



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년12월02일

(11) 등록번호 10-1334450

(24) 등록일자 2013년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7011522

(22) 출원일자(국제) 2009년11월18일

심사청구일자 2011년05월25일

(85) 번역문제출일자 2011년05월20일

(65) 공개번호 10-2011-0074612

(43) 공개일자 2011년06월30일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/064881

(87) 국제공개번호 WO 2010/059654

국제공개일자 2010년05월27일

(30) 우선권주장

61/116,825 2008년11월21일 미국(US)

61/219,903 2009년06월24일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2007126799 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

일라이 렐리 앤드 캄파니

미국 46285 인디애나주 인디애나폴리스 렐리 코퍼레이트 센터

(72) 발명자

데이비스, 줄리안

미국 46285 인디애나주 인디애나폴리스 렐리 코퍼레이트 센터 일라이 렐리 앤드 캄파니

리우, 링

미국 46285 인디애나주 인디애나폴리스 렐리 코퍼레이트 센터 일라이 렐리 앤드 캄파니

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김영, 양영준

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 c-MET 항체

(57) 요약

c-Met에 결합하고 c-Met의 활성을 억제하고 발병기전이 c-Met에 의해 매개되는 암 및 다른 질병, 질환, 또는 병태의 치료에 효과적인 모노클로날 항체, 그의 항원-결합 단편 및 이들의 조합물이 제공된다.

(72) 발명자

루, 지통

미국 46285 인디애나주 인디애나폴리스 렐리 코퍼
레이트 센터 일라이 렐리 앤드 컴퍼니

베일란코트, 피터, 에드워드

미국 46285 인디애나주 인디애나폴리스 렐리 코퍼
레이트 센터 일라이 렐리 앤드 컴퍼니

워팅어, 마크, 앤드류

미국 46285 인디애나주 인디애나폴리스 렐리 코퍼
레이트 센터 일라이 렐리 앤드 컴퍼니

젱, 웨이

미국 46285 인디애나주 인디애나폴리스 렐리 코퍼
레이트 센터 일라이 렐리 앤드 컴퍼니

특허청구의 범위

청구항 1

3개의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 및 3개의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR)을 포함하며, 상기 3개의 LCDR 및 상기 3개의 HCDR이 아미노산 서열 SVSSVSSIYLH (서열 53)를 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열 STSNLAS (서열 54)를 포함하는 LCDR2, 아미노산 서열 QVYSGYPLT (서열 56)를 포함하는 LCDR3, 아미노산 서열 GYTFTDYYMH (서열 65)를 포함하는 HCDR1, 아미노산 서열 RVNPNRRGTTYNQKFEG (서열 68)를 포함하는 HCDR2, 및 아미노산 서열 ANWLDY (서열 69)를 포함하는 HCDR3인 것인 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, $^{123}\text{DTYYDD}_{128}$ (서열 81), $^{144}\text{HVFPHNHTADIQS}_{156}$ (서열 82), $^{192}\text{FINF}_{195}$ (서열 83), 및 $^{220}\text{KETKDGFM}_{227}$ (서열 84)를 특징으로 하는 입체형태적 에피토프 내에서 인간 c-Met의 α -사슬에 결합하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 경쇄 가변 영역 (LCVR) 및 중쇄 가변 영역 (HCVR)을 포함하고, LCVR이 서열 5의 아미노산 서열을 포함하고, HCVR이 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 것인 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 서열 29의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 및 IgG4 중쇄 불변 영역을 갖는 중쇄를 포함하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 서열 29의 아미노산 서열을 갖는 2개의 경쇄 및 IgG4 중쇄 불변 영역을 갖는 2개의 중쇄를 포함하는 모노클로날 항체.

청구항 6

제1항 또는 제2항의 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 제약상 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함하는, 인간에서 암의 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항의 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는, 인간에서 위암, 신장암, 결장암, 결장직장암, 폐암, 두경부암, 전립선암, 또는 흑색종의 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 경쇄의 아미노산 서열이 서열 35에 의해 코딩되고, 중쇄의 아미노산 서열이 서열 47에 의해 코딩되는 것인 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 9

제8항에 있어서, 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 포함하고, 상기 경쇄의 아미노산 서열이 서열 35에 의해 코딩되고, 상기 중쇄의 아미노산 서열이 서열 47에 의해 코딩되는 것인 모노클로날 항체.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 c-Met에 결합하는 항체, 및 발병기전이 상기 수용체에 의해 매개되는 병태 및 질환을 치료하는데 있어서 그들의 용도에 관한 것이다.

[0002]

티로신 키나제 상과의 구성원인 c-Met는 간세포 성장 인자 (HGF)에 대한 수용체이다. c-Met에 대한 HGF의 결합은 수용체 이량체화 또는 다량체화, 세포내 영역에서 다수 티로신 잔기의 인산화, 촉매적 활성화, 및 하류 신호 전달을 일으킨다. c-Met는 또한 수용체 과다-발현, 증폭, 및 돌연변이를 포함한 리간드-비의존적 메카니즘을 통해 활성화된다. c-Met 활성화는 세포성 증식, 이동, 형태형성, 생존 (아폽토시스로부터의 보호), 및 프로테이제 합성 (암 환자에서 침습성 세포 표현형 및 불량한 임상 결과 및 약물 내성과 연관된 특징)을 향상시킨다. c-Met 신호전달 경로는 인간 암에서 가장 빈번하게 조절곤란한 경로 중 하나이고, 실질적으로 모든 종류의 고형 종양에서 생성한다.

배경기술

[0003]

PCT 국제 특허 출원 공개 WO 09/007427에서는 뮤린 및 CDR-그라프팅된 (grafted), 인간화된 c-Met 항체를 개시하고 있다. 여기에 개시된 뮤린 항체 224G11은 c-Met 세마 (Sema) 도메인에 결합하지 않았다. h224G11 Mab로 표시된 상기 뮤린 항체의 인간화된 IgG1 유도체의 추가의 기능적 특성은 2009년 4월에 어소시에이션 포 캔서 리서치 (American Association for Cancer Research; 미국 콜로라도주 덴버)의 학회에서 제출된 초록 (Abstract) 835 (시험관내 데이터) 및 2792 (생체내 데이터)와 그의 첨부된 포스터 (poster)에 보고되어 있다. 이를 초록 및 포스터에서는 2가 h224G11 Mab가 고유한 효험 특성이 없고, c-Met의 완전 길항제로서 거동하고,

c-Met 이량체화를 강하게 감소시키는 것을 개시한다. 뮤린 224G11는 생체 내에서 c-Met를 하향-조절하고 c-Met 인산화를 차단하는 것으로 보고되었다. 다른 수용체의 경우에, 이량체화는 수용체 내재화 및 분해를 위한 전제 조건이다. 이들 초록 및 포스터에서는 c-Met 내재화에 관한 데이터를 개시하지 않았다. 또한, 인간화된 항체가 c-Met 내에서 결합하는 에피토프도 확인되지 않았다.

[0004] PCT 국제 특허 출원 공개 WO 05/016382에서는 또한 c-Met 항체를 개시하지만, 항체가 결합하는 에피토프(들)을 확인하지 않는다. 에피토프 맵핑 (mapping) 예가 제공되지만, 보고된 결과는 단지 6개의 c-Met 항체가 공통에 에피토프에 결합하는 한편, 7번째 c-Met 항체는 별개의 에피토프에 결합하는 나타낸다. 이들 c-Met 항체가 결합하는 특정 에피토프는 제공되지 않는다.

[0005] 인간 c-Met의 α-사슬에 대한 그의 결합이 HGF의 존재 및/또는 부재 하에 세포 표면으로부터 수용체의 내재화를 용이하게 하는, 인간 c-Met에 대한 길항체 항체가 여전히 필요하다. 인간 c-Met의 α-사슬에 대한 결합이 기능 획득 돌연변이를 함유하는 c-Met 변이체를 포함하는 세포에서 세포 표면으로부터 수용체의 내재화를 용이하게 하는 인간 c-Met에 대한 길항체 항체가 또한 필요하다. c-Met 분해 및 인간화된 c-Met의 감소를 유도하는 인간 c-Met에 대한 길항체 항체가 또한 필요하다. 그러한 길항체 활성은 종양 세포 표면 상에 HGF에 대한 이용 가능한 결합 부위의 수를 감소시키고, c-Met의 과다발현, 증폭, 또는 돌연변이에 의해 유발된 경로 활성화를 종결시킬 수 있다. 동시에, 그러한 길항체 항체는 c-Met에 대한 HGF 결합 및 HGF-유도된 c-Met 활성화를 억제하고, 효능제 활성 자체는 거의 또는 전혀 유도하지 않아야 한다.

발명의 내용

[0006] 본 발명의 항체 화합물은 이를 필요로 충족시킨다. 이들은 인간 c-Met 세마 도메인의 α-사슬 내의 에피토프에 결합하여, 효능제 활성을 거의 또는 전혀 유도하지 않으면서 c-Met에 대한 HGF-결합 및 수용체 활성화를 억제한다. 본 발명의 항체는 또한 HGF의 존재 또는 부재 하에 및 또한 기능 획득 돌연변이를 함유하는 c-Met 변이체를 포함하는 세포 내에서 수용체의 내재화를 유도한다. 이들은 c-Met의 분해를 유도하고, 인간화된 인간 c-Met의 감소를 유도하고, 상기 수용체를 발현하는 종양 세포의 HGF-의존적 및 HGF-비의존적 증식을 억제한다. 이들 특성에 비추어, 이들 항체 화합물은 다양한 상이한 메카니즘을 통해 c-Met에 의해 매개되는 암을 치료하는데 있어서 치료상 유용할 것이다.

[0007] 추가로, 본 발명의 항체 화합물은 다른 많은 바람직한 특성을 갖는다. 이들은 c-Met에 대해 높은 친화도 (K_D)를 보이고, HGF-매개된 c-Met 인산화 및 하류 신호전달, 세포성 증식, 및 세포성 이동을 차단하고; 종양 세포 증식, 운동성, 침습, 관강형성 (tubulogenesis), 혈관신생, 또는 항-아폽토시스 효과의 유도와 같은 HGF-유사 생물학적 효능제 활성을 거의 또는 전혀 유도하지 않으면서 단지 c-Met의 약한 인산화만을 유도한다. 이들은 리간드 (HGF)-의존적 및 리간드-비의존적 c-Met 경로 활성화를 모두 억제한다. 추가로, 본 발명의 항체 화합물은 밀접하게 관련된 수용체 RON 및 PlexinA2의 세포외 도메인 (ECD)에 비해 인간 c-Met 세포외 도메인 (ECD)에 우선적으로 결합하고, c-Met ECD의 "탈락 (shedding)"을 일으키지 않는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0008] 따라서, 본 발명은

[0009] a) 인간 c-Met의 α-사슬 내의 에피토프에 결합하고,

[0010] b) 세포 표면 인간 c-Met의 내재화를 유도하는

[0011] 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0012] 상기한 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 세포 표면 인간 c-Met의 간세포 성장 인자-비의존적 내재화를 유도한다. 바람직한 실시양태에서, 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 28의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 40의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 29의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 41의 아미노산 서열을 포함한다.

[0013] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 기능 획득 돌연변이를 함유하는 인간 c-Met 변이체를 포함하는 세포 내에서 인간 c-Met의 내재화를 유도한다. 기능 획득 돌연변이는 c-Met 키나제 도

메인 돌연변이 M1149T 또는 막근접 도메인 돌연변이 R988C일 수 있다.

[0014] 임의의 상기한 항체 또는 그의 항원-결합 단편에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 세포에서 세포 표면 인간 c-Met의 적어도 40% 내재화를 유도한다. 임의의 상기한 항체 또는 그의 항원-결합 단편에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 세포에서 세포 표면 인간 c-Met의 적어도 45% 내재화를 유도한다. 임의의 상기한 항체 또는 그의 항원-결합 단편에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 세포에서 세포 표면 인간 c-Met의 적어도 50% 내재화를 유도한다. 임의의 상기한 항체 또는 그의 항원-결합 단편에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 세포에서 세포 표면 인간 c-Met의 적어도 55% 내재화를 유도한다. 임의의 상기한 항체 또는 그의 항원-결합 단편에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 세포에서 세포 표면 인간 c-Met의 적어도 60% 내재화를 유도한다. 임의의 상기한 항체 또는 그의 항원-결합 단편에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 세포에서 인간 c-Met의 적어도 65% 내재화를 유도한다. 임의의 상기한 항체 또는 그의 항원-결합 단편에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 세포에서 세포 표면 인간 c-Met의 적어도 70% 내재화를 유도한다.

[0015] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 간세포 성장 인자-비의존적 종양 세포에서 총 c-Met의 감소를 유도한다. 바람직한 실시양태에서, 간세포 성장 인자-비의존적 종양 세포에서 총 c-Met의 감소를 유도하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 28의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 40의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 간세포 성장 인자-비의존적 종양 세포에서 총 c-Met의 감소를 유도하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 29의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 41의 아미노산 서열을 포함한다.

[0016] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 간세포 성장 인자-비의존적 종양 세포에서 인산화된 c-Met의 감소를 유도한다.

[0017] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 서열 28에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 및 서열 40에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함하는 항체와 실질적으로 동일한 에피토프에서 인간 c-Met의 α-사슬에 결합하거나, 또는 서열 29에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 및 서열 41에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함하는 항체와 실질적으로 동일한 에피토프에서 인간 c-Met의 α-사슬에 결합한다.

[0018] 서열 26에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 및 서열 38에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 갖는 것을 제외한 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나에서, 에피토프는 $^{144}\text{HVFPHNHTADIQS}_{156}$ (서열 82) 내에 하나 이상의 아미노산 잔기를 추가로 포함한다.

[0019] 상기한 항체 또는 항원-결합 단편의 임의의 하나에서, 에피토프는 $^{123}\text{DTYYDD}_{128}$ (서열 81) 내에 하나 이상의 아미노산 잔기를 추가로 포함한다.

[0020] 상기한 항체 또는 항원-결합 단편의 임의의 하나에서, 에피토프는 $^{192}\text{FINF}_{195}$ (서열 83) 내에 하나 이상의 아미노산 잔기를 추가로 포함한다.

[0021] 상기한 항체 또는 항원-결합 단편의 임의의 하나에서, 에피토프는 $^{220}\text{KETKDGFM}_{227}$ (서열 84) 내에 하나 이상의 아미노산 잔기를 추가로 포함한다.

[0022] 상기한 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나에서, 항체는

- a) $^{121}\text{VVDTYYDDQL}_{130}$ (서열 77),
- b) $^{131}\text{ISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQS}_{156}$ (서열 78),
- c) $^{179}\text{ALGAKVLSSVKDRFINF}_{195}$ (서열 79), 및
- d) $^{216}\text{VRRLKETKDGFM}_{227}$ (서열 80)

[0023]로 이루어지는 군 중에서 선택된 아미노산 서열 내에서 결합한다.

- [0025] 상기한 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나에서, 항체는
 a) $^{123}\text{DTYYDD}_{128}$ (서열 81),
 b) $^{144}\text{HVFPHNHTADIQS}_{156}$ (서열 82),
 c) $^{192}\text{FINF}_{195}$ (서열 83), 및
 d) $^{220}\text{KETKDGFM}_{227}$ (서열 84)
- [0026]
- [0027]로 이루어지는 군 중에서 선택된 아미노산 서열 내에서 결합한다.
- [0028]상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는
 $^{121}\text{VVDTYYDDQL}_{130}$ (서열 77) $^{131}\text{ISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQS}_{156}$
 (서열 78), $^{179}\text{ALGAKVLSSVKDRFINF}_{195}$ (서열 79), 및
 $^{216}\text{VRRLKETKDGFM}_{227}$ (서열 80)
- [0029]
- [0030]을 특징으로 하는 에피토프 내에서 아미노산 서열에 결합한다.
- [0031]상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는
 $^{123}\text{DTYYDD}_{128}$ (서열 81), $^{144}\text{HVFPHNHTADIQS}_{156}$ (서열 82),
 $^{192}\text{FINF}_{195}$ (서열 83), 및 $^{220}\text{KETKDGFM}_{227}$ (서열 84)
- [0032]
- [0033]을 특징으로 하는 에피토프 내에서 아미노산 서열에 결합한다.
- [0034]상기한 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나에서, 항체는 $^{95}\text{CFPCQDCSSKA}_{105}$ (서열 86)의 아미노산 서열 내에서 결합한다.
- [0035]서열 29에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 및 서열 41에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 갖는 것을 제외한 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나에서, 에피토프는 $^{95}\text{CFPCQDCSSKA}_{105}$ (서열 86) 내에 하나 이상의 아미노산 잔기를 추가로 포함한다.
- [0036]인간 c-Met에 결합하는 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 3개의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 및 3개의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR)을 포함하고, 여기서 상기 3개의 LCDR 및 상기 3개의 HCDR은
- [0037]a) 아미노산 서열 SVSSSISSTNLH(서열 49)를 포함하는 LCDR1;
- [0038]아미노산 서열 GTS X_1 LX X_2 S(서열 87) (여기서, X_1 은 Y 또는 R이고, X_2 는 A 또는 R이다)를 포함하는 LCDR2;
- [0039]아미노산 서열 QQWSSYPYS(서열 51)를 포함하는 LCDR3;
- [0040]아미노산 서열 GYTFTSRYIH(서열 59)를 포함하는 HCDR1;
- [0041]아미노산 서열 WIYPVTGDTYYX $_7$ EX $_8$ FKG(서열 90) (여기서, X_7 은 N, I 또는 R이고, X_8 은 K 또는 P이다)를 포함하는 HCDR2; 및
- [0042]아미노산 서열 GYGAFX $_9$ Y(서열 91) (여기서, X_9 은 Y 또는 F이다)를 포함하는 HCDR3; 및
- [0043]b) 아미노산 서열 SVSSSVX $_3$ SIYLH(서열 88) (여기서, X_3 은 S 또는 R이다)를 포함하는 LCDR1;
- [0044]아미노산 서열 STSNLAS(서열 54)를 포함하는 LCDR2;
- [0045]아미노산 서열 X $_4$ X $_5$ YX $_6$ GYPLT(서열 89) (여기서, X_4 는 I 또는 Q이고, X_5 는 Q 또는 V이고, X_6 은 S 또는 R이다)를 포함하는 LCDR3;
- [0046]아미노산 서열 GYTFTDYYMH(서열 65)를 포함하는 HCDR1;

- [0047] 아미노산 서열 RVNPX₁₀RX₁₁X₁₂TTYNQKFEG (서열 92) (여기서, X₁₀은 N 또는 Y이고, X₁₁은 G 또는 R이고, X₁₂는 G 또는 S이다)를 포함하는 HCDR2; 및
- [0048] 아미노산 서열 X₁₃NX₁₄LDY (서열 93) (여기서, X₁₃은 T 또는 A이고, X₁₄는 W 또는 I이다)를 포함하는 HCDR3
- [0049] 으로 이루어지는 군 중에서 선택되고;
- [0050] 상기 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 상기 인간 c-Met의 α-사슬 내의 에피토프에 결합하고 세포 표면 인간 c-Met의 내재화를 유도한다.
- [0051] 인간 c-Met에 결합하는 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 3개의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 및 3개의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR)을 포함하고, 여기서 항체는 3개의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 및 3개의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR)을 포함하고, 여기서
- [0052] LCDR1은 아미노산 서열 SVSSSISSTNLH (서열 49)를 포함하고;
- [0053] LCDR2는 GTSX₁LX₂S (서열 87) (여기서, X₁은 Y 또는 R이고, X₂는 A 또는 R이다)를 포함하고;
- [0054] LCDR3은 아미노산 서열 QQWSSYPYS (서열 51)를 포함하고;
- [0055] HCDR1은 아미노산 서열 GYTFTSRYIH (서열 59)를 포함하고;
- [0056] HCDR2는 아미노산 서열 WIYPVTGDTYYX₇EX₈FKG (서열 90) (여기서, X₇은 N, I 또는 R이고, X₈은 K 또는 P이다)를 포함하고;
- [0057] HCDR3은 아미노산 서열 GYGAFX₉Y (서열 91) (여기서, X₉는 Y 또는 F이다)를 포함한다.
- [0058] 인간 c-Met에 결합하는 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 3개의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 및 3개의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR)을 포함하고, 여기서
- [0059] LCDR1은 아미노산 서열 SVSSSVX₃SIYLH (서열 88) (여기서, X₃은 S 또는 R이다)를 포함하고;
- [0060] LCDR2는 아미노산 서열 STSNLAS (서열 54)를 포함하고;
- [0061] LCDR3은 아미노산 서열 X₄X₅YX₆GYPLT (서열 89) (여기서, X₄는 I 또는 Q이고, X₅는 Q 또는 V이고, X₆은 S 또는 R이다)를 포함하고;
- [0062] HCDR1은 아미노산 서열 GYTFTDYYMH (서열 65)를 포함하고;
- [0063] HCDR2는 아미노산 서열 RVNPX₁₀RX₁₁X₁₂TTYNQKFEG (서열 92) (여기서, X₁₀은 N 또는 Y이고, X₁₁은 G 또는 R이고, X₁₂는 G 또는 S이다)를 포함하고;
- [0064] HCDR3은 아미노산 서열 X₁₃NX₁₄LDY (서열 93) (여기서, X₁₃은 T 또는 A이고, X₁₄는 W 또는 I이다)를 포함한다.
- [0065] 인간 c-Met에 결합하는 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 3개의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 및 3개의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR)을 포함하고,
- [0066] 여기서 상기 3개의 LCDR 및 상기 3개의 HCDR은
- [0067] a) 아미노산 서열 SVSSSISSTNLH (서열 49)를 포함하는 LCDR1;
- [0068] 아미노산 서열 GTSYLAS (서열 50)를 포함하는 LCDR2;
- [0069] 아미노산 서열 QQWSSYPYS (서열 51)를 포함하는 LCDR3;
- [0070] 아미노산 서열 GYTFTSRYIH (서열 59)를 포함하는 HCDR1;

- [0071] 아미노산 서열 IYPVTGDTYYNEKFKG (서열 60) 를 포함하는 HCDR2; 및
- [0072] 아미노산 서열 GYGAFYY (서열 61) 를 포함하는 HCDR3;
- [0073] b) 아미노산 서열 SVSSSISSTNLH (서열 49) 를 포함하는 LCDR1;
- [0074] 아미노산 서열 GTSYLAS (서열 50) 를 포함하는 LCDR2;
- [0075] 아미노산 서열 QQWSSYPYS (서열 51) 를 포함하는 LCDR3;
- [0076] 아미노산 서열 GYTFTSRYIH (서열 59) 를 포함하는 HCDR1;
- [0077] 아미노산 서열 WIYPVTGDTYYIEKFKG (서열 62) 를 포함하는 HCDR2; 및
- [0078] 아미노산 서열 GYGAFFY (서열 63) 를 포함하는 HCDR3;
- [0079] c) 아미노산 서열 SVSSSISSTNLH (서열 49) 를 포함하는 LCDR1;
- [0080] 아미노산 서열 GTSRLRS (서열 52) 를 포함하는 LCDR2;
- [0081] 아미노산 서열 QQWSSYPYS (서열 51) 를 포함하는 LCDR3;
- [0082] 아미노산 서열 GYTFTSRYIH (서열 59) 를 포함하는 HCDR1;
- [0083] 아미노산 서열 WIYPVTGDTYYREPFKG (서열 64) 를 포함하는 HCDR2, 및
- [0084] 아미노산 서열 GYGAFYY (서열 61) 를 포함하는 HCDR3;
- [0085] d) 아미노산 서열 SVSSSVSSIYLN (서열 53) 를 포함하는 LCDR1;
- [0086] 아미노산 서열 STSNLAS (서열 54) 를 포함하는 LCDR2;
- [0087] 아미노산 서열 IQYSGYPLT (서열 55) 를 포함하는 LCDR3;
- [0088] 아미노산 서열 GYTFTDYYMH (서열 65) 를 포함하는 HCDR1;
- [0089] 아미노산 서열 RVNPNRGGTTYNQKFEG (서열 66) 를 포함하는 HCDR2, 및
- [0090] 아미노산 서열 TNWLDY (서열 67) 를 포함하는 HCDR3;
- [0091] e) 아미노산 서열 SVSSSVSSIYLN (서열 53) 를 포함하는 LCDR1;
- [0092] 아미노산 서열 STSNLAS (서열 54) 를 포함하는 LCDR2;
- [0093] 아미노산 서열 QVYSGYPLT (서열 56) 를 포함하는 LCDR3;
- [0094] 아미노산 서열 GYTFTDYYMH (서열 65) 를 포함하는 HCDR1;
- [0095] 아미노산 서열 RVNPNRGGTTYNQKFEG (서열 68) 를 포함하는 HCDR2; 및
- [0096] 아미노산 서열 ANWLDY (서열 69) 를 포함하는 HCDR3; 및
- [0097] f) 아미노산 서열 SVSSSVRSIYLN (서열 57) 를 포함하는 LCDR1;
- [0098] 아미노산 서열 STSNLAS (서열 54) 를 포함하는 LCDR2;
- [0099] 아미노산 서열 QVYRGYPLT (서열 58) 를 포함하는 LCDR3;

- [0100] 아미노산 서열 GYTFTDYYMH (서열 65) 를 포함하는 HCDR1;
- [0101] 아미노산 서열 RVNPYRGSTTYNQKFEG (서열 70) 를 포함하는 HCDR2; 및
- [0102] 아미노산 서열 ANILDY (서열 71) 를 포함하는 HCDR3
- [0103] 으로 이루어지는 군 중에서 선택되고;
- [0104] 상기 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 상기 인간 c-Met 의 α-사슬 내의 에피토프에 결합하고 세포 표면 인간 c-Met 의 내재화를 유도한다.
- [0105] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 3개의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 및 3개의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR)을 포함하고, 여기서 상기 3개의 LCDR 및 상기 3개의 HCDR은
- [0106] a) 아미노산 서열 SVSSSISSTNLH (서열 49) 를 포함하는 LCDR1;
- [0107] 아미노산 서열 GTSYLAS (서열 50) 를 포함하는 LCDR2;
- [0108] 아미노산 서열 QQWSSYPYS (서열 51) 를 포함하는 LCDR3;
- [0109] 아미노산 서열 GYTFTSRYIH (서열 59) 를 포함하는 HCDR1;
- [0110] 아미노산 서열 WIYPVTGDTYYNEKFKG (서열 60) 를 포함하는 HCDR2; 및
- [0111] 아미노산 서열 GYGAFYY (서열 61) 를 포함하는 HCDR3;
- [0112] b) 아미노산 서열 SVSSSISSTNLH (서열 49) 를 포함하는 LCDR1;
- [0113] 아미노산 서열 GTSYLAS (서열 50) 를 포함하는 LCDR2;
- [0114] 아미노산 서열 QQWSSYPYS (서열 51) 를 포함하는 LCDR3;
- [0115] 아미노산 서열 GYTFTSRYIH (서열 59) 를 포함하는 HCDR1;
- [0116] 아미노산 서열 WIYPVTGDTYYIEKFKG (서열 62) 를 포함하는 HCDR2; 및
- [0117] 아미노산 서열 GYGAFFY (서열 63) 를 포함하는 HCDR3;
- [0118] c) 아미노산 서열 SVSSSISSTNLH (서열 49) 를 포함하는 LCDR1;
- [0119] 아미노산 서열 GTSRLRS (서열 52) 를 포함하는 LCDR2;
- [0120] 아미노산 서열 QQWSSYPYS (서열 51) 를 포함하는 LCDR3;
- [0121] 아미노산 서열 GYTFTSRYIH (서열 59) 를 포함하는 HCDR1;
- [0122] 아미노산 서열 WIYPVTGDTYYREPKG (서열 64) 를 포함하는 HCDR2; 및
- [0123] 아미노산 서열 GYGAFYY (서열 61) 를 포함하는 HCDR3
- [0124] 으로 이루어지는 군 중에서 선택된다.
- [0125] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 3개의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 및 3개의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR)을 포함하고, 여기서 상기 3개의 LCDR 및 상기 3개의 HCDR은
- [0126] a) 아미노산 서열 SVSSSVSSIYLH (서열 53) 를 포함하는 LCDR1;
- [0127] 아미노산 서열 STSNLAS (서열 54) 를 포함하는 LCDR2;

- [0128] 아미노산 서열 IQYSGYPLT (서열 55) 를 포함하는 LCDR3;
- [0129] 아미노산 서열 GYTFTDYYMH (서열 65) 를 포함하는 HCDR1;
- [0130] 아미노산 서열 RVNPNRGGTTYNQKFEG (서열 66) 를 포함하는 HCDR2; 및
- [0131] 아미노산 서열 TNWLDY (서열 67) 를 포함하는 HCDR3;
- [0132] b) 아미노산 서열 SVSSSVSSIYLH (서열 53) 를 포함하는 LCDR1;
- [0133] 아미노산 서열 STSNLAS (서열 54) 를 포함하는 LCDR2;
- [0134] 아미노산 서열 QVYSGYPLT (서열 56) 를 포함하는 LCDR3;
- [0135] 아미노산 서열 GYTFTDYYMH (서열 65) 를 포함하는 HCDR1;
- [0136] 아미노산 서열 RVNPNRGGTTYNQKFEG (서열 68) 를 포함하는 HCDR2; 및
- [0137] 아미노산 서열 ANWLDY (서열 69) 를 포함하는 HCDR3; 및
- [0138] c) 아미노산 서열 SVSSSVRSIYLH (서열 57) 를 포함하는 LCDR1;
- [0139] 아미노산 서열 STSNLAS (서열 54) 를 포함하는 LCDR2;
- [0140] 아미노산 서열 QVYRGYPPLT (서열 58) 를 포함하는 LCDR3;
- [0141] 아미노산 서열 GYTFTDYYMH (서열 65) 를 포함하는 HCDR1;
- [0142] 아미노산 서열 RVNPYRGSTTYNQKFEG (서열 70) 를 포함하는 HCDR2; 및
- [0143] 아미노산 서열 ANILDY (서열 71) 를 포함하는 HCDR3
- [0144] 으로 이루어지는 군 중에서 선택된다.
- [0145] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 3개의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 및 3개의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR)을 포함하고, 여기서
- [0146] LCDR1은 아미노산 서열 SVSSSVSSIYLH (서열 53) 를 포함하고;
- [0147] LCDR2는 아미노산 서열 STSNLAS (서열 54) 를 포함하고;
- [0148] LCDR3은 아미노산 서열 IQYSGYPLT (서열 55) 를 포함하고;
- [0149] HCDR1은 아미노산 서열 GYTFTDYYMH (서열 65) 를 포함하고;
- [0150] HCDR2는 아미노산 서열 RVNPNRGGTTYNQKFEG (서열 66) 를 포함하고;
- [0151] HCDR3은 아미노산 서열 TNWLDY (서열 67) 를 포함한다.
- [0152] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 3개의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR) 및 3개의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR)을 포함하고, 여기서
- [0153] LCDR1은 아미노산 서열 SVSSSVSSIYLH (서열 53) 를 포함하고;
- [0154] LCDR2는 아미노산 서열 STSNLAS (서열 54) 를 포함하고;
- [0155] LCDR3은 아미노산 서열 QVYSGYPLT (서열 56) 를 포함하고;

- [0156] HCDR1은 아미노산 서열 GYTFTDYYMH(서열 65)를 포함하고;
- [0157] HCDR2는 아미노산 서열 RVNPNNRRGTTYNQKFEG(서열 68)를 포함하고;
- [0158] HCDR3은 아미노산 서열 ANWLDY(서열 69)를 포함한다.
- [0159] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 경쇄 가변 영역 (LCVR) 및 중쇄 가변 영역 (HCVR)을 포함하고, 여기서 상기 LCVR 및 상기 HCVR는 각각
- [0160] a) 서열 94 및 서열 96; 및
 - [0161] b) 서열 95 및 서열 97
- [0162]로 이루어지는 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하고,
- [0163]상기 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 상기 인간 c-Met의 α-사슬 내의 에피토프에 결합하고 세포 표면 인간 c-Met의 내재화를 유도한다.
- [0164]상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 경쇄 가변 영역 (LCVR) 및 중쇄 가변 영역 (HCVR)을 포함하고, 여기서 상기 LCVR은 서열 94를 포함하고, 상기 HCVR은 서열 96을 포함한다.
- [0165]상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 경쇄 가변 영역 (LCVR) 및 중쇄 가변 영역 (HCVR)을 포함하고, 여기서 상기 LCVR은 서열 95를 포함하고, 상기 HCVR은 서열 97을 포함한다.
- [0166]상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나에서, 상기 LCVR 및 상기 HCVR은 다음으로 이루어지는 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다:
- [0167] a) LCVR은 서열 1이고 HCVR은 서열 13이고;
 - [0168] b) LCVR은 서열 2이고 HCVR은 서열 14이고;
 - [0169] c) LCVR은 서열 3이고 HCVR은 서열 15이고;
 - [0170] d) LCVR은 서열 4이고 HCVR은 서열 16이고;
 - [0171] e) LCVR은 서열 5이고 HCVR은 서열 17이고;
 - [0172] f) LCVR은 서열 6이고 HCVR은 서열 18이다.
- [0173]상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나에서, 상기 LCVR 및 상기 HCVR은 각각 다음으로 이루어지는 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다:
- [0174] a) LCVR은 서열 1이고 HCVR은 서열 13이고;
 - [0175] b) LCVR은 서열 2이고 HCVR은 서열 14이고;
 - [0176] c) LCVR은 서열 3이고 HCVR은 서열 15이다.
- [0177]상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나에서, 상기 LCVR 및 상기 HCVR은 각각 다음으로 이루어지는 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다:
- [0178] a) LCVR은 서열 4이고 HCVR은 서열 16이고;
 - [0179] b) LCVR은 서열 5이고 HCVR은 서열 17이고;
 - [0180] c) LCVR은 서열 6이고 HCVR은 서열 18이다.
- [0181]상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나에서, 상기 LCVR은 서열 4의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 HCVR은 서열 16의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0182]상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나에서, 상기 LCVR은 서열 5의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 HCVR은 서열 17의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0183]상기한 모노클로날 항체 중의 임의의 하나에서, 상기 항체는 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄 및 중쇄는 다음으로 이루어지는 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다:

[0184] a) 경쇄는 서열 25이고 중쇄는 서열 37이고;

[0185] b) 경쇄는 서열 26이고 중쇄는 서열 38이고;

[0186] c) 경쇄는 서열 27이고 중쇄는 서열 39이고;

[0187] d) 경쇄는 서열 28이고 중쇄는 서열 40이고;

[0188] e) 경쇄는 서열 29이고 중쇄는 서열 41이고;

[0189] f) 경쇄는 서열 30이고 중쇄는 서열 42이다.

[0190] 상기한 모노클로날 항체 중의 임의의 하나에서, 상기 항체는 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄 및 중쇄는 다음으로 이루어지는 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다:

[0191] a) 경쇄는 서열 25이고 중쇄는 서열 37이고;

[0192] b) 경쇄는 서열 26이고 중쇄는 서열 38이고;

[0193] c) 경쇄는 서열 27이고 중쇄는 서열 39이다.

[0194] 상기한 모노클로날 항체 중의 임의의 하나에서, 상기 항체는 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄 및 중쇄는 다음으로 이루어지는 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다:

[0195] a) 경쇄는 서열 28이고 중쇄는 서열 40이고;

[0196] b) 경쇄는 서열 29이고 중쇄는 서열 41이고;

[0197] c) 경쇄는 서열 30이고 중쇄는 서열 42이다.

[0198] 상기한 모노클로날 항체 중의 임의의 하나에서, 상기 경쇄는 서열 28의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열 40의 아미노산 서열을 포함한다.

[0199] 상기한 모노클로날 항체 중의 임의의 하나에서, 상기 경쇄는 서열 29의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열 41의 아미노산 서열을 포함한다.

[0200] 상기한 모노클로날 항체 중의 임의의 하나에서, 상기 항체는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 포함하고, 여기서 각각의 경쇄는 서열 28의 아미노산 서열을 포함하고, 각각의 중쇄는 서열 40의 아미노산 서열을 포함한다.

[0201] 상기한 모노클로날 항체 중의 임의의 하나에서, 상기 항체는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 포함하고, 여기서 각각의 경쇄는 서열 29의 아미노산 서열을 포함하고, 각각의 중쇄는 서열 41의 아미노산 서열을 포함한다.

[0202] 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 c-Met에 대한 결합을 위해 임의의 상기한 c-Met 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 경쟁한다. 그러한 경쟁하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 상기한 c-Met 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나와 c-Met의 동일한 에피토프에 결합할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체와 경쟁하고, 여기서 경쇄는 서열 28의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 40의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체와 경쟁하고, 여기서 경쇄는 서열 29의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 41의 아미노산 서열을 포함한다.

[0203] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 인간 c-Met를 구성적으로 과다발현하는 간세포 성장 인자-비의존적 종양 세포에서 총 인간 c-Met 및 인산화된 인간 c-Met의 감소를 유도한다. 바람직한 실시양태에서, 인간 c-Met를 구성적으로 과다발현하는 간세포 성장 인자-비의존적 종양 세포에서 총 인간 c-Met 및 인산화된 인간 c-Met의 감소를 유도하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 28의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 40의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 인간 c-Met를 구성적으로 과다발현하는 간세포 성장 인자-비의존적 종양 세포에서 총 인간 c-Met 및 인산화된 인간 c-Met의 감소를 유도하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 29의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 41의 아미노산 서열을 포함한다.

[0204] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 인간 c-Met를 구성적으로 인산화하는 간세포 성장 인자-비의존적 종양 세포에서 총 인간 c-Met 및 인산화된 인간 c-Met의 감소를 유도한다. 바람직한

실시양태에서, 인간 c-Met를 구성적으로 인산화하는 간세포 성장 인자-비의존적 종양 세포에서 총 인간 c-Met 및 인산화된 인간 c-Met의 감소를 유도하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 28의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 40의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 인간 c-Met를 구성적으로 인산화하는 간세포 성장 인자-비의존적 종양 세포에서 총 인간 c-Met 및 인산화된 인간 c-Met의 감소를 유도하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 29의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 41의 아미노산 서열을 포함한다.

- [0205] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 간세포 성장 인자-반응성인 간세포 성장 인자-비의존적 종양 세포에서 총 인간 c-Met 및 인산화된 인간 c-Met의 감소를 유도한다.
- [0206] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 인간 RON 세포와 도메인 또는 인간 PlexinA2 세포와 도메인에 비해 인간 c-Met 세포와 도메인에 우선적으로 결합한다.
- [0207] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 인간 c-Met 세포와 도메인의 탈락을 유도하지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 인간 c-Met 세포와 도메인의 탈락을 유도하지 않는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 28의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 40의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 인간 c-Met 세포와 도메인의 탈락을 유도하지 않는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 29의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 41의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0208] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 인간 c-Met를 발현하는 종양 세포를 스타우로스포린-유도된 아폽토시스로부터 보호하지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 인간 c-Met를 발현하는 종양 세포를 스타우로스포린-유도된 아폽토시스로부터 보호하지 않는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 28의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 40의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 인간 c-Met를 발현하는 종양 세포를 스타우로스포린-유도된 아폽토시스로부터 보호하지 않는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 29의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 41의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0209] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 인간 c-Met를 발현하는 종양 세포의 간세포 성장 인자-의존적 및 간세포 성장 인자-비의존적 증식을 억제한다.
- [0210] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 인간 c-Met에 대한 인간 간세포 성장 인자의 결합을 억제한다.
- [0211] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 HGF-유사 생물학적 효능제 활성을 유도하지 않는다. HGF-유사 생물학적 효능제 활성을 종양 세포 증식, 종양 세포 운동성, 종양 세포 침습, 관강형성, 혈관신생, 및 항-아폽토시스 효과를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, HGF-유사 생물학적 효능제 활성을 유도하지 않는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 29의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 41의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0212] 제약 조성물은 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나, 및 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.
- [0213] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 요법에 사용된다. 바람직한 실시양태에서, 요법에 사용하기 위한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 28의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 40의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 요법에 사용하기 위한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 29의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 41의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0214] 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 인간에서 암을 치료하는데 사용된다. 바람직한 실시양태에서, 인간에서 암을 치료하는데 사용하기 위한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 28의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 40의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 인간에서 암을 치료하는데 사용하기 위한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 29의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 41의 아미노산 서열을 포함한다.

- [0215] 인간에서 암을 치료하는데 사용하기 위한 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나는 다른 치료제와 조합된다. 바람직한 실시양태에서, 다른 치료제와 조합되는, 인간에서 암을 치료하는데 사용하기 위한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 28의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 40의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 다른 치료제와 조합되는, 인간에서 암을 치료하는데 사용하기 위한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 서열 29의 아미노산 서열을 포함하고, 중쇄는 서열 41의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0216] 제약 조성물은 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나, 및 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.
- [0217] 인간에서 암 치료용 의약의 제조를 위한, 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나의 용도를 제공한다.
- [0218] 그를 필요로 하는 인간 환자에게 유효량의 상기한 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편 중의 임의의 하나를 투여하는 암의 치료 방법을 제공한다.
- [0219] **정의**
- [0220] 전장 항체는 자연에서 존재하는 것과 같이, 디슬퍼드 결합에 의해 상호연결된 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 면역글로불린 분자이다. 각각의 사슬의 아미노 말단 부분은 그 내부에 포함된 상보성 결정 영역 (CDR)을 통한 항원 인식을 주로 담당하는 약 100-110개 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 각각의 사슬의 카르복시-말단 부분은 효과기 기능을 주로 담당하는 불변 영역을 규정한다.
- [0221] CDR 사이에는 프레임워크 영역 ("FR")으로 불리는 보다 보존된 영역이 배치되어 있다. 각각의 경쇄 가변 영역 (LCVR) 및 중쇄 가변 영역 (HCVR)은 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 다음 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 경쇄의 3개의 CDR은 "LCDR1, LCDR2 및 LCDR3"으로서 칭해지고, 중쇄의 3개의 CDR은 "HCDR1, HCDR2 및 HCDR3"으로서 칭해진다. CDR은 항원과 특이적 상호작용을 형성하는 대부분의 잔기를 함유한다. LCVR 및 HCVR 영역 내의 CDR 아미노산 잔기의 넘버링 및 위치 결정은 공지된 Kabat 넘버링 협약에 따라 실시된다.
- [0222] 경쇄는 카파 또는 람다로서 분류되고, 당업계에 공지된 특정 불변 영역에 의해 특성화된다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 엡실론으로서 분류되고, 항체의 이소형을 각각 IgG, IgM, IgA, IgD, 또는 IgE로 규정한다. IgG 항체는 추가로 하위클래스, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4로 구분된다. 각각의 중쇄 종류는 당업계에 잘 공지된 서열을 갖는 특정 불변 영역에 의해 특성화된다.
- [0223] 본원에서 사용될 때, 본 발명의 항체 화합물에 적용되는 용어 "모노클로날 항체" (Mab)는 그에 의해 항체가 생성되는 방법이 아니라, 예를 들어, 임의의 진핵, 원핵, 또는 파지 클론을 비롯하여 단일 카파 또는 클론으로부터 유도되는 항체를 의미한다. 본 발명의 Mab는 바람직하게는 균질한 또는 실질적으로 균질한 집단에 존재한다. 완전한 Mab는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함한다. 상기 모노클로날 항체의 "항원-결합 단편"은 예를 들어 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, 단일쇄 Fv 단편, 및 경쇄 및 중쇄를 포함하는 외팔이 (one-armed) 항체를 포함한다. 본 발명의 모노클로날 항체 및 그의 항원-결합 단편은 예를 들어 재조합 기술, 파지 디스플레이 기술, 합성 기술, 예를 들어 CDR-그라프팅, 또는 상기 기술의 조합, 또는 당업계에 공지된 다른 기술에 의해 생산될 수 있다.
- [0224] "항체 화합물"은 본원에 개시된 Mab 및 Fab를 의미한다. 본 발명에 따른 유사한 기능적 특성을 보이는 추가의 항체 화합물은 통상적인 방법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 마우스는 인간 c-Met 또는 그의 단편으로 면역화될 수 있고, 생성되는 항체는 회수되어 정제될 수 있고, 항체가 본원에 개시된 항체 화합물과 유사하거나 동일한 결합 및 기능적 특성을 갖는지의 여부는 하기 실시예 2-19에 개시된 방법에 의해 평가될 수 있다. 항원-결합 단편도 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 항체 및 항원-결합 단편의 생산 및 정제 방법은 당업계에 잘 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, chapters 5-8 and 15, ISBN 0- 87969-314-2]에서 볼 수 있다.
- [0225] 어구 "인간 조작된 항체"는 본원에 개시된 것과 유사한, 본 발명에 따른 결합 및 기능적 특성을 갖고 비-인간 항체로부터 유도된 CDR 주위의 실질적으로 인간 또는 완전 인간 프레임워크 영역을 갖는, 본원에 개시된 항체

화합물 이외의 모노클로날 항체 및 항원-결합 단편을 의미한다. "프레임워크 영역" 또는 "프레임워크 서열"은 프레임워크 영역 1 내지 4 중의 임의의 하나를 의미한다. 본 발명에 포함되는 인간 조작된 항체 및 항원-결합 단편은 프레임워크 영역 1 내지 4 중의 임의의 하나 이상이 실질적으로 또는 완전 인간 영역인, 즉, 개개의 실질적인 인간 또는 완전 인간 프레임워크 영역 1 내지 4의 임의의 가능한 조합이 존재하는 분자를 포함한다. 예를 들어, 이것은 프레임워크 영역 1 및 프레임워크 영역 2, 프레임워크 영역 1 및 프레임워크 영역 3, 프레임워크 영역 1, 2, 및 3 등이 실질적인 인간 또는 완전 인간 영역인 분자를 포함한다. 실질적인 인간 프레임워크는 공지의 인간 생식계열 (germline) 프레임워크 서열에 적어도 약 80%의 서열 동일성을 갖는 것이다. 바람직하게는, 실질적으로 인간 프레임워크는 공지의 인간 생식계열 프레임워크 서열에 적어도 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 99%의 서열 동일성을 갖는다.

[0226] 완전 인간 프레임워크는 공지의 인간 생식계열 프레임워크 서열에 동일한 것이다. 인간 프레임워크 생식계열 서열은 그의 웹사이트 <http://imgt.cines.fr>를 통해 ImMunoGeneTics (IMGT)로부터, 또는 문헌 [The Immunoglobulin FactsBook by Marie-Paule Lefranc and Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351]으로부터 입수할 수 있다. 예를 들어, 생식계열 경쇄 프레임워크는 A11, A17, A18, A19, A20, A27, A30, L1, L11, L12, L2, L5, L15, L6, L8, 012, 02, 및 08로 이루어지는 군 중에서 선택될 수 있고, 생식계열 경쇄 프레임워크 영역은 VH2-5, VH2-26, VH2-70, VH3-20, VH3-72, VHI-46, VH3-9, VH3-66, VH3-74, VH4-31, VHI-18, VHI-69, VI-13-7, VH3-11, VH3-15, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-48, VH4-39, VH4-59, 및 VH5-51로 이루어지는 군 중에서 선택될 수 있다.

[0227] 본원에 개시된 것에 추가로, 본 발명에 따른 유사한 기능적 특성을 보이는 인간 조작된 항체가 몇몇 상이한 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 한 방법에서, 모 항체 화합물을 CDR은 모 항체 화합물 프레임워크와 높은 서열 동일성을 갖는 인간 프레임워크 내로 그라프팅된다. 새로운 프레임워크의 서열 동일성은 일반적으로 모 항체 화합물 내의 상응하는 프레임워크의 서열에 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99% 동일할 것이다. 100개 미만의 아미노산 잔기를 갖는 프레임워크 영역의 경우에, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 잔기가 변경될 수 있다. 상기 그라프팅은 모 항체에 비해 결합 친화도를 감소시킬 수 있다. 이 경우에, 프레임워크는 문헌 [Queen et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2869]에 개시된 특정 기준을 기초로 하여 특정 위치에서 모 프레임워크로 복귀-돌연변이될 수 있다. 마우스 항체의 인간화에 유용한 방법을 설명하고 있는 추가의 참고문헌은 미국 특허 4,816,397; 5,225,539 및 5,693,761; 문헌 [Levitt (1983) J. Mol. Biol. 168:595-620]에 기재된 컴퓨터 프로그램 ABMOD 및 ENCAD; 및 원터 (Winter) 등의 방법 [Jones et al. (1986) Nature 321:522-525]; [Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327]; 및 [Verhoeven et al. (1988) Science 239: 1534-1536]을 포함한다.

[0228] 복귀-돌연변이를 위해 고려되는 잔기의 확인은 다음과 같이 수행될 수 있다.

[0229] 아미노산이 다음 범주에 속할 때, 사용되고 있는 인간 생식계열 서열의 프레임워크 아미노산 ("수용자 프레임워크")은 모 항체 화합물의 프레임워크 영역으로부터의 프레임워크 아미노산 ("공여자 프레임워크")에 의해 치환된다:

[0230] (a) 수용자 프레임워크의 인간 프레임워크 영역 내의 아미노산은 그 위치에서 인간 프레임워크에 대해 보기 드문 것인 반면, 공여자 면역글로불린 내의 상응하는 아미노산은 그 위치에서 인간 프레임워크에 대해 전형적인 것이거나;

[0231] (b) 아미노산의 위치는 CDR 중의 하나에 바로 인접하거나;

[0232] (c) 프레임워크 아미노산의 임의의 측체 원자는 3차원 면역글로불린 모델에서 CDR 아미노산의 임의의 원자의 약 5-6 옹스트롬 (중심 대 중심) 내에 존재한다.

[0233] 수용자 프레임워크의 인간 프레임워크 영역 내의 각각의 아미노산 및 공여자 프레임워크 내의 상응하는 아미노산이 일반적으로 그 위치에서 인간 프레임워크에 대해 보기 드문 것일 때, 상기 아미노산은 그 위치에서 인간 프레임워크에 대해 전형적인 아미노산에 의해 치환될 수 있다. 상기 복귀-돌연변이 기준을 통해, 모 항체 화합물의 활성을 회복시킬 수 있다.

[0234] 본원에 개시된 항체 화합물에 유사한 기능적 특성을 보이는 인간 조작된 항체를 생성하는 다른 방법은 프레임워크를 변경하지 않으면서 그라프팅된 CDR 내의 아미노산을 무작위로 돌연변이시키고, 생성된 분자를 모 항체 화합물의 것만큼 양호하거나 그보다 더 양호한 결합 친화도 및 다른 기능적 특성에 대해 스크리닝하는 것을 포함한다. 또한, 단일 돌연변이를 각각의 CDR 내의 각각의 아미노산 위치에 도입한 후, 결합 친화도 및 다른 기능

적 특성에 대한 상기 돌연변이의 효과를 평가할 수 있다. 서로 조합될 때 그들의 효과를 평가하기 위해 개선된 특성을 생성시키는 단일 돌연변이를 조합할 수 있다.

[0235] 또한, 상기한 두 방법의 조합도 가능하다. CDR 그라프팅 후에, 아미노산 변화를 CDR에 도입한 것에 추가로 특정 프레임워크 영역을 복귀-돌연변이시킬 수 있다. 상기 방법은 문헌 [Wu et al. (1999) J. Mol. Biol. 294: 151-162]에 기재되어 있다.

[0236] 본 발명의 교시내용을 적용하여, 당업자는 통상적인 기술, 예를 들어, 부위 지정 돌연변이 유발을 사용하여 본원에 개시된 CDR 및 프레임워크 서열 내의 아미노산을 치환하고, 이에 의해 본 발명의 서열로부터 유도된 추가의 가변 영역 아미노산 서열을 생성할 수 있다. 모든 천연 생성 아미노산이 특정 치환 부위에 도입될 수 있다. 이어서, 본원에 개시된 방법을 사용하여, 지시된 생체내 기능을 갖는 서열을 확인하기 위해 이들 추가의 가변 영역 아미노산 서열을 스크리닝할 수 있다. 이러한 방식으로, 본 발명에 따른 인간 조작된 항체 및 그의 항원-결합 부분의 제조에 적합한 추가의 서열을 확인할 수 있다. 바람직하게는, 프레임워크 내의 아미노산 치환은 본원에 개시된 4개의 경쇄 및/또는 중쇄 프레임워크 영역 중의 임의의 하나 이상 내의 1, 2 또는 3개의 위치로 제한된다. 바람직하게는, CDR 내의 아미노산 치환은 3개의 경쇄 및/또는 중쇄 CDR 중의 임의의 하나 이상 내의 1, 2 또는 3개의 위치로 제한된다. 상기한 이들 프레임워크 영역 및 CDR의 다양한 변화의 조합도 가능하다.

[0237] 상기 논의된 아미노산 변형을 도입함으로써 생성된 항체 화합물의 기능적 특성이 본원에 개시된 특정 분자에 의해 제시되는 것과 일치하는지의 여부는 하기 실시예 2-19에 개시된 방법에 의해 확인될 수 있다.

[0238] 용어 "에피토프"는 항체 또는 항체 단편이 그에 대해 결합하는 웨티드 또는 단백질 상에 위치하는 아미노산의 특이적인 배열을 의미한다. 에피토프는 종종 분자, 예를 들어 아미노산 또는 당 측쇄의 화학적으로 활성인 표면기로 구성되고, 특이적 3차원 구조적 특징 및 특이적 전하 특징을 갖는다. 에피토프는 선형일 수 있거나 (즉, 아미노산의 단일 서열에 대한 결합을 수반), 또는 입체형태적일 수 있다 (즉, 반드시 연속적일 필요는 없는 항원의 다양한 영역 내의 아미노산의 2 이상의 서열에 대한 결합을 수반). 본원에 개시된 에피토프는 실시예 3에 개시된 아미노산 서열로 구성되거나, 본질적으로 이로 구성되거나 이를 포함할 수 있다.

[0239] 본원에 개시된 분자와 "경쟁하는" 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 본 발명의 분자가 결합하는 부위(들)과 동일하거나 겹치는 부위(들)에서 인간 c-Met에 결합하는 것이다. 경쟁하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 예를 들어 항체 경쟁 분석을 통해 확인될 수 있다. 예를 들어, 정제된 또는 부분적으로 정제된 인간 c-Met의 샘플은 고체 지지체에 결합될 수 있다. 이어서, 본 발명의 항체 화합물 또는 그의 항원 결합 단편, 및 상기 상기 본 발명의 항체 화합물과 경쟁할 수 있는 것으로 의심되는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 첨가한다. 2개의 분자 중 하나가 표지된다. 표지된 화합물 및 표지되지 않은 화합물이 c-Met 상의 별개의 분리된 부위에 결합하면, 표지된 화합물은 의심되는 경쟁하는 화합물의 존재 여부와 상관없이 동일한 수준으로 결합할 것이다. 그러나, 상호작용 부위가 동일하거나 겹치는 경우에, 표지되지 않은 화합물은 경쟁할 것이고, 항원에 결합된 표지된 화합물의 양은 저하될 것이다. 표지되지 않은 화합물이 과량으로 존재하면, 단지 매우 적은 표지된 화합물이 결합할 것이다. 본 발명의 목적을 위해, 경쟁하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 c-Met에 대한 본 발명의 항체 화합물의 결합을 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 99% 감소시키는 것이다. 상기 경쟁 분석을 수행하기 위한 절차에 대한 상세한 내용은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pages 567-569, ISBN 0-87969-314-2]에서 볼 수 있다. 상기 분석은 정제된 항체를 사용하여 정량적으로 수행될 수 있다. 하나의 항체를 그 자체에 대해 적정하여 표준 곡선을 확립한다. 즉, 동일한 항체가 표지 및 경쟁자 (competitor) 모두에 대해 사용된다. 플레이트에 대한 표지된 분자의 결합을 억제하는 표지되지 않은 경쟁하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 능력이 적정된다. 결과를 플로팅하고, 목적하는 결합 억제 정도의 달성을 필요한 농도를 비교한다. 상기 경쟁 분석에서 본 발명의 항체 화합물과 경쟁하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 본 발명의 항체 화합물과 동일하거나 유사한 기능적 특성을 갖는지의 여부는 하기 실시예 2-19에 개시된 방법을 통해 결정될 수 있다.

[0240] 본원에 개시된 모노클로날 항체 또는 항원-결합 단편과 실질적으로 동일한 c-Met의 에피토프(들)에 결합하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 본 발명의 분자가 결합하는 부위(들)과 겹치는 부위(들)에서 인간 c-Met에 결합하는 것이다. 본원에 개시된 c-Met 모노클로날 항체 또는 항원-결합 단편과 실질적으로 동일한 c-Met의 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 확인을 용이하게 하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 PCT 국제 특허 출원 공개 WO 00/64946에 기재되어 있다. 본원에 개시된 것과 실

질적으로 동일한 c-Met 에피토프(들)에 결합하는 상기 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 본 발명의 항체 화합물과 동일하거나 유사한 기능적 특성을 갖는지의 여부는 하기 실시예 2-19에 개시된 방법을 통해 결정될 수 있다.

[0241] "c-Met" 또는 "인간 c-Met"은 임의의 인간 c-Met, 및 그의 기능적 활성을 갖는 돌연변이된 형태를 의미한다. c-Met의 구조는 다음과 같이 도식적으로 표시된다:



[0242] SEMA: 세마 도메인

[0243] PSI: 플렉신, 세마포린, 및 인테그린 도메인

[0244] IPT: 4 면역글로불린, 플렉신, 및 전사 인자 도메인

[0245] TM: 막횡단 영역

[0246] JM: 막근접 도메인

[0247] KD: 키나제 도메인

[0248] 인간 c-Met ECD (서열 75)에서, 아미노산 1-24는 신호 서열을 포함한다. 성숙 단백질은 아미노산 25 (E)에서 시작한다. 세마 도메인은 c-Met의 N-말단에서 약 500개의 아미노산 잔기로 구성되고, α -사슬 (아미노산 잔기 25-307) 및 β -사슬의 일부 (아미노산 잔기 308-519)를 포함한다.

[0249] 용어 "억제하다"는 c-Met의 생물학적 효과를 실질적으로 길항, 방해, 억제, 제한, 자연, 붕괴, 제거, 정지, 감소 또는 역전시키는 능력을 의미한다.

[0250] 용어 "치료하는" (또는 "치료하다" 또는 "치료")는 증상, 질환, 병태, 또는 질병의 진행 또는 중증도의 자연, 저지, 중지, 억제, 정지, 감소 또는 역전을 의미하지만, 반드시 모든 질병-관련 증상, 병태, 또는 질환의 완전한 제거를 수반하지는 않는다.

[0251] 급성 사건 및 만성 병태가 치료될 수 있다. 급성 사건에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 증상, 질환, 병태, 또는 질병의 발병시에 투여되고, 급성 사건이 끝날 때 중단된다. 이와 반대로, 만성 증상, 질환, 병태 또는 질병은 보다 연장된 시간에 걸쳐 치료된다.

[0252] 용어 "유효량"은 환자에게 단일 또는 다중 투여량 투여시에 목적하는 치료 또는 예방 효과를 제공하는 본 발명의 항체 화합물의 양 또는 투여량을 의미한다. 본 발명의 항체 화합물의 치료 유효량은 단일 투여량당 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양을 포함할 수 있다. 임의의 개별적인 환자에 대한 치료 유효량은 생체마커, 예를 들어 종양 또는 비-종양 조직의 세포 표면 c-Met, 종양 퇴행 등에 대한 항체 화합물의 효과를 모니터링함으로써 의료종사자에 의해 결정될 수 있다. 상기 방법에 의해 얻은 데이터의 분석을 통해, 단독으로 또는 다른 치료제와 조합되어 사용되는 최적량의 항체 화합물이 투여되도록, 및 또한 치료 지속 기간을 결정할 수 있도록 치료 동안 치료 요법을 변경할 수 있다. 이러한 방식으로, 투여/치료 요법은 만족스러운 종양 감소 유효성을 보이는, 단독으로 또는 다른 치료제와 조합되어 사용되는 최소량의 항체 화합물이 투여되도록, 및 그러한 화합물의 투여가 환자를 성공적으로 치료하기 위해 필요한 기간 동안만 지속되도록 치료 과정에 걸쳐 변경될 수 있다.

[0253] 본 발명의 항체 화합물은 다양한 경로에 의해 투여되는 인간 의약에서 의약품으로서 사용될 수 있다. 가장 바람직하게는, 상기 조성물은 비경구 투여를 위한 것이다. 그러한 제약 조성물은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있고 (예를 들어, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th ed. (1995), A. Gennaro et al., Mack Publishing Co.] 참조), 본원에 개시된 하나 이상의 항체 화합물, 및 제약상 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함한다.

[0254] 용어 "종양"은 악성 또는 양성, 및 모든 전-암성 및 암성 세포 및 조직을 포함하는 모든 신생 세포의 성장 및 증식을 의미한다. 용어 "암", "암성", 및 "종양"은 본원에서 사용되는 바와 같이 상호 배타적인 의미가 아니다.

[0255] 용어 "암" 및 "암성"은 일반적으로 이상 세포 성장/증식이라는 특징을 갖는 포유동물의 생리학적 상태를 의미하

거나 설명하는 것이다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 및 백혈병을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0257] c-Met 및 암

탈조절된 c-Met 경로는 전사 상향조절, c-Met 유전자 증폭, 특이적 유전자 변형, 또는 리간드-의존적 자가분비 또는 주변분비 메카니즘에 의해 유도될 수 있다. 인간 종양에서 구성적 c-Met 활성화의 가장 빈번한 원인은 유전자 증폭의 부재 하에 전사 상향조절의 결과로서 증가된 단백질 발현이다. 또한, MET 유전자의 증폭은 그 결과인 단백질 과다발현 및 구성적 키나제 활성화와 함께 위 및 식도 암종, 비-소세포 폐 (NSCL) 암종 및 수질아세포종을 비롯한 많은 인간 1차 종양에서 보고되었다. 중간엽 기원의 종양, 예를 들어 골육종 및 횡문근육종은 HGF를 생산함으로써 종종 자가분비 메카니즘을 이용한다. 상승된 HGF 수준 및 c-Met의 과다발현은 종종 보다 공격적인 질병, 증가된 종양 전이, 및 단축된 환자 생존을 포함하는 불량한 임상 결과와 연관된다. 추가로, 종양에서 고수준의 HGF 및/또는 c-Met 단백질은 화학요법 및 방사선요법에 대한 내성을 부여한다. 비정상 HGF 및 c-Met 발현에 추가로, c-Met 경로는 유전자 교체, 예를 들어 c-Met 돌연변이, 유전자 증폭, 및 유전자 재배열을 통해 활성화될 수 있다. 미스센스 (missense) c-MET 돌연변이는 잘 특성화된 유전 유두상 신세포 암종 (PRCC)이 있는 모든 개체에서 및 산발적 PRCC 샘플의 작은 하위세트 (13%)에서 발견된다. 일부 돌연변이는 증가된 키나제 활성으로 인해 종양발생 잠재성을 가진다. HGF 및 c-MET 유전자가 모두 위치하는 염색체 7의 삼염색체 (trisomy)는 PRCC에서 빈번하게 발생하고, 돌연변이체 c-MET 대립유전자의 비-랜덤 중복을 일으킨다. 또한, 체세포 c-MET 돌연변이가 위, 두경부, 간, 난소, 비-소세포 폐 및 갑상선 암을 포함한 다른 인간 암 및 이를 암의 일부의 전이에서 확인되었다. PRCC와는 달리, 돌연변이가 일반적으로 키나제 도메인에 한정되는 경우에, 이들 돌연변이는 종종 수용체의 다른 영역, 예를 들어, 막근접 도메인에 위치한다. 돌연변이에 추가로, c-MET 유전자는 유방, 간, 뇌, 결장직장, 소화, 폐 및 위암에서 종종 증폭되고, 이는 일부 환자에서 질병 진행에 상호관련된다.

[0259] 치료 적용증

[0260] 이상 HGF/c-MET 신호전달은 방광, 유방, 자궁경부, 결장직장, 자궁내막, 식도, 위, 두경부, 신장, 간, 폐, 비인두, 난소, 췌장, 전립선 및 갑상선 암뿐만 아니라 담관암종, 골육종, 횡문근육종, 윤활막 육종, 카포시 (Kaposi) 육종, 평활근육종, 및 MFH/섬유육종을 포함한 광범위한 인간 악성종양에서 기록되었다. 추가로, 비정상 HGF 및/또는 c-Met 발현은 또한 혈액 악성종양, 예를 들어 급성 골수성 백혈병, 성인 T-세포 백혈병, 만성 골수양 백혈병, 림프종 및 다발 골수종뿐만 아니라 다른 종양, 예를 들어 흑색종, 중피종, 윌름스 (Wilms) 종양, 아교모세포종, 및 성상세포종에서 보고되었다 (문헌 [Liu et al. (2008) Expert Opin. Investig. Drugs 17(7):997-1011]에 요약됨). 본 발명의 c-Met 항체는 HGF-의존적 및 HGF-비의존적 종양을 모두 억제할 수 있다.

[0261] 다음 비-제한적인 실시예는 본 발명의 다양한 측면을 설명한다.

[0262] 아래 실시예에서, 인간화된 IgG2 및 IgG4 및 뮤린 IgG (또한 때때로 mIgG1) 대조 항체는 본 발명의 c-Met 항체에 비관련된 이소형 대조 항체이다. 항체 C8, D11 및 optD11은 뮤린 항체이다. 모든 경우에, 인간 HGF는 알엔디 시스템즈 (R&D Systems; #294)로부터 입수한다.

[0263] 실시예 1

[0264] c-Met 항체

[0265] 본 발명의 인간 조작된 항체의 상기한 경쇄 및 중쇄 가변 영역, 완전한 경쇄 및 중쇄, 및 각각의 코딩 뉴클레오티드 서열의 아미노산 서열을 아래에 "아미노산 및 뉴클레오티드 서열"로 명명한 섹션에 나열한다. 경쇄 및 중쇄 CDR 아미노산 서열을 각각 표 1 및 2에 제시한다.

표 1

경쇄 CDR			
항체	CDR 1	CDR 2	CDR 3
D11-S17Y	SVSSSISSTNLH (서열 49)	GTSYLAS (서열 50)	QQWSSYPYS (서열 51)
D11-8B8	SVSSSISSTNLH (서열 49)	GTSYLAS (서열 50)	QQWSSYPYS (서열 51)
D11-C27G3	SVSSSISSTNLH (서열 49)	GTSRLRS (서열 52)	QQWSSYPYS (서열 51)
D11 컨센서스 서열	--	GTSX ₁ LX ₂ S (서열 87)	--
C8-6	SVSSSVSSIYLH (서열 53)	STSNLAS (서열 54)	IQYSGYPLT (서열 55)
C8-H24I	SVSSSVSSIYLH (서열 53)	STSNLAS (서열 54)	QVYSGYPLT (서열 56)
C8-co-16	SVSSSVRSIYLH (서열 57)	STSNLAS (서열 54)	QVYRGYPLT (서열 58)
C8 컨센서스 서열	SVSSSVX ₃ SIYLH (서열 88)	--	X ₄ X ₅ YX ₆ GYPLT (서열 89)

X₁은 Y 또는 R이고, X₂는 A 또는 R이고;X₃은 S 또는 R이고;X₄는 I 또는 Q이고, X₅는 Q 또는 V이고, X₆은 S 또는 R이다.

[0266]

표 2

중쇄 CDR			
항체	CDR 1	CDR 2	CDR 3
D11-S17Y	GYTFTSRYIH (서열 59)	WIYPVTGDTYYNEKFKG (서열 60)	GYGAFYY (서열 61)
D11-8B8	GYTFTSRYIH (서열 59)	WIYPVTGDTYYIEKFKG (서열 62)	GYGAFFY (서열 63)
D11-C27G3	GYTFTSRYIH (서열 59)	WIYPVTGDTYYREPKFG (서열 64)	GYGAFYY (서열 61)
D11 컨센서스 서열	--	WIYPVTGDTYYX ₇ EX ₈ FKG (서열 90)	GYGAFX ₉ Y (서열 91)
C8-6	GYTFTDYYMH (서열 65)	RVNPNRGGTTYNQKFEG (서열 66)	TNWLDY (서열 67)
C8-H24I	GYTFTDYYMH (서열 65)	RVNPNRGTTYNQKFEG (서열 68)	ANWLDY (서열 69)
C8-co-16	GYTFTDYYMH (서열 65)	RVNPYRGSTTYNQKFEG (서열 70)	ANILDY (서열 71)
C8 컨센서스 서열	--	RVNPX ₁₀ RX ₁₁ X ₁₂ TTYNQKFEG (서열 92)	X ₁₃ NX ₁₄ LDY (서열 93)

X₇은 N, I 또는 R이고, X₈은 K 또는 P이고;X₉는 Y 또는 F이고;X₁₀은 N 또는 Y이고, X₁₁은 G 또는 R이고, X₁₂는 G 또는 S이고;X₁₃은 T 또는 A이고, X₁₄는 W 또는 I이다.

[0267]

D11-항체 및 C8-항체 경쇄 및 중쇄 가변 영역에 대한 컨센서스 서열은 하기와 같다:

D11-항체 경쇄 가변 영역 컨센서스 서열 (서열 94)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCSVSSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIY
GTSX₁LX₂SGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFG

QGTKLEIK

여기서, X₁은 Y 또는 R이고, X₂는 A 또는 R이다;

[0272] C8-항체 경쇄 가변 영역 컨센서스 서열 (서열 95)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCSVSSSVX;SIYLHWYQQKPGKAPKLLIY
 STSNLASGVPSRSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCX₄X₅YX₆GYPLTFG
 GGTKEIK

[0273]

[0274] 여기서, X₃은 S 또는 R이고, X₄는 I 또는 Q이고, X₅는 Q 또는 V이고, X₆은 S 또는 R이다;

[0275] D11-항체 중쇄 가변 영역 컨센서스 서열 (서열 96)

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFTSRYIHWRQAPGQGLEWMGW
 IYPVTGDTYYX₇EX₈FKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGY
 GAFX₉YWGQGTLTVS

[0276]

[0277] 여기서, X₇은 N, I 또는 R이고, X₈은 K 또는 P이고, X₉는 Y 또는 F이다;

[0278] C8-항체 중쇄 가변 영역 컨센서스 서열 (서열 97)

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWRQAPGQGLEWMGR
 VNPNX₁₀RX₁₁X₁₂TTYNQKFEGRVTMTDTSTSTAYMELRSRSDDTAVYYCARX₁₃
 NX₁₄LDYWQGQGTTVTVS

[0279]

[0280] 여기서, X₁₀은 Y 또는 N이고, X₁₁은 G 또는 R이고, X₁₂는 S 또는 G이고, X₁₃은 A 또는 T이고, X₁₄는 I 또는 W이다.

[0281]

항체를 표준 형질감염 절차를 이용하여 HEK293 EBNA 세포 (엣지 바이오시스템즈 (Edge BioSystems), #90500130) 내에서 일시적으로 발현시켰다. 형질감염된 세포를 형질감염 후에 37°C에서 게네티신 (G418) 및 토브라마이신을 함유하는 표준 무혈청 배지 내에서 48 내지 120시간 동안 배양하였다. 항체를 제조자의 지시에 따라 60 mL rProtein A 세파로스 컬럼 (애머샴 바이오사이언시스 (Amersham Biosciences), #17-1279-04) 상에서 정제하고, 이동상으로서 인산염 완충 염수 (PBS) (pH 7.4)를 사용하여 크기 배제 크로마토그래피 (XK50/60 Superdex200, 파마시아 (Pharmacia))에 의해 추가로 농축하고 정제하였다. 이어서, 항체를 Millev-GV, PVDF 막, 0.22 μm, 33 mm (밀리포어 (Millipore), # SLGV033RS)를 사용하여 여과하고 4 내지 8°C에서 저장하였다.

[0282]

[0282] 이하 많은 실시예에서 논의되는 뮤린 IgG1 c-Met 항체 5D5 (미국 특허 5,686,292)를 상기 설명한 바와 같이 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션 (American Type Culture Collection, 미국 베지니아주 매나사스)으로부터 입수한 하이브리도마 (hybridoma) HB-11895로부터 단리하고 정제하였다.

[0283]

실시예 2[0284] 다양한 c-Met 세포의 도메인에 대한 c-Met 항체의 결합 동력학

[0285]

인간, 사이노몰거스 (cynomolgus) 원숭이 및 래트 c-Met 서열의 세포외 도메인 (ECD)을 Fc의 C-말단 (서열 72-74)에서 flag- 및 His-태그 (tag) (Flis-태그)와의 Fc 융합 단백질로서 발현시켰다. 이들 c-Met ECD Fc 융합 단백질을 따로 HEK293 EBNA 세포 내에서 일시적으로 발현시키고 실시예 1에 기재된 바와 같이 정제하였다.

[0286]

비아코어 (Biacore)® 2000 기기를 사용하여 인간, 사이노몰거스 원숭이 및 래트 c-Met ECD에 대한 c-Met 항체의 결합 동력학을 측정하였다. 측정은 25°C에서 수행하였다. 샘플을 HBS-EP 버퍼 (150 mM 염화나트륨, 3 mM EDTA, 0.005% (w/v) 계면활성제 P-20, 및 10 mM N-2-히드록시에틸페라진-N'-2-에탄술폰산 (HEPES), pH 7.4; #BR-1001-88)에 용해시켰다. 염소 항 인간 IgG, F(ab')₂ 단편 특이적 (잭슨 이му노리서치 잉크. (Jackson Immunoresearch Inc.) #109-006-097)의 F(ab')₂ 단편을 항-c-Met 항체를 포획하기 위해 아민 커플링 화학을 이용하여 4000 반응 단위 (RU)의 수준에서 CM5 센서 칩의 유동 세포 1 내지 4 상에 고정시켰다.

[0287]

결합은 다수 사이클을 이용하여 평가한다. 각각의 사이클은 50 μl/min의 유속에서 수행하고, 다음 단계로 이루어진다: 40-100 RU의 포획을 목적으로 하는 10 μg/mL에서 약 10 μl의 c-Met 항체의 주사, 250 μl의 인간, 사이노몰거스 원숭이 또는 래트 c-Met-Flis-Fc ECD의 주사 (100 nM에서 출발하고, 각각의 사이클을 위해 2배 연속 회석을 이용하여), 이어서 분리를 위해 20 min, 및 약 30 μl의 10 mM 글라이신 염산염 (pH 1.5)을 사용한 재생. 각각의 사이클에 대한 회합 및 분리 속도는 BIAevaluation 소프트웨어 버전 4.1에서 "1:1 (랭무어 (Langmuir)) 결합" 모델을 이용하여 평가하였다. 래트 c-Met-Flis-Fc ECD에 대한 항체 D11-S17Y의 결합을 위해, 데이터를 적당하게 피팅 (fitting)하기 위해 비균질성 리간드 모델을 사용하고; 따라서, 2개의 결합 친화도를 얻었다.

[0288]

결과를 아래 표 3-5에 제시한다.

표 3

인간 c-Met-Flis-Fc ECD에 대한 c-Met 항체의 결합 동력학 및 친화도

항체	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
D11-8B8	$1.0 \pm 0.1 \times 10^5$	$0.5 \pm 0.2 \times 10^{-4}$	0.5 ± 0.2
D11-C27G3	$6.4 \pm 0.2 \times 10^4$	$0.9 \pm 0.2 \times 10^{-4}$	1.4 ± 0.3
D11-S17Y	$0.7 \pm 0.1 \times 10^5$	$2.8 \pm 0.1 \times 10^{-4}$	4.2 ± 0.9
C8-H241	$1.1 \pm 0.3 \times 10^5$	$<10^{-5}$	<0.1
C8-6	$1.6 \pm 0.4 \times 10^5$	$3 \pm 2 \times 10^{-4}$	4 ± 1
C8-co16	$1.1 \pm 0.2 \times 10^5$	$0.3 \pm 0.2 \times 10^{-4}$	0.3 ± 0.1

[0289]

표 4

사이노몰거스 원숭이 c-Met-Flis-Fc ECD에 대한 c-Met 항체의 결합 동력학 및 친화도

항체	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
D11-8B8	$0.78 \pm 0.02 \times 10^5$	$2.23 \pm 0.07 \times 10^{-4}$	2.9 ± 0.2
D11-C27G3	$0.5 \pm 0.1 \times 10^5$	$3.2 \pm 0.4 \times 10^{-4}$	6.5 ± 0.7
D11-S17Y	$0.70 \pm 0.08 \times 10^5$	$3.6 \pm 0.5 \times 10^{-4}$	5.1 ± 0.2
C8-H241	$0.80 \pm 0.06 \times 10^5$	$<10^{-5}$	<0.2
C8-6	$1.4 \pm 0.5 \times 10^5$	$4.5 \pm 0.2 \times 10^{-4}$	3.6 ± 1.1
C8-co16	$1.03 \pm 0.02 \times 10^5$	$<10^{-5}$	<0.1

[0290]

표 5

래트 c-Met-Flis-Fc ECD에 대한 c-Met 항체의 결합 동력학 및 친화도

항체	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (pM)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
D11-8B8	$2.1 \pm 0.2 \times 10^5$	$1.9 \pm 0.3 \times 10^{-4}$	0.89 ± 0.04			
D11-C27G3	$1.3 \pm 0.1 \times 10^5$	$3.4 \pm 0.5 \times 10^{-4}$	2.7 ± 0.2			
D11-S17Y	0.66×10^5	189×10^{-4}	286	2.5×10^5	3.0×10^{-4}	1.2

[0291]

[0292] 이들 데이터는 항체 C8-H241, C8-6, 및 C8-co16은 인간 및 사이노몰거스 원숭이 c-Met ECD 모두에 유사한 친화도로 결합하지만, 래트 c-Met ECD에는 그렇지 않음을 입증한다. 추가의 데이터 (제시하지 않음)는 이들 항체가 ELISA 플레이트 상에 코팅된 $1 \mu\text{g/mL}$ ECD를 사용하여 100 nM까지의 항체에서 마우스 c-Met ECD에 결합하지 않음을 나타낸다. 그러나, 항체 D11-8B8, D11-C27G3, 및 D11-S17Y는 인간, 사이노몰거스 원숭이 및 래트 c-Met ECD에 결합한다.

[0293]

실시예 3

[0294]

에피토프 맵핑

[0295]

본 발명의 c-Met 항체의 에피토프를 수소-중수소 교환 질량 분광법 (HDXMS) (Yamada et al. (2002) Rapid Commun. Mass Spectrom. 16(4):293-299) 및 디에틸 피로카르보네이트 (DEPC) 표지 (Mendoza et al. (2008) Analy. Chem. 80(8):2895-2904)의 조합에 의해 맵핑하였다. 인간 c-Met 세마 도메인의 수소-중수소 교환 반응을 c-Met 항체의 존재 또는 부재 하에 수행하였다. 항체의 부재 하에서보다 그의 존재 하에 더 적은 중수소를

획득한 세마 도메인 영역이 항체에 대한 에피토프(들)로서 확인되었다. DEPC는 세마 도메인 내의 표면 노출된 라이신 또는 히스티딘 잔기의 아미노기와 반응하여, 에틸 카르바메이트 라이신 또는 히스티딘을 형성할 수 있다. 이들 아미노산이 에피토프 영역 내에 위치하면, 이들은 보호될 것이고 항체 결합 시에 DEPC와 반응하지 않을 것이다. 이것은 HDXMS에 의해 결정된 에피토프 영역을 추가로 위치결정하고/하거나 확인하는 것을 돕는다.

[0296] **c-Met 세마 도메인의 발현 및 정제.** 인간 c-Met의 세마 도메인을 HEK293 EBNA 세포 내에서 C-말단 (서열 76)에서 Flis 태그와 함께 발현시키고, 실시에 1 및 2에 기재된 바와 같이 정제하였다. 이어서, 정제된 단백질을 4 °C에서 PBS (pH 7.4) 내에 저장하였다. 상기 도메인은 본 발명의 c-Met 항체에 전장 인간 c-Met ECD와 유사한 친화도로 결합하고, 이것은 이들 항체에 대한 에피토프가 인간 c-Met의 상기 영역 내에 위치함을 나타낸다.

[0297] **c-Met 세마 도메인의 탈글리코실화 및 탈시알화 (Desialylation).** 100 μl 의 1.2 mg/mL 인간 c-Met 세마 도메인 용액을 탈-N-글리코실화를 위해 1 μl 의 PNGase F 용액 (프로자임 (Prozyme), GKE-5006B)으로 37°C에서 철야 처리하였다. LC/MS 분석은 상기 처리 후에 대부분의 단백질이 탈글리코실화됨을 입증한다. 이와 별개로, 100 μl 의 1.2 mg/mL 인간 c-Met 세마 도메인 용액을 세마 도메인을 탈시알화하기 위해 2 μl 의 10 U/mL 뉴라미니다제 용액 (로슈 (Roche), Cat. #10 269 611 001)으로 37°C에서 1시간 동안 처리하였다.

[0298] **c-Met 세마 도메인/항체 복합체의 형성.** 10 μl 의 탈글리코실화 c-Met 세마 도메인 용액 (1.2 mg/mL)을 29 μg 단백질의 항체 용액 (2.07 μl 의 C8-H241, 2.01 μl 의 D11-8B8, 또는 3.87 μl 의 비관련된 대조 Mab)을 함유하는 분취액과 혼합한 후, 1X PBS 용액으로 40 μl 의 최종 부피로 희석하였다. 이와 별개로, 5 μl 의 탈시알화 인간 c-Met 세마 도메인 용액 (1.2 mg/mL)을 14 μg 단백질의 항체 용액 (1.04 μl 의 C8-H241, 1.01 μl 의 D11-8B8, 또는 1.94 μl 의 비관련된 대조 Mab)을 함유하는 분취액과 혼합한 후, 1X PBS 용액으로 15 μl 의 최종 부피로 희석하였다. 이어서, 각각의 항체의 혼합된 용액을 각각 HDXMS 분석하였다.

[0299] **HDXMS 분석.** 4 μl 의 탈글리코실화 또는 탈시알화 c-Met 세마 도메인/항체 혼합물을 16 μl 의 100% D₂O (아크로스 (Acros), 코드 166310500; 교환 동안 80% D)와 혼합하고, 주변 온도에서 90초 동안 인큐베이팅하였다. 이어서, 교환을 0°C에서 물 중 0.5% (v/v) 포름산 50 μl 로 켄칭시켰다. 켄칭된 용액을 0°C에서 3.5 또는 4 min 동안 2 μl 의 5 mg/mL (v/v) 펩신 용액 (시그마 (Sigma), Cat. # P6887)로 즉시 처리하였다. 소화된 용액을 즉시 RP-HPLC 컬럼 (폴리머 래보래토리스 (Polymer Laboratories), Part #1912-1802; 2.1x50mm, 1000 Å 공극 크기, 8 μM 입자 크기) 상에 수동으로 주입하였다. HPLC 펌프 (워터스 (Waters), 2795 HPLC)로부터의 HPLC 버퍼 스트림을 금속관 (약 1 mL)을 통해 수동 주입기로 통과시켰다. 이어서, 컬럼 용출물을 마이크로매스 LCT 프리미어 (Micromass LCT Premier) 또는 SYNAPT 질량 분광기로 통과시켰다. 금속관, 주입기 루프, 및 컬럼을 열음 수조 내에 잡갔다.

[0300] 컬럼을 99% A (0.05% (v/v) 수성 TFA (트리플루오로아세트산) 및 1% B (아세토니트릴 중 0.04% (v/v) TFA)로 0.2 mL/min의 유속으로 평형화시켰다. 동용매 (isocratic) 구배 용출을 1 min 동안, 1 min에 걸쳐 1 내지 10% B로, 12 min에 걸쳐 40% B로, 4 min에 걸쳐 90% B로 수행하고 3 min 동안 유지한 후, 초기 조건으로 신속하게 되돌렸다. 질량 분광법은 마이크로매스 LCT 프리미어 질량 분광기에서 양성 스프레이, W 모드 및 다음 세팅으로 수행하였다: 1.5 kV의 모세관 전압, 100 V의 콘 (cone) 전압, 25 V의 구경 (Aperture) 1, 200 내지 2000의 질량 범위, 150°C의 탈용매 온도, 및 500 L/h의 탈용매 기체 유동. c-Met의 각각의 펩신소화 펩티드의 질량 스펙트럼은 c-Met 항체를 사용한 또는 사용하지 않는 D/H 교환 후에 얻어졌다. 각각의 펩티드의 평균 질량은 가장 강한 이온 피크의 동위원소 분포에 따라 계산하였다.

[0301] **c-Met/항체 복합체의 DEPC 표지.** 8.3 μl 의 1.2 mg/mL 인간 c-Met 세마 도메인 용액을 항체 용액 (24 μg 단백질: 1.71 μl 의 C8-H241, 1.67 μl 의 D11-8B8, 또는 3.2 μl 의 비관련된 대조 Mab) 및 1X PBS 용액과 76 μl 의 최종 부피로 혼합하였다. 각각의 c-Met/항체 혼합물을 주변 온도에서 5 min 동안 이소프로판을 중 10 mg/mL (w/v) DEPC 4 μl 로 처리한 후, 0.1 M Tris-HCl 버퍼 (pH 8) 중 20 mg/mL 히스티딘 10 μl 및 0.1 M Tris-HCl 버퍼 (pH 8) 중 0.2 mg/mL 라이신 10 μl 로 켄칭하였다. 각각의 용액을 5 μl 의 0.2 mg/mL (w/v) 돼지 트립신 용액 (프로메가 (Promega), Cat.# V528A)과 혼합하고, 혼합물 절반을 0.5 μl 의 50 mg/mL (w/v) 디티오트레이톨 용액과 혼합하였다. 각각의 샘플 용액을 37°C에서 5시간 동안 인큐베이팅한 후 0.5 μl 의 PNGase F 용액으로 추가 1시간 동안 처리하였다. 각각의 소화된 용액을 2 μl 의 10% (v/v) 아세트산 용액으로 산성화시켰다. 2 μl 의 100 mg/mL TCEP (트리스(2-카르복시에틸) 포스핀 염산염 (시그마, Cat. # C4702-2G) 용액을 디티오트레이톨을 첨가하지 않으면서 비활원된 소화물에 첨가하였다. 각각의 용액을 워터스 애쿼티 (Acquity) UPLC 및 워터스 SYNAPT 질량 분광기를 이용하여 LC/MS 분석하였다. HPLC에서는 60°C에서 워터스 애쿼티 UPLC BEH C8 컬럼

(2.1x50mm, 1.7 μm , 워터스, part #186002877)을 사용하고, 웨프티드를 물/아세토니트릴/TFA HPLC 이동상 시스템 내의 아세토니트릴 구배로 용출하였다. 소화물에 대해 45 min 실행 시간을 이용하였다. 컬럼은 99% A (0.05% (v/v) TFA 수용액) 및 1% B (아세토니트릴 중 0.04% (v/v) TFA)로 0.2 mL/min의 유속으로 평형화시켰다. 구배 용출은 동용매 상태로 2 min 동안, 25 min에 걸쳐 1 내지 25% B으로, 10 min에 걸쳐 45% B까지, 1 min에 걸쳐 90% B까지 수행한 후 1.5 min 동안 유지한 후 (동일한 시간에서, 0.3 mL/min의 유속), 1% B로 신속하게 되돌렸다.

[0302] 결과. Mab C8-H241은 인간 c-Met 세포의 도메인의 α -사슬 (서열 75의 아미노산 잔기 25-307)에 위치한 c-Met 세마 도메인의 4개의 영역을 포함하는 입체형태적 에피토프에 결합하는 것으로 나타났다:

$^{121}\text{VVDTYYDDQL}_{130}$ (서열 77),

$^{131}\text{ISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQS}_{156}$ (서열 78),

$^{179}\text{ALGAKVLSSVKDRFINFF}_{196}$ (서열 79), 및

$^{216}\text{VRRLKETKDGF}_{227}$ (서열 80).

보다 특히, Mab C8-H241은

$^{123}\text{DTYYDD}_{128}$ (서열 81),

$^{144}\text{HVFPHNHTADIQS}_{156}$ (서열 82),

$^{192}\text{FINF}_{195}$ (서열 83), 및

$^{220}\text{KETKDGF}_{227}$ (서열 84) 내에서 하나 이상의 아미노산 잔기와 상호작용함으로써 c-Met에 결합한다.

[0312] 영역 $^{144}\text{HVFPHNHTADIQS}_{156}$ (서열 82)에 Mab C8-H241이 결합하면, 이들은 인간 (서열 75) 및 사이노몰거스 원숭이 (서열 73의 아미노산 25 내지 932) c-Met 세포의 도메인 모두에 대등한 친화도로 결합할 수 있지만, 결합 분석에서 100 nM까지의 항체에서 래트 또는 마우스 c-Met에 결합하지 않는다.

[0313] c-Met 세마 도메인의 α -사슬에 대한 Mab D11-8B8 결합은 하나의 영역에, 즉, 아미노산 서열 $^{84}\text{YKTGPVLEHPDCFPCQDCSSKANL}_{107}$ (서열 85) 내의 선형 에피토프 내의 아미노산 잔기, 보다 특히 영역 $^{95}\text{CFPCQDCSSKA}_{105}$ (서열 86)에 위치하는 것으로 보인다. Mab D11-8B8에 대한 에피토프는 에피토프 추출 실험에 의해 추가로 확인된다 (Dhungana et al. (2009) Methods Mol. Biol. 524:87-101). c-Met 세마 도메인을 돼지 트립신 (프로메가)으로 소화시킨 후, c-Met 웨프티드에 결합하기 위해 EZ-LinkTM Sulfo-NHS-LC-비오틴 키트 (피어스 (Pierce), Prod. #1754210)을 이용하여 소화물을 비오틴화된 Mab D11-8B8과 혼합하였다. 결합된 c-Met 웨프티드를 갖거나 갖지 않는 비오틴화된 D11-8B8을 고용량 스트렙타비딘 아가로스 수지 (씨모 사이언티픽 (Thermo Scientific), Prod. # 20359)에 의해 포획하였다. 결합된 웨프티드는 H₂O 중 0.15% 포름산 (v/v)으로 방출시킨 후, LC/MS에 의해 확인하였다.

실시예 4

RON 및 PlexinA2 ECD에 비해 c-Met ECD에 대한 항체의 우선적 결합

[0316] c-Met에 최대 서열 동일성을 갖는 인간 단백질은 RON 및 PlexinA2이다. 본 실험에서는 c-Met, RON 및 PlexinA2 ECD에 대한 c-Met 항체 결합의 특이성을 비교한다.

[0317] 96-웰 EIA/RIA 고 결합 플레이트 (코스타 (Costar), #2592)의 웰을 코팅 버퍼 (바이오에프엑스 랩스 (BioFX Labs), # COAT-1000-01) 내에서 100 μl 의 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인간 c-Met 세포의 도메인 (ECD)-Fc-Flis 융합체 (서열 72), RON-ECD-Fc (알엔디 시스템즈, #1947-MS) 또는 PlexinA2-ECD-Fc (앱노바 (Abnova, 타이완 타이페이) #H00005362-P01)로 4°C에서 철야 코팅하였다. 웰을 흡인여과하고, 비-특이적 결합 부위는 200 μl 의 차단 버퍼 (0.05% (v/v) 툴리소르베이트 20 (Tween-20)을 함유하는 Tris-완충 염수 (pH 8.0) (TBS-T) (바이오에프엑스 랩스, # WSHW-1000-01) + 1% (w/v) 소 혈청 알부민 (BSA) (잭슨 이뮤노, #001-000-162)를 첨가하고 1시간 동안 실온에서 인큐베이팅함으로써 차단하였다. 플레이트를 세척 버퍼 (TBS-T)로 3회 세척한 후에, 차단 버퍼 중의

c-Met 항체의 1:6 연속 희석액 (100 $\mu\text{g/mL}$ 로부터 출발함) 100 $\mu\text{l}/\text{웰}$ 을 첨가하고 실온에서 2시간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 세척하고, 100 $\mu\text{l}/\text{웰}$ 의 HRP-접합된 염소 항-인간 F(ab)₂ IgG (잭슨 이뮤노리서치 랩스 (Jackson ImmunoResearch Labs) #109-036-097)와 함께 차단 버퍼 내에서 90분 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 세척한 후에, 100 $\mu\text{l}/\text{웰}$ 의 기질 용액 (바이오에프엑스, #TMBW-1000-01)을 첨가하고, 플레이트를 10 min 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 100 $\mu\text{l}/\text{웰}$ 의 중지 용액 (바이오에프엑스, #LSTP-1000-01)을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 비색 신호를 발색시키고, 450 nm에서 스펙트라맥스 (SpectraMax) 190 플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이스 (Molecular Devices, 미국 캘리포니아주 서니베일))를 사용하여 판독하였다. c-Met, RON 및 PlexinA2 ECD에 대한 c-Met 항체 결합은 색 신호 생산에 비례적이다.

[0318]

표 6에 제시된 바와 같이, 본 발명의 C8 및 D11 c-Met 항체는 둘 모두 RON ECD 또는 PlexinA2 ECD에 비해 인간 c-Met ECD에 우선적으로 결합한다.

표 6

RON 및 PlexinA2 ECD에 비해 인간 c-Met ECD에 대한
c-Met 항체의 우선적인 결합

항체 용량 (ng/mL)	평균 A450 nm								
	C8-H241			C8-6			C8-co16		
	c-Met ECD	RON ECD	Plexin A2	c-Met ECD	RON ECD	Plexin A2	c-Met ECD	RON ECD	Plexin A2
0.000	0.300	0.098	0.092	0.322	0.110	0.109	0.335	0.106	0.104
0.002	0.317	0.088	0.082	0.326	0.106	0.099	0.369	0.100	0.094
0.010	0.317	0.081	0.090	0.335	0.097	0.095	0.374	0.096	0.078
0.060	0.484	0.104	0.099	0.551	0.087	0.096	0.446	0.089	0.082
0.357	0.902	0.091	0.097	0.813	0.080	0.107	0.907	0.083	0.095
2.143	2.861	0.101	0.103	2.415	0.098	0.106	2.888	0.114	0.092
12.860	4.000	0.079	0.083	4.000	0.087	0.085	4.000	0.102	0.069
77.160	4.000	0.085	0.079	4.000	0.090	0.078	4.000	0.084	0.096
462.963	4.000	0.090	0.104	4.000	0.088	0.086	4.000	0.103	0.092
2777.778	4.000	0.085	0.092	4.000	0.088	0.094	4.000	0.095	0.114
16666.667	4.000	0.117	0.125	4.000	0.124	0.118	4.000	0.198	0.284
1000000.000	4.000	0.267	0.310	4.000	0.170	0.171	4.000	0.421	0.983
표준 오차									
0.000	0.006	0.015	0.007	0.011	0.000	0.004	0.003	0.005	0.011
0.002	0.003	0.006	0.002	0.012	0.005	0.006	0.023	0.000	0.006
0.010	0.002	0.000	0.005	0.001	0.004	0.009	0.015	0.012	0.002
0.060	0.055	0.001	0.002	0.144	0.004	0.005	0.029	0.003	0.002
0.357	0.004	0.004	0.002	0.022	0.005	0.003	0.005	0.007	0.000
2.143	0.032	0.004	0.005	0.041	0.004	0.003	0.128	0.002	0.007
12.860	0.000	0.001	0.012	0.000	0.000	0.007	0.000	0.004	0.004
77.160	0.000	0.002	0.014	0.000	0.008	0.007	0.000	0.003	0.001
462.963	0.000	0.004	0.003	0.000	0.006	0.001	0.000	0.013	0.001
2777.778	0.000	0.004	0.002	0.000	0.004	0.001	0.000	0.007	0.000
16666.667	0.000	0.005	0.004	0.000	0.004	0.003	0.000	0.003	0.002
1000000.000	0.000	0.008	0.012	0.000	0.002	0.003	0.000	0.011	0.093

[0319]

D11-8B8			D11-C27G3			D11-S17Y		
c-Met ECD	RON ECD	Plexin A2	c-Met ECD	RON ECD	Plexin A2	c-Met ECD	RON ECD	Plexin A2
0.297	0.097	0.081	0.2844	0.0791	0.0771	0.31475	0.1129	0.10795
0.299	0.082	0.078	0.2708	0.07065	0.07965	0.3091	0.09705	0.09345
0.304	0.074	0.078	0.2904	0.0715	0.0763	0.31405	0.0868	0.0986
0.445	0.094	0.073	0.45965	0.0695	0.06605	0.37355	0.0857	0.09455
1.314	0.073	0.074	1.43965	0.07085	0.0792	0.78915	0.08475	0.0924
2.416	0.069	0.073	2.5266	0.0655	0.0742	2.1432	0.1085	0.08235
3.931	0.079	0.075	4	0.07835	0.0641	4	0.0825	0.0768
4.000	0.079	0.066	4	0.06725	0.076	4	0.08195	0.07575
4.000	0.071	0.077	4	0.0981	0.1045	4	0.08185	0.0783
4.000	0.088	0.093	4	0.20445	0.30325	4	0.09255	0.0955
4.000	0.165	0.181	4	0.67565	1.33475	4	0.1274	0.1491
4.000	0.544	0.498	3.9211	2.30295	3.37085	4	0.23775	0.3146
표준 오차								
0.006	0.003	0.003	0.0087	0.0017	0.0106	0.00515	0.0012	0.00035
0.011	0.002	0.002	0.0194	0.00595	0.00185	0.0228	0.00065	0.01725
0.012	0.002	0.001	0.0051	0.0018	0.0017	0.01195	0.0058	0.0079
0.007	0.017	0.003	0.01495	0.0006	0.00335	0.00375	0.0013	0.00035
0.092	0.007	0.004	0.02935	0.00695	0.0017	0.04195	0.00075	0.0039
0.044	0.002	0.001	0.2742	0.0002	0.0015	0.0841	0.0054	0.00015
0.069	0.005	0.002	0	0.01505	0.0043	0	0.0029	0.0061
0.000	0.007	0.000	0	0.00275	0.0066	0	0.00445	0.00455
0.000	0.005	0.004	0	0.0063	0.0032	0	0.00485	0.0089
0.000	0.003	0.005	0	0.00975	0.00535	0	0.00705	0.0055
0.000	0.007	0.004	0	0.03125	0.03495	0	0.0007	0.0035
0.000	0.016	0.006	0.0789	0.07335	0.14345	0	0.00865	0.004

[0320]

실시예 5

[0322]

c-Met 항체는 HGF/c-Met 결합을 차단한다

[0323]

시험관내 결합 분석을 이용하여, 본 발명의 c-Met 항체에 의한 c-Met에 대한 HGF 결합의 억제를 결정하였다.

[0324]

96-웰 EIA/RIA 고 결합 플레이트 (코스타, #2592)의 웰을 둘베코 (Dulbecco) 인산염 완충 염수 (DPBS) 내의 인간 c-Met ECD-Fc-Flis (서열 72) ($2 \mu\text{g/mL}$) $100 \mu\text{l}$ 로 실온에서 철야 코팅하고; 플레이트 세척기에서 세척 버퍼 (0.05% (v/v) 폴리소르베이트 20 (TWEEN®-20)를 함유하는 Tris-완충 염수 (pH 8.0) (TBS-T) (바이오에프엑스 랩스, #WSHW-1000-01))로 4회 세척하고; $300 \mu\text{l}$ 의 차단 버퍼 (TBS-T + 1% (w/v) 소 혈청 알부민 (BSA) (잭슨 이뮤노, #001-000-162))를 첨가하고; 60분 동안 37°C 에서 인큐베이팅함으로써 차단하였다. 이어서, 차단 버퍼를 웰로부터 제거하고, 표 7에 제시된 최종 농도에서 차단 버퍼 내의 $50 \mu\text{l}$ 의 항체를 각각의 웰에 첨가하였다. 차단 버퍼를 HGF만 담은 대조 웰에 첨가하였다. c-Met 항체를 담은 플레이트를 90분 동안 37°C 에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 10 ng/mL 의 최종 농도에서 차단 버퍼 내의 $50 \mu\text{l}$ 의 인간 간세포 성장 인자 (HGF) (알앤디 시스템즈, #294)를 항체만을 담은 대조 웰을 제외한 각각의 웰에 첨가하였다. c-Met 항체/HGF 혼합물을 담은 플레이트를 플레이트 진탕기 상에서 2시간 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 웰을 플레이트 세척기에서 TBS-T로 4회 세척하였다. 이어서, 100 ng/mL 의 최종 농도에서 차단 버퍼 내의 비오티닐화된 항-HGF 항체 (알앤디 시스템즈, #BAF294) $100 \mu\text{l}$ 을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 90분 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 웰을 다시 플레이트 세척기에서 TBS-T로 4회 세척하였다. 차단 버퍼 내의 스트렙타비딘-양고추냉이 페옥시다제 (HRP) (알앤디 시스템즈, DY998)의 1:200 회석액 $100 \mu\text{l}$ 을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 30분 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 웰을 플레이트 세척기에서 TBS-T로 4회 세척하였다. 이어서, $100 \mu\text{l}/\text{웰}$ 의 기질 용액 (바이오에프엑스, #TMBW-1000-01)을 첨가하고, 플레이트를 10분 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 반응을 중지시키기 위해, $100 \mu\text{l}/\text{웰}$ 의 중지 용액 (바이오에프엑스, #LSTP-1000-01)을 첨가하였다. 샘플을 450-570 nm의 과장에서 마이크로플레이트 판독기 (스펙트라, 맥스 190) 상에서 판독하고, 배경을 공제하지 않았다.

[0325]

표 7에 제시된 바와 같이, 본 발명의 C8 및 D11 c-Met 항체는 둘 모두 인간 HGF/c-Met 결합을 차단한다.

표 7

C8- 및 D11-항체에 의한 인간 c-Met에 대한 인간 HGF 결합의 억제

항체 용량 (ng/mL)	AVG A450 nm							
	hIgG2	D11-8B8	D11-27G3	D11-S17Y	hIgG4	C8-6	C8-H241	C8-co16
0.00	2.43	2.43	2.43	2.43	2.61	2.61	2.61	2.61
0.48	2.46	2.51	2.37	2.15	2.41	2.56	2.45	2.05
1.91	2.87	2.48	2.31	1.98	2.49	2.59	2.46	2.18
7.63	2.70	2.41	2.27	2.08	2.88	2.64	2.53	2.20
30.52	2.41	2.32	2.38	2.07	2.63	2.42	2.42	2.08
122.07	2.52	1.92	1.60	1.69	2.44	2.00	1.77	1.30
488.28	2.53	1.30	0.94	1.29	2.44	1.33	0.73	0.70
1953.13	2.43	1.43	0.97	1.23	2.27	1.08	0.68	0.60
7812.50	2.50	1.24	0.91	1.12	2.49	0.95	0.70	0.57
31250.00	2.50	1.31	0.94	1.17	2.67	0.98	0.77	0.56
125000.00	2.43	1.38	0.89	1.35	3.00	1.32	0.69	0.38
STDErr								
0.00	0.06	0.06	0.06	0.06	0.10	0.10	0.10	0.10
0.48	0.02	0.13	0.01	0.09	0.24	0.02	0.14	0.15
1.91	0.27	0.08	0.08	0.03	0.00	0.03	0.16	0.12
7.63	0.14	0.01	0.21	0.08	0.14	0.03	0.06	0.09
30.52	0.09	0.02	0.31	0.09	0.16	0.01	0.03	0.01
122.07	0.09	0.07	0.03	0.02	0.08	0.10	0.02	0.03
488.28	0.00	0.04	0.04	0.02	0.01	0.02	0.00	0.01
1953.13	0.13	0.16	0.02	0.05	0.00	0.01	0.01	0.01
7812.50	0.04	0.01	0.01	0.02	0.25	0.07	0.01	0.02
31250.00	0.06	0.02	0.02	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03
125000.00	0.07	0.03	0.01	0.08	0.13	0.47	0.01	0.00

언어: AVG = 평균; STDErr = 표준 오차

[0326]

실시예 6

c-Met 항체는 간세포 성장 인자 및 효능제 Mab 5D5에 비해

약한 c-Met 인산화를 유도한다

[0330]

HGF로 자극한 후에, A549 폐 암종 세포주는 티로신 잔기 1349에서 증가된 c-Met 인산화를 보였다. 인산화된 c-Met (p-Met) ELISA 분석을 이용하여, HGF의 부재 하에 다양한 c-Met 항체의, 및 Mab 5D5 및 HGF 자체의 효능제 활성을 측정하였다.

[0331]

A549 세포 (ATCC, #CCL-185)를 햄 (Ham) F12K + 2 mM 글루타민 (인비트로겐 (Invitrogen), #21127-022) + 10% FBS 배지 (인비트로겐, #10082) 내에서 배양하였다. 세포를 96-웰 플레이트에서 위에서와 같은 전체 혈청 배지 내에 6×10^4 세포/웰로 플레이팅하고, 37°C에서 5% (v/v) CO₂ 하에 철야 인큐베이팅하였다. 배지를 웰로부터 제거하고, 세포를 100 μL의 햄 F12K + 2 mM 글루타민 배지 + 0.5% FBS 내에서 6시간 동안 37°C에서 5% (v/v) CO₂ 하에 단식시켰다. 항체 또는 HGF를 단식 (starvation) 배양 배지 내에 희석하고, 표 8에 지시된 최종 농도로 첨가하고, 15분 동안 37°C에서 인큐베이팅하였다. 배지를 흡인여과하고, 세포를 웰 당 50 μL 용해 벼퍼 (10 mM Tris (인비트로겐, #15567-027), 150 mM NaCl, 2 mM 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA) (인비트로겐, #15575-038), 50 mM NaF (시그마, #S1504), 1% (v/v) 옥틸페녹시 폴리에톡시 에탄올 (TRITON®-X 100; 시그마, #T8787), 2 mM 나트륨 오르토바나데이트 (EMD 케미칼스 (EMD Chemicals, 미국 뉴저지주 킵스타운), #567540), 프로테아제 억제제 (시그마, 미국 미주리주 세인트루이스; #P8340), 포스파타제 억제제 칵테일 (cocktail) I (시그마 #P2850), 및 포스파타제 억제제 칵테일 II (시그마 #P5726)) 내에서 용해시키고, 얼음 상에서 15-20분 동안 인큐베이팅하였다. 세포 용해물을 아래 설명되는 ELISA 분석에서 사용하여, 잔기 Y1349에서 c-Met의 인산화를 결정하였다.

[0332]

c-Met 포획 항체를 Bup H 코팅 벼퍼 (씨모 피셔 사이언티픽 (Thermo Fisher Scientific, 미국 매사추세츠주 월 텁), #28382) 내에 2 μg/mL로 희석하고, ELISA 플레이트 (그라이너 바이오-원 (Greiner Bio-One, 미국 노쓰 캐롤리나주 면로), #655081)에 첨가하고, 4°C에서 철야 인큐베이팅하였다. 웰을 흡인여과하고, TBS-T (바이오에프엑스, 미국 매릴랜드주 오윙스 밀스, WSH-1000-01)로 3회 세척한 후, 200 μL의 차단 벼퍼 (TBS-T + 2% (w/v) BSA)로 1시간 동안 실온에서 차단하였다. 플레이트를 TBS-T로 3회 세척하였다. 이어서, 25 μL의 세포 용해물 + 75 μL 차단 벼퍼를 첨가하고, 플레이트를 4°C에서 철야 인큐베이팅하였다. 이어서, 플레이트를 TBS-T로 3회 세척하였다. 차단 벼퍼 중의 0.5 μg/mL의 pY1349 c-Met 폴리클로날 항체 (셀 시그널링 테크놀로지 (Cell

Signaling Technology, 미국 매사추세츠주 텐버스), #3133) 100 μl 을 각각의 웰에 첨가하고, 2시간 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 플레이트를 TBS-T로 3회 세척하였다. 차단 버퍼 중의 1/10,000 회석된 퍼옥시다제-접합된 염소 항-토끼 IgG 폴리클로날 항체 (잭슨 이뮤노리서치 래보래토리스 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 미국 펜실베니아주 웨스트 그로브), #111-035-144) 100 μl 을 각각의 웰에 첨가하고, 1시간 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 플레이트를 TBS-T로 3회 세척하였다. 100 μl 의 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 용액 (바이오에프엑스, #TMBW-1000-01)을 각각의 웰에 첨가한 후, 100 μl 중지 용액 (바이오에프엑스, #LSTP-1000-01)을 첨가하였다. 플레이트를 450 nm에서 스펙트라맥스 M5 플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이즈, 미국 캘리포니아주 서니베일) 상에서 판독하고, 샘플 값을 SOFTmax 프로 4.8 소프트웨어 (몰레큘라 디바이즈)를 이용하여 결정하였다.

[0333] 결과를 표 8에 제시한다.

표 8

A549 세포에서 c-Met 인산화에 대한
c-Met 항체, HGF, 및 효능제 Mab 5D5의 효과

Ab 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	p-Met 신호		
	C8-H241	C8-6	hIgG4
30	0.333	0.272	0.061
10	0.418	0.334	0.077
3.333	0.450	0.328	0.068
1.113	0.465	0.365	0.087
0.370	0.340	0.211	0.082
0.123	0.304	0.127	0.067
0.041	0.130	0.125	0.268
0.014	0.078	0.105	0.074
0.005	0.074	0.070	0.074
0.002	0.070	0.081	0.117

HGF 농도 (ng/mL)	p-Met 신호		
	Ab 농도 (ng/mL)	p-Met 신호	
	Mab 5D5		
300	10.615	5	3.290
100	6.129		
33.33333	2.267		
11.11111	1.0667		
3.703704	0.461		
1.234568	0.211		
0.411523	0.142		
0.137174	0.128		
0.045725	0.100		
0.015242	0.148		

[0334]

데이터는 HGF 및 효능제 c-Met Mab 5D5가 c-Met 인산화를 강하게 자극하는 한편, 본 발명의 c-Met Mab C8-H241 및 C8-6은 c-Met 인산화를 약하게 자극함을 입증한다. HCT116, H460, 및 MDA-MB-231 세포주에서 유사한 결과가 얻어졌다.

[0336]

Mab D11-8B8을 유사한 결과를 생성시킨다.

실시예 7

c-Met 항체는 HGF-유도된 c-Met 인산화를 억제한다

[0339]

c-Met에 HGF가 결합하면 c-Met 분자의 티로신 인산화 및 c-Met 신호전달 경로의 활성화를 일으킨다. 본 실시예에서, HGF에 반응성인 인간 결장암 세포주 HCT116을 사용하여, 본 발명의 c-Met 항체에 의한 c-Met의 티로신 잔기 1230, 1234, 및 1235에서 HGF-유도된 인산화의 억제를 평가한다.

[0340]

HCT116 세포 (ATCC, 미국 버지니아주 매나사스, #CCL-247)를 150,000 세포/ mL 로 10% (v/v) 태소 혈청 (FBS) (인비트로겐, #10082-147)을 함유하는 맥코이 (McCoy) 5A 배지 (인비트로겐, 미국 캘리포니아주 칼스바드, #16600-082) + 페니실린/스트렙토마이신 (인비트로겐, #15140-122) 내에 재현탁시켰다. 0.2 mL 의 재현탁된 HCT116 세포를 96-웰 미량역가 플레이트 (코닝 (Corning, 미국 매사추세츠주 로웰), #3596)에 30,000 세포/웰로 첨가한 후, 세포를 48시간 동안 37°C에서 5% (v/v) CO_2 하에 인큐베이팅하였다. 이어서, 배양 배지를 흡입

여과하고, 세포를 100 μl 의 0.1% (w/v) BSA를 함유하는 맥코이 5A 배지 + 페니실린/스트렙토마이신 내에서 24시간 동안 37°C에서 5% (v/v) CO₂ 하에 단식시켰다. 25 μl 의 나트륨 아지드 (0.01% (w/v)의 최종 농도) (시그마, #S2002)를 첨가한 후, 즉시 25 μl 의 8X c-Met 항체 희석액을 0.1% (w/v) BSA를 함유하는 맥코이 5A 배지 + 페니실린/스트렙토마이신을 첨가하고, 세포를 30분 동안 37°C에서 5% (v/v) CO₂ 하에 인큐베이팅하였다. 50 μl 의 HGF를 200 ng/mL의 최종 농도에서 각각의 웰에 첨가하고, 세포를 추가로 15분 동안 37°C에서 5% (v/v) CO₂ 하에 인큐베이팅하였다. 이어서, 배지를 흡인여과하고, 50 μl 의 세포 용해 버퍼를 첨가하였다 (10 mM Tris (인비트로겐, #15567-027), 150 mM NaCl, 2 mM 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA) (인비트로겐, #15575-038), 50 mM NaF (시그마, #S1504), 1% (v/v) 옥틸페녹시 폴리에톡시 에탄올 (TRITON®-X 100; 시그마, #T8787), 2 mM 나트륨 오르토바나레이트 (EMD 케미칼스, 미국 뉴저지주 깁스타운, #567540), 및 완전 프로테아제 억제제, EDTA 비함유 (로슈 (스위스 바젤), #11836170001)). 세포를 용해 버퍼 내에서 실온에서 15-30분 동안 인큐ベ이팅하였다. 세포 용해물을 다음과 같이 ELISA에 의해 c-Met 티로신 인산화에 대해 분석하였다.

[0341]

c-Met 포획 항체를 코팅 버퍼 (바이오에프엑스, 미국 캘리포니아주 글렌도라, COAT-1000-01) 내에 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석하였다. 110 μl 의 희석된 항체를 ELISA 플레이트 (그라이너 바이오-원, 미국 노쓰 캐롤리나주 면로, #655081)에 웰 당 첨가하고, 플레이트를 4°C에서 철야 인큐베이팅하였다. 웰을 흡인여과하고, TBS-T로 2회 세척한 후, 200 μl 의 차단 버퍼 (TBS-T + 2% (w/v) BSA)로 1시간 동안 차단하였다. 플레이트를 TBS-T로 2회 세척하였다. 이어서, 25 μl 의 세포 용해물 + 75 μl 차단 버퍼 또는 100 μl 의 MKN45 세포 용해물 희석액 (차단 버퍼로 희석시킴, 표준품으로서)를 첨가하고, 플레이트를 2시간 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 플레이트를 TBS-T로 4회 세척하였다. 이어서, 차단 버퍼 중의 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 pYpYpY1230/1234/1235 c-Met 폴리클로날 항체 (인비트로겐, #44-888G) 100 μl 을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 2시간 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 플레이트를 TBS-T로 4회 세척하였다. 이어서, 차단 버퍼 중의 1/12,000 희석된 페옥시다제-접합된 염소 항-토끼 IgG 폴리클로날 항체 (잭슨 이뮤노리서치 래보래토리스, 미국 펜실베니아주 웨스트그로브, #111-035-144) 100 μl 을 첨가하고, 혼합물을 1시간 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 플레이트를 TBS-T로 6회 세척하였다. 100 μl 의 3,3',5,5'-테트라메틸벤자린 용액 (바이오에프엑스, #TMBW-1000-01)을 각각의 웰에 첨가한 후, 100 μl 중지 용액 (바이오에프엑스, #LSTP-1000-01)을 첨가하였다. 플레이트를 스펙트라맥스 190 플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이시즈, 미국 캘리포니아주 서니베일)를 사용하여 570 nm에서 교정하면서 450 nm에서 판독하였다. 4-파라미터 분석을 이용하여 표준 곡선을 확립하고, 샘플 값을 SOFTmax 프로 3.1.2 소프트웨어 (몰레큘라 디바이시즈)를 이용하여 결정하였다.

[0342]

c-Met 티로신 인산화의 억제 %는 c-Met 항체 첨가 없이 HGF 처리의 평균 (0% 억제)에서 설정하고, 100% 억제는 나트륨 아지드 처리의 평균에서 (HGF 또는 c-Met 항체 처리 없이) 설정하였다.

[0343]

표 9는 3개의 실험에 대한 실험 당 삼중 처리의 평균을 표준 오차와 함께 보여준다. 데이터는 인간 IgG2 및 IgG4 이소형 대조군에 비해 본 발명의 6개의 c-Met 항체 중 5개가 c-Met의 HGF-유도된 티로신 인산화를 유의하게 억제함을 입증한다.

표 9

C8- 및 D11-항체에 의한 HGF-유도된 c-Met 티로신 인산화의 억제

항체 용량: 10 μ g/mL 2 μ g/mL 0.4 μ g/mL 0.08 μ g/mL 0.016 μ g/mL 0.0032 μ g/mL	Ab 처리		c-Met		c-Met		c-Met		c-Met		c-Met		c-Met		
	이소형	프로	프로	프로	프로	프로	프로	프로	프로	프로	프로	프로	프로	프로	프로
D11-388	IgG2	19.56	4.68	40.74	8.24	35.04	6.43	10.52	7.41	-6.68	9.48	-10.37	6.79		
D11-C27G3	IgG2	1.25	7.55	31.78	7.71	38.10	4.97	20.79	5.72	5.73	8.95	9.72	7.09		
D11-S37Y	IgG2	16.73	8.72	31.39	6.43	15.91	6.05	-3.24	10.54	2.33	8.52	9.48	8.51		
G8H241	IgG4	60.08	5.27	62.20	2.10	59.09	3.05	22.09	4.92	14.68	12.40	-12.33	10.18		
G8-c0-16	IgG4	65.40	3.94	58.96	3.37	45.08	3.44	9.77	9.14	-2.89	10.95	-10.72	5.41		
G8-6	IgG4	14.88	10.78	27.94	3.80	16.83	4.36	7.79	7.68	-6.06	8.84	-11.34	8.65		
5D5	mIgG1	64.12	3.31	63.75	4.44	42.55	4.27	11.87	7.73	-3.30	9.70	-6.07	5.68		
IgG2	이소형 대조군	6.24	5.31	17.53	5.74	9.31	6.56	-1.58	8.16	9.49	6.77	-10.21	6.78		
IgG4	이소형 대조군	-1.47	5.76	6.62	9.07	-16.07	7.01	-21.70	9.09	-7.96	10.97	-14.40	7.37		
mIgG1	이소형 대조군	5.46	6.31	9.76	9.27	13.43	8.18	-10.59	10.31	-5.42	10.53	-9.76	8.42		

비자리	평균	표준	오차
HGF	200 ng/mL	0.00	2.76

ELISA에 의해 측정될 때 HGF 자극된 포스포-Met의 억제 %

[0344]

실시예 8

c-Met 항체에 의한 c-Met 내재화의 유도

본 실시예에 설명된 실험에서는 본 발명의 c-Met 항체가 세포 표면 c-Met 분자에 결합하고 c-Met 내재화를 유도하는 것을 입증하기 위해 형광-활성화 세포 분류 (FACS) 분석을 사용한다. 사용된 MKN45 세포는 고수준의 총 c-Met를 구성적으로 발현하고, MET 유전자 증폭의 결과로서 c-Met의 HGF-비의존적 인산화를 보인다. c-Met 내재화는 c-Met 분해를 유도하는 것으로 보이고 (실시예 10 및 19 참조), 이것은 c-Met 신호전달 경로의 억제를 일으킨다.

[0348]

6-웰 조직 배양 플레이트 (코스타, #3598)의 웰에 2 mL의 배양 배지 (RPMI-1640 (인비트로겐, #11835); 10% (v/v) FBS (인비트로겐, #10082); 2 mM L-글루타민 (인비트로겐, #25030); 100 U/500 mL 폐니실린 G, 및 100 μ g/500 mL 스트렙토마이신 (인비트로겐, #15140)) 내에서 1.5×10^5 인간 위 종양 MKN45 세포 (재팬 헬쓰 사이언스 파운데이션, 헬쓰 사이언스 리서치 리소스뱅크 (Japan Health Sciences Foundation, Health Science Research Resource Bank), #JCRB0254)를 접종하였다. 플레이트를 24시간 동안 37°C에서 95% 상대 습도 및 5% (v/v) CO₂ 하에 인큐베이팅하였다. 이어서, 항체를 웰에 5 μ g/mL의 최종 농도로 첨가하였다. 철야 처리 후에, 배양 배지를 웰로부터 제거하고, 1 mL의 효소가 없는 세포 분리 용액 (케미콘 (Chemicon), #S-014-B)로 교체하였다. 5분 동안 실온에서 인큐베이팅한 후 세포를 원심분리관에 수집하고, 배양 배지 내에 1회 세척한 후 결합 버퍼 (1% (w/v) BSA 및 0.01% (w/v) 나트륨 아지드를 함유하는 DPBS) 내에 1회 더 세척하였다. 세포를 염색하

기 전에, 본 발명의 c-Met 항체와 상이한 에피토프를 인식하는 c-Met 항체를 공급자의 지시에 따라 알렉사 플루오르 (Alexa Fluor) 488 모노클로날 항체 표지 키트 (몰레큘라 프로브스, 미국 오래곤주 유진, #A-20181)를 사용하여 표지하였다. 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 알렉사 플루오르 488-표지된 항체를 함유하는 결합 버퍼 100 μl 을 세포에 첨가하고, 이어서 이를 60분 동안 열음 상에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 세포를 결합 버퍼로 1회 세척하고, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 프로파�드 요오다이드 (죽은 세포를 염색하기 위해)를 함유하는 DPBS 내에 재현탁시켰다. 세포 표면 상에 남아있는 c-Met 분자의 양을 FACS 분석에 의해 분석하였고, 10,000 사건이 각각의 샘플에 대해 획득되었다.

[0349] 세포 표면 상의 평균 형광 강도는 c-Met 항체로 처리한 후 세포 표면 상에 남아있는 c-Met 분자의 양을 반영한다.

[0350] 하나의 대표적인 실험으로부터의 데이터를 표 10에 제시한다.

표 10

FACS 분석에 의해 결정할 때 c-Met 내재화에 대한 C8- 및 D11-항체의 효과

항체 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	평균 형광									
	hIgG2	D11-8B8	D11-C27G3	D11-S17Y	hIgG4	C8-6	C8-H241	C8-co16	mIgG	5D5
5.00	130.25	44.66	51.09	56.35	135.03	67.88	57.63	56.16	136.47	92.87

[0351]

데이터는 본 발명의 c-Met 항체로 처리한 세포의 표면 상의 평균 형광 강도가 상응하는 IgG 이소형 대조 항체 또는 mIgG 항체로 처리한 세포보다 더 낮음을 입증하고, 이것은 본 발명의 c-Met 항체가 c-Met 내재화를 유도함을 나타낸다. 더욱이, 본 발명의 c-Met 항체로 처리한 세포의 표면 상의 평균 형광 강도는 대조 효능제 c-Met 항체 5D5로 처리한 세포보다 더 낮다. % 내재화는 다음과 같이 계산할 수 있다:

[0353] % 내재화 = [1 - (시험 항체의 평균 형광/이소형 항체 대조군의 평균 형광)] X 100].

[0354] 내재화 데이터는 본 발명의 항체가 인간 c-Met의 이량체화를 유도함을 시사한다. 실시예 9 및 19의 데이터는 C8- 및 D11-항체가 또한 c-Met의 분해를 유도하고, 인산화를 감소시키는 것을 입증한다.

[0355] 상보성 내재화 결과는 MKN45 및 Caki-1 세포에서 형광 표지된 뮤린 C8 항체를 사용하는 공초점 현미경에 의해 얻었다.

[0356] C8-H241, C8-6, C8-co-16, 및 뮤린 D11 항체를 사용할 때, 사이노몰거스 원숭이 c-Met를 코딩하는 핵산으로 형질감염된 사이노몰거스 원숭이 NIH3T3 세포에서 유사한 내재화 결과가 얻어졌다.

[0357] C8-H241, C8-6, C8-co-16 및 optD11 항체는 또한 인간 c-Met 키나제 도메인 돌연변이 M1149T를 코딩하는 핵산으로 형질감염된 NIH3T3 세포에서 c-Met의 내재화를 유도한다. 항체 C8-H241, C8-6, C8-co-16 및 뮤린 D11은 또한 c-Met 막근접 도메인 돌연변이 R988C를 함유한 비-소세포 폐암 H1437 세포에서 c-Met의 내재화를 유도한다. 두 돌연변이는 모두 c-Met의 기능 획득 구성적 활성화를 일으킨다.

실시예 9

시험관 내에서 리간드-의존적 종양 세포 증식의 항체 억제

[0359] HGF 리간드의 부재 하에 HGF-비의존적 MKN45 세포에서 c-Met 항체에 의한 시험관내 종양 세포 성장의 억제를 본 분석에서 시험한다.

[0361] c-Met 및 이소형 대조 항체를 배양 배지 (RPMI-1640 (인비트로겐, #11835), 10% (v/v) FBS, 2 mM L-글루타민 (인비트로겐, #25030), 100 U/500 mL 페니실린 G, 및 100 $\mu\text{g}/500 \text{ mL}$ 스트렙토마이신 (인비트로겐, #15140))로 희석하여 표 11에 지시된 최종 농도의 2X를 달성하고, 50 μl 의 2X 항체 용액을 96-웰 조직 배양 플레이트 (퍼킨 엘머 (PerkinElmer) # 1450-517)의 각각의 웰에 첨가하였다. MKN45 세포 (재팬 헬쓰 사이언스 파운데이션, 헬쓰 사이언스 리서치 리소스 뱅크, #JCRB0254)를 상기 지시된 배지 내에 유지시키고, 1×10^5 세포/mL로 동일한 배지 내에 재현탁시켰다. 50 μl 의 상기 MKN45 재현탁액을 각각의 웰에 첨가하여 5×10^3 세포/웰을 달성하였다. 이어서, 플레이트를 48시간 동안 37°C에서 95% 상대 습도 및 5% (v/v) CO₂ 하에 인큐베이팅하였다. 배양의 마

지막 6시간 동안, 세포를 ^3H -티미딘 (эм피 바이오메디칼스 (MP Biomedicals, 미국 오하이오주 솔론), #24066)로 1 $\mu\text{ci}/\text{웰}$ 에서 37°C, 95% 상대 습도, 5% (v/v) CO₂에서 펄싱하였다 (pulsing). 이어서, 배지를 제거하고, 세포를 DPBS로 1회 세척하였다. 그 후에, 200 μl 의 Optiphase Supermix (퍼킨엘머, #1200-439)를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고, 적어도 1시간 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 세포에 혼입된 ^3H -티미딘을 섬광 계수기를 사용하여 1분 동안 계수하였다.

[0362] 하나의 대표적인 실험으로부터 데이터를 표 11에 제시한다.

표 11

다양한 C8- 및 D11-항체에 의한 MKN45 세포에서 ^3H -티미딘 혼입의 억제

항체 용량 (ng/mL)	AVG CPM									
	hIgG2	D11-888	D11-27G3	D11-S17Y	hIgG4	C8-co16	C8-H241	C8-8	mIgG	5D5
20000.0	45054	11239	18407	19752	50628	11738	11425	16387	52448	35086
3333.3	49384	11441	16920	21239	54026	12956	12063	18216	53670	38195
555.6	51720	11925	15987	20936	54200	13476	13217	18334	54655	39496
92.6	47562	11094	14550	21911	54264	12419	11962	23041	52241	39607
15.4	50488	24402	26685	39695	53808	22528	23150	44771	51329	49766
2.8	48491	44741	47034	49888	54765	53465	48761	54598	55483	54987
0.4	46468	43334	43998	45304	55330	47485	46845	53389	51549	49583
0.1	44822	41578	41515	44568	53856	45725	44418	51668	47709	51883
0.0	50427	50427	44213	48708	51478	48708	50300	50300	50300	50300
STDErr										
20000.0	2927	114	1265	1206	2491	282	654	282	1845	764
3333.3	2462	732	841	689	1421	388	386	314	1310	1491
555.6	2186	605	578	267	4364	281	341	1116	1192	534
92.6	1835	22	150	564	1733	352	636	475	1036	370
15.4	2144	2024	941	463	1376	207	1771	422	1281	968
2.8	2587	1914	1133	1910	1978	2164	1945	444	919	2577
0.4	2041	650	1177	2551	1501	378	2392	162	438	1943
0.1	1628	1734	1817	2402	678	1340	2442	1589	2092	3143
0.0	1203	1203	841	1377	886	886	1377	777	777	777

약어: AVG = 평균; CPM = 분당 개수; STDErr = 표준 오차

[0363]

[0364] 이들 데이터는 ^3H -티미딘 혼입의 감소에 의해 증명되는 바와 같이 본 발명의 다양한 C8- 및 D11-c-Met 항체가 HGF-비의존적 MKN45 세포 증식을 억제함을 입증한다. 각각 c-Met의 구성적 과다발현 및 인산화를 보이는 SNU5 및 NUGC-4 종양 세포에서 유사한 결과가 얻어진다.

[0365] 실시예 10

[0366] c-Met 항체에 반응하여 인산화된 및 총 c-Met의 감소, 및

[0367] c-Met 세포의 도메인의 탈락의 결여

[0368] 본 실시예에서는 본 발명의 c-Met 항체를 사용한 MKN45 세포의 처리가 인산화된 c-Met (p-Met) 및 총 c-Met의 감소를 일으키는지 여부를 조사한다. 또한, 본 분석은 c-Met 항체 처리가 MKN45-조건화 배지 내로 c-Met ECD의 탈락을 유도하는지 결정하기 위해 사용된다.

[0369] c-Met 및 이소형 대조 항체를 배양 배지 (RPMI-1640 (인비트로겐, #11835), 10% (v/v) FBS (인비트로겐, #10082), 2 mM L-글루타민 (인비트로겐, #25030), 100 U/500 mL 페니실린 G, 및 100 $\mu\text{g}/500 \text{mL}$ 스트렙토마이신 (인비트로겐, #15140))로 희석하여 표 12에 지시된 최종 농도의 2X를 달성하고, 50 μl 의 2X 항체 용액을 96-웰 조직 배양 플레이트 (코스타, #3596)의 각각의 웰에 첨가하였다. MKN45 세포 (재팬 헬쓰 사이언스 파운데이션, 헬쓰 사이언스 리서치 리소스��크, #JCRB0254)를 상기 지시된 배지 내에 유지시키고, 1×10^5 세포/mL로 동일한 배지 내에 재현탁시켰다. 50 μl 의 상기 MKN45 재현탁액을 각각의 웰에 첨가하여 5×10^3 세포/웰을 달성하였다. 이어서, 플레이트를 24시간 동안 37°C에서 95% 상대 습도 및 5% (v/v) CO₂ 하에 인큐ベ이팅하고, 세포 용해물을 실시예 7에 설명된 바와 같이 제조하였다. 또한, c-Met-ECD 정량을 위해 각각의 처리로부터 조건화 배지를 수집하였다. 세포 용해물 내의 p-Met 및 총 c-Met 수준을 ELISA에 의해 결정하고, 용해물 단백질 농도 (BCA에 의해 결정됨, 피어스 #23225)에 대해 표준화하였다.

[0370] 인산화된 c-Met

[0371] 티로신 잔기 1230, 1234 및 1235에서 c-Met의 인산화를 실시예 7에 설명된 바와 같이 결정하였다.

[0372] 총 c-Met 및 c-Met ECD 탈락

[0373] 총 c-Met 및 c-Met ECD ELISA를 위해, c-Met 포획 항체를 코팅 버퍼 (바이오에프엑스, 미국 캘리포니아주 클렌도라, COAT-1000-01) 내에 2 $\mu\text{g/mL}$ 로 희석하였다. 110 μl 의 희석된 항체를 ELISA 플레이트 (그赖이너 바이오-원, 미국 노쓰 캐롤리나주 면로, #655081)에 웰 당 첨가하고, 플레이트를 4°C에서 철야 인큐베이팅하였다. 웰을 흡인여과하고, TBS-T로 2회 세척한 후, 200 μl 의 차단 버퍼 (TBS-T + 2% (w/v) BSA)로 1시간 동안 실온에서 차단하였다. 이어서, 플레이트를 TBS-T로 2회 세척하였다. 이어서, MKN45 세포 용해물, MKN45 조건화 배지, 또는 c-Met 세포의 도메인 (ECD) (서열 75) (표준품으로서)를 첨가하고, 플레이트를 2시간 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 플레이트를 TBS-T로 4회 세척하였다. 차단 버퍼 내에 희석시킨 포획 항체와 상이한 c-Met 애피토프에 결합하는 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 비오티닐화된 제2 c-Met 항체 (Mab 5D5) 100 μl 을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 2시간 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 플레이트를 TBS-T로 4회 세척하였다. 이어서, 차단 버퍼 중의 1/12,000 희석된 퍼옥시다제-접합된 스트렙타비딘 (잭슨 이뮤노리서치 래보래토리스, 미국 펜실베니아주 웨스트 그로브, #016-030-084) 100 μl 을 첨가하고, 혼합물을 1시간 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 플레이트를 TBS-T로 6회 세척하였다. 100 μl 의 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 용액 (바이오에프엑스, #TMBW-1000-01)을 각각의 웰에 첨가한 후, 100 μl 중지 용액 (바이오에프엑스, #LSTP-1000-01)을 첨가하였다. 플레이트를 스펙트라맥스 190 플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이시즈, 미국 캘리포니아주 서니베일)를 사용하여 570 nm에서 교정하면서 450 nm에서 판독하였다. 4-파라미터 분석을 이용하여 표준 곡선을 확립하고, 샘플 값을 SOFTmax 프로 3.1.2 소프트웨어 (몰레큘라 디바이시즈)를 이용하여 결정하였다.

[0374] 표 12에 도시된 바와 같이, p-Met 및 총 c-Met ELISA 데이터는 Mab C8-H241 처리가 p-Met를 77%로 및 총 c-Met를 약 67%로 최대로 감소시킴을 밝혀준다. D11-8B8 처리는 p-Met를 약 75%로 및 총 c-Met를 63%로 최대로 감소시킨다.

[0375] 실시예 8에 언급된 바와 같이, 이들 데이터는 C8- 및 D11-항체가 c-Met 분해를 유도하고 c-Met의 인산화를 감소시키는 것을 입증한다.

[0376] 표 12의 데이터는 또한 C8-H241 및 D11-8B8 c-Met 항체를 사용한 처리가 c-Met ECD의 절단 및 탈락을 유도하지 않음을 나타낸다.

표 12

MKN45 세포 용해물 및 조건화 배지에서 인산화된
c-Met, 총 c-Met, 및 c-Met 세포의 도메인의 흘림에 대한
C8- 및 D11-항체의 효과

MKN45 인산화된 c-Met의 억제%

Mab 용량 (ng/mL)	C8-H241		hIgG4		D11-8B8		hIgG2	
	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차
10000	77.0	2.4	-2.1	10.9	74.8	3.4	14.0	7.1
1000	74.1	1.3	11.1	9.7	72.8	2.0	-4.6	10.9
100	71.7	2.5	13.4	13.3	69.1	3.7	-7.6	24.4
10	42.3	3.0	5.8	11.3	37.6	5.5	6.1	11.0
	평균	표준 편차						
비례	0.0	8.0						

MKN45 총 c-Met의 억제 %

Mab 용량 (ng/mL)	C8-H241		hIgG4		D11-8B8		hIgG2	
	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차
10000	63.1	1.6	-23.7	4.1	63.0	7.0	14.1	9.1
1000	66.7	4.3	10.4	16.0	62.7	0.6	-2.4	22.4
100	61.5	3.4	-3.7	14.4	62.9	2.5	7.3	9.1
10	32.3	4.9	-3.4	13.5	34.5	8.4	15.1	7.0
	평균	표준 편차						
비례	0.0	25.9						

MKN45-조건화 배지 내의 c-Met ECD의 수준 (ng/mL)

Mab 용량 (ng/mL)	C8-H241		hIgG4		D11-8B8		hIgG2	
	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차
10000	5.1	0.5	7.4	0.7	6.2	0.2	7.0	0.1
1000	6.1	0.8	7.6	0.4	7.2	0.5	7.2	0.5
100	5.4	0.4	7.6	0.8	6.9	1.6	7.2	0.6
10	6.6	0.2	8.4	1.1	6.2	0.4	7.2	0.1
	평균	표준 편차						
비례	8.3	1.0						

[0377] 실시예 11

HGF의 부재 하에 Caki-1 종양 세포에서 항체의 효능제 활성

Caki-1 신 암종 세포는 HGF에 반응하여 증식한다. 본 발명의 c-Met 항체의 효능제 활성을 평가하기 위해, 본 실시예에서 HGF의 부재 하에 c-Met 항체에 의한 Caki-1 세포에서 c-Met의 활성화를 검사한다.

96-웰 조직 배양 플레이트의 웰에 10% (v/v) FBS, 2 mM L-글루타민 (인비트로겐, #25030), 100 U/500 mL 폐니실린 G 및 100 μ g/500 mL 스트렙토마이신 (인비트로겐, #15140)을 보충한 맥코이 5A 배양 배지 (인비트로겐, #16600) 내에서 5,000 인간 신장 투명 세포 암종 Caki-1 세포 (ATCC, #HTB-46)를 접종하였다. 24시간 동안 배양한 후, 세포를 저 혈청 배지 (0.5% (v/v) FBS)에서 추가로 24시간 동안 단식시켰다. 이어서, 세포를 항-c-Met 및 대조 항체의 존재 하에 저 혈청 배지 내에서 표 13에 지시된 최종 농도에서 24시간 동안 37°C, 95% 상대 습도, 5% (v/v) CO₂에서 배양하였다. 배양의 마지막 6시간 동안, 세포를 ³H-티미딘 (эм피 바이오메디칼스, 미국 오하이오주 솔론, #24066)로 1 μ ci/웰에서 37°C, 95% 상대 습도, 5% (v/v) CO₂에서 펼성하였다. 이어서, 배지를 제거하고, 세포를 DPBS로 1회 세척하였다. 그 후에, 200 μ l의 Optiphase Supermix (퍼킨엘머, #1200-439)를 각각의 웰에 첨가하였다. 이어서, 플레이트를 밀봉하고, 적어도 1시간 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 세포에 혼입된 ³H-티미딘을 섭광 계수기를 사용하여 1분 동안 계수하였다.

하나의 대표적인 실험으로부터의 데이터를 표 13에 제시한다.

표 13

HGF의 부재 하에 Caki-1 세포에서 ^3H -티미딘 혼입에 대한 C8- 및 D11-항체의 효과

AVG CPM										
항체 용량 (ng/mL)	hIgG2	D11-8B8	D11-C27G3	D11-S17Y	hIgG4	C8-co16	C8-H241	C8-6	mIgG	5D5
20000.0	14658	15866	16054	18616	13704	13112	12797	13194	14224	19893
3333.3	14034	15730	15765	17897	13023	13829	12702	13193	13469	19018
555.6	14048	13997	14536	16620	12393	11359	12116	13494	13200	20043
92.6	14113	13705	14718	15342	12934	11563	12142	12793	13761	15588
15.4	14473	13488	13836	14579	13271	12111	13020	13670	13638	11748
2.6	15517	14097	13325	14867	13858	13713	14407	14126	13766	12520
0.4	14341	14411	13596	14618	13412	14080	14142	14601	14357	12896
0.1	16947	15319	17690	15899	13547	15567	15530	16121	13797	14383
0.0	14992	14992	15237	15237	14622	13889	14622	13889	14531	14531
STDErr										
20000.0	398	737	549	345	219	642	268	96	465	807
3333.3	358	959	538	466	84	1086	380	382	927	954
555.6	343	809	705	284	478	437	216	4	397	505
92.6	428	502	728	237	447	292	445	212	706	394
15.4	232	737	729	160	487	267	305	107	514	318
2.6	386	173	295	404	339	299	291	711	91	221
0.4	357	568	508	392	317	556	656	281	331	323
0.1	262	550	1108	326	381	601	583	536	229	145
0.0	310	310	394	394	364	554	364	554	238	238

약어 AVG = 평균; CPM = 분당 계수; STDErr = 표준 오차.

[0383]

[0384] 이들 데이터는 c-Met 항체 C8-H241, C8-6, C8-co-16, 및 D11-8B8가 IgG 이소형 대조군에 비해 Caki-1 세포에서 티미딘-[메틸- ^3H]의 흡수를 유의하게 증가시키지 않음을 입증한다. D11-C27G3 및 D11-S17Y는 IgG 이소형 대조군에 비해 Caki-1 세포에서 티미딘-[메틸- ^3H] 흡수의 낮고 가변적이지만 통계상 유의한 자극을 보인다. 대조 c-Met 효능제 항체 5D5는 동일한 실험 조건 하에 Caki-1 세포에서 본 발명의 c-Met 항체보다 더 강한 티미딘-[메틸- ^3H] 흡수를 유도한다.

[0385]

실시예 12

HGF의 부재 하에 1차 인간 간세포에서 항체의 효능제 활성

[0387]

본 발명의 c-Met 항체의 효능제 활성을 HGF의 부재 하에, HGF-반응성인 1차 인간 간세포 (PHH)에서 추가로 평가 한다.

[0388]

냉동보존된 플레이팅 가능한 PHH 세포 (KQG 셀시스, 미국 일리노이주 시카고), RD#00002)를 37°C에서 해동시키고, 175,000 세포/mL로 어뢰 (torpedo) 항생제 믹스 (셀시스, #Z99000)와 함께 InVitroGRO CP 배지 (셀시스, #Z99029) 내에 재현탁시켰다. 0.2 mL의 재현탁된 PHH 세포를 콜라겐 I 코팅된 96-웰 미량역가 플레이트 (비디 (BD, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스), #354407)에 35,000 세포/웰로 웰 당 첨가하고, 세포를 24시간 동안 37°C 및 5% (v/v) CO_2 에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 배양 배지를 흡인여과하고, 150 μl 의 InVitroGRO HI 배지 (셀시스, #Z99009)를 어뢰 항생제 믹스 + 0.1% (w/v) BSA와 함께, 50 μl 의 c-Met 및 10 μg /mL 내지 0.0032 μg /mL의 최종 농도 범위의 대조 항체와 함께, 또는 200 ng/mL의 최종 농도의 HGF와 함께 어뢰 항생제 믹스 + 0.1% (w/v) BSA를 갖는 InVitroGRO HI 배지 내에 웰 당 첨가하였다. 세포를 48시간 동안 37°C 및 5% (v/v) CO_2 에서 인큐베이팅하고, 10 μl 의 0.1 mCi 티미딘-[메틸- ^3H]/mL (эм피 바이오메디칼스, 미국 오하이오주 솔론, #24066)을 마지막 6시간의 인큐베이션을 위해 웰 당 첨가하였다. 분석 플레이트를 -70°C에서 동결하고, 37°C에서 해동하고, 필터메이트 수거기 (퍼킨엘머)를 사용하여 유니필터 (Unifilter)-96, GF/C 플레이트 (퍼킨엘머, 미국 매사추세츠주 월텀, #6005174) 상에 수거하였다. 유니필터 플레이트를 건조시키고, 20 μl 의 마이크로신트 (Microscint) 0 섬광제 (퍼킨엘머, #6013611)를 웰 당 첨가하고, 플레이트를 1450 마이크로베타 (Microbeta) 액체 섬광 계수기 (퍼킨엘머) 상에서 계수하였다.

[0389]

표 14는 삼중 처리의 평균을 표준 편차와 함께 보여주고, 3회의 반복 실험을 대표한다.

표 14

HGF의 부재 하에 1차 인간 간세포에서 ^3H -티미딘 흡입에 대한
다양한 C8- 및 D11-항체의 효과

Ab 처리	이소형	용량:						
		10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.016 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.0032 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
D11-8B8	IgG2	1703.7	140.1	1427.0	120.3	1231.0	232.4	1122.7
D11-C27G3	IgG2	2145.7	171.0	1874.0	443.4	1753.0	199.6	1283.3
D11-S17Y	IgG2	3155.0	594.2	2566.0	173.1	1911.0	348.3	1458.7
C8-H241	IgG4	671.0	61.0	710.3	81.8	681.3	13.7	669.3
C8-co-16	IgG4	952.0	36.0	822.0	88.4	670.0	23.3	767.3
C8-6	IgG4	1042.3	91.3	892.3	107.0	801.7	77.4	792.3
5D5	mIgG1	4978.0	59.9	4452.2	287.7	3763.0	292.1	3320.0
hIgG2	이소형 대조군	650.0	39.4	645.7	11.7	711.7	16.8	636.0
hIgG4	이소형 대조군	647.3	77.1	735.0	33.8	717.3	19.4	819.0
mIgG1	이소형 대조군	616.7	24.8	581.0	81.8	601.0	82.0	596.0
		평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균
HGF	200 ng/mL	6292.7	733.0					
관체리		615.1	83.9					

[0390]

[0391] 데이터는 IgG 이소형 대조군에 비해, 본 발명의 c-Met 항체 C8-H241이 PHH 세포에서 티미딘-[메틸- ^3H] 흡수를 유의하게 증가시키지 않고; C8-6, C8-co-16, D11-8B8, D11-C27G3, 및 D11-S17Y가 티미딘-[메틸- ^3H] 흡수의 낮고 가변적이지만 통계상 유의한 자극을 보임을 입증한다. 그러나, 본 발명의 c-Met 항체의 효능제 활성은 5D5 대조 c-Met 항체보다 유의하게 더 낮다. 효능제 항체 5D5는 PHH 증식을 용량-의존적 방식으로 자극하여, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 5배 증가시킨다. 200 ng/mL에서, HGF는 ^3H -티미딘 흡수에서 5배 증가를 자극한다. Mab C8-H241은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 사용될 때에도 증식을 유도하지 않는다.

[0392] HGF 자극에 반응하여 또한 증식하는 인간 신 상피 HK2 세포에서 유사한 결과가 얻어진다.

실시예 13

HGF의 부재 하에 HepG2 세포에서 관 형태형성에 대한 항체의 효과

[0395] HGF는 기저막의 성분을 함유하는 세포외 매트릭스 물질인 마트리겔 (Matrigel)TM (베톤-디킨슨 (Becton-Dickinson), #354234)에서 성장된 HepG2 세포에서 관 형태형성 변화를 유도한다. 본 실험에서, HepG2 세포에서 관 형태형성 변화를 유도하는 데 있어서 본 발명의 항체의 HGF-유사 효능제 활성을 평가한다.

[0396] HepG2 세포 (ATCC, #HB-8065)를 10% FBS가 보충된 DMEM 내에서 배양하였다. 10% (v/v) FBS, 2 mM L-글루타민 (인비트로겐, #25030), 100 U/500 mL 폐니실린 G 및 100 $\mu\text{g}/500 \text{ mL}$ 스트렙토마이신 (인비트로겐, #15140)이 보충된 Opti-MEMI (인비트로겐, #31985) 내에 희석시킨 100 μl 의 마트리겔TM 용액 (마트리겔TM, 베톤-디킨슨)을 96-웰 조직 배양 플레이트 (코스타, #3596)의 웰 내에 플레이팅하였다. 마트리겔TM 용액이 응고한 후, 10% 혈청이 보충된 50 μl 의 배양 배지 내의 2000 HepG2 세포를 첨가하였다. 이어서, c-Met 및 대조 항체를 최종 농도 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로, 또는 HGF를 최종 농도 50 ng/mL로 세포에 첨가하였다. 세포를 5% (v/v) CO₂를 함유하는 가습 분위기 내에서 4일 동안 37°C에서 성장시켰다. 4일 후에, 상부 배지를 제거하고, PBS 중의 50 μl 의 1 mg/mL p-요오도니트로-테트라졸륨 바이올렛 (시그마, #I8377)으로 교체하고, 세포를 추가로 48시간 동안 동일한 조건 하에 인큐베이팅하였다. 염색된 32 mm 영역의 사진을 찍고, 이미지-프로 플러스 6 (미디어 사이버네틱스, 인크. (Media Cybernetics, Inc., 미국 메릴랜드주))을 사용하여 분석하였다.

[0397] 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 항체에 대해 하나의 대표적인 실험으로부터 데이터를 표 15에 제시한다.

표 15

HepG2 세포에서 관 형태형성에 대한 C8-항체의 효과

항체 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	hIgG4	C8-H241	C8-co16	C8-6	mIgG	5D5	HGF (50ng/ml)
관 형태형성	자극 없음	자극 없음	자극 없음	1.2	1.2	4.9	5.4
효능제 활성							
(자극 배수)							

[0398]

[0399] 이를 데이터는 HGF 및 대조 효능제 항체 5D5가 이소형 대조군에 비해 HepG2 세포에서 약 5배 관 형태형성 변화를 유도함을 입증한다. 이와 반대로, 본 발명의 c-Met 항체 C8-H241 및 C8-co16은 동일한 조건 하에 HepG2 세

포에서 유의한 관 형태형성 변화를 유도하지 않는 한편, c-Met 항체 C8-6은 낮은 수준의 자극만을 유도한다.

[0400] Mab D11-8-B8을 사용할 때 유사한 결과가 얻어진다.

실시예 14

세포 운동성에 대한 항체의 효과:

DU145 산란 (Scatter) 분석 및 H441 세포 스크래치 (Scratch) 분석

HGF를 사용한 자극 시에, DU 145 전립선암 세포는 서로로부터 분리하고, H441 세포는 융합 (confluent) 세포층에 만들어진 스크래치를 채운다. H441 세포는 고수준의 c-Met 발현 및 상기 수용체의 구성적 인산화를 보이지만, 여전히 HGF-반응성이다. 다음 실험은 산란 분석 및 스크래치 분석에서 세포 운동성에 대한 본 발명의 항체의 효능제 효과를 평가한다.

DU145 세포 산란 분석

MEM 배지 (인비트로겐, #11095) + 10% FBS (인비트로겐, #10082) 내에서 37°C에서 5% (v/v) CO₂ 하에 성장시킨 DU145 세포 (ATCC, #HTB-81)를 흑색 ViewPlate 96-웰 플레이트 (퍼킨엘머, 미국 매사추세츠주 월텀, #600518 2)에 2 x 10³ 세포/웰로 70 μL 부피에서 플레이팅하고, 37°C에서 5% (v/v) CO₂ 하에 철야 인큐베이팅하였다. c-Met 및 대조 항체를 세포 배양 배지에 희석하고 20 μg/mL의 최종 농도로 첨가하고, HGF를 20 ng/mL의 최종 농도로 첨가하고 (각각 30 μL 부피로 12개의 복제물로), 48시간 동안 37°C에서 5% (v/v) CO₂ 하에 인큐베이팅하였다. 이어서, 배지를 흡인여과하고, 세포를 2% 포름알데히드 내에서 15 min 동안 실온에서 고정하였다. 웰을 PBS로 3회 세척하고, 50 μL의 5 U/mL 알렉사 플루오르 488 팔로이딘 (인비트로겐, #A12379)을 30분 동안 실온에서 첨가하였다. 웰을 PBS로 3회 세척하고, 50 μL의 15 μM 프로피碇 요오다이드 (인비트로겐, #P3566)을 첨가하였다. 플레이트를 후속적으로 콜로니 내에 DU145 세포의 비율을 결정하기 위해 자키스 (Jockyss) 소프트웨어를 이용하여 아쿠멘 익스플로러 (Acumen Explorer)TM 레이저-스캐닝 형광 마이크로플레이트 세포측정기 (티티피 랩테크 엘티디 (TTP Labtech Ltd, 미국 매사추세츠주 캠브리지)) 상에서 판독하였다.

[0407] 결과를 표 16에 제시한다.

표 16

DU145 세포 산란에 대한 C8- 및 D11-항체의 효과

	콜로니 내의 DU145 세포의 비율								
	C8-H241	C8-6	C8-co-16	hIgG4	D11-8B8	hIgG2	5D5	HGF	비처리
평균	24.13	23.29	23.69	24.41	25.57	25.67	14.45	8.15	26.53
표준 편차	3.35	1.37	2.30	2.02	1.98	3.13	0.34	1.23	2.44

[0408]

[0409] 데이터는 효능제 c-Met Mab 5D5 및 HGF가 DU145 세포 산란/운동성을 유의하게 자극하지만, c-Met Mab C8-H241, C8-co-16, C8-6 또는 D11-8B8는 그렇지 않음을 입증한다.

H441 세포 스크래치 분석

[0410] H441 스크래치 분석을 위해, H441 세포 (ATCC, #HTB-174)를 RPMI-1640 (인비트로겐, #11835); 10% (v/v) FBS (인비트로겐, #10082); 2 mM L-글루타민 (인비트로겐, #25030); 100 U/500 mL 페니실린 G 및 100 μg/500 mL 스트렙토마이신 (인비트로겐, #15140)) 내에서 성장시키고, 1 x 10⁶ 세포/2 mL/웰로 6-웰 조직 배양 플레이트 (코스타, #3598)의 웰에 배양 배지 내에서 접종하였다. 플레이트를 3일 동안 95% 상대 습도 및 5% (v/v) CO₂ 하에 인큐베이팅하였다. 이어서, 배지를 흡인여과하고, 세포를 저혈청 배지 (RPMI 배지 중 0.5% (v/v) FBS)에서 16시간 동안 단식시켰다. 웰 바닥 상의 융합 세포층을 각각의 웰의 중간에서 5 mL 피펫 끝으로 스크래칭하고, 부유하는 세포를 흡인여과하였다. 나머지 세포를 저혈청 배지로 1X 세척하였다. 저혈청 배지를 첨가하고, 스크래칭된 영역을 4X 대물렌즈를 갖는 명시야 현미경을 사용하여 영상화하였다. 이들 갭 (gap)이 0시간에서의 갭으로서 규정된다.

[0412] 시험 항체를 세포에 $10 \mu\text{g/mL}$ 의 최종 농도로 첨가한 후, 37°C 에서 5% CO_2 (v/v) 하에 16시간 동안 인큐베이팅하였다. HGF를 200 ng/mL 의 최종 농도에서 시험하였다. 각각의 처리군을 적어도 이중의 웰에서 시험하였다. 스크래칭된 영역을 다시 16시간에서 명시야 현미경을 사용하여 영상화하였다. 이를 캡이 16시간에서의 캡으로서 규정된다.

[0413] 캡을 채우기 위한 H441 세포의 이동에 대한 c-Met 항체 또는 HGF의 효과를 다음과 같이 계산하였다:

$$\text{평균 변화 배분율} = \frac{[\text{처리군 (0시간에서의 캡} - \text{16시간에서의 캡})]}{\text{평균 배지군 (0시간에서의 캡} - \text{16시간에서의 캡})}] \times 100$$

[0414]

[0415] 결과를 표 17에 제시한다.

표 17

H441 스크래치 분석에서 C8-항체의 효과

항체 ($10 \mu\text{g/mL}$)	평균 %	표준 편차
	배지	7
hIgG4	98	9
C8-H241	98	9
C8-6	102	4
mIgG1	98	18
Mab 5D5	244	4
HGF (200 ng/mL)	364	9

[0416]

[0417] 데이터는 효능제 c-Met Mab 5D5 및 HGF가 H441 세포의 이동/스크래칭된 영역의 채움을 자극함을 입증한다. 동일한 조건 하에, c-Met Mab C8-H241 및 C8-6은 H441 세포 운동성을 자극하지 않는다.

[0418] 실시예 15

HepG2 세포 침습성에 대한 c-Met 항체의 효과

[0420] HGF 및 효능제 c-Met 항체는 c-Met 보유 세포의 침습을 자극한다. 본 실시예는 침습 분석에서 HGF-반응성인 HepG2 세포를 사용한 세포 침습 분석에서 본 발명의 c-Met 항체의 효능제 활성을 검사한다.

[0421] HepG2 세포 (ATCC, #HB-8065)를 무혈청 MEM 배지 (인비트로겐, #11095) 내에서 철야 단식시킨 후, $500 \mu\text{l}$ 의 총 부피 내에 5×10^4 세포를 마트리겔 침습 챔버 (비디, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스, #354483)의 상부 챔버의 각각의 웰에 첨가한 후 (여기서, 저변 챔버는 항체를 $750 \mu\text{l}$ 의 무혈청 배지의 총 부피 내에 $10 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로, 또는 HGF를 50 ng/mL 로 무혈청 배지 내에 함유한다), 48시간 동안 37°C 에서 5% (v/v) CO_2 하에 인큐베이팅하였다. 비-침습 세포를 스왑 (swab)을 사용하여 상부 챔버로부터 제거한 후, 95% 에탄올로 막 고정하고 0.2% (w/v) 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다. 세척 및 건조한 후, 침습 세포의 수를 2.5X 대물렌즈를 사용하여 염색된 세포에서 취한 사진의 Image-Pro Plus 6 Manual Tag (미디어 사이버네틱스, 인크., 미국 메릴랜드주) 소프트웨어 분석을 이용하여 계수하였다.

[0422]

결과를 표 18에 요약한다.

표 18

HepG2 세포 침습성에 대한 C8-, C8, 및 D11 항체의 효과

항체 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	2.5x 영역 당 평균 세포 수							
	hIgG4	C8-H241	C8	mIgG1	optD11	5D5	HGF (50 ng/mL)	배지
10.00	5.5	3.5	4.3	5.5	19.8	85.0	509.5	3.5
	표준 오차							
	0.5	0.9	1.3	0.5	4.1	20.4	4.5	0.5

[0423]

[0424] 데이타는 효능제 c-Met Mab 5D5 및 HGF가 HepG2 침습을 자극하지만, c-Met Mab C8-H241 및 (주) C8을 그렇지 않음을 입증한다. 뮤린 c-Met Mab optD11은 HepG2 세포 침습을 약하게 유도한다.

[0425] 실시예 16

[0426] C8- 및 D11-항체는 Caki-1 세포를 스타우로스포린-유도된 아폽토시스로부터 보호하지 않는다

[0427] 아폽토시스로부터 보호하지 않는다

[0428] HGF 및 효능제 c-Met 항체는 세포를 스타우로스포린-유도된 세포 사멸로부터 보호한다. 본 실시예는 HGF-반응성 Caki-1 세포를 사용하는 스타우로스포린-유도된 아폽토시스 분석에서 본 발명의 c-Met 항체의 효능제 활성을 검사한다.

[0429] Caki-1 세포 (ATCC, #HTB-46)를 실시예 11에 설명된 바와 같이 성장시키고, 1×10^4 세포/웰로 96 웰 플레이트 (코스타, #3596)에 배양 배지 내에서 접종하고, 항체 (세포 배양 배지 내에 30000 ng/mL 내지 3 ng/mL로 희석시킴), 또는 HGF (225 ng/mL 내지 0.02 ng/mL로 희석시킴)로 1시간 동안 예비처리한 후, 0.1 μM 스타우로스포린 (최종 농도)으로 48시간 동안 37°C에서 처리하였다. 배지를 흡인여과하고, 세포를 30분 동안 세포 사멸 검출 ELISA 키트 (로슈 어플라이드 사이언스 (Roche Applied Science, 미국 인디애나주 인디애나폴리스), #11774425001)의 0.2 mL의 용해 버퍼 성분으로 용해시켰다. 상기 키트는 450 nm에서 흡수에 의해 결정할 때 세포질 히스톤-연관 DNA 단편의 검출에 의해 세포 사멸을 측정하기 위해 20 μl 의 각각의 용해물을 사용한다. 450 nm에서 광학 밀도가 보다 높은 것은 아폽토시스가 보다 크다는 것을 나타낸다.

[0430] 표 19에 제시된 결과는 HGF는 Caki-1 세포를 스타우로스포린-유도된 아폽토시스로부터 보호하지만, c-Met Mab C8-H241, C8-6, 및 D11-8B8은 그렇지 않다.

표 19

Caki-1 세포에서 스타우로스포린-유도된 아폽토시스에 대한 c-Met 항체의 효과

항체 용량 (ng/mL)	평균 A450 nm							
	hIgG4	C8-H241	C8-6	HGF	hIgG2	D11-8B8	배지	STS*
3	0.95	0.83	1.09	0.97 (0.02 ng/mL)	0.95	1.02	0.24	0.87
30	0.98	0.84	1.02	0.93 (0.23 ng/mL)	0.91	0.91		
300	0.87	0.86	0.97	0.73 (2.25 ng/mL)	0.95	0.81		
3000	0.98	0.85	0.92	0.58 (22.5 ng/mL)	0.95	0.91		
30000	0.91	0.90	0.96	0.45 (225 ng/mL)	0.94	0.87		
표준 오차								
3	0.03	0.02	0.19	0.02	0.07	0.01	0.01	0.03
30	0.03	0.01	0.14	0.06	0.00	0.11		
300	0.10	0.03	0.06	0.03	0.02	0.02		
3000	0.04	0.01	0.12	0.01	0.06	0.02		
30000	0.00	0.01	0.13	0.06	0.04	0.03		

*STS: 스타우로스포린

[0431]

[0432] 실시예 17

[0433] 혈관신생에 대한 C8-항체의 효과

[0434] HGF 및 효능제 c-Met 항체는 혈관신생을 자극한다. 본 발명의 c-Met 항체를 ADSC/ECFC 동시-배양 관 형성 분석에서 상기 기능적 효능제 특성에 대해 평가한다. 지방-유래 줄기 세포 (ADSC)는 HGF를 발현하고; 내피 콜로니 형성 세포 (ECFC)은 HGF에 의한 자극에 반응하여 관을 형성한다.

[0435] ADCS (론자 (Lonza, 미국 뉴저지주 알렌데일), #PT-5006)를 분리하고, 기초 배지 (MCDB-131 배지 (시그마, 미국 미주리주 세인트루이스 #M8537)) + 30 µg/mL L-아스코르브산 2-포스페이트 (시그마 #A8960), 1 µM 텍사메타손 (시그마 #D4902), 50 µg/mL 토브라마이신 (시그마 #T4014), 10 µg/mL 셀 프라임 (Cell Prime) r-트랜스페린 AF (밀리포어 #9701) + 10 µg/mL 뉴셀린 (Nucellin; 릴리 (Lilly) 인간 재조합 인슐린) 내에 재현탁시키고, 4 x 10⁴ 세포/웰로 96-웰 플레이트 내에 플레이팅하고, 37°C에서 5% (v/v) CO₂ 하에 철야 인큐베이팅하였다. 배지를 흡인여과하고, 500 µg/mL 나트륨 헤파린 (시그마, #H3393)을 기초 배지 내에 100 µl/웰로 첨가한 후; 세포를 1시간 동안 37°C에서 인큐베이팅하였다. 웰을 흡인여과하고, 100 µl 기초 배지로 1회 세척하고, ECFC를 다음과 같이 첨가하였다: ECFC (엔드제니터 테크놀로지스, 인크. (EndGenitor Technologies, Inc., 미국 인디애나주 인디애나폴리스) #EGT-ECFC100506)를 분리하고, 기초 배지 내에 세척하고, 기초 배지 내에 재현탁하고, 96-웰 플레이트에서 ADSC의 상단에 4 x 10³ 세포/웰로 첨가하였다. 37°C에서 4시간 인큐베이션 후에, HGF 및 항체를 세포 배양 배지 내에 희석하고, 별개의 웰에 다음 최종 농도로 첨가하였다: HGF: 100 ng/mL; 항체: 10 µg/mL. HGF 항체 (알앤디 시스템즈 #AB-294-NA)를 또한 10 µg/mL 최종 농도로 첨가하였다. 세포를 추가 4일 동안 37°C에서 인큐베이팅하였다. 웰을 흡인여과하고, 100 µl/웰의 1% 파라포름알데히드를 첨가한 후, 20-30분 동안 인큐베이팅하였다. 세포를 PBS-BSA (0.1% BSA, 인비트로젠 #15260-037)로 3회 세척하고, 50 µl의 1 µg /mL 항-인간 CD31 항체 (알앤디 시스템즈, #AF806)로 1시간 동안 37°C에서 또는 밤새 4°C에서 처리하였다. 세포를 PBS-BSA로 2회 세척하고, 50 µl의 4 µg/mL 항-양 IgG 알렉사 플루오르488 접합체 (인비트로젠, #A11015)으로 1시간 동안 실온에서 처리하였다. 세포를 PBS-BSA로 2회 세척하고, 100 µl의 Hoechst3342 염료로 염색하고, 셀로믹스 어레이스캔 (Cellomics ArrayScan) (써모 피셔 사이언티픽, 미국 매사추세츠주 월텀) 상에서 판독하였다. vHCS View 버전 1.4.6 소프트웨어를 사용하여 총 관 면적을 결정하고, 이를 사용하여 혈관신생의 자극에 대한 다양한 항체 및 HGF의 효과를 평가하였다.

[0436] 결과를 표 20에 제시한다.

표 20

ECFC 세포에서 관 형성에 대한 C8-항체의 효과

총 관 면적								
	기초 배지	hIgG4	C8-H241	C8-6	mIgG1	5D5	HGF Ab	HGF
평균	67753.3	90134.3	22979.7	65224.0	125538.3	147237.3	22824.3	212104.7
표준 편차	24221.6	17741.1	604.9	18275.9	34702.4	18748.1	6586.0	16588.5

[0437]

[0438] 결과는 C8-H241 및 C8-6은 배지 또는 그의 상응하는 이소형 대조 항체에 비해 관 형성을 자극하지 않는 반면, HGF 및 효능제 Mab 5D5는 관 형성을 유의하게 자극한다.

[0439] 실시예 18

[0440] 이종이식편 모델에서 HGF-비의존적 및 HGF-의존적 종양 세포 성장의 억제

[0441] 본 발명의 c-Met 항체에 의한 HGF-비의존적 및 HGF-의존적 종양 세포 성장의 억제를 각각 MKN45 세포 및 U87MG (인간 아교모세포종) 세포 마우스 이종이식편 모델을 사용하는 생체내 분석에서 검사한다. MKN45 세포는 HGF의 부재 하에 고수준의 c-Met를 구성적으로 발현하고 c-Met 인산화를 유도한다. U87MG 세포는 자가분비 방식으로 HGF를 분비하고, HGF-반응성이다.

[0442] MKN45 세포 (재팬 헬쓰 사이언스 파운데이션, 헬쓰 사이언스 리서치 리소스, #JCRB0254)를 실시예 8에 설명된 바와 같이 배양액 내에서 팽창시키고, 단일 세포로 트립신처리하고, 수거하고, PBS 내에 재현탁시켰다. PBS 중의 2백만 개의 MKN45 세포를 무흉선 누드 마우스 (할란 (Harlan, 미국 인디애나주 인디애나폴리스))의 등쪽 옆구리 내로 피하 주사하였다. c-Met 항체 및 상응하는 IgG2 및 IgG4 항체를 PBS (pH 7.2) 내에 희석하고, 종양 세포 이식 후 3 또는 7일에 시작하여 1, 5, 또는 20 mg/mL에서 정맥내 주사에 의해 매주 기초로 투여하였다. 종양 세포 성장의 억제는 처리의 과정 동안 매주 2회 종양 부피의 3차원 캘리퍼스 (caliper) 측정에 의해 결정하였다. 체중을 독성의 일반적인 측정치로서 측정하였다.

[0443] U87MG 세포 (ATCC, #HTB-14)를 MEM (인비트로겐, #11095)에서 37°C에서 성장시키고, 배양액 내에서 팽창시키고, 단일 세포로 트립신처리하고, 수거하고, PBS (인비트로겐, #14190) 내에 재현탁시켰다. 5백만 개의 세포를 무흉선 누드 마우스 (할란, 미국 인디애나주 인디애나폴리스)의 등쪽 옆구리 내로 피하 주사하였다. c-Met 항체를 PBS 내에 희석하고, 종양 세포 이식 후 7일에 시작하여 표 22에 지시된 용량에서 정맥내 주사에 의해 매주 기초로 투여하였다. 대조 IgG4 항체는 10 mg/kg에서 투여하였다. 종양 세포 성장의 억제는 처리의 과정 동안 매주 2회 종양 부피의 3차원 캘리퍼스 측정에 의해 결정하였다. 체중을 독성의 일반적인 측정치로서 측정하였다.

[0444] MKN45 세포 이종이식편 모델에서 4개의 항체 D11-8B8, C8-H241, C8-6, 및 C8-co-16의 항-종양 효능을 표 21에 요약한다. "최대 억제 %"는 상응하는 대조 항체를 사용한 처리 (0% 억제)에 비해 종양 성장의 억제 %를 나타낸다.

[0445] 5 mg/kg 또는 20 mg/kg에서 투여할 때, 4개의 모든 c-Met 항체는 그의 상응하는 IgG 이소형 대조군에 비해 MKN45 종양 세포 성장의 유의한 억제를 일으킨다.

표 21

생체 내에서 HGF-의존 MKN45 종양 성장에 대한
C8- 및 D11-항체의 효과

항체	용량 수준 (mg/kg)	최대 억제 %	p 값
D11-8B8	5	53	p<0.05
	20	56	p<0.01
C8-H241	1	39	NS
	5	63	p<0.01
	20	51	p<0.05
C8-6	1	60	p<0.001
	5	59	p<0.01
	20	73	p<0.001
C8-Co-16	1	36	NS
	5	60	p<0.001
	20	85	p<0.001

[0446]

[0447] C8-H241에 의한 종양 세포 성장의 용량-의존적 억제를 또한 표 22에 요약된 바와 같이 HGF-의존적 U87MG 세포 이종이식편 모델에서 관찰한다.

[0448] "최대 억제 %"는 상응하는 IgG4 대조 항체를 사용한 처리 (0% 억제)에 비해 종양 성장의 억제 %를 나타낸다.

표 22

생체 내에서 HGF-의존 U87MG 종양 성장에 대한
C8-H241 항체의 효과

항체	용량 수준 (mg/kg)	최대 억제 %	p 값
C8-H241	0.1	45.2	NS
C8-H241	0.3	86.8	p<0.001
C8-H241	1	91.9	p<0.001
C8-H241	3	91	p<0.001
C8-H241	10	94.8	p<0.001

[0449]

[0450] 5 및 20 mg/kg에서, C8-H241 항체는 또한 H441 비-소세포 폐암 이종이식편 종양 성장을 각각 58% 및 60% 억제한다. H441 세포는 고수준의 c-Met 발현 및 c-Met의 구성적 인산화를 보이지만, 여전히 HGF에 반응성이다.

[0451] 실시예 19[0452] MKN45 이종이식편 종양에서 총 및 인산화된 c-Met의 항체 감소

MKN45 (HGF-비의존) 이종이식편 종양을 보유하는 마우스에서 총 c-Met 및 인산화된 c-Met에 대한 c-Met 항체 C8-H241의 생체내 활성을 본 실시예에서 조사한다. 총 c-Met 및 인산화된 c-Met (티로신 1349에서) 모두의 용량-의존적 감소를 항체 투여 후 24시간 관찰한다.

[0454] MKN45 세포를 실시예 8에 설명된 바와 같이 배양액 내에서 팽창시키고, 단일 세포로 트립신처리하고, 수거하였다. PBS 중의 2백만 개의 MKN45 세포를 무흉선 누드 마우스 (할란, 미국 인디애나주 인디애나폴리스)의 등쪽 옆구리 내로 피하 주사하였다. c-Met 항체 C8-H241을 PBS (pH 7.2) 내에 희석하고, 2.5, 5, 10, 20, 및 40 mg/kg에서 종양 세포 이식 8일 후에 정맥내 주사에 의해 투여하였다. 대조 항체 hIgG4는 40 mg/kg에서 투여하였다. 처리 24시간 후에, 종양을 제거하고, 급속 동결하고, 일시적으로 -80°C에서 저장하고, 용해 버퍼 (5 mM 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA), 5 mM 에틸렌글리콜-비스(b-아미노에틸)-N,N,N',N'-테트라아세트산 (EGTA), 50 mM HEPES, 20 mM 피로인산나트륨 (써모 피셔 사이언티픽, #S390-500), 150 mM NaCl, 20 mM NaF, 1% (v/v) 옥틸페녹시 폴리에톡시 에탄올 (TRITON®-X 100), 완전 프로테아제 억제제, EDTA 비함유 (로슈, 스위스 바젤, #1836153) 포스파타제 억제제 카테일 I (시그마 #P2850) 및 포스파타제 억제제 카테일 II (시그마 #P5726)) 내에 용해시켰다.

[0455] 총 c-Met ELISA

[0456] 총 c-Met ELISA를 위해, c-Met 포획 항체를 Bup H 코팅 버퍼 (써모 피셔 사이언티픽, 미국 매사추세츠주 월텀, #28382) 내에 2 µg/mL로 희석하였다. 100 µl의 희석된 항체를 ELISA 플레이트 (써모 피셔 사이언티픽, 미국 매사추세츠주 월텀, #439454)에 웰 당 첨가하고, 플레이트를 4°C에서 철야 인큐베이팅하였다. 웰을 흡인여과하고, TBS-T로 2회 세척한 후, 200 µl의 차단 버퍼 (TBS-T + 2% (w/v) BSA)로 1시간 동안 실온에서 차단하였다. 플레이트를 TBS-T로 2회 세척하였다. 이어서, 종양 용해물 또는 c-Met 세포의 도메인 (서열 75의 아미노산 25-932)의 희석액을 첨가하고, 플레이트를 4°C에서 철야 인큐베이팅하였다. 이어서, 플레이트를 TBS-T로 3회 세척하였다. 이어서, 차단 버퍼 내에 희석시킨 0.5 µg/mL의 비오티닐화된 Mab 5D5 (포획 항체와 상이한 c-Met 에피토프에 결합하는 제2 c-Met 항체로서) 100 µl을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 2시간 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 플레이트를 TBS-T로 3회 세척하였다. 이어서, 차단 버퍼 내에 1/10,000 희석된 페옥시다제-접합된 스트렙타비딘 (잭슨 이뮤노리서치 래보래토리스, 미국 펜실베니아주 웨스트 그로브, #016-030-084) 100 µl을 첨가하고, 혼합물을 1시간 동안 실온에서 인큐ベ이팅하였다. 이어서, 플레이트를 TBS-T로 3회 세척하였다. 100 µl의 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 용액 (바이오에프엑스, #TMBW-1000-01)을 각각의 웰에 첨가한 후, 100 µl 중지 용액 (바이오에프엑스, #LSTP-1000-01)을 첨가하였다. 플레이트를 SOFTmax Pro 3.1.2 소프트웨어 (몰레큘라 디바이시즈)를 사용하여 스펙트라맥스 250 플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이시즈, 미국 캘리포니아주 서니베일)를 이용하여 450 nm에서 판독하였다.

[0457] 인산화된 c-Met ELISA

[0458] 포스포-c-Met ELISA를 위해, c-Met 포획 항체를 Bup H 코팅 버퍼 (써모 피셔 사이언티픽, 미국 매사추세츠주 월텀, #28382) 내에 2 µg/mL로 희석하였다. 100 µl의 희석된 항체를 ELISA 플레이트 (써모 피셔 사이언티픽, 미국 매사추세츠주 월텀, #439454)에 웰 당 첨가하고, 플레이트를 4°C에서 철야 인큐베이팅하였다. 웰을 흡인여과하고, TBS-T로 2회 세척한 후, 200 µl의 차단 버퍼 (TBS-T + 2% (w/v) BSA)로 1시간 동안 실온에서 차단하였다. 플레이트를 TBS-T로 2회 세척하였다. 이어서, MKN45 세포 용해물을 첨가하고, 플레이트를 실온에서 철야 인큐베이팅하였다. 이어서, 플레이트를 TBS-T로 3회 세척하였다. 이어서, 차단 버퍼 내에 희석시킨 0.5 µg/mL 항-pY1349 c-Met 항체 (셀 시그널링 테크놀로지, 미국 매사추세츠주 덴버스, #3121) 100 µl을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 2시간 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 플레이트를 TBS-T로 3회 세척하였다. 차단 버퍼 내에 1/10,000 희석된 페옥시다제 접합된 항-토끼 IgG (잭슨 이뮤노리서치 래보래토리스, 미국 펜실베니아주 웨스트 그로브, #111-035-144) 100 µl을 첨가하고, 혼합물을 1시간 동안 실온에서 인큐ベ이팅하였다. 이어서, 플레이트를 TBS-T로 3회 세척하였다. 100 µl의 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 용액 (바이오에프엑스, #TMBW-1000-01)을 각각의 웰에 첨가한 후, 100 µl 중지 용액 (바이오에프엑스, #LSTP-1000-01)을 첨가하였다. 플레이트를 SOFTmax Pro 3.1.2 소프트웨어 (몰레큘라 디바이시즈)를 이용하여 스펙트라맥스 250 플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이시즈, 미국 캘리포니아주 서니베일)를 사용하여 450 nm에서 판독하였다.

[0459] 결과를 표 23에 제시한다.

[0460] 데이타는 24시간 동안 Mab C8-H241을 사용한 MKN45 이종이식편 종양의 생체내 처리가 이들 조건 하에 총 c-Met를 약 43%로 및 인산화된 c-Met를 약 73%로 최대로 감소시킴을 입증한다.

표 23

생체 내에서 c-Met 항체 C8-H241을 사용한 24시간 처리 후에
MKN45 이종이식편 종양에서 총 및 인산화된 c-Met의 감소

총 c-Met의 감소							
액체%	C8-H241						hIgG4
	PBS	2.5 mpk	5 mpk	10 mpk	20 mpk	40 mpk	
평균 억제%	-88.51	-8.43	4.26	25.07	42.85	30.62	0.00
표준 편차 억제%	62.63	-8.43	36.84	26.88	17.67	35.95	41.23
인산화된 c-Met의 감소							
액체%	C8-H241						hIgG4
	PBS	2.5 mpk	5 mpk	10 mpk	20 mpk	40 mpk	
평균 억제%	12.16	22.89	17.56	53.21	67.04	73.42	0.00
표준 편차 억제%	23.89	22.89	37.05	9.90	6.58	7.04	48.81

mpk: mg/kg

[0461]

아미노산 및 뉴클레오티드 서열

정체 가변 구역 아미노산 서열

D11-S17Y (서열 1)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCSVSSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIYGTSYLAS
GIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFGQGTKLEIK

D11-8B8 (서열 2)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCSVSSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIYGTSYLAS
GIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFGQGTKLEIK

D11-C27G3 (서열 3)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCSVSSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIYGTSRLRS
GIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFGQGTKLEIK

C8-6 (서열 4)

DIQMTQSPSSLASAVGDRVITCSVSSSVSSIYLHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCIQYSGYPLTFGGGTKEIK

C8-H241 (서열 5)

DIQMTQSPSSLASAVGDRVITCSVSSSVSSIYLHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQVYSGYPLTFGGGTKEIK

C8-co-16 (서열 6)

DIQMTQSPSSLASAVGDRVITCSVSSSVRSIYLHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLA
SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQVYRGYPLTFGGGTKEIK

[0463]

경쇄 가변 구역 핵산 서열

D11-S17Y (서열 7)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTGTCTTGTCAGGGAAAGAGCCACC
 CTCTCCTGCAGTGTCAAGTATAAGTTCACCAACTTACACTGGTACCGAGCAGAAA
 CCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCATCTATGGCACATCCTATCTGGCTCTGGCATCCCA
 GACAGGTTCACTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTCACTCACCATCAGCAGACTGGAG
 CCTGAAGAGTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAGTTTGGC
 CAAGGGACCAAGTGGAGATCAAA

D11-8B8 (서열 8)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTGTCTTGTCAGGGAAAGAGCCACC
 CTCTCCTGCAGTGTCAAGTATAAGTTCACCAACTTACACTGGTACCGAGCAGAAA
 CCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCATCTATGGCACATCCTACCTGGCTCTGGCATCCCA
 GACAGGTTCACTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTCACTCACCATCAGCAGACTGGAG
 CCTGAAGAGTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAGTTTGGC
 CAAGGGACCAAGTGGAGATCAAA

D11-C27G3 (서열 9)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTGTCTTGTCAGGGAAAGAGCCACC
 CTCTCCTGCAGTGTCAAGTATAAGTTCACCAACTTACACTGGTACCGAGCAGAAA
 CCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCATCTATGGCACATCCAGACTGAGATCTGGCATCCCA
 GACAGGTTCACTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTCACTCACCATCAGCAGACTGGAG
 CCTGAAGAGTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAGTTTGGC
 CAAGGGACCAAGTGGAGATCAAA

C8-6 (서열 10)

GACATCCAGATGCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
 ATCACTTGCAGTGTCAAGTGTAAAGTTCATTTACTGCACTGGTATCAGCAGAAA
 CCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCTGATCTAGCACATCCAACCTGGCTCTGGAGTCCCA
 TCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTTCACCATCAGCAGTCTGCAA

[0464]

CCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGTATTCACTACAGTGTTACCCGCTCACGTTGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA

C8-H24I (서열 11)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTGCAGTGTCAAGTGTAAAGTCCATTACTGCACTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGAAAGCCCCAAGCTCCTGATCTAGCACATCCAATTGGCTCTGGAGTCCC
TCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACACTCACCACAGCAGTCTGCAA
CCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGTCACTACAGTGTTACCCGCTCACGTTGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA

C8-eo-16 (서열 12)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTGCAGTGTCAAGTGTACGTTCCATTACTGCACTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGAAAGCCCCAAGCTCCTGATCTAGCACATCCAATTGGCTCTGGAGTCCC
TCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACACTCACCACAGCAGTCTGCAA
CCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGTCACTACAGTGTTACAGGGTTACCCGCTCACGTTGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA

중쇄 가변 구역 아미노산 서열

D11-S17Y (서열 13)

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFTSRYIHWRQAPGQGLEWMGWIYP
VTGDTYYNEKFGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGAFFYWG
QQGTLVTVS

D11-8B8 (서열 14)

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFTSRYIHWRQAPGQGLEWMGWIYP
VTGDTYYIEKFGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGAFFYWG
QGTLVTVS

D11-C27G3 (서열 15)

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFTSRYIHWVRQAPGQGLEWMGWIYP
VTGDTYYREPKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGAFYYWG
QGTLVTVS

C8-6 (서열 16)

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGRV
NPNRGGTTYNQKFEGRVMTTDSTSTAYMELRSLSRSDDTAVYYCARTNWLDY
WGQGTTVTVS

C8-H24I (서열 17)

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGRV
NPNRGGTTYNQKFEGRVMTTDSTSTAYMELRSLSRSDDTAVYYCARANWLDY
WGQGTTVTVS

C8-co-16 (서열 18)

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGRV
NPYRGSTTYNQKFEGRVMTTDSTSTAYMELRSLSRSDDTAVYYCARANILDYW
GQGTTVTVS

중쇄 가변 구역 핵산 서열

D11-S17Y (서열 19)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGTGAGGTGAAGAAGCCTGGTCCTCGGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTCTGGCTACACCTTCACAAGTAGGTATATACACTGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGATTATCCTGTAAGTGGTGTACTTACTAC
AACGAGAAAGTTCAAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTAC
GGAGCTTTTACTACTGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGCTCC

[0466]

D11-8B8 (서열 20)

CAGGTGCAGCTGGTCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGTCCTCGGTGAAGGTC
 TCCTGCAAGGCTCTGGCTACACCTTCACAAGTAGGTATATACTACACTGGTGCGACAGGCC
 CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGATTATCCTGTAACGGTGTACTTAC
 ATCGAGAAAGTTCAAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGAACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
 ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTAT
 GGTGCTTTTCTACTGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCC

D11-C27G3 (서열 21)

CAGGTGCAGCTGGTCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGTCCTCGGTGAAGGTC
 TCCTGCAAGGCTCTGGCTACACCTTCACAAGTAGGTATATACTACACTGGTGCGACAGGCC
 CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGATTATCCTGTAACGGTGTACTTAC
 AGAGAGCCTTCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGAACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
 ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTAT
 GGGCTTTTACTACTGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCC

C8-6 (서열 22)

CAGGTTCAGCTGGTCAGTCTGGTGTGAGGTGAAGAAGCCTGGTCCTCAGTGAAGGTC
 TCCTGCAAGGCTCTGGTTACACCTTACCGACTACTACATGCACTGGTGCGTCAGGCC
 CCTGGTCAAGGTCTTGAGTGGATGGGTGTTAACCTAACCGGGGTGGTACTACCTAC
 AACCAAGAATTGGAGGGCGTGTCAACCAGTACGACACAGACATCCACGAGCACAGCCTAC
 ATGGAGCTGCGTAGCCTGCGTTCTGACGACACGCCGTGTATTACTGTGCGCGTACGAAC
 TGGCTTGACTACTGGGCCAGGGCACCCGTACCGTCTCC

C8-H24I (서열 23)

CAGGTTCAGCTGGTCAGTCTGGTGTGAGGTGAAGAAGCCTGGTCCTCAGTGAAGGTC
 TCCTGCAAGGCTCTGGTTACACCTTACCGACTACTACATGCACTGGTGCGTCAGGCC
 CCTGGTCAAGGTCTTGAGTGGATGGGTGTTAACCTAACCGGGAGGGTACTACCTAC
 AACCAAGAATTGGAGGGCGTGTCAACCAGTACGACACAGACATCCACGAGCACAGCCTAC
 ATGGAGCTGCGTAGCCTGCGTTCTGACGACACGCCGTGTATTACTGTGCGCGTGCAC
 TGGCTTGACTACTGGGCCAGGGCACCCGTACCGTCTCC

[0467]

C8-co-16 (서열 24)

CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCGGTGTGAGGTGAAGAAGCCTGGTGCCTCAGTGAAGGTC
 TCCTGCAAGGCTCTGGTACACATTCACTGACTACTACATGCACTGGGTGCGTCAGGCC
 CCTGGTCAAGGCTTGAGTGGATGGGCGTGTAAATCCTATCGGGTAGTACTACCTAC
 AACCCAGAAATTGAGGGCCGTGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC
 ATGGAGCTGCGTAGCCTGCGTTCTGACGACACGGCGTGTATTACTGTGCGCGTGCAC
 ATTCTTGACTACTGGGCCAGGGCACCACCGTCACCGTCTCC

완전 경쇄 아미노산 서열

D11-S17Y 카파 (서열 25)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSVSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIYGTSYLAS
 GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFGQGTKLEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

D11-8B8 카파 (서열 26)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSVSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIYGTSYLAS
 GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFGQGTKLEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

D11-C27G3 카파 (서열 27)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSVSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIYGTSRLRS
 GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFGQGTKLEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

C8-6 카파 (서열 28)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCSVSSVSSIYLHWYQQKPGKAPKLLIYSTNLAS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCIQYSGYPLTFGGGTKVEIKRTVAAP

SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

C8-H241 카파 (서열 29)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSVSSIYLHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLAS
GVPSRFSGSQGTDFTLTISLQPEDFATYYCQVYSGYPLTFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

C8-co-16 카파 (서열 30)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSVRSIYLHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLA
SGVPSRFSGSQGTDFTLTISLQPEDFATYYCQVYRGYPLTFGGGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

완전 경쇄 혼산 서열

D11-S17Y IgG2 LC (서열 31)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCGTCTTGCTCCAGGGAAAGAGCCACC
CTCTCCTGCAGTGTCAAGTATAAGTTCACCAACTTACACTGGTACCCAGCAGAAA
CCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGCACATCCTACCTGGCTCTGGCATCCCA
GACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAGTTTCGGC
CAAGGGACCAAGTGGAGATCAAACGAACGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGAAACTGCGCTCTGTTGTGCCTGTAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACCCCTCCAATCGGGTAACCTC
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGGCTGCGAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTGCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGAGAGTGC

D11-8B8 IgG2 LC (서열 32)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCGTCTTGCTCCAGGGAAAGAGCCACC
CTCTCCTGCAGTGTCAAGTATAAGTTCACCAACTTACACTGGTACCCAGCAGAAA
CCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGCACATCCTACCTGGCTCTGGCATCCCA
GACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAGTTTCGGC
CAAGGGACCAAGTGGAGATCAAACGAACGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGAAACTGCGCTCTGTTGTGCCTGCTGTAATAACTTC

[0469]

TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGTAACCTCC
CAGGAGAGTGTCAAGAGCAGCACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGGAGAACACAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

D11-C27G3 IgG2 LC (서열 33)

GAAATTGTGTTGACGCACTCCAGGCACCTGTCTTGCTCCAGGGAAAGAGCCACC
CTCTCTGCAGTGTCAAGTATAAGTCCACCAACTTACACTGGTACAGCAGAAA
CCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGCACATCCAGACTGAGATCTGGCATTCCA
GACAGGTTAGTGGCAGTGGGTGGAGACAGACTTCACCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTGCAAGTGTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAGTTCCGC
CAAGGGACCAAGTGGAGATCAAACGAACGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGCGCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGTAACCTCC
CAGGAGAGTGTCAAGAGCAGCACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGGAGAACACAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

C8-6 IgG4 LC (서열 34)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCAGTGTCAAGTGTATCTCCATTACTTGCACACTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATAGCACATCCAACCTGGCTCTGGAGTCCA
TCAAGGTTAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAA
CCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGTATTCACTACAGTGGTTACCGCTCACGTTCCGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGCGCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGTAACCTCC
CAGGAGAGTGTCAAGAGCAGGAGCACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGGAGAACACAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

C8-H241 IgG4 LC (서열 35)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCAGTGTCAAGTGTATCTCCATTACTTGCACACTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATAGCACATCCAACCTGGCTCTGGAGTCCA
TCAAGGTTAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAA
CCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGTCAAGTCTACAGTGGTTACCGCTCACGTTCCGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGCGCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGTAACCTCC
CAGGAGAGTGTCAAGAGCAGGAGCACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGGAGAACACAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

C8-eo16 IgG4 LC (서열 36)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGGAGACAGAGTCACC
 ATCACTTGAGTGTCAAGTCAGCTAAGCTCTGATCTAGCACATCCAACCTGGCTCTGGAGTC
 CCAGGGAAAGCCCTAAGCTCTGATCTAGCACATCCAACCTGGCTCTGGAGTC
 TCAAGGTTAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTC
 CCTGAAGATTTGCAACTACTGTCAGGGTACAGGGGTTACCCGCTCACGGTTC
 GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACACTGGCTGACCATCTGCTTCATCTTCCC
 CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGAACTGCCTCTGTTGTGCTGTAATAACTTC
 TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC
 CAGGAGAGTGTACAGAGCAGCAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC
 ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCC
 CGCCTGAGCTGCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

완전 중쇄 아미노산 서열

D11-S17Y IgG2 (서열 37)

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFTSRYIHWVRQAPGQGLEWMWIYP
 VTGDTYYNEKFGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGAFYYW
 GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGA
 LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFQGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER
 KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN
 WYVDGMEVHNNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
 PAPIEKTISKKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPG

D11-8B8 IgG2 (서열 38)

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFTSRYIHWVRQAPGQGLEWMWIYP
 VTGDTYYIEKFGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGAFFYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFQGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK
 CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW
 YVDGMEVHNNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
 APIEKTISKKGQREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG

[0471]

QPENNYKTPPMULDGSFFYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMEALHNHYTQ
KSLSLSPG

D11-C27G3 IgG2 (서열 39)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSRYIHWVRQAPGQGLEWMWIYP
VTGDTYYREPFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGAFYWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK
CCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVQFNW
YVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
APIEKTIKKGQREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTPPMULDGSFFYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMEALHNHYTQ
KSLSLSPG

C8-6 IgG2 (서열 40)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGRV
NPNRGGTTYNQKFEGRVTMTDTSTSTAYMELRSRSDDTAVYYCARTNWLDY
WGQGTTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE
RKCCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVQFN
WYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PAPIEKTIKKGQREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQENNYKTPPMULDGSFFYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMEALHNHYT
QKSLSLSPG

C8-H241 IgG2 (서열 41)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGRV
NPNRGGTTYNQKFEGRVTMTDTSTSTAYMELRSRSDDTAVYYCARANWLDY
WGQGTTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE
RKCCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVQFN
WYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL

[0472]

PAPIEKTIKTKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTPPMULDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPG

C8-co-16 IgG2(서열 42)

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGRV
NPYRGSTTYNQKFEGRVTMTDTSTSTAYMELRSLSRSDDTAVYYCARANILDYW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFLAPCRSRTSESTAALGLVKDYFPEPVTWSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER
KCCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPKPKDLMISRTPEVCVVVDVSHEDPEVQFN
WYVDGMEVHNNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVHWDLNGKEYKCKVSNKGL
PAPIEKTIKTKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTPPMULDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPG

완전 중쇄 혼산 서열

D11-S17Y IgG2 HC (서열 43)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGTCTCGGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTCTGGCTACACCTTACAAGTAGGTATATACTGGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGGATGGATTATCCTGTAACTGGTGATACTTAC
AACGAGAAGTTCAAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAATCACGACACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGCCCTGAGATCTGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCGAGAGCTAT
GGGGCTTTACTACTGGGCCAGGGCACCTGGTCAACGGTCTCCGGCTCCACCAAG
GCCCATCGGCTTCCCGCTAGGCCCTGCTCCAGGAGCACCTGGAGACACAGCGCC
CTGGGCTGCCGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGACTCAGGC
GCCCTGACCAGGGCGTGCACACCTCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTGAACGGTGCCTCCAGCAACTTCCGGCACCCAGACCTACACCTGCAAC
GTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTC
GAGTGCCCACCGTGGCCAGCACCCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCCTTCCCCCA
AAACCCAAGGACACCCCTATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACTGCGTGGTGGAC
GTGAGGACAGGAAGACCCCGAGGTCCAGITCAACTGGTACGGTGGACGGCATGGAGGTGCAT
AATGCCAAGGACAAAGGCCACGGGAGGAGATGTCACACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTC
CTCACCGTCGTGACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAAC
AAAGGCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACAAAGGGCAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGTAACCCCTGCCCCCATCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACCGCTG
ACCTGCTGGTCAAGGCTTCAACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCATGC

[0473]

TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCCCTGTCTCCG
GGT

D11-8B8 IgG2 HC (서열 44)

CAGGTGCAGCTGGTCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGTCTCGGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGGTCTGGCTACACCTTCACAAGTAGGTATATACTGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGGTTGAGTGGATGGATTATCCTGTAACTGGTGATACTTACTAC
ATCGAGAAAGTCAAGGGCAGAGTCACGATTAACGGCGAACATCCACGAGCACAGGCC
ATGGAGCTGAGCAGCTGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTAT
GGTGTCTTCTGAGGACACGGCGTGTACGGGACCCCTGGTCAACGGCTCCACCAAG
GGCCCATCGGTCTTCCGCTAGGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGGCC
CTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCAACCGGGTGAACGGTGTGGAAACTCAGGC
GCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTCCGGCTGTACAGTCAGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTACCCGCTGAGGACACCTGGGACCCAGACCTACACCTGCAAC
GTAGATCACAAGGCCAGCAACCCAAGGTGAGCAGACAGTGGAGCGCAAATGTTGTC
GAGTCCCACCGTGGCCAGCACCTGTGGCAGGACCGTCAAGTCTTCCCTCCCCCA
AAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACAGTCAGTGGTGGAC
GTGAGGACAGAAGACCCGAGGGTCAACTGGTACGGTGGACGGCATGGAGGTGCA
AATGCCAAGACAAGCCACGGGAGGAGCAGTCACAGCACGTTCCGTGTGGTCAAGG
CTCACCGTCTGCAACAGGACTGGTGAACCGCAAGGAGTACAAGTGAACGGTCTAAC
AAAGGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGACACCTCCGGGGAGGAGATGACCAAGAACCGAGTCAGGCTG
ACCTGCTGGTCAAAGGCTCTACCCGAGGACATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGG
CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTCTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGGTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCCCTGTCTCCG
GGT

D11-C27G3 IgG2 HC (서열 45)

CAGGTGCAGCTGGTCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGTCTCGGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGGTCTGGCTACACCTTCACAAGTAGGTATATACTGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGGTTGAGTGGATGGATTATCCTGTAACTGGTGATACTTACTAC
AGAGAGCCTTCAAGGGCAGAGTCACGATTAACGGCGAACATCCACGAGCACAGGCC
ATGGAGCTGAGCAGCTGAGATCTGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTAC
GGAGCTTTACTACTGGGCCAGGGCACCTGGTCAACGGTCTCCACCGCTCCACCAAG
GGCCCATCGGTCTCCGCTAGGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCAACCGGGTACGGGTGACGGTGTGGAACTCAGGC
GCCCTGACCAGGGCTGCACACCTCCGGCTGTCTACAGTCAGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTACCGTGGCCCTCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAAC
GTAGATCACAAGGCCAGCAACCCAAGGTGAGCAGACAGTGGAGCGCAAATGTTGTC
GAGTCCCACCGTGGCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAAGTGGTGGAGGTGCA
AAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACAGTCAGTGGTGGAC
GTGAGGCCACGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGGTGGACGGCATGGAGGTGCA
AATGCCAAGACAAGCCACGGGAGGAGCAGTCACAGCACGTTCCGTGTGGTCAAGG
CTCACCGTCTGCAACAGGACTGGTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAACGGTCTAAC

[0474]

AAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCCTC AAAACCAAAGGGAGCCCCGAGAA
 CCACAGGTGTACACCCTGCCCATCCGGAGAGATGACCAAGAACAGGTGAGCTG
 ACCTGCGCTGTCAGGCTTACACCTTACCGACTACATGCACTGGGTGCGTCAGGCC
 CAGCGGAGAACAACTACAAGACACACCTCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTCTC
 CTCTACAGCAAGCTCACCGTGACAAGAGCAGGTGGCACAGGGGAACCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACACAGAAGAGCCTCTCCGTCTCG
 GGT

C8-6 IgG4 HC (서열 46)

CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGTGTGAGGTGAAGAAGCCTGGTGCCTCAGTGAAGGTC
 TCCTGCAAGGCTCTGGTTACACATTACGTGACTACTACATGCACTGGGTGCGTCAGGCC
 CCTGGTCAAGGCTTGTGAGTGGGATGGGTGTTAATCTAACCGGGGTGTTACTACCTAC
 AACAGAAATTGAGGGCCGTGACCATGACACAGACACATCCACGAGCACAGCTAC
 ATGGAGCTGCGTAGCCTCGCTCTGACGACACGGCCGTGTTACTGTGCGCGTACGAAC
 TGGCTTGACTACTGGGCCAGGGCACCCACCGTCAACCGTCTCCCGCCTCCACCAAGGGC
 CCATCGGTCTTCCCGTAGGCCCTGCTCAGGAGCACCTCGAGAGCACAGCCGCC
 GGCTGCGCTGGTCAAGGACTACTCCCCAACCGGTGACGGTGTGGAACTCAGGCC
 CTGACCGAGCGGCTGACACCTCCGGCTGCTCACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTC
 AGCAGCGTGGTACCGTCAAGGCTTGGGACAGAACCTACACCTGCAACGTA
 GATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCAAATATGGTCCCCCA
 TGCCCACCCCTGCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGACCATCAGTCTTGTGTTCCCCCA
 AAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGAC
 GTGAGGCCAGGAAGACCCGGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGAACAAAGCCGGGAGGAGCAGTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTC
 CTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCAAAC
 AAAGGCCTCCGTCTCCATCGAGAAAACCCTC AAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAG
 CCACAGGTGTACCCCTGCCAGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGAGCTG
 ACCTGCGCTGGTCAAGGCTTCTACCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAAGCAATGGG
 CAGCGGAGAACAACTACAAGACACCAGCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTCTC
 CTCTACAGCAGGCTAACCGTGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAAATGTCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACACAGAAGAGCCTCTCCGTCTCG
 GGT

C8-H241 IgG4 HC (서열 47)

CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGTGTGAGGTGAAGAAGCCTGGTGCCTCAGTGAAGGTC
 TCCTGCAAGGCTCTGGTTACACATTACGTGACTACTACATGCACTGGGTGCGTCAGGCC
 CCTGGTCAAGGCTTGTGAGTGGGATGGGTGTTAATCTAACCGGGAGGGGTACTACCTAC
 AACAGAAATTGAGGGCCGTGACCATGACACAGACACATCCACGAGCACAGCTAC
 ATGGAGCTGCGTAGCCTCGCTCTGACGACACGGCCGTGTTACTGTGCGCGTGC
 AC TGGCTTGACTACTGGGCCAGGGCACCCACCGTCAACCGTCTCCCGCCTCCACCAAGGGC
 CCATCGGTCTTCCCGTAGGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCGAGAGCACAGCCGCC
 GGCTGCGCTGGTCAAGGACTACTCCCCAACCGGTGACGGTGTGGAACTCAGGCC
 CTGACCGAGCGGCGTAGGCCCTCCAGCAGCTTGGGACAGAACCTACACCTGCAACGTA
 AGCAGCGTGGTACCGTGGCTCACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTC
 GATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCAAATATGGTCCCCCA
 TGCCCACCCCTGCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGACCATCAGTCTTGTGTTCCCCCA

AAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGAC
 GTGAGCAGGAAGACCCGAGGTCAGTTCAACTGGTACGGATGGCGTGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCGGAGGAGCAGTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCCTC
 CTCACCGTCTCGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCAAAC
 AAAGGCCTCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAG
 CCACAGGTGTACACCTGCCCTCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAAGGTGAGCTG
 ACCTGCCTGGTCAAAGGTTCTACCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAAAGCAATGGG
 CAGCCGAGAACAACATAAGACACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTC
 CTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAAATGTTCTCATGC
 TCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACACACAGAACGCTCTCCGTCTCTG
 GGT

C8-co16 IgG4 HC (서열 48)

CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGTGTGAGGTGAAGAACGCTGGTGCCTCAGTGAAGGTC
 TCCTGCAAGGCTCTGGTTACACATTCACTGACTACTACATGCACTGGGTGCGTCAGGCC
 CCTGGTCAAGGTTCTGAGTGGATGGTCGTGTTAACCTTATCCTGAGGGTAGTACTACCTAC
 AACAGAAATTGAGGGCCGTGACCATGACACAGAACATCCACAGAACAGCTAC
 ATGGAGCTGCGTAGCCTGCGTTCTGACGACAGGCCGTGTTACTGTCGCGTGC
 AACAGGCTCTCCGCTAGCGCCCTGCTCAGGAGCACCTCCACCAAGGGC
 CCATCGGCTCTCCGCTAGCGCCCTGCTCAGGAGCACCTCCACCAAGGGC
 GGCGCTCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAAGGGTGAACGGTGTGGAAACTCAGGCC
 CTGACAGCGGGCGTGCACACCTTCCGGCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
 AGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTGGGACAGAACACTACAGTA
 GATCACAAGCCCAGAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAATATGGTCCCC
 TGCCACCTGCCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCC
 AAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGAC
 GTGAGCCAGGAAGACCCGAGGTCAGTTCAACTGGTACGGATGGCGTGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCCTC
 CTCACCGTCTGACCAGGACTGGCTGAACCGAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCAAAC
 AAAGGCCTCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAG
 CCACAGGTGTACACCTGCCCTCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGAGCTG
 ACCTGCCTGGTCAAGGTTCTACCCAGGACATGCCGTGGAGTGGAAAGCAATGGG
 CAGCCGAGAACAACTACAAGACACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTC
 CTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAAATGTTCTCATGC
 TCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACACACAGAACGCTCTCCGTCTCTG
 GGT

인간 cMet-ECD-Fc-Flis (서열 72)

MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQN
 VILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCPQDCSSKANLSG
 GVWKDNINMALVVDTYYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFS
 PQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHPLHSISVRLK
 ETKDGFMFDTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDAQTFT

[0476]

RIIRFCSINGLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSKPGAQLARQI
 GASLNDDILFGVFAQSKPDSEAEPMDRSAMCAFPIKVNDFFNKIVNKNVRCLQ
 HFYGPNEHCFNRTLLRNSSGEARRDEYRTEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSI
 STFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVSRSGPSTPHVNFLLDSPVSPREVIEHTLNQ
 NYGTLVITGKIKTIPNLGCRHFQSCSQCLSAPPVQCGWCHDKCVRSEECLS
 GTWTQQICLPAIYKVFNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNE
 SCTLTLSESTMNTLKCTVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTQYSTFSYDPVITSISPK
 YGPMAGGTLLTGNLYLNSGNSRHISIGGKCTLKSNSILECYTPAQTI
 VKLKIDLANRETISFSYREDPIVYEIHPTKSISGGSTITGVGKNLNSVSPRMVIN
 HEAGRNFNTVACQHRSNSEIICCTPSLQQLNQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIY
 VHNPVFKPFEKPVMISMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGKNSCENIHLHSE
 AVLCTVPNDLLKLNSELNIEWKQAISSVTLGKIVQPDQNFTEVLFQGP DIEPKS
 CDKHTCPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTKAKGQPREPQEYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFCSCVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGKRDYKDDDDKHVHHHHHH

[0477]

[0478] 굵은 이탤릭체 아미노산은 신호 서열을 나타내고; 굵은 밑줄친 아미노산은 Flis 태그를 나타낸다.

사이노롤거스 원증이 cMet-ECD-Fe-Flis (서열 73)

MKAPAVLVPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETAIQN
 VILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFPCQDCSSKANSG
 GVVWKDNINMALVVDTYYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFS
 PQIEEPNQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPHHPLHSISVRRLK
 ETKDGFMFLLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYIHAFESNNIYFLTVQRETLNAQTFHTR
 IIRFCSLNSGLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSKPGAQLARQI
 GASLNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPIKYVNDFFNKIVNKNNVRCLQ
 HFYGPNHEHCFNRLLRNSSGEARRDEYRAEFTALQRVDLFMGQFSEVLLTSI
 STFKGDLTIANLGTSEGFRMQVVSRSGPSTPHVNFLDSHPVSPEVIVEHPLNQ
 NGYTLVVTGKKITKIPNLGCRHFQSCSQCLSAPPVQCGWCHDKCVRSEECPS

[0479]

GTWTQQICLPAIYKVFPANTSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNE
 SCTLTLSESTMNTLKCTVGPAMNKHFNMIIIISNGHGTQYSTFSYVDPIITSISP
 YGPMAGGTLLTGTGNYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEFA
 VKLKIDLANRETTSIFSYREDPIVYEIHPTKSFISGGSTITGVGKNLHSVSVP
 HEAGRNFNTVACQHRSNSEIICCTTPSLQQQLNLQPLKTAFFMLDGILSKYFDL
 IYVHNPVFKPFEKPVIMSGNENVLEIKGNIDPPEAVKGEVLKVGNCENIHLHSE
 AVLCTVNDLLKLNSELNIEWKQASSTVLGKIVQPDQNFTEVLFQGP
 DIEPKS CDKTHTCPPCAPELLGGPSVLFPPPKDLMISRTPEVTCVV
 DVSHEDPEVKFNWYV
 YDGVEVHN
 AKTPREEQYN
 STYRV
 VS
 VLT
 VLHQDW
 LNGKEY
 KCKV
 SNKA
 LPA
 IEKT
 SKAK
 QPREP
 QEYTL
 PPSRE
 EEMTK
 NQV
 SLT
 CLV
 KG
 FYP
 SDIA
 VEWE
 NGQP
 ENNYK
 TTP
 VLD
 SDGS
 FFLY
 SKLT
 VDK
 SRW
 QQGN
 VFCS
 VMHE
 ALHN
 HYTQK
 SLSPG
 KR
DYKDDDDKHVHHHHHH

[0480]

[0481] 굵은 이탤릭체 아미노산은 신호 서열을 나타내고; 굵은 밑줄친 아미노산은 Flis 태그를 나타낸다.

래트 cMet-ECD-Fe-Flis (서열 74)

MKAPТАLAPGИLLLLTЛAQRSHGECKEALVKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIHN
 VVLHGHHIYLGATNYIYVLNDKDLQKVSEFKTGPVVEHPDCFPCQDCSSKANVS
 GGVWKDNVNMA
 LVDTYYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHC
 MFSPLAEEESGQCPDCVVSALGAKVLLSEKDRFINFFVGNTINSSYPPDYSLSHSIV
 RRLKETQDGFKFLDQSYIDVLPEFRDSYPIKYIHAFESNHF
 IYFLTVQKETLDAQT
 FHTRIIRFCSDGLHSYMEMPLECILTEKRRKRSTREEV
 FNILQAAYVSKPGANL
 AKQIGASPYD
 DILYGVFAQSKPDSAEPMNRS
 A
 CAFPIKYVNDFFNKIVNKNNVR
 CLQH
 FYGP
 NHEH
 CFNR
 LLRN
 SS
 GEVR
 SDEY
 RT
 EFT
 ALQR
 VDFM
 GRLN
 HVL
 LTS
 I
 FIKG
 DL
 TIAN
 LGT
 SEGR
 FMQV
 VLS
 RTA
 HFT
 PHVN
 FLDS
 YP
 VS
 PEV
 IVEH
 P
 SNQ
 NGY
 TLV
 VTG
 KK
 I
 PLN
 GLC
 GHF
 QSC
 QL
 S
 APY
 FI
 QCG
 WCH
 NRC
 VHS
 NE
 CPS
 GTWT
 QEICL
 PAV
 YKV
 FPT
 SAPLE
 GGTRL
 TIC
 GWDF
 GFK
 NNKF
 DL
 RKT
 KVLL
 GN
 ES
 CTL
 LS
 E
 TT
 NTL
 KCTV
 GPAM
 SEH
 NV
 VIV
 NS
 RETT
 Q
 YSA
 FSY
 VDP
 VITS
 I
 SPRY
 GPHAG
 GTL
 TG
 K
 YL
 NS
 GNS
 R
 HIS
 IGG
 KT
 CTL
 K
 VS
 SD
 S
 I
 L
 E
 CY
 TPG
 HT
 V
 SA
 E
 FP
 V
 KL
 K
 ID
 LAD
 RV
 T
 SS
 FS
 Y
 RED
 PV
 V
 SE
 IH
 PT
 KS
 F
 IS
 GG
 ST
 IT
 G
 I
 G
 K
 N
 L
 N
 S
 V
 ST
 P
 K
 L
 V
 Y
 HD
 PM
 F
 K
 P
 F
 K
 P
 V
 M
 I
 S
 M
 G
 N
 E
 V
 V
 E
 I
 K
 G
 D
 D
 I
 D
 P
 E
 A
 V
 K
 G
 E
 V
 L
 K
 V
 G
 N
 K
 S
 C
 E
 N
 L
 H

[0482]

WHSEALLCTVPSDLLKLNGGELNIEWKQAVSSTVLGKIVQPDQNF
 ALEVLFQG
 PDIEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVLFPPPKDLMISRTPEV
 TCVV
 DV
 SH
 DPEV
 KFN
 WY
 VDG
 V
 EH
 N
 A
 K
 T
 K
 P
 RE
 E
 Q
 YN
 STY
 RV
 V
 S
 V
 L
 T
 V
 L
 HQDW
 LNG
 KEY
 KC
 K
 V
 S
 N
 K
 A
 L
 P
 A
 I
 E
 K
 T
 I
 S
 K
 A
 K
 Q
 Q
 P
 E
 P
 Q
 E
 Y
 T
 L
 P
 P
 S
 R
 E
 E
 M
 T
 K
 N
 Q
 V
 S
 L
 T
 C
 L
 V
 K
 G
 F
 Y
 P
 S
 D
 I
 A
 V
 E
 W
 E
 S
 N
 G
 Q
 P
 E
 N
 N
 Y
 K
 T
 T
 P
 P
 V
 L
 D
 S
 D
 G
 S
 F
 F
 L
 Y
 S
 K
 L
 T
 V
 D
 K
 S
 R
 W
 Q
 Q
 G
 N
 V
 F
 C
 S
 V
 M
 H
 E
 ALHN
 HYTQK
 SLSPG
 KR
DYKDDDDKHVHHHHHH

[0483]

[0484] 굵은 이탈릭체 아미노산은 신호 서열을 나타내고; 굵은 밑줄친 아미노산은 Flis 태그를 나타낸다.

인간 c-Met ECD (서열 75)

MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQN
 VILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFPCQDCSSKANLSG
 GVWKDNINMALVVDTYYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFS
 PQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHPLHSISVRRLK
 ETKDGFMLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDAQTFT
 RIIRFCINSGLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSKPGAQLARQI
 GASLNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPIKYVNDFFNKIVNKNNVRCLQ
 HFYGPNHEHCFNRLLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSI
 STFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLDSHPVSPEVIVEHTLNQ
 NGYTLVITGKKITKIPLNLGCRHFQSCSQCLSAPPVQCGWCHDKCVRSEECLS
 GTWTQQICLPAIYKVFPNSAPLEGGRTRLICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNE
 SCTLTSESTMNLKCTVGPAMNKHFNMSSIISNGHGTQYSTFSYDPVITSISPK
 YGPMAGGTLLLTGNYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVNSILECYTPAQTISTEFA
 VKLKIDLANRETSIFSREDPIVYEIHPTKSFISGGSTITGVGKNLNSVPRMVINV
 HEAGRNFVACQHRSNSEIICCTPSLQQQLNLQLPLKTAFFMLDGILSKYFDLIY
 VHNPVFKPFEKPVISMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGNKSCENIHLHSE
 AVLCTVPNDLLKLNSELNEWKQASSTVLGVIVQPDQNFT

[0485]

[0486] 굵은 이탈릭체 아미노산은 신호 서열을 나타낸다.

Flis 태그를 갖는 인간 c-Met 세마 도메인 (서열 76)

MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQN
 VILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFPCQDCSSKANLSG
 GVWKDNINMALVVDTYYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFS
 PQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHPLHSISVRRLK
 ETKDGFMLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDAQTFT
 RIIRFCINSGLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSKPGAQLARQI
 GASLNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPIKYVNDFFNKIVNKNNVRCLQ
 HFYGPNHEHCFNRLLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSI
 STFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLDSHPVSPEVIVEHTLNQ
 NGYTLVITGKKITKIPLNLGCRHFQSCSQCLSAPPVQCGWCHDKCVRSEECLS
 GTWTQQICL**DYKDDDDKHVHHHHHH**

[0487]

[0488] 굵은 이탈릭체 아미노산은 신호 서열을 나타내고; 굵은 밑줄친 아미노산은 Flis 태그를 나타낸다

[0489] 인간 c-Met 세포외 도메인 내의 C8-항체 에피토프

121VVDTYYDDQL₁₃₀ (서열 77)

131ISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQS₁₅₆ (서열 78)

179ALGAKVLSSVKDRFINF₁₉₅ (서열 79)

216VRRLKETKDGFM₂₂₇ (서열 80)

123DTYYDD₁₂₈ (서열 81)

144HVFPHNHTADIQS₁₅₆ (서열 82)

192FINF₁₉₅ (서열 83)

220KETKDGFM₂₂₇ (서열 84)

[0490]

[0491] 인간 c-Met 세포외 도메인 내의 D11-항체 에피토프

84YKTGPVLEHPDCFPCQDCSSKANL₉₅ (서열 85)

95CFPCQDCSSKA₁₀₅ (서열 86)

[0493] 컨센서스 CDR 서열

- [0494] D11-항체 경쇄 CDR2
GTSX₁LX₂S (서열 87) (여기서, X₁은 Y 또는 R이고, X₂는 A 또는 R이다);
- [0496] C8-항체 경쇄 CDR1
SVSSSVX₃SIYLH (서열 88) (여기서, X₃은 S 또는 R이다);
- [0498] C8-항체 경쇄 CDR3
X₄X₅YX₆GYPLT (서열 89) (여기서, X₄는 I 또는 Q이고, X₅는 Q 또는 V이고, X₆은 S 또는 R이다);
- [0500] D11-중쇄 항체 CDR2
WIYPVTGDTYYX₇EX₈FKG (서열 90) (여기서, X₇은 N, I 또는 R이고, X₈은 K 또는 P이다);
- [0502] D11-항체 중쇄 CDR3
GYGAFX₉Y (서열 91) (여기서, X₉는 Y 또는 F이다);
- [0504] C8-항체 중쇄 CDR2
RVNPX₁₀RX₁₁X₁₂TTYNQKFEKG (서열 92) (여기서, X₁₀은 N 또는 Y이고, X₁₁은 G 또는 R이고, X₁₂는 G 또는 S이다);
- [0506] C8-항체 중쇄 CDR3
X₁₃NX₁₄LDY (서열 93) (여기서, X₁₃은 T 또는 A이고, X₁₄는 W 또는 I이다);
- [0508] 컨센서스 경쇄 가변 영역 서열
[0509] D11-항체 경쇄 가변 영역 컨센서스 서열 (서열 94)
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCSVSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIY
GTSX₁LX₂SGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFG
QGTKLEIK
- [0511] (여기서, X₁은 Y 또는 R이고, X₂는 A 또는 R이다);
- [0512] C8-항체 경쇄 가변 영역 컨센서스 서열 (서열 95)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCSVSSSVX₃SIYLHWYQQKPGKAPKLLIY
STSNLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCX₄X₅YX₆GYPLTFG
GGTKVEIK
- [0514] (여기서, X₃은 S 또는 R이고, X₄는 I 또는 Q이고, X₅는 Q 또는 V이고, X₆은 S 또는 R이다);
- [0515] 컨센서스 중쇄 가변 영역 서열
[0516] D11-항체 중쇄 가변 영역 컨센서스 서열 (서열 96)
QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFTSRYIHWVRQAPGQGLEWMGW
IYPVTGDTYYX₇EX₈FKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGY
GAFX₉YWGQGTLTVVS
- [0518] (여기서, X₇은 N, I 또는 R이고, X₈은 K 또는 P이고, X₉는 Y 또는 F이다);
- [0519] C8-항체 중쇄 가변 영역 컨센서스 서열 (서열 97)
QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGR
VNPNX₁₀RX₁₁X₁₂TTYNQKFEGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARX₁₃
NX₁₄LDYWGQGTTVTVS

[0521] (여기서, X_{10} 은 Y 또는 N이고, X_{11} 은 G 또는 R이고, X_{12} 는 S 또는 G이고, X_{13} 은 A 또는 T이고, X_{14} 는 I 또는 W이다).

서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부