의 조합의 치환, 결실 또는 첨가(예: 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개의 아미노산 또는 이들의 임의의 조합의 치환, 결실 또는 첨가; 예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 또는 이들의 임의의 조합의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는, 인간 면역글로불린 또는 이의 변이체의 경쇄 불변 영역(CL)을 포함하고;

바람직하게는, 상기 중쇄 불변 영역이 IgG 중쇄 불변 영역, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 중쇄 불변 영역이고;

바람직하게는, 상기 경쇄 불변 영역이  $\kappa$  경쇄 불변 영역 또는  $\lambda$  경쇄 불변 영역이고;

바람직하게는, 상기 중쇄 불변 영역이 서열번호 121에 제시된 서열을 갖고;

바람직하게는, 상기 경쇄 불변 영역이 서열번호 122에 제시된 서열을 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단편이 Fab, Fab', (Fab')<sup>2</sup>, Fv, 이황화 연결된(disulfide-linked) Fv, scFv, 디아바디 및 단일 도메인 항체(sdAb)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나; 상기 항체가 무린(murine) 항체, 키메라(chimeric) 항체, 인간화 항체 또는 다중특이적(multispecific) 항체이고;

바람직하게는, 상기 항원 결합 단편이 Fab이고;

바람직하게는, 상기 항원 결합 단편이 Fc 단편(예: 인간 IgG1의 Fc 단편) 또는 이의 돌연변이체(mutant)를 추가로 포함하고;

바람직하게는, 상기 Fc 단편이 LALA 돌연변이 및 노브(knob) 돌연변이를 갖거나; 또는, 상기 Fc 단편이 LALA 돌연변이 및 홀(hole) 돌연변이를 갖고;

바람직하게는, 상기 Fc 단편이 서열번호 111 또는 112에 제시된 서열을 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩(encoding)하는 단리된 핵산 분자(isolated nucleic acid molecule).

#### 청구항 7

제6항에 따른 핵산 분자를 포함하는 벡터(vector)로서, 바람직하게는, 상기 벡터가 클로닝(cloning) 벡터 또는 발현 벡터인, 벡터.

#### 청구항 8

제6항에 따른 핵산 분자 또는 제7항에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포(host cell)로서, 바람직하게는, 상기 숙주 세포가 포유류 세포인, 숙주 세포.

#### 청구항 9

제8항에 따른 숙주 세포를 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 발현을 허용하는 조건 하에 배양하는 단계, 및 배양된 숙주 세포의 배양물로부터 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하기 위한 방법.

#### 청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 다중특이적 분자(multispecific molecule)로서,

바람직하게는, 상기 다중특이적 분자가 c-Met에 특이적으로 결합할 수 있고, 하나 이상의 다른 표적(target)에 추가로 특이적으로 결합할 수 있고;

바람직하게는, 상기 다중특이적 분자가 이중특이적 분자이고;

바람직하게는, 상기 이중특이적 분자가 제2 표적에 대한 제2 결합 특이성을 갖는 분자(예: 제2 항체)를 추가로 포함하는, 다중특이적 분자.

#### 청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제10항에 따른 다중특이적 분자, 및 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 다중특이적 분자에 연결된 치료제를 포함하는 면역접합체(immunoconjugate)로서,

바람직하게는, 상기 치료제가 세포독성제로부터 선택되고;

바람직하게는, 상기 치료제가 알킬화제, 유사분열 억제제(mitotic inhibitor), 항종양 항생제, 항대사산물, 토포아이스머라제 억제제, 티로신 키나제 억제제, 방사성 핵종 제제 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

바람직하게는, 상기 면역접합체가 항체-약물 접합체(ADC)인, 면역접합체.

#### 청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제10항에 따른 다중특이적 분자, 또는 제11항에 따른 면역접합체, 및 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물로서,

바람직하게는, 상기 약제학적 조성물이 추가의 약제학적 활성제를 추가로 포함하고;

바람직하게는, 상기 추가의 약제학적 활성제가 항종양 활성을 갖는 약물, 예를 들어, 알킬화제, 유사분열 억제제, 항종양 항생제, 항대사산물, 토포아이스머라제 억제제, 티로신 키나제 억제제, 방사성 핵종 제제, 방사선 민감제, 항혈관신생제, 사이토카인, 분자 표적 약물, 면역 체크포인트 억제제 또는 종양 용해성 바이러스이고;

바람직하게는, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 다중특이적 분자, 또는 상기 면역접합체 및 상기 추가의 약제학적 활성제가 별도의 구성 요소로서 또는 동일 조성물의 구성 요소로서 제공되는, 약제학적 조성물.

**청구항 13**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 키트(kit)로서,

바람직하게는, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 검출 가능한 표지(detectable label), 예를 들어, 효소(예: 서양고추냉이 퍼옥시다제), 방사성 핵종, 형광 염료, 발광 물질(예: 화학발광 물질) 또는 비오틴을 포함하고;

바람직하게는, 상기 키트가 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 특이적으로 인식할 수 있는 제2 항체를 추가로 포함하고;

바람직하게는, 상기 제2 항체가 검출 가능한 표지, 예를 들어, 효소(예: 서양고추냉이 퍼옥시다제), 방사성 핵종, 형광 염료, 발광 물질(예: 화학발광 물질) 또는 비오틴을 추가로 포함하는, 키트.

**청구항 14**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor)로서,

바람직하게는, 상기 항원 결합 도메인이 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역을 포함하고;

바람직하게는, 상기 항원 결합 도메인이 scFv이고;

바람직하게는, 상기 키메라 항원 수용체가 면역 이펙터 세포(예: T 세포)에 의해 발현되는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 15**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제10항에 따른 다중특이적 분자, 또는 제11항에 따른 면역접합체, 또는 제12항에 따른 억제학적 조성물, 또는 제14항에 따른 키메라 항원 수용체의 유효량과 종양 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, c-Met를 발현하는 종양 세포의 성장을 억제하고/하거나 종양 세포를 사멸시키기 위한 방법.

**청구항 16**

대상체(예: 인간)의 종양을 예방 및/또는 치료하기 위한 의약의 제조에서의, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제10항에 따른 다중특이적 분자, 또는 제11항에 따른 면역접합체, 또는 제12항에 따른 억제학적 조성물, 또는 제14항에 따른 키메라 항원 수용체의 용도로서,

바람직하게는, 상기 의약이 추가의 억제학적 활성제를 추가로 포함하고;

바람직하게는, 상기 추가의 억제학적 활성제가 항종양 활성을 갖는 약물, 예를 들어, 알킬화제, 유사분열 억제제, 항종양 항생제, 항대사산물, 토포아이스머라제 억제제, 티로신 키나제 억제제, 방사성 핵종 제제, 방사선 민감제, 항혈관신생제, 사이토카인, 분자 표적 약물, 면역 체크포인트 억제제 또는 종양 용해성 바이러스이고;

바람직하게는, 상기 종양이 c-Met를 발현하고;

바람직하게는, 상기 종양이 c-Met를 발현하는 종양 세포를 포함하고; 바람직하게는, 상기 c-Met가 종양 세포의 표면에서 발현되고;

바람직하게는, 상기 종양이 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer), 소세포 폐암(small cell lung cancer), 신장 세포 암종(renal cell carcinoma), 결장직장암(colorectal cancer), 난소암(ovarian cancer), 유방암(breast cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 위암(gastric cancer), 방광암(bladder cancer), 식도암(esophageal cancer), 중피종(mesothelioma), 흑색종(melanoma), 두경부암(head and neck cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 육종(sarcoma), 전립선암(prostate cancer), 교모세포종(glioblastoma), 자궁경부암(cervical cancer), 흉선암(thymic cancer), 백혈병(leukemia), 림프종(lymphoma), 골수종(myeloma), 균상 식육종(mycosis fungoids), 메르켈 세포 암종(Merkel cell carcinoma) 및 기타 악성 혈액 질환(other malignant blood diseases), 예를 들어, 고전적 호지킨 림프종(classical Hodgkin's lymphoma; CHL), 원발성 종격동 거대 B-세포 림프종(primary mediastinal large B-cell lymphoma), T-세포/조직구의 B-세포 풍부 림프종(B-cell

rich lymphoma of T-cell/histiocyte), EBV-양성 및 -음성 PTLD 및 EBV-관련 미만성 거대 B-세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma; DLBCL), 형질모세포 림프종(plasmablastic lymphoma), 림프절외 NK/T-세포 림프종(extranodal NK/T-cell lymphoma), 비인두암종(nasopharyngeal carcinoma) 및 HHV8-관련 원발성 삼출성 림프종(HHV8-associated primary effusion lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 중추신경계(central nervous system; CNS) 종양, 예를 들어, 원발성 CNS 림프종, 척추 축 종양(spinal axis tumor), 뇌간 신경교종(brainstem glioma)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

바람직하게는, 상기 대상체가 포유동물, 예를 들어, 인간인, 용도.

**청구항 17**

키트(kit)의 제조에서의, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도로서, 상기 키트가 종양이 c-Met를 표적으로 하는 항종양 요법에 의해 치료될 수 있는지 여부를 결정하고;

(1) 종양 세포를 함유하는 샘플을 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키고;

(2) 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 c-Met를 포함하는 복합체(complex)의 형성을 검출하기 위해 사용되고;

바람직하게는, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 검출 가능한 표지를 포함하고;

바람직하게는, 상기 c-Met가 포유동물(예: 인간, 원숭이)의 c-Met 이고;

바람직하게는, 상기 종양이 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신장 세포 암종, 결장직장암, 난소암, 유방암, 췌장암, 위암, 방광암, 식도암, 중피종, 흑색종, 두경부암, 갑상선암, 육종, 전립선암, 교모세포종, 자궁경부암, 흉선 암종, 백혈병, 림프종, 골수종, 근상 식육종, 메르켈 세포 암종 및 기타 혈액학적 악성 종양, 예를 들어, 고전적 호지킨 림프종(CHL), 원발성 종격동 거대 B-세포 림프종, T-세포/조직구의 B-세포 풍부 림프종, EBV-양성 및 -음성 PTLD 및 EBV-관련 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL), 형질모세포 림프종, 림프절외 NK/T-세포 림프종, 비인두암종 및 HHV8-관련 원발성 삼출성 림프종, 호지킨 림프종, 중추신경계(CNS) 종양, 예를 들어, 원발성 CNS 림프종, 척추 축 종양, 뇌간 신경교종으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 용도.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001]

본 출원은 생체의학 기술 분야에 속한다. 보다 구체적으로, 본 출원은 c-Met에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편뿐만 아니라, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 함유하는 면역접합체, 약제학적 조성물 및 키트(kit)에 관한 것이다. 본 출원은 키트 또는 의약의 제조에서의, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도에 관한 것이기도 하다.

**배경 기술**

[0002]

c-Met 단백질은 수용체 티로신 키나제이고, 이는 번역 후 변형을 통해 170kDa 리더 단백질로부터 50kDa의 α 서브유닛과 145kDa의 β 서브유닛으로 전환된다. 이는 이황화 결합 연결 후 막관통 이량체를 형성한다. 현재, c-Met의 주요 공지된 리간드는 간세포 성장 인자(HGF)이다. HGF 자극을 받으면, c-Met의 세포내 도메인은 티로신 잔기 Y1234 및 Y1235에서 자가인산화(autophosphorylation)를 거친 다음, 인산화 신호는 Y1349 및 Y1356으로 전달되어 c-Met의 세포내 도메인이 어댑터 단백질에 결합할 수 있도록 한다. c-Met의 다운스트림 신호 활성화 경로는 PI3K/Akt, Rac1/Cdc42 및 Erk/MAPK를 포함하고, 이는 세포 증식, 이동, 침윤 및 관 조직 형성과 같은 관련 징후에 크게 영향을 미칠 수 있다. c-Met 단백질이 자가인산화에 의해 활성화된 후, Cb1 유비퀴틴 리가제는 이 단백질의 유비퀴틴화를 시작한 다음, 분해 과정에 들어가고 c-Met 경로에 대한 음성 조절을 수행한다.

[0003]

연구에 따르면, c-Met는 암 진행을 촉진할 수 있으며, 다양한 종양 조직에서 고도로 발현되는 것으로 나타났다. 이는 항암제 개발의 표적(target)이 되고 있다. 전통적인 소분자 RTK 억제제 외에도, 거대 분자 표적화 항체의 약물 개발이 점차 발전하여 임상 연구로 심화되고 있다. 이의 예로는 항-c-Met 모노클로날 항체 MetMab이 포함된다. 다른 예는 항투블린 독소 테시린과 접합된 TR1801과 같은 ADC 분자이며, 이는 MET의 발현이 낮거나 중간이거나 높은 마우스 종양 PDX 모델에서 효과적이다.

[0004] 따라서, 친화도를 향상시키고 생산을 촉진하기 위해 새로운 항-c-Met 모노클로날 항체와 이의 상응하는 인간화 항체를 개발할 필요가 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0005] 많은 실험과 반복적인 탐색 후에, 본 발명자들은 c-Met에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공했다. 항체는 c-Met을 발현하거나 과발현하는 세포와 높은 친화도를 갖고 특정 열 안정성을 갖는다. 또한, 항체는 HGF-c-Met 신호전달 경로를 억제할 수 있어서 암세포의 세포사멸을 유발하고 암세포의 증식을 억제할 수 있다.

**과제의 해결 수단**

[0006] 따라서, 제1 양태에서, 본 출원은 c-Met에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하며, 여기서 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

[0007] (a) 다음의 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH):

[0008] (i) 서열번호 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 또는 35 중 어느 하나에 제시된 서열, 또는 이와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예: 1, 2 또는 3개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열로 구성된 VH CDR1,

[0009] (ii) 서열번호 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51 또는 53 중 어느 하나에 제시된 서열, 또는 이와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예: 1, 2 또는 3개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열로 구성된 VH CDR2, 및

[0010] (iii) 서열번호 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69 또는 71 중 어느 하나에 제시된 서열, 또는 이와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예: 1, 2 또는 3개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열로 구성된 VH CDR3;

[0011] 및/또는,

[0012] (b) 다음의 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL):

[0013] (iv) 서열번호 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 또는 36 중 어느 하나에 제시된 서열, 또는 이와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예: 1, 2 또는 3개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열로 구성된 VL CDR1,

[0014] (v) 서열번호 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 또는 54 중 어느 하나에 제시된 서열, 또는 이와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예: 1, 2 또는 3개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열로 구성된 VL CDR2, 및

[0015] (vi) 서열번호 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70 또는 72 중 어느 하나에 제시된 서열, 또는 이와 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예: 1, 2 또는 3개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열로 구성된 VL CDR3을 포함한다.

[0016] 특정 구현예에서, (i) 내지 (vi) 중 어느 하나에 기재된 치환은 보존적 치환(conservative substitution)이다.

[0017] 특정 구현예에서, (i) 내지 (vi) 중 어느 하나에 기재된 CDR은 카바트(Kabat), IMGT 또는 초티아 넘버링 시스템(Chothia numbering systems)에 따라 정의된다.

[0018] 특정 구현예에서, (i) 내지 (vi) 중 어느 하나에 기재된 CDR은 IMGT 넘버링 시스템에 따라 정의된다.

[0019] 특정 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 3개의 중쇄 CDR: 서열번호 19에 제시된 VH CDR1, 서열번호 37에 제시된 VH CDR2, 서열번호 55에 제시된 VH CDR3; 및/또는, 다음의 3개의 경쇄 CDR: 서열번호 20에 제시된 VL CDR1, 서열번호 38에 제시된 VL CDR2, 서열번호 56에 제시된 VL CDR3을 포함한다.

[0020] 특정 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 3개의 중쇄 CDR: 서열번호 21에 제시된 VH CDR1, 서열번호 39에 제시된 VH CDR2, 서열번호 57에 제시된 VH CDR3; 및/또는, 다음의 3개의

경쇄 CDR: 서열번호 22에 제시된 VL CDR1, 서열번호 40에 제시된 VL CDR2, 서열번호 58에 제시된 VL CDR3을 포함한다.

- [0021] 특정 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 3개의 중쇄 CDR: 서열번호 23에 제시된 VH CDR1, 서열번호 41에 제시된 VH CDR2, 서열번호 59에 제시된 VH CDR3; 및/또는, 다음의 3개의 경쇄 CDR: 서열번호 24에 제시된 VL CDR1, 서열번호 42에 제시된 VL CDR2, 서열번호 60에 제시된 VL CDR3을 포함한다.
- [0022] 특정 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 3개의 중쇄 CDR: 서열번호 25에 제시된 VH CDR1, 서열번호 43에 제시된 VH CDR2, 서열번호 61에 제시된 VH CDR3; 및/또는, 다음의 3개의 경쇄 CDR: 서열번호 26에 제시된 VL CDR1, 서열번호 44에 제시된 VL CDR2, 서열번호 62에 제시된 VL CDR3을 포함한다.
- [0023] 특정 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 27에 제시된 VH CDR1, 서열번호 45에 제시된 VH CDR2, 서열번호 63에 제시된 VH CDR3; 및/또는, 다음의 3개의 경쇄 CDR: 서열번호 28에 제시된 VL CDR1, 서열번호 46에 제시된 VL CDR2, 서열번호 64에 제시된 VL CDR3을 포함한다.
- [0024] 특정 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 3개의 중쇄 CDR: 서열번호 29에 제시된 VH CDR1, 서열번호 47에 제시된 VH CDR2, 서열번호 65에 제시된 VH CDR3; 및/또는, 다음의 3개의 경쇄 CDR: 서열번호 30에 제시된 VL CDR1, 서열번호 48에 제시된 VL CDR2, 서열번호 66에 제시된 VL CDR3을 포함한다.
- [0025] 특정 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 3개의 중쇄 CDR: 서열번호 31에 제시된 VH CDR1, 서열번호 49에 제시된 VH CDR2, 서열번호 67에 제시된 VH CDR3; 및/또는, 다음의 3개의 경쇄 CDR: 서열번호 32에 제시된 VL CDR1, 서열번호 50에 제시된 VL CDR2, 서열번호 68에 제시된 VL CDR3을 포함한다.
- [0026] 특정 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 3개의 중쇄 CDR: 서열번호 33에 제시된 VH CDR1, 서열번호 51에 제시된 VH CDR2, 서열번호 69에 제시된 VH CDR3; 및/또는, 다음의 3개의 경쇄 CDR: 서열번호 34에 제시된 VL CDR1, 서열번호 52에 제시된 VL CDR2, 서열번호 70에 제시된 VL CDR3을 포함한다.
- [0027] 특정 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 3개의 중쇄 CDR: 서열번호 35에 제시된 VH CDR1, 서열번호 53에 제시된 VH CDR2, 서열번호 71에 제시된 VH CDR3; 및/또는, 다음의 3개의 경쇄 CDR: 서열번호 36에 제시된 VL CDR1, 서열번호 54에 제시된 VL CDR2, 서열번호 72에 제시된 VL CDR3을 포함한다.
- [0028] 특정 구현예에서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 면역글로불린(human immunoglobulin)의 프레임워크 영역을 추가로 포함한다.
- [0029] 특정 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0030] (a) (i) 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 또는 17 중 어느 하나에 제시된 서열;
- [0031] (ii) 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 또는 17 중 어느 하나에 제시된 서열과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예: 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열; 또는
- [0032] (iii) 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 또는 17 중 어느 하나에 제시된 서열과 비교하여 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성(sequence identity)을 갖는 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH);
- [0033] 및/또는
- [0034] (b) (iv) 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 또는 18에 제시된 서열;
- [0035] (v) 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 또는 18에 제시된 서열과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가(예: 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는 서열; 또는

- [0036] (vi) 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 또는 18에 제시된 서열과 비교하여 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다.
- [0037] 특정 구현예에서, (ii) 또는 (v)에 기재된 치환은 보존적 치환이다.
- [0038] 특정 구현예에서, 상기 언급된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1에 제시된 서열을 갖는 VH와 서열번호 2에 제시된 서열을 갖는 VL을 포함한다.
- [0039] 특정 구현예에서, 상기 언급된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 3에 제시된 서열을 갖는 VH와 서열번호 4에 제시된 서열을 갖는 VL을 포함한다.
- [0040] 특정 구현예에서, 상기 언급된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 5에 제시된 서열을 갖는 VH와 서열번호 6에 제시된 서열을 갖는 VL을 포함한다.
- [0041] 특정 구현예에서, 상기 언급된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 7에 제시된 서열을 갖는 VH와 서열번호 8에 제시된 서열을 갖는 VL을 포함한다.
- [0042] 특정 구현예에서, 상기 언급된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 9에 제시된 서열을 갖는 VH와 서열번호 10에 제시된 서열을 갖는 VL을 포함한다.
- [0043] 특정 구현예에서, 상기 언급된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 11에 제시된 서열을 갖는 VH와 서열번호 12에 제시된 서열을 갖는 VL을 포함한다.
- [0044] 특정 구현예에서, 상기 언급된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 13에 제시된 서열을 갖는 VH와 서열번호 14에 제시된 서열을 갖는 VL을 포함한다.
- [0045] 특정 구현예에서, 상기 언급된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 15에 제시된 서열을 갖는 VH와 서열번호 16에 제시된 서열을 갖는 VL을 포함한다.
- [0046] 특정 구현예에서, 상기 언급된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 17에 제시된 서열을 갖는 VH와 서열번호 18에 제시된 서열을 갖는 VL을 포함한다.
- [0047] 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0048] (a) 인간 면역글로불린 또는 이의 변이체의 중쇄 불변 영역(CH)으로서, 상기 변이체가 변이체가 유래되는 서열과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 또는 이들의 임의의 조합의 치환, 결실 또는 첨가(예: 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개의 아미노산 또는 이들의 임의의 조합의 치환, 결실 또는 첨가; 예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 또는 이들의 임의의 조합의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는, 인간 면역글로불린 또는 이의 변이체의 중쇄 불변 영역(CH); 및/또는
- [0049] (b) 인간 면역글로불린 또는 이의 변이체의 경쇄 불변 영역(CL)으로서, 상기 변이체가 변이체가 유래되는 서열과 비교하여 하나 또는 여러 개의 아미노산 또는 이들의 임의의 조합의 치환, 결실 또는 첨가(예: 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개의 아미노산 또는 이들의 임의의 조합의 치환, 결실 또는 첨가; 예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 또는 이들의 임의의 조합의 치환, 결실 또는 첨가)를 갖는, 인간 면역글로불린 또는 이의 변이체의 경쇄 불변 영역(CL)을 포함한다.
- [0050] 특정 구현예에서, 중쇄 불변 영역은 IgG 중쇄 불변 영역, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 중쇄 불변 영역이다.
- [0051] 특정 구현예에서, 경쇄 불변 영역은  $\kappa$  경쇄 불변 영역 또는  $\lambda$  경쇄 불변 영역이다.
- [0052] 특정 구현예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호 121에 제시된 서열을 갖는다.
- [0053] 특정 구현예에서, 경쇄 불변 영역은 서열번호 122에 제시된 서열을 갖는다.
- [0054] 특정 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서, 항원 결합 단편은 Fab, Fab', (Fab')<sup>2</sup>, Fv, 이황화 연결된(disulfide-linked) Fv, scFv, 디아바디 및 단일 도메인 항체(sdAb)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

- [0055] 특정 구현예에서, 항체는 무린(murine) 항체, 키메라(chimeric) 항체, 인간화 항체 또는 다중특이적(multispecific) 항체이다.
- [0056] 특정 구현예에서, 항원 결합 단편은 Fab이다.
- [0057] 특정 구현예에서, 항원 결합 단편은 Fc 단편(예: 인간 IgG1의 Fc 단편) 또는 이의 돌연변이체(mutant)를 추가로 포함한다.
- [0058] 특정 구현예에서, Fc 단편은 LALA 돌연변이 및 노브(knob) 돌연변이를 갖거나; Fc 단편은 LALA 돌연변이 및 홀(hole) 돌연변이를 갖는다.
- [0059] 특정 구현예에서, Fc 단편은 서열번호 111 또는 112에 제시된 서열을 갖는다.
- [0060] 또 다른 양태에서, 본 출원은 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩(encoding)하는 단리된 핵산 분자(isolated nucleic acid molecule)를 제공한다.
- [0061] 또 다른 양태에서, 본 출원은 상기 기재된 바와 같은 핵산 분자를 포함하는 벡터(vector)를 제공한다. 특정 구현예에서, 벡터는 클로닝(cloning) 벡터 또는 발현 벡터이다.
- [0062] 또 다른 양태에서, 본 출원은 상기 기재된 바와 같은 핵산 분자 또는 상기 기재된 바와 같은 벡터를 포함하는 숙주 세포(host cell)를 제공한다. 특정 구현예에서, 숙주 세포는 포유류 세포이다.
- [0063] 또 다른 양태에서, 본 출원은 상기 기재된 바와 같은 숙주 세포를 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 발현을 허용하는 조건 하에 배양하는 단계, 및 배양된 숙주 세포의 배양물로부터 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는, 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하기 위한 방법을 제공한다.
- [0064] 또 다른 양태에서, 본 출원은 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 다중특이적 분자(multispecific molecule)를 제공한다.
- [0065] 특정 구현예에서, 다중특이적 분자는 c-Met에 특이적으로 결합할 수 있고, 하나 이상의 다른 표적에 추가로 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0066] 특정 구현예에서, 다중특이적 분자는 이중특이적 분자이다.
- [0067] 특정 구현예에서, 이중특이적 분자는 제2 표적에 대한 제2 결합 특이성을 갖는 분자(예: 제2 항체)를 추가로 포함한다.
- [0068] 또 다른 양태에서, 본 출원은 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 기재된 바와 같은 다중특이적 분자, 및 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 다중특이적 분자에 연결된 치료제를 포함하는 면역접합체를 제공한다.
- [0069] 특정 구현예에서, 치료제는 세포독성제로부터 선택된다.
- [0070] 특정 구현예에서, 치료제는 알킬화제, 유사분열 억제제(mitotic inhibitor), 항종양 항생제, 항대사산물, 토포 아이소머라제 억제제, 티로신 키나제 억제제, 방사성 핵종 제제 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0071] 특정 구현예에서, 면역접합체는 항체-약물 접합체(ADC)이다.
- [0072] 또 다른 양태에서, 본 출원은 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 기재된 바와 같은 다중특이적 분자, 또는 상기 기재된 바와 같은 면역접합체, 및 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0073] 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 추가의 약제학적 활성제를 추가로 포함한다.
- [0074] 특정 구현예에서, 추가의 약제학적 활성제는 항종양 활성을 갖는 약물, 예를 들어, 알킬화제, 유사분열 억제제, 항종양 항생제, 항대사산물, 토포아이소머라제 억제제, 티로신 키나제 억제제, 방사성 핵종 제제, 방사선 민감제, 항혈관신생제, 사이토카인, 분자 표적 약물, 면역 체크포인트 억제제 또는 종양 용해성 바이러스이다.
- [0075] 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 다중특이적 분자 또는 면역접합체 및 추가의 약제학적 활성제는 별도의 구성 요소로서 또는 동일 조성물의 구성 요소로서 제공된다.

- [0076] 또 다른 양태에서, 본 출원은 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0077] 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 검출 가능한 표지(detectable label), 예를 들어, 효소(예: 서양고추냉이 퍼옥시다제), 방사성 핵종, 형광 염료, 발광 물질(예: 화학발광 물질) 또는 비오틴을 포함한다.
- [0078] 특정 구현예에서, 키트는 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 특이적으로 인식할 수 있는 제2 항체를 추가로 포함한다.
- [0079] 특정 구현예에서, 제2 항체는 검출 가능한 표지, 예를 들어, 효소(예: 서양고추냉이 퍼옥시다제), 방사성 핵종, 형광 염료, 발광 물질(예: 화학발광 물질) 또는 비오틴을 추가로 포함한다.
- [0080] 또 다른 양태에서, 본 출원은 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor)를 제공한다.
- [0081] 특정 구현예에서, 항원 결합 도메인은 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0082] 특정 구현예에서, 항원 결합 도메인은 scFv이다.
- [0083] 특정 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 면역 이펙터 세포(예: T 세포)에 의해 발현된다.
- [0084] 또 다른 양태에서는, 본 출원은 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 기재된 바와 같은 다중특이적 분자, 또는 상기 기재된 바와 같은 면역접합체, 또는 상기 기재된 바와 같은 억제학적 조성물, 또는 상기 기재된 바와 같은 키메라 항원 수용체의 유효량과 종양 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, c-Met를 발현하는 종양 세포의 성장을 억제하고/하거나 종양 세포를 사멸시키기 위한 방법을 제공한다.
- [0085] 또 다른 양태에서, 본 출원은 대상체(예: 인간)의 종양을 예방하고/하거나 치료하기 위한 의약의 제조에서의, 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 기재된 바와 같은 다중특이적 분자, 또는 상기 기재된 바와 같은 면역접합체, 또는 상기 기재된 바와 같은 억제학적 조성물, 또는 상기 기재된 바와 같은 키메라 항원 수용체의 용도를 제공한다.
- [0086] 특정 구현예에서, 의약은 추가의 억제학적 활성제를 추가로 포함한다.
- [0087] 특정 구현예에서, 추가의 억제학적 활성제는 항종양 활성을 갖는 약물, 예를 들어, 알킬화제, 유사분열 억제제, 항종양 항생제, 항대사산물, 토포아이스머라제 억제제, 티로신 키나제 억제제, 방사성 핵종 제제, 방사선 민감제, 항혈관신생제, 사이토카인, 분자 표적 약물, 면역 체크포인트 억제제 또는 종양 용해성 바이러스이다.
- [0088] 특정 구현예에서, 종양은 c-Met를 발현한다.
- [0089] 특정 구현예에서, 종양은 c-Met를 발현하는 종양 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, c-Met는 종양 세포의 표면에 발현된다.
- [0090] 특정 구현예에서, 종양은 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer), 소세포 폐암(small cell lung cancer), 신장 세포 암종(renal cell carcinoma), 결장직장암(colorectal cancer), 난소암(ovarian cancer), 유방암(breast cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 위암(gastric cancer), 방광암(bladder cancer), 식도암(esophageal cancer), 중피종(mesothelioma), 흑색종(melanoma), 두경부암(head and neck cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 육종(sarcoma), 전립선암(prostate cancer), 교모세포종(glioblastoma), 자궁경부암(cervical cancer), 흉선암(thymic cancer), 백혈병(leukemia), 림프종(lymphoma), 골수종(myeloma), 균상 식육종(mycosis fungoids), 메르켈 세포 암종(Merkel cell carcinoma) 및 기타 혈액학적 악성 종양(other hematological malignancies), 예를 들어, 고전적 호지킨 림프종(classical Hodgkin's lymphoma; CHL), 원발성 중격동 거대 B-세포 림프종(primary mediastinal large B-cell lymphoma), T-세포/조직구의 B-세포 풍부 림프종(B-cell rich lymphoma of T-cell/histiocyte), EBV-양성 및 -음성 PTLD 및 EBV-관련 미만성 거대 B-세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma; DLBCL), 형질모세포 림프종(plasmablastic lymphoma), 림프절외 NK/T-세포 림프종(extranodal NK/T-cell lymphoma), 비인두암종(nasopharyngeal carcinoma) 및 HHV8-관련 원발성 삼출성 림프종(HHV8-associated primary effusion lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 중추신경계(central nervous system; CNS) 종양, 예를 들어, 원발성 CNS 림프종, 척추 축 종양(spinal axis tumor), 뇌간 신경교종(brainstem glioma)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

- [0091] 일부 구현예에서, 대상체는 포유동물, 예를 들어, 인간이다.
- [0092] 종양이 c-Met를 표적으로 하는 항종양 요법에 의해 치료될 수 있는지 여부를 결정하기 위한 키트의 제조에서의, 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도.
- [0093] (1) 종양 세포를 함유하는 샘플을 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계;
- [0094] (2) 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 c-Met를 포함하는 복합체(complex)의 형성을 검출하는 단계.
- [0095] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 검출 가능한 표지를 포함한다.
- [0096] 일부 구현예에서, c-Met는 포유동물(예: 인간, 원숭이)의 c-Met이다.
- [0097] 특정 구현예에서, 종양은 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신장 세포 암종, 결장직장암, 난소암, 유방암, 췌장암, 위암, 방광암, 식도암, 중피종, 흑색종, 두경부암, 갑상선암, 육종, 전립선암, 교모세포종, 자궁경부암, 흉선암, 백혈병, 림프종, 골수종, 근상 식육종, 메르켈 세포 암종 및 기타 혈액학적 악성 종양, 예를 들어, 고 전적 호지킨 림프종(CHL), 원발성 종격동 거대 B-세포 림프종, T-세포/조직구의 B-세포 풍부 림프종, EBV-양성 및 -음성 PTLD 및 EBV-관련 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL), 형질모세포 림프종, 림프절외 NK/T-세포 림프종, 비인두암종 및 HHV8-관련 원발성 삼출성 림프종, 호지킨 림프종, 중추신경계(CNS) 종양, 예를 들어, 원발성 CNS 림프종, 척추 축 종양, 뇌간 신경교종으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0098] 또 다른 양태에서, 본 출원은 대상체에서 종양을 예방 및/또는 치료하기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 상기 기재된 바와 같은 이중특이적 또는 다중특이적 분자, 또는 상기 기재된 바와 같은 면역접합체, 또는 상기 기재된 바와 같은 약제학적 조성물, 또는 상기 기재된 바와 같은 키메라 항원 수용체, 또는 상기 기재된 바와 같은 숙주 세포의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0099] 특정 구현예에서, 종양은 c-Met를 발현한다.
- [0100] 특정 구현예에서, 종양은 c-Met를 발현하는 종양 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, c-Met는 종양 세포의 표면에서 발현된다.
- [0101] 특정 구현예에서, 종양은 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신장 세포 암종, 결장직장암, 난소암, 유방암, 췌장암, 위암, 방광암, 식도암, 중피종, 흑색종, 두경부암, 갑상선암, 육종, 전립선암, 교모세포종, 자궁경부암, 흉선암, 백혈병, 림프종, 골수종, 근상 식육종, 메르켈 세포 암종 및 기타 혈액학적 악성 종양, 예를 들어, 고 전적 호지킨 림프종(CHL), 원발성 종격동 거대 B-세포 림프종, T-세포/조직구의 B-세포 풍부 림프종, EBV-양성 및 -음성 PTLD 및 EBV-관련 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL), 형질모세포 림프종, 림프절외 NK/T-세포 림프종, 비인두암종 및 HHV8-관련 원발성 삼출성 림프종, 호지킨 림프종, 중추신경계(CNS) 종양, 예를 들어, 원발성 CNS 림프종, 척추 축 종양, 뇌간 신경교종으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0102] 특정 구현예에서, 대상체는 포유동물, 예를 들어, 인간이다.
- [0103] 특정 구현예에서, 상기 방법은 항종양 활성을 갖는 추가 약물, 예를 들어, 알킬화제, 유사분열 억제제, 항종양 항생제, 항대사산물, 토포아이스오머라제 억제제, 티로신 키나제 억제제, 방사성 핵종 제제, 방사선 민감제, 항혈관신생제, 사이토카인, 분자 표적 약물, 면역 체크포인트 억제제 또는 종양 용해성 바이러스를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0104] 특정 구현예에서, 상기 방법은 추가의 항종양 요법, 예를 들어, 수술, 화학요법, 방사선요법, 표적 요법, 면역요법, 호르몬 요법, 유전자 요법 또는 완화 요법을 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0105] 또 다른 양태에서, 본 출원은 다음 단계를 포함하는, c-Met를 표적으로 하는 항종양 요법에 의해 종양이 치료될 수 있는지 여부를 결정하기 위한 방법을 제공한다:
- [0106] (1) 종양 세포를 함유하는 샘플을 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계;
- [0107] (2) 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 c-Met를 포함하는 복합체의 형성을 검출하는 단계.
- [0108] 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 검출 가능한 표지를 포함한다.
- [0109] 특정 구현예에서, c-Met는 포유류(예: 인간, 원숭이)의 c-Met이다.
- [0110] 특정 구현예에서, 종양은 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신장 세포 암종, 결장직장암, 난소암, 유방암, 췌장암,

위암, 방광암, 식도암, 중피종, 흑색종, 두경부암, 갑상선암, 육종, 전립선암, 교모세포종, 자궁경부암, 흉선암, 백혈병, 림프종, 골수종, 군상 식육종, 메르켈 세포 암종 및 기타 혈액학적 악성 종양, 예를 들어, 고전적 호지킨 림프종(CHL), 원발성 종격동 거대 B-세포 림프종, T-세포/조직구의 B-세포 풍부 림프종, EBV-양성 및 -음성 PTLD 및 EBV-관련 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL), 형질모세포 림프종, 림프절외 NK/T-세포 림프종, 비인두암종 및 HHV8-관련 원발성 삼출성 림프종, 호지킨 림프종, 중추신경계(CNS) 종양, 예를 들어, 원발성 CNS 림프종, 척추 축 종양, 뇌간 신경교종으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0111] 또 다른 양태에서, 본 출원은 다음 단계를 포함하는, 샘플에서 c-Met의 존재 또는 양을 결정하기 위한 방법을 제공한다:

[0112] (1) 샘플을 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계;

[0113] (2) 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 c-Met를 포함하는 복합체의 형성을 검출하거나 복합체의 양을 검출하는 단계.

[0114] 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 검출 가능한 표지를 포함한다.

[0115] 특정 구현예에서, c-Met는 포유동물(예: 인간, 원숭이)의 c-Met이다.

[0116] 용어의 정의

[0117] 본 발명에서, 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 과학 및 기술 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 갖는다. 또한, 본원에 사용된 분자 유전학, 핵산 화학, 화학, 분자 생물학, 생화학, 세포 배양, 미생물학, 세포 생물학, 유전체학 및 재조합 DNA의 작동 단계는 모두 상응하는 분야에서 널리 사용되는 통상적인 단계이다. 동시에, 본 발명을 보다 잘 이해하기 위해, 관련 용어의 정의 및 설명이 아래에 제공된다.

[0118] 본원에 사용된 용어 "항체"는 전형적으로 두 쌍의 폴리펩티드 체로 구성된 면역글로불린 분자를 지칭하며, 각 체는 경쇄(LC)와 중쇄(HC)를 갖는다. 항체 경쇄는  $\kappa$ (카파) 경쇄 및  $\lambda$ (람다) 경쇄로 분류될 수 있다. 중쇄는  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ , 또는  $\epsilon$ 로 분류될 수 있으며, 항체의 아이소타입은 각각 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 정의될 수 있다. 경쇄와 중쇄 내에서 가변 영역 및 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산의 "J" 영역으로 연결되며, 중쇄는 약 3개 이상의 아미노산의 "D" 영역을 또한 함유한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역(VH)과 중쇄 불변 영역(CH)으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인(CH1, CH2 및 CH3)으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(VL)과 경쇄 불변 영역(CL)으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인인 CL로 구성된다. 불변 도메인은 항원에 대한 항체의 결합에 직접 관여하지는 않지만, 고전적 보체 시스템(C1q)의 제1 구성 요소에 대한 면역계의 다양한 세포(예: 이펙터 세포)의 결합을 포함하여 숙주 조직 또는 인자와 면역글로불린의 상호작용을 매개하는 것과 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다. VH 및 VL 영역은 또한 프레임워크 영역(FR)이라고 하는 보다 보존적인 영역이 산재되어 있는 상보성 결정 영역(CDR)이라고 하는 높은 가변성 영역으로 세분화될 수도 있다. 각 VH와 VL은 아미노 말단에서 카르복실 말단까지 다음과 같은 순서로 배열된 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 각 중쇄/경쇄 쌍의 가변 영역(VH 및 VL)은 각각 항원 결합 부위를 형성한다. 영역 또는 도메인에 대한 아미노산의 할당은 문헌[Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 또는 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196 :901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342:878-883]의 정의에 따를 수 있다.

[0119] 본원에 사용된 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 항원 결합을 담당하는 항체의 가변 영역 내의 아미노산 잔기를 지칭한다. 중쇄와 경쇄의 가변 영역은 각각 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 명명되는 세 개의 CDR을 함유한다. 이러한 CDR의 정확한 경계는 당업계에 공지된 다양한 넘버링 시스템, 예를 들어, 카바트 넘버링 시스템(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), 초티아 넘버링 시스템(Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342:878-883) 또는 IMGT 넘버링 시스템(Lefranc et al. al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003)에 따라 정의될 수 있다. 주어진 항체에 대해, 당업자는 각 넘버링 시스템에 의해 정의된 CDR을 쉽게 식별할 것이다. 또한, 상이한 넘버링 시스템 사이의 상응성은 당업자에게 익히 공지되어 있다(참조: 예를 들어, Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003).

[0120] 본 발명에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 함유된 CDR은 당업계에 공지된 다양한 넘버링 시스템에 따라 결정될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 함유된 CDR은 바람직

하계는 카바트, 초티아 또는 IMGT 넘버링 시스템에 의해 결정된다.

- [0121] 본원에 사용된 용어 "프레임워크 영역" 또는 "FR" 잔기는 상기 정의된 CDR 잔기 이외의 항체의 가변 영역 내의 아미노산 잔기를 지칭한다.
- [0122] 용어 "항체"는 항체를 생산하는 임의의 특정 방법에 제한되지 않는다. 예를 들어, 이는 재조합 항체, 모노클로날 항체 및 폴리클로날 항체를 포함한다. 항체는 상이한 아이소타입의 항체, 예를 들어, IgG(예: IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 아형), IgA1, IgA2, IgD, IgE 또는 IgM 항체일 수 있다.
- [0123] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체", "McAb", "mAb"는 동일한 의미를 가지며 상호교환적으로 사용되고, 고도로 상동성인 항체 분자의 그룹, 즉 자발적으로 발생할 수 있는 천연 돌연변이를 제외한 동일한 항체 분자의 그룹으로부터 유래된 항체 또는 항체의 단편을 지칭한다. 모노클로날 항체는 항원의 단일 에피토프에 대해 높은 특이성을 갖는다. 폴리클로날 항체는 모노클로날 항체와 상대적으로 언급되며, 이는 일반적으로 항원의 상이한 에피토프를 인식하는 적어도 2개 이상의 상이한 항체를 일반적으로 함유한다. 또한, 수식어 "모노클로날"은 단지 항체가 매우 상동성 항체 그룹으로부터 획득된다는 것을 특징으로 함을 나타내고, 항체가 임의의 특정 방법으로 제조될 필요가 있다는 것으로 해석해서는 안 된다.
- [0124] 본 발명의 모노클로날 항체는 다양한 기술, 예를 들어, 하이브리드마 기술(참조: 예를 들어, Kohler et al., Nature, 256:495, 1975), 재조합 DNA 기술(참조: 예를 들어, 미국 특허 출원 4,816,567) 또는 파지 항체 라이브러리 기술(참조: 예를 들어, Clackson et al. Nature 352: 624-628, 1991, or Marks et al. J. Mol. Biol. 222: 581-597, 1991)에 의해 제조될 수 있다.
- [0125] 본원에 사용된 바와 같이, 항체의 "항원 결합 단편"이라는 용어는 전장 항체가 결합하는 동일한 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하고/하거나 항원에 대한 특이적 결합을 위해 전장 항체와 경쟁하는 전장 항체의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 지칭하며, 이는 또한 "항원 결합 모이어티"라고도 불린다. 일반적으로, 모든 목적을 위해 전체가 본원에 참조로 포함된 문헌[Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed., Raven Press, N.Y. (1989))]을 참조한다. 항체의 항원 결합 단편은 재조합 DNA 기술 또는 온전한 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 획득될 수 있다. 항원 결합 단편의 비제한적인 예는 Fab, Fab', F(ab')<sup>2</sup>, Fd, Fv, 상보성 결정 영역(CDR) 단편, scFv, 디아바디, 단일 도메인 항체, 키메라 항체, 선형 항체, 나노바디(Domantis의 기술), 프로바디, 및 항원 결합 능력을 가진 폴리펩티드에 특이성을 부여하기에 충분한 항체의 적어도 일부를 함유하는 이러한 폴리펩티드를 포함한다. 조작된 항체 변이체는 문헌[Holliger et al., 2005; Nat Biotechnol, 23: 1126-1136]에서 검토된다.
- [0126] 본원에 사용된 용어 "전장 항체"는 2개의 "전장 중쇄"와 2개의 "전장 경쇄"로 구성된 항체를 지칭한다. 이들 중, "전장 중쇄"는 N-말단에서 C-말단 방향으로 중쇄 가변 영역(VH), 중쇄 불변 영역 CH1 도메인, 힌지 영역(HR), 중쇄 불변 영역 CH2 도메인, 중쇄 불변 영역 CH3 도메인으로 구성된 폴리펩티드 쇄를 지칭하며, 전장 항체가 IgE 아이소타입인 경우, 이는 임의로 중쇄 불변 영역 CH4 도메인도 포함한다. 바람직하게는, "전장 중쇄"는 N-말단에서 C-말단 방향으로 VH, CH1, HR, CH2 및 CH3으로 구성된 폴리펩티드 쇄이다. "전장 경쇄"는 N-말단에서 C-말단 방향으로 경쇄 가변 영역(VL)과 경쇄 불변 영역(CL)으로 구성된 폴리펩티드 쇄이다. 두 쌍의 전장 항체 쇄는 CL과 CH1 사이의 이황화 결합과 두 전장 중쇄의 HR 사이의 이황화 결합에 의해 함께 연결된다. 본 발명의 전장 항체는 인간과 같은 단일 종으로부터 유래될 수 있으며, 이는 또한 키메라 항체 또는 인간화 항체일 수도 있다. 본 발명의 전장 항체는 동일한 항원을 특이적으로 인식/결합하는 VH 및 VL 쌍에 의해 각각 형성된 두 개의 항원 결합 부위를 포함한다.
- [0127] 본원에 사용된 용어 "Fd"는 VH 및 CH1 도메인으로 구성된 항체 단편을 지칭하고, 용어 "dAb 단편"은 VH 도메인으로 구성된 항체 단편을 지칭하고(Ward et al, Nature 341:544 546 (1989)); 용어 "Fab 단편"은 VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 항체 단편을 지칭하고; 용어 "F(ab')<sup>2</sup> 단편"은 힌지 영역에서 이황화 브릿지에 의해 연결된 두 개의 Fab 단편을 포함하는 항체 단편을 지칭하고; 용어 "Fab' 단편"은 완전한 경쇄와 중쇄의 Fd 단편(VH 및 CH1 도메인으로 구성됨)으로 구성된 F(ab')<sup>2</sup> 단편에서 두 개의 중쇄 단편을 연결하는 이황화 결합을 환원하여 획득된 단편을 지칭한다.
- [0128] 본원에 사용된 용어 "Fv"는 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 구성되는 항체 단편을 지칭한다. Fv 단편은 일반적으로 완전한 항원 결합 부위를 형성할 수 있는 가장 작은 항체 단편으로 간주된다. 일반적으로, 6개의 CDR이 항체에 항원 결합 특이성을 부여하는 것으로 간주된다. 그러나, 단일 가변 영역(예: 항원에 특이적인

3개의 CDR만 함유하는 Fd 단편)조차도 항원을 인식하고 이에 결합할 수 있지만, 이의 친화도는 완전한 결합 부위보다 낮을 수 있다.

- [0129] 본원에 사용된 용어 "Fc"는 항체의 제1 중쇄의 제2 및 제3 불변 영역과 제2 중쇄의 제2 및 제3 불변 영역 사이의 이황화 결합에 의해 형성된 항체 단편을 지칭한다. 항체의 Fc 단편은 다양한 상이한 기능을 가지고 있지만 항원 결합에는 참여하지 않는다.
- [0130] 본원에서 사용된 용어 "scFv"는 VL 및 VH 도메인을 포함하는 단일 폴리펩티드 쇄를 지칭하며, 여기서 VL 및 VH는 링커로 연결된다(참조: 예를 들어, Bird et al., Science 242:423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. USA 85:5879-5883 (1988); Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Roseburg and Moore, ed., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)). 이러한 scFv 분자는 일반적인 구조를 가질 수 있다: NH<sub>2</sub>-VL-링커-VH-COOH 또는 NH<sub>2</sub>-VH-링커-VL-COOH. 적합한 종래 기술의 링커는 반복되는 GGGGS 아미노산 서열 또는 이의 변이체로 구성될 수 있다. 예를 들어, 아미노산 서열 (GGGGS)<sub>4</sub>를 갖는 링커가 사용될 수 있지만, 이의 변이체도 사용될 수 있다(Holliger et al. (1993), Proc. Natl. Acad. USA 90: 6444-6448). 본 발명에 사용될 수 있는 다른 링커는 문헌[Alfthan et al. (1995), Protein Eng. 8:725-731, Choi et al. (2001), Eur. J. Immunol. 31: 94-106, Hu et al. (1996), Cancer Res. 56:3055-3061, Kipriyanov et al. (1999), J. Mol. Biol. 293:41-56 및 Roovers et al. (2001), Cancer Immunol]에 기재되어 있다. 일부 경우에는, scFv의 VH와 VL 사이에 이황화 결합이 존재할 수도 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, scFv는 두 개 이상의 단일 scFv를 직렬로 연결하여 형성된 항체를 지칭하는 di-scFv를 형성할 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, scFv는 (scFv)<sub>2</sub>를 형성할 수 있으며, 이는 둘 이상의 단일 scFv에 의해 병렬로 형성된 항체를 지칭한다.
- [0131] 본원에 사용된 용어 "단일 도메인 항체(sdAb)"는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 갖고, 이는 전장 항체에 의해 결합된 동일한 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 유지하는 단일 단량체 가변 항체 도메인(예: 단일 중쇄 가변 영역)으로 구성된 항체 단편을 지칭한다. 단일 도메인 항체는 또한 나노바디라고 한다.
- [0132] 상기 항체 단편 각각은 전장 항체에 의해 결합된 동일한 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하고/하거나 항원에 대한 특이적 결합을 위해 전장 항체와 경쟁한다.
- [0133] 항체의 항원 결합 단편(예: 상기 항체 단편)은 당업자에게 공지된 통상적인 기술(예: 재조합 DNA 기술 또는 효소적 또는 화학적 절단 방법)을 사용하여 주어진 항체(예: 본 발명에 의해 제공된 항체)로부터 획득될 수 있고, 항체의 항원 결합 단편은 온전한 항체와 동일한 방식으로 특이성에 대해 스크리닝될 수 있다.
- [0134] 본원에 사용된 바와 같이, 문맥상 달리 명백하게 명시되지 않는 한, 용어 "항체"가 언급되는 경우, 이는 온전한 항체뿐만 아니라 항체의 항원 결합 단편도 포함한다.
- [0135] 본원에 사용된 용어 "키메라 항체"는 경쇄 및/또는 중쇄의 일부가 하나의 항체(특정 종에서 유래되거나 특정 항체 부류 또는 하위 부류에 속할 수 있음)로부터 유래되고, 경쇄 및/또는 중쇄의 또 다른 일부가 또 다른 항체(동일하거나 상이한 종으로부터 유래되거나 동일하거나 상이한 항체 부류 또는 하위 부류에 속할 수 있음)로부터 유래되지만, 어쨌든 여전히 표적 항원에 대한 결합 활성을 유지하는 항체를 지칭한다(U.S.P 4,816,567 to Cabilly et al.; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). 특정 구현예에서, 용어 "키메라 항체"는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 제1 항체로부터 유래되고, 항체의 중쇄 및 경쇄 불변 영역이 제2 항체로부터 유래되는 항체를 포함할 수 있다.
- [0136] 본원에 사용된 용어 "동일성"은 두 개의 폴리펩티드 사이 또는 두 개의 핵산 사이의 서열의 일치치를 지칭하는 데 사용된다. 두 개의 아미노산 서열 또는 두 개의 핵산 서열의 동일성 퍼센트를 결정하기 위해, 서열을 최적의 비교 목적을 위해 정렬한다(예: 제2 아미노산 또는 핵산 서열과 최적의 정렬을 위해 제1 아미노산 서열 또는 핵산 서열에 갭이 도입할 수 있음). 그런 다음, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 비교한다. 제1 서열의 한 위치가 제2 서열의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드에 의해 점유되면, 분자는 해당 위치에서 동일하다. 두 개의 서열 사이의 동일성 퍼센트는 서열이 공유하는 동일한 위치의 수의 함수이다(즉, 동일성 퍼센트 = 동일한 중첩 위치 수/총 위치 수 × 100%). 특정 구현예에서, 두 서열은 동일한 길이를 갖는다.
- [0137] 두 서열 사이의 동일성 퍼센트의 결정은 또한 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다. 두 서열의 비교를 위한 수학적 알고리즘의 비제한적인 예로는 문헌[Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877]에 의해 수정된 문헌[Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268]의 알고리즘이다. 이러한 알고리즘은 문헌[Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403]의 NBLAST 및

XBLAST 프로그램에 통합된다.

- [0138] 본원에 사용된 용어 "변이체"는, 폴리펩티드의 맥락(폴리펩티드 포함)에서, 아미노산 잔기의 치환, 결실 또는 첨가를 도입하여 변경된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 또는 펩티드를 지칭하기도 한다. 일부 경우에, 용어 "변이체"는 (즉, 폴리펩티드 또는 펩티드에 임의의 유형의 분자를 공유 부착시켜) 변형된 폴리펩티드 또는 펩티드를 지칭하기도 한다. 예를 들어, 제한적이지 않지만, 폴리펩티드는, 예를 들어, 글리코실화, 아세틸화, 폐길화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호/차단 그룹에 의한 유도체화, 단백질 분해 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에의 부착 등에 의해 변형될 수 있다. 유도체화된 폴리펩티드 또는 펩티드는 특정 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화, 투니카마이신의 대사 합성 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 화학적 변형에 의해 생산될 수 있다. 또한, 변이체는 그것이 유래되는 폴리펩티드 또는 펩티드와 유사하거나 동일하거나 향상된 기능을 갖는다.
- [0139] 본원에 사용된 용어 "특이적 결합"은 항체와 항체가 지시되는 항원 사이의 반응과 같은 두 분자 사이의 비무작위 결합 반응을 지칭한다. 특정 결합 상호작용의 강도 또는 친화도는 상호작용의 평형 해리 상수(KD)로 표현될 수 있다. 본 발명에서, 용어 "KD"는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 지칭하며, 이는 항체와 항원 사이의 결합 친화도를 기재하는 데 사용된다. 평형 해리 상수가 작을수록 항체-항원 결합은 더 단단해지고 항체와 항원 사이의 친화도는 높아진다.
- [0140] 두 분자 사이의 특정 결합 특성은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 한 가지 방법은 항원 결합 부위/항원 복합체의 형성 및 해리 속도를 측정하는 단계를 포함한다. "결합 속도 상수"(ka 또는 kon)와 "해리 속도 상수"(kdis 또는 koff)는 모두 농도와 실제 결합 및 해리 속도로부터 계산될 수 있다(참조: Malmqvist M, Nature, 1993, 361: 186-187). kdis/kon의 비율은 해리 상수 KD와 같다(참조: Davies et al., Annual Rev Biochem, 1990; 59: 439-473). KD, kon 및 kdis의 값은 임의의 효과적인 방법으로 측정될 수 있다. 특정 구현예에서, 해리 상수는 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 사용하여 비아코어(Biacore)에서 측정될 수 있다. 또한, 해리 상수는 생물발광 간섭 측정법(bioluminescence interferometry) 또는 키넥사(Kinexa)로 측정될 수 있다.
- [0141] 본원에 사용된 바와 같이, 본 발명의 검출 가능한 표지는 형광, 분광학, 광화학, 생화학, 면역학, 전기적, 광학적 또는 화학적 수단에 의해 검출될 수 있는 임의의 물질일 수 있다. 이러한 표지는 당업계에 익히 공지되어 있으며, 이의 예는 효소(예: 서양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제,  $\beta$ -갈락토시다제, 우레아제, 글루코스 산화효소 등), 방사성 핵종(예:  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$  또는  $^{32}\text{P}$ ), 형광 염료(예: 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 플루오레세인, 테트라메틸로다민 이소티오시아네이트(TRITC), 피코에리트린(PE), 텍사스 레드, 로다민, 양자점 또는 시아닌 염료 유도체(예: Cy7, Alexa 750)), 발광 물질(예: 화학발광 물질, 예를 들어, 아크리디늄 에스테르 화합물, 루미놀 및 이의 유도체, 루테늄 유도체, 예를 들어, 테르피리딘 루테늄), 자성 비드(예: Dynabeads®), 열량 측정 표지, 예를 들어, 콜로이드 금 또는 유색 유리 또는 플라스틱(예: 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 라텍스 등) 비드, 및 상기 표지로 변형된 아비딘(예: 스트렙타비딘)에 결합하기 위한 비오틴을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0142] 본원에 사용된 용어 "백터"는 폴리뉴클레오티드가 삽입될 수 있는 핵산 비히클을 지칭한다. 백터가 삽입된 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩된 단백질을 발현할 수 있는 경우, 백터를 발현 백터라고 한다. 백터는 형질전환, 형질도입 또는 형질감염에 의해 숙주 세포에 도입되어 백터가 운반하는 유전 물질 요소가 숙주 세포에서 발현되도록 할 수 있다. 백터는 당업자에게 익히 공지되어 있으며, 플라스미드; 파지미드; 코스미드; 인공 염색체, 예를 들어, 효모 인공 염색체(YAC), 박테리아 인공 염색체(BAC) 또는 P1 유래 인공 염색체(PAC); 박테리오파지, 예를 들어,  $\lambda$  파지 또는 M13 파지 및 동물 바이러스를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 백터로 사용될 수 있는 동물 바이러스에는 레트로바이러스(웬티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 헤르페스 바이러스(예: 단순 포진 바이러스), 폭스바이러스, 바콜로바이러스, 유두종바이러스, 파포바이러스(예: SV40)가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 백터는 프로모터 서열, 전사 시작 서열, 인핸서 서열, 선택 요소 및 리포터 유전자를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 발현을 제어하는 다양한 요소를 함유할 수 있다. 또한, 백터는 복제 시작 부위를 함유할 수도 있다.
- [0143] 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"는 원핵 세포, 예를 들어, 에셰리키아 콜리(*Escherichia coli*) 또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 진균 세포, 예를 들어, 효모 세포 또는 아스퍼질러스(*Aspergillus*), 곤충 세포, 예를 들어, S2 초파리(*Drosophila*) 세포 또는 Sf9, 또는 동물 세포, 예를 들어, 섬유아세포, CHO 세포, COS 세포, NSO 세포, HeLa 세포, BHK 세포, HEK 293 세포 또는 인간 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 백터를 도입하는 데 사용될 수 있는 세포를 지칭한다.

- [0144] 본원에 사용된 용어 "보존적 치환"은 아미노산 서열을 포함하는 단백질/폴리펩티드의 예상 특성에 악영향을 미치지거나 변경하지 않는 아미노산 치환을 지칭한다. 예를 들어, 보존적 치환은 부위 지시 돌연변이유발 및 PCR 매개 돌연변이유발과 같은 당업계에 공지된 표준 기술에 의해 도입될 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기, 예를 들어, 상응하는 아미노산 잔기와 물리적으로 또는 기능적으로 유사한(예: 유사한 크기, 모양, 전하, 공유 결합 또는 수소 결합을 형성하는 능력을 포함한 화학적 특성 등) 아미노산 잔기로 대체되는 것들을 포함한다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 계열은 당업계에 정의되어 있다. 이러한 계열은 염기성 측쇄(예: 리신, 아르기닌 및 히스티딘), 산성 측쇄(예: 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄(예: 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄(예: 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌),  $\beta$ -분지 측쇄(예: 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예: 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다. 따라서, 상응하는 아미노산 잔기를 동일한 측쇄 계열의 또 다른 아미노산 잔기로 대체하는 것이 바람직하다. 아미노산의 보존적 치환을 확인하는 방법은 당업계에 익히 공지되어 있다(참조: 예를 들어, Brummell et al., *Biochem. 32*:1180-1187 (1993); Kobayashi et al., *Protein Eng. 12*(10):879-884 (1999); and Burks et al. *Proc. Natl Acad. Set USA 94*:412-417 (1997), 이는 본원에 참조로 포함됨).
- [0145] 본원에서 언급된 20개의 통상적인 아미노산은 통상적인 사용법에 따라 기재된다. 예를 들어, 본원에 참조로 포함되어 있는 문헌[*Immunology-A Synthesis* (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))]을 참조한다. 본 발명에서, 용어 "폴리펩티드"와 "단백질"은 동일한 의미를 가지며 상호교환적으로 사용된다. 그리고, 본 발명에서, 아미노산은 일반적으로 당업계에 공지된 단일 문자 및 세 문자 약어로 표시된다. 예를 들어, 알라닌은 A 또는 Ala로 표시될 수 있다.
- [0146] 본원에 사용된 용어 "약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제"는 대상체 및 활성 성분과 약리학적으로 및/또는 생리학적으로 적합한 담체 및/또는 부형제를 지칭하며, 이들은 당업계에 익히 공지되어 있고(참조: 예를 들어, Remington's *Pharmaceutical Sciences*. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), pH 조절제, 계면활성제, 보조제, 이온 강도 강화제, 희석제, 삼투압 유지제, 흡수 지연제, 방부제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, pH 조절제는 인산염 완충액을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 계면활성제는 양이온성, 음이온성 또는 비이온성 계면활성제, 예를 들어, Tween-80을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이온 강도 강화제는 염화나트륨을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 삼투압 유지제는 당, NaCl 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 흡수 지연제는 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 희석제는 물, 수성 완충액(예: 완충 식염수), 알코올 및 폴리올(예: 글리세롤) 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 방부제는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 티메로살, 2-페녹시에탄올, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 안정제는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 가지며, 이는 나트륨 글루타메이트, 젤라틴, SPGA, 당류(예: 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 락토스, 텍스트란 또는 글루코스), 아미노산(예: 글루탐산, 글리신), 단백질(예: 건조 유청, 알부민 또는 카제인) 또는 이의 분해 생성물(예: 락탈부민 가수분해물) 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 의약 내 활성 성분의 목적하는 활성을 안정화시킬 수 있다. 특정 예시적인 구현예에서, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제는 멸균 주사 가능한 액체(예: 수성 또는 비수성 현탁액 또는 용액)를 포함한다. 특정 예시적 구현예에서, 이러한 멸균 주사 가능한 액체는 주사용수(WFI), 주사용 정균수(BWFI), 염화나트륨 용액(예: 0.9%(w/v) NaCl), 글루코스 용액(예: 5% 글루코스), 계면활성제를 함유하는 용액(예: 0.01% 폴리소르베이트 20), pH 완충 용액(예: 인산염 완충 용액), 링거 용액 및 이들의 임의의 조합으로 구성되는 그룹으로부터 선택된다.
- [0147] 본원에 사용된 용어 "예방"은 대상체에서 질환, 장애 또는 증상의 발생을 예방하거나 지연시키기 위해 구현되는 방법을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "치료"는 유익하거나 목적하는 임상 결과를 획득하기 위해 구현되는 방법을 지칭한다. 본 발명의 목적상, 유익하거나 목적하는 임상 결과는 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 질환 상태의 안정화(즉, 더 이상 악화되지 않음), 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 개선 또는 완화, 검출 가능하든 검출가능 하지 않든 증상의 완화(부분적이든 완전하든)를 포함한다(이에 제한되지 않음). 또한, "치료"는 (치료를 받지 않을 경우) 예상 생존 기간과 비교하여 생존 기간을 연장하는 것을 지칭할 수도 있다.
- [0148] 본원에 사용된 용어 "대상체"는 포유동물, 예를 들어, 인간, 시노물구스 원숭이 또는 마우스를 지칭한다. 특정 구현예에서, 대상체(예: 인간, 시노물구스 원숭이 또는 마우스)는 c-Met과 관련된 질환을 앓고 있거나 상기 언급된 질환을 앓을 위험이 있다.
- [0149] 본원에 사용된 용어 "유효량"은 목적하는 효과를 획득하거나 적어도 부분적으로 획득하기에 충분한 양을 지칭한

다. 예를 들어, 질환 예방 유효량은 질환의 발생을 예방, 억제 또는 지연시키기에 충분한 양을 지칭하며, 질환 치료 유효량은 이미 질환을 앓고 있는 환자에서 질환 및 이의 합병증을 치료하거나 적어도 부분적으로 예방하기에 충분한 양을 지칭한다. 이러한 유효량을 결정하는 것은 당업자의 능력 범위 내에 있다. 예를 들어, 치료적 사용에 효과적인 양은 치료할 질환의 중증도, 환자 자신의 면역계의 전반적인 상태, 환자의 일반적 상태, 예를 들어, 연령, 체중 및 성별, 약물 투여 방식, 및 동시에 투여되는 다른 치료법 등에 따라 달라진다.

[0150] 본원에 사용된 용어 "단일 아암 항체"는 Fab 세그먼트와 Fc 세그먼트를 포함하는 항원 결합 단편을 지칭하며, 일반적으로 Fab 세그먼트는 중쇄(예: VH 및 CH1)와 경쇄(예: VL 및 CL)를 포함하고, Fc 세그먼트는 불변 영역(예: CH2 및 CH3)을 포함한다. Fab 세그먼트와 Fc 세그먼트는 링커에 의해 연결될 수 있거나 그렇지 않을 수도 있다. 본 발명의 단일 아암 항체는 다양한 방법에 의해, 예를 들어, Fab 중쇄를 인코딩하는 서열과 Fc를 인코딩하는 서열을 동일한 벡터로 작제하고, Fab 경쇄를 인코딩화하는 서열을 또 다른 벡터로 작제하고, 두 벡터를 숙주 세포에 개별적으로 형질전환시켜 단일 아암 항체를 수득함으로써 제조되거나 합성될 수 있다.

[0151] 본원에 사용된 용어 "이중특이적 항체"는 제1 항체(또는 이의 단편)와 제2 항체(또는 이의 단편) 또는 항체 유사체가 커플링 아암을 통해 형성된 접합체를 지칭하며, 커플링 방법은 화학 반응, 유전자 융합 및 효소적 방법을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이중특이적 항체는 다양한 방법으로 연결되거나 생성될 수 있으며, 예를 들어, 문헌[Songsivilai et al. (Clin. Exp. Immunol., 79: 315-321 (1990))의 방법, 및 문헌[Kostelny et al. (J. Immunol., 148: 1547-1553 (1992))]의 방법을 참조한다.

**발명의 효과**

[0152] 종래 기술과 비교하여, 본 출원에서 제조된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 c-Met에 특이적으로 결합한 다음, c-Met를 발현하는 세포를 특이적으로 인식하거나 이에 결합할 수 있다. 항체는 c-Met를 발현하거나 과발현하는 세포와 높은 친화도를 갖고 특정 열 안정성을 갖는다. 또한, 항체는 HGF-Met 신호전달 경로를 억제하여 암 세포의 세포사멸을 유발하고 암 세포의 증식을 억제할 수 있고, 표적 종양 요법에서 적용 가능성이 크다.

**도면의 간단한 설명**

[0153] 본 발명의 구현에는 도면 및 실시예와 함께 이하 상세히 기재될 것이지만, 당업자는 다음의 도면 및 실시예가 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것이 아니라 본 발명을 예시하기 위해 사용된 것임을 이해할 것이다. 도면 및 바람직한 구현예에 대한 다음의 상세한 설명에 따라, 본 발명의 다양한 목적과 장점이 당업자에게 명백해질 것이다.

도 1은 본 출원의 실시예 2에서 작제된 항체의 구조에 대한 개략도를 나타낸다.

도 2는 c-Met를 과발현하는 세포에 대한 본 출원의 항-c-Met 항체의 결합 활성을 나타내며, 여기서 도 2A 및 도 2B는 HEK293-Hu c-Met 세포에 대한 본 출원의 항체(항체 22, 23, 74, 111, 136, 187, 216, 221, 223)와 대조군 항체의 결합 활성을 나타내고; 도 2C 및 도 2D는 HEK293-Rhe c-Met 세포에 대한 본 출원의 항체(항체 22, 23, 74, 111, 136, 187, 216, 221, 223)와 대조군 항체의 결합 활성을 나타낸다.

도 3은 HCC827 세포에 대한 본 출원의 항-c-Met 항체(항체 22, 23, 74, 111, 136, 187, 216, 221, 223)와 대조군 항체의 억제 활성을 나타낸다.

도 4는 H596 세포에 대한 본 출원의 항-c-Met 항체(항체 136, 187) 및 대조군 항체의 억제를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0154] 서열 정보

[0155] 본 발명과 관련된 일부 서열의 정보는 아래 표 1에 제공된다.

[0156]

[표 1]

서열 설명

서열번호	설명	서열
1	22-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKTSGYFTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMG WISAYNGHTNYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARD RRTGTSFFDYWGQGLVTVSS
2	22-VL	DIVMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSKFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYFCQQAYGFPLTFGGGKVEI K
3	23-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSVI SGSGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMHSRAEDTAVYYCAKVITFER GRFTDIWGQGMVTVSS
4	23-VL	DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSFSDYLNWYRQKPGKAPKLLFAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYCCQQSYSPPYTFGQGTKLEI K
5	74-VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGGSISSSSYYWGWIRQSPGKGLEWIGSI YYSGNYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCVRQVYDFW RDWGQGLVTVSS
6	74-VL	DIVMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGINSWLAWYQQKPGKAPNLLIYAA SSLQSGVPSRFSGRGSGTDFSLTISLHPEDFATYCCQAKGFPLTFGGGKVEI EIK
7	111-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASMKVCKASGNTFISYGINWVRQAPGQGLEWMG WISAYNGNTNYAQKFQGRVTMTTDTSTSSAYMELRNLRSDDTAVYYCATG DTTSSGYNYMDVWGKTTVTVSS
8	111-VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGAFS RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAYYCCQYQSSPRTFGGKVDIK
9	136-VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGGVSIVNYYWKWIRQPPGKLEWIGY ISYSGNTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCVRAPYYM DVWSKGTTVTVSS
10	136-VL	DIVMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAVS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQANSFPLTFGGGKVEI K

[0157]

11	187-VH	QLQLQESGPGLVKPESETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWRQSPGKGLEWIGSR YYSNGTYYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLRVTAADTAVYYCARQVYDY WRDWGQGalVTVSS
12	187-VL	DIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYAAS NLPSGVPSRFSGSGGTFTLTISLQPEDFATYYCQNSFPLTFGGGKVEI K
13	216-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRFLFCGASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI TGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQLNSLRAEDTAIYYCAKIIVTEAG RWLDPWGQGTMTVTVSS
14	216-VL	DIRMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISNYLNWFQKPGKAPKLLIYATSS LQSGVPSRFSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYCQSYIPYTFGGGKVEIK
15	221-VH	EVQLLESggGLVQPGGSLRLScaASGFTFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSI SGSGGSTYYEDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNslRAEDTAVYYCAKIVTFER GRFDIwGQGTMTVTVSS
16	221-VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGpSS RATGIPDRFSGSGGTDFLTISLQPADFASYYCQSYITPYTFGGGKVEIK
17	223-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRFLScaASGFTFRNYAMSWVRQAPGKGLEWVSA ISGSGVGTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNslRVEDTAVYYCVRVMTV EFSRWLDPWGQGTlVTVSS
18	223-VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIITYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGGTDFLTNISSLQPEDFATYYCQANSLPYTFGGGKVEIK
19	22-VH CDR1	GYFTNYG
20	22-VL CDR1	QGISSW
21	23-VH CDR1	GFTFSSYA
22	23-VL CDR1	QSFSDY
23	74-VH CDR1	GGSISSSSYY
24	74-VL CDR1	QGINSW
25	111-VH CDR1	GNTFISYG
26	111-VL CDR1	QSVSSSY

[0158]

27	136-VH CDR1	GGSVTSVNYY
28	136-VL CDR1	QGISSW
29	187-VH CDR1	GGSSSSSY
30	187-VL CDR1	QGISSW
31	216-VH CDR1	GFTFSSYA
32	216-VL CDR1	QISISNY
33	221-VH CDR1	GFTFSSYA
34	221-VL CDR1	QSVSSSY
35	223-VH CDR1	GFTFRNYA
36	223-VL CDR1	QSIITY
37	22-VH CDR2	ISAYNGHT
38	22-VL CDR2	AAS
39	23-VH CDR2	ISGSGGTT
40	23-VL CDR2	AAS
41	74-VH CDR2	IYYSGNT
42	74-VL CDR2	AAS
43	111-VH CDR2	ISAYNGNT
44	111-VL CDR2	GAF
45	136-VH CDR2	ISYSGNT
46	136-VL CDR2	AVS
47	187-VH CDR2	RYYSGNT
48	187-VL CDR2	AAS
49	216-VH CDR2	ITGSGGST
50	216-VL CDR2	ATS

[0159]

51	221-VH CDR2	ISGSGGST
52	221-VL CDR2	GPS
53	223-VH CDR2	ISGSGVGT
54	223-VL CDR2	AAS
55	22-VH CDR3	ARDRRTGTSFFDY
56	22-VL CDR3	QQAYGFPLT
57	23-VH CDR3	AKVITFERGRTFDI
58	23-VL CDR3	QQSYSPPYT
59	74-VH CDR3	VRQVYDFWRD
60	74-VL CDR3	QQAKGFPLT
61	111-VH CDR3	ATGDTTSSGYNYMDV
62	111-VL CDR3	QQYGSSPRT
63	136-VH CDR3	VRAPYYMDV
64	136-VL CDR3	QQANSFPLT
65	187-VH CDR3	ARQVYDYWRD
66	187-VL CDR3	QQSNSFPLT
67	216-VH CDR3	AKIVTVEAGRWLDP
68	216-VL CDR3	QQSYSIPYT
69	221-VH CDR3	AKVITFERGRTFDI
70	221-VL CDR3	QQSYITPYT
71	223-VH CDR3	VRVMTVEFSRWLDP
72	223-VL CDR3	QQANSLPYT
73	중쇄 업스트림 프라이머 1	ACAGGTGCCCACTCCCAGGTGCAG

[0160]

74	중쇄 업스트림 프라이머 2	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG
75	중쇄 업스트림 프라이머 3	CCCAGATGGGTCTGTCCCAGGTGCAG
76	중쇄 업스트림 프라이머 4	CAAGGAGTCTGTCCGAGGTGCAG
77	중쇄 다운스트림 프라이머 1	TGAGCAGCAGAACCTGGAGCCAAGGGATAGACAGATGGGGCTGTTGT
78	중쇄 다운스트림 프라이머 2	TGAGCAGCAGAACCTGGAGCCAGTGGATAGACAGATGGGGCTGTTGT
79	경쇄 업스트림 프라이머 1	ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG
80	경쇄 업스트림 프라이머 2	CTTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAG
81	경쇄 업스트림 프라이머 3	ATTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTG
82	경쇄 다운스트림 프라이머 1	TGTTCAGAAGATGGTGGGAAGATAGATACAGTTGGTGCAGCATCAGC
83	중쇄 업스트림 프라이머 5	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGACAGGTGCAGCTGGT GCAG
84	중쇄 업스트림 프라이머 6	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGAGAGGTGCAGCTGGT GCAG
85	중쇄 업스트림 프라이머 7	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGAGAGGTGCAGCTGGT GGAG
86	중쇄 업스트림 프라이머 8	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGAGAGGTGCAGCTGTT GGAG
87	중쇄 업스트림 프라이머 9	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGACAGGTGCAGCTGCA GGAG
88	중쇄 업스트림 프라이머 10	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGACAGGTGCAGCTACA GCAGTG

[0161]

89	중쇄 업스트림 프라이머 11	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGACAGGTTTCAGCTGGTGCAG
90	중쇄 업스트림 프라이머 12	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGACAGGTCCAGCTGGTACAG
91	중쇄 업스트림 프라이머 13	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGACAGGTGCAGCTGGTGGAG
92	중쇄 업스트림 프라이머 14	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGAGAAGTGCAGCTGGTGGAG
93	중쇄 업스트림 프라이머 15	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGACAGCTGCAGCTGCA GGAG
94	중쇄 업스트림 프라이머 16	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGACAGGTACAGCTGCAGCAG
95	중쇄 다운스트림 프라이머 3	GCCAGGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGCTAGCTGAGGAGACGGTG ACCAG
96	중쇄 다운스트림 프라이머 4	GCCAGGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGCTAGCTGAAGAGACGGTG ACCATTG
97	중쇄 다운스트림 프라이머 5	GCCAGGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGCTAGCTGAGGAGACGGTG ACCGTG
98	경쇄 업스트림 프라이머 4	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATCCGACATCCAGATGACCCAGTC
99	경쇄 업스트림 프라이머 5	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATCCGACATCCAGTTGACCCAGTCT
100	경쇄 업스트림 프라이머 6	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATCCGATATCCGGATGACCCAGTC
101	경쇄 업스트림 프라이머 7	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATCCGATATTGTGATGACCCAGAC
102	경쇄 업스트림 프라이머 8	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATCCGATATTGTGATGACTCAGTC
103	경쇄 업스트림 프라이머 9	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATCCGATGTTGTGATGACTCAGTC

[0162]

104	경쇄 업스트림 프라이머 10	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATCCGAAATTGTTGACACAGTC
105	경쇄 업스트림 프라이머 11	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATCCGAAATAGTGATGACGCAGTC
106	경쇄 업스트림 프라이머 12	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATCCGAAATTGTTGACGCAGTCT
107	경쇄 업스트림 프라이머 13	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATCCGACATCGTGATGACCCAGTC
108	경쇄 다운스트림 프라이머 2	GGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGATYTCCACCTT GGTC
109	경쇄 다운스트림 프라이머 3	GGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGATCTCCAGCTT GGTC
110	경쇄 다운스트림 프라이머 4	GGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGATATCCACTTT GGTC
111	인간 IgG1-Fc (LALA 돌연변이, 노브 돌연변이)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
112	Fc-LALA-홀	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
113	단일 아암 항체 아미반타맙의 노브 중쇄	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYFTSYGISWVRQAPGHGLEWMGW ISAYNGYTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLR GTNYFDYWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
114	단일 아암 항체	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAAS

[0163]

	아미반타맵의 경쇄	SLLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
115	단일 아암 항체 아미반타맵 및 항체 오나르투주맙의 홀 중쇄	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
116	단일 아암 항체 LY2875358의 노브 중쇄	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYFTDYYMHWRQAPGQGLEWM GRVNPNNRRGTTYNQKFEGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDAVYYCARA NWLVDYWGQGTITVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNK PSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
117	단일 아암 항체 LY2875358의 경쇄	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCSVSSVSSYLHWYQQKPKAPKLLIYSTS NLAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQVYSGYPLTFGGGTKEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
118	단일 아암 항체 LY2875358의 홀 중쇄	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
119	항체 오나르투주맙 의 노브 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGYFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGM IDPSNSDRFNPFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSY VTPLDYWGQGTITVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNK PSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0164]

120	항체 오나르투주맙 의 경쇄	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKSSQLLYTSSQKNYLAWYQQKPKAPKL LIYWASTRESGVPFSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYAIPWTFG QGTVKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
121	CH1	ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEPKSC
122	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC

[0165]

[0166]

본 발명을 수행하기 위한 구체적인 모델

- [0167] 본 발명은 이제 (본 발명을 제한하려는 것이 아니라) 본 발명을 예시하기 위한 다음의 실시예를 참조하여 기재된다.
- [0168] 달리 명시되지 않는 한, 실시예에 기재된 실험 및 방법은 기본적으로 당업계에 익히 공지되어 있고, 다양한 참고문헌에 기재된 통상적인 방법에 따라 수행된다. 예를 들어, 본 발명에 사용되는 면역학, 생화학, 화학, 분자생물학, 미생물학, 세포생물학, 유전체학 및 재조합 DNA의 통상적인 기술은 문헌[Sambrook, Fritsch and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd edition (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel et al., eds., (1987)); METHODS IN ENZYMOLOGY series (Academic Publishing Company): PCR 2: A PRACTICAL METHOD. APPROACH (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor, ed. (1995)), and ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney, ed. (1987))]에서 찾을 수 있다.
- [0169] 또한, 구체적인 조건이 실시예에서 명시되지 않은 경우, 이들은 통상적인 조건 또는 제조사에서 권장하는 조건에 따라 수행했다. 제조사를 명시하지 않고 사용된 시약 또는 기구는 모두 상업적으로 수득될 수 있는 통상적인 제품이었다. 실시예는 본 발명을 예시로서 기재하고, 본 발명의 보호 범위를 제한하려는 의도가 아니라는 것이 당업자에게 공지되어 있다. 본원에서 언급된 모든 개시내용 및 기타 참고문헌은 전체가 본원에 참조로 포함된다.
- [0170] 실시예 1: 항-c-Met 항체의 스크리닝
- [0171] 1.1. 항체 라이브러리의 작제
- [0172] 동물 면역화
- [0173] 1mg의 세포 중간엽 상피 전이 인자(c-Met) 항원(AcroBiosystems에서 구입)을 동일 용적의 프로인트 보조제(Freund's adjuvant)와 혼합하고, 5마리의 인간화 마우스(Alloy Company에서 구입)를 총 4회 면역화 동안 주 1회 면역화하여 B 세포를 자극하여 항원 특이적 항체를 생산했다. 4회 면역화 후, 마우스의 비장을 채취하고, 총 RNA는 RNA 추출 시약 트리졸(Invitrogen에서 구입)을 사용하여 추출했다. 완전 인간화 마우스의 cDNA는 cDNA 합성 키트(Invitrogen에서 구입)를 사용하여 역전사에 의해 수득했다.
- [0174] 항체 유전자 증폭
- [0175] PCR의 제1 라운드: 표 1에 제시된 바와 같이, 중쇄 업스트림 프라이머 1 내지 4(서열번호 73 내지 서열번호 76) 및 중쇄 다운스트림 프라이머 1 내지 2(서열번호 77 및 서열번호 78) 뿐만 아니라 경쇄 업스트림 프라이머 1 내지 3(서열번호 79 내지 81) 및 경쇄 다운스트림 프라이머 1(서열번호 82)을 사용하여, 완전 인간화 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 서열을 cDNA로부터 증폭시켰다.
- [0176] 상기 PCR 생성물을 아가로스 겔 전기영동을 실시하여 밴드 크기와 균일성을 결정했다. 표적 단편은 400bp 내지 500bp에 있었다.
- [0177] PCR의 제2 라운드: 표 1에 제시된 바와 같이, 중쇄 업스트림 프라이머 5 내지 16(서열번호 83 내지 서열번호 94) 및 중쇄 다운스트림 프라이머 3 내지 5(서열번호 95 내지 서열번호 97) 뿐만 아니라 경쇄 업스트림 프라이머 4 내지 13(서열번호 98 내지 서열번호 107) 및 경쇄 다운스트림 프라이머 2 내지 4(서열번호 108 내지 서열번호 110)를 사용하여, PCR의 제1 라운드의 생성물은 중쇄 및 경쇄 유전자에 상동성 암을 첨가하기 위한 제2 라운드의 서열 증폭의 주형으로 사용하였다.
- [0178] 표적 단편은 PCR 정제 키트(QIAGEN에서 구매)를 사용하여 회수했다.
- [0179] 라이브러리 작제
- [0180] 선형화된 효모 디스플레이 벡터와 PCR의 제2 라운드의 생성물을 혼합하고, 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)(ATCC에서 구입)로 전기 형질전환하여 5마리의 마우스로부터 완전 인간화된 항-c-Met 항체 라이브러리를 작제하고, 라이브러리 용량을 결정했다. 라이브러리 용량은  $3 \times 10^7$ 이었다.
- [0181] 1.2. c-Met 항체의 스크리닝
- [0182] c-Met 단백질의 비오틴화 표지
- [0183] 적절한 용적의 이중 증류수를 취해 인간 c-Met 단백질(AcroBiosystems에서 구입)을 용해시켰다. 비오틴 표지 키트(Thermo에서 구입)의 지침에 따라, 비오틴을 용해시키고 단백질 용액과 혼합한 다음, 4°C에서 2시간 동안 배양했다. 탈염 컬럼(Thermo에서 구매)을 사용하여 과잉 비오틴을 제거했으며, 여기서 탈염 컬럼 전처리 및 샘플

플 수집 작업은 모두 제품 지침의 단계에 따라 수행되었다.

- [0184] 인간 c-Met에 특이적으로 결합할 수 있는 효모를 농축하기 위한 자기 비드 분류(MACS)
- [0185] 실시예 1.1에서 작제된 항체 라이브러리를 SD-CAA 증폭 배지(1L의 SD-CAA 증폭 배지는 6.7g의 YNB, 5g의 티로신, 13.62g의 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 7.44g의 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 및 2% 글루코스를 함유함)에 접종하고, 30°C, 225rpm에서 밤새 배양했다. 적정량의 효모 세포를 채취하고, 3000rpm×5분(다음 원심분리 작업은 동일함)으로 원심분리하여 배양 배지를 제거한 다음, 효모 세포를 SD-CAA 유도 배지로 재현탁시키고, 밤새 유도했다. 유도 후 라이브러리의 농도를 결정하고, 적정량의 효모 세포를 채취하고 원심분리하여 배양 배지를 제거했다. 효모 세포를 50ml의 PBS로 재현탁시키고, 원심분리하여 상청액을 제거했다. 효모 세포를 10ml의 PBS로 재현탁시켰다.
- [0186] 비오틴 표지 인간 c-Met 단백질(최종 농도는 100nM임)을 첨가하고, 실온에서 30분 동안 배양하고, 효모 세포를 원심분리로 수집하고 50ml의 PBS로 3번 세척했다. 효모 세포를 5ml의 세척액으로 재현탁시키고, 200 μl의 SA 자기 비드(Miltenyi Biotec에서 구입)를 첨가하고, 샘플을 10분 동안 배양했다. 효모와 자기 비드의 혼합물을 PBS로 3번 세척하고, 혼합물을 LS 정제 컬럼(Miltenyi Biotec에서 구입)에 첨가했다. LS 정제 컬럼을 자기 스탠드에 놓고, PBS로 세척하여 비특이적으로 결합된 효모 세포를 제거했다. 정제 컬럼을 자기 스탠드로부터 취하고, PBS를 첨가하여 효모 세포를 용출시켰다. 용출된 효모 세포를 원심분리하고 증폭을 위해 SD-CAA 증폭 배지로 옮겼다.
- [0187] 고친화도 효모 세포를 획득하기 위한 유세포 분석 분류(FACS)
- [0188] MACS로 농축된 효모 세포를 SD-CAA 증폭 배지에 접종하고, 진탕 플라스크에서 30°C, 225rpm에서 밤새 배양했다. 효모 세포를 SD-CAA 유도 배지에 재현탁시키고 밤새 유도했다. 항-c-Myc 마우스 항체(Thermo에서 구입)와 100nM 비오틴 표지 c-Met 항원을 첨가하고, 10분 동안 배양했다. 효모 세포를 PBS로 3회 세척하고, 염소 항-마우스 IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 488 형광 항체(Invitrogen에서 구입) 및 스트렙타비딘 APC 접합 형광 항체(Invitrogen에서 구입)를 첨가하고, 15분 동안 배양했다. 세포를 PBS에 재현탁시키고, BD AriaIII 기기를 사용하여 분류하여 c-Met 항원에 대한 높은 결합 능력을 갖는 효모를 획득했다.
- [0189] c-Met 항체 후보 분자 항체 유전자의 검색
- [0190] MACS 및 FACS 농축으로 획득된 인간 c-Met 항원에 대한 높은 결합 능력을 갖는 효모 용액을 SD-CAA의 고체 배양 플레이트에 코팅한 후, 단일 클론을 선택하여 SD-CAA 증폭 배지에서 30°C, 225rpm에서 밤새 배양했다. 증폭된 단일 클론을 0.1% SDS로 처리하고 원심분리하고, 상청액을 PCR 증폭을 위한 주형으로 사용했다. PCR 생성물을 서열분석하여 유전자 서열을 획득했다. 항체 22, 23, 74, 111, 136, 187, 216, 221 및 223으로 명명된 총 9개의 항체를 획득하였으며, 이들의 특정 서열은 표 1에 제시되었으며, 이 중 항체의 CDR 서열은 IMGT 넘버링 시스템(Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003)에 의해 결정되었다.
- [0191] 실시예 2: 단일 아암 항체의 작제 및 발현 및 정제
- [0192] 2.1. pCDNA3.1 발현 벡터에 항체 유전자 작제
- [0193] 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열(서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 또는 17에 제시된 바와 같음)을 중쇄 불변 영역 1을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열(서열번호 121에 제시된 바와 같음)과 인간 IgG1-Fc(LALA 돌연변이, 노브 돌연변이) 세그먼트를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열(서열번호 111)에 결합시키고, 상동성 제조합 시스템을 사용하여 EcoRI 및 NotI 제한 효소(Vazyme에서 구입)로 이중 분해된 선형화 pCDNA3.1 벡터에 클로닝하였고; 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열(서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 또는 18에 제시된 바와 같음) 및 경쇄 불변 영역을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열(서열번호 122에 제시된 바와 같음)을 EcoRI/XhoI I 이중 분해 선형화 pCDNA3.1 벡터에 클로닝하였고; Fc-LALA-홀을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열(서열번호 112)을 EcoRI/XhoI I 이중 분해 선형화 pCDNA3.1 벡터에 클로닝했다. 과정은 제품 매뉴얼에 따라 수행했다. 상동성 제조합 생성물을 Top10 적격 세포로 형질전환하고, 암피실린 내성 플레이트에 플레이트링한 다음, 37°C에서 밤새 배양하고, 단일 콜로니를 서열분석을 위해 선택하고, 플라스미드를 추출했다.
- [0194] 2.2. 세포 형질감염 및 단백질 정제
- [0195] ExpiCHO™ 발현 시스템 키트(Thermo에서 구입)를 사용하여 상기 추출된 중쇄(Fc-LALA-노브), 경쇄 및 Fc-LALA-홀(서열번호 112) 플라스미드를 Expi-CHO 세포에 공동 형질감염시켜 단일 Fab 구조를 갖는 항체를 생산했다(도 1). 형질감염 방법은 제품 매뉴얼에 따라 수행되었다. 세포 배양 5일 후, 상청액을 수집하고, 표적 단백질을

단백질 A 자기 비드(GenScript에서 구입) 분류 방법으로 정제했다. 자기 비드를 적절한 용적의 결합 완충액 (PBS + 0.1% Tween 20, pH 7.4)(자기 비드 용적의 1 내지 4배)에 재현탁시키고, 정제할 샘플에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 부드럽게 진탕시키면서 배양했다. 샘플을 자기 스탠드(Beaver에서 구입)에 놓고, 상청액을 폐기하고, 자기 비드를 결합 완충액으로 3번 세척했다. 용출 완충액(0.1M 나트륨 시트레이트, pH3.2)을 자기 비드 용적의 3 내지 5배에 따라 첨가하고, 실온에서 5 내지 10분 동안 진탕시키고, 다시 자기 스탠드에 놓고 용출 완충액을 수집하고 중화 완충액(1M Tris, pH 8.54)이 있는 수집 튜브로 옮기고 잘 혼합하여 표적 단백질을 수득했다.

[0196] 실시예 3: c-Met 항체 친화도의 결정

[0197] ForteBio 친화도 결정은 기존 방법에 따라 수행되었다(Estep, P et al., Determination of antibody-antigen affinity and epitope binding based on high-throughput methods. MAbs, 2013.5(2): p.270-8). 간단히, 센서를 검정 완충액에서 30분 동안 오프라인으로 평형화한 다음, 60초 동안 온라인으로 테스트를 수행하여 기준선을 확립하고, 상기 기재된 바와 같이 수득된 정제된 항체를 AHQ 센서에 온라인으로 로딩했다. 그런 다음, 센서를 100nM 인간 c-Met 항원에 5분 동안 넣은 다음, 5분 동안 해리를 위해 PBS로 옮겼다. 동역학 분석은 1:1 결합 모델을 사용하여 수행했다.

[0198] [표 2]

후보 분자와 인간 c-Met의 친화도

번호	KD(M)	Kon(1/Ms)	Koff(1/s)
22	4.29E-09	1.28E+05	5.48E-04
23	5.96E-10	1.60E+05	9.50E-05
74	6.01E-09	1.79E+05	1.08E-03
111	2.34E-09	1.60E+05	3.74E-04
136	2.93E-11	2.29E+05	6.71E-06
187	1.68E-09	2.20E+05	3.69E-04
216	6.54E-10	2.19E+05	1.43E-04
221	2.01E-09	1.84E+05	3.70E-04
223	9.76E-09	1.67E+05	1.63E-03

[0199]

[0200] 후보 분자는 또한 시노몰구스 원숭이(AcroBiosystems에서 구입)의 단백질을 포함하여 상이한 종의 단백질과 교차 반응성에 대해 테스트했다.

[0201] [표 3]

후보 분자와 원숭이 c-Met의 친화도

번호	KD(M)	Kon(1/Ms)	Koff(1/s)
22	1.90E-08	1.36E+05	2.59E-03
23	2.65E-08	5.69E+04	1.51E-03
74	9.70E-09	2.69E+05	2.60E-03
111	1.15E-08	1.02E+05	1.17E-03
136	1.16E-09	3.69E+05	4.26E-04
187	2.92E-09	3.24E+05	9.47E-04
216	3.84E-09	1.28E+05	4.93E-04
221	6.38E-08	3.01E+04	1.92E-03
223	1.62E-08	6.73E+04	1.09E-03

[0202]

[0203] 실험 결과는 표 2 및 3에 제시되어 있다. 본 출원의 9개 항체는 모두 포유동물(예: 인간, 원숭이)의 c-Met 단

백질과 특정 친화도를 가졌다.

[0204] 단백질의 작제, 발현 및 정제 방법은 실시예 2.2와 동일하였고, 단백질의 순도는 HPLC 검출에 의해 수득했다. HPLC 방법은 다음과 같았다: 이동상: 150mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, pH7.0; 크로마토그래피 조건: 검출 파장: 280nm, 컬럼 온도: 25℃, 유속: 0.35ml/분, 검출 시간: 20분, Zenix-C SEC-300 크로마토그래피 컬럼(SEPAX 4.6×300mm, 3 μm).

[0205] [표 4]

항-c-Met 항체의 순도 검출 결과

번호	단량체 비율 (%)
22	97.20%
23	98.50%
74	98.00%
111	97.20%
136	94.80%
187	97.70%
216	97.30%
221	94.00%
223	96.80%

[0206]

[0207] 실험 결과는 표 4에 제시되어 있다. 본 출원의 9개의 항체는 모두 비교적 높은 순도를 가졌다, 즉 모두 94% 이상이었다.

[0208] 실시예 4. 항-c-Met 후보의 열 안정성

[0209] DSC(시차 주사 열량 측정법)를 사용하여 상이한 항체의 열 안정성을 검출했다. 샘플을 농축시키고 PBS로 1mg/ml로 희석하고, 5000배 형광 비색제 사이프로 오렌지(Bio-Rad에서 구입)를 초순수로 50배 희석하여 100배 형광 비색제 사이프로 오렌지를 수득했다. 1mg/ml 샘플 50 μl를 채취하고, 100배 형광 비색제 사이프로 오렌지 10 μl와 초순수 40 μl를 첨가하여 잘 혼합하고, 혼합물 30 μl를 채취하여 96-웰 PCR 플레이트에 첨가하고, 각 샘플에 대해 3개의 중복 웰로, 플레이트를 PCR 기기에 넣었다. 가열 프로그램은 다음과 같이 설정했다: 5분 동안 25℃의 일정한 온도를 유지하고, 0.5℃/분의 속도로 99℃로 가열했다. 프로그램이 완료된 후, "용융 곡선" 그래프에서 곡선의 가장 낮은 지점의 온도 값을 판독했으며, 이는 샘플의 T<sub>m</sub> 값이었다. 구체적인 결과는 아래 표 5에 제시되어 있다:

[0210] [표 5]

항-c-Met 항체의 Tm 값

번호	Tm (°C)
22	67.34
23	67.95
74	67.42
111	64.26
136	67.86
187	67.42
216	67.42
221	67.42
223	67.42

[0211]

[0212] 실험 결과는 표 5에 제시되어 있다. 본 출원의 9개 항체 모두 특정 열 안정성을 가졌다.

[0213] 실시예 5. 인간/붉은 털 원숭이 c-Met 세포에 결합하는 항-c-Met 정제된 후보

[0214] c-Met을 발현하는 포유류 세포에 대한 본 출원의 항체의 결합 능력을 검증하기 위해, 3개의 기존 항체인 아미반타맙, LY2875358 및 오나르투주맙을 비교를 위한 대조군 항체로 선택하였다.

[0215] 이들 중, 아미반타맙 및 LY2875358 대조군 항체의 작제 과정은 본 출원의 단일 아암 항체와 동일했으며, 둘 다 실시예 2의 단계에 따라 작제되었다. 간단히 말해, 대조군 항체 아미반타맙의 경우, 서열번호 113, 서열번호 114 및 서열번호 115에 제시된 삽입 단편을 각각 플라스미드에 삽입하고, 플라스미드를 Expi-CHO 세포에 공동형질전환시켰으며, 대조군 항체 LY2875358의 경우, 서열번호 116, 서열번호 117 및 서열번호 118에 제시된 삽입 단편을 각각 플라스미드에 삽입하였고, 플라스미드를 Expi-CHO 세포로 공동형질전환시켰다. 대조군 항체 오나르투주맙의 경우, 서열번호 119, 서열번호 120 및 서열번호 115를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 각각 플라스미드에 삽입하고, 플라스미드를 Expi-CHO 세포에 공동형질전환시켰다.

[0216] 인간 c-Met를 과발현하는 HEK293T 세포(HEK293-Hu c-Met)와 붉은 털 원숭이 c-Met를 과발현하는 HEK293T 세포(HEK293-Rhe c-Met)는 인간 또는 붉은 털 원숭이 c-Met cDNA(Sino Biological에서 구입)가 클로닝된 pCH01.0 벡터(Invitrogen에서 구입)를 MCS에 형질감염시켜 생성했다. 확장된 HEK293-Hu c-Met/HEK293-Rhe c-Met 세포의 세포 밀도를  $2 \times 10^6$  세포/ml로 조정하고, 96-웰 유세포 분석 플레이트에  $100 \mu\text{l}$ /웰로 첨가하고, 나중 사용을 위해 원심분리했다. 정제된 c-Met 항체를 PBS로 희석하고, 총 10포인트에 대해 100nM에서 3배 희석을 시작했다. 희석된 샘플을 세포가 있는 96-웰 유세포 분석 플레이트에  $100 \mu\text{l}$ /웰로 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 배양하고 PBS로 두 번 세척했다. PBS로 100배 희석된 염소 F(ab')<sup>2</sup> 항-인간 IgG-Fc(PE)(Abcam에서 구입)를  $100 \mu\text{l}$ /웰로 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 배양하고 PBS로 두 번 세척했다. PBS를  $100 \mu\text{l}$ /웰로 첨가하여 세포를 재현탁시키고, 세포를 CytoFlex(Bechman) 유세포 분석기에서 검출하고, 반응하는 MFI를 계산했다.

[0217] 상기 방법의 검출 실험에서, 실험 결과는 도 2A 및 도 2B에 제시되어 있으며, 본 발명의 모든 항-c-Met 단일 아암 항체는 HEK293-Hu c-Met 세포에 대한 결합 활성을 가졌다. 특히, 항체 136은 대조군 항체 아미반타맙과 유사한 강력한 결합 활성을 보였으며, 대조군 항체 LY2875358 및 대조군 항체 오나르투주맙보다 우수했다. 도 2C 및 도 2D는 HEK293-Rhe c-Met 세포에 대한 본 발명의 모든 항-c-Met 단일 아암 항체의 결합 활성이 인간 c-Met 과발현 세포와 유사했음을 나타냈다. 특히, 항체 136은 아미반타맙과 유사하게 강력한 결합 활성을 나타냈으며, 다른 후보 항체 및 대조군 항체보다 우수했다. 그리고, 표 6 및 7에 제시된 바와 같이, 모든 항-c-Met 스크리닝 단일 아암 항체는 인간 c-Met 및 붉은 털 원숭이 c-Met을 발현하는 세포에 대한 유사한 결합 능력(EC50)을 나타냈다.

[0218] [표 6]

HEK293-Hu c-Met 에 대한 항-c-Met 단일 아암 항체의 결합 활성을 검출하기 위한 표

항체 클론 번호	EC50 (nM)	EC50 (nM)
22	0.947	/
23	0.8211	/
74	1.901	/
85	2.092	/
111	25.72	/
136	0.4515	/
187	/	0.7322
216	/	0.744
221	/	1.731
222	/	0.78
223	/	0.7649
225	/	2.352
LY2875358 단일 아암 항체	1.245	1.391
아미반타맙 단일 아암 항체	0.3227	0.3957
오나르투주맙	1.032	0.5398

[0219]

[0220] [표 7]

HEK293-Rhe c-Met 에 대한 항-c-Met 단일 아암 항체의 결합 검출

항체 클론 번호	EC50 (nM)	EC50 (nM)
22	0.7258	/
23	0.7464	/
74	1.461	/
85	0.8092	/
111	26.17	/
136	0.3062	/
187	/	0.5922
216	/	0.6006
221	/	1.478
222	/	0.4646
223	/	1.064
225	/	7.536
LY2875358 단일 아암 항체	0.8682	0.7487
아미반타맙 단일 아암 항체	0.2414	0.2001
오나르투주맙	0.9699	1.241

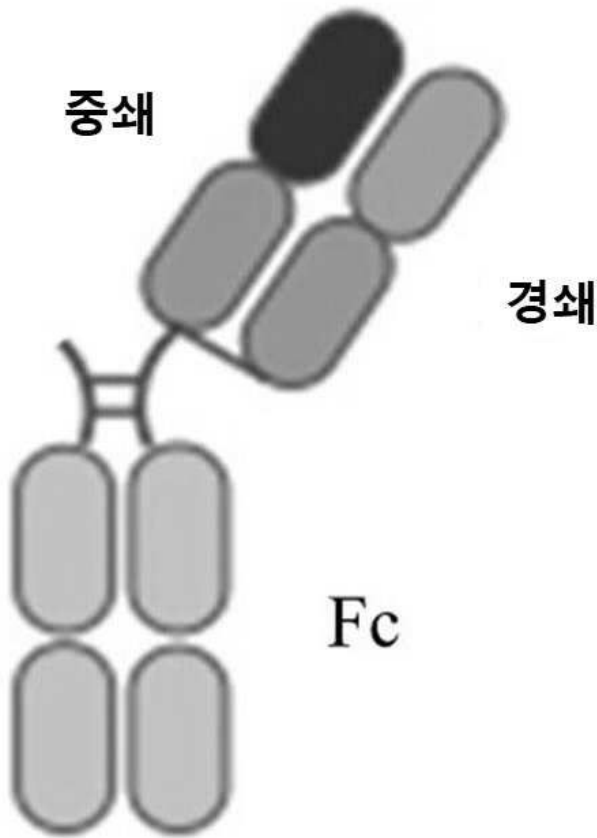
[0221]

[0222] 실시예 6: 항-c-Met 스크리닝을 위한 단일 아암 항체로 HGF 의존적 TKI 내성 차단

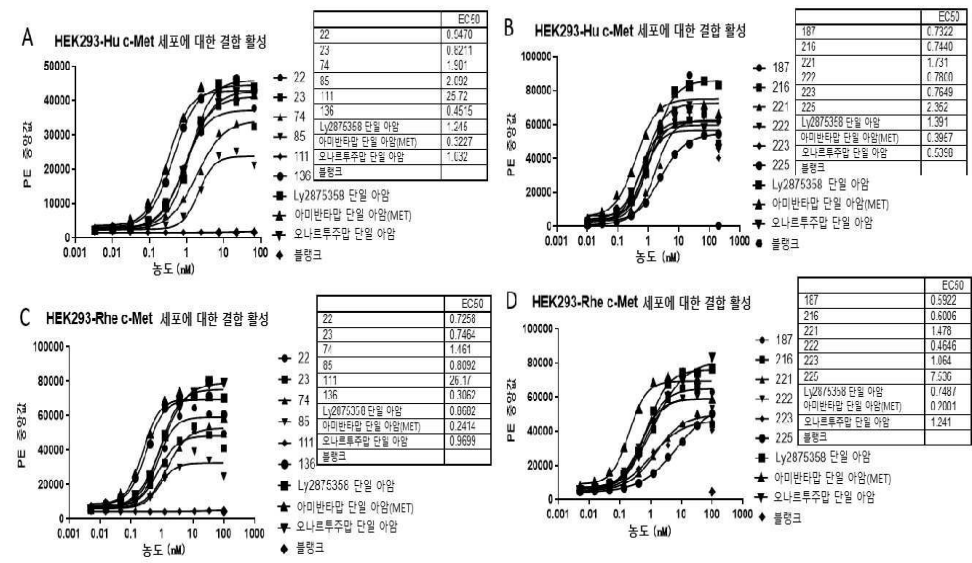
- [0223] HCC827 세포는 인간 비소세포 폐암 세포였고, 중국 과학원 세포 은행에서 구입했으며, 이는 표피 성장 인자 수용체(EGFR)(엑손 19 결실)와 c-Met 수용체를 고도로 발현할 수 있었다. 티로신 키나제 억제제(TKI) 소분자 게피티닙(게피티닙, 표피 성장 인자 수용체 티로신 키나제 억제제)을 사용한 치료는 HCC827 세포에서 세포사멸을 유도할 수 있다. 이러한 조건 하에 HGF를 동시에 첨가하면, c-Met 경로가 활성화되어 HCC827이 게피티닙에 내성이도록 유도하고 세포사멸을 억제할 수 있다.
- [0224] 확장 배양된 HCC827 세포의 세포 밀도를  $2 \times 10^4$  세포/ml로 조정하고, 96-웰 세포 배양 플레이트에 100  $\mu$ l/웰로 첨가하고, 나중 사용을 위해 밤새 배양했다. 1640 배지를 사용하여, 테스트할 항체를 1640 배지로 1000nM로 희석하고, HGF는 800ng/mL로 희석하고, 게피티닙은 8  $\mu$ M으로 희석했다. 실험 요건에 따라, 세포가 있는 96-웰 플레이트에 희석된 항체를 50  $\mu$ l/웰로, HGF를 25  $\mu$ l/웰로, 게피티닙을 25  $\mu$ l/웰로 첨가하고, 1640 배지를 보충하여 총 용적 200  $\mu$ l/웰에 도달하도록 했다. 37°C, 5% 이산화탄소에서 3일 동안 배양한 후, 배지 100  $\mu$ l를 제거한 다음, 100  $\mu$ l/웰로 세포 역가 글로(Promega에서 구입)를 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기로 화학발광 신호를 수집했다.
- [0225] 실험 결과는 도 3에 제시되어 있다. 본 출원의 항-c-Met 스크리닝을 위한 단일 아암 항체는 HGF-c-Met 신호전달 경로를 억제하였고(예: 항체 22, 23, 74, 85, 111, 136 및 187), 이로써 게피티닙에 의해 유도된 HCC827의 세포사멸을 회복시켰다. 이들 중, 항체 136과 187은 모두 상당한 억제 활성을 나타냈으며, 다른 항체(예: 항체 22, 23, 74, 85, 111, 216, 221, 222, 223 및 225)보다 훨씬 우수했으며, 심지어 일부 대조군 항체보다 더 우수했다.
- [0226] 실시예 7. 항-c-Met 스크리닝을 위한 단일 아암 항체로 HGF 유도 세포 증식 차단
- [0227] H596 세포는 인간 폐암 세포였고, ATCC에서 구입했으며, 이는 EGFR과 c-Met 수용체를 발현할 수 있었다. HGF 치료는 H596 세포 증식을 유도할 수 있다. 이러한 조건 하에 대조군 항체를 첨가하면, HGF-c-Met 신호전달 경로가 억제되고, 이로써 H596의 HGF 유도 증식을 억제한다. 확장된 H596 세포를  $3 \times 10^4$  세포/ml의 밀도에 도달하도록 조정하고, 96-웰 세포 배양 플레이트에 100  $\mu$ l/웰로 첨가하고, 나중 사용을 위해 밤새 배양했다. 1640 배지를 사용하여 테스트할 항체를 400nM로 희석하고, HGF를 200ng/mL로 희석했다. 실험 요건에 따라, 세포가 있는 96-웰 플레이트에 희석된 항체를 50  $\mu$ l/웰로, HGF를 50  $\mu$ l/웰로 첨가하고, 1640 배지를 보충하여 총 용적 200  $\mu$ l/웰에 도달하도록 했다. 세포를 37°C, 5% 이산화탄소에서 5일 동안 배양했다. 5일 후, 배지 100  $\mu$ l를 제거한 다음, 세포 역가 글로(Promega에서 구입)를 100  $\mu$ l/웰로 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기로 화학발광 신호를 수집했다.
- [0228] 도 4에 도시된 바와 같이, 항-c-Met 스크리닝을 위한 단일 아암 항체 136과 187은 모두 HGF 유도된 H596 세포의 증식을 유의미하게 억제했다. 또한, 항체 136의 억제 효과는 모든 대조군 항체보다 우수했다.
- [0229] 본 발명의 특정 구현예가 상세히 기재되었지만, 당업자는 개시된 모든 교시에 기초하여 세부 사항에 다양한 변형 및 변화가 이루어질 수 있으며, 이러한 변화는 본 발명의 보호 범위 내에 있음을 이해할 것이다. 본 발명의 전체는 첨부된 청구범위 및 이의 임의의 등가물에 의해 제공된다.

도면

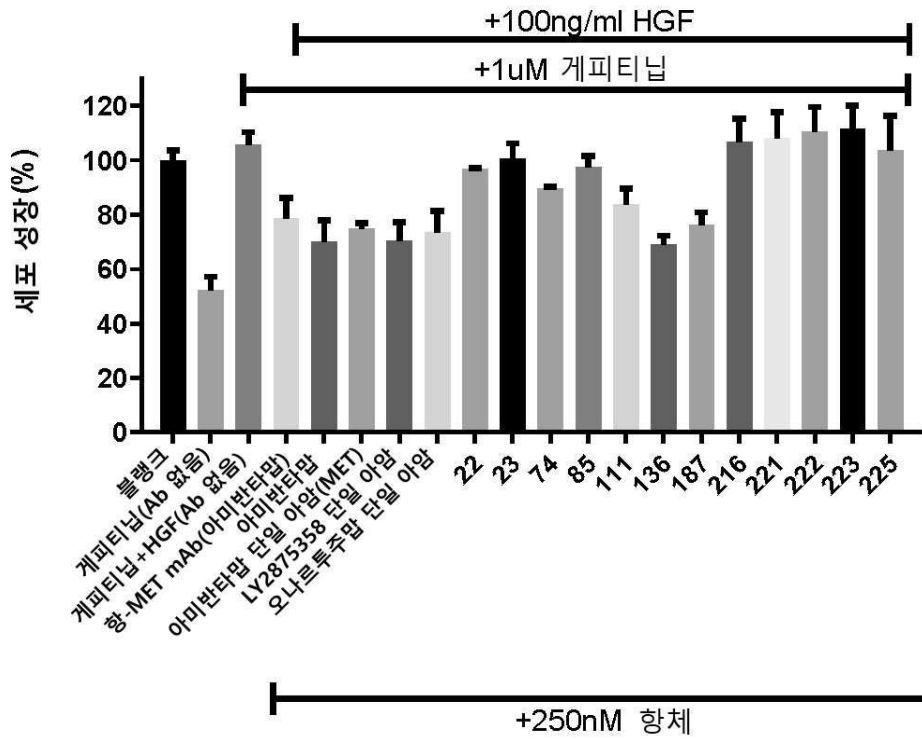
도면1



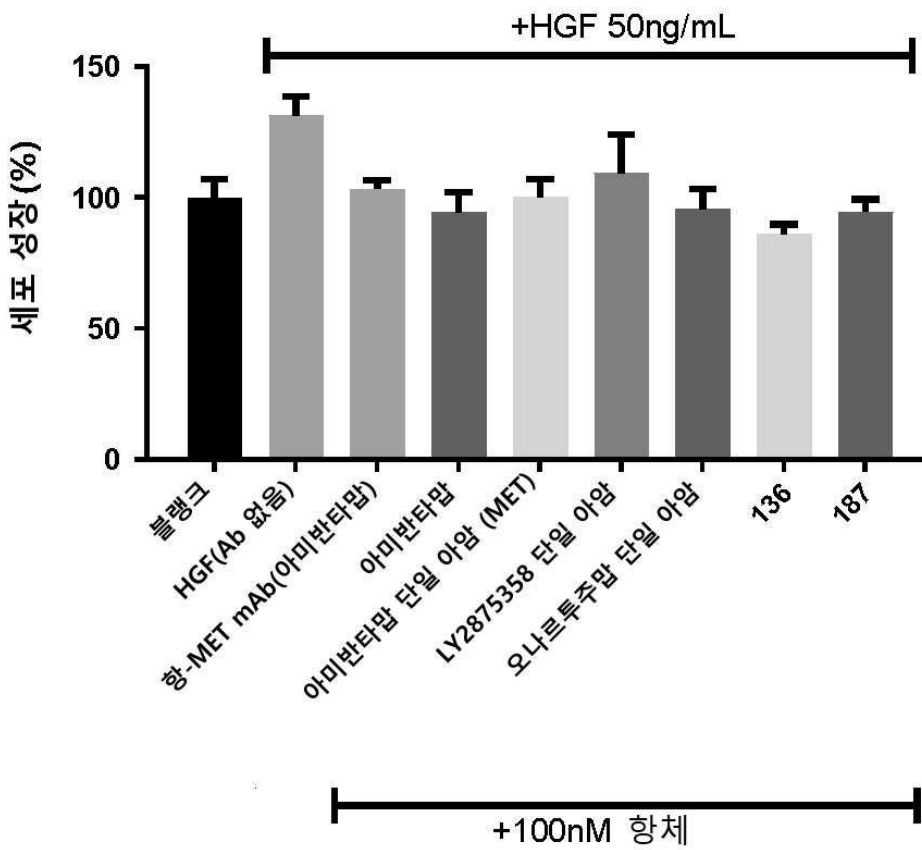
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.