



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201106972 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：099124592

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 07 月 26 日

(51)Int. Cl. : **A61K39/395 (2006.01)**

C07K16/30 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/07/27 美國

61/228,915

2010/06/18 美國

61/356,498

(71)申請人：建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：寇斯 蘇珊那 COUTO, SUZANA (BR)；杭戈 喬 安 HONGO, JO-ANNE S.

(US)；卡拉普 黛拉 KALLOP, DARA Y. (US)；李勇軍 LI, YONGJUN (CN)；劉

勁鋒 LIU, JINFENG (CN)；路得連 瑪莉 LUDLAM, MARY (GB)；培 林 PEI,

LIN (US)；譚 克利斯丁 TAN, CHRISTINE (US)；葉曉芬 YE, XIAOFEN (CN)；

趙及平 ZHA, JIPING (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：19 共 252 頁

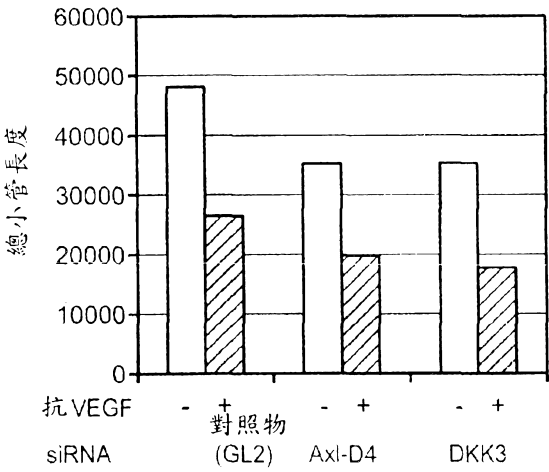
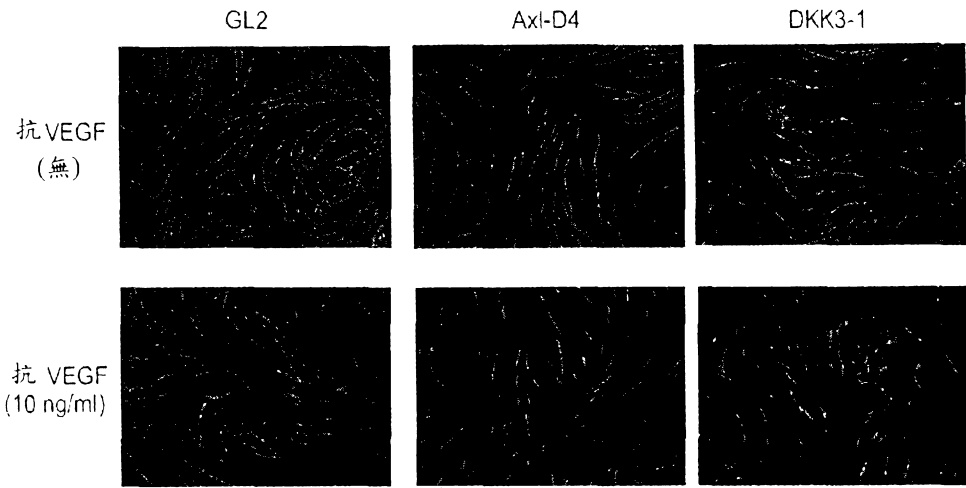
(54)名稱

組合療法

COMBINATION TREATMENTS

(57)摘要

本發明提供 Axl 拮抗劑及其使用方法。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201106972 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：099124592

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 07 月 26 日

(51)Int. Cl. : **A61K39/395 (2006.01)**

C07K16/30 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/07/27 美國

61/228,915

2010/06/18 美國

61/356,498

(71)申請人：建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：寇斯 蘇珊那 COUTO, SUZANA (BR)；杭戈 喬 安 HONGO, JO-ANNE S.

(US)；卡拉普 黛拉 KALLOP, DARA Y. (US)；李勇軍 LI, YONGJUN (CN)；劉

勁鋒 LIU, JINFENG (CN)；路得連 瑪莉 LUDLAM, MARY (GB)；培 林 PEI,

LIN (US)；譚 克利斯丁 TAN, CHRISTINE (US)；葉曉芬 YE, XIAOFEN (CN)；

趙及平 ZHA, JIPING (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：19 共 252 頁

(54)名稱

組合療法

COMBINATION TREATMENTS

(57)摘要

本發明提供 Axl 拮抗劑及其使用方法。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明大體上係關於分子生物學領域。更明確地說，本發明係關於Axl拮抗劑及其使用方法。

本案主張2009年7月27日所申請之美國專利申請案第61/228,915號及2010年6月18日所申請之第61/356,498號之優先權，該等案之內容以引用方式併入本文中。

【先前技術】

Axl屬於TAM受體酪胺酸激酶(RTK)亞家族，該亞家族亦包括Tyro3及Mer(O'Bryan J.P.等人，(1991) *Mol. Cell Biol.* 11:5016-5031；Lai C.及G. Lemke (1991) *Neuron* 6:691-704)。TAM受體之特徵為以下之組合：位於胞外區中之兩個免疫血球蛋白樣結構域及雙重纖維結合蛋白III型重複，以及細胞質激酶域。TAM受體之配位體為Gas6(生長抑制特異性6)及蛋白質S(兩種顯示43%胺基酸序列一致性且共有類似域結構的維生素K依賴性蛋白質)(Varnum B.C.等人，(1995) *Nature* 373:623-626；Stitt T.N.等人，(1995) *Cell* 80:661-670)。各蛋白質具有：含有11個 γ -羧基麩胺酸殘基的N端Gla域，後接四個表皮生長因子(EGF)樣模組，及由兩個串聯層黏連蛋白G域組成之C端性激素結合球蛋白(SHBG)樣結構。SHBG域對於TAM受體結合及活化為必要且充分的，而Gla域結合帶負電的膜磷脂且在TAM介導之凋亡細胞吞噬作用中起重要作用(Sasaki T.等人，(2006) *EMBO J.* 25:80-87；Hasanbasic I.等人，(2005) *J. Thromb.*

Haemost. 3:2790-2797)。

TAM活化及信號傳導已牽涉多種細胞反應，包括細胞存活、增殖、遷移及黏附(Hafizi S.及B. Dahlbäck (2006) *FEBS J.* 273:5231-5244)。TAM受體信號傳導已顯示可調節血管平滑肌穩定(Melaragno M.G.等人，(1999) *Trends Cardiovasc. Med.* 9:250-253；Korshunov V.A.等人，(2006) *Circ. Res.* 98:1446-1452；Korshunov V.A.等人，(2007) *Hypertension* 50:1057-1062)、血小板功能、血栓穩定性(Angelillo-Scherrer A.等人，(2001) *Nat. Med.* 7:215-221；Gould W.R.等人，(2005) *J. Thromb. Haemost.* 3:733-741)及紅血球生成(Angelillo-Scherrer A.等人，(2008) *J. Clin. Invest.* 118:583-596)。TAM受體亦牽涉寡樹突神經膠質細胞存活之控制(Shankar S.L.等人，(2006) *J. Neurosci.* 26:5638-5648)及蝕骨細胞功能之調節(Katagiri M.等人，(2001) *J. Biol. Chem.* 276:7376-7382)。對基因剔除小鼠之最新研究表明TAM受體在先天免疫中起重要作用(Lemke G.及C.V., Rothlin (2008) *Nat. Rev. Immunol.* 8:327-336)。TAM抑制巨噬細胞及樹突狀細胞之炎症(Rothlin C.V.等人，(2007) *Cell* 131:1124-1136；Sharif M.N.等人，(2006) *J. Exp. Med.* 203:1891-1901)、促進凋亡細胞吞噬作用(Prasad D.等人，(2006) *Mol. Cell. Neurosci.* 33:96-108；Lu Q.等人，(1999) *Nature* 398:723-728)且刺激自然殺手細胞之分化(Caroux A.等人，(2006) *Nat. Immunol.* 7:747-754)。在許多此等情況下，主要下游TAM信號傳導路徑似

乎為 PI3K/AKT 路徑 (Angelillo-Scherrer A. 等人, (2001) *Nat. Med.* 7:215-221; Shankar S.L. 等人, (2006) *J. Neurosci.* 26:5638-5648; Keating A.K. 等人, (2006) *Oncogene* 25: 6092-6100); 然而, 傑納斯激酶(Janus kinase)- STAT路徑為 TAM介導之免疫反應所必需(Rothlin C.V. 等人, (2007) *Cell* 131:1124-1136)。此外, 許多由 TAM調節之生物功能需要 TAM受體與細胞激素受體信號傳導網路之間的協同交互作用(Rothlin C.V. 等人, (2007) *Cell* 131:1124-1136; Budagian V. 等人, (2005) *EMBO J.* 24:4260-4270)。

Axl最初自慢性骨髓性白血病患者選殖且在過度表現時呈現轉型潛能(O'Bryan J.P. 等人, (1991) *Mol. Cell Biol.* 11:5016-5031; Janssen J.W. 等人, (1991) *Oncogene* 6: 2113-2120)。已報導在多種人類癌症中存在 Axl過度表現(Berclaz G. 等人, (2001) *Ann. Oncol.* 12:819-824; Craven R.J. 等人, (1995) *Int. J. Cancer* 60:791-797; Shieh Y.S. 等人, (2005) *Neoplasia* 7:1058-1064; Sun W. 等人, (2004) *Oncology* 66:450-457; Ito T. 等人, (1999) *Thyroid* 9:563-567), 且 Axl過度表現與以下癌之侵襲及轉移有關: 肺癌(Shieh Y.S. 等人, (2005) *Neoplasia* 7:1058-1064)、前列腺癌(Sainaghi P.P. 等人, (2005) *J. Cell. Physiol.* 204:36-44)、乳癌(Meric F. 等人, (2002) *Clin. Cancer Res.* 8:361-367)及胃癌(Wu C.W. 等人, (2002) *Anticancer Res.* 22: 1071-1078)以及腎細胞癌(Chung B.I. 等人, (2003) *DNA Cell. Biol.* 22:533-540)及神經膠母細胞瘤(glioblastoma

(Hutterer M.等人，(2008) *Clin. Cancer Res.* 14:130-138)。

最新研究表明，Axl經由「酪胺酸激酶開關」過度表現引起胃腸道受質腫瘤對伊馬替尼(imatinib)之抗性(Mahadevan D.等人，(2007) *Oncogene* 26:3909-3919)。Axl表現受化學療法藥物誘導且Axl過度表現引起急性骨髓性白血病之抗性(Hong C.C.等人，(2008) *Cancer Lett.* 268:314-324)。

Axl亦顯示可調節內皮細胞遷移及血管形成(Holland S.J.等人，(2005) *Cancer Res.* 65:9294-9303)。此等發現表明，Axl可能涉及腫瘤形成之多個方面之調節，包括腫瘤生長、侵襲及血管生成。與Axl及抗Axl抗體相關的其他公開案包括WO 2004/039955、WO 2009/063965；共同擁有之同在申請中的美國專利申請案61/356,508(2010年6月18日申請)；共同擁有之同在申請中的美國專利申請案61/356,514(2010年6月18日申請)；WO 2009/062690；WO 2004/008147；及5,468,634。

血管系統之發育為許多生理及病理過程之基本需要。諸如胚胎及腫瘤之活躍生長組織需要足夠之血液供應。其藉由產生促進新血管經由稱為血管生成之過程形成的促血管生成因子來滿足此需求。血管形成是一個複雜但有序之生物事件，其涉及全部或多個以下步驟：a)內皮細胞(EC)由現有EC增殖或由祖細胞分化；b)EC遷移並聚結以形成束狀結構；c)接著血管束經歷管生成(tubulogenesis)以形成具有中央腔之血管；d)現有管束或血管長出新枝而形成二級血管；e)原始血管叢經歷進一步重塑及再成形；及f)募集

外皮內皮細胞包圍內皮管，從而向血管提供維持及調節功能；該等細胞包括小毛細血管之外被細胞、較大血管之平滑肌細胞及心臟中之心肌細胞。Hanahan, D. *Science* 277:48-50 (1997)；Hogan, B. L.及Kolodziej, P. A. *Nature Reviews Genetics*. 3:513-23 (2002)；Lubarsky, B. 及Krasnow, M. A. *Cell*. 112:19-28 (2003)。

現已充分確定，血管生成牽涉多種病症之發病機理。此等病症包括實體腫瘤及轉移；動脈粥樣硬化；晶狀體後纖維組織增生；血管瘤；慢性炎症；眼內新生血管疾病，諸如增生性視網膜病變(例如糖尿病性視網膜病變)、年齡相關之黃斑變性(AMD)、新生血管性青光眼；移植角膜組織及其他組織之免疫排斥反應；類風濕性關節炎；及牛皮癬。Folkman 等人，*J. Biol. Chem.*, 267:10931-10934 (1992)；Klagsbrun 等人，*Annu. Rev. Physiol.* 53:217-239 (1991)；及Garner A., 「Vascular diseases」，於：*Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach*, Garner A., Klintworth GK 編，第2版(Marcel Dekker, NY, 1994)，第1625-1710頁。

在腫瘤生長情況下，血管生成對於增生轉變為贅瘤形成及向腫瘤生長及轉移提供營養似乎至關重要。Folkman 等人，*Nature* 339:58 (1989)。與正常細胞相比，新血管生成允許腫瘤細胞獲取生長優勢及增殖自主性。腫瘤通常始於單個異常細胞，其因與可利用之毛細血管床距離遠而可僅增生至幾立方毫米之大小，且腫瘤可長期保持「休眠」而

不進一步生長及散播。接著一些腫瘤細胞轉變成血管生成表型以活化內皮細胞，其增殖並成熟成為新毛細血管。此等新形成之血管不僅允許原發性腫瘤持續生長，而且允許轉移的腫瘤細胞散播及再定殖。相應地，已在乳癌及多種其他腫瘤中觀測到腫瘤切片中之微血管密度與患者存活率之間的相互關係。Weidner等人，*N. Engl. J. Med* 324:1-6 (1991)；Horak等人，*Lancet* 340:1120-1124 (1992)；Macchiarini等人，*Lancet* 340:145-146 (1992)。尚未清楚瞭解控制血管生成開關之準確機制，但咸信腫瘤塊之新血管生成係由大量血管生成刺激物及抑制物之淨平衡引起 (Folkman, 1995, *Nat Med* 1(1):27-31)。

血管發育過程受到嚴格調節。迄今，大量分子(主要為由周圍細胞產生之分泌因子)已顯示可調節EC分化、增殖、遷移及聚結成為束狀結構。舉例而言，血管內皮生長因子(VEGF)已鑑別為涉及刺激血管生成及誘導血管滲透性之關鍵因子。Ferrara等人，*Endocr. Rev.* 18:4-25 (1997)。喪失甚至單一VEGF對偶基因亦導致胚胎死亡之發現表明，此因子在血管系統形成及分化中起到不可替代之作用。此外，VEGF已顯示為與腫瘤及眼內病症相關之新血管生成之關鍵介體。Ferrara等人，*Endocr. Rev.*同上。所檢查之人類腫瘤大部分過度表現VEGF mRNA。Berkman等人，*J. Clin. Invest.* 91:153-159 (1993)；Brown等人，*Human Pathol.* 26:86-91 (1995)；Brown等人，*Cancer Res.* 53:4727-4735 (1993)；Mattern等人，*Brit. J. Cancer* 73:

931-934 (1996)；Dvorak等人，Am. J. Pathol. 146:1029-1039 (1995)。

抗VEGF中和抗體抑制裸小鼠中多種人類腫瘤細胞株之生長(Kim等人，Nature 362:841-844 (1993)；Warren等人，J. Clin. Invest. 95:1789-1797 (1995)；Borgström等人，Cancer Res. 56:4032-4039 (1996)；Melnik等人，Cancer Res. 56:921-924 (1996))且亦抑制缺血性視網膜病症模型中眼內血管生成。Adamis等人，Arch. Ophthalmol. 114:66-71 (1996)。因此，抗VEGF單株抗體或其他VEGF作用抑制劑為有望用於治療腫瘤及各種眼內新生血管病症之候選藥物。該等抗體描述於例如EP 817,648(1998年1月14日公開)；及WO 98/45331與WO 98/45332(均於1998年10月15日公開)中。

癌症為對人類健康之最致命威脅之一。僅在美國，癌症每年影響近一百三十萬新患者且為心血管疾病之後的第二個主要死亡原因，在死亡中占約1/4。實體腫瘤是造成大部分彼等死亡的原因。儘管某些癌症之醫療已顯著進步，但在過去20年中所有癌症之總體5年存活率僅提高約10%。儘管癌症治療顯著進步，但仍然在尋求改良療法。

本文中引用之所有參考文獻，包括專利申請案及公開案，均以全文引用的方式併入本文中。

【發明內容】

本發明提供治療諸如癌症之病理性病狀之組合療法，其中將Axl拮抗劑與VEGF拮抗劑組合。

在一態樣中，本發明提供治療個體癌症之方法，其包含向個體投與治療有效量之Axl拮抗劑及VEGF拮抗劑。

在另一態樣中，本發明提供抑制個體癌轉移之方法，其包含向個體投與治療有效量之Axl拮抗劑及VEGF拮抗劑。

在另一態樣中，本發明提供抑制個體血管生成之方法，其包含向個體投與治療有效量之Axl拮抗劑及VEGF拮抗劑。

在另一態樣中，本發明提供抑制個體細胞增殖之方法，其包含向個體投與治療有效量之Axl拮抗劑及VEGF拮抗劑。

在某些實施例中，VEGF拮抗劑為阻礙VEGF與細胞受體結合之化合物。該等VEGF阻斷拮抗劑之實例包括(但不限於)可溶性VEGF受體、對VEGF具有特異性之適體或肽體，及抗VEGF抗體。在一實施例中，抗VEGF抗體為貝伐珠單抗(bevacizumab)。

在某些實施例中，當組合使用時，貝伐珠單抗的投與量範圍為約0.05 mg/kg至約15 mg/kg。在一實施例中，可向個體投與約0.5 mg/kg、1.0 mg/kg、2.0 mg/kg、3.0 mg/kg、4.0 mg/kg、5.0 mg/kg、6.0 mg/kg、7.0 mg/kg、7.5 mg/kg、8.0 mg/kg、9.0 mg/kg、10 mg/kg或15 mg/kg中之一或多種劑量(或其任何組合)。該等劑量可間歇地投與，例如每天、每三天、每週或每兩至三週。

Axl拮抗劑之實例包括(但不限於)可溶性Axl受體、可溶性Axl配位體變異體、對Axl或Axl配位體具有特異性之適

體或肽體、Axl小分子、抗Axl抗體及抗Axl配位體抗體。在一些實施例中，Axl拮抗劑為抗Axl抗體。在一些實施例中，Axl拮抗劑不為華法林(warfarin)。

在一些實施例中，抗Axl抗體包含含有序列EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSGSWIHWVRQAPGKGLEWVGWINPYRGYAYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCAREYSGWGGSSVGYAMDYWGQGTLV(SEQ ID NO:1)的重鏈可變區及含有序列DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR(SEQ ID NO:2)的輕鏈可變區。

在一些實施例中，Axl拮抗劑為R428(Rigel; Holland等人，Cancer Research 70, 1544 (2010))或PF02341066。

在某些實施例中，該方法進一步包含投與EGFR拮抗劑。在某些實施例中，EGFR拮抗劑為埃羅替尼(erlotinib)。在某些實施例中，可以每天150 mg之劑量或以每天100 mg之劑量投與埃羅替尼。

本發明之方法可用於改變任何適合的病理狀態。舉例而言，本發明之方法可用於治療不同癌症(實體腫瘤與液體腫瘤以及相似的軟組織腫瘤)。可依照本發明之療法治療的癌症之非限制性實例包括乳癌、結腸直腸癌、直腸癌、非小細胞肺癌、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkins lymphoma, NHL)、腎細胞癌、前列腺癌、肝癌(諸如肝細胞癌)、胰臟癌、軟組織肉瘤、卡波西氏肉瘤(kaposi's

sarcoma)、類癌瘤(carcinoid carcinoma)、頭頸癌、黑色素瘤、卵巢癌、胃癌、間皮瘤及多發性骨髓瘤。在某些態樣中，癌症為轉移性癌。在其他態樣中，癌症為非轉移性癌。

在一些實施例中，抗Axl抗體及抗VEGF抗體(諸如貝伐珠單抗)用於諸如非小細胞肺癌之癌症之組合療法中。

視待治療之特定適應症而定，可將本發明之組合療法與諸如化學治療劑之其他治療劑或諸如放射線療法或手術之其他療法組合。許多已知化學治療劑可用於本發明之組合療法中。在某些實施例中，本發明之組合療法可與一種以上化學治療劑組合。在某些實施例中，所用的彼等化學治療劑為用於治療特定適應症之標準藥劑。在另一實施例中，組合使用之各種治療劑之劑量或頻率等同於或小於不使用其他治療劑時相應治療劑之劑量或頻率。

在某些實施例中，癌症顯示Axl表現(諸如Axl過度表現)、擴增或活化。

在某些實施例中，個體經診斷患有表現Axl之癌症。

本發明亦提供抑制組成性Axl活化之方法，其包含使細胞與下調Axl表現(降低例如細胞表面(諸如腫瘤細胞表面)上之Axl表現及/或降低細胞(諸如腫瘤細胞)中之總體Axl表現)之抗體(或其抗原結合片段)接觸。

本發明亦提供治療個體癌症之方法，其包含向個體投與下調Axl表現(降低例如細胞表面(諸如腫瘤細胞表面)上之Axl表現及/或降低細胞(諸如腫瘤細胞)中之總體Axl表現)

的抗Axl抗體。

本發明亦提供阻斷配位體與Axl結合之方法，其包含使表現Axl之細胞與結合Axl且抑制配位體與Axl結合之抗體或其抗原結合片段接觸，其中該抗體識別人類Axl而非小鼠Axl上之抗原決定基。單株抗體可為例如嵌合抗體、人類化抗體、單鏈抗體或雙特異性抗體。在一些實施例中，抗體結合的抗原決定基與選自由3G9、8B5、12A11及4F8組成之群之單株抗體所結合之抗原決定基相同。在一些實施例中，抗體抑制配位體與Axl結合。在一些實施例中，抗體下調Axl表現。在一些實施例中，抗體識別Axl上之變性抗原決定基，如可由西方墨點法(Western blot)偵測。在一些實施例中，抗體之IC₅₀為至少約100 ng/ml。在一些實施例中，抗體抑制Gas6誘導之Axl磷酸化。

在一態樣中，本發明提供由融合瘤細胞株3G9.19.7產生之抗體，融合瘤細胞株3G9.19.7具有美國菌種保存中心(ATCC)編號_____，寄存於_____。

在一態樣中，本發明提供分離抗體，其包含由具有美國菌種保存中心(ATCC)編號_____之融合瘤細胞株3G9.19.7所產生之抗體之重鏈及/或輕鏈可變域，其中該分離抗體特異性結合人類Axl。

在一態樣中，本發明提供包含至少1個(至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、及/或6個)高變序列(HVR)之分離抗體，該(等)高變序列包含選自由具有美國菌種保存中心(ATCC)編號_____之融合瘤細胞株3G9.19.7所產生之

抗體之HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及/或HVR-H3組成之群的序列，其中該分離抗體特異性結合人類Axl。

在一態樣中，本發明提供所結合之人類Axl上之抗原決定基與由具有美國菌種保存中心(ATCC)編號_____之融合瘤細胞株3G9.19.7產生之抗體所結合之人類Axl上之抗原決定基相同的分離抗體。

在一態樣中，本發明提供與由具有美國菌種保存中心(ATCC)編號_____之融合瘤細胞株3G9.19.7所產生之抗體競爭結合人類Axl的分離抗體。

本發明亦提供下調細胞中Axl表現之方法，其包含使該細胞與引起該細胞中Axl表現降低之抗體接觸。抗體可為單株抗體。抗體可為例如嵌合抗體、人類化抗體、單鏈抗體或雙特異性抗體。在一些實施例中，抗體結合的抗原決定基與選自由3G9、8B5、12A11及4F8組成之群之單株抗體所結合之抗原決定基相同。在一些實施例中，抗體抑制配位體與Axl結合。在一些實施例中，抗體識別Axl上之變性抗原決定基，如可由西方墨點法偵測。在一些實施例中，抗體之IC₅₀為至少約100 ng/ml。在一些實施例中，抗體抑制Gas6誘導之Axl磷酸化。

本發明亦提供偵測樣品中Axl之方法，其包含使該樣品與特異性結合於Axl上之抗原決定基且不與該樣品中其他蛋白質交叉反應的抗體接觸。在一些實施例中，抗體結合的抗原決定基與選自由3G9、8B5、12A11及4F8組成之群

之單株抗體所結合之抗原決定基相同。在一些實施例中，抗體識別Axl上之變性抗原決定基，如可由西方墨點法偵測。在一些實施例中，抗體之 IC_{50} 為至少約100 ng/ml。

本發明亦提供診斷患有以Axl表現(在一些實施例中，為過度表現)為特徵之病狀之患者的方法，其包含自該患者獲得樣品且針對Axl表現分析該樣品，其中該分析法包含使用所結合之抗原決定基與選自由3G9、8B5、12A11及4F8組成之群之抗體或其抗原結合片段所結合之抗原決定基相同的抗體。在一些實施例中，抗體為3G9、8B5、12A11、4F8，其抗原結合片段，或其組合。抗體可為單株抗體、嵌合抗體、人類化抗體、單鏈抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，抗體與可偵測標記(諸如(但不限於)放射性同位素、螢光化合物或酶標記)結合。

本發明亦提供治療患者癌症之方法，其包含：(a)使用第一抗體偵測該患者之樣品中Axl之過度表現；及(b)向該患者投與包含第二抗體及醫藥學上可接受之載劑的組合物，其中該第一抗體特異性結合於人類Axl上之抗原決定基且該第二抗體抑制配位體與Axl結合、Axl磷酸化，或下調Axl表現。癌症可為選自由以下組成之群的癌症：骨髓性白血病、肺癌(例如非小細胞肺癌(NSCLC))、胃癌、乳癌、前列腺癌、腎細胞癌、胰臟癌及神經膠母細胞瘤。在一些實施例中，第一抗體結合的Axl抗原決定基與選自由3G9、8B5、12A11及4F8組成之群之單株抗體或其抗原結合片段所結合之Axl抗原決定基相同。在一些實施例中，

第二抗體結合的Axl抗原決定基與選自由3G9、8B5、12A11及4F8組成之群之單株抗體或其抗原結合片段所結合之Axl抗原決定基相同。在一些實施例中，第一抗體及第二抗體為單株抗體、嵌合抗體、人類化抗體、單鏈抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，第一抗體及/或第二抗體與細胞毒性劑(諸如(但不限於)化學治療劑、毒素或放射性同位素)結合。在一些實施例中，該方法進一步包含在投與結合Axl之抗體之前、之後或同時投與抗VEGF抗體。

本發明亦提供抑制過度表現Axl之細胞之血管生成之方法，其包含向該等細胞投與抗體，該抗體特異性結合人類Axl上之抗原決定基且抑制配位體與Axl結合、Axl磷酸化，或下調Axl表現。癌症可為選自由以下組成之群的癌症：骨髓性白血病、肺癌(例如非小細胞肺癌(NSCLC))、胃癌、乳癌、前列腺癌、腎細胞癌、胰臟癌及神經膠母細胞瘤。在一些實施例中，抗體結合的抗原決定基與選自由3G9、8B5、12A11及4F8組成之群之抗體或其抗原結合片段所結合之抗原決定基相同。在一些實施例中，抗體為單株抗體、嵌合抗體、人類化抗體、單鏈抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，抗體與細胞毒性劑(諸如(但不限於)化學治療劑、毒素或放射性同位素)結合。在一些實施例中，該方法進一步包含在投與結合Axl之抗體之前、之後或同時投與抗VEGF抗體。抗Axl抗體及抗VEGF抗體可呈多特異性抗體形式，諸如(但不限於)雙特異性抗體。

在一態樣中，本發明提供抗Axl抗體及其使用方法。

在一些實施例中，本發明提供特異性結合人類Axl而非小鼠Axl上之抗原決定基的單株抗體，或該抗體之抗原結合片段。單株抗體可為例如嵌合抗體、人類化抗體、單鏈抗體或雙特異性抗體。在一些實施例中，抗體結合的抗原決定基與選自由3G9、8B5、12A11及4F8組成之群之單株抗體所結合之抗原決定基相同。在一些實施例中，抗體抑制配位體與Axl結合。在一些實施例中，抗體下調Axl表現。在一些實施例中，抗體識別Axl上之變性抗原決定基，如可由西方墨點法偵測。在一些實施例中，抗體之 IC_{50} 為至少約100 ng/ml。在一些實施例中，抗體抑制Gas6誘導之Axl磷酸化。

本發明亦提供醫藥組合物，其包含如前述段落中所述之單株抗體及醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，醫藥組合物進一步包含抗VEGF抗體。

本發明進一步提供包含容器、容器中所含組合物及藥品說明書之製品，其中該組合物包含所結合之Axl抗原決定基與選自由3G9、8B5、12A11及4F8組成之群之單株抗體或其抗原結合片段所結合之Axl抗原決定基相同的單株抗體，且該藥品說明書包含該組合物之使用說明。在一些實施例中，抗體為選自由3G9、8B5、12A11及4F8組成之群之單株抗體。

在一態樣中，提供編碼任一種上述抗體之聚核苷酸。在一實施例中，提供包含聚核苷酸之載體。在一實施例中，

提供包含載體之宿主細胞。在一實施例中，宿主細胞為真核細胞。在一實施例中，宿主細胞為CHO細胞。在一實施例中，提供製備抗Axl抗體之方法，其中該方法包含在適於表現編碼抗體之聚核苷酸的條件下培養宿主細胞、及分離抗體。

在一實施例中，任一種上述抗體均為單株抗體。在一實施例中，抗體為選自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段之抗體片段。在一實施例中，抗體為人類化抗體。在一實施例中，抗體為人類抗體。

【實施方式】

本發明提供以組合療法使用Axl拮抗劑及VEGF拮抗劑治療諸如癌症之病理病狀之方法。

本發明亦提供結合Axl之分離抗體及使用其之方法，例如使用其診斷或治療諸如以下之癌症的方法：骨髓性白血病、肺癌(例如非小細胞肺癌(NSCLC))、胃癌、乳癌、前列腺癌、腎細胞癌、胰臟癌及神經膠母細胞瘤。

I. 一般技術

本文中所述或所參考之技術及程序為熟習該項技術者已廣泛瞭解且共同使用的習知方法，諸如描述於以下文獻中之廣泛使用方法：Sambrook等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 第3版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.；*Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, 等人編，(2003))；叢刊*Methods in Enzymology* (Academic Press,

Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M. J. MacPherson, B. D. Hames 及 G. R. Taylor 編 (1995)), Harlow 及 Lane 編 (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual* 及 *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney 編 (1987)) ; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait 編 , 1984) ; *Methods in Molecular Biology*, Humana Press ; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis 編 , 1998) Academic Press ; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney) 編 , 1987) ; *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather 及 P. E. Roberts, 1998) Plenum Press ; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths 及 D. G. Newell 編 , 1993-8) J. Wiley and Sons ; *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir 及 C. C. Blackwell 編) ; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller 及 M. P. Calos 編 , 1987) ; *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis 等人 編 , 1994) ; *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan 等人 編 , 1991) ; *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999) ; *Immunobiology* (C. A. Janeway 及 P. Travers, 1997) ; *Antibodies* (P. Finch, 1997) ; *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty. 編 , IRL Press, 1988-1989) ; *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd 及 C. Dean 編 , Oxford University Press, 2000) ; *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow 及 D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) ; *The*

Antibodies (M. Zanetti及J. D. Capra編，Harwood Academic Publishers, 1995)；及 *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V. T. DeVita等人編，J.B. Lippincott Company, 1993)。

II. 定義

為解釋本說明書之目的，以下定義將適用，且只要適合時，以單數所用之術語亦將包括複數，反之亦然。若下述任何定義與以引用的方式併入本文中之任何文獻相悖，則以下述定義為準。

多肽「變異體」意謂與原生序列多肽具有至少約80%胺基酸序列一致性之生物學活性多肽。該等變異體包括例如在多肽之N或C端添加或缺失一或多個胺基酸殘基之多肽。通常，變異體與原生序列多肽將具有至少約80%胺基酸序列一致性、更佳至少約90%胺基酸序列一致性且甚至更佳至少約95%胺基酸序列一致性。

「原生序列」多肽包含與源自自然界之多肽具有相同胺基酸序列之多肽。因此，原生序列多肽可具有任何哺乳動物之天然存在多肽的胺基酸序列。該原生序列多肽可自自然界分離，或可由重組或合成方法製備。術語「原生序列」多肽特定包涵天然存在之截短型或分泌型多肽(例如胞外域序列)、天然存在之變異型(例如選擇性剪接型)多肽及天然存在之對偶基因變異體多肽。

「抗Ax1抗體」為以足夠親和力及特異性結合Ax1之抗體。所選抗體通常對Ax1具有足夠強之結合親和力，例如

抗體可以100 nM-1 pM之間的 K_d 值結合人類Axl。在某些實施例中，結合Axl之抗體具有 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 或 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 之解離常數(K_d)。舉例而言，抗體親和力可藉由例如基於表面電漿子共振之分析法(諸如描述於PCT申請公開案第WO 2005/012359號中之BIAcore分析法)、酶聯免疫吸附分析法(ELISA)及競爭分析法(例如RIA)測定。較佳地，抗Axl抗體與不相關非Axl蛋白之結合程度小於該抗體與Axl之結合程度之約10%，如藉由例如放射免疫分析法(RIA)所量測。在某些實施例中，抗Axl抗體可用作靶向及干預涉及Axl活性之疾病或病狀的治療劑。此外，可對抗體進行其他生物活性分析法，例如以評估其作為治療劑之有效性。該等分析法在此項技術中已知且視標靶抗原及抗體之預定用途而定。

「Axl拮抗劑」(可互換地稱為「Axl抑制劑」)為干擾Axl活化或功能之藥劑。Axl抑制劑之實例包括Axl抗體；Axl配位體抗體；小分子Axl拮抗劑；Axl酪胺酸激酶抑制劑；反義及抑制性RNA(例如shRNA或siRNA)分子(參見例如WO 2004/87207)。較佳地，Axl抑制劑為結合Axl之抗體或小分子。在一特定實施例中，Axl抑制劑對Axl具有約1,000 nM或小於1,000 nM之結合親和力(解離常數)。在另一實施例中，Axl抑制劑對Axl具有約100 nM或小於100 nM之結合親和力。在另一實施例中，Axl抑制劑對Axl具有約50 nM或小於50 nM之結合親和力。在一特定實施例中，Axl抑制劑與Axl共價結合。在一特定實施例中，Axl抑制

劑以 1,000 nM 或小於 1,000 nM 之 IC_{50} 抑制 Axl 信號傳導。在另一實施例中，Axl 抑制劑以 500 nM 或小於 500 nM 之 IC_{50} 抑制 Axl 信號傳導。在另一實施例中，Axl 抑制劑以 50 nM 或小於 50 nM 之 IC_{50} 抑制 Axl 信號傳導。

「Axl 活化」係指 Axl 受體之活化或磷酸化。通常，Axl 活化引起信號轉導(例如由 Axl 受體之胞內激酶域使 Axl 或受質多肽內之酪胺酸殘基磷酸化所引起)。Axl 活化可由 Axl 配位體(例如 Gas6)結合相關 Axl 受體介導。Axl 配位體結合 Axl 可活化 Axl 之激酶域且由此引起 Axl 中之酪胺酸殘基磷酸化及/或其他受質多肽中之酪胺酸殘基磷酸化。

如本文中所用之術語「配位體非依賴性」，例如應用於受體信號傳導活性時，係指信號傳導活性不依賴於配位體之存在。舉例而言，EGFR 信號傳導可由與 HER 家族之其他成員(諸如 HER2)二聚所引起。受體具有配位體非依賴性激酶活性不一定會妨礙配位體與該受體之結合，從而產生激酶活性之其他活化。

如本文中所用之術語「組成性」，例如應用於受體激酶活性時，係指受體之連續信號傳導活性不依賴於配位體或其他活化分子之存在。舉例而言，常見於多形性神經膠母細胞瘤中之 EGFR 變異體 III(EGFRvIII)已缺失其大部分胞外域。儘管配位體不能結合 EGFRvIII，然而其持續具有活性且與異常增殖及存活相關。視受體性質而定，所有活性可為組成性的或受體之活性可由其他分子(例如配位體)結合進一步活化。一般熟習此項技術者熟知引起受體活化之

細胞事件。舉例而言，活化可包括寡聚(例如二聚、三聚等)成高級受體複合物。複合物可包含單一物種之蛋白質，亦即均聚複合物。或者，複合物可包含至少兩個不同物種之蛋白質，亦即雜聚複合物。複合物形成可由例如正常或突變型受體在細胞表面上過度表現而引起。複合物形成亦可由受體之一或多個特異性突變而引起。

術語「VEGF」或「VEGF-A」用於指165-胺基酸人類血管內皮細胞生長因子及相關的121-胺基酸、189-胺基酸及206-胺基酸人類血管內皮細胞生長因子，如Leung等人，*Science*, 246:1306 (1989)及Houck等人，*Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991)所述，以及其天然存在之對偶基因形式及經處理形式。VEGF-A為包括VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-F及PlGF之基因家族之一部分。VEGF-A主要結合兩種高親和力受體酪胺酸激酶VEGFR-1(Flt-1)及VEGFR-2(Flk-1/KDR)，VEGFR-2(Flk-1/KDR)為VEGF-A之血管內皮細胞致有絲分裂信號傳導之主要傳遞質。此外，神經纖毛蛋白-1已鑑別為結合肝素之VEGF-A同功異型物之受體且可在血管發育中起重要作用。術語「VEGF」或「VEGF-A」亦指非人類物種(諸如小鼠、大鼠或靈長類動物)之VEGF。特定物種之VEGF有時用諸如hVEGF(對於人類VEGF)或mVEGF(對於鼠類VEGF)之術語表示。術語「VEGF」亦用於指包含165-胺基酸人類血管內皮細胞生長因子之胺基酸8至109或1至109之多肽之截短形式或片段。在本案中，提及任何該等形式之VEGF均可用例如

「VEGF(8-109)」、「VEGF(1-109)」或「VEGF₁₆₅」標識。

「截短」型原生VEGF之胺基酸位置如原生VEGF序列中所示進行編號。舉例而言，截短型原生VEGF中之胺基酸位置17(甲硫胺酸)亦為原生VEGF中之位置17(甲硫胺酸)。截短型原生VEGF對KDR及Flt-1受體之結合親和力與原生VEGF相當。

如本文中所用之術語「VEGF變異體」係指在原生VEGF序列中包括一或多個胺基酸突變的VEGF多肽。一或多個胺基酸突變視情況包括胺基酸取代。為簡寫本文中所述之VEGF變異體名稱之目的，應注意編號係指沿公認原生VEGF之胺基酸序列之胺基酸殘基位置(Leung等人(同上)及Houck等人(同上)提供)。

「VEGF生物活性」包括與任何VEGF受體結合或任何VEGF信號傳導活性，諸如調節正常與異常血管生成及血小管生成(Ferrara及Davis-Smyth (1997) *Endocrine Rev.* 18:4-25; Ferrara (1999) *J. Mol. Med.* 77:527-543); 促進胚胎血小管生成及血管生成(Carmeliet等人, (1996) *Nature* 380:435-439; Ferrara等人, (1996) *Nature* 380:439-442); 及調節雌性生殖道中環狀血管增生及骨骼生長及軟骨形成(Ferrara等人, (1998) *Nature Med.* 4:336-340; Gerber等人, (1999) *Nature Med.* 5:623-628)。除作為血管生成及血小管生成中之血管生成因子之外，作為多效性生長因子之VEGF亦在其他生理學過程(諸如內皮細胞存活、血管滲透性及血管擴張、單核細胞趨化性及鈣流入)中展現多重生

物效應 (Ferrara及 Davis-Smyth (1997), 同上及 Cebe-Suarez 等人, *Cell. Mol. Life Sci.* 63:601-615 (2006))。此外, 最近研究已報導 VEGF 對少數非內皮細胞類型 (諸如視網膜色素上皮細胞、胰管細胞及許旺氏細胞 (Schwann cell)) 的促有絲分裂作用。Guerrin 等人, (1995) *J. Cell Physiol.* 164: 385-394; Oberg-Welsh 等人, (1997) *Mol. Cell. Endocrinol.* 126:125-132; Sondell 等人, (1999) *J. Neurosci.* 19:5731-5740。

「血管生成抑制劑」或「抗血管生成劑」係指直接或間接抑制血管生成、血小管生成或非所要之血管通透性的小分子量物質、聚核苷酸、多肽、分離蛋白、重組蛋白、抗體、或其結合物或融合蛋白。應瞭解, 抗血管生成劑包括結合血管生成因子或其受體且阻斷血管生成因子或其受體之血管生成活性的抗血管生成劑。舉例而言, 抗血管生成劑為如上文所定義之抗體或其他血管生成劑拮抗劑, 例如抗 VEGF-A 或 VEGF-A 受體 (例如 KDR 受體或 Flt-1 受體) 之抗體、抗 PDGFR 抑制劑, 諸如 GLEEVEC® (甲磺酸伊馬替尼 (Imatinib Mesylate))。抗血管生成劑亦包括原生血管生成抑制劑, 例如血管抑制素、內皮抑制素等。參見例如 Klagsbrun 及 D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit 及 Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (例如表 3 列出惡性黑色素瘤之抗血管生成療法); Ferrara 及 Alitalo, *Nature Medicine* 5:1359-1364 (1999); Tonini 等人, *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (例如表 2 列出已知的抗

血管生成因子)；及 Sato. *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003)(例如表1列出臨床試驗中所使用的抗血管生成劑)。

「VEGF拮抗劑」係指能夠中和、阻斷、抑制、中止、減少或干擾VEGF活性(包括其與一或多個VEGF受體之結合)的分子。在某些實施例中，VEGF拮抗劑將VEGF之表現量或生物活性減少或抑制至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或90%以上。在一實施例中，受VEGF拮抗劑抑制之VEGF為VEGF(8-109)、VEGF(1-109)或VEGF₁₆₅。適用於本發明方法中之VEGF拮抗劑包括特異性結合VEGF之肽基或非肽基化合物，諸如抗VEGF抗體及其抗原結合片段；特異性結合VEGF之多肽或其片段；及特異結合VEGF、藉此隔絕其與一或多種受體(例如可溶性VEGF受體蛋白或其VEGF結合片段，或嵌合VEGF受體蛋白)結合之受體分子及衍生物；與編碼VEGF多肽之核酸分子之至少一個片段互補的反義核苷酸寡聚物；與編碼VEGF多肽之核酸分子之至少一個片段互補的小RNA；靶向VEGF之核糖酶；抗VEGF之肽體；及VEGF適體。

「抗VEGF抗體」為以足夠親和力及特異性結合VEGF之抗體。所選抗體對VEGF通常具有足夠強之結合親和力，例如抗體可以100 nM-1 pM之間的K_d值結合hVEGF。抗體親和力可藉由例如基於表面電漿子共振之分析法(諸如描述於PCT申請公開案第WO 2005/012359號中之BIAcore分析法)、酶聯免疫吸附分析法(ELISA)及競爭分析法(例如

RIA)測定。在某些實施例中，本發明之抗VEGF抗體可用作靶向及干預涉及VEGF活性之疾病或病狀的治療劑。此外，可對抗體進行其他生物活性分析法，例如以評估其作為治療劑之有效性。該等分析法在此項技術中已知且視標靶抗原及抗體之預定用途而定。實例包括HUVEC抑制分析法(如以下實例中所述)；腫瘤細胞生長抑制分析法(如(例如)WO 89/06692中所述)；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)及補體介導之細胞毒性(CDC)分析法(美國專利5,500,362)；及拮抗活性或血細胞生成分析法(參見WO 95/27062)。抗VEGF抗體通常不會結合其他VEGF同源物，諸如VEGF-B或VEGF-C，亦不會結合其他生長因子，諸如PIGF、PDGF或bFGF。

在某些實施例中，抗VEGF抗體包括單株抗體，該單株抗體所結合的抗原決定基與由融合瘤ATCC HB 10709所產生之單株抗VEGF抗體A4.6.1(根據Presta等人，*Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)所產生之重組人類化抗VEGF單株抗體)所結合之抗原決定基相同。在一實施例中，抗VEGF抗體為「貝伐珠單抗(BV)」，亦稱為「rhuMAb VEGF」或「AVASTIN[®]」。貝伐珠單抗包含突變型人類IgG1構架區及抗原結合互補決定區，抗原結合互補決定區來自阻斷人類VEGF與其受體結合之鼠類抗hVEGF單株抗體A.4.6.1。貝伐珠單抗(包括大部分構架區)之胺基酸序列中約93%來源於人類IgG1，且約7%序列來源於鼠類抗體A4.6.1。貝伐珠單抗具有約149,000道爾頓(dalton)之分子量且經糖基化。

貝伐珠單抗已由FDA批准與化學治療方案組合用於治療轉移性結腸直腸癌(CRC)及非小細胞肺癌(NSCLC)。Hurwitz等人, *N. Engl. J. Med.* 350:2335-42 (2004); Sandler等人, *N. Engl. J. Med.* 355:2542-50 (2006)。目前許多臨床試驗正在對貝伐珠單抗治療各種癌症適應症進行研究。Kerbel, *J. Clin. Oncol.* 19:45S-51S (2001); De Vore等人, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 19:485a. (2000); Hurwitz等人, *Clin. Colorectal Cancer* 6:66-69 (2006); Johnson等人, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20:315a (2001); Kabbinavar等人, *J. Clin. Oncol.* 21:60-65 (2003); Miller等人, *Breast Can. Res. Treat.* 94:Suppl 1:S6 (2005)。

貝伐珠單抗及其他人類化抗VEGF抗體進一步描述於2005年2月26日頒予之美國專利第6,884,879號中。其他抗體包括G6或B20系列抗體(例如G6-31, B20-4.1), 如PCT公開案第WO 2005/012359號、PCT公開案第WO 2005/044853號及美國專利申請案60/991,302中所述, 此等專利申請案之內容以引用方式明確併入本文中。關於其他抗體, 參見美國專利第7,060,269號、第6,582,959號、第6,703,020號、第6,054,297號; WO 98/45332; WO 96/30046; WO 94/10202; EP 0666868B1; 美國專利申請公開案第2006009360號、第20050186208號、第20030206899號、第20030190317號、第20030203409號及第20050112126號; 及 Popkov 等人, *Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004)。其他抗體包括可與包含殘基F17、

M18、D19、Y21、Y25、Q89、I91、K101、E103及C104或者包含殘基F17、Y21、Q22、Y25、D63、I83及Q89之人類VEGF上之功能性抗原決定基結合的抗體。

本發明之「G6系列抗體」為來源於PCT公開案第WO 2005/012359號之圖7、24-26及34-35中任一者之G6抗體或G6衍生抗體之序列的抗VEGF抗體，該案全部內容以引用方式明確併入本文中。亦參見PCT公開案第WO 2005/044853號，該案全部內容以引用方式明確併入本文中。在一實施例中，G6系列抗體與包含殘基F17、Y21、Q22、Y25、D63、I83及Q89之人類VEGF上之功能性抗原決定基結合。

本發明之「B20系列抗體」為來源於PCT公開案第WO 2005/012359號之圖27-29中任一者之B20抗體或B20衍生抗體之序列的抗VEGF抗體，該案全部內容以引用方式明確併入本文中。亦參見PCT公開案第WO 2005/044853號及美國專利申請案60/991,302，此等專利申請案之內容以引用方式明確併入本文中。在一實施例中，B20系列抗體與包含殘基F17、M18、D19、Y21、Y25、Q89、I91、K101、E103及C104之人類VEGF上之功能性抗原決定基結合。

本發明之「功能性抗原決定基」係指抗原中之對抗體結合起積極作用的胺基酸殘基。任一個起積極作用之抗原殘基之突變(例如由丙胺酸或同系物突變引起之野生型VEGF突變)將中斷抗體之結合使得抗體之相對親和力比率(IC50突變型VEGF/IC50野生型VEGF)大於5(參見WO 2005/

012359之實例2)。在一實施例中，相對親和力比率係利用溶液結合噬菌體呈現ELISA測定。簡言之，在4°C下用2 ug/ml濃度(含於PBS中)之待測試抗體之Fab形式塗佈96孔Maxisorp免疫培養盤(NUNC)隔夜，且在室溫下用PBS、0.5% BSA及0.05% Tween20(PBT)阻斷2小時。噬菌體呈現hVEGF丙胺酸點突變體(殘基8-109形式)或野生型hVEGF(8-109)於PBT中之連續稀釋物首先在室溫下、在Fab塗佈之培養盤上培育15分鐘，且用PBS、0.05% Tween20(PBST)洗滌培養盤。所結合噬菌體用1:5000於PBT中稀釋之抗M13單株抗體辣根過氧化酶(Amersham Pharmacia)偵測，且用3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMB, Kirkegaard & Perry Labs, Gaithersburg, MD)受質顯色約5分鐘，用1.0 M H₃PO₄淬滅，且在450 nm下以分光光度計讀取。IC₅₀值之比率(IC_{50,ala}/IC_{50,wt})表示結合親和力之降低倍數(相對結合親和力)。

「酪胺酸激酶抑制劑」為在某種程度上抑制酪胺酸激酶之酪胺酸激酶活性的分子，諸如Axl受體。

「嵌合VEGF受體蛋白」為具有來源於至少兩種不同蛋白質之胺基酸序列的VEGF受體分子，其中至少一者為VEGF受體蛋白。在某些實施例中，嵌合VEGF受體蛋白能夠結合VEGF且抑制VEGF之生物活性。

具有指定抗體的「生物學特徵」之抗體為具有彼抗體之一或多種生物學特徵的抗體，該等生物學特徵將其與結合相同抗原之其他抗體相區分。

「片段」意謂一種多肽或核酸分子之一部分，該部分較佳含有參考核酸分子或多肽之全長的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或95%以上。片段可含有10、20、30、40、50、60、70、80、90或100、200、300、400、500、600或600個以上核苷酸，或10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、190、200或200個以上胺基酸。

「治療」係指治療性處理及防治性或預防性措施。需要治療者包括已患有良性、癌前期或非轉移性腫瘤者，以及預防癌症發生或復發者。

術語「治療有效量」係指治療或預防哺乳動物疾病或病症之治療劑的量。在癌症情況下，治療劑之治療有效量可減少癌細胞數目；降低原發性腫瘤尺寸；抑制(亦即在某種程度上減緩且較佳終止)癌細胞浸潤至周邊器官中；抑制(亦即在某種程度上減緩且較佳終止)腫瘤轉移；在某種程度上抑制腫瘤生長；及/或在某種程度上減輕與病症相關的一或多種症狀。就藥物可防止生長及/或殺死現有癌細胞而言，藥物可為細胞生長抑制劑及/或細胞毒性劑。癌症治療之活體內功效可藉由例如評估存活持續時間、疾病進展時間(TTP)、反應率(RR)、反應持續時間及/或生活品質來量測。

術語「癌症」及「癌性」係指或描述哺乳動物體內通常以細胞生長調節異常為特徵之生理病況。此定義包括良性及惡性癌症。「早期癌症」或「早期腫瘤」意謂非侵襲性

或轉移性或分類為0、I或II期癌症之癌症。癌症之實例包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤、母細胞瘤(包括神經管母細胞瘤及視網膜母細胞瘤)、肉瘤(包括脂肪肉瘤及滑膜細胞肉瘤)、神經內分泌腫瘤(包括類癌腫瘤、胃泌素瘤及胰島細胞癌)、間皮瘤、神經鞘瘤(包括聽神經瘤)、腦膜瘤、腺癌、黑色素瘤及白血病或淋巴惡性疾病。該等癌症之更特定實例包括鱗狀細胞癌(例如上皮鱗狀細胞癌)、肺癌(包括小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺腺癌及肺鱗狀癌)、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌(包括胃腸癌)、胰臟癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝腫瘤(hepatoma)、乳癌(包括轉移性乳癌)、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌、唾液腺癌、腎癌、前列腺癌、陰門癌、甲狀腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、肛門癌、陰莖癌、睪丸癌、食道癌、膽道腫瘤以及頭頸癌。

「轉移」意謂癌症自其原發性位點擴散至體內其他位置。癌細胞可脫離原發性腫瘤，滲入淋巴及血管中，經由血流循環且在體內其他位置處之正常組織內的遠端病灶中生長(轉移)。轉移可為局部或遠端轉移。視腫瘤細胞脫離原發性腫瘤、經由血流行進且停留在遠端位點而定，轉移為連續過程。在新位點，細胞確立血液供給且可生長而形成威脅生命之團塊。

「降低或抑制」意謂引起20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或大於95%之總

體降幅之能力。降低或抑制可涉及所治療病症之症狀、轉移之存在或尺寸、原發性腫瘤尺寸、或血管生成病症中血管之尺寸或數目。

本文中之術語「抗體」以最廣泛意義使用且尤其涵蓋單株抗體、多株抗體、由至少兩個完整抗體形成之多特異性抗體(例如雙特異性抗體)，及抗體片段，只要其展現所要生物活性即可。

「分離」抗體為已鑑別且與其天然環境之組分分離及/或自其天然環境之組分中回收的抗體。其天然環境之污染物組分為干擾抗體之研究、診斷性或治療性使用的物質，且可包括酵素、激素及其他蛋白性溶質或非蛋白性溶質。在一些實施例中，抗體純化至(1)大於95重量%之抗體且在一些實施例中大於99重量%(如利用例如洛瑞法(Lowry method)所測定)；(2)足以獲得N端或內部胺基酸序列之至少15個殘基的程度(使用例如旋杯式定序儀(spinning cup sequenator))；或(3)均質之程度(在還原或非還原性條件下使用例如庫馬斯藍(Coomassie blue)或銀染料進行SDS-PAGE)。由於抗體之天然環境中之至少一種組分將不存在，因此分離抗體包括重組細胞內原位之抗體。然而，分離抗體通常藉由至少一個純化步驟來製備。

「原生抗體」通常為約150,000道爾頓之雜四聚糖蛋白，其由兩條相同輕鏈(L)及兩條相同重鏈(H)構成。各輕鏈經由一個共價雙硫鍵與重鏈連接，而在不同免疫球蛋白同型之重鏈間，雙硫鍵之數目不同。各重鏈及輕鏈亦具有

規律性間隔之鏈內雙硫橋。各重鏈在一端具有可變域(V_H)，其後為大量恆定域。各輕鏈在一端具有可變域(V_L)且在另一端具有恆定域；輕鏈之恆定域與重鏈之第一恆定域對準，且輕鏈可變域與重鏈可變域對準。成信特定胺基酸殘基形成輕鏈與重鏈可變域之間的界面。

抗體之「可變區」或「可變域」係指抗體重鏈或輕鏈之胺基端結構域。重鏈之可變域可稱為「 V_H 」。輕鏈之可變域可稱為「 V_L 」。此等結構域通常為抗體之最易變部分且含有抗原結合位點。

術語「可變」係指可變域之某些部分的序列在各種抗體之間廣泛不同且該等部分用於各種特定抗體對其特定抗原之結合及特異性。然而，可變性在整個抗體可變域中並非均勻分佈。其集中於輕鏈可變域及重鏈可變域中三個稱為高變區(HVR)之區段中。可變域之較高度保守部分稱為構架區(FR)。原生重鏈及輕鏈之可變域各包含四個FR區，該等FR區主要採用 β 片構形、經由三個HVR連接，從而形成連接 β 片結構的環，且在一些情況下該等環形成 β 片結構之一部分。各鏈中之HVR經由FR區緊密結合在一起，且與另一鏈之HVR一起促使形成抗體之抗原結合位點(參見Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，National Institute of Health, Bethesda, MD (1991))。恆定域不直接涉及抗體與抗原之結合，但展現各種效應功能，諸如抗體參與抗體依賴性細胞毒性。

來自任何脊椎動物種之抗體(免疫球蛋白)之「輕鏈」基

於其恆定域之胺基酸序列可歸類為兩種明顯不同類型(稱為 κ 及 λ)之一。

抗體(免疫球蛋白)視其重鏈之恆定域之胺基酸序列而定可歸為不同類。存在五種主要類別之免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且此等免疫球蛋白中之若干者可進一步分為亞類(同型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於不同類免疫球蛋白的重鏈恆定域分別稱為 α 、 β 、 ϵ 、 γ 及 μ 。不同類免疫球蛋白之次單位結構及三維構形已熟知且大體描述於例如Abbas等人，*Cellular and Mol. Immunology*，第4版(W.B. Saunders, Co., 2000)中。抗體可為由該抗體與一或多種其他蛋白質或肽共價或非共價結合所形成之較大融合分子的一部分。

術語「全長抗體」、「完整抗體」及「整個抗體」在本文中可互換使用以指呈實質上完整形式之抗體，而非如下所定義之抗體片段。該等術語尤其指具有包含Fc區之重鏈的抗體。

用於本文目的之「裸抗體」為未與細胞毒性部分或放射性標記結合之抗體。

「抗體片段」包含完整抗體之一部分，較佳包含其抗原結合區。抗體片段之實例包括Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段；雙功能抗體；線性抗體；單鏈抗體分子及由抗體片段形成之多特異性抗體。

木瓜蛋白酶消化抗體產生兩個稱為「Fab」片段之相同抗原結合片段，各具有單一抗原結合位點；及一殘餘

「Fc」片段，其名稱反映其易於結晶之能力。胃蛋白酶處理產生具有兩個抗原結合位點且仍能夠與抗原交聯之 $F(ab')_2$ 片段。

「Fv」為含有完整抗原結合位點之最小抗體片段。在一實施例中，雙鏈Fv物質由緊密、非共價結合之一個重鏈可變域與一個輕鏈可變域之二聚體組成。在單鏈Fv(scFv)物質中，一個重鏈可變域與一個輕鏈可變域可經由柔性肽連接子共價連接，使得輕鏈與重鏈可以類似於雙鏈Fv物質結構之「二聚」結構結合。在此構形中，各可變域之三個HVR相互作用以設定VH-VL二聚體表面上之抗原結合位點。總而言之，六個HVR使抗體具有抗原結合特異性。然而，即使單個可變域(或僅包含三個對抗原具有特異性之HVR之Fv的一半)亦能夠識別及結合抗原，但是親和力低於完整結合位點。

Fab片段含有重鏈可變域及輕鏈可變域且亦含有輕鏈之恆定域及重鏈之第一恆定域(CH1)。Fab'片段因在重鏈CH1結構域之羧基末端添加有少量殘基(包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸)而與Fab片段不同。Fab'-SH在本文中指示其中恆定域之半胱胺酸殘基帶有游離硫醇基之Fab'。 $F(ab')_2$ 抗體片段最初係作為其間具有鉸鏈半胱胺酸之Fab'片段對產生。亦已知抗體片段之其他化學偶合。

「單鏈Fv」或「scFv」抗體片段包含抗體之VH及VL域，其中此等域存在於單一多肽鏈中。通常，scFv多肽進一步包含VH與VL域之間之多肽連接子，其使scFv能夠形

成抗原結合所需結構。欲回顧scFv，參見例如Pluckthün, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*，第113卷，Rosenburg及Moore編，(Springer-Verlag, New York, 1994)，第269-315頁。

術語「雙功能抗體」係指具有兩個抗原結合位點之抗體片段，該等片段在同一多肽鏈(VH-VL)中包含相連接之重鏈可變域(VH)與輕鏈可變域(VL)。因使用連接子過短而無法使同一鏈上兩個域之間配對，該等域被迫與另一條鏈之互補域配對且產生兩個抗原結合位點。雙功能抗體可為二價或雙特異性抗體。雙功能抗體更全面地描述於例如EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson等人，*Nat. Med.* 9:129-134 (2003)；及Hollinger等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)中。三功能抗體及四功能抗體亦描述於Hudson等人，*Nat. Med.* 9:129-134 (2003)中。

如本文所用之術語「單株抗體」係指自一群實質上同源抗體獲得之抗體，亦即構成該群體之個別抗體除可微量存在之可能突變(例如天然存在之突變)外均相同。因此，修飾語「單株」表示不為個別抗體之混合物之抗體的特徵。在某些實施例中，該單株抗體通常包括包含結合標靶之多肽序列之抗體，其中藉由包括自複數個多肽序列選擇單個標靶結合多肽序列之方法來獲得標靶結合多肽序列。舉例而言，選擇方法可為自複數個純系(諸如融合瘤純系池、噬菌體純系池或重組DNA純系池)選擇獨特純系。應瞭解，所選擇之標靶結合序列可進一步變異以例如提高對標

靶之親和力、使標靶結合序列人類化、提高其在細胞培養物中之產量、減少其活體內免疫原性、產生多特異性抗體等，且包含變異之標靶結合序列的抗體亦為本發明之單株抗體。與通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體之多株抗體製劑相反，單株抗體製劑中之各單株抗體係針對抗原上之單個決定子。單株抗體製劑除其特異性外，有利之處亦在於其通常未受到其他免疫球蛋白污染。

修飾語「單株」表示自一群實質上同源抗體獲得之抗體之特性，且不應理解為需要利用任何特定方法產生該抗體。舉例而言，根據本發明使用之單株抗體可利用多種技術製備，包括例如融合瘤方法(例如 Kohler及 Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo等人, *Hybridoma*, 14(3): 253-260 (1995); Harlow等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版 1988); Hammerling等人, 於: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)中); 重組DNA方法(參見例如美國專利案第4,816,567號); 噬菌體呈現技術(參見例如 Clackson等人, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu等人, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee等人, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); 及 Lee等人, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004)); 及用於在動物中產生具有編碼人類免疫球蛋白之

人類免疫球蛋白基因座或基因之一部分或全部之人類或人類樣抗體的技術(參見例如 WO 1998/24893 ; WO 1996/34096 ; WO 1996/33735 ; WO 1991/10741 ; Jakobovits 等人 , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993) ; Jakobovits 等人 , *Nature* 362: 255-258 (1993) ; Bruggemann 等人 , *Year in Immunol.* 7:33 (1993) ; 美國專利案第 5,545,807 號 、 第 5,545,806 號 、 第 5,569,825 號 、 第 5,625,126 號 、 第 5,633,425 號 及 第 5,661,016 號 ; Marks 等人 , *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) ; Lonberg 等人 , *Nature* 368: 856-859 (1994) ; Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994) ; Fishwild 等人 , *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996) ; Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996) ; 及 Lonberg 及 Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995))。

本文之單株抗體特定包括「嵌合」抗體，其中重鏈及/或輕鏈之一部分與源自特定物種或屬於特定抗體種類或亞類之抗體中的相應序列一致或同源，而該(該等)鏈之其餘部分與源自另一物種或屬於另一抗體種類或亞類之抗體中的相應序列一致或同源；以及該等抗體之片段，只要其展現出所需生物學活性即可(參見例如美國專利案第 4,816,567 號；及 Morrison 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。嵌合抗體包括 PRIMATIZED® 抗體，其中抗體之抗原結合區源自藉由例如以相關抗原使獼猴免疫而產生之抗體。

「人類化」形式之非人類(例如鼠類)抗體為含有源自非人類免疫球蛋白之最小序列的嵌合抗體。在一實施例中，人類化抗體為人類免疫球蛋白(受者抗體)，其中受者之HVR的殘基已經具有所要特異性、親和力及/或容量之非人類物種(供者抗體)(諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物)之HVR的殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之FR殘基經相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含未發現於受者抗體或供者抗體中之殘基。可進行此等修飾以進一步改進抗體效能。通常，人類化抗體將包含實質上全部之至少一個且通常兩個可變域，其中全部或實質上全部高變環對應於非人類免疫球蛋白之高變環，且全部或實質上全部FR為人類免疫球蛋白序列之FR。人類化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區(Fc)(通常為人類免疫球蛋白恆定區)之至少一部分。欲知詳情，參見Jones等人，*Nature* 321:522-525 (1986)；Riechmann等人，*Nature* 332:323-329 (1988)；及Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。亦參見例如Vaswani及Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998)；Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995)；Hurle及Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)；及美國專利第6,982,321號及第7,087,409號。

「人類抗體」為具有與人類所產生之抗體之胺基酸序列相對應的胺基酸序列及/或使用本文所揭示之任何製造人類抗體之技術製得的抗體。人類抗體之此定義尤其排除包

含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。可使用此項技術中已知之各種技術(包括噬菌體呈現文庫)產生人類抗體。Hoogenboom及Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks等人, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)。描述於以下文獻中之方法亦可用於製備人類單株抗體: Cole等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第77頁(1985); Boerner等人, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)中。亦參見van Dijk及van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001)。人類抗體可藉由將抗原投與轉殖基因動物來製備, 該轉殖基因動物經修飾可回應抗原攻毒而產生該等抗體、但其內源基因座已失能, 例如經免疫之異種移植小鼠(xenomice)(關於XENOMOUSE™技術, 參見例如美國專利第6,075,181號及第6,150,584號)。關於經由人類B細胞融合瘤技術產生之人類抗體, 亦參見例如Li等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)。

術語「高變區」、「HVR」或「HV」當用於本文中時係指序列高變及/或形成結構上確定之環的抗體可變域區域。通常, 抗體包含六個HVR; 三個在VH中(H1、H2、H3), 且三個在VL中(L1、L2、L3)。在原生抗體中, H3及L3顯示六個HVR之最高多樣性, 且尤其咸信H3在賦予抗體精細特異性方面起獨特作用。參見例如Xu等人, *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson及Wu, 於*Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo編, Human Press, Totowa,

NJ, 2003)。實情為，僅由重鏈組成之天然存在之駱駝科動物抗體在不存在輕鏈的情況下亦具功能性及穩定性。參見例如 Hamers-Casterman 等人，*Nature* 363:446-448 (1993)；Sheriff 等人，*Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996)。

本文中使用並涵蓋許多 HVR 敘述。Kabat 互補決定區 (CDR) 係以序列可變性為基礎且最常使用 (Kabat 等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第 5 版，公共衛生署 (Public Health Service)，國家衛生研究院 (National Institutes of Health)，Bethesda, MD. (1991))。Chothia 改為指出結構環之位置 (Chothia 及 Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。AbM HVR 代表 Kabat HVR 與 Chothia 結構環之間的折衷處理，且由 Oxford Molecular 之 AbM 抗體建模軟體使用。「接觸」HVR 係基於對可用複合物晶體結構之分析。此等 HVR 每一者之殘基註解如下。

環	Kabat	AbM	Chothia	接觸
----	----	---	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	(Kabat 編號)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Chothia 編號)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

HVR可包含如下之「延長HVR」：VL中之24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)及89-97或89-96(L3)；及VH中之26-35(H1)、50-65或49-65(H2)及93-102、94-102或95-102(H3)。可變域殘基係根據Kabat等人(同上)關於該等定義中之每一者所述進行編號。

「構架」或「FR」殘基為除如本文所定義之HVR殘基以外之可變域殘基。

術語「根據Kabat之可變域殘基編號」或「根據Kabat之胺基酸位置編號」及其變化形式係指Kabat等人(同上)之用於編譯抗體之重鏈可變域或輕鏈可變域之編號系統。使用該編號系統，實際線性胺基酸序列可含有更少或其他胺基酸(對應於可變域之FR或HVR之縮短，或插入)。舉例而言，重鏈可變域可包括位於H2殘基52後之單一胺基酸插入(殘基52a，根據Kabat)及位於重鏈FR殘基82後之插入殘基(例如殘基82a、82b及82c等，根據Kabat)。可藉由在同源區比對抗體序列與「標準」Kabat編號序列來確定指定抗體中殘基之Kabat編號。

Kabat編號系統通常在提及可變域中之殘基(大致為輕鏈殘基1-107及重鏈殘基1-113)時使用(例如Kabat等人，*Sequences of Immunological Interest*. 第5版，公共衛生署，國家衛生研究院，Bethesda, Md. (1991))。「EU編號系統」或「EU索引」通常在提及免疫球蛋白重鏈恆定區中之殘基時使用(例如Kabat等人(同上)報導之EU索引)。「根據Kabat之EU索引」係指人類IgG1 EU抗體之殘基編號。除

非本文中另有說明，否則提及抗體可變域中之殘基編號意謂依據Kabat編號系統進行之殘基編號。除非本文中另有說明，否則提及抗體恆定域中之殘基編號意謂依據EU編號系統進行之殘基編號(參見例如美國臨時申請案第60/640,323號關於EU編號之諸圖)。

「親和力成熟」抗體為其一或多個HVR中具有一或多個變異的抗體，該等變異使得抗體對抗原之親和力提高(與不具有彼等變異之親本抗體相比)。在一實施例中，親和力成熟抗體對靶抗原具有奈莫耳(nanomolar)或甚至皮莫耳(picomolar)親和力。可使用此項技術中已知之某些程序產生親和力成熟抗體。舉例而言，Marks等人之Bio/Technology 10:779-783 (1992)描述藉由VH及VL域改組進行親和力成熟。HVR及/或構架殘基之隨機突變誘發描述於例如Barbas等人，*Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994)；Schier等人，*Gene* 169:147-155 (1995)；Yelton等人，*J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995)；Jackson等人，*J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995)；及Hawkins等人，*J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)中。

「阻斷」抗體或「拮抗劑」抗體為抑制或降低其所結合之抗原之生物活性的抗體。某些阻斷抗體或拮抗劑抗體實質上或完全抑制抗原之生物活性。

如本文中所用之「促效劑抗體」為部分或完全模擬相關多肽之至少一種功能活性的抗體。

「生長抑制性」抗體為防止或減少表現抗體所結合之抗

原之細胞增殖的抗體。舉例而言，抗體可防止或減少活體外及/或活體內表現Axl之癌細胞的增殖。

「誘導細胞凋亡」之抗體為誘導漸進式細胞死亡的抗體，如藉由標準細胞凋亡分析法所測定，諸如磷脂結合蛋白V(annexin V)結合、DNA斷裂、細胞皺縮、內質網擴張、細胞斷裂、及/或膜囊(稱為細胞凋亡體)形成。

抗體「效應功能」係指由抗體之Fc區(原生序列Fc區或胺基酸序列變異體Fc區)引起之彼等生物活性，且其隨抗體同型而變化。抗體效應功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性(CDC)；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體)之下調；及B細胞活化。

本文中之術語「Fc區」用於定義免疫球蛋白重鏈之C端區域，包括原生序列Fc區及變異型Fc區。雖然免疫球蛋白重鏈之Fc區之邊界可變化，但人類IgG重鏈Fc區通常定義為自位置Cys226之胺基酸殘基或自Pro230伸展至其羧基末端。可移除Fc區之C端離胺酸(殘基447，根據EU編號系統)，例如在產生或純化抗體期間或藉由對編碼抗體重鏈之核酸進行重組工程改造來移除。因此，完整抗體之組成可包含全部K447殘基皆移除之抗體群體、K447殘基未移除之抗體群體，及具有存在K447殘基之抗體與不存在K447殘基之抗體之混合物的抗體群體。

「功能性Fc區」具有原生序列Fc區之「效應功能」。例示性「效應功能」包括C1q結合；CDC；Fc受體結合；

ADCC；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體；BCR)之下調等。該等效應功能通常需要Fc區與結合域(例如抗體可變域)組合且可使用例如本文定義中所揭示之各種分析法來評估。

「原生序列Fc區」包含與自然界中發現之Fc區之胺基酸序列一致之胺基酸序列。原生序列人類Fc區包括原生序列人類IgG₁ Fc區(非A異型及A異型)、原生序列人類IgG₂ Fc區、原生序列人類IgG₃ Fc區，及原生序列人類IgG₄ Fc區以及其天然存在之變異體。

「變異型Fc區」包含因至少一個胺基酸修飾、較佳一或多個胺基酸取代而與原生序列Fc區之彼胺基酸序列不同的胺基酸序列。較佳地，與原生序列Fc區或親本多肽之Fc區相比，變異Fc區具有至少一個胺基酸取代，例如在原生序列Fc區中或親本多肽之Fc區中具有約一個至約十個胺基酸取代，且較佳約一個至約五個胺基酸取代。本文中之變異型Fc區較佳與原生序列Fc區及/或與親本多肽之Fc區具有至少約80%之同源性，且最佳與其具有至少約90%之同源性，更佳與其具有至少約95%之同源性。

「Fc受體」或「FcR」描述結合抗體Fc區之受體。在一些實施例中，FcR為原生人類FcR。在一些實施例中，FcR為結合IgG抗體之FcR(γ 受體)且包括Fc γ RI、Fc γ RII及Fc γ RIII亞類之受體，包括該等受體之對偶基因變異體及選擇性拼接形式。Fc γ RII受體包括Fc γ RIIA(「活化受體」)及Fc γ RIIB(「抑制受體」)，其胺基酸序列相似，主要區別在

於其細胞質域。活化受體FcγRIIA在其細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之活化基元(ITAM)。抑制受體FcγRIIB在其細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之抑制基元(ITIM)(參見例如 Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997))。FcR 評述於例如 Ravetch 及 Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)；Capel 等人, *Immunomethods* 4:25-34 (1994)；及 de Haas 等人, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995) 中。本文中術語「FcR」涵蓋其他FcR，包括有待將來鑑別之FcR。

術語「Fc受體」或「FcR」亦包括新生兒受體FcRn，其負責將母體IgG傳遞至胎兒中(Guyer等人, *J. Immunol.* 117:587 (1976)及Kim等人, *J. Immunol.* 24:249 (1994))及免疫球蛋白之穩定調節。量測FcRn結合之方法已知(參見例如 Ghetie 及 Ward., *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997)；Ghetie等人, *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997)；Hinton 等人, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004)；WO 2004/92219 (Hinton 等人))。

可例如在表現人類FcRn之轉殖基因小鼠或經轉染人類細胞株中，或在投與具有變異型Fc區之多肽的靈長類動物中，分析人類FcRn高親和力結合多肽之活體內人類FcRn結合及血清半衰期。WO 2000/42072(Presta)描述與FcR之結合增強或減弱的抗體變異體。亦參見例如 Shields 等人, *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001)。

「人類效應細胞」為表現一或多種FcR且執行效應功能

之白血球。在某些實施例中，該等細胞至少表現Fc γ RIII且執行ADCC效應功能。介導ADCC之人類白血球之實例包括周邊血液單核細胞(PBMC)、自然殺手(NK)細胞、單核細胞、細胞毒性T細胞及嗜中性白血球。可自原生來源(例如血液)分離效應細胞。

「抗體依賴性細胞介導之細胞毒性」或「ADCC」係指一種細胞毒性形式，其中所分泌之Ig結合於某些細胞毒性細胞(例如NK細胞、嗜中性白血球及巨噬細胞)上所存在之Fc受體(FcR)使得此等細胞毒性效應細胞能夠特異性結合攜有抗原之標靶細胞且隨後用細胞毒素殺死該標靶細胞。介導ADCC之初級細胞、NK細胞僅表現Fc γ RIII，而單核細胞表現Fc γ RI、Fc γ RII及Fc γ RIII。FcR在造血細胞上之表現概述於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)之第464頁上的表3中。為評估相關分子的ADCC活性，可執行活體外ADCC分析法，諸如美國專利第5,500,362號或第5,821,337號或美國專利第6,737,056號(Presta)中所述之分析法。適用於該等分析法之效應細胞包括PBMC及NK細胞。或者或另外，相關分子的ADCC活性可於活體內，例如在諸如Clynes等人，*PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)所揭示之動物模型中評估。

「補體依賴性細胞毒性」或「CDC」係指標靶細胞在補體存在下溶解。經典補體路徑之活化係藉由補體系統之第一組分(C1q)與結合其同源抗原之抗體(適當亞類之抗體)結合來啟動。為評估補體活化，可進行CDC分析法，例如

Gazzano-Santoro 等人，*J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)中所述。具有變異Fc區胺基酸序列(具有變異型Fc區之多肽)且C1q結合能力增加或減小之多肽變異體描述於例如美國專利第6,194,551 B1號及WO 1999/51642中。亦參見例如 Idusogie 等人，*J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)。

術語「包含Fc區之抗體」係指包含Fc區之抗體。可移除Fc區之C端離胺酸(殘基447，根據EU編號系統)，例如在抗體純化期間或藉由對編碼抗體之核酸進行重組工程改造來移除。因此，包含具有本發明之Fc區之抗體的組合物可包含具有K447之抗體、所有K447均移除之抗體、或具有K447殘基之抗體與不具有K447殘基之抗體的混合物。

「結合親和力」通常係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間非共價相互作用力的總和。除非另有說明，否則如本文所使用之「結合親和力」係指反映結合對(例如抗體與抗原)成員之間1:1相互作用之固有結合親和力。分子X對其搭配物Y之親和力通常可由解離常數(K_d)表示。可藉由此項技術中已知之常用方法(包括本文所述之方法)量測親和力。低親和力抗體一般緩慢結合抗原且傾向於容易解離，而高親和力抗體一般較快結合抗原且傾向於保持較長時間結合。此項技術中已知多種量測結合親和力之方法，其中任一種方法均可用於本發明之目的。量測結合親和力之特定說明性及例示性實施例描述於下文。

在一實施例中，本發明之「 K_d 」或「 K_d 值」係藉由放射

性標記抗原結合性分析法(RIA)量測，該分析法利用相關抗體之Fab形式及其抗原執行，如以下分析法所述。Fab對抗原之溶液結合親和力如下量測：在連續滴定之未標記抗原存在下，使Fab與最小濃度之(^{125}I)標記之抗原平衡，接著用塗佈抗Fab抗體之培養盤捕捉所結合抗原(參見例如Chen等人，*J. Mol. Biol.*, 293:865-881(1999))。為建立分析條件，用含5 $\mu\text{g/ml}$ 捕捉抗Fab抗體(Cappel Labs)之50 mM碳酸鈉(pH 9.6)塗佈MICROTITER[®]多孔培養盤(Thermo Scientific)隔夜，且接著在室溫(約23°C)下用含2%(w/v)牛血清白蛋白之PBS阻斷2至5小時。在非吸附培養盤(Nunc #269620)中，將100 pM或26 pM [^{125}I]-抗原與相關Fab之連續稀釋液混合(例如按照Presta等人，*Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)中之抗VEGF抗體Fab-12之評估)。接著培育相關Fab隔夜；然而，可持續培育較長時間(例如約65小時)以確保達到平衡。此後，在室溫下將混合物轉移至捕捉性培養盤中培育(例如歷時1小時)。隨後移除溶液且用含0.1% TWEEN-20TM之PBS洗滌培養盤八次。當培養盤乾燥時，每孔添加150微升閃爍體(MICROSCINT-20TM；Packard)，且培養盤在TOPCOUNTTM γ 計數器(Packard)上計數十分鐘。得到小於或等於20%最大結合之各Fab濃度選用於競爭性結合分析法。

根據另一實施例，藉由在25°C下，使用BIAcore[®]-2000或BIAcore[®]-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)，利用以約10個反應單位(RU)固定之抗原CM5晶片，使用表面電

漿子共振分析法來量測 K_d 或 K_d 值。簡言之，根據供應商說明書，以 N -乙基- N' -(3-二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及 N -羥基丁二醯亞胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物感應器晶片(CM5, BIACORE, Inc.)。用10 mM乙酸鈉(pH 4.8)稀釋抗原至5 $\mu\text{g/ml}$ (約0.2 μM)，再以5微升/分鐘之流速注射，以獲得約10個反應單位(RU)之偶合蛋白。注射抗原之後，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應基團。為進行動力學量測，在25 $^{\circ}\text{C}$ 下，以約25 $\mu\text{l/min}$ 之流速注射Fab於含0.05% TWEEN-20TM界面活性劑之PBS(PBST)中之兩倍連續稀釋液(0.78 nM至500 nM)。使用簡單的一對一朗繆爾結合模型(one-to-one Langmuir binding model)(BIACORE[®]評估軟體3.2版)，藉由同時擬合結合及解離感應圖譜來計算結合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。根據 k_{off}/k_{on} 比率計算平衡解離常數(K_d)。參見例如Chen等人，*J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)。若依據上述表面電漿共振分析法，結合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ，則可藉由使用螢光淬滅技術測定結合速率，該技術係在遞增濃度之抗原(如分光計(諸如配備停流模式之分光光度計(Aviv Instruments)或具有攪拌式比色管的8000系列SLM-AMINCOTM分光光度計(ThermoSpectronic))所量測)存在下，在25 $^{\circ}\text{C}$ 下量測含於PBS(pH 7.2)中之20 nM抗抗原抗體(Fab形式)之螢光發射強度(激發=295 nm；發射=340 nm，16 nm帶通)的增大或減小。

本發明之「結合速率」或「 k_{on} 」亦可如上所述使用

BIACORE[®]-2000 或 BIACORE[®]-3000 系統 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 來測定。

如本文中所用之術語「實質上類似」或「實質上相同」表示兩個數值(例如一個與本發明抗體相關且另一個與參考/比較抗體相關)之間具有足夠高之相似度，以致熟習此項技術者會認為，在生物學特徵依據該等值(例如 K_d 值)度量之情況下，兩個值之間之差異很小或無生物學及/或統計學顯著性。以參考/比較值計，該兩個值之間的差異為例如小於約 50%、小於約 40%、小於約 30%、小於約 20% 及/或小於約 10%。

如本文中所用之片語「實質上減小」或「實質上不同」表示兩個數值(通常一個與分子相關且另一個與參考/比較分子相關)之間具有足夠高之差異，以致熟習此項技術者會認為，在生物學特徵依據該等值(例如 K_d 值)度量之之情況下，該兩個值之間之差異具有統計學顯著性。以參考/比較分子之值計，該兩個值之間的差異為例如大於約 10%、大於約 20%、大於約 30%、大於約 40% 及/或大於約 50%。

「純化」意謂分子存在於樣品中之濃度為至少 95% 或至少 98%(以含有其之樣品重量計)。

「分離」核酸分子為一種核酸分子，其已與其通常所結合之至少一種其他核酸分子(例如在其天然環境中)分離。分離核酸分子進一步包括通常表現核酸分子之細胞中所含之核酸分子，但該核酸分子存在於染色體外或存在於與其

天然染色體位置不同之染色體位置。

如本文所使用之術語「載體」意指一種核酸分子，其能夠轉運其所連接之另一核酸分子。一類載體為「質體」，其指可接合其他DNA區段之環形雙股DNA。另一類載體為病毒載體，其中可將其他DNA區段接合至病毒基因組中。某些載體能夠在引入該等載體之宿主細胞中自主複製(例如具有細菌複製起點之細菌載體及游離型哺乳動物載體)。其他載體(例如非游離型哺乳動物載體)可在引入宿主細胞之後整合至宿主細胞基因組中，且從而與宿主基因組一起複製。此外，某些載體能夠導引其可操作地連接之基因之表現。該等載體在本文中稱為「重組性表現載體」或簡稱「表現載體」。通常，適用於重組DNA技術中之表現載體通常呈質體形式。在本說明書中，由於質體為最常用之載體形式，故「質體」與「載體」可互換使用。

如本文中可互換使用之「聚核苷酸」或「核酸」係指任何長度之核苷酸聚合物，且包括DNA及RNA。核苷酸可為脫氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾核苷酸或鹼基、及/或其類似物，或可藉由DNA或RNA聚合酶或藉由合成反應併入聚合物中之任何受質。聚核苷酸可包含經修飾之核苷酸，諸如甲基化核苷酸及其類似物。若存在，則可在裝配聚合物之前或之後對核苷酸結構進行修飾。核苷酸序列可雜有非核苷酸組分。聚核苷酸可包含合成之後所形成之修飾，諸如與標記結合。其他類型之修飾包括：例如，一或多個天然存在之核苷酸經類似物「帽」取代；核苷酸

間修飾，諸如具有不帶電荷之鍵聯(例如膦酸甲酯、磷酸三酯、磷醯胺酸、胺基甲酸酯等)之彼等物及具有帶電荷鍵聯(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)之彼等物、含有側接部分(例如蛋白質(例如核酸酶、毒素、抗體、信號肽、ply-L-離胺酸等)之彼等物、具有嵌入劑(例如吡啶(acridine)、補骨脂素(psoralen)等)之彼等物、含有螯合劑(例如金屬、放射性金屬、硼、氧化性金屬等)之彼等物、含有烷化劑之彼等物、具有經修飾之鍵聯(例如 α 變旋異構體核酸等)之彼等物，以及聚核苷酸之未修飾形式。此外，通常存在於糖中之任何羥基均可經例如膦酸酯基、磷酸酯基置換，經標準保護基團保護或經活化以製備與其他核苷酸之其他鍵聯；或可與固體或半固體支撐物結合。5'及3'末端OH可經磷酸化或經1至20個碳原子之胺或有機封端基團部分取代。其他羥基亦可衍生為標準保護基。聚核苷酸亦可含有此項技術中通常已知之核糖或脫氧核糖之類似物形式，包括例如2'-O-甲基-核糖、2'-O-烯丙基-核糖、2'-氟-核糖或2'-迭氮基-核糖、碳環糖類似物、 α -變旋異構糖、差向異構糖(諸如阿拉伯糖(arabinose)、木糖或來蘇糖(lyxose))、呋喃糖、吡喃糖、景天庚酮糖、無環類似物及鹼性核苷類似物(諸如甲基核糖苷)。一或多個磷酸二酯鍵聯可經替代性連接基團置換。此等替代性連接基團包括(但不限於)磷酸酯基經P(O)S(「硫代酸酯基」)、P(S)S(「二硫代酸酯基」)、(O)NR₂(「醯胺酸酯基」)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂(「甲縮醛」)置換的實施例，其中各R

或R'獨立地為H或者視情況含有醚(-O-)鍵聯之經取代或未經取代之烷基(1-20個C)、芳基、烯基、環烷基、環烯基或芳烷基。並非聚核苷酸中之所有鍵聯皆需相同。上述描述適用於本文中所提及之所有聚核苷酸，包括RNA及DNA。

如本文中所使用之「寡核苷酸」通常係指短聚核苷酸，通常為單股、通常為合成的短聚核苷酸，其長度通常(但不一定)小於約200個核苷酸。術語「寡核苷酸」及「聚核苷酸」並不相互排斥。上文有關聚核苷酸之描述同樣且完全適用於寡核苷酸。

除非另外指示，否則如本文中所用之術語「Axl」係指來自任何脊椎動物來源(包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)及齧齒動物(例如小鼠及大鼠))之任何原生Axl。該術語涵蓋「全長」、未經處理之Axl以及由在細胞中處理所產生之任何形式之Axl。該術語亦涵蓋天然存在之Axl變異體，例如剪接變異體或對偶基因變異體。

除非另外指示，否則如本文中所用之術語「Axl配位體」或「Gas6」係指來自任何脊椎動物來源(包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)及齧齒動物(例如小鼠及大鼠))之任何原生Axl配位體。該術語涵蓋「全長」、未經處理之Axl配位體以及由在細胞中處理所產生之任何形式之Axl配位體。該術語亦涵蓋天然存在之變異型Axl配位體，例如剪接變異體或對偶基因變異體。

如本文中所用，「治療(treatment)」(及其變化形式，諸如「treat」或「treating」)係指試圖改變所治療個體或細

胞之自然過程之臨床干預，且可出於預防之目的或在臨床病理過程中執行。理想的治療效果包括預防疾病發生或復發、減輕症狀、減少疾病之任何直接或間接病理性後果、預防轉移、降低疾病進展速率、改善或減緩疾病狀態、及症狀緩解或預後改良。在一些實施例中，使用本發明之抗體延緩疾病或病症之發展或減慢疾病或病症之進展。

「個體(individual/subject)」或「患者」為脊椎動物。在某些實施例中，脊椎動物為哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)農畜(諸如牛)、運動型動物、寵物(諸如貓、狗及馬)、靈長類動物、小鼠及大鼠。在某些實施例中，哺乳動物為人類。

術語「醫藥調配物」係指呈使活性成分之生物活性有效之形式的製劑，且其不含對投與該調配物之個體具有不可接受之毒性的其他組分。該等調配物可為無菌的。

「無菌」調配物為無菌的或不含所有活微生物及其孢子。

「有效量」係指有效達成所需治療或預防結果所必需之劑量及時間量。

本發明之物質/分子之「治療有效量」可根據諸如以下因素而變：個體之疾病狀態、年齡、性別及體重，以及物質/分子在個體中誘發所要反應的能力。治療有效量涵蓋使治療有利作用超過物質/分子之任何毒性或有害作用的量。「預防有效量」係指有效達成所需預防結果所必需之劑量及時間量。因為預防劑量係在疾病之前或在疾病早期

用於個體，所以預防有效量通常(但不一定)會少於治療有效量。

如本文中所用之術語「細胞毒性劑」係指抑制或阻止細胞功能及/或引起細胞死亡或破壞的物質。該術語意欲包括放射性同位素(例如 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及 Lu 之放射性同位素)、化學治療劑(例如甲胺喋呤(methotrexate)、阿黴素(adriamycin)、長春花生物鹼(vinca alkaloid)(長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、依託泊苷(etoposide))、小紅莓(doxorubicin)、美法倫(melphalan)、絲裂黴素 C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、道諾黴素(daunorubicin)或其他嵌入劑、酵素及其片段(諸如核酸分解酶)、抗生素及毒素(諸如小分子毒素，或細菌、真菌、植物或動物來源之酶促活性毒素，包括其片段及/或變異體)，以及下文揭示之各種抗腫瘤劑或抗癌劑。其他細胞毒性劑在下文中描述。殺腫瘤劑可引起腫瘤細胞毀壞。

「毒素」為能夠對細胞生長或增殖具有有害影響的任何物質。

「化學治療劑」為可用於治療癌症之化合物。化學治療劑之實例包括烷基化劑，諸如塞替派(thiotepa)及環磷醯胺(cyclophosphamide; CYTOXAN®)；烷基磺酸酯，諸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶(aziridine)，諸如苯唑多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米特多巴(meturedopa)

及尤利多巴(uredopa)；乙烯亞胺(ethylenimine)及甲基三聚氰胺，包括六甲密胺(altretamine)、曲他胺(triethylenemelamine)、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三羥甲基三聚氰胺；乙醯精寧(acetogenin)(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))； δ -9-四氫大麻酚(屈大麻酚(dronabinol)，MARINOL®)； β -拉帕酮(beta-lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙鹼(colchicine)；樺木酸(betulinic acid)；喜樹鹼(camptothecin)(包括合成類似物拓朴替康(topotecan；HYCAMTIN®)、CPT-11(伊立替康(irinotecan；CAMPTOSAR®))、乙醯基喜樹鹼、東莨菪素(scopolectin)及9-胺基喜樹鹼)；苔蘚抑素(bryostatin)；卡利斯塔叮(callystatin)；CC-1065(包括其合成類似物阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin))；足葉草毒素(podophyllotoxin)；足葉草酸(podophyllinic acid)；替尼泊苷(teniposide)；念珠藻環肽(cryptophycin)(尤其念珠藻環肽1及念珠藻環肽8)；海兔毒素(dolastatin)；多卡米辛(duocarmycin)(包括合成類似物KW-2189及CB1-TM1)；艾榴素(eleutherobin)；盤克斯塔叮(pancratistatin)；沙考的汀(sarcodictyin)；海綿抑素(spongistatin)；氮芥(nitrogen mustard)，諸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、荼氮芥(chlornaphazine)、氯磷醯胺(chlorophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、雙氯乙基甲胺(mechlorethamine)、雙氯乙

基甲胺氧化物鹽酸鹽、美法侖、新恩比興(novembichin)、膽固醇對苯乙酸氮芥(phenesterine)、潑尼莫司汀(prednimustine)、曲洛磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶芥(uracil mustard)；亞硝基脲，諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲黴素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimustine)；抗生素，諸如烯二炔抗生素(例如刺孢黴素(calicheamicin)，尤其刺孢黴素 γ 1I及刺孢黴素 ω 1I(參見例如 Nicolaou 等人，*Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994))；CDP323(一種口服 α -4整合素抑制劑)；達米辛(dynemicin)，包括達米辛A；艾斯帕米辛(esperamicin)；以及新制癌菌素(neocarzinostatin)發色團及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團)、阿克拉黴素(aclacinomycin)、放線菌素(actinomycin)、安麴黴素(authramycin)、偶氮絲胺酸(azaserine)、博來黴素(bleomycin)、放線菌素C(cactinomycin)、卡拉比辛(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycin)、放線菌素D(dactinomycin)、道諾黴素、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、小紅莓(包括 ADRIAMYCIN®、N-嗎啉基-小紅莓、氰基-(N-嗎啉基)-小紅莓、2-(N-吡咯啉基)-小紅莓、鹽酸小紅莓脂質體注射液(DOXIL®)、脂質體小紅莓TLC D-99(MYOCET®)、聚乙二醇化脂質體小紅莓(CAELYX®)及脫氧小紅莓(deoxydoxorubicin))、表柔比星(epirubicin)、依索比星

(esorubicin)、伊達比星(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(諸如絲裂黴素C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾拉黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycin)、培洛黴素(peplomycin)、泊非黴素(porfiromycin)、嘌呤黴素、三鐵阿黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑黴素(streptonigrin)、鏈佐星(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、左柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤、吉西他濱(gemcitabine；GEMZAR®)、喃氟啶(tegafur；UFTORAL®)、卡培他濱(capecitabine；XELODA®)、埃坡黴素(epothilone)及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如迪諾特寧(denopterin)、甲胺喋呤、蝶羅呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉濱(fludarabine)、6-巰基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、阿紫胞苷(azacitidine)、6-氮雜尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙脫氧尿苷、脫氧氟尿苷、依諾他濱(enocitabine)、氮尿苷(floxuridine)；雄激素，諸如卡普甾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸酯(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitioanol)、美雄烷(mepitioanol)、甾內酯(testolactone)；抗腎上腺，諸如胺魯米特(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如夫羅林酸(frolinic acid)；乙醯葡醛酯(aceglatone)；醛磷醯胺糖

苷；胺基乙醯丙酸；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吖啶(amsacrine)；倍思塔布(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；艾達曲克(edatraxate)；得弗伐胺(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吖醌(diaziquone)；艾弗鳥胺酸(elfornithine)；依利醋銨(elliptinium acetate)；埃坡黴素；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂；羥基脲；香菇多糖(lentinan)；羅尼達寧(lonidainine)；類美登素(maytansinoid)，諸如美登素(maytansine)及胺沙托辛(ansamitocin)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫比達摩(mopidanmol)；硝拉維林(nitraerine)；噴司他丁(pentostatin)；凡那明(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；2-乙基醯肼；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；根瘤菌素(rhizoxin)；西佐喃(sizofiran)；鍺螺胺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌；2,2',2'-三氯三乙胺；單端孢黴烯族毒素(trichothecene)(尤其T-2毒素、弗納庫林A(verracurin A)、桿孢菌素A(roridin A)及蛇形菌毒素(anguidine))；烏拉坦(urethan)；長春地辛(vindesine)(ELDISINE®、FILDESIN®)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露莫司汀(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；甲托辛(gacytosine)；阿拉伯糖苷(arabinoside；「Ara-C」)；塞替派；紫杉烷類(taxoid)，例如太平洋紫杉醇(paclitaxel；

TAXOL®)、白蛋白工程改造之太平洋紫杉醇之奈米顆粒調配物(ABRAXANE™)及多西他賽(TAXOTERE®); 苯丁酸氮芥(chloranbucil); 6-硫代鳥嘌呤; 巯嘌呤; 甲胺喋呤; 鉑藥劑, 諸如順鉑(cisplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)(例如ELOXATIN®)及卡鉑(carboplatin); 防止微管蛋白聚合形成微管的長春花(vincas), 包括長春鹼(VELBAN®)、長春新鹼(ONCOVIN®)、長春地辛(ELDISINE®、FILDESIN®)及長春瑞賓(vinorelbine; NAVELBINE®); 依託泊苷(VP-16); 異環磷醯胺; 米托蒽醌; 甲醯四氫葉酸(leucovorin); 諾凡特龍(novantrone); 依達曲沙(edatrexate); 道諾黴素; 胺基喋呤; 伊班膦酸鹽(ibandronate); 拓撲異構酶抑制劑RFS 2000; 二氟甲基鳥胺酸(DMFO); 類視黃素, 諸如視黃酸, 包括貝瑟羅汀(bexarotene; TARGRETIN®); 雙膦酸鹽, 諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)(例如BONEFOS®或OSTAC®)、依替膦酸鹽(etidronate; DIDROCAL®)、NE-58095、唑來膦酸(zoledronic acid)/唑來膦酸鹽(zoledronate; ZOMETA®)、阿倫膦酸鹽(alendronate; FOSAMAX®)、帕米膦酸鹽(pamidronate; AREDIA®)、替魯膦酸鹽(tiludronate; SKELID®)或利塞膦酸鹽(risedronate; ACTONEL®); 曲沙他濱(troxacitabine)(1,3-二氧戊環核苷胞嘧啶類似物); 反義寡核苷酸, 尤其抑制與異常細胞增殖有關之信號傳導路徑中之基因之表現的反義寡核苷酸, 諸如PKC- α 、Raf、H-Ras及表皮生長因子受體(EGF-R); 疫苗, 諸如THERATOPE®疫苗及基因療法疫

苗，例如 ALLOVECTIN® 疫苗、LEUVECTIN® 疫苗及 VAXID® 疫苗；拓撲異構酶1抑制劑(例如 LURTOTECAN®)；rmRH(例如 ABARELIX®)；BAY439006(索拉非尼(sorafenib)；Bayer)；SU-11248(舒尼替尼(sunitinib)，SUTENT®，Pfizer)；哌立福新(perifosine)、COX-2抑制劑(例如塞來昔布(celecoxib)或依託昔布(etoricoxib))、蛋白酶體抑制劑(例如 PS341)；硼替佐米(bortezomib；VELCADE®)；CCI-779；替吡法尼(tipifarnib；R11577)；索拉非尼(orafenib)、ABT510；Bcl-2抑制劑，諸如奧利默森鈉(oblimersen sodium；GENA SENSE®)；匹克生瓊(pixantrone)；EGFR抑制劑(參見以下定義)；酪胺酸激酶抑制劑(參見以下定義)；絲胺酸-蘇胺酸激酶抑制劑，諸如雷帕黴素(rapamycin)(西羅莫司(sirolimus)，RAPAMUNE®)；法尼基轉移酶(farnesyltransferase)抑制劑，諸如洛那法尼(lonafarnib；SCH 6636，SARASAR™)；及上述任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物；以及上述兩者或兩者以上之組合，諸如 CHOP，其為環磷醯胺、小紅莓、長春新鹼及潑尼龍之組合療法之縮寫；及 FOLFOX，其為奧沙利鉑(ELOXATIN™)與 5-FU 及甲醯四氫葉酸之組合治療方案的縮寫。

如本文中所定義之化學治療劑包括用以調節、減少、阻斷或抑制可促進癌生長之激素之作用的「抗激素劑」或「內分泌治療劑」。其可為激素本身，包括(但不限於)：具有混合促效/拮抗概況之抗雌激素，包括他莫昔芬

(NOLVADEX®)、4-羥基他莫昔芬、托瑞米芬(toremifene；FARESTON®)、艾多昔芬(idoxifene)、曲洛昔芬(droloxifene)、雷洛昔芬(raloxifene；EVISTA®)、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛昔芬(keoxifene)及選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，諸如SERM3；不具有促效性質之純抗雌激素，諸如氟維司群(fulvestrant；FASLODEX®)及EM800(該等藥劑可阻斷雌激素受體(ER)二聚化、抑制DNA結合、增加ER週轉且/或抑制ER含量)；芳香酶抑制劑，包括類固醇芳香酶抑制劑(諸如福美司坦(formestane)及依西美坦(exemestane；AROMASIN®))及非類固醇芳香酶抑制劑(諸如阿那曲唑(anastrozole；ARIMIDEX®)、來曲唑(letrozole；FEMARA®)及胺魯米特)，以及其他芳香酶抑制劑，包括伏氣唑(vorozole；RIVISOR®)、乙酸甲地孕酮(megestrol acetate；MEGASE®)、法屈唑(fadrozole)及4(5)-咪唑；黃體激素釋放激素促效劑，包括亮丙立德(leuprolide；LUPRON®及ELIGARD®)、戈舍瑞林(goserelin)、布舍瑞林(buserelin)及曲特瑞林(tripterelin)；性類固醇，包括孕激素(諸如乙酸甲地孕酮及乙酸甲羥孕酮)、雌激素(諸如己烯雌酚(diethylstilbestrol)及普雷馬林(premarin))及雄激素/類視黃素(諸如氟羥甲基睾酮(flouxymesterone)、所有反式視黃酸及芬維A胺(fenretinide))；奧那司酮(onapristone)；抗孕酮；雌激素受體下調劑(ERD)；抗雄激素，諸如氟他胺(flutamide)、尼魯胺(nilutamide)及比卡魯胺(bicalutamide)；及上述任一者

之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物；以及上述兩者或兩者以上之組合。

當用於本文中時，「生長抑制劑」係指活體外或活體內抑制細胞(諸如表現Axl之細胞)生長之化合物或組合物。因此，生長抑制劑可為大大降低S期細胞(諸如表現Axl之細胞)百分率的藥劑。生長抑制劑之實例包括阻斷細胞週期進程(除S期外之階段)之藥劑，諸如誘導G1停滯及M期停滯之藥劑。經典M期阻斷劑包括長春花(長春新鹼及長春鹼)、紫杉烷(taxane)及拓撲異構酶II抑制劑(諸如多柔比星、表柔比星、柔紅黴素、依託泊苷及博萊黴素)。阻滯G1之彼等藥劑亦導致S期停滯，例如DNA烷化劑，諸如他莫西芬、潑尼松(prednisone)、氮烯唑胺、氮芥、順鉑、甲胺喋呤、5-氟尿嘧啶及ara-C。更多資訊可見於Mendelsohn及Israel編，*The Molecular Basis of Cancer*，第1章，Murakami等人之題為「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」(W.B. Saunders, Philadelphia, 1995)，例如第13頁。紫杉烷(太平洋紫杉醇及多西他賽(docetaxel))均為源自紫杉樹之抗癌藥。源自歐洲紫杉之多西他賽(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer)為太平洋紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb)之半合成類似物。紫杉醇及多西他賽促進微管蛋白二聚體組裝成微管且藉由防止解聚而使微管穩定，從而抑制細胞有絲分裂。

III. 組合物及方法

本發明之特徵在於以組合療法使用Axl拮抗劑及VEGF拮

抗劑治療諸如腫瘤之病理病狀。本發明亦提供抗Axl抗體及其使用方法。

Axl拮抗劑

適用於本發明方法之Axl拮抗劑包括特異性結合Axl之多肽、抗Axl抗體、Axl小分子、特異性結合Axl之受體分子及衍生物，及融合蛋白。Axl拮抗劑亦包括Axl多肽之拮抗性變異體、siRNA、針對Axl及Axl配位體之RNA適體及肽體。適用於本發明方法之Axl拮抗劑亦包括抗Axl配位體抗體、抗Axl配位體多肽、特異性結合Axl配位體之Axl受體分子及衍生物。此等每一者之實例描述於下文中。在一些實施例中，Axl拮抗劑不為華法林。

適用於本發明方法之抗Axl抗體包括以足夠親和力及特異性結合Axl且可降低或抑制Axl活性之任何抗體。

抗Axl抗體在此項技術中已熟知且進一步描述於本文中。參見例如WO 2009/062690；WO 2009/06396；共同擁有之同在申請中之美國專利申請案61/356,508(2010年6月18日申請)；5,468,634。在一實施例中，抗Axl抗體為單株抗體。在一實施例中，抗Axl抗體為抗體片段，例如Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段。在一實施例中，抗Axl抗體為嵌合、人類化或人類抗體。在一實施例中，抗Axl抗體經純化。在某些實施例中，組合物為用於治療癌症之醫藥調配物。

由融合瘤產生之例示性單株抗體提供於本文中且描述於實例8中。該等抗體稱為3G9、8B5、12A11及4F8。在一態

樣中，提供與3G9、8B5、12A11及4F8競爭結合Axl之單株抗體。亦提供所結合之抗原決定基與3G9、8B5、12A11及4F8所結合之抗原決定基相同的單株抗體。

在一些實施例中，抗Axl抗體包含含有序列EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSGSWIHWVRQAPGKGLEWVGWINPYRGYAYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCAREYSGWGGSSVGYAMDYWGQGTLV(SEQ ID NO:)的重鏈可變區，及含有序列DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR(SEQ ID NO)的輕鏈可變區。

抗Axl配位體Gas 6之抗體亦可用於本發明之方法中。

特異性結合Axl配位體(例如Gas6)之Axl分子或其片段可用於本發明之方法中，例如結合且螯合Axl配位體蛋白質、藉此阻止其信號傳導的Axl分子或其片段。Axl分子或其Axl配位體結合片段較佳為可溶形式。在一些實施例中，受體之可溶形式藉由結合Axl配位體而對Axl蛋白質之生物活性施加抑制作用，藉此防止其結合標靶細胞表面上存在之其天然受體。亦包括Axl融合蛋白，其實例描述於下文中。亦參見Nagata, J Biol Chem 271:30022 (1996); 2005/0185471; McClosky等人, J Biol Chem 272: 23285 (1997); Fridell等人, J Biol Chem 273:7123 (1998)。

可溶性Axl蛋白質或嵌合Axl蛋白質包括不經由跨膜域而固著至細胞表面之Axl蛋白質。因而，Axl之可溶形式(包

括嵌合受體蛋白)儘管能夠結合Axl配位體且使Axl配位體失活，但不包含跨膜域且因此通常不與表現分子的細胞之細胞膜結合。

本發明之方法中可使用特異性結合Axl且阻斷或降低Axl之活化，藉此防止其信號傳導的Axl配位體分子或其片段。

Axl siRNA描述且舉例說明於本文中且亦描述於例如WO 2009/005813中。

適體為核酸分子，其形成的三級結構特異性結合諸如Axl配位體多肽之標靶分子。此項技術中已熟知適體之產生及治療用途。參見例如美國專利案第5,475,096號。Axl配位體適體為聚乙二醇化修飾之寡核苷酸，其採用使得其能夠與細胞外Axl配位體結合之三維構形。關於適體之其他資訊可見於美國專利申請公開案第20060148748號中。

肽體為連接至編碼免疫球蛋白分子之片段或部分之胺基酸序列的肽序列。多肽可源自藉由任何特異性結合方法所選擇之隨機化序列，該方法包括(但不限於)噬菌體呈現技術。在一較佳實施例中，可將所選多肽連接至編碼免疫球蛋白之Fc部分的胺基酸序列。特異性結合且拮抗Axl配位體或Axl之肽體亦適用於本發明之方法中。

Axl拮抗劑包括小分子，諸如R 428(Rigel; Holland等人, Cancer Research 70, 1544 (2010))及PF02341066。在一些實施例中，小分子Axl拮抗劑不為華法林。

VEGF拮抗劑

VEGF拮抗劑係指能夠結合VEGF、降低VEGF表現量或中和、阻斷、抑制、中止、降低或干擾VEGF生物學活性(包括VEGF與一或多種VEGF受體結合及VEGF介導之血管生成及內皮細胞存活或增殖)的分子。適用於本發明方法中之VEGF拮抗劑包括特異性結合VEGF之多肽、抗VEGF抗體及其抗原結合片段、特異性結合VEGF藉此隔絕其與一或多種受體結合之受體分子及衍生物、融合蛋白(例如VEGF-Trap(Regeneron))及VEGF₁₂₁-白樹素(gelonin)(Peregrine)。VEGF拮抗劑亦包括VEGF多肽之拮抗性變異體、針對VEGF之RNA適體及肽體。下文描述此等每一者的實例。

適用於本發明方法中之抗VEGF抗體包括以足夠親和力及特異性結合VEGF且可降低或抑制VEGF生物活性之任何抗體或其抗原結合片段。抗VEGF抗體通常不結合諸如VEGF-B或VEGF-C之其他VEGF同源物，亦不結合諸如PlGF、PDGF或bFGF之其他生長因子。該等抗VEGF抗體之實例包括(但不限於)本文中在「定義」之下所提供之抗體。

兩種經最佳表徵之VEGF受體為VEGFR1(亦稱為Flt-1)及VEGFR2(關於鼠類同系物，亦稱為KDR及FLK-1)。各受體對各VEGF家族成員之特異性可變化，但VEGF-A與Flt-1及KDR均結合。全長Flt-1受體包括具有七個Ig域之細胞外域、跨膜域及具有酪胺酸激酶活性之細胞內域。細胞外域涉及結合VEGF且細胞內域涉及信號轉導。

特異性結合 VEGF 之 VEGF 受體分子或其片段可在本發明之方法中用於結合且螯合 VEGF 蛋白質，藉此防止其信號傳導。在某些實施例中，VEGF 受體分子或其 VEGF 結合片段為可溶形式，諸如 sFlt-1。受體之可溶形式藉由結合 VEGF 來對 VEGF 蛋白質之生物活性發揮抑制作用，藉此阻止 VEGF 與標靶細胞表面上存在之其天然受體結合。亦包括 VEGF 受體融合蛋白，其實例描述於下文中。

嵌合 VEGF 受體蛋白為具有源自至少兩種不同蛋白質之胺基酸序列的受體分子，其中至少一種蛋白質為能夠結合 VEGF 且抑制 VEGF 之生物活性的 VEGF 受體蛋白(例如 flt-1 或 KDR 受體)。在某些實施例中，本發明之嵌合 VEGF 受體蛋白由源自僅兩種不同 VEGF 受體分子之胺基酸序列組成；然而，包含一個、兩個、三個、四個、五個、六個或所有七個來自 flt-1 及/或 KDR 受體之細胞外配位體結合區之 Ig 樣結構域的胺基酸序列可連接至其他不相關蛋白質之胺基酸序列，例如免疫球蛋白序列。可與 Ig 樣結構域組合之其他胺基酸序列對於一般技術者顯而易知。嵌合 VEGF 受體蛋白之實例包括可溶性 Flt-1/Fc、KDR/Fc 或 FLt-1/KDR/Fc(亦稱為 VEGF Trap)(參見例如 PCT 申請公開案第 WO 97/44453)。

本發明之可溶性 VEGF 受體蛋白或嵌合 VEGF 受體蛋白包括不經由跨膜域固定至細胞表面之 VEGF 受體蛋白。因此，VEGF 受體之可溶形式(包括嵌合受體蛋白)儘管能夠結合 VEGF 且使 VEGF 失活，但不包含跨膜域且因此通常不與

表現分子的細胞之細胞膜結合。

適體為核酸分子，其形成的三級結構特異性結合諸如 VEGF 多肽之標靶分子。此項技術中已熟知適體之產生及治療用途。參見例如美國專利案第 5,475,096 號。VEGF 適體為聚乙二醇化修飾之寡核苷酸，其採用使得其能夠與細胞外 VEGF 結合之三維構形。靶向 VEGF 以治療年齡相關之黃斑變性的治療有效適體之一實例為派加替尼 (pegaptanib; Macugen™, OSI)。關於適體之其他資訊可見於美國專利申請公開案第 20060148748 號中。

肽體為連接至編碼免疫球蛋白分子之片段或部分之胺基酸序列的肽序列。多肽可源自藉由任何特異性結合方法所選擇之隨機化序列，該方法包括(但不限於)噬菌體呈現技術。在一較佳實施例中，可將所選多肽連接至編碼免疫球蛋白之 Fc 部分的胺基酸序列。特異性結合 VEGF 且拮抗 VEGF 之肽體亦適用於本發明之方法中。

抗體

1. 抗體片段

本發明涵蓋抗體片段。抗體片段可藉由傳統方法產生，諸如酶促消化，或藉由重組技術產生。在某些情形下，使用抗體片段優於使用整個抗體。較小尺寸之片段允許迅速清除且更容易進入實體腫瘤中。欲回顧某些抗體片段，參見 Hudson 等人，(2003) *Nat. Med.* 9:129-134。

已開發用於產生抗體片段的多種技術。傳統上，經由完整抗體之蛋白水解消化獲得該等片段(參見例如 Morimoto

等人，*Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)；及 Brennan 等人，*Science*, 229:81 (1985))。然而，該等片段現可由重組宿主細胞直接產生。Fab、Fv及ScFv抗體片段皆可由大腸桿菌表現且分泌，從而容易產生大量此等片段。可自上文所討論之抗體噬菌體文庫中分離抗體片段。或者，可自大腸桿菌直接回收Fab'-SH片段且以化學方式偶合而形成F(ab')₂片段(Carter等人，*Bio/Technology* 10:163-167 (1992))。根據另一方法，F(ab')₂片段可自重組宿主細胞培養物直接分離。美國專利第5,869,046號中描述包含救助受體結合抗原決定基殘基、活體內半衰期延長的Fab及F(ab')₂片段。產生抗體片段之其他技術對於熟習此項技術者顯而易知。在某些實施例中，抗體為單鏈Fv片段(scFv)。參見WO 93/16185、美國專利第5,571,894號及第5,587,458號。Fv及scFv為完整結合位點不含恆定區的唯一物質；因此，其可適於在活體內使用期間減少非特異性結合。可構築scFv融合蛋白以使效應蛋白在scFv之胺基或羧基末端融合。參見*Antibody Engineering*, Borrebaeck編(同上)。抗體片段亦可為例如「線性抗體」，例如美國專利第5,641,870號中所述。該等線性抗體可為單特異性或雙特異性抗體。

2. 人類化抗體

本發明涵蓋人類化抗體。此項技術中已知將非人類抗體人類化之多種方法。舉例而言，人類化抗體中可引入一或多個來自非人類來源之胺基酸殘基。此等非人類胺基酸殘

基通常稱為「輸入」殘基，其通常取自「輸入」可變域。人類化基本上可依循 Winter 及同事之方法 (Jones 等人，(1986) *Nature* 321:522-525；Riechmann 等人，(1988) *Nature* 332:323-327；Verhoeyen 等人，(1988) *Science* 239:1534-1536) 藉由高變區序列取代人類抗體之相應序列來進行。因此，該等「人類化」抗體為嵌合抗體 (美國專利第 4,816,567 號)，其中實質上小於完整人類可變域已經非人類物種之相應序列取代。實際上，人類化抗體通常為人類抗體，其中一些高變區殘基及可能之一些 FR 殘基已經齧齒動物抗體之類似位點之殘基取代。

選擇用於產生人類化抗體之人類可變域 (輕鏈與重鏈) 對於減少抗原性極其重要。根據所謂之「最佳擬合」方法，對照已知人類可變域序列之完整文庫篩檢齧齒動物抗體之可變域序列。隨後將與齧齒動物之該序列最接近之人類序列視作人類化抗體之人類構架。參見例如 Sims 等人，(1993) *J. Immunol.* 151:2296；Chothia 等人，(1987) *J. Mol. Biol.* 196:901。另一方法係使用源自含有特定亞群之輕鏈或重鏈之所有人類抗體之共同序列的特定構架。若干不同的人類化抗體可使用相同構架。參見例如 Carter 等人，(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285；Presta 等人，(1993) *J. Immunol.*, 151:2623。

通常更需要使抗體在保持對抗原之高親和力及其他良好生物特性下經人類化。為達成此目的，根據一種方法，藉由使用親本序列及人類化序列之三維模型分析親本序列及

各種概念性人類化產物的過程來製備人類化抗體。三維免疫球蛋白模型普遍可得且為熟習此項技術者熟知。可利用電腦程式說明及呈現所選擇之候選免疫球蛋白序列之可能三維構形結構。檢查此等呈現可分析殘基在候選免疫球蛋白序列之功能中的可能作用，亦即，分析影響候選免疫球蛋白結合其抗原之能力的殘基。藉此，可自接受者及輸入序列選擇FR殘基且加以組合以便獲得所需抗體特徵，諸如對標靶抗原之親和力增加。通常，高變區殘基直接且最實質性地涉及影響抗原結合。

3. 人類抗體

可藉由將選自人類源噬菌體呈現文庫之Fv純系可變域序列與如上所述之已知人類恆定域序列組合來構築本發明之人類抗體。或者，可利用融合瘤方法製造本發明之人類單株抗體。用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類雜交骨髓瘤(heteromyeloma)細胞株已描述於例如Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及Boerner等人, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)中。

現可產生轉殖基因動物(例如小鼠)，其免疫後能夠在缺乏內源免疫球蛋白產生之情況下產生全譜系之人類抗體。舉例而言，已描述嵌合及生殖系突變體小鼠中抗體重鏈連接區(JH)基因的同種接合子缺失會完全抑制內源抗體產生。將人類生殖系免疫球蛋白基因陣列轉移至該等生殖系

突變體小鼠體內將會在抗原攻擊後引起人類抗體之產生。參見例如 Jakobovits 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90: 2551 (1993)；Jakobovits 等人，*Nature*, 362: 255 (1993)；Bruggermann 等人，*Year in Immunol.*, 7: 33 (1993)。

亦可使用基因改組自非人類(例如齧齒動物)抗體獲得人類抗體，其中人類抗體具有與初始非人類抗體類似之親和力及特異性。根據此方法(其亦稱「抗原決定基印記法」)，藉由如上所述之噬菌體呈現技術所獲得之非人類抗體片段之重鏈或輕鏈可變區可以人類V域基因之譜系置換，形成非人類鏈/人類鏈 scFv 或 Fab 嵌合體之群。以抗原進行選擇可分離非人類鏈/人類鏈嵌合 scFv 或 Fab，其中人類鏈可恢復在移除初級噬菌體呈現純系中之相應非人類鏈時所損壞的抗原結合位點，亦即抗原決定基決定(印記)人類鏈搭配物之選擇。當重複此過程以置換剩餘非人類鏈時，獲得人類抗體(參見 1993 年 4 月 1 日公開之 PCT WO 93/06213)。與傳統上藉由 CDR 移植使非人類抗體人類化不同，此技術提供不具有非人類來源之 FR 或 CDR 殘基的完全人類抗體。

4. 雙特異性抗體

雙特異性抗體為對至少兩種不同抗原具有結合特異性的單株抗體。在某些實施例中，雙特異性抗體為人類或人類化抗體。在某些實施例中，結合特異性之一係針對 Axl 而另一者係針對其他任何抗原。在某些實施例中，雙特異性抗體可結合 Axl 之兩個不同抗原決定基。雙特異性抗體亦

可用於將細胞毒性劑定位於表現Axl之細胞。此等抗體具有結合Axl之臂及結合細胞毒性劑之臂，該細胞毒性劑諸如皂草素(saporin)、抗干擾素- α 、長春花生物鹼、蓖麻毒素A鏈、甲胺喋呤或放射性同位素半抗原。可製備全長抗體或抗體片段形式之雙特異性抗體(例如F(ab')₂雙特異性抗體)。

此項技術中已知製造雙特異性抗體之方法。傳統上，雙特異性抗體之重組產生法係基於兩對免疫球蛋白重鏈-輕鏈之共同表現，其中兩個重鏈具有不同特異性(Milstein及Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983))。由於免疫球蛋白重鏈及輕鏈之隨機分配，此等融合瘤(四源雜交瘤)產生10種不同抗體分子之潛在混合物，其中僅一種具有正確雙特異性結構。通常藉由親和層析步驟進行之正確分子之純化法相當繁瑣，且產物產率較低。類似程序揭示於1993年5月13日公開之WO 93/08829及Traunecker等人，*EMBO J.*, 10: 3655 (1991)中。

根據不同方法，將具所需結合特異性(抗體-抗原結合位點)之抗體可變域與免疫球蛋白恆定域序列融合。例如與免疫球蛋白重鏈恆定域(包含鉸鏈、CH₂及CH₃區之至少一部分)融合。在某些實施例中，含有輕鏈結合所需位點的第一重鏈恆定區(CH₁)存在於至少一個融合部分。將編碼免疫球蛋白重鏈融合體及(若需要)免疫球蛋白輕鏈之DNA插入個別表現載體中，且共轉染至適當宿主生物體中。從而在使用不相等比率之三個多肽鏈以建構得到最佳產量的

實施例中，為調整這三個多肽片段之相互比例提供極大靈活性。然而，當相等比率之至少兩個多肽鏈的表現造成高產量或當比率並非特別重要時，可將兩個或全部三個多肽鏈之編碼序列插入一個表現載體中。

在此方法之一實施例中，雙特異性抗體係由位於一臂中之雜交免疫球蛋白重鏈(具有第一結合特異性)與位於另一臂中之雜交免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(提供第二結合特異性)組成。已發現此不對稱結構有利於將所需雙特異性化合物與非所要之免疫球蛋白鏈組合分離，因此免疫球蛋白輕鏈存在於雙特異性分子之僅一半中可提供一種簡便之分離方式。此方法揭示於WO 94/04690中。關於產生雙特異性抗體之其他細節，參見例如 Suresh 等人，*Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)。

根據另一方法，可工程改造一對抗體分子間之界面以使自重組細胞培養物回收雜二聚體之百分比最大化。該界面包含抗體恆定域之C_H3域之至少一部分。以此方法，使第一抗體分子界面之一或多條小胺基酸側鏈經較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)置換。藉由較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置換較大胺基酸側鏈可在第二抗體分子之界面上產生尺寸與較大側鏈相同或類似之互補「空腔」。由此提供增加雜二聚體(而非其他非所要最終產物，諸如同二聚體)之產量的機制。

雙特異性抗體包括交聯或「異結合」抗體。舉例而言，異結合之抗體之一可與抗生物素蛋白(avidin)偶合，另一

者與生物素偶合。已提出該等抗體例如可使免疫系統細胞靶向不需要細胞(美國專利案第4,676,980號)且可用於治療HIV感染(WO 91/00360、WO 92/00373及EP 03089)。可使用任何適宜的交聯方法製造異結合抗體。適當交聯劑及多種交聯技術在此項技術中已熟知且揭示於美國專利案第4,676,980號中。

自抗體片段產生雙特異性抗體之技術已描述於文獻中。舉例而言，可使用化學鍵聯製備雙特異性抗體。Brennan等人，*Science*, 229: 81 (1985)描述一種程序，其中完整抗體經蛋白質裂解而產生F(ab')₂片段。此等片段在二硫醇錯合劑亞砷酸鈉存在下還原以穩定鄰近二硫醇且防止分子間二硫鍵形成。接著所產生之Fab'片段轉化為硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。接著藉由巯基乙胺還原將Fab'-TNB衍生物之一再轉化為Fab'-硫醇，且與等莫耳量之另一種Fab'-TNB衍生物混合以形成雙特異性抗體。所產生之雙特異性抗體可用作選擇性固定酵素之藥劑。

最新進展已可方便地自大腸桿菌直接回收Fab'-SH片段，該等片段可經化學偶合而形成雙特異性抗體。Shalaby等人，*J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)描述完全人類化雙特異性抗體F(ab')₂分子之製備。各Fab'片段分別由大腸桿菌分泌且進行活體外定向化學偶合以形成雙特異性抗體。由此形成之雙特異性抗體能夠結合過度表現HER2受體之細胞及正常人類T細胞，且引發人類細胞毒性淋巴細胞針對人類乳房腫瘤標靶之溶解活性。

亦已描述直接在重組細胞培養物中形成且分離雙特異性抗體片段之多種技術。舉例而言，已使用白胺酸拉鏈產生雙特異性抗體。Kostelny等人，*J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)。藉由基因融合將來自Fos及Jun蛋白之白胺酸拉鏈肽與兩種不同抗體之Fab'部分連接。抗體均二聚體在鉸鏈區還原而形成單體，且接著再氧化而形成抗體雜二聚體。此方法亦可用於產生抗體均二聚體。Hollinger等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)所述之「雙功能抗體」技術已提供一種用於製造雙特異性抗體片段之替代機制。該等片段包含經連接子連接至輕鏈可變域(VL)之重鏈可變域(VH)，該連接子過短而無法使同一鏈上之兩個結構域之間配對。因此，一個片段之VH及VL域被迫與另一個片段之互補VL及VH域配對，由此形成兩個抗原結合位點。另一種藉由使用單鏈Fv(sFv)二聚體形成雙特異性抗體片段之策略亦已報導。參見Gruber等人，*J. Immunol.*, 152:5368 (1994)。

涵蓋兩價以上之抗體。舉例而言，可製備三特異性抗體。Tutt等人，*J. Immunol.* 147: 60 (1991)。

5. 多價抗體

多價抗體可比二價抗體更快地被表現抗體所結合之抗原的細胞內化(及/或異化)。本發明之抗體可為具有三個或三個以上抗原結合位點之多價抗體(IgM類別之抗體除外)(例如四價抗體)，多價抗體可容易藉由重組表現編碼抗體多肽鏈之核酸來製得。多價抗體可包含二聚域及三個或三個

以上抗原結合位點。在某些實施例中，二聚域包含Fc區或鉸鏈區(或由Fc區或鉸鏈區組成)。在此情形中，抗體將包含Fc區及三個或三個以上位於Fc區之胺基末端之抗原結合位點。在某些實施例中，多價抗體包含三個至約八個抗原結合位點(或由三個至約八個抗原結合位點組成)。在一該實施例中，多價抗體包含四個抗原結合位點(或由四個抗原結合位點組成)。多價抗體包含至少一個多肽鏈(例如兩個多肽鏈)，其中多肽鏈包含兩個或兩個以上的可變域。舉例而言，多肽鏈可包含VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc，其中VD1為第一可變域，VD2為第二可變域，Fc為一條多肽鏈中之Fc區，X1及X2表示胺基酸或多肽，且n為0或1。舉例而言，多肽鏈可包含：VH-CH1-柔性連接子-VH-CH1-Fc區鏈或VH-CH1-VH-CH1-Fc區鏈。本文中之多價抗體可另外包含至少兩個(例如四個)輕鏈可變域多肽。本文中之多價抗體可例如包含約兩條至約八條輕鏈可變域多肽。本文所涵蓋之輕鏈可變域多肽包含輕鏈可變域且視情形另外包含CL域。

6. 單域抗體

在一些實施例中，本發明之抗體為單域抗體。單域抗體為包含抗體之重鏈可變域之全部或一部分或者輕鏈可變域之全部或一部分的單一多肽鏈。在某些實施例中，單域抗體為人類單域抗體(Domantis, Inc., Waltham, MA；參見例如美國專利案第6,248,516 B1號)。在一實施例中，單域抗體係由抗體重鏈可變域之全部或一部分組成。

7. 抗體變異體

在一些實施例中，本發明涵蓋本文所述之抗體的胺基酸序列修飾。舉例而言，可能需要改良抗體之結合親和力及/或其他生物學特性。可藉由將適當變異引入編碼抗體之核苷酸序列中或藉由肽合成來製備抗體之胺基酸序列變異體。該等修飾包括例如抗體胺基酸序列內之殘基缺失及/或插入及/或取代。缺失、插入及取代可任意組合以獲得最終構築體，其限制條件為最終構築體具有所需特徵。可在形成序列時將胺基酸變異引入標的抗體胺基酸序列中。

一種適用於鑑別抗體之作為較佳突變誘發位置之某些殘基或區域的方法稱為「丙胺酸掃描突變誘發」，如 Cunningham 及 Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085 所描述。其中，鑑別一個殘基或一組標靶殘基(例如帶電荷殘基，諸如 arg、asp、his、lys 及 glu)且用中性或帶負電荷之胺基酸(例如丙胺酸或聚丙胺酸)置換以影響胺基酸與抗原之相互作用。接著，藉由在取代位點或針對取代位點引入另外或其他變異體來改進對取代顯示功能敏感性之彼等胺基酸位置。因此，雖然引入胺基酸序列變異之位點係預先確定，但突變之性質本身無需預先確定。舉例而言，為分析特定位點之突變效能，在靶密碼子或區域執行 ala 掃描或隨機突變誘發且針對所需活性篩檢所表現之免疫球蛋白。

胺基酸序列插入物包括長度範圍為一個殘基至含有一百個或一百以上個殘基之多肽的胺基末端及/或羧基末端融

合體，以及具有單個或多個胺基酸殘基之序列內插入物。末端插入物之實例包括具有N末端甲硫胺醯基殘基之抗體。抗體分子之其他插入變異體包括抗體之N末端或C末端與酵素(例如，對於ADEPT而言)或延長抗體之血清半衰期之多肽的融合體。

在某些實施例中，本發明之抗體經變異可增大或減小抗體糖基化之程度。多肽之糖基化通常為N連接型或O連接型。N連接型係指碳水化合物部分連接至天冬醯胺殘基之側鏈。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-蘇胺酸(其中X為除脯胺酸以外之任何胺基酸)為碳水化合物部分與天冬醯胺側鏈之酶促連接的識別序列。因此，多肽中存在此等三肽序列之任一者可產生潛在糖基化位點。O連接型糖基化係指糖N-乙醯基半乳糖胺、半乳糖或木糖之一連接至羥基胺基酸，最常見為絲胺酸或蘇胺酸，但亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸。

抗體糖基化位點之添加或缺失宜藉由改變胺基酸序列以使得產生或移除一或多個上述三肽序列來實現(針對N-連接型糖基化位點)。亦可藉由一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基之添加、缺失或取代來使原始抗體序列產生變異(針對O連接型糖基化位點)。

在抗體包含Fc區之情況下，可改變與其連接之碳水化合物。哺乳動物細胞產生之原生抗體通常包含分支鏈、雙觸角(biantennary)寡糖，其通常藉由N鍵聯連接至Fc區之CH2域之Asn297。參見例如Wright等人，(1997) *TIBTECH*

15:26-32。寡醣可包括各種碳水化合物，例如甘露糖、N-乙醯基葡糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸，以及連接至雙觸角寡醣結構之「莖幹」中之GlcNAc之海藻糖。在一些實施例中，可對本發明抗體中之寡醣進行修飾以便產生具有某些改良性質之抗體變異體。

舉例而言，提供具有碳水化合物結構之抗體變異體，該碳水化合物結構缺乏(直接或間接)連接至Fc區之海藻糖。該等變異體可具有改良之ADCC功能。參見例如美國專利公開案第US 2003/0157108號(Presta, L.)；US 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。與「去海藻糖基化」或「缺海藻糖」抗體有關之公開案的實例包括：US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO 2005/053742；WO 2002/031140；Okazaki等人，*J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki等人，*Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)。產生去海藻糖基化抗體之細胞株之實例包括缺乏蛋白質海藻糖基化之Lec13 CHO細胞(Ripka等人，*Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)；美國專利申請案第US 2003/0157108 A1號，Presta, L；及WO 2004/056312 A1, Adams等人，尤其實例11)，及基因剔除細胞株，諸如 α -1,6-海藻糖基轉移酶基因、*FUT8*、基因剔除CHO細胞(參

見例如 Yamane-Ohnuki 等人，*Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004)；Kanda, Y. 等人，*Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006)；及 WO 2003/085107)。

另外提供寡糖被切成兩分之抗體變異體，例如其中藉由 GlcNAc 將連接至抗體之 Fc 區之雙觸角寡糖切成兩分。該等抗體變異體可具有減少之海藻糖化及/或改良之 ADCC 功能。該等抗體變異體之實例描述於例如 WO 2003/011878(Jean-Mairet 等人)、美國專利案第 6,602,684 號(Umana 等人)及 US 2005/0123546(Umana 等人)中。亦提供在連接至 Fc 區之寡糖中具有至少一個半乳糖殘基之抗體變異體。該等抗體變異體可具有改良之 CDC 功能。該等抗體變異體描述於例如 WO 1997/30087(Patel 等人)、WO 1998/58964(Raju, S.)及 WO 1999/22764(Raju, S.)中。

在某些實施例中，抗體變異體包含具有一或多個進一步改良 ADCC 之胺基酸取代(例如 Fc 區之位置 298、333 及/或 334(Eu 殘基編號)處之取代)的 Fc 區。該等取代可與上述任何變異組合出現。

在某些實施例中，本發明涵蓋具有一些(但非全部)效應功能之抗體變異體，從而使其成為許多應用之理想候選藥物，其中抗體之活體內半衰期為重要的，但某些效應功能(諸如補體及 ADCC)為不必要或有害的。在某些實施例中，可量測抗體之 Fc 活性以確保僅維持所要特性。可進行活體外及/或活體內細胞毒性分析法以確認 CDC 及/或 ADCC 活性之降低/耗竭。舉例而言，可進行 Fc 受體(FcR)結合分

析法以確保抗體缺乏FcγR結合能力(從而可能缺乏ADCC活性)，但保留FcRn結合能力。介導ADCC之初級細胞、NK細胞僅表現FcγRIII，而單核細胞表現FcγRI、FcγRII及FcγRIII。造血細胞上之FcR表現概述於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)之第464頁之表3中。

評估相關分子之ADCC活性之活體外分析法之非限制性實例描述於美國專利案第5,500,362號(參見例如Hellstrom, I., 等人*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986))及Hellstrom, I等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985)；5,821,337(參見Bruggemann, M. 等人, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987))中。或者，可使用非放射性分析方法(參見例如流式細胞測量術之ACTI™非放射性細胞毒性分析法(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA)；及CytoTox 96®非放射性細胞毒性分析法(Promega, Madison, WI))。適用於該等分析法之效應細胞包括周圍血液單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。或者或另外，可評估相關分子在活體內，例如在動物模型(諸如揭示於Clynes等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998)中之動物模型)中之ADCC活性。亦可進行C1q結合分析法以確認抗體無法與C1q結合且因此缺乏CDC活性。為了評估補體活化，可執行CDC分析法(參見例如Gazzano-Santoro等人, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)；Cragg, M.S. 等人, *Blood* 101:1045-1052 (2003)；及Cragg, M.S. 及 M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004))。亦可使用此項技術

中已知之方法測定FcRn結合及活體內清除/半衰期(參見例如 Petkova, S.B. 等人, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006))。

提供具有一或多個胺基酸取代之其他抗體變異體。用於取代性突變誘發之相關位點包括高變區, 但亦涵蓋FR變異。保守型取代顯示於表1中「較佳取代」標題下。稱為「例示性取代」之更多實質性變異提供於表1中, 或如下文參考胺基酸類別進一步描述。可將胺基酸取代引入相關抗體中且篩檢產物, 例如針對所要活性(諸如改良之抗原結合、降低之免疫原性、改良之ADCC或CDC等)篩檢產物。

表 1

原始殘基	例示性取代	較佳取代
Ala (A)	Val ; Leu ; Ile	Val
Arg (R)	Lys ; Gln ; Asn	Lys
Asn (N)	Gln ; His ; Asp, Lys ; Arg	Gln
Asp (D)	Glu ; Asn	Glu
Cys (C)	Ser ; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn ; Glu	Asn
Glu (E)	Asp ; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg	Arg
Ile (I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; 正白胺酸	Leu
Leu (L)	正白胺酸 ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys (K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met (M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu

原始殘基	例示性取代	較佳取代
Phe (F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Tyr
Axl(P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val ; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val (V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正白胺酸	Leu

可藉由選擇影響以下方面之取代來實現抗體生物學性質之改變：(a)取代區域中多肽主鏈之結構，例如呈片或螺旋構形；(b)靶點處分子之電荷或疏水性；或(c)側鏈之大小。胺基酸可根據其側鏈性質之相似性分類(A. L. Lehninger, Biochemistry, 第二版, 第73-75頁, Worth Publishers, New York (1975))：

(1) 非極性：Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Axl(P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M)

(2) 不帶電荷極性：Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q)

(3) 酸性：Asp (D)、Glu (E)

(4) 鹼性：Lys (K)、Arg (R)、His(H)

或者，天然存在之殘基可基於共同側鏈性質分類：

(1) 疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

(2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(3) 酸性：Asp、Glu；

(4) 鹼性：His、Lys、Arg；

(5) 影響鏈取向之殘基：Gly、Pro；

(6) 芳族：Trp、Tyr、Phe。

非保守取代將引起此等類別之一之成員交換成另一類成員。亦可將該等經取代之殘基引入保守性取代位點中或引入其餘(非保守性)位點中。

一種類型之取代變異體涉及取代親本抗體(例如人類化抗體或人類抗體)之一或多個高變區殘基。通常，所得選用於進一步開發之變異體相對於產生其之親本抗體具有經修改(例如改良)的生物特性。例示性取代變異體為親和力成熟抗體，其宜使用基於噬菌體呈現之親和力成熟技術產生。簡而言之，使數個高變區位點(例如6-7個位點)突變，以在各位點處產生所有可能之胺基酸取代。由此產生之抗體以與封裝於各粒子內之噬菌體鞘蛋白(例如M13之基因III產物)之至少一部分融合的形式由絲狀噬菌體粒子呈現。接著篩檢噬菌體呈現之變異體之生物活性(例如結合親和力)。為鑑別用於修飾之候選高變區位點，可執行掃描誘變(例如丙胺酸掃描)以鑑別對抗原結合有顯著作用的高變區殘基。或者或另外，可有益的是分析抗原-抗體複合物之晶體結構以鑑別抗體與抗原之間的接觸點。根據此項技術中已知之技術，包括本文詳述之技術，該等接觸殘基及相鄰殘基為用於取代之候選殘基。一旦產生該等變異體，即使用此項技術中已知之技術(包括本文中描述之彼等技術)篩檢該組變異體，且可選擇在一或多個相關分析法中具有優良性質的變異體用於進一步開發。

編碼抗體之胺基酸序列變異體之核酸分子係由此項技術

已知之多種方法製備。該等方法包括(但不限於)自天然來源分離(在天然存在之胺基酸序列變異體之情況下)，或藉由對早先製備之抗體變異體或非變異型抗體進行寡核苷酸介導(或定點)之突變誘發、PCR突變誘發及卡匣式突變誘發來製備。

可能需要將一或多個胺基酸修飾引入本發明抗體之Fc區中，藉此產生Fc區變異體。Fc區變異體可包含在一或多個胺基酸位置(包括鉸鏈半胱胺酸位置)含有胺基酸修飾(例如取代)之人類Fc區序列(例如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)。

根據本說明書及此項技術之教示，可預期在有些實施例中，本發明之抗體與野生型相應抗體相比可包含一或多個變異，例如Fc區中之一或多個變異。然而，此等抗體保留與其野生型對應物實質上相同之治療效用所需特徵。舉例而言，咸信Fc區中產生的某些變異會改變(亦即改良或減弱)C1q結合及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)，例如WO 99/51642中所述。關於Fc區變異體之其他實例，亦參見Duncan及Winter, *Nature* 322:738-40 (1988)；美國專利案第5,648,260號；美國專利案第5,624,821號；及WO 94/29351。WO 00/42072(Presta)及WO 2004/056312(Lowman)描述與FcR結合增強或減弱的抗體變異體。此等專利公開案之內容以引用之方式明確併入本文中。亦參見Shields等人, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)。US 2005/0014934A1(Hinton等人)中描述半衰期延長且與新生

兒Fc受體(FcRn)之結合增強的抗體，新生兒Fc受體負責將母體IgG轉移至胎兒中(Guyer等人，*J. Immunol.* 117:587 (1976)及Kim等人，*J. Immunol.* 24:249 (1994))。此等抗體包含其中具有一或多個增強Fc區與FcRn結合之取代的Fc區。美國專利第6,194,551B1號、WO99/51642中描述Fc區胺基酸序列已變異且C1q結合能力增大或減小之多肽變異體。該等專利公開案之內容以引用的方式明確併入本文中。亦參見Idusogie等人，*J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)。

在另一態樣中，本發明提供在包含Fc區之Fc多肽之界面中包含修飾的抗體，其中該等修飾有助於且/或促進雜二聚化。該等修飾包含將突起引入第一Fc多肽中以及將空腔引入第二Fc多肽中，其中該突起可定位於該空腔中以便促進第一Fc多肽與第二Fc多肽之複合。產生具有該等修飾之抗體的方法已知於此項技術中，例如美國專利第5,731,168號所述。

在另一態樣中，可能需要產生經半胱胺酸工程改造之抗體，例如「thioMAb」，其中抗體之一或多個殘基經半胱胺酸殘基取代。在特定實施例中，經取代殘基存在於抗體之可達位點。藉由半胱胺酸取代彼等殘基，從而將反應性硫醇基定位於抗體之可達位點且可用於使抗體與其他部分(諸如藥物部分或連接子-藥物部分)結合，如本文中進一步描述。在某些實施例中，任一或多個以下殘基可經半胱胺酸取代：輕鏈之V205(Kabat編號)；重鏈之A118(EU編

號)；及重鏈Fc區之S400(EU編號)。

8. 抗體衍生物

本發明之抗體可進一步修飾成含有此項技術中已知且易於獲得之其他非蛋白部分。適於抗體衍生化之部分較佳為水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、聚-1,3-二氧戊環、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)及葡聚糖或聚(N-乙烯吡咯啉酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛因其於水中之穩定性而可具有製造優勢。聚合物可具有任何分子量，且可分支或不分支。連接至抗體之聚合物之數目可變化，且若連接一個以上聚合物，則其可為相同或不同分子。通常，用於衍生化之聚合物之數目及/或類型可基於以下考慮來確定：包括(但不限於)待改良之抗體特定性質或功能，抗體衍生物是否將用於限定條件下之療法等。

在另一實施例中，提供抗體與非蛋白部分之結合物，該等結合物可藉由曝露於輻射來選擇性加熱。在一實施例中，非蛋白部分為碳奈米管(Kam等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005))。此輻射可具有任一波長，且包括(但不限於)不損傷一般細胞、但能將非蛋白部分加熱至可殺死抗體-非蛋白部分鄰近之細胞之溫度的波

長。

B. 某些製造抗體之方法

1. 某些基於融合瘤之方法

本發明之單株抗體可使用融合瘤方法製備，融合瘤方法首先描述於Kohler等人，*Nature*, 256:495 (1975)中，且進一步描述於關於人類-人類融合瘤的以下文獻中：例如Hongo等人，*Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995)；Harlow等人，*Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版1988)；Hammerling等人，於：*Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)；及Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4): 265-268 (2006)。其他方法包括例如美國專利第7,189,826號中所述之關於自融合瘤細胞株產生單株人類天然IgM抗體之方法。人類融合瘤技術(三源雜交瘤技術)描述於Vollmers及Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005)及Vollmers及Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)中。

對於各種其他融合瘤技術，參見例如US 2006/258841；US 2006/183887(完全人類抗體)；US 2006/059575；US 2005/287149；US 2005/100546；US 2005/026229；及美國專利第7,078,492號及第7,153,507號。使用融合瘤方法產生單株抗體之例示性方案描述如下。在一實施例中，使小鼠或其他適當宿主動物(諸如倉鼠)免疫以誘使淋巴細胞產生

或能夠產生特異性結合用於免疫之蛋白質之抗體。藉由多次皮下(sc)或腹膜內(ip)注射包含Axl或其片段之多肽及佐劑(諸如單磷醯基脂質A(MPL)/海藻糖二柯諾黴菌酸酯(trehalose dicrynomycolate ; TDM)(Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT))來使動物產生抗體。可使用此項技術中熟知之方法(諸如重組方法)製備包含Axl或其片段之多肽,其中一些方法在本文中另外描述。分析經免疫動物之血清中的抗Axl抗體,且視情況投與免疫強化劑。自產生抗Axl抗體之動物分離淋巴細胞。或者,可於活體外免疫淋巴細胞。

隨後使用適合融合劑(諸如聚乙二醇)使淋巴細胞與骨髓瘤細胞融合以形成融合瘤細胞。參見例如 Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第59-103頁(Academic Press, 1986)。可使用有效融合、有助於所選抗體產生細胞穩定高量產生抗體且對培養基(諸如HAT培養基)敏感的骨髓瘤細胞。例示性骨髓瘤細胞包括(但不限於)鼠類骨髓瘤細胞株,諸如可自沙克生物研究所細胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center)(San Diego, California USA)獲得之MOPC-21及MPC-11小鼠腫瘤所產生的彼等細胞及可自美國菌種保存中心(American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA)獲得之SP-2或X63-Ag8-653細胞。亦已描述用於產生人類單株抗體的人類骨髓瘤及小鼠-人類雜交骨髓瘤細胞株(Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur等人, *Monoclonal*

Antibody Production Techniques and Applications，第51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

由此製備之融合瘤細胞接種且生長於適當培養基中，例如含有一或多種抑制未融合之親代骨髓瘤細胞之生長或存活之物質的培養基。舉例而言，若親代骨髓瘤細胞缺乏次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(HGPRT或HPRT)，則融合瘤培養基通常將包括次黃嘌呤、胺基喋呤及胸苷(HAT培養基)，該等物質會阻止缺乏HGPRT之細胞之生長。無血清之融合瘤細胞培養方法較佳用於減少使用動物源血清(諸如胎牛血清)，例如 Even 等人，*Trends in Biotechnology*, 24(3), 105-108 (2006)中所述。

作為提高融合瘤細胞培養物之生產力之手段的寡肽描述於 Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005)中。特定言之，標準培養基富含某些胺基酸(丙胺酸、絲胺酸、天冬醯胺、脯胺酸)或蛋白質水解產物部分，且由三個至六個胺基酸殘基構成之合成寡肽可顯著抑制細胞凋亡。該等肽以毫莫耳濃度或高於毫莫耳濃度之濃度存在。

可對培養融合瘤細胞之培養基分析結合 Axl 之單株抗體之產生。融合瘤細胞所產生之單株抗體的結合特異性可藉由免疫沈澱法或藉由活體外結合分析法(諸如放射免疫分析法(RIA)或酶聯免疫吸附分析法(ELISA))測定。單株抗體之結合親和力可藉由例如史卡查分析(Scatchard analysis)來測定。參見例如 Munson 等人，*Anal. Biochem.*,

107:220 (1980)。

鑑別可產生具有所要特異性、親和力及/或活性之抗體的融合瘤細胞之後，可藉由限制性稀釋程序次選殖純系且藉由標準方法培養。參見例如 Goding，同上。適用於此目的之培養基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培養基。另外，融合瘤細胞可在動物體活體內內培養為腹水腫瘤。次純系所分泌之單株抗體宜藉由習知免疫球蛋白純化程序(諸如蛋白 A-瓊脂糖、羥磷灰石層析、凝膠電泳、透析或親和性層析)自培養基、腹水或血清中分離。一種自融合瘤細胞分離蛋白質之程序描述於 US 2005/176122 及美國專利第 6,919,436 號中。該方法包括在結合過程中使用最少量之鹽(諸如易溶鹽)及亦較佳在溶離過程中使用少量有機溶劑。

2. 某些文庫篩檢方法

可藉由使用組合文庫篩檢具有所需活性之抗體來獲得本發明之抗體。舉例而言，此項技術中已知多種產生噬菌體呈現文庫及篩檢該等文庫中具有所要結合特徵之抗體的方法。該等方法一般描述於 Hoogenboom 等人之 *Methods in Molecular Biology* 178:1-37(O'Brien 等人編，Human Press, Totowa, NJ, 2001) 中。舉例而言，如 Lee 等人，*J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93 中所述，一種產生相關抗體之方法係使用噬菌體抗體文庫。

大體上，藉由篩檢含有噬菌體的噬菌體文庫來選擇合成抗體純系，該噬菌體呈現與噬菌體鞘蛋白融合之抗體可變區(Fv)之各種片段。藉由針對所需抗原進行親和層析來淘

選該等噬菌體文庫。表現能夠與所需抗原結合之Fv片段之純系吸附至抗原且因此與文庫中非結合純系分離。接著將結合純系自抗原溶離，且可藉由另外幾輪抗原吸附/溶離進一步富集。本發明之任何抗體可如下獲得：設計適合抗原篩檢程序以選擇相關噬菌體純系，接著使用相關噬菌體純系之Fv序列及Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991)，第1-3卷中所述之適合恆定區(Fc)序列來構築全長抗體純系。

在某些實施例中，抗體之抗原結合域係由兩個具有約110個胺基酸之可變(V)區形成，可變區各來自輕鏈(VL)及重鏈(VH)且均存在三個高變環(HVR)或互補決定區(CDR)。可變域可作為單鏈Fv(scFv)片段(其中VH與VL經由柔性短肽共價鍵聯)或作為Fab片段(其中VH與VL各與恆定域融合且非共價相互作用)功能性地呈現於噬菌體上，如Winter等人，*Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455(1994)中所述。如本文所使用，scFv編碼噬菌體純系及Fab編碼噬菌體純系統稱為「Fv噬菌體純系」或「Fv純系」。

VH與VL基因譜系可藉由聚合酶鏈反應(PCR)分別選殖，且在噬菌體文庫中隨機重組，接著可搜尋抗原結合純系，如Winter等人，*Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455(1994)中所述。來自經免疫來源之文庫提供抗免疫原之高親和力抗體而無需構築融合瘤。或者，可選殖可提供針對廣泛範圍之非自體抗原以及自體抗原之單一人類抗體來源而無需任何

免疫作用的天然譜系，如 Griffiths 等人，*EMBO J*, 12: 725-734 (1993) 所述。最後，天然文庫亦可如下合成獲得：自幹細胞選殖未經重排之 V-基因片段並使用含有隨機序列之 PCR 引子編碼 CDR3 高變區及完成活體外重排，如 Hoogenboom 及 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992) 所述。

在某些實施例中，使用絲狀噬菌體呈現與次要鞘蛋白 pIII 融合的抗體片段。抗體片段可作為單鏈 Fv 片段呈現，其中 VH 域與 VL 域藉由柔性多肽間隔基連接於同一多肽鏈上，例如 Marks 等人，*J. Mol. Biol.*, 581-597 (1991) 中所述；或作為 Fab 片段呈現，其中一鏈與 pIII 融合而另一鏈分泌進入細菌性宿主細胞周質內，在周質內藉由置換一些野生型鞘蛋白組裝呈現於噬菌體表面上的 Fab-鞘蛋白結構，例如 Hoogenboom 等人，*Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991) 中所述。

通常，編碼抗體基因片段之核酸可自由人類或動物採集之免疫細胞獲得。若需要偏重於抗 Axl 純系的文庫，則個體以 Axl 免疫以產生抗體反應，且回收脾細胞及/或循環 B 細胞及其他周圍血液淋巴細胞 (PBL) 用於文庫建構。在較佳實施例中，偏重於抗 Axl 純系之人類抗體基因片段文庫可藉由在攜有功能性人類免疫球蛋白基因陣列 (且缺乏功能性內源抗體產生系統) 之轉殖基因小鼠中產生抗 Axl 抗體反應以使得 Axl 免疫引起 B 細胞產生抗 Axl 之人類抗體來獲得。下文描述產生人類抗體之轉殖基因小鼠的產生。

針對抗Axl反應性細胞群之其他富集可藉由使用適當篩檢程序分離表現Axl特異性膜結合抗體之B細胞來獲得，例如使用Axl親和層析法分離細胞或使細胞吸附至螢光染料標記之Axl、再進行流式活化細胞分選(FACS)。

或者，使用未免疫供體之脾細胞及/或B細胞或其他PBL可更好地展現可能抗體譜系，且亦容許使用任何動物(人類或非人類)物種(其中Axl不具抗原性)建構抗體文庫。對於合併活體外抗體基因建構之文庫而言，自個體採集幹細胞以提供編碼未重排抗體基因區段之核酸。相關免疫細胞可自多種動物物種獲得，諸如人類、小鼠、大鼠、兔類、狼、犬、貓、豬、牛、馬及鳥類物種等。

自相關細胞中回收編碼抗體可變基因區段(包括VH及VL區段)之核酸並擴增。在重排VH及VL基因文庫之狀況中，所需DNA可如下獲得：自淋巴細胞中分離基因組DNA或mRNA，接著利用與重排VH及VL基因之5'端及3'端匹配之引子進行聚合酶鏈反應(PCR)，如Orlandi等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989)中所述，從而獲得用於表現之各種V基因譜系。V基因可自cDNA及基因組DNA擴增，其中反向引子位於編碼成熟V域之外顯子之5'端且前向引子定位於J區段內部，如Orlandi等人，(1989)及Ward等人，*Nature*, 341: 544-546 (1989)中所述。然而，自cDNA擴增時，反向引子亦可定位於前導外顯子中，如Jones等人，*Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991)中所述，且前向引子可位於恆定區內部，如Sastry等人，*Proc. Natl. Acad.*

Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989)中所述。為最大化互補性，可合併引子中的簡併性，如 Orlandi 等人(1989)或 Sastry 等人(1989)中所述。在某些實施例中，文庫多樣性可藉由使用靶向各V基因家族的PCR引子最大化，以擴增存在於免疫細胞核酸樣品中之所有可利用的VH與VL排列，例如 Marks 等人，*J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)之方法中所述或如 Orum 等人，*Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993)之方法中所述。將擴增之DNA選殖入表現載體內時，可將稀少限制性位點引入PCR引子內之一端作為標記，如 Orlandi 等人(1989)中所述，或利用標記引子進一步進行PCR擴增，如 Clackson 等人，*Nature*, 352: 624-628 (1991)中所述。

合成性重排之V基因譜系可活體外源自V基因區段。人類VH基因區段中的大部分已選殖且定序(報導於Tomlinson 等人，*J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)中)，且已繪出圖譜(報導於Matsuda 等人，*Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993)中)；可使用此等選殖區段(包括H1與H2環之所有主要構形)以及編碼各種序列及長度之H3環的PCR引子產生各種VH基因譜系，如 Hoogenboom及Winter，*J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)中所述。亦可獲得所有序列多樣性皆集中於長H3環之單一長度上的VH譜系，如 Barbas 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992)中所述。人類V κ 及V λ 區段已選殖且定序(報導於Williams及Winter，*Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)中)且可用於形成合成性

輕鏈譜系。基於一系列之VH與VL摺疊及L3與H3長度之合成V基因譜系將編碼具有大量結構多樣性之抗體。擴增V基因編碼DNA之後，生殖系V基因區段可根據Hoogenboom及Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)之方法活體外重排。

可藉由以多種方式將VH與VL基因譜系組合在一起來建構抗體片段譜系。各譜系可建立於不同載體中，且載體可活體外重組，例如 Hogrefe 等人，*Gene*, 128: 119-126 (1993)中所述，或藉由組合感染(例如 Waterhouse 等人，*Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993)中所述之loxP系統)活體內重組。活體內重組方法係利用Fab片段之雙鏈性質來克服大腸桿菌轉型效率對文庫大小所施加之限制。天然VH及VL譜系係分別選殖，一者選殖入噬菌粒中且另一者選殖入噬菌體載體中。接著藉由噬菌體感染含有噬菌粒之細菌來組合兩個文庫，以使得各細胞含有不同組合且文庫大小僅受所存在細胞數量(約 10^{12} 個純系)限制。兩載體均含有活體內重組信號，以使得VH與VL基因在單一複製子上重組且共封裝於噬菌體病毒粒子中。此等大型文庫提供大量具有良好親和力(K_d^{-1} 為約 10^{-8} M)之多種抗體。

或者，該等譜系可依序選殖入同一載體，例如 Barbas 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991)中所述，或藉由PCR組裝在一起且接著選殖，例如 Clackson 等人，*Nature*, 352: 624-628 (1991)中所述。亦可使用PCR組裝將VH及VL DNA與編碼柔性肽間隔基之DNA連接在一起

以形成單鏈Fv(scFv)譜系。在另一種技術中，使用「細胞內PCR組裝」藉由PCR在淋巴細胞內組合VH與VL基因且接著選殖已連接基因之譜系，如Embleton等人，*Nucl. Acids Res.* 20:3831-37 (1992)中所述。

由天然文庫所產生之抗體(天然或合成)可具有中度親和力(約 10^6 至 10^7 M⁻¹之Kd⁻¹)，但親和力成熟亦可藉由建構及再選擇第二文庫來活體外模擬，如Winter等人(1994)(同上)所述。舉例而言，可使用Hawkins等人，*J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992)之方法或Gram等人，*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 3576-3580 (1992)之方法中之易出錯聚合酶(報導於Leung等人，*Technique*, 1: 11-15 (1989)中)活體外隨機引入突變。此外，親和力成熟可如下進行：在所選個別Fv純系中使一或多個CDR隨機突變，例如使用具有全長為相關CDR之隨機序列的引子進行PCR，且篩檢較高親和力純系。WO 9607754(1996年3月14日公開)描述一種誘導免疫球蛋白輕鏈之互補決定區發生突變以建立輕鏈基因文庫的方法。另一種有效方法為將藉由噬菌體呈現所選擇的VH域或VL域與獲自未免疫供體之天然存在之V域變異體譜系重組且以數輪鏈改組篩檢較高親和力，如Marks等人，*Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992)中所述。此技術能夠產生親和力為約 10^{-9} M或 10^{-9} M以下之抗體及抗體片段。

可藉由此項技術中已知之各種技術完成文庫篩檢。舉例而言，可使用Axl塗佈吸附板之各孔，於固定至吸附板之宿主細胞上表現或用於細胞分選，或與生物素結合以供塗

有抗生物蛋白鏈菌素之珠粒捕捉，或用於淘選噬菌體呈現文庫之任何其他方法中。

在適於使噬菌體顆粒之至少一部分與吸附劑結合之條件下，使噬菌體文庫樣品與經固定Axl接觸。通常選擇可模擬生理條件的條件，包括pH值、離子強度、溫度及其類似條件。洗滌結合至固相之噬菌體且接著藉由酸溶離，例如Barbas等人，*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991)中所述，或藉由鹼溶離，例如Marks等人，*J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)中所述，或藉由Axl抗原競爭，例如以與Clackson等人，*Nature*, 352:624-628 (1991)之抗原競爭方法類似之程序進行Axl抗原競爭。可在單輪選擇中富集20-1,000倍之噬菌體。此外，所富集之噬菌體可在細菌培養物中生長並經歷其他多輪選擇。

選擇效率視許多因素而定，包括洗滌過程中之解離動力學及單一噬菌體上之多個抗體片段能否同時與抗原接合。具有快速解離動力學(及弱結合親和力)之抗體可藉由使用短時間洗滌、多價噬菌體呈現及抗原於固相中之高塗佈密度予以保留。高密度不僅經由多價相互作用使噬菌體穩定，且亦有利於使已解離之噬菌體再結合。可使用長時間洗滌及單價噬菌體呈現(如Bass等人，*Proteins*, 8: 309-314 (1990)及WO 92/09690中所述)及低抗原塗佈密度(如Marks等人，*Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992)中所述)來促進對具有慢速解離動力學(及良好結合親和力)之抗體之選擇。

可在對Axl親和力不同之噬菌體抗體之間選擇，即使親

和力稍微不同。然而，所選抗體之隨機突變(例如，如在一些親和力成熟技術中所執行)可能產生許多突變體，大多數結合抗原，且有一些具有較高親和力。在限制Axl下，可淘汰稀少的高親和力噬菌體。為了保留所有較高親和力突變體，可將噬菌體與過量的經生物素標記之Axl一起培育，但經生物素標記之Axl之莫耳濃度比Axl之目標莫耳親和力常數低。高親和力結合噬菌體接著可被塗有抗生物蛋白鏈菌素之順磁珠粒捕捉。該「平衡捕捉」使得能夠根據抗體之結合親和力以敏感性選擇抗體，該敏感性允許使具有僅兩倍高親和力之突變體純系與具有較低親和力之大量過量噬菌體分離。亦可操控用於洗滌結合至固相之噬菌體的條件以基於解離動力學進行區分。

可基於活性選擇抗Axl純系。在某些實施例中，本發明提供結合天然表現Axl之活細胞之抗Axl抗體。在一實施例中，本發明提供阻斷Axl配位體與Axl之間結合但不阻斷Axl配位體與第二蛋白之間結合的抗Axl抗體。對應於該等抗Axl抗體的Fv純系可如下選擇：(1)如上所述自噬菌體文庫中分離抗Axl純系，及視需要擴增分離的噬菌體純系群體(藉由在適當細菌宿主中培育該群體)；(2)針對分別需要阻斷活性及非阻斷活性來選擇Axl及第二蛋白；(3)將抗Axl噬菌體純系吸附至固著Axl；(4)使用過量的第二蛋白溶離任何非所要純系，非所要純系識別的Axl結合決定子與第二蛋白之結合決定子重疊或共有；及(5)溶離步驟(4)完成後仍吸附的純系。具有所要阻斷/非阻斷特性之純系視需

要可進一步藉由將本文中所述之選擇程序重複一或多次來富集。

使用習知程序(例如使用設計成自融合瘤或噬菌體DNA模板特異性擴增相關重鏈及輕鏈編碼區的寡核苷酸引子)易於分離及定序編碼本發明之融合瘤源單株抗體或噬菌體呈現Fv純系的DNA。DNA一經分離，便可置於表現載體內，接著轉染至宿主細胞(諸如大腸桿菌細胞、猿COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞)中(否則宿主細胞不產生免疫球蛋白)，以於重組宿主細胞中獲得所需單株抗體之合成。關於在細菌中重組表現編碼抗體之DNA的評論文章包括Skerra等人，*Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993)及Pluckthun, *Immunol. Revs*, 130: 151 (1992)。

可將編碼本發明Fv純系之DNA與已知編碼重鏈及/或輕鏈恆定區之DNA序列(例如適當之DNA序列可依據Kabat等人(同上)獲得)組合以形成編碼全長或部分長度重鏈及/或輕鏈之純系。應瞭解，為達成此目的可使用任何同型之恆定區，包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恆定區，且此等恆定區可由任何人類或動物物種獲得。源自一種動物(諸如人類)物種之可變域DNA且接著與另一動物物種之恆定區DNA融合以形成「雜交」全長重鏈及/或輕鏈之編碼序列的Fv純系包括於如本文所使用之「嵌合」及「融合」抗體定義中。在某些實施例中，使來源於人類可變DNA之Fv純系與人類恆定區DNA融合以形成全長或部分長度人類重鏈及/或輕鏈之編碼序列。

編碼本發明之源自雜交瘤之抗Axl抗體的DNA亦可經修飾，例如用人類重鏈恆定域及輕鏈恆定域編碼序列取代源自融合瘤純系的同源鼠序列(例如Morrison等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)之方法)。編碼源自融合瘤或Fv純系之抗體或片段的DNA可藉由共價連接至免疫球蛋白編碼序列、非免疫球蛋白多肽之全部或部分編碼序列來進一步修飾。以此方式可製備具有本發明之源自Fv純系或融合瘤純系之抗體之結合特異性的「嵌合」或「融合」抗體。

3. 載體、宿主細胞及重組方法

亦可使用重組方法產生抗體。為重組產生抗Axl抗體，將編碼該抗體之核酸分離且插入可複製載體中以便進一步選殖(擴增DNA)或用於表現。可使用習知程序(例如使用能夠特異性結合編碼抗體重鏈及輕鏈之基因之寡核苷酸探針)容易分離及定序編碼抗體之DNA。可利用多種載體。載體組分一般包括(但不限於)以下一或多者：信號序列、複製起點、一或多個標記基因、強化子元件、啟動子及轉錄終止序列。

a) 信號序列組分

本發明之抗體不僅可直接重組產生，而且可以與異源多肽之融合多肽形式產生，該異源多肽較佳為信號序列或在成熟蛋白質或多肽之N末端處具有特定裂解位點之其他多肽。所選擇之異源信號序列較佳為可由宿主細胞識別及處理(亦即由信號肽酶裂解)之信號序列。對於不識別及處理

原生抗體信號序列之原核宿主細胞而言，將該信號序列取代為原核信號序列，例如選自鹼性磷酸酶、青黴素酶、lpp或熱穩定性腸毒素II前導序列之群的原核信號序列。對於酵母分泌，原生信號序列可取代為例如酵母轉化酶前導序列、 α 因子前導序列(包括酵母菌(*Saccharomyces*)及克魯維酵母(*Kluyveromyces*) α 因子前導序列)或酸性磷酸酶前導序列、白色念珠菌(*C. albicans*)葡糖澱粉酶前導序列或WO 90/13646中所述之信號。在哺乳動物細胞表現中，可使用哺乳動物信號序列以及病毒分泌性前導序列(例如單純疱疹gD信號)。

b) 複製起點

表現載體與選殖載體皆含有使載體能夠在一或多種所選宿主細胞中複製的核酸序列。通常，在選殖載體中，此序列為使載體能夠獨立於宿主染色體DNA複製的序列，且包括複製起點或自主複製序列。已熟知多種細菌、酵母及病毒之該等序列。質體pBR322之複製起點適於大多數革蘭氏陰性(Gram-negative)細菌，2 μ 質體起點適於酵母，且各種病毒起點(SV40、多形瘤、腺病毒、VSV或BPV)適用於哺乳動物細胞中之選殖載體。通常，哺乳動物表現載體不需要複製起點組分(使用SV40起點的原因通常僅在於其含有早期啟動子)。

c) 選擇基因組分

表現及選殖載體可含有選擇基因，亦稱為可選標記物。典型選擇基因編碼的蛋白質(a)賦予針對抗生素或其他毒素

(例如安比西林(ampicillin)、新黴素(neomycin)、甲胺喋呤或四環素(tetracycline))的抗性，(b)補充營養缺陷型不足或(c)供應不可自複雜培養基中得到之關鍵營養，例如編碼桿狀菌(*Bacilli*)之D-丙胺酸消旋酶的基因。

選擇方案之一實例係利用藥物阻滯宿主細胞之生長。經異源基因成功轉型之彼等細胞產生賦予抗藥性之蛋白質且因此在選擇療程中存活。該顯性選擇之實例係使用藥物新黴素、黴酚酸及濕黴素(hygromycin)。

適用於哺乳動物細胞之可選擇標記之另一實例為能夠鑑別有能力接納編碼抗體之核酸之細胞的彼等標記，諸如DHFR、麩醯胺酸合成酶(GS)、胸苷激酶、金屬硫蛋白I及金屬硫蛋白II(較佳為靈長類動物金屬硫蛋白基因)、腺苷脫胺酶、鳥胺酸脫羧酶等。

舉例而言，藉由在含有甲胺喋呤(Mtx)(DHFR之競爭性拮抗劑)之培養基中培養轉化子來鑑別經DHFR基因轉型之細胞。在此等條件下，DHFR基因與任何其他共轉型核酸一起擴增。可使用缺乏內源性DHFR活性之中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株(例如ATCC CRL-9096)。

或者，藉由在含有L-甲硫胺酸磺醯亞胺(Msx)(GS之抑制劑)之培養基中培養轉化子來鑑別經GS基因轉型之細胞。在此等條件下，GS基因與任何其他共轉型核酸一起擴增。GS選擇/擴增系統可與上述DHFR選擇/擴增系統組合使用。

或者，可藉由在含有針對可選擇標記之選擇劑(諸如胺

基糖苷抗生素，例如卡那黴素(kanamycin)、新黴素或G418)之培養基中培養細胞來選擇經編碼相關抗體之DNA序列、野生型DHFR基因及另一可選擇標記(諸如胺基糖苷3'-磷酸轉移酶(APH))轉型或共轉型之宿主細胞(尤其含有內源性DHFR之野生型宿主)。參見美國專利案第4,965,199號。

適用於酵母中之選擇基因為存在於酵母質體YRp7中之*trp1*基因(Stinchcomb等人, *Nature*, 282:39 (1979))。*trp1*基因為不能在色胺酸中生長的突變型酵母菌株(例如ATCC編號44076或PEP4-1)提供選擇標記。Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)。酵母宿主細胞基因組中存在之*trp1*損傷接著為偵測在色胺酸不存在下由生長所引起之轉型提供有效環境。類似地，*Leu2*缺陷型酵母菌株(ATCC 20,622或38,626)由攜有*Leu2*基因之已知質體補充。

此外，來源於1.6 μ m環狀質體pKD1之載體可用於轉型克魯維酵母。或者，已報導乳酸克魯維酵母(*K. lactis*)之表現系統，其用於大規模生產重組小牛凝乳酶。Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990)。亦已揭示供工業克魯維酵母菌株分泌成熟重組人類血清白蛋白的穩定多複本表現載體。Fleer等人, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)。

d) 啟動子組分

表現及選殖載體通常含有可被宿主生物體識別且可操作地連接至編碼抗體之核酸之啟動子。適用於原核宿主之啟動子包括*phoA*啟動子、 β -內醯胺酶及乳糖啟動子系統、鹼

性磷酸酶啟動子、色胺酸(trp)啟動子系統、及融合啟動子(諸如tac啟動子)。然而，其他已知之細菌啟動子亦適用。用於細菌系統中之啟動子亦含有可操作地連接至編碼抗體之DNA之夏因-達爾加諾(Shine-Dalgarno; S.D.)序列。

已知用於真核生物之啟動子序列。實際上所有真核基因均具有位於轉錄起始位點上游大約25至30個鹼基處之富AT區。發現於多種基因之轉錄起點上游70至80個鹼基處的另一序列為CNCAAT區，其中N可為任何核苷酸。大部分真核基因的3'端為AATAAA序列，該序列可為添加poly A尾至編碼序列之3'端的信號。所有此等序列均適合插入真核表現載體中。

適用於酵母宿主之啟動子序列之實例包括3-磷酸甘油酸激酶或其他糖解酶(諸如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸脫氫酶、己糖激酶、丙酮酸脫羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸異構酶、3-磷酸甘油酸歧化酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖異構酶、磷酸葡糖異構酶及葡萄糖激酶)之啟動子。

作為具有轉錄受生長條件控制之額外優勢之可誘導啟動子的其他酵母啟動子為以下之啟動子區：乙醇脫氫酶2、異細胞色素C、酸性磷酸酶、與氮代謝相關之降解酶、金屬硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脫氫酶及負責麥芽糖及半乳糖利用之酵素。EP 73,657中進一步描述適用於酵母表現之載體及啟動子。酵母增強子亦可有利地與酵母啟動子一起使用。

哺乳動物宿主細胞中經由載體進行的抗體轉錄可藉由例

如以下啟動子控制：獲自病毒(諸如多形瘤病毒、雞痘病毒、腺病毒(諸如腺病毒2)、牛乳頭狀瘤病毒、鳥肉瘤病毒、細胞巨大病毒、反轉錄病毒、B型肝炎病毒、猿猴病毒40(SV40))之基因組的啟動子；或異源哺乳動物啟動子(例如肌動蛋白啟動子或免疫球蛋白啟動子)；熱休克啟動子，其限制條件為該等啟動子與宿主細胞系統相容。

SV40病毒之早期及晚期啟動子宜作為亦含有SV40病毒複製起點之SV40限制片段獲得。人類細胞巨大病毒之立即早期啟動子宜作為HindIII E限制片段獲得。美國專利第4,419,446號中揭示使用牛乳頭狀瘤病毒作為載體在哺乳動物宿主中表現DNA之系統。美國專利第4,601,978號中描述此系統之改型。關於人類 β 干擾素cDNA在小鼠細胞中在單純疱疹病毒之胸苷激酶啟動子控制下之表現，亦參見Reyes等人，*Nature* 297:598-601 (1982)。或者，可使用勞斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus)之長末端重複序列作為啟動子。

e) 強化子元件組分

高等真核細胞轉錄編碼本發明抗體之DNA通常藉由將強化子序列插入載體中來增強。現已知多種源自哺乳動物基因(球蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、 α -胎蛋白及胰島素)的強化子序列。然而，通常使用真核細胞病毒之強化子。實例包括複製起點(bp 100-270)後側之SV40強化子、細胞巨大病毒早期啟動子強化子、複製起點後側之多形瘤病毒強化子及腺病毒強化子。關於用於活化真核啟動子之增強元

件，亦可參見Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982)。強化子可剪接至載體中位於抗體編碼序列之5'或3'位置，但較佳位於啟動子之5'位點。

f) 轉錄終止組分

在真核宿主細胞(酵母、真菌、昆蟲、植物、動物、人類或來自其他多細胞生物體之有核細胞)中使用之表現載體亦含有終止轉錄及穩定mRNA所需的序列。該等序列通常可自真核細胞或病毒DNA或cDNA之5'且有時3'非轉譯區獲得。此等區域含有在編碼抗體之mRNA之非轉譯部分中以聚腺苷酸化片段形式轉錄的核苷酸區段。一種適用之轉錄終止組分為牛生長激素多聚腺苷酸化區。參見WO 94/11026及其中所揭示之表現載體。

g) 選擇及轉型宿主細胞

適用於在本文中之載體中選殖或表現DNA之宿主細胞為上述原核細胞、酵母或高等真核細胞。適於此目的之原核細胞包括真細菌，諸如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物體，例如腸內菌科(Enterobacteriaceae)，諸如埃希氏菌屬(*Escherichia*)(例如大腸桿菌)、腸內菌屬(*Enterobacter*)、歐文氏菌屬(*Erwinia*)、克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)、變形桿菌屬(*Proteus*)、沙門氏菌屬(*Salmonella*)(例如鼠傷寒沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*))、沙雷氏菌屬(*Serratia*)(例如黏質沙雷氏菌(*Serratia marcescans*))及志賀氏菌屬(*Shigella*)以及芽孢桿菌屬(*Bacilli*)(諸如枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*)及地衣芽孢桿菌(*B. licheniformis*))(例如1989年4月

12日公開之DD 266,710中揭示之地衣芽孢桿菌41P))、假單胞菌屬(*Pseudomonas*)(諸如綠膿假單胞菌(*P. aeruginosa*))及鏈黴菌屬(*Streptomyces*)。儘管諸如大腸桿菌B、大腸桿菌X1776(ATCC 31,537)及大腸桿菌W3110(ATCC 27,325)之其他菌株亦適合，但一較佳大腸桿菌選殖宿主為大腸桿菌294(ATCC 31,446)。此等實例具說明性而非限制性。

可在細菌中產生全長抗體、抗體融合蛋白及抗體片段，尤其當不需要糖基化及Fc效應功能時，諸如當治療性抗體與自身顯示有效破壞腫瘤細胞之細胞毒性劑(例如毒素)結合時。全長抗體在循環中具有較長半衰期。大腸桿菌之生產更快且更具成本效率。關於抗體片段及多肽在細菌中之表現，參見例如 U.S. 5,648,237(Carter 等人)、U.S. 5,789,199(Joly 等人)、U.S. 5,840,523(Simmons 等人)，其描述轉譯起始區(TIR)及用於優化表現及分泌之信號序列。亦參見 Charlton, *Methods in Molecular Biology*，第248卷(B.K.C. Lo 編，Humana Press, Totowa, NJ, 2003)，第245-254頁，其描述大腸桿菌中抗體片段之表現。表現之後，抗體可自可溶部分中之大腸桿菌細胞糊狀物分離且可視同型而定經由例如蛋白A或G管柱加以純化。最終純化可類似於純化例如CHO細胞中所表現之抗體的方法進行。

除原核生物外，諸如絲狀真菌或酵母之真核細胞微生物為適用於編碼抗體之載體的選殖或表現宿主。在低等真核細胞宿主微生物中最常使用釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或普通麵包酵母(baker's yeast)。然而，大量其

他屬、種及菌株通常可利用並適用於本文，諸如裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)；克魯維酵母宿主，諸如乳酸克魯維酵母、脆壁克魯維酵母 (*K. fragilis*)(ATCC 12,424)、保加利亞克魯維酵母 (*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045)、威克克魯維酵母 (*K. wickerhamii*)(ATCC 24,178)、瓦提克魯維酵母 (*K. waltii*)(ATCC 56,500)、果蠅克魯維酵母菌 (*K. drosophilarum*)(ATCC 36,906)、耐熱克魯維酵母菌 (*K. thermotolerans*)及馬克斯克魯維酵母 (*K. marxianus*)；解脂耶氏酵母 (*Yarrowia*)(EP 402,226)；甲醇酵母 (*Pichia pastoris*)(EP 183,070)；假絲酵母 (*Candida*)；半知菌木黴 (*Trichoderma reesia*)(EP 244,234)；粗厚神經孢子菌 (*Neurospora crassa*)；許旺酵母屬 (*Schwanniomyces*)，諸如西方許旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*)；及纖維狀真菌，諸如脈孢菌屬 (*Neurospora*)、青黴菌屬 (*Penicillium*)、彎頸黴 (*Tolypocladium*)及曲黴菌 (*Aspergillus*)宿主，諸如溝巢麴黴 (*A. nidulans*)及黑麴黴 (*A. niger*)。關於討論酵母及絲狀真菌用於製備治療性蛋白質之用途的評述，參見例如 Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004)。

可選擇糖基化路徑已「人類化」的某些真菌及酵母菌株，從而產生具有部分或完全人類糖基化模式之抗體。參見例如 Li 等人，*Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)(描述甲醇酵母中糖基化路徑之人類化)；及 Gerngross 等人(同上)。

適用於表現糖基化抗體之宿主細胞亦可源自多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括

植物及昆蟲細胞。已鑑別多種桿狀病毒株及變異體以及來自諸如以下宿主的相應許可性昆蟲宿主細胞：草地黏蟲 (*Spodoptera frugiperda*)(毛蟲)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)(蚊子)、白紋伊蚊 (*Aedes albopictus*)(蚊子)、黑腹果蠅 (*Drosophila melanogaster*)(果蠅)及家蠶 (*Bombyx mori*)。用於轉染之多種病毒株公開可得，例如苜蓿丫紋夜蛾 (*Autographa californica*)NPV 之 L-1 變異體及家蠶 NPV 之 Bm-5 病毒株，且該等病毒可根據本發明用作本文中之病毒，尤其用於轉染草地黏蟲細胞。

棉花、玉米、馬鈴薯、大豆、矮牽牛、番茄、浮萍(浮萍科 (*Lemnaceae*))、紫苜蓿(截形苜蓿 (*M. truncatula*))及菸草之植物細胞培養物亦可用作宿主。參見例如美國專利第 5,959,177 號、第 6,040,498 號、第 6,420,548 號、第 7,125,978 號及第 6,417,429 號(描述在轉殖基因植物中產生抗體之 PLANTIBODIESTM 技術)。

脊椎動物細胞可用作宿主，且在培養物(組織培養物)中增殖脊椎動物細胞已成為常規程序。適用哺乳動物宿主細胞株之實例為經 SV40 轉型之猴腎 CV1 細胞株(COS-7，ATCC CRL 1651)；人類胚腎細胞株(293 細胞或經次選殖以便在懸浮培養物中生長之 293 細胞，Graham 等人，*J. Gen Virol.* 36:59 (1977)；幼倉鼠腎細胞(BHK，ATCC CCL 10)；小鼠足細胞(TM4，Mather，*Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980))；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76，ATCC CRL-1587)；人類子宮頸癌細胞(HELA，

ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK，ATCC CCL 34)；水牛鼠肝細胞(BRL 3A，ATCC CRL 1442)；人類肺細胞(W138，ATCC CCL 75)；人類肝細胞(Hep G2，HB 8065)；小鼠乳腺腫瘤(MMT 060562，ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather等人，*Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982))；MRC 5細胞；FS4細胞；及人類肝腫瘤細胞株(Hep G2)。其他適用哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括DHFR⁻ CHO細胞(Urlaub等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))；及骨髓瘤細胞株，諸如NS0及Sp2/0。欲回顧適用於產生抗體之某些哺乳動物宿主細胞株，參見例如Yazaki及Wu，*Methods in Molecular Biology*，第248卷(B.K.C. Lo編，Humana Press, Totowa, NJ, 2003)，第255-268頁。

宿主細胞用產生抗體之上述表現或選殖載體轉型，且在適當時經修改的習知營養培養基中培養以便誘導啟動子、選擇轉化子或擴增編碼所需序列之基因。

h) 培養宿主細胞

用於產生本發明抗體之宿主細胞可於多種培養基中培養。市購培養基(諸如Ham氏F10(Sigma)、最低必需培養基(MEM)(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)及杜貝科氏修飾之伊格氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium；DMEM)(Sigma))適用於培養宿主細胞。此外，Ham等人，*Meth. Enz.* 58:44 (1979)；Barnes等人，*Anal. Biochem.* 102:255 (1980)；美國專利第4,767,704號、第4,657,866

號、第4,927,762號、第4,560,655號或第5,122,469號；WO 90/03430；WO 87/00195；或美國專利參考案30,985中所述之任何培養基可用作宿主細胞之培養基。任何此等培養基均可視需要補充激素及/或其他生長因子(諸如胰島素、運鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽(諸如氯化鈉、鈣、鎂及磷酸鹽)、緩衝液(諸如HEPES)、核苷酸(諸如腺苷及胸苷)、抗生素(諸如GENTAMYCIN™藥物)、微量元素(定義為無機化合物，通常以在微莫耳濃度範圍內之最終濃度存在)及葡萄糖或等效能源。亦可包括熟習此項技術者已知之適當濃度的任何其他必需補充劑。培養條件(諸如溫度、pH值及其類似條件)為前述選擇用於表現之宿主細胞所用的條件，且對一般技術者顯而易知。

i) 抗體純化

使用重組技術時，抗體可在細胞內、周質間隙中產生，或直接分泌至培養基中。若抗體於細胞內產生，則作為第一步驟，藉由例如離心或超濾移除微粒碎片(宿主細胞或已溶解片段)。Carter等人，*Bio/Technology* 10:163-167 (1992)描述將分泌至大腸桿菌之周質間隙中之抗體分離的程序。簡言之，在乙酸鈉(pH 3.5)、EDTA及苯基甲基磺醯氟(PMSF)存在下，經約30分鐘將細胞糊狀物解凍。細胞碎片可利用離心移除。在抗體分泌至培養基中之情形下，通常首先使用市售蛋白濃縮過濾器(例如Amicon或Millipore Pellicon超濾裝置)濃縮此等表現系統之上清液。任何前述步驟中可包括諸如PMSF之蛋白酶抑制劑以抑制蛋白水

解，且可包括抗生素以防止外來污染物生長。

由細胞製備之抗體組合物可使用例如羧磷灰石層析、疏水相互作用層析、凝膠電泳、透析及親和性層析來純化，親和性層析為通常較佳之純化步驟之一。蛋白A作為親和性配位體之適用性視存在於抗體中之任何免疫球蛋白Fc域的種類及同型而定。蛋白A可用於純化基於人類 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重鏈的抗體(Lindmark等人，*J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983))。蛋白G推薦用於所有小鼠同型及人類 $\gamma 3$ (Guss等人，*EMBO J.* 5:1567-1575 (1986))。雖然親和性配位體所連接之基質最常為瓊脂糖，但可利用其他基質。與用瓊脂糖可達成之流速及處理時間相比，機械穩定性基質(諸如可控孔隙玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯)允許更快之流速及更短之處理時間。當抗體包含 C_H3 域時，可使用Bakerbond ABX™樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)純化。視欲回收之抗體而定，亦可利用純化蛋白質之其他技術，諸如離子交換柱分離法、乙醇沈澱法、逆相HPLC、二氧化矽層析、肝素SEPHAROSE™層析、陰離子或陽離子交換樹脂(諸如聚天冬胺酸管柱)層析、層析聚焦、SDS-PAGE及硫酸銨沈澱。

繼任何初步純化步驟之後，可使用pH值為約2.5-4.5之間的溶離緩衝液使包含所關注之抗體及污染物之混合物進行低pH疏水性相互作用層析，較佳在低鹽濃度(例如約0-0.25 M鹽)下進行。

通常，用於製備供研究、測試及臨床使用之抗體之各種

方法在此項技術中已充分確立，與上述方法一致且/或被熟習此項技術者視為適用於所關注之特定抗體。

C. 免疫結合物

本發明亦提供包含與一或多種細胞毒性劑結合之抗體的免疫結合物(可互換地稱為「抗體-藥物結合物」或「ADC」)，細胞毒性劑諸如化學治療劑、藥物、生長抑制劑、毒素(例如蛋白質毒素，細菌、真菌、植物或動物來源之酶促活性毒素，或其片段)或放射性同位素(亦即放射性結合物)。

免疫結合物已在癌症治療中用於細胞毒性劑(亦即殺死細胞或抑制細胞生長或增殖之藥物)之局部傳遞(Lambert, J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543-549；Wu等人，(2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146；Payne, G. (2003) *i* 3:207-212；Syrigos 及 Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614；Niculescu-Duvaz 及 Springer (1997) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26:151-172；美國專利第4,975,278號)。免疫結合物允許藥物部分靶向傳遞至腫瘤且在其中進行細胞內積聚，其中未結合藥物之全身投與會對正常細胞以及試圖消除之腫瘤細胞造成不可接受之毒性程度(Baldwin等人，*Lancet* (1986年3月15日)第603-05頁；Thorpe (1985)「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,」於 *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (A. Pinchera等人編)第475-506頁)。已報導多株抗體與單株抗

體均適用於此等策略中 (Rowland 等人, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-87)。該等方法中使用的藥物包括道諾黴素、阿黴素、甲胺喋呤及長春地辛 (Rowland 等人, (1986) 同上)。用於抗體-毒素結合物之毒素包括諸如白喉毒素之細菌毒素；諸如蓖麻毒蛋白之植物毒素；小分子毒素，諸如格爾德黴素 (geldanamycin) (Mandler 等人, (2000) *J. Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581；Mandler 等人, (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028；Mandler 等人, (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)，類美登素 (EP 1391213；Liu 等人, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) 及加里剎黴素 (calicheamicin) (Lode 等人, (1998) *Cancer Res.* 58:2928；Hinman 等人, (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342)。毒素可藉由包括微管蛋白結合、DNA 結合或拓撲異構酶抑制之機制來發揮其細胞毒性作用。有些細胞毒性藥物當與大抗體或蛋白質受體配位體結合時易失活或活性降低。

ZEVALIN® (替伊莫單抗替烏克坦 (ibritumomab tiuxetan), Biogen/Idex) 為抗體-放射性同位素結合物，其由藉由硫脲連接子-螯合劑相結合之抗 CD20 抗原 (發現於正常及惡性 B 淋巴細胞之表面上) 之鼠類 IgG1 κ 單株抗體與 ^{111}In 或 ^{90}Y 放射性同位素組成 (Wiseman 等人 (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27 (7):766-77；Wiseman 等人 (2002) *Blood* 99 (12):4336-42；Witzig 等人 (2002) *J. Clin. Oncol.* 20 (10):2453-63；Witzig 等人 (2002) *J. Clin. Oncol.* 20 (15):3262-69)。儘管

ZEVALIN具有抗B細胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)的活性，但投藥在大部分患者中引起嚴重及長期性血細胞減少症。MYLOTARG™(吉妥珠單抗奧唑米星(gemtuzumab ozogamicin)，Wyeth Pharmaceuticals)(一種由相連接之huCD33抗體與刺孢黴素組成的抗體藥物結合物)於2000年獲准用於注射治療急性骨髓性白血病(*Drugs of the Future* (2000) 25 (7):686；美國專利第4970198號、第5079233號、第5585089號、第5606040號、第5693762號、第5739116號、第5767285號、第5773001號)。康圖單抗美坦辛(Cantuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.)(一種由經由二硫化物連接子SPP相連接之huC242抗體與類美登素藥物部分DM1構成的抗體-藥物結合物)正進入治療表現CanAg之癌症的II期試驗，諸如結腸癌、胰臟癌、胃癌及其他癌症。MLN-2704(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)(一種由相連接之抗前列腺特異性膜抗原(PSMA)單株抗體與類美登素藥物部分DM1構成的抗體-藥物結合物)正開發用於前列腺腫瘤之潛在性治療。奧利斯坦叮(auristatin)肽、奧利斯坦叮E(AE)及單甲基奧利斯坦叮(monomethylauristatin；MMAE)(海兔毒素之合成類似物)與嵌合單株抗體cBR96(對癌科Lewis Y具有特異性)及cAC10(對惡性血液病CD30具有特異性)結合(Doronina等人(2003) *Nature Biotechnology* 21 (7):778-784)且正在治療性開發中。

在某些實施例中，免疫結合物包含抗體及化學治療劑或

其他毒素。本文中(例如上文)描述了適用於產生免疫結合物之化學治療劑。可使用的酶促活性毒素及其片段包括：白喉A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿假單胞菌)、蓖麻毒素A鏈、相思豆毒素A鏈、葫蘆根毒蛋白A鏈、 α -帚麴菌素(alpha-sarcin)、油桐(Aleurites fordii)蛋白質、康乃馨蛋白質、美洲商陸(Phytolacca americana)蛋白質(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(momordica charantia)抑制劑、麻瘋樹毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crotonin)、肥皂草(saponaire officinalis)抑制劑、白樹素(gelonin)、有絲分裂素(mitogellin)、侷限麴菌素(restrictocin)、酚黴素、伊諾黴素(enomycin)及單端孢黴烯族毒素(tricothecene)。參見例如1993年10月28日公開之WO 93/21232。多種放射性核素可用於產生放射性結合之抗體。實例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及 ^{186}Re 。抗體與細胞毒性劑之結合物可使用多種雙功能蛋白偶聯劑製得，該等蛋白偶聯劑諸如3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙官能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮鹽衍生物(諸如雙(對重氮鹽苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人，Science, 238:1098 (1987)中所述加以製備。碳14標記之1-

異硫氰基苯甲基-3-甲基二伸乙三胺五乙酸(MX-DTPA)為一種用於使放射性核苷酸與抗體結合之例示性螯合劑。參見WO 94/11026。

本文亦涵蓋抗體與一或多種小分子毒素(諸如刺胞毒素、美登素類、海兔毒素、奧瑞他汀、單端孢徽烯族毒素及CC1065以及此等毒素之具有毒素活性之衍生物)之結合物。

1. 美登素與類美登素

在一些實施例中，免疫結合物包含抗體(全長或片段)與一或多種類美登素分子之結合物。

類美登素為藉由抑制微管蛋白聚合而發揮作用之有絲分裂抑制劑。美登素最先係自東非灌木齒葉美登木(Maytenus serrata)分離(美國專利第3,896,111號)。隨後發現某些微生物亦產生類美登素，諸如美登醇及C-3美登醇酯(美國專利第4,151,042號)。合成的美登醇及其衍生物及類似物揭示於例如美國專利第4,137,230號；第4,248,870號；第4,256,746號；第4,260,608號；第4,265,814號；第4,294,757號；第4,307,016號；第4,308,268號；第4,308,269號；第4,309,428號；第4,313,946號；第4,315,929號；第4,317,821號；第4,322,348號；第4,331,598號；第4,361,650號；第4,364,866號；第4,424,219號；第4,450,254號；第4,362,663號及第4,371,533號中。

類美登素藥物部分為抗體藥物結合物中引人注目之藥物部分，此歸因於其：(i)藉由醃酵或化學修飾、醃酵產物衍

生化製備相對容易；(ii)易用適於經由非二硫化物連接子與抗體結合之官能基衍生化；(iii)在血漿中穩定；及(iv)對多種腫瘤細胞株有效。

含有類美登素之免疫結合物、其製造方法及其治療用途揭示於例如美國專利第5,208,020號、第5,416,064號及歐洲專利EP 0 425 235 B1中，其揭示內容以引用的方式明確併入本文中。Liu等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)描述的免疫結合物包含相連接之類美登素(命名為DM1)與針對人類結腸直腸癌之單株抗體C242。已發現該結合物對所培養之結腸癌細胞具有高細胞毒性且在活體內腫瘤生長分析法中顯示抗腫瘤活性。Chari等人，Cancer Research 52:127-131 (1992)描述免疫結合物，其中類美登素經由二硫化物連接子與結合至人類結腸癌細胞株上之抗原的鼠類抗體A7結合，或與結合HER-2/neu致癌基因之另一種鼠類單株抗體TA.1結合。已活體外測試TA.1-類美登素結合物對人類乳癌細胞株SK-BR-3之細胞毒性，該細胞株每個細胞表現 3×10^5 個HER-2表面抗原。藥物結合物達成的細胞毒性度與游離類美登素藥物類似，細胞毒性度可藉由增加每個抗體分子之類美登素分子之數目來增加。A7-類美登素結合物在小鼠體內顯示低全身性細胞毒性。

抗體-類美登素結合物係藉由將抗體與類美登素分子化學連接來製備而不顯著降低抗體或類美登素分子之生物學活性。參見例如美國專利第5,208,020號(其揭示內容以引

用方式明確地併入本文中)。平均每個抗體分子結合3-4個類美登素分子已顯示出增強標靶細胞之細胞毒性之功效而對抗體功能或溶解性無不利影響，即使一個分子毒素/抗體預計亦會增強細胞毒性而超過使用裸抗體。類美登素已為此項技術中所熟知，且可藉由已知技術合成或自天然來源分離。適當之類美登素揭示於例如美國專利第5,208,020號及上文提及之其他專利及非專利公開案中。較佳之類美登素為美登醇及在美登素醇分子之芳環中或其他位置處經修飾之美登醇類似物(諸如各種美登醇酯)。

此項技術中已知之用於製備抗體-類美登素結合物的多種連接基團包括例如美國專利第5,208,020號或歐洲專利0 425 235 B1；Chari等人，Cancer Research 52:127-131(1992)及美國專利申請案第10/960,602號(2004年10月8日申請)中所揭示的連接基團，其揭示內容以引用方式明確併入本文中。可如2004年10月8日申請之美國專利申請案第10/960,602號中所揭示，製備包含連接組分SMCC之抗體-類美登素結合物。如以上鑑別之專利中所揭示，連接基團包括二硫基、硫醚基、酸不穩定性基團、光不穩定性基團、肽酶不穩定性基團或酯酶不穩定性基團，較佳為二硫基及硫醚基。本文中描述及舉例說明其他連接基團。

抗體與類美登素之結合物可使用多種雙官能蛋白偶合劑製得，該等蛋白偶合劑諸如3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸丁二醯亞胺酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯

亞胺酯之雙官能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮鹽衍生物(諸如雙(對重氮鹽苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。特別較佳之偶合劑包括提供二硫鍵之3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)(Carlsson等人, *Biochem. J.* 173:723-737 (1978))及4-(2-吡啶基硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(SPP)。

視連接類型而定, 連接子可連接於類美登素分子之各種位置。舉例而言, 可使用習知偶合技術、藉由與羥基反應形成酯鍵。反應可發生於具有羥基之C-3位置、經羥甲基修飾之C-14位置、經羥基修飾之C-15位置及具有羥基之C-20位置處。在一較佳實施例中, 鍵聯形成於美登醇或美登醇類似物之C-3位置處。

2. 奧利斯坦叮及海兔毒素

在一些實施例中, 免疫結合物包含抗體與海兔毒素或海兔毒素肽類似物及衍生物奧利斯坦叮之結合物(美國專利第5635483號、第5780588號)。海兔毒素及奧利斯坦叮已顯示可干擾微管動力學、GTP水解及細胞核及細胞分裂(Woyke等人, (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584)且具有抗癌(US 5663149)及抗真菌活性(Pettit等人, (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-965)。海兔毒素或奧利斯坦叮藥物部分可經由肽藥物

部分之N(胺基)末端或C(羧基)末端與抗體連接(WO 02/088172)。

例示性奧利斯坦叮實施例包括「Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands」(2004年11月5日申請之美國專利第10/983,340號，其全部揭示內容以引用方式明確併入本文中)中所揭示的N末端連接之單甲基奧利斯坦叮藥物部分DE及DF。

基於肽之藥物部分通常可藉由在兩個或兩個以上胺基酸及/或肽片段之間形成肽鍵而製備。該等肽鍵可根據例如肽化學領域中熟知之液相合成方法(參見E. Schröder及K. Lübke, 「The Peptides」, 第1卷, 第76-136頁, 1965, Academic Press)製備。可根據以下文獻中之方法製備奧利斯坦叮/海兔毒素藥物部分: US 5635483; US 5780588; Pettit等人, (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit等人(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R.等人, Synthesis, 1996, 719-725; 及Pettit等人, (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863。亦參見Doronina (2003) Nat Biotechnol 21 (7):778-784; 「Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands」, 2004年11月5日申請之美國專利第10/983,340號，其全文以引用方式併入本文中(揭示例如連接子及製備與連接子結合之單甲基纈胺酸化合物(諸如MMAE及MMAF)的方法)。

3. 刺孢黴素

在其他實施例中，免疫結合物包含抗體與一或多個刺孢黴素分子之結合物。刺孢黴素家族之抗生素能夠在亞皮莫耳濃度下產生雙股DNA斷裂。有關刺孢黴素家族結合物之製備，參見美國專利第5,712,374號、第5,714,586號、第5,739,116號、第5,767,285號、第5,770,701號、第5,770,710號、第5,773,001號及第5,877,296號(均頒予American Cyanamid Company)。可使用之刺孢黴素之結構類似物包括(但不限於) γ 1I、 α 2I、 α 3I、N-乙醯基- γ 1I、PSAG及 θ 1I(Hinman等人，Cancer Research 53:3336-3342 (1993)；Lode等人，Cancer Research 58:2925-2928 (1998)；及頒予American Cyanamid之上述美國專利)。可與抗體結合之另一種抗腫瘤藥物為QFA，其為抗葉酸劑。刺孢黴素與QFA皆具有細胞內作用位點且不易於跨過質膜。因此，細胞經由抗體介導之內化作用攝取此等藥劑可大大增強其細胞毒性作用。

4. 其他細胞毒性劑

可與抗體結合之其他抗瘤劑包括BCNU、鏈脲佐菌素(streptozocin)、長春新鹼及5-氟尿嘧啶(該家族之藥劑統稱為LL-E33288複合物，如美國專利5,053,394、5,770,710中所述)以及艾斯帕米辛(esperamicin)(美國專利5,877,296)。

可使用的酶促活性毒素及其片段包括白喉A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(獲自綠膿假單胞菌)、蓖麻毒素A鏈、相思豆毒素A鏈、葫蘆根毒素A鏈、 α -帚麴

菌素、油桐蛋白、康乃馨蛋白、美洲商陸蛋白(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜抑制劑、麻瘋樹毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草抑制劑、白樹素、有絲分裂素、侷限麴菌素、酚黴素、伊諾黴素及單端孢黴烯族毒素。參見例如1993年10月28日所公開之WO 93/21232。

本發明進一步涵蓋抗體與具有核分解活性之化合物(例如核糖核酸酶或DNA內切酶，諸如去氧核糖核酸酶；DNase)之間所形成的免疫結合物。

為選擇性破壞腫瘤，抗體可包含高度放射性原子。可使用多種放射性同位素產生放射性結合抗體。實例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及Lu之放射性同位素。當使用結合物進行偵測時，其可包含用於閃爍攝影研究之放射性原子，例如 $\text{Tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} ；或用於核磁共振(NMR)成像(亦稱為磁共振成像，mri)之自旋標記，諸如碘-123及碘-131、銦-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、釷、錳或鐵。

可以已知方式將放射性標記或其他標記併入結合物中。舉例而言，肽可生物合成，或可藉由化學胺基酸合成、使用適當胺基酸前驅物(包括例如替代氫的氟-19)來合成。諸如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 及 In^{111} 之標記可經由肽中之半胱胺酸殘基連接。釷-90可經由離胺酸殘基連接。可使用 IODOGEN 方法(Fraker 等人，(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) 併入碘-123。「Monoclonal Antibodies in Immunoscinigraphy」(Chatal, CRC Press

1989)詳細描述了其他方法。

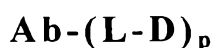
抗體與細胞毒性劑之結合物可使用多種雙官能蛋白偶合劑製得，該等蛋白偶合劑為諸如3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸丁二醯亞胺酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙官能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮鹽衍生物(諸如雙(對重氮鹽苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如 Vitetta 等人，*Science*, 238:1098 (1987) 中所述來製備。碳14標記之1-異硫氰基苯甲基-3-甲基二伸乙三胺五乙酸(MX-DTPA)為一種用於使放射性核苷酸與抗體結合之例示性螯合劑。參見 WO94/11026。連接子可為有利於細胞毒性藥物釋放於細胞中之「可裂解連接子」。舉例而言，可使用酸不穩定性連接子、肽酶敏感性連接子、光不穩定性連接子、二甲基連接子或含二硫鍵連接子 (Chari 等人，*Cancer Research* 52:127-131 (1992)；美國專利第 5,208,020 號)。

該等化合物明確涵蓋(但不限於)與以下交聯試劑所製備之 ADC：BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、sulfo-EMCS、sulfo-GMBS、sulfo-KMUS、sulfo-

MBS、sulfo-SIAB、sulfo-SMCC及sulfo-SMPB及SVSB((4-乙烯基磺)苯甲酸丁二醯亞胺酯)，該等交聯試劑可市購(例如購自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。參見2003-2004 Applications Handbook and Catalog第467-498頁。

5. 製備抗體藥物結合物

在抗體藥物結合物(ADC)中，抗體(Ab)經由連接子(L)與一或多個藥物部分(D)(例如每個抗體約1至約20個藥物部分)結合。式I之ADC可藉由若干途徑，使用熟習此項技術者已知之有機化學反應、條件及試劑來製備，包括：(1)使抗體之親核基團與二價連接子試劑反應以經由共價鍵形成Ab-L，接著與藥物部分D反應；及(2)使藥物部分之親核基團與二價連接子試劑反應以經由共價鍵形成D-L，接著與抗體之親核基團反應。本文描述用於製備ADC之其他方法。



I

連接子可由一或多種連接子組分構成。例示性連接子組分包括6-順丁烯二醯亞胺基己醯基(「MC」)、順丁烯二醯亞胺基丙醯基(「MP」)、纈胺酸-瓜胺酸(「val-cit」)、丙胺酸-苯丙胺酸(「ala-phe」)、對胺基苯甲氧基羰基(「PAB」)、4-(2-吡啶基硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(「SPP」)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸N-丁二醯亞胺酯(「SMCC」)及(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(「SIAB」)。其他連接子組分已為此項技

術中所知且有些描述於本文中。亦參見「Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands」，2004年11月5日申請之美國專利第10/983,340號，其全部內容以引用方式併入本文中。

在一些實施例中，連接子可包含胺基酸殘基。例示性胺基酸連接子組分包括二肽、三肽、四肽或五肽。例示性二肽包括纈胺酸-瓜胺酸(vc或val-cit)、丙胺酸-苯丙胺酸(af或ala-phe)。例示性三肽包括甘胺酸-纈胺酸-瓜胺酸(gly-val-cit)及甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸(gly-gly-gly)。包含胺基酸連接子組分之胺基酸殘基包括天然存在之胺基酸以及次要胺基酸及非天然存在之胺基酸類似物，諸如瓜胺酸。可對胺基酸連接子組分進行設計且優化以對特定酵素(例如腫瘤相關蛋白酶、組織蛋白酶B、C及D或纖溶蛋白酶)之酶促裂解具有選擇性。

抗體上之親核基團包括(但不限於)：(i)N末端胺基；(ii)側鏈胺基，例如離胺酸；(iii)側鏈硫醇基，例如半胱胺酸；及(iv)抗體經糖基化之糖羥基或胺基。胺基、硫醇基及羥基呈親核性且能夠與連接子部分及連接子試劑上之親電子基團(包括：(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵甲酸酯及酸鹵化物；(ii)烷基及苯甲基鹵化物，諸如鹵乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及順丁烯二醯亞胺基)反應形成共價鍵。某些抗體具有可還原之鏈間二硫鍵，亦即半胱胺酸橋。抗體可藉由諸如DTT(二硫蘇糖醇)之還原劑處理而具有反應性以便與連接子試劑結合。因此，每個半胱胺酸橋

在理論上將形成兩個反應性硫醇親核體。其他親核基團可經由離胺酸與2-亞胺基硫雜環戊烷(特勞特試劑(Traut's reagent))反應使胺轉化為硫醇而引入抗體中。反應性硫醇基可藉由引入一個、兩個、三個、四個或四個以上半胱胺酸殘基而引入抗體(或其片段)中(例如製備包含一或多個非原生半胱胺酸胺基酸殘基之突變體抗體)。

亦可藉由修飾抗體以引入可與連接子試劑或藥物上之親核性取代基反應的親電子性部分來製備抗體藥物結合物。糖基化抗體中之糖可以例如過碘酸鹽氧化試劑氧化以形成可與連接子試劑或藥物部分之胺基反應的醛或酮基。所得亞胺希夫鹼(Schiff base)基團可形成穩定鍵聯，或可經例如硼氫化物試劑還原而形成穩定胺鍵。在一實施例中，糖基化抗體中之碳水化合物部分與半乳糖氧化酶或偏過碘酸鈉之反應可於蛋白質中產生可與藥物上之適當基團反應的羰基(醛及酮基團)(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一實施例中，含有N末端絲胺酸或蘇胺酸殘基之蛋白質可與偏過碘酸鈉反應，從而產生醛而非第一胺基酸(Geoghegan 及 Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852)。該醛可與藥物部分或連接子親核體反應。

類似地，藥物部分上之親核基團包括(但不限於)：胺、硫醇、羥基、醯肼、肟、肼、硫半卡(thiosemicarbazone)、肼羧酸鹽及芳基醯肼基團，該等基團能夠與連接子部分及連接子試劑上之親電子基團(包括：(i)活性酯，諸如 NHS

酯、HOBt酯、鹵甲酸酯及酸鹵化物；(ii)烷基及苯甲基鹵化物，諸如鹵乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及順丁烯二醯亞胺基)反應形成共價鍵。

或者，包含抗體及細胞毒性劑之融合蛋白可藉由例如重組技術或肽合成法製造。DNA之長度可包含編碼結合物之兩個部分的各別區域，該等區域可彼此相鄰或由編碼不破壞結合物所需特性之連接子肽之區域分隔。

在另一實施例中，抗體可與用於預靶向腫瘤的「受體」(諸如抗生物蛋白鏈菌素)結合，其中將抗體-受體結合物投與患者，隨後使用廓清劑將未結合之結合物自循環系統中移除，且接著投與與細胞毒性劑(例如放射性核苷酸)結合的「配位體」(例如抗生物素蛋白)。

本發明之抗Axl抗體可藉由此項技術中已知之各種分析法表徵其物理/化學性質及/或生物活性。

a) 活性分析法

在一態樣中，提供用於鑑別具有生物活性之抗Axl抗體之分析法。生物活性可包括例如抑制配位體與Axl結合、抑制Axl之磷酸化或下調Axl表現。亦提供在活體內及/或活體外具有該生物活性之抗體。

在某些實施例中，測試本發明抗體抑制配位體與Axl結合、抑制Axl磷酸化或下調Axl表現之能力。

b) 結合分析法及其他分析法

在一態樣中，測試本發明抗體之抗原結合活性，例如藉由諸如ELISA、西方墨點法等已知方法測試。在另一態樣

中，可使用競爭分析法鑑別與3G9、8B5、12A11或4F8競爭結合Axl之單株抗體。在某些實施例中，該競爭抗體結合的抗原決定基與3G9、8B5、12A11或4F8所結合之抗原決定基(例如線性或構形抗原決定基)相同。例示性競爭分析法包括(但不限於)常規分析法，諸如Harlow及Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* 第14章(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)中提供之常規分析法。對抗體所結合之抗原決定基定位之詳細例示性方法提供於*Methods in Molecular Biology*，第66卷(Humana Press, Totowa, NJ)中之Morris (1996)「Epitope Mapping Protocols」中。兩種抗體若一者將另一者之結合阻斷50%或50%以上，則稱該兩種抗體結合於相同抗原決定基。

在例示性競爭分析法中，在包含結合Axl之第一經標記抗體(例如3G9、8B5、12A11或4F8)及經測試能夠與第一抗體競爭結合Axl之第二未標記抗體的溶液中培育固定Axl。第二抗體可存在於融合瘤上清液中。作為對照，在包含第一經標記抗體、但不包含第二未標記抗體的溶液中培育固定之Axl。在允許第一抗體與Axl結合之條件下培育之後，移除過量的未結合抗體，且量測與固定之Axl結合之標記之量。若相對於對照樣品，測試樣品中與固定之Axl結合之標記之量大幅減少，則指示第二抗體與第一抗體競爭結合Axl。

在一態樣中，本發明之抗體可藉由一系列分析法進一步

表徵，該等分析法包括(但不限於)N末端定序、胺基酸分析、非變性尺寸排阻高壓液相層析(HPLC)、質譜分析、離子交換層析及木瓜蛋白酶消化。

應瞭解，可使用本發明之免疫結合物替代抗Axl抗體或除抗Axl抗體之外亦可使用本發明之免疫結合物來執行任何上述分析法。

方法

組合療法

本發明之特徵在於Axl拮抗劑與VEGF拮抗劑之組合使用。該組合之有利效應包括(但不限於)治療劑組合所產生之藥物動力學或藥效學共同作用。本發明尤其適用於治療各階段之各類型癌症。

術語癌症包含多種增生病症，包括(但不限於)癌前期生長、良性腫瘤及惡性腫瘤。良性腫瘤保持定位於初始位點處且不具有浸潤、侵襲或轉移至遠端位點之能力。惡性腫瘤將侵襲且損壞其周圍的其他組織。其亦能夠脫離初始位點且通常經由血流或經由淋巴結所在之淋巴系統擴散至身體的其他部分(轉移)。原發性腫瘤係依據其發生之組織類型分類；轉移性腫瘤係依據癌細胞所來源之組織類型分類。惡性腫瘤細胞隨時間變得更加異常且似乎更不像正常細胞。癌細胞外形之此變化稱為腫瘤等級，且癌細胞描述為充分分化(低級)、中度分化、不良分化或未分化(高級)。充分分化細胞之外形相當正常且類似於其所來源之正常細胞。未分化細胞為已變得如此異常以致無法判定細

胞起源的細胞。

癌症分期系統描述在解剖學上癌症已擴散之程度且試圖將具有類似預後及治療之患者歸為同一階段組。可進行數種測試以有助於對癌症分期，包括活組織檢查及某些成像測試，諸如胸部X射線、乳房X射線攝像(mammogram)、骨骼掃描、CT掃描及MRI掃描。亦使用血液測試及臨床評估來評估患者總體健康且偵測癌症是否已擴散至某些器官。

為對癌症分期，美國癌症聯合委員會(American Joint Committee on Cancer)首先使用TNM分類系統將癌症(尤其實體腫瘤)按字母歸類。癌症以字母T(腫瘤尺寸)、N(可觸知結點)及/或M(轉移)指明。T1、T2、T3及T4描述原發性病變之尺寸增加；N0、N1、N2、N3指示涉及進行性發展之結點；且M0及M1反映不存在或存在遠端轉移。

在第二種分期方法(亦稱為總體分期或羅馬數字分期)中，將癌症分成0至IV期(合併原發性病變之尺寸以及結節擴散及遠端轉移之存在)。在此系統中，將病例分為由羅馬數字I至IV表示之四個階段，或歸類為「復發性」。對於某些癌症，0期稱為「原位」或「Tis」，諸如對於乳癌而言，稱為乳腺管原位癌或小葉原位癌。高級腺瘤亦可歸類為0期。通常，I期癌症為通常可治癒之小局部癌症，而IV期通常表示無法進行手術或轉移性癌症。II期及III期癌症通常局部發展及/或顯示涉及局部淋巴結。通常，較高級數字指示較重大疾病，包括較大腫瘤尺寸及/或癌症擴散

至附近淋巴結及/或鄰近原發性腫瘤之器官。此等階段定義明確，但各類型癌症的定義不同且為熟習此項技術者所知。

許多癌症登記處(諸如美國國家癌症研究所之監視、流行病學及最終結果計劃(NCI's Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, SEER))係使用總結分期。此系統用於所有類型之癌症。其將癌症病例分成五個主要類別：

原位為早期癌症，其僅存在於其開始之細胞層中。

局部化為侷限於開始器官，而無擴散證據之癌症。

區域性為已擴散超出初始(原發性)位點至附近淋巴結或器官及組織之癌症。

遠端為已自原發性位點擴散至遠端器官或遠端淋巴結之癌症。

未知用於描述無足夠資訊指示階段之病例。

此外常見的是，在原發性腫瘤已移除之後數月或數年，癌症復發。在所有可見腫瘤已根除之後復發之癌症稱為復發性疾病。在原發性腫瘤區域內復發之疾病為局部復發，且以轉移形式復發的疾病稱為遠端復發。

腫瘤可為實體腫瘤或非實體腫瘤或軟組織腫瘤。軟組織腫瘤之實例包括白血病(例如慢性骨髓性白血病、急性骨髓性白血病、成年急性淋巴母細胞白血病、急性骨髓性白血病、成熟B細胞急性淋巴母細胞白血病、慢性淋巴球性白血病、前淋巴球性白血病或毛細胞白血病)或淋巴瘤(例

如非霍奇金氏淋巴瘤、皮膚T細胞淋巴瘤或霍奇金氏病)。實體腫瘤包括除血液、骨髓或淋巴系統以外的身體組織之任何癌症。實體腫瘤可進一步分為上皮細胞起源之實體腫瘤及非上皮細胞起源之實體腫瘤。上皮細胞實體腫瘤之實例包括胃腸道、結腸、乳房、前列腺、肺、腎、肝、胰、卵巢、頭及頸部、口腔、胃、十二指腸、小腸、大腸、肛門、膽囊、唇、鼻咽、皮膚、子宮、雄性生殖器、泌尿器官、膀胱及皮膚之腫瘤。非上皮起源之實體腫瘤包括肉瘤、腦腫瘤及骨腫瘤。

除上述治療方案以外，可對患者進行外科手術移除癌細胞及/或放射療法。

在某些實施例中，對本文中之患者進行診斷測試，例如在治療之前及/或治療期間及/或治療之後進行診斷測試。通常，若進行診斷測試，則樣品可獲自需要治療之患者。若個體患有癌症，則樣品可為腫瘤樣品或其他生物樣品，諸如生物體液，包括(但不限於)血液、尿、唾液、腹水、或諸如血清及血漿之衍生物，及其類似物。

在一些實施例中，個體癌症表現(在一些實施例中，過度表現)Ax1及/或VEGF。測定Ax1及VEGF表現之方法在此項技術中已知且本文中描述某些方法。

在一態樣中，本發明提供治療癌症、抑制不良細胞增殖、抑制癌症轉移及活體內或活體外誘導腫瘤細胞之細胞凋亡的方法，該方法包含在允許本發明之抗體與Ax1結合之條件下使細胞暴露於抗體。在某些實施例中，細胞為骨

髓性白血細胞、肺癌細胞、胃癌細胞、乳癌細胞、前列腺癌細胞、腎細胞癌細胞及神經膠母細胞瘤細胞。在一實施例中，本發明之抗體可用於抑制Axl之活性，該方法包含使Axl暴露於本發明之抗體以便抑制Axl之活性。

在一態樣中，本發明提供治療癌症之方法，其包含向個體投與有效量之本發明抗體。在某些實施例中，治療癌症之方法包含向個體投與有效量之醫藥調配物，其包含本發明之抗體及視情況選用之至少一種其他治療劑(諸如下文提供之治療劑)。

本發明之抗體在治療中可單獨使用或與其他組合物組合使用。舉例而言，本發明之抗體可與至少一種其他治療劑及/或佐劑共投與。在某些實施例中，其他治療劑為抗VEGF抗體。

上述該等組合療法涵蓋組合投藥(其中兩種或兩種以上治療劑包括在同一或各別調配物中)，及分別投藥，在此情況下本發明抗體之投與可在投與其他治療劑及/或佐劑之前、同時及/或之後進行。本發明之抗體亦可與放射療法組合使用。

在一實施例中，將本發明之抗體用於結合個體中之Axl的方法中，該個體罹患與Axl表現及/或活性增加相關之病症，該方法包含將抗體投與個體以結合個體中之Axl。在一實施例中，Axl為人類Axl且個體為人類個體。

診斷方法及偵測方法

在一態樣中，本發明之抗體適用於偵測生物樣品中Axl

之存在。如本文中所用之術語「偵測」涵蓋定量或定性偵測。在某些實施例中，生物樣品包含細胞或組織，諸如腫瘤組織。

在一態樣中，本發明提供偵測生物樣品中Axl之存在的方法。在某些實施例中，該方法包含在允許抗Axl抗體與Axl結合之條件下使生物樣品與抗Axl抗體接觸，及偵測抗Axl抗體與Axl之間是否形成複合物。

在一態樣中，本發明提供診斷與Axl表現增加相關之病症的方法。在某些實施例中，該方法包含：使測試細胞與抗Axl抗體接觸；藉由偵測抗Axl抗體與Axl之結合來測定測試細胞中Axl之表現量(定量或定性)；及對測試細胞之Axl表現量與對照細胞(例如與測試細胞來源於相同組織之正常細胞，或Axl表現量與此正常細胞相當之細胞)之Axl表現量加以比較，其中測試細胞之Axl表現量高於或低於對照細胞皆指示存在與Axl表現增加相關之病症。在某些實施例中，測試細胞獲自懷疑患有與Axl表現增加相關之病症之個體。在某些實施例中，病症為細胞增殖性病症，諸如癌症或腫瘤。

可使用本發明之抗體診斷之例示性病症包括骨髓性白血病、肺癌(例如非小細胞肺癌(NSCLC))、胃癌、乳癌、前列腺癌、腎細胞癌、胰臟癌及神經膠母細胞瘤。

可使用某些其他方法偵測抗體與Axl之結合。該等方法包括(但不限於)此項技術中熟知之抗原結合分析法，諸如西方墨點法、放射免疫分析法、ELISA(酶聯免疫吸附分析

法)、「夾心」免疫分析法、免疫沈澱分析法、螢光免疫分析法、蛋白A免疫分析法及免疫組織化學(IHC)。

在某些實施例中，抗體經標記。標記包括(但不限於)直接偵測之標記或部分(諸如螢光、發色團、電子密度、化學發光及放射性標記)，以及間接偵測之部分，例如經由酶促反應或分子間相互作用間接偵測之部分，諸如酵素或配位體。例示性標記包括(但不限於)放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 及 ^{131}I ；螢光團，諸如稀土螯合物或螢光素(fluorescein)及其衍生物；若丹明(rhodamine)及其衍生物；丹醯基(dansyl)；傘酮(umbelliferone)；螢光素酶，例如螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶(美國專利第4,737,456號)；螢火蟲發光素(luciferin)；2,3-二氫酞嗪二酮；辣根過氧化酶(HRP)；鹼性磷酸酶； β -半乳糖苷酶；葡糖澱粉酶；溶菌酶；醣氧化酶，例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶；雜環氧化酶，諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶，以及使用過氧化氫氧化染料前驅物之酵素(諸如HRP、乳酸過氧化酶或微過氧化酶)、生物素/抗生物素蛋白、自旋標記、噬菌體標記、穩定游離基團及其類似物。

在某些實施例中，將抗體固定於不溶性基質上。固定可能引起抗Axl抗體與溶液中保持游離之任何Axl分離。固定習知如下完成：在分析程序之前，降低抗Axl抗體溶解性；吸附至水不溶性基質或表面(Bennich等人，U.S. 3,720,760)；或共價偶合(例如使用戊二醛交聯)；或在抗

Axl抗體與Axl之間形成複合物之後，降低抗Axl抗體溶解性，例如藉由免疫沈澱法降低抗Axl抗體溶解性。

應瞭解，可使用本發明之免疫結合物代替抗Axl抗體或除抗Axl抗體之外亦使用本發明之免疫結合物來執行任何上述診斷或偵測實施例。

本發明亦提供測定對Axl拮抗劑治療之反應的方法，包含偵測圖6中所示之任一基因之表現(多肽，核酸)。在一些實施例中，用Axl拮抗劑(諸如抗Axl抗體)治療後，MYCN、HLX、GAS7、HDAC9、E2F1、CXCR4、PMCH及ANG-2中一或多者之表現增加。在一些實施例中，用Axl拮抗劑(諸如抗Axl抗體)治療後，IFI44L、GJA4、Axl、IFIT1、SCG5、CYTL1、DPP4及DKK3中一或多者之表現降低。在一些實施例中，增加及/或降低之表現為尚未經Axl拮抗劑治療之個體(或經Axl拮抗劑治療之前的個體)中的相對表現。

化學治療劑

本發明之組合療法可進一步包含一或多種化學治療劑。組合投藥包括使用各別調配物或單一醫藥調配物進行共投藥或同時投藥，及依任一次序之連續投藥，其中較佳存在兩種(或所有)活性劑同時發揮其生物活性的時間段。

化學治療劑(若投與)通常以其已知劑量投與，或由於藥物之組合作用或可歸因於投與抗代謝物化學治療劑之消極副作用而視情況降低。可根據製造商之說明書或如熟練從業者根據經驗所確定來使用該等化學治療劑之製劑及給藥

時程。

以上揭示可組合之各種化學治療劑。在一些實施例中，待組合之化學治療劑選自由以下組成之群：紫杉醇(包括多西他賽及太平洋紫杉醇)、長春花(諸如長春瑞賓或長春花鹼)、鉑化合物(諸如卡鉑或順鉑)、芳香酶抑制劑(諸如來曲唑、阿那曲唑或依西美坦)、抗雌激素(例如氟維司群或他莫昔芬)、依託泊苷、噻替派、環磷醯胺、甲胺喋呤、脂質阿黴素、聚乙二醇化脂質阿黴素、卡西他賓、吉西他濱、COX-2抑制劑(例如賽利克西)或蛋白酶體抑制劑(例如PS342)。在一些實施例中，化學治療劑為紫杉醇及鉑化合物(諸如卡鉑)。

調配物、劑量及投藥

本發明所用治療劑將以符合優良醫藥實務之方式調配、給予且投與。本文中所考慮之因素包括所治療之特定病症、所治療之特定個體、個別患者之臨床病狀、病症之病因、藥劑傳遞位點、投藥方法、投藥時程、待組合藥劑的藥物-藥物相互作用及醫學從業者已知之其他因素。

治療性調配物係使用此項技術中已知之標準方法，藉由混合具有所需純度之活性成分與可選的生理學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(Remington's Pharmaceutical Sciences (第20版)，A. Gennaro編，2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)來製備。可接受之載劑包括生理食鹽水或緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸；低分子量(小於約

10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖、二糖及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖醇，諸如甘露糖醇或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；及/或非離子界面活性劑，諸如TWEEN™、PLURONICS™或PEG。

調配物視情況但較佳含有醫藥學上可接受之鹽，較佳為氯化鈉且較佳處於約生理學濃度下。本發明之調配物可視情況含有醫藥學上可接受之防腐劑。在一些實施例中，防腐劑濃度範圍通常為0.1至2.0%(v/v)。適當防腐劑包括醫藥技術中已知者。苯甲醇、苯酚、間甲酚、對羥基苯甲酸甲酯及對羥基苯甲酸丙酯為較佳防腐劑。本發明之調配物可視情況包括濃度為0.005至0.02%之醫藥學上可接受之界面活性劑。

治療特定適應症需要時，本文中之調配物亦可含有一種以上活性化合物，較佳為具有不會對彼此產生不利影響之互補活性的活性化合物。該等分子宜以有效達成預期目的之量組合存在。

活性成分亦可截留於例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合所製備之微膠囊(例如分別為羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊)中、截留於膠狀藥物傳遞系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米顆粒及奈米囊劑)或截留於巨乳液中。該等技術揭示於Remington's

Pharmaceutical Sciences(同上)中。

可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適合實例包括含有抗體之半透性固體疏水性聚合物基質，該等基質呈成型物品之形式，例如薄膜或微膠囊。持續釋放基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如聚(甲基丙烯酸2-羥基乙酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸交酯(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與 γ 乙基-L-麩胺酸酯之共聚物、不可降解性乙烯-乙酸乙烯酯、可降解性乳酸-乙醇酸共聚物(諸如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物及乙酸亮丙瑞林構成的可注射微球體))及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。雖然諸如乙烯-乙酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸之聚合物釋放分子能夠逾100天，但某些水凝膠釋放蛋白質的時段更短。當囊封抗體長時間保留於體內時，由於在37°C下暴露於水分，其可變性或聚集，導致生物活性損失及可能之免疫原性變化。視所涉及之機制而定，可設計合理策略以達成穩定化。舉例而言，若發現聚集機制為經由硫基-二硫化物互換形成分子間S-S鍵，則可藉由修飾氫硫基殘基、由酸性溶液凍乾、控制水分含量、使用適當添加劑及開發特定聚合物基質組合物來實現穩定化。

本發明之治療劑係根據已知方法投與人類患者，諸如快速靜脈內投與或在一段時間連續輸注、肌肉內、腹膜內、腦脊髓內、皮下、關節內、滑膜內、鞘內、經口、局部或吸入路徑。在VEGF拮抗劑之情況下，若廣泛副作用或毒性與VEGF拮抗作用相關，則尤其需要局部投藥。治療性

應用亦可使用離體策略。離體策略涉及以編碼 Axl 及 / 或 VEGF 拮抗劑之聚核苷酸轉染或轉導自個體獲得之細胞。接著，使轉染或轉導細胞返回至個體。該等細胞可為多種類型中之任一種，包括(但不限於)造血細胞(例如骨髓細胞、巨噬細胞、單核細胞、樹突狀細胞、T 細胞或 B 細胞)、纖維母細胞、上皮細胞、內皮細胞、角質細胞或肌細胞。

舉例而言，若 Axl 及 / 或 VEGF 拮抗劑為抗體，則藉由包括非經腸、皮下、腹膜內、肺內及鼻內之任何適合方式投與該抗體，且若需要局部免疫抑制治療，則藉由病灶內方式投與。非經腸輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投藥。此外，抗體宜藉由脈衝輸注來投與，尤其遞減劑量之抗體。給藥較佳藉由注射進行，最佳靜脈內或皮下注射，此部分地視投藥為短期或長期而定。

在另一實例中，當病症或腫瘤位置允許時，可局部投與 Axl 及 / 或 VEGF 拮抗劑化合物，例如藉由直接注射局部投與，且可定期重複注射。Axl 及 / 或 VEGF 拮抗劑亦可全身性傳遞至個體或直接傳遞至腫瘤細胞，例如在外科切除腫瘤之後傳遞至腫瘤或腫瘤床，以防止或減少局部復發或轉移。

在抑制劑為抗體的情況下，所投抗體較佳為裸抗體。然而，所投抑制劑可與細胞毒性劑結合。所結合之抑制劑及 / 或與其結合之抗原較佳經細胞內化，從而增加免疫結合物殺死其所結合之標靶細胞之治療功效。在一較佳實施

例中，細胞毒性劑靶向或干擾癌細胞中之核酸。該等細胞毒性劑之實例包括類美登素、加里剎黴素、核糖核酸酶及DNA核酸內切酶。

本文中所列之任一治療劑之適當劑量為目前使用之劑量且可由治療醫師適當降低或提高。

治療劑組合通常在限定時間段(通常數分鐘、數小時、數天或數週，視所選組合而定)投與。組合療法意欲包含依序投與此等治療劑(亦即，其中在不同時間投與各治療劑)以及實質上同時投與此等治療劑或至少兩種治療劑。

治療劑可由相同途徑或不同途徑投與。舉例而言，可藉由靜脈內注射投與組合中之VEGF及/或Axl拮抗劑，而組合中之蛋白質激酶抑制劑可經口投與。或者，例如，視特定治療劑而定，可經口投與兩種治療劑或可藉由靜脈內注射投與兩種治療劑。視特定藥劑而定，亦可改變治療劑之投與次序。

本案涵蓋藉由基因療法來投與VEGF及/或Axl拮抗劑。關於使用基因療法產生細胞內抗體，參見例如1996年3月14日公開之WO96/07321。

應瞭解，可使用本發明之免疫結合物代替抗體或除抗體之外亦使用本發明之免疫結合物來執行任何上述治療方法。

D. 製品

在本發明之另一態樣中，提供一種含有適用於治療、預防及/或診斷上述病症之物質的製品。該製品包含容器及

位於該容器上或與該容器相關之標籤或藥品說明書。適合之容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可由諸如玻璃或塑膠之多種材料形成。容器可由諸如玻璃或塑膠之多種材料形成。容器容納單獨組合物或該組合物與有效治療、預防及/或診斷病狀之另一種組合物之組合，且可具有無菌接取口(例如容器可為具有可由皮下注射針刺穿之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)。組合物中至少一種活性劑為本發明之抗體或免疫結合物。標記或藥品說明書指示組合物用於治療所選病狀。此外，製品包含(a)其中含有組合物之第一容器，其中該組合物包含本發明之抗體或免疫結合物；及(b)其中含有組合物之第二容器，其中該組合物包含另一種細胞毒性劑或其他治療劑。本發明之此實施例中的製品可進一步包含藥品說明書，該藥品說明書指示組合物可用於治療特定病狀。或者或另外，製品可進一步包含含有醫藥學上可接受之緩衝液(諸如注射用之抑菌水(BWFI)、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液)的第二(或第三)容器。其可進一步包括就商業及使用者觀點而言所需之其他物質，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

實例

以下為本發明之方法及組合物之實例。應瞭解，鑒於上文提供之一般說明，可實施各種其他實施例。

A. 物質及方法

抗體。抗體獲自以下供應商：針對人類 Axl 之小鼠單株

抗體(mAb)(純系 6C8, Abnova, Taiwan), 磷酸化 Akt(Ser 473)小鼠 mAb 及 Akt 多株抗體(Cell Signaling), 針對人類 Gas6 之小鼠 mAb(R&D System)。用於磷酸化 Axl 之 ELISA 套組購自 R&D System。

細胞株及培養物。人類癌瘤細胞株來自 ATCC。初級人類臍靜脈內皮細胞(HUVEC)及肺動脈平滑肌細胞(PASMC)來自 Cambrex(Walkersville, MD)且根據供應商建議培養。

siRNA 轉染。Axl 及螢光素酶對照物(GL2)之 siRNA 購自 Dharmacon。基於先前公開之序列(Holland, 2005)之其他 Axl siRNA(Axl2 及 Axl4)係內部合成。siRNA 轉染時, 使用脂染胺(lipofectamine)RNAiMax(Invitrogen)以 50 pmol siRNA 轉染 3×10^5 個細胞/孔(6孔培養盤)HUVEC, 且轉染後 24 至 96 小時藉由 FACS 定量所阻斷之 Axl 基因表現。

產生可誘導性 AxlshRNA 細胞株。shRNA 載體(pHUSH-GW)包含 shRNA 表現穿梭質體及反轉錄病毒載體骨架, 該反轉錄病毒載體骨架含有 TetR-IRES-Puro 卡匣以使得 shRNA 表現能夠被四環素調節。使用脂染胺 2000 試劑(Invitrogen)轉染 293GP2 細胞。轉染後 48 小時, 收集傳染性上清液, 過濾且接著與所靶向之癌症細胞株一起培育 24 小時。將對嘌呤黴素處理具有抗性之細胞合併以產生表現 AxlshRNA 之穩定細胞株。

共培養。添加 HUVEC 前一天將 PASMC(2.4×10^5 個細胞/孔)接種於塗有膠原蛋白之 12 孔培養盤中。用 50 pmol siRNA 轉染早期繼代 HUVEC($p < 5$), 且在轉染後 24 小時,

以胰蛋白酶處理細胞且將 4×10^4 個細胞置放於單層PASMC上。共培養細胞3天且藉由結合FITC之抗CD31抗體染色來表徵。在ImageXpress^{MICRO}成像系統下觀察且拍攝血管。藉由MetaXpress軟體分析總管長度。

微陣列。用Axl或對照物siRNA轉染HUVEC。轉染後72小時，使用RNeasy Plus小型套組(Qiagen)提取RNA。在Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0陣列上、根據製造商方案執行HUVEC之mRNA表現分析。資料分析及探針設定如本文中所描述。

產生抗Axl單株抗體。Axl細胞外域在CHO細胞中表現且自CHO細胞純化。使用經純化AxlECD使小鼠免疫。針對抑制Baf3-Axl細胞之Gas6依賴性增殖之能力篩檢融合瘤上清液。所選抗體進行次選殖及純化。

異種移植實驗。所有研究皆根據「實驗動物之護理及使用準則(Guidance for the Care and Use of Laboratory Animals)」(NIH)進行且由機構性動物護理及使用委員會(Institutional Animal Care and Used Committee; IACUC)批准。本文中描述詳細方案。

正位轉移模型。依序用AxlshRNA及dsRedLuc感染乳癌細胞株MDA-MB-231以產生可表現Dox可誘導性AxlshRNA與螢光素酶報導基因的穩定細胞株。將 10^5 個細胞植入SCID小鼠之乳腺脂肪塊中。植入後次日，將小鼠分為Dox處理組及未處理組(每組n=5)。當原發性腫瘤尺寸達到 1000 mm^3 時，移除腫瘤。移除原發性腫瘤後5週，移除肺

用於生物發光成像。

生物發光成像。將 200 μ L 含 25 mg/mL D-螢光素 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 之 PBS 腹膜內注入小鼠且在成像期間使用異氟烷 (Henry Schein, Sparks, NV) 經由鼻錐麻醉小鼠。使用固定至不透光成像室之冷卻式加強電荷耦合裝置攝影機 (Stanford Photonics, Palo Alto, CA) 獲得生物發光影像。影像獲取時間通常小於 5 分鐘，且藉由將參考影像與生物發光資料影像共寄存來處理。離體成像時，獲取肺，在 PBS 中沖洗且浸泡於 100 μ l 25 mg/mL D-螢光素鈉鹽中。

實例 1. Axl 頻繁過度表現於癌細胞株中

使用微陣列分析法篩檢一大批代表多種腫瘤類型之癌細胞株用於 Axl mRNA 表現。Axl 展現自僅可偵測之量至極高量之廣泛表現，甚至在相同組織類型中 (圖 1A)。Axl 過度表現於多種癌細胞株中，其中多形性神經膠母細胞瘤 (GBM) 及胰臟癌中頻率最高。使用免疫墨點法測定所選癌細胞株中 Axl 蛋白含量。Axl 高度表現於所有經測試之癌細胞株中，包括 GBM、前列腺癌、胰臟癌、結腸癌、NSCLC 及乳癌 (SH-SY5Y (一種已知不表現 Axl 之神經母細胞瘤細胞株) 用作陰性對照) (圖 1B)。此外，配位體 Gas6 共同表現於此等癌細胞株中 (圖 1B)。為測定 Axl 是否經組成性活化，藉由 ELISA 量測磷酸化 Axl 之含量。所有經測試之癌細胞株均具有可偵測之磷酸化 Axl 含量 (圖 1C)。用外源添加之 Gas6 處理細胞可顯著誘導 A172、Calu1 及 H1299 細胞中之

進一步Axl磷酸化，但不能誘導其他細胞株中之進一步Axl磷酸化。此等結果表明Axl在腫瘤細胞株中在不同程度上被組成性活化(可能經由內源Gas6之自分泌作用)。

實例2. 阻斷癌細胞株中之Axl基因表現可降低細胞存活率且減弱其遷移

為檢查Axl表現在腫瘤生長、遷移及轉移中之功能性意義，建立其中Axl表現可藉由多西環素(doxycycline)可誘導性AxlshRNA阻斷的穩定細胞株。首先測試六種Axl siRNA序列抑制人類臍靜脈內皮細胞(HUVEC)中Axl表現之能力。所有六種Axl特異性siRNA皆使Axl蛋白含量降低超過90%，如轉染後48小時FACS所量測(圖10A及圖10B)，而對照物siRNA對Axl蛋白質無影響。接著，使用以一種Axl siRNA(Axl-4)為基礎之短髮夾RNA(shRNA)產生可誘導性阻斷Axl基因表現之穩定細胞株。此等細胞株作為細胞池產生以防止純系變異。

用Dox處理穩定表現AxlshRNA之癌細胞株72小時使得Axl蛋白質表現幾乎被完全抑制(圖2A)。阻斷Axl基因表現伴隨下游信號傳導事件之抑制。儘管Gas6在未經Dox處理之親本H1299及H1299AxlshRNA細胞中誘導Akt磷酸化，但Gas6誘導之Akt磷酸化在阻斷Axl基因表現之細胞中完全中止，與經可溶性受體AxlFc處理之細胞類似(圖2B)。

為測試阻斷Axl基因表現對活體外癌細胞之作用，執行細胞增殖及遷移分析法。Dox誘導阻斷Axl基因表現可降低A549(50%)及MDA-MB-231(33%)之細胞存活率(圖2C)。儘

管在 Gas6 不存在下阻斷 H1299 細胞中之 Axl 基因表現不影響細胞存活率，但其使 Gas6 介導之培養於低血清中之細胞之存活率停止增加 (圖 2C)。阻斷 Axl 基因表現可顯著減弱 MDA-MB-231 (40%) 及 A549 (48%) 細胞 (圖 2D) 之遷移。此等結果表明，視細胞情形而定，Gas6-Axl 信號傳導在不同程度上促進癌細胞生長及遷移。

實例 3. 阻斷 Axl 基因表現可降低異種移植模型中之腫瘤生長

為評估活體內癌細胞生長是否需要 Axl 表現，測試阻斷 Axl 基因表現對小鼠中之 NSCLC A549 及 H1299 及乳癌 MDA-MB-231 異種移植物之生長的影響。將穩定表現 AxlshRNA 之細胞分別皮下植入裸小鼠 (A549 及 H1299) 或 SCID 小鼠 (MDA-MB-231) 中。對於 A549 及 H1299 模型，植入後將小鼠隨機分為處理組及對照組且分別投與含多西環素 (Dox) 或蔗糖之飲用水。與未處理小鼠相比，Dox 誘導之 Axl 沉默引起 A549 腫瘤生長能力之顯著減弱 (圖 3A)。Dox 誘導之阻斷 H1299 細胞中之 Axl 基因表現引起裸小鼠中腫瘤生長之中度 (25%) 抑制 (圖 3B)。對於 MDA-MB-231 模型，讓異種移植腫瘤生長至 200 mm³ 之平均尺寸；接著將小鼠隨機分為未處理組或 Dox 處理組。阻斷 Axl 基因表現顯著降低所建立之 MDA-MB-231 腫瘤之生長 (33% 抑制) (圖 3C)。在所建立之 A549 腫瘤模型中獲得類似結果 (資料未圖示)。研究結束時，藉由西方墨點法分析腫瘤溶解產物來檢驗 Axl 基因表現之有效阻斷 (圖 3)。此等結果表明 Axl 信號傳導有助於

A549、H1299及MDA-MB-231腫瘤異種移植植物之活體內生長。

實例 4. 阻斷Axl基因表現可抑制MDA-MB-231乳癌細胞轉移至肺

已證明Axl促進活體外癌細胞之遷移及侵襲性(圖2D, Zhang等人, 2008; Tai等人, 2008); 然而, 仍需確定Axl在癌症轉移中之作用。利用正位模型及藉由生物發光成像監視腫瘤轉移來解決此問題。產生表現Dox可誘導性AxlshRNA與螢光素酶報導基因之穩定MDA-MB-231細胞株。如活體外螢光素酶分析法所測定, 此細胞株顯示高生物發光度(資料未圖示)。

圖4A概述針對此項研究之實驗設計。首先提問Axl表現對乳癌細胞擴散至遠端器官位點是否有影響。細胞植入後次日開始多西環素處理。植入後2週, 良好建立原發性腫瘤。當原發性腫瘤達到1000 mm³之尺寸時將其移除, 且移除原發性腫瘤後監視肺轉移5週。移除原發性腫瘤後5週, 在對照組5隻小鼠中的3隻小鼠肺中偵測到大規模轉移性病灶, 而經Dox處理之動物(n=5)中無肺轉移跡象(圖4B, 第1組)。肺中腫瘤病灶之存在係藉由H&E染色(圖4C)及藉由可確定性地標記人類腫瘤細胞的c-Met(已知表現於MDA-MB-231細胞中之蛋白質)IHC(未圖示)確認。此等結果表明Axl促進乳癌細胞轉移至肺。接著提問一旦癌細胞定殖於肺中後, 轉移性生長是否需要Axl表現。為解決此問題, 讓原發性腫瘤尺寸達到1000 mm³, 移除原發性腫瘤, 接著開始

用Dox處理。移除原發性腫瘤後監視小鼠5週。經對照物處理之小鼠與經Dox處理之小鼠均具有轉移性病灶(每組5隻小鼠中的3隻小鼠)(圖4B, 第2組)。此等結果表明一旦癌細胞自身在肺中建立後, Axl對轉移性病灶生長並非關鍵。

實例5. 阻斷HUVEC中之Axl基因表現可減少內皮小管形成

先前研究已表明, Axl不僅過度表現於腫瘤中, 而且過度表現於周圍血管細胞中(Hutterer等人)。為進一步評估Axl在調節血管生成中之潛在作用, 測試阻斷Axl基因表現對內皮小管形成之影響。FACS分析證明Axl表現於HUVEC表面上(圖5A)。轉染後48小時, 在經Axl特異性siRNA轉染之HUVEC中, Axl蛋白含量下調超過90%, 而對照物螢光素酶siRNA(GL2)無影響(圖5A)。阻斷HUVEC中之Axl基因表現對細胞生長無顯著影響(圖10C)。

接著使用初級HUVEC/PASMC(肺動脈平滑肌細胞)共培養分支小管形成分析法評估Axl在血管生成中之重要性。與經對照物siRNA轉染之細胞相比, 經Axl siRNA轉染之HUVEC中依據小管長度定量之管形成減少約40%(圖5B)。此等結果表明Axl涉及內皮小管形態形成之調節。

實例6. Axl調節血管生成因子Dickkopf同系物3(DKK3)及促血管生成素-2(Ang-2)之表現

為瞭解Axl調節血管生成所涉及的機制, 對經Axl或對照物siRNA轉染之HUVEC執行基因分析。圖6A列舉阻斷Axl基因表現後HUVEC中上調或下調幅度最大的八種基因。

其中兩種基因 Ang-2 及 DKK3 為已知的血管生成調節劑。藉由對 DKK3 及 Ang-2 執行定量 RT-PCR 來確認微陣列結果。此外，如 ELISA 所量測，阻斷 Axl 基因表現後，HUVEC 溶解產物及培養基中 DKK3 及 Ang-2 蛋白質之含量亦變化(圖 11)。

為瞭解 Axl 與 DKK3 或 Ang-2 之間的關係，測試阻斷 DKK3 及 Ang-2 siRNA 基因表現對 Axl 表現之影響。阻斷 DKK3 及 Ang-2 基因表現均不影響 Axl 蛋白含量(圖 11)。此外，阻斷 DKK3 基因表現對 Ang-2 無影響，阻斷 Ang-2 基因表現亦不影響 DKK3 表現(圖 11)。接著測試 DKK3 及 Ang-2 siRNA 對內皮小管形成之作用。藉由 RNAi 阻斷 DKK3 基因表現可使小管形成減少至與阻斷 Axl 基因表現類似之程度，而單獨 Ang-2 siRNA 對小管形成無顯著作用(圖 6C)。此等結果表明 DKK3 及 Ang-2 為 Axl 之下游標靶且可藉由不同信號傳導路徑調節其表現。

實例 7. 阻斷 Axl 基因表現與抗 VEGF 具有相加效應

因為 VEGF 為調節內皮細胞功能之主要因子，所以在小管形成分析法中測試阻斷 Axl 基因表現與抗 VEGF 單株抗體一起之作用。用單獨抗 VEGF 處理細胞引起劑量依賴性小管形成減少(未圖示)，阻斷 Axl 基因表現與抗 VEGF 一起可增強對小管形成之抑制(圖 7)，阻斷 DKK3 基因表現亦具有類似結果(圖 7)。此等結果表明，下調 Axl 表現與抗 VEGF 具有抑制小管形成的相加效應。

實例 8. 產生阻斷 Axl 功能之單株抗體

使用RNAi之驗證資料表明Axl涉及腫瘤生長、轉移以及血管生成之調節。因此著手開發針對Axl之單株抗體。開發的基於細胞之分析法係直接測試Axl mAb阻斷Axl/Gas6介導之細胞生長之能力。產生過度表現Axl之Baf3前B細胞的穩定細胞株(圖12A)。Baf3細胞中Axl之表現引起Gas6依賴性生長(圖12B)，其可由AxlFc以劑量依賴性方式抑制(圖12C)。用人類AxlECD使小鼠免疫，且使用此分析法篩檢一組融合瘤上清液。鑑別四種抗體阻斷Gas6誘導之Baf3Axl細胞生長(圖12D)。經純化之抗體對Baf3Axl細胞生長顯示劑量依賴性抑制，最強阻斷劑12A11展現約100 ng/ml之IC₅₀(圖8A)。

為瞭解此等mAb抑制Axl之機制，進一步表徵此等抗體。在固相ELISA中，Axl mAb 3G9及8B5阻斷配位體與受體結合，而12A11及4F8對配位體結合無影響(圖8B1)。藉由使用FACS測定Axl mAb阻斷Gas6與A549細胞之細胞表面Axl結合之能力來確認此結果(圖8B2)。Axl mAb 12A11、8B5及3G9下調A549細胞中之受體表現，而4F8無影響(圖8C)。4F8為西方墨點法偵測Axl之唯一抗體，表明其識別線性抗原決定基(資料未圖示)。此外，12A11及3G9抑制H1299細胞中經Gas6誘導之Axl磷酸化(圖8C)。

此等單株抗體不與鼠類Axl交叉反應(圖13A)，其亦不與相關受體Tyro3及Mer交叉反應(圖13B)。在交叉阻斷分析法中，Axl mAb彼此不競爭(資料未圖示)，表明其結合不同抗原決定基。為定位mAb之結合抗原決定基，活體外轉

錄及轉譯 Axl ECD之不同部分(圖 8D)且接著用作 ELISA 中之抗原。3G9及8B5之抗原決定基似乎位於第一Ig域內，與其阻斷配位體與受體結合之能力一致，而12A11及4F8之抗原決定基定位於第一纖維結合蛋白域中(圖 8D)。

實例 9. Axl mAb 抑制 A549 NSCLC 異種移植腫瘤生長

為評估 mAb 抑制 Axl 是否影響活體內腫瘤細胞生長，將 A549 細胞皮下植入裸小鼠中。當腫瘤尺寸達到 100 mm³ 時(圖 9A 中第 0 天)，將動物隨機分組且用 30 mg/kg Axl mAb 或對照抗體處理，每週 2 次。與對照物相比，Axl mAb 顯著減弱 A549 腫瘤生長，給藥後第 40 天抑制約 40%(圖 9A)。為研究 Axl mAb 抑制腫瘤生長之機制，執行藥效學研究。投與抗體後 0、24、48 及 72 小時後切除腫瘤且產生腫瘤溶解產物。西方墨點法分析表明，給藥後 24 小時 Axl mAb 下調腫瘤中 Axl 表現，此下調持續 72 小時(圖 9B)。對腫瘤樣品之 Ki67 及卡斯蛋白酶 3 染色表明，給藥後 72 小時，Axl mAb 12A11 引起 Ki67 染色減少 20%(圖 9C)及卡斯蛋白酶 3 染色增加約 50%(未圖示)。此等結果表明 Axl mAb 藉由下調受體表現來減弱 A549 異種移植生長，從而又引起腫瘤細胞之細胞凋亡增強及細胞增殖減少。此等結果與阻斷 A549 細胞中之 Axl 基因表現一致，證明 Axl 在調節此 NSCLC 細胞株之腫瘤生長中起重要作用。

討論

此研究中已研究 Axl 在腫瘤形成(包括腫瘤生長、轉移以及血管生成)中之多種作用。已使用可誘導性 shRNA 抑制

人類癌細胞株中之Axl表現且證明Axl表現促進NSCLC及乳癌模型中之腫瘤生長。分別使用Axl顯性負性突變體或shRNA之先前研究表明，Axl表現促進神經膠母細胞瘤(Vajkoczy等人，2006)及乳癌(Holland等人，2005)異種移植模型中之腫瘤生長。然而，此等研究均在對照細胞株與其中在植入小鼠前Axl或其信號傳導經下調之細胞株之間進行腫瘤生長速率比較。儘管此方法適用，但其無法評估Axl抑制對腫瘤生長之直接影響。本發明方法係利用AxlshRNA之可誘導表現且在Axl表現存在或不存在下量測相同細胞株之生長。本發明結果表明Axl表現對腫瘤生長之影響視所用細胞模型而定。儘管阻斷A549 NSCLC中之Axl基因表現幾乎完全抑制腫瘤生長，但阻斷Axl基因表現對H1299 NSCLC及MDA-MB-231之影響為中度的(約30%生長抑制)。A549細胞對阻斷Axl基因表現之敏感度較高可能歸因於此等細胞中存在增加之Axl基因複本數目(未公開結果)。

轉移在所有癌症死亡中佔約90%；且在涉及癌形成的所有過程中，局部侵襲及轉移形成在臨床上最相關。最新實驗進展已鑑別多種分子路徑及細胞機制可解釋轉移之多階段過程。此等階段包括腫瘤侵襲、腫瘤細胞經由血液或淋巴系統擴散、定殖於遠端器官中及轉移之過度生長(Christofori, 2006)。Axl表現與多種癌症中之侵襲及轉移相關，包括乳癌(Meris等人，2002；Zhang等人，2008)、肺癌(Shieh等人，2005)及胃癌(Sainaghi等人，2005)以及

神經膠母細胞瘤(Hutterer等人, 2008)。已活體外證明Axl涉及促進癌細胞遷移及侵襲(Zhang等人, 2008; Tai等人, 2008; Vajkoczy等人, 2006)。在乳癌模型中, Axl之異位表現足以向弱侵襲性MCF7細胞賦予高侵襲性表型。相反, 藉由阻斷shRNA基因表現或抗Axl抗體抑制Axl信號傳導可減少高侵襲性乳癌細胞之遷移及侵襲。儘管此等研究確定活體外Axl促進細胞遷移及侵襲之作用, 但尚未說明Axl表現是否引起轉移。此研究中已使用正位乳癌模型研究Axl在轉移中之功能性意義。本發明結果表明MDA-MB-231細胞需要Axl表現以在肺中建立轉移性病灶, 因為shRNA阻斷Axl基因表現可完全中止來自原發性腫瘤之細胞定殖於肺中之能力。然而, 一旦轉移性病灶建立於肺中, Axl似乎對轉移之過度生長不具有顯著影響。此結果表明Axl與MDA-MB-231癌細胞轉移之早期有關, 且提供Axl與轉移直接有關的第一活體內證據。

Gas6/Axl信號傳導因調節血管平滑肌細胞及內皮細胞之存活及遷移而在血管生物學中起重要作用(Melaragno等人, 1999)。Gas6/Axl在損傷動脈中之表現受到上調且Gas6經由PI3K/Akt之活化誘導A類清除性受體, 引起泡沫細胞形成, 此為動脈粥樣硬化之重要步驟(Cao等人, 2001)。活化Axl信號傳導可介導內皮細胞之層流剪切應力之抗細胞凋亡效應, 可能經由其與 $\alpha v \beta 3$ 整合素複合物之結合介導此效應(D'Arcangelo等人, 2006)。Axl與Gas6共同表現於神經膠質瘤中與腫瘤相關之血管細胞中(Hutterer等

人，2008)。在原生人類乳癌樣品中，發現腫瘤受質細胞中之強Axl染色(未公開觀測結果)。因此，Axl不僅可在腫瘤細胞中影響腫瘤形成，而且調節腫瘤受質功能，諸如血管生成。此研究中，執行實驗以瞭解涉及Axl調節內皮細胞功能之機制。本發明資料表明內皮細胞增殖不需要Axl表現，因為RNAi阻斷Axl基因表現對此等細胞之生長具有極小影響。然而，抑制Axl表現可減少內皮小管形成。

為瞭解有關機制，分析mRNA表現以鑑別可受Axl表現調節之基因。阻斷Axl基因表現引起DKK3之下調及Ang-2之上調，DKK3及Ang-2已知為涉及血管生成的兩種因子。DKK3為Wnt信號傳導之Dickkopf分泌性調節劑家族的一員(Krupnik等人，1999)，且強表現於小鼠及雞之正發育心臟及血管中(Monaghan等人，1999)。最新研究證明DKK3蛋白質表現於高度血管化贅瘤之血管中，包括GBM、高級非霍奇金氏淋巴瘤、黑色素瘤及結腸直腸癌(Monaghan等人，1999)。B16F10細胞中鼠類DKK3之穩定過度表現可顯著增加C57/BL6黑色素瘤模型中之微血管密度。此外，對初級內皮群落形成細胞之活體外研究表明，siRNA阻斷DKK3基因表現並不顯著影響細胞增殖，而是減少基質膠(matrigel)中之小管形成(Untergasser等人，2008)。此等結果與阻斷Axl或DKK3基因表現後在HUVEC中之發現類似。阻斷HUVEC中之Axl基因表現引起Ang-2之上調。促血管生成素信號傳導系統在調節血管生成、血管恆定及血管退化中起重要作用(Yancopoulos等人，2000)。此信號傳

導系統係由促血管生成素1及促血管生成素2及其受體Tie2組成(Dumonut等人, 1994)。Ang-1為經由PI3K/Akt信號傳導路徑(Peters等人, 2004)促進EC存活及內皮完整(Suri等人, 1998)之促效劑。另一方面, Ang-2(Maisonpierre等人, 1997)為抑制Ang-1之作用以促進血管失去穩定的信號傳導拮抗劑。在VEGF存在下, Ang-2提供重要的血管生成刺激物(Yancopoulos等人, 2000)。然而, 當VEGF信號傳導受抑制或缺乏時, Ang-2對血管之促失穩作用引起細胞死亡及毛細血管退化(Yancopoulos等人, 2000)。本發明結果證明, 阻斷Axl基因表現與抗VEGF具有抑制內皮小管形成的相加效應。當Axl表現受抑制時, 可經由Ang-2之上調來介導此相加效應。總而言之, 本發明結果提出藉由Axl調節內皮細胞功能的以下模型。EC中Axl之表現引起促血管生成因子DKK3之上調及Ang-2之下調, 從而又促進Ang-1/Tie2之信號傳導且引起血管生成增加。

Axl在腫瘤形成中所起的多種作用使得其成為受關注之癌症治療標靶。抗Axl抗體為可用於研究Axl在腫瘤形成中之作用的特定試劑且提供抑制患者中Axl依賴性信號傳導之治療可能。拮抗性mAb可由多種機制實現其功能: (1)阻斷配位體與受體結合, (2)促進受體降解, (3)阻斷受體二聚, 或(4)介導ADCC。因為許多腫瘤可展現配位體非依賴性活化Axl, 所以重要的是開發且比較經由不同作用模式起作用之mAb且基於功效選擇主導mAb。此研究中已表徵一組針對Axl之融合瘤抗體。已針對阻斷Axl生物功能之單

株抗體開發出基於細胞之篩檢。本文中所表徵之mAb包括兩種阻斷配位體與受體結合之mAb(3G9及8B5)，以及一種不干擾配位體結合但抑制受體磷酸化之mAb(12A11)。所有3種mAb皆誘導受體表現之下調。最重要的是，此等mAb減弱A549 NSCLC腫瘤生長。此等結果不僅證實Axl在促進腫瘤生長中之作用(如shRNA研究所表明)，而且表明單株抗體可提供治療過度表現Axl之癌症的有效策略。因為此等mAb不與鼠類Axl交叉反應，所以無法評估Axl對於活體內腫瘤血管生成之重要性及其對腫瘤基質之影響。目前已開發出交叉反應性mAb以研究活體內Axl之此等潛在功能。

總而言之，本發明已驗證Axl在促進腫瘤生長中之作用且提供乳癌細胞轉移至肺需要Axl表現之第一證據。本發明已證明Axl經由促血管生成素及DKK3信號傳導系統起作用來增強內皮小管形成。本發明資料表明針對Axl之治療性抗體不僅可在腫瘤本身中、而且可在周圍基質中阻斷Axl功能。Axl抑制與抗VEGF之相加效應表明阻斷Axl功能可增強抗血管生成療法。

實例 10

物質及方法

抗體及細胞株。抗體獲自以下供應商：針對人類Axl之小鼠單株抗體(mAb)(Abnova, Taiwan)，磷酸化Akt小鼠mAb及Akt多株抗體(Cell Signaling)。用於磷酸化Axl之小鼠重組Gas6及ELISA套組購自R&D System。人類癌瘤細胞

株獲自 ATCC 且在補充有 10% FBS 之 PRMI1640 培養基中培養。融合瘤抗人類 Axl 單株抗體 12A11 及 3G9 係由 Genentech 提供(參見 Li(2009))。

產生噬菌體抗 Axl 單株抗體。為產生抗體，淘選使用人類噬菌體抗體文庫，其在所選互補決定區(H1、H2、H3)中具有模擬人類 IgG 譜系之天然多樣性的合成多樣性。Fab 片段二價呈現於 M13 噬菌體顆粒表面上。針對人類及鼠類 Axl ECD 多輪淘選噬菌體抗體文庫。與人類 Axl ECD-His 及鼠類 Axl ECD-Fc 融合蛋白結合之噬菌體抗體係藉由 ELISA 及 DNA 定序鑑別，且重組抗體純系以表現全長 IgG(Liang 等人，2007)。個別純系短暫表現於哺乳動物細胞中且以蛋白 A 管柱純化(Carter, 1992)。

篩檢噬菌體純系抑制 Baf3-Axl 細胞之 Gas6 依賴性增殖之能力。選擇在抑制 Baf3 Axl 細胞增殖中展現最高效能的兩個純系用於親和力成熟。

對於親和力成熟，在 M13 噬菌體表面上呈現單價 Fab 之嗜菌質體(Liang 等人，2007)充當用於接枝噬菌體 Ab 之輕鏈(V_L)可變域及重鏈(V_H)可變域之文庫模板。親和力成熟係採用軟隨機化策略，如(Liang 等人，2007)所述，且使用高產量單點競爭性噬菌體 ELISA 快速篩檢高親和力純系，如(Sidhu 等人，2004)所述。

量測抗 Axl 抗體之親和力。測定抗 Axl 抗體之結合親和力時，使用由 BIAcore™-3000 儀器量測表面電漿子共振(SRP)。為量測抗 Axl 抗體與人類 Axl ECD-His 蛋白之間的

親和力，藉由可達成約250個反應單位(RU)之塗有小鼠抗人類IgG的CM5生物感測晶片捕捉抗Axl人類IgG。動力學量測時，在25°C下以30 μ l/min之流速注射人類Axl ECD-His於PBT緩衝液(含有0.05% Tween 20之PBS)中之兩倍連續稀釋液(440 nM-28 nM)。使用簡單的一對一朗繆爾結合模型(BIAcore評估軟體3.2版)計算結合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。平衡解離常數(K_D)依據 k_{off}/k_{on} 比率計算。為量測抗Axl抗體對鼠類Axl ECD-Fc融合蛋白之親和力，藉由可達成約150個反應單位(RU)之塗有小鼠抗人類IgG的CM5生物感測晶片捕捉鼠類Axl ECD人類IgG融合蛋白。動力學量測時，在25°C下以30 ml/min之流速注射抗Axl Fab片段於PBST緩衝液(含有0.05% Tween 20之PBS)中之兩倍連續稀釋液(200 nM-12 nM)。

細胞增殖分析法。細胞以5000個細胞/孔接種於96孔培養盤中且用多種濃度之Axl mAb處理72小時。使用CellTiter-Glo發光細胞存活率分析法(Promega)、根據製造商說明書量測細胞增殖。

ELISA及螢光活化細胞分選(FACS)。ELISA分析法執行如下：用0.5% BSA、PBS、0.05% Tween 20(PBST)阻斷塗有山羊抗人類IgG Fc之培養盤。對於交叉反應分析法，在室溫下將所塗培養盤與人類Axl.Fc、小鼠Axl.Fc或人類Mer.Fc、Tyro-3.Fc一起培育1小時，在PBST中洗滌4次，與抗Axl mAb及結合HRP之抗小鼠Ig一起培育。對於結合分析法，在室溫下將所塗培養盤與人類Axl.Fc一起培育1

小時，在PBST中洗滌4次，在室溫下與rmGas 6及抗Axl mAb一起培育1小時。培養盤在PBST中洗滌4次，與結合生物素之抗mGas6及抗生物蛋白鏈菌素-HRP一起培育。根據製造商說明書、使用R&D ELISA套組量測所分泌之Ang-2及DKK3。使用標準技術藉由FACS測定細胞表面上之Axl表現。簡言之，收集細胞，在冰上用抗Axl mAb(12A11，10 ug/ml)染色30分鐘，在PBS中洗滌2次且接著用結合PE之第二抗體染色。為測定抗體對Gas6與細胞表面上之Axl結合的阻斷作用，收集細胞，用抗Axl mAb染色30分鐘且在冰上與rmGas6一起培育30分鐘。在PBS中洗滌2次且用結合生物素之抗Gas6及結合PE之抗生物蛋白鏈菌素染色。樣品在BD FACScalibur流式細胞儀上分析。

異種移植實驗。所有研究皆根據「實驗動物之護理及使用準則」(NIH)進行且由機構性動物護理及使用委員會(IACUC)批准。將基質膠中總共 5×10^6 (A549)或 10^7 個細胞(MDA-MB-231)分別皮下植入裸小鼠(A549)或SCID小鼠(MDA-MB-231)之右側腹中。當平均腫瘤尺寸達到 100 mm^3 時，將小鼠隨機分為不同處理組(每組 $n=10$)。經由腹膜內注射(IP)以10-30 mg/kg投與抗Axl或對照IgG1抗體，以1-2 mg/kg投與抗VEGF，每週2次。每天經口管飼100 mg/kg埃羅替尼。處理開始時，分別地，每天皮下投與6.25 mg/kg太平洋紫杉醇歷時5天，及皮下投與100 mg/kg單一劑量之卡鉑。使用雙因子變異數分析(Anova two-way)執行統計分析以比較不同處理組之腫瘤生長。

對於藥效學(PD)研究，用抗體處理小鼠0、24、72及168小時。在各時間點切除腫瘤，處理以用於免疫組織化學染色及影像分析，且用於產生細胞溶解產物以用於西方墨點分析。

對於轉移研究，經由尾靜脈注射將經螢光素酶報導基因穩定轉染之 5×10^5 個MDA-MB-231(Li等人，2009)植入SCID小鼠中。藉由生物發光偵測法監視腫瘤細胞向各器官之轉移，如(Li等人，2009)所述。

免疫組織化學。將異種移植腫瘤樣品固定於10%中性緩衝福馬林(formalin)中，處理，包埋於石蠟中且以4 μ m切片。薄切片接著用針對Ki67、分裂卡斯蛋白酶3及MECA32之一次抗體處理，接著用結合生物素之二次抗體及DAB色素原處理。

自Cureline Inc.獲得原發性人類乳癌組織微陣列，包括乳腺管及轉移性腺癌。使用先前描述之抗Axl單株抗體(Li等人，2009)執行Axl IHC，且使用CD68染色巨噬細胞。對於雙重Axl/CD68 IHC，首先使用Vector ABC Elite HRP試劑及DAB受質以2 μ g/ml執行Axl染色。亦使用ABC Elite-HRP試劑、但改用Vector SG色素原(藍色/灰色)以0.5 μ g/ml依序執行CD68染色。在兩種複合物之間執行第二標靶抗原修復步驟以溶離第一複合物，從而避免兩種標記物之交叉反應性。

血管密度量測及資料分析。腫瘤樣品用MECA32(一種泛內皮細胞標記物)染色。藉由Ariol SL-50自動化載片掃描

平台 (Genetix Ltd.; Hampshire, UK) 獲得 100 倍最終放大率影像。腫瘤特定區域作為個別 8 位元影像輸出以供 Metamorph 套裝軟體 (MDS Analytical Technologies, Ontario, Canada) 分析。使用藍色正規化演算法、經由蘇木精對比染色分離棕色 DAB 特異性染色，如 (Brey 等人，2003) 所述。分段演算法鑑別血管且基於尺寸及形狀移除雜訊。細胞係基於蘇木精染色之尺寸、形狀及密度鑑別為腫瘤或非腫瘤。非腫瘤區域係依據非腫瘤細胞密度與腫瘤細胞密度之對比加以鑑別。完成分析後，人工再檢視影像以移除錯誤鑑別為血管或腫瘤區域之假影。記錄個別血管以及各影像中腫瘤及非腫瘤區域的面積量測。使用 JMP 8.0 軟體 (SAS Institute, Inc., North Carolina, USA) 分析基於影像分析之原始數值。執行學生 t 檢驗以比較各對平均值，其中 $p < 0.05$ 。

分離腫瘤相關巨噬細胞 (TAM) 及偵測所分泌之細胞激素。切開腫瘤，斬為小塊及在含 2.5% FBS、0.2 單位/毫升 Liberase Blendzymes II 及 5 單位/毫升 DNase I 之 RPMI 1640 培養基 (Roche) 中培育。使用 MACS 解離器 (Miltenyi Biotec) 解離腫瘤細胞且在室溫下保持 20 分鐘。添加 EDTA (最終濃度 0.002%) 以終止反應。製備單細胞懸浮液且使用 RBC 溶解緩衝液 (eBioscience) 移除紅血球。以 10^7 個細胞/毫升將細胞再懸浮於含有 1% FBS 之 PBS 中且與 20 $\mu\text{g/ml}$ FcR II、FcR III 及 FcR IV 一起培育 20 分鐘。添加抗 F4/80-PE (eBioscience) 及抗 CD11c-APC (BD Pharmingen) ($0.2 \mu\text{g}/10^6$

個細胞)且在冰上培育30分鐘。藉由FACS Aria(BD Biosciences)分選F4/80及CD11c陽性細胞。將總共 2×10^5 個F4/80及CD11c陽性細胞接種於96孔培養盤中且培養隔夜。收集培養基且使用Bio-Plex小鼠細胞激素分析法(Bio-Rad)、根據製造商說明書測定細胞激素及趨化因子之含量。

抗原決定基定位

藉由標準分子生物學技術製備Axl-2(PRK HuAxl(1-134Aa)/HuIgG1Fc)、Axl-3(PRK HuAxl(1-221Aa)/HuIgG1Fc)、Axl-4(PRK HuAxl(1-324Aa)/HuIgG1Fc)及Axl-5(PRK HuAxl(1-435Aa)/HuIgG1Fc)質體構築體。藉由直接定序及/或限制消化確認所有質體。使用Promega L2080 TNT SP6快速轉錄/轉譯系統套組活體外轉錄及轉譯編碼Axl細胞外域之多個部分(aa1-134、aa1-221、aa1-324、aa1-435)的質體且用作ELISA中之抗原。用於此等實驗之Axl部分包括：

人類Axl(包含Axl之Ig1)之胺基酸1-134：

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPF
VGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPEVHWLRDQGILE
LADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQRLRITSLQLSDTGQYQC
LVFLGHQTFVSQPGYVG (SEQ ID NO:18)，及

人類Axl(包含Axl纖維結合蛋白域)之胺基酸221-324：

ITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTL
QAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHP
HTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWL (SEQ ID NO:19)。

抗體競爭實驗

為測定噬菌體抗Axl mAb YW327.6或YW327.42是否與融合瘤抗Axl mAb 12A11及3G9競爭，A549細胞用抗Axl噬菌體抗體(各為50 ug/ml)及融合瘤抗Axl抗體(各為10 ug/ml)共染色30分鐘。細胞在PBS中洗滌2次且用抗小鼠Ig-PE染色。如上針對FACS分析所述，樣品在BD FACScalibur流式細胞儀(BD Biosciences)上分析。

結果

產生阻斷Axl功能之噬菌體源單株抗體。為鑑別與鼠類Axl及人類Axl交叉反應之抗體，使用在所選互補決定區中具有模擬人類IgG之天然多樣性之合成多樣性的噬菌體呈現抗體文庫(Lee等人，2004)。藉由ELISA及DNA定序鑑別與人類Axl ECD及鼠類Axl ECD均結合之噬菌體抗體，且重組抗體純系以表現全長IgG(Liang等人，2007)。接著針對抑制Baf3Axl細胞之Gas6依賴性生長之能力篩檢一組全長IgG(Li等人，2009)，對純系YW327.6之一進行親和力成熟及純化。

親和力成熟之Axl mAb YW327.6S2以高親和力結合人類Axl與鼠類Axl，Kd分別為約1 nM及545 pM(圖14A)。特定而言，Ka為 1.7×10^5 ，kd為 1.7×10^4 且KD為 9.9×10^{-10} 。此抗體亦結合獼猴Axl，但其不與相關受體Tyro3及Mer交叉反應(圖14B)。如無細胞ELISA與細胞表面FACS所證明，YW327.6S2以劑量依賴性方式阻斷配位體Gas6與Axl結合(圖14C)。

親和力成熟之 Axl MAbs YW327.6S11、YW327.42S8 及 YW327.42S31 亦已表徵。YW327.6S11、YW327.42S8 及 YW327.42S31 以高親和力結合人類 Axl 與鼠類 Axl。舉例而言，對抗體結合人類 Axl 之 biacore 分析產生以下結果：

	Hu Axl		
	Ka	kd	KD
YW327.6S11	1.7×10^5	1.7×10^4	1.3×10^9
YW327.42S8	5.2×10^4	1.3×10^4	2.5×10^9
YW327.42S31	6.3×10^4	1.5×10^4	2.4×10^9

此等抗體不與 Tyro3 及 Mer 交叉反應。YW327.6S2 (及親本抗體 YW 327.6) 阻斷配位體 Gas6 與 Axl 結合，而 YW327.42S8 及 YW327.42S31 (及親本 Mab YW327.42) 不阻斷配位體 Gas6 與 Axl 結合。

YW327.6S2 包含含有序列 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFSLSGSWIHWVRQAPGKGLEWVGWINPYRGYAYYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYSG WGGSSVGYAMDYWGQGTLV (SEQ ID NO:1) 的重鏈可變區，及含有序列 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRAS QDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:2) 的輕鏈可變區。

Axl 抗原決定基分析

使用 ELISA 分析結合人類 Axl 細胞外域之多個部分的 Axl 抗體。獲得結果。

	YW327.6	YW327.42
Axl2 (aa1-134)	+	-
Axl-3 (aa1-221)	+	-
Axl-4 (aa1-324)	+	+

YW327.6結合包含人類Axl之胺基酸1-134的Axl-Fc融合物。相反，YW327.42結合包含人類Axl之胺基酸1-324之Axl-Fc融合物，但不結合包含胺基酸1-134及1-221之Axl Fc融合物。因此得出結論：YW327.6結合由人類Axl之胺基酸1-134組成之多肽且YW327.42結合需要人類Axl胺基酸222-234。胺基酸1-134含有Axl IgI域且胺基酸222-234含有Axl纖維結合蛋白域。

抗Axl融合瘤抗體之競爭實驗

測定抗體YW326.6及YW327.42是否可與抗Axl融合瘤抗體12A11及3G9(Li, (2009))競爭結合人類Axl。在對人類Axl之抗體競爭結合實驗中，抗體YW327.6不與融合瘤抗體12A11或3G9中任一者競爭結合人類Axl，證明此等抗體不識別相同抗原決定基。抗體YW327.42與融合瘤抗體12A11競爭結合人類Axl，但不與融合瘤抗體3G9競爭結合人類Axl。

YW327.6S2下調Axl表現，抑制其活化、信號傳導及Gas6依賴性Baf3Axl細胞增殖

為測試YW327.6S2是否影響Axl生物功能，首先評估其對Axl表現及信號傳導之影響。用YW327.6S2處理NSCLC細胞株A549引起細胞表面上Axl表現之快速下調(圖14D，

上圖)且此下調持續24小時(圖14D, 下圖)。用Gas6處理H1299 NSCLC細胞可誘導Axl磷酸化, 當細胞用YW327.6S2預培育時, Axl磷酸化受抑制(圖14E, 上圖)。因此, 用YW327.6S2預培育H1299細胞可阻斷Gas6誘導之下游信號傳導分子Akt磷酸化(圖14E, 下圖)。藉由YW327.6S2下調Axl表現且使其信號傳導失活可有效抑制Baf3Axl細胞之Gas6依賴性生長, 其中 IC_{50} 為340 ng/ml(圖14F)。

YW327.6S2降低A549異種移植物生長且增強抗VEGF之作用。在前述研究中, 已顯示藉由RNAi抑制Axl或用抗人類Axl融合瘤單株抗體處理可顯著減弱A549 NSCLC腫瘤生長(Li等人, 2009)。因此首先測試YW327.6S2對此模型中之腫瘤生長之影響。10 mg/kg單獨YW327.6S2, 每週兩次給藥方案顯著降低A549腫瘤生長(圖15A), 且此抑制效果與抗人類Axl融合瘤抗體相當(圖15C)。

Axl表現於內皮細胞上且增強VEGF誘導之內皮小管形成(Li等人, 2009; Holland等人, 2005); 已測試抗Axl mAb是否可增強抗VEGF之抗腫瘤生長性質(Liang等人, 2006)。單獨抗VEGF抗體及單獨YW327.6S2對A549腫瘤生長具有類似作用(圖15A)。與任一種單獨抗體相比, 兩種抗體之組合可增強對腫瘤生長之抑制, 其中單一藥劑抑制30%, 相比之下, 組合處理抑制60%(圖15A)。

此研究中之動物每週給藥2次歷時60天且隨後在第85天檢查腫瘤生長之延緩(當腫瘤尺寸超過800 mm³時將動物自

研究移除；無動物因中毒而移除)。單一藥劑相比，YW327.6S2與抗VEGF組合可顯著延緩腫瘤生長(圖15A)。自最後一次給藥至實驗結束(第85天)所耗時間期間，組合處理組中不存在腫瘤再生長，此組中之所有動物在實驗結束時存活，如卡普蘭-麥爾(Kaplan-Meier)曲線所示(圖15B)。

抗人類Axl融合瘤單株抗體12A11(其不與鼠類Axl交叉反應)顯著減弱A549異種移植腫瘤生長(Li等人，2009)，其亦增強抗VEGF之作用，如圖15C所示。此為所期望的，因為12A11直接抑制腫瘤細胞生長且抗VEGF影響腫瘤血管結構。

YW327.6S2下調受體表現且誘導A549腫瘤細胞之細胞凋亡。為開始瞭解介導YW327.6S2對減少腫瘤生長之作用的機制，執行藥效學研究。用YW327.6S2處理含有A549腫瘤之小鼠且在給藥後0、24、72及168小時切除腫瘤。西方墨點法分析腫瘤溶解產物顯示，投與抗體後24小時，Axl表現下調且持續168小時(圖15D)，表明YW327.6S2之抗腫瘤生長效應部分地由Axl表現之下調介導。

為確定YW327.6S2是否對腫瘤細胞增殖及細胞凋亡具有直接影響，切除經對照物或YW327.6S2處理兩週之A549異種移植腫瘤且執行分裂卡斯蛋白酶3(CC3)及Ki67 IHC。與經對照物處理之腫瘤相比，經YW327.6S2處理之腫瘤展現增加之CC3(圖15E)，表明YW327.6S2誘導腫瘤細胞之細胞凋亡。經對照物處理之腫瘤與經YW327.6S2處理之腫瘤之

間不存在Ki67陽性細胞核之顯著差異，表明YW327.6S2不直接影響腫瘤細胞增殖。

為研究YW327.6S2是否影響腫瘤相關血管結構，用單獨YW327.6S2或用YW327.6S2與抗VEGF之組合處理含有A549腫瘤之小鼠。切除腫瘤且用MECA32(一種泛內皮標記物)染色以檢查瘤內血管密度。與對照物相比，單獨YW327.6S2不顯著降低血管密度，但YW327.6S2與抗VEGF之組合引起腫瘤相關血管密度之顯著降低(圖15F)。相反，單獨12A11或其與抗VEGF之組合不顯著影響瘤內血管密度。

YW327.6S2增強埃羅替尼及化學療法之作用。為測試YW327.6S2是否可增加NSCLC之標準護理之治療指數，執行YW327.6S2與EGFR小分子抑制劑(SMI)埃羅替尼及化學療法之組合處理。

A549含有野生型EGFR且對埃羅替尼僅中度敏感(Yauch等人，2005)；因此研究抗Axl mAb是否可使此等細胞對EGFR SMI敏感。YW327.6S2及埃羅替尼當作為單一藥劑投與時引起腫瘤生長降低30%，但組合投與時降低腫瘤生長速率超過50%(圖16A)，表明抗Axl mAb增強埃羅替尼之抗腫瘤生長作用。

接著研究抗Axl mAb是否能夠增加NSCLC之標準化學療法之治療指數。含有A549異種移植物之小鼠用一輪化學療法處理，此輪化學療法係由在處理開始時(第0天，圖16B)投與太平洋紫杉醇(6.25毫克/公斤/天，5天)及卡鉑(100

mg/kg，單一劑量)組成。單獨化學療法與單獨投與YW327.6S2對腫瘤生長具有類似作用，且兩者之組合可增強對腫瘤生長之抑制(圖16B)。

在MDA-MB-231乳癌異種移植模型中，YW327.6S2降低血管密度且抑制腫瘤相關巨噬細胞分泌發炎性細胞激素。因為shRNA阻斷Axl基因表現對MDA-MB-231異種移植腫瘤生長僅具有中度作用(Li等人，2009)，所以提問YW327.6S2在此模型中是否有效。在此模型中，單獨YW327.6S2能夠降低腫瘤生長(25%)且與用作單一藥劑之抗VEGF具有類似效果(圖17A)。組合療法引起腫瘤生長降低50%，表明YW327.6S2增強抗VEGF之作用(圖17A)。相反，在此模型中，不與鼠類Axl交叉反應之抗Axl融合瘤抗體12A11(Li等人，2009)作為單一藥劑對腫瘤生長不具有顯著作用，抗VEGF亦無影響(圖17B)。西方墨點分析顯示YW327.6S2與12A11者均下調腫瘤中之Axl表現(圖17C及圖17D)。此等結果表明YW327.6S2之抗腫瘤生長效應可藉由調節腫瘤基質功能來介導。

為進一步研究YW327.6S2會如何調節腫瘤基質功能，用單獨YW327.6S2或其與抗VEGF之組合處理含有MDA-MB-231之小鼠。在投與抗體後之多個時間點，切除腫瘤且用MECA32染色以檢查瘤內血管密度。與對照物相比，YW327.6S2與抗VEGF均顯著降低血管密度(圖17E)。且兩種抗體之組合進一步降低腫瘤相關血管密度。此等結果表明YW327.6S2藉由改變血管功能來部分地降低MDA-MB-

231腫瘤生長。

在原發性人類乳癌樣品中，發現Axl蛋白質強表現於浸潤巨噬細胞中(圖 17F)且因此提問Axl mAb YW327.6S2是否會影響腫瘤相關巨噬細胞(TAM)功能。用YW327.6S2、12A11或對照抗體處理MDA-MB-231異種移植腫瘤1週，且藉由分選F4/80陽性細胞來分離TAM。細胞在不含血清之培養基中培養隔夜，且收集上清液並針對各種細胞激素及趨化因子之存在進行分析法。與經對照抗體處理之TAM相比，來自經YW327.6S2及12A11處理之腫瘤的TAM產生的發炎性細胞激素及趨化因子量低得多(圖 17G)。與此等抗體下調腫瘤細胞上之Axl表現(圖 17C及圖 17D)相反，用任一種Axl-mAb處理均不影響TAM上之Axl表現量(資料未圖示)。此等結果表明Axl mAb很可能以間接方式(可能藉由阻斷腫瘤與基質細胞之間的聯絡)調節TAM分泌發炎性細胞激素/趨化因子。

YW327.6S2降低MDA-MB-231乳癌細胞轉移至骨骼。前述研究中已顯示，shRNA阻斷Axl基因表現可抑制正位模型中MDA-MB-231乳癌細胞轉移至肺(Li等人，2009)，因此測試YW327.6S2是否影響此等細胞之轉移。經由尾靜脈將穩定表現螢光素酶報導基因之MDA-MB-231細胞注入SCID小鼠中。注射後四週，在對照抗體處理組中的所有5隻動物之顱面區域、脛骨及股骨偵測到強螢光信號。在對照組中，利用生物發光所偵測之位點在各動物中為5、5、4、3及1個，總共18個(圖 18A)。在經YW327.6S2處理之小

鼠中，利用生物發光所偵測之位點顯著減少，各動物中為0、1、2、3及1個位點且整個組為總共7個(圖18A)。藉由組織分析檢驗骨骼中轉移性病灶之存在(圖18B)。此等結果表明YW327.6S2能夠降低MDA-MB-231乳癌細胞轉移至遠端器官。

討論

已開發且表徵展現交叉物種反應性且阻斷Axl在腫瘤形成中之多種功能的人類抗Axl單株抗體(YW327.6S2)。除作為第一個所報導之針對Axl之完全人類化阻斷抗體外，YW327.6S2不僅充當分析Axl活化/信號傳導在癌症發展及進程之多方面中之影響的有力工具，而且代表治療多種癌症之可能治療劑。

本發明結果表明YW327.6S2藉由下調Axl表現及抑制配位體Gas6與受體結合從而引起Axl及其下游信號傳導之失活來阻斷Axl功能(圖14)。因為許多癌症表現組成性活化Axl且不再對外源Gas6有反應，所以YW327.6S2下調癌細胞中之Axl表現的能力代表其抑制作用之重要機制(Li等人，2009)。

在A549 NSCLC模型中，YW327.6S2當作為單一藥劑投與時顯著減弱腫瘤生長(圖15A)。此抑制效果與抗Axl融合瘤抗體在此模型中之抑制效果相當(Li等人(2009)，圖15C)。YW327.6S2快速下調異種移植物中之Axl表現(圖15D)，且誘導腫瘤細胞之細胞凋亡(圖15E)，此可能為介導其腫瘤生長抑制作用的機制之一。Axl藉由調節DKK3及

促血管生成素/Tie2路徑調節內皮細胞功能的先前發現(Li等人, 2009)提高抗Axl mAb可增強抗VEGF降低腫瘤生長之作用的可能性。本發明結果(圖15A及圖15F)與此假設一致, 亦即YW327.6S2藉由增強抗VEGF降低瘤內血管密度之作用來影響腫瘤血管結構。實際上, 在A549模型中, YW327.6S2與抗VEGF之共投與引起腫瘤停滯, 此停滯在停止處理後維持至少4週(圖15B)。融合瘤抗體12A11亦增強抗VEGF在此模型中之抗腫瘤作用(圖15C)。然而, 與YW327.6S2不同, 12A11對腫瘤血管結構不具有直接影響; 而是其直接抑制腫瘤細胞增殖及誘導細胞凋亡(Li等人, 2009)。當兩種藥劑一起使用時, 12A11對腫瘤生長之作用及抗VEGF對腫瘤血管結構之作用引起增加之效果。

諸如埃羅替尼之EGFR小分子抑制劑可有效治療具有EGFR突變或擴增之NSCLC腫瘤(Lynch等人, 2004; Paez等人, 2004; Eberhard等人, 2005; Giaccone等人, 2005; Tsao等人, 2005)。亦已知用Her2/EGFR小分子抑制劑拉帕替尼(Lapatinib)或抗Her2抗體赫賽汀(Herceptin)處理乳癌細胞可誘導Axl表現且因此導致癌細胞對此等療法產生抗性(Liu等人, 2009)。最近發現在已獲得針對埃羅替尼之抗性的HCC827 NSCLC(具有EGFR突變及擴增之細胞株)細胞中可誘導Axl表現且阻斷抗性細胞中之Axl基因表現可恢復該等細胞對埃羅替尼之敏感性, 表明Axl可在NSCLC對埃羅替尼之抗性中起作用。因為A549細胞含有野生型EGFR且對活體外EGFR抑制僅具中度敏感性(Yauch

等人，2005)，所以提問抗Axl mAb是否會使此等細胞對埃羅替尼敏感。本發明結果顯示YW327.6S2增強埃羅替尼降低腫瘤生長之作用(圖16A)，表明抗Axl mAb可增強EGFR抑制劑在單獨EGFR抑制難治性腫瘤中的作用(可能藉由直接降低腫瘤細胞中之Axl表現)。

全身化學療法在NSCLC之治療範例中占最大比重。對於復發性或晚期疾病，經由卡鉑/太平洋紫杉醇組成之化學療法治療之患者的反應率為15%且中值存活期為10.3個月(Sandley等人，2006)。本發明在A549 NSCLC模型中之結果顯示YW327.6S2能夠增強卡鉑/太平洋紫杉醇之抗腫瘤功效(圖16B)，表明阻斷Axl功能可提高此疾病之化學療法之治療指數。本發明結果與最近證明Axl小分子抑制劑與順鉑協同抑制4T1乳癌正位模型中之肝微轉移之報導(Holland等人，2010)一致。

MDA-MB-231乳癌模型中，單獨YW327.6S2能夠顯著減弱腫瘤生長(圖17A)。不與鼠類Axl交叉反應且因此僅會影響腫瘤細胞之抗Axl融合瘤抗體對此模型中之腫瘤生長不具有顯著作用(圖17B)。此等結果表明YW327.6S2可能經由其對腫瘤基質之作用來發揮其抗腫瘤效應。本發明結果表明YW327.6S2降低瘤內血管密度(圖17E)且增強抗VEGF之作用。YW327.6S2經由其對腫瘤血管結構之作用可影響腫瘤生長。

已長期瞭解癌症之發展與炎症之間的相關性(Balkwill及Mantovani, 2001；Coussens及Werb,2002)。與感染及刺激

相關之慢性炎症可能產生培養基因組病變及腫瘤起始之環境。愈來愈多的證據表明TAM在包括促進血管生成及基質再成型的腫瘤進展中具有因果作用(Balkwill等人, 2005; Pollard, 2004)。導致此作用之信號被認為是發炎性細胞激素, 包括腫瘤壞死因子- α (TNF- α)、介白素6(IL-6)及過多的趨化因子。此等細胞激素及趨化因子不僅募集刺激腫瘤進展之免疫細胞至特定位點, 而且顯示其受體表現於腫瘤細胞上, 從而其可增強腫瘤生長及遷移(Haghnegahdar等人, 2000)。在原發性人類乳癌中, Axl蛋白高量表現於腫瘤相關巨噬細胞(TAM)上(圖17F)。本文證明抗Axl mAb可經由間接機制調節此等細胞之功能。本發明資料顯示, 用YW327.6S2或12A11(其不與鼠類Axl交叉反應且因此對TAM不應具有直接作用)處理MDA-MB-231可抑制TAM分泌發炎性細胞激素及趨化因子(圖17G)。因為Axl-mAb似乎不是對TAM上之Axl表現具有顯著作用, 而是下調腫瘤細胞上之受體表現, 所以抗Axl-mAb可藉由阻斷腫瘤與基質細胞之間的聯絡來調節TAM分泌細胞激素/趨化因子。此等結果與最新報導(腫瘤細胞可藉由教導浸潤性白血球誘導Gas6之表現來促進自身生長(Loges等人, 2010); 且Axl之小分子抑制劑降低4T1乳房腫瘤細胞中之GM-CSF表現(Holland等人, 2010))一致。

先前研究已確定Axl在促進腫瘤細胞遷移、侵襲及轉移中之作用(Zhang等人, 2008; Li等人, 2009; Tai等人, 2008; Vajkoczy等人, 2006; Gjerdrum等人, 2010)。本文

顯示 YW327.6S2 能夠減少 MDA-MB-231 乳癌細胞轉移至骨。此等結果與先前資料(藉由 RNAi 使乳癌細胞中之 Axl 沉默可抑制正位模型中之乳癌細胞轉移至肺 (Li 等人, 2009; Gjerdrum 等人, 2010))一致, 表明此抗 Axl 抗體可不僅在治療性原發腫瘤上、而且在治療轉移性疾病上具有治療潛能。

總而言之, 已開發阻斷 Axl 功能之人類單株抗體。此抗 Axl mAb 經由多種機制發揮其抗腫瘤作用, 該等機制包括誘導腫瘤細胞之細胞凋亡、調節血管生成及調節腫瘤相關免疫細胞功能。此外, 此抗 Axl mAb 增強抗 VEGF、EGFR SMI 以及化學療法之抗腫瘤功效, 因此可代表臨床配置中之新穎治療方法, 其中此等療法為標準護理。

參考文獻

Angelillo-Scherrer A 等人, (2001) *Nat Med* 7:215-221。

Angelillo-Scherrer A 等人, (2008) *J Clin Invest* 118:583-596。

Berclaz G 等人, (2001) *Ann Oncol* 12:819-824。

Budagian V 等人, (2005) *EMBO J* 24:4260-4270。

Budagian V 等人, (2005) *MCB* 25:9324-9339。

Cao WM 等人, (2001) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1592-1597。

Caraux A 等人, (2006) *Nat Immunol* 7:747-754。

Chung BI 等人, (2003) *DNA Cell Biol* 22:533-540。

Christofori G (2006) *Nature* 441: 444-450。

- Craven RJ 等人，(1995) *Int J Cancer* **60**:791-797。
- D'Arcangelo D 等人，(2006) *Cardiovasc Res* **71**:754-763。
- Dumont DJ 等人，(1994) *Genes Dev* **8**:1897-1909。
- Gould WR 等人，(2005) *J Thromb Haemost* **3**:733-741。
- Hafizi S.及 B. Dahlbäck (2006) *Cytokine & Growth factor Rev* **17**: 295-304。
- Hasanbasic I 等人，(2005) *J Thromb Haemost* **3**:2790-2797。
- Holland SJ 等人，(2005) *Cancer Res* **65**:9294-9303。
- Hong CC 等人，(2008) *Cancer Lett* **268**: 314-324。
- Hutterer M 等人，(2008). *Clin Cancer Res* **14**:130-138。
- Ito T 等人，(1999) *Thyroid* **9**:563-567。
- Janssen JW 等人，(1991) *Oncogene* **6**:2113-2120。
- Katagiri M 等人，(2001) *J Biol Chem* **276**:7376-7382。
- Keating AK 等人，(2006) *Oncogene* **25**:6092-6100。
- Korshunov VA 等人，(2006) *Circ Res* **98**:1446-1452。
- Korshunov VA 等人，(2007) *Hypertension* **50**:1057-1062。
- Krupnik VE 等人，(1999) *Gene* **238**:301-313。
- Lai C.及 G.。 Lemke G (1991) *Neuron* **6**: 691-704。
- Lemke G, Rothlin CV. (2008) *Nat Rev Immunol* **8**:327-336。
- Lu Q 等人，(1999) *Nature* **398**:723-728。
- Mahadevan D 等人，(2007) *Oncogene* **26**:3909-3919。
- Maisonpierre PC 等人，(1997) *Science* **277**:55-60。
- Melaragno MG (1999) *Trends Cardiovasc Med* **9**:250-253。

- Meric F 等 人 , (2002) *Clin Cancer Res* **8**:361-367 。
- Monaghan AP 等 人 , (1999) *Mech Dev* **87**:45-56 。
- O'Bryan JP 等 人 , (1991) *Mol Cell Biol* **11**:5016-5031 。
- Peters KG 等 人 , (2004) *Recent Prog Horm Res* **59**:51-71 。
- Prasad D 等 人 , (2006) *Mol Cell Neurosci* **33**:96-108 。
- Rothlin CV 等 人 , (2007) *Cell* **131**:1124-1136 。
- Sainaghi PP 等 人 , (2005) *J Cell Physiol* **204**:36-44 。
- Sasaki T 等 人 , (2006) *EMBO J* **25**:80-87 。
- Shankar SL 等 人 , (2006) *J Neurosci* **26**:5638-5648 。
- Sharif MN 等 人 , (2006) *J Exp Med* **203**:1891-1901 。
- Shieh YS 等 人 , (2005) *Neoplasia* **7**:1058-1064 。
- Stitt TN 等 人 , (1995) *Cell* **80**:661-670 。
- Sun W 等 人 , (2004) *Oncology* **66**:450-457 。
- Suri C 等 人 , (1998) *Science* **282**:468-471 。
- Tai KY 等 人 , (2008) *Oncogene* **27**: 4044-4055 。
- Untergasser G 等 人 , (2008) *Int J Cancer* **122**:1539-1547 。
- Vajkoczy P 等 人 , (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:5799-5804 。
- Varnum BC (1995) *Nature* **373**:623-626 。
- Wu CW 等 人 , (2002) *Anticancer Res* **22**:1071-1078 。
- Yancopoulos GD 等 人 , (2000) *Nature* **407**:242-248 。
- Zhang YX (2008) *Cancer Res* **68**:1905-1915 。
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? (2001). *Lancet* **357**: 539-45 。

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7: 211-7 .

Berclaz G, Altermatt HJ, Rohrbach V, Kieffer I, Dreher E, Andres AC. (2001). Estrogen dependent expression of the receptor tyrosine kinase axl in normal and malignant human breast. *Ann Oncol* 12: 819-24 .

Brey EM, Lalani Z, Johnston C, Wong M, McIntire LV, Duke PJ, Patrick Jr CW. (2003). Automated Selection of DAB-labeled Tissue for Immunohistochemical Quantification. *J Histochem & Cytochem* 51: 575-84 .

Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. (1992). Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4285-89 .

Chung BI, Malkowicz SB, Nguyen TB, Libertino JA, McGarvey TW. (2003). Expression of the proto-oncogene Axl in renal cell carcinoma. *DNA Cell Biol* 22:533-40 .

Coussens LM, Werb Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860-7 .

Craven RJ, Xu LH, Weiner TM, Fridell YW, Dent GA, Srivastava S, Varnum B, Liu ET, Cance WG. (1995). Receptor tyrosine kinases expressed in metastatic colon

cancer. *Int J Cancer* 60:791-7。

Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, 等人, (2005). Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 23: 5900-9。

Giaccone G. (2005). Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23: 3235-42。

Gjerdrum C, Tiron C, Hoiby T, Stefansson I, Haugen H, Sandal T, 等人, (2010). Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 1124-29。

Haghnegahdar H, Du J, Wang D, Strieter RM, Burdick MD, Nanney LB, Cardwell N, Luan J, Shattuck-Brandt R, Richmond A. (2000). The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma. *J Leukoc Biol* 67:53-62。

Holland SJ, Powell MJ, Franci C, Chan EW, Frieri AM, Atchison RE, 等人, (2005). Multiple roles for the receptor tyrosine kinase axl in tumor formation. *Cancer Res* 65: 9294-303。

Holland SJ, Pan A, Franci C, Hu Y, Chang B, Li W, 等人, (2010). R428, a selective small molecule inhibitor of Axl kinase, blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer. *Cancer Res* 70:1544-54。

Hong CC, Lay JD, Huang JS, Cheng AL, Tang JL, Lin MT, Lai GM, Chuang SE. (2008). Receptor tyrosine kinase AXL is induced by chemotherapy drugs and overexpression of AXL confers drug resistance in acute myeloid leukemia. *Cancer Lett* 268: 314-24。

Hutterer M, Knyazev P, Abate A, Reschke M, Maier H, Stefanova N, Knyazeva T, 等人, (2008). Axl and growth arrest-specific gene 6 are frequently overexpressed in human gliomas and predict poor prognosis in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 14:130-8。

Ito T, Ito M, Naito S, Ohtsuru A, Nagayama Y, Kanematsu T, Yamashita S, Sekine I. (1999). Expression of the Axl receptor tyrosine kinase in human thyroid carcinoma. *Thyroid* 9: 563-7。

Janssen JW, Schulz AS, Steenvoorden AC, Schmidberger M, Strehl S, Ambros PF, Bartram CR. (1991). A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene* 6: 2113-20。

Koorstra JB, Karikari CA, Feldmann G, Bisht S, Rojas PL,

Offerhaus GJ, Alvarez H, Maitra A. (2009). The Axl receptor tyrosine kinase confers an adverse prognostic influence in pancreatic cancer and represents a new therapeutic target. *Cancer Biol Ther* 8: 618-26 .

Lai C, Lemke G. (1991). An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron* 6: 691-704 .

Lee CV, Liang WC, Dennis MS, Eigenbrot C, Sidhu SS, Fuh G. (2004). High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold. *J Mol Biol* 340:1073-93 .

Li Y, Ye X, Tan C, Hongo JA, Zha J, Liu J, Kallop D, Ludlam MJ, Pei L. (2009). Axl as a potential therapeutic target in cancer: role of Axl in tumor growth, metastasis and angiogenesis. *Oncogene* 28: 3442-55 .

Lian WC, Wu X, Peale FV, Lee CV, Meng YG, Gutierrez J , 等人 , (2006). Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF. *J Biol Chem* 281: 951-61 .

Liang WC, Dennis MS, Stawicki S, Chanthery Y, Pan Q, Chen Y, Eigenbrot C, Yin J, Koch AW, Wu X , 等人 , (2007). Function blocking antibodies to neuropilin-1 generated from a designed human synthetic antibody phage

library. *J Mol Biol* 366: 815-29 .

Liu L, Greger J, Shi H, Liu Y, Greshock J, Annan R, Halsey W, Sathe GM, Martin AM, Gilmer TM. (2009). Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. *Cancer Res* 69: 6871-8 .

Loges S, Schmidt T, Tjwa M, van Geyte K, Lievens D, Lutgens E, 等人, (2010). Malignant cells fuel tumor growth by educating infiltrating leukocytes to produce the mitogen Gas6. *Blood* 115:2264-73 .

Lynch TJ, Bell TW, Sordella R, 等人, (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350:2129-39 .

Mahadevan D, Cooke L, Riley C, Swart R, Simons B, Della Croce K, Wisner L, Iorio M, Shakalya K, Garewal H, Nagle R, Bearss D. (2007). A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 26: 3909-19 .

Meric F, Lee WP, Sahin A, Zhang H, Kung HJ, Hung MC. (2002). Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer. *Clin Cancer Res* 8:361-7 .

O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C 等人, (1991). Axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a

novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 11:5016-31。

Paez JG, Janne PA, Lee JC 等人，(2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304: 1497-500。

Pollard JW. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4:71-8。

Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H， 等人，(2007). Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 131:1190-203。

Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Galletti M, Bellosta P, Avanzi GC. (2005). Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J Cell Physiol* 204:36-44。

Sandley A, Gray R, Perry MC 等人，(2006). Palitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for no-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 355: 2542-50。

Shieh YS, Lai CY, Kao YR, Shiah SG, Chu YW, Lee HS, Wu CW. (2005). Expression of axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression. *Neoplasia* 7:1058-64。

Sidhu SS, Li B, Chen Y, Fellouse FA, Eigenbrot C, Fuh G. (2004). Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions. *J Mol*

Biol 338:299-310 。

Sun W, Fujimoto J, Tamaya T. (2004). Coexpression of Gas6/Axl in human ovarian cancers. *Oncology* 66:450-7 。

Tai KY, Shieh YS, Lee CS, Shiah SG, Wu CW. (2008). Axl promotes cell invasion by inducing MMP-9 activity through activation of NF-kappaB and Brg-1. *Oncogene* 27: 4044-55 。

Tsao MS, Sakurada A, Lorimer I, 等人, (2005). Molecular analysis of the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene and protein expression in patients treated with erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC CTG) trial BR.21. *J Clin Oncol* 23: 7007. Meeting Abstracts 。

Vajkoczy P, Knyazev P, Kunkel A, Capelle HH, Behrndt S, von Tengg-Kobligk H, 等人, (2006). Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:5799-5804 。

Wu CW, Li AF, Chi CW, Lai CH, Huang CL, Lo SS, Lui WY, Lin WC. (2002). Clinical significance of AXL kinase family in gastric cancer. *Anticancer Res* 22:1071-8 。

Yauch RL, Januario T, Eberhard DA, Cavet G, Zhu W, Fu L, 等人, (2005). Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity

of erlotinib in lung cancer patients. Clin Cancer Res 11:8686-98。

Zhang YX, Knyazev PG, Cheburkin YV, Sharma K, Knyazev YP, Orfi L 等人，(2008). AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression. Cancer Res 68:1905-15。

如下所述，融合瘤細胞株 3G9.19.7 依據布達佩斯條約 (Budapest Treaty) 條款寄存於美國菌種保存中心 (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA：

物種	物質	寄存編號	存日期
小鼠	3G9.19.7	_____	_____

本文中之寄存係依據國際認可用於專利程序目的之微生物寄存布達佩斯條約及相關細則 (Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder) (布達佩斯條約) 的規定進行。此舉確保自寄存之日起保持寄存物之存活培養物 30 年。寄存物可依據布達佩斯條約之條款經 ATCC 獲得，且服從 Genentech, Inc. 與 ATCC 之間的協議，從而確保一旦相關美國專利頒佈或一旦任何美國或國外專利申請案向公眾公開 (以先到者為準)，公眾即可永久及無限制獲得寄存物之培養物的子代，且確保美國專利與商標委員 (U.S. Commissioner of Patents and Trademarks) 可有權根據 35 U.S.C. 122 及依照其之委員細則 (包括 37 C.F.R. 1.14，其特定參考 886 OG 638)

確定獲得子代者。

雖然上文已出於清楚理解之目的藉助於說明及實例詳細地描述本發明，但該等描述及實例不應解釋為限制本發明之範疇。本文中所引用之所有專利及科學文獻之揭示內容以全文引用的方式明確地併入本文中。

【圖式簡單說明】

圖1顯示癌細胞株中之Axl表現。圖塊A：癌細胞株中之Axl mRNA含量：在代表244個樣品(針對各腫瘤類型指定樣品編號)的Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0陣列上編輯若干微陣列實驗所得的癌細胞株中Axl mRNA含量。選擇可代表Axl之表現的探針集202686_s_at。圖塊B：對所選癌細胞株中Axl及Gas6之西方墨點分析。U87及A172：神經膠質瘤；DU145：前列腺癌；Pan0327：胰臟癌；RKO：結腸癌；MDA-MB-231：乳癌；Calu1、A549、H1299及HCC366：NSCLC；SHSY5Y：神經母細胞瘤；圖塊C：癌細胞株中之磷酸化Axl。使細胞在不含血清之培養基中饑餓隔夜且用Gas6(200 ng/ml)處理30分鐘。藉由ELISA量測磷酸化Axl；

圖2顯示阻斷癌細胞株中之Axl基因表現可降低細胞存活率且減弱遷移。圖塊A：阻斷癌細胞株中之可誘導性Axl基因表現(西方墨點分析)。藉由多西環素(doxycycline)處理細胞72小時來誘導AxlshRNA表現。圖塊B：阻斷Axl基因表現可中止下游信號傳導。使細胞血清饑餓24小時，用100 ng/ml AxlFc預培育2小時且用Gas6處理30分鐘。針對

磷酸化Akt及Akt執行西方墨點分析；圖塊C：阻斷Axl基因表現對細胞存活率之影響。細胞於10%血清(左圖)中或於具有或不具有Gas6之1%血清(H1299，右圖)中培養。藉由Dox處理細胞72小時來誘導AxlshRNA，且使用CellTiter Glo分析法量測細胞存活率(n=8)。圖塊D：阻斷Axl基因表現可減弱細胞遷移。如所述執行遷移分析法。誤差長條圖表示標準差(n=8)；

圖3顯示阻斷Axl基因表現可降低異種移植模型中之腫瘤生長。對於各圖塊而言，左側曲線圖顯示腫瘤生長曲線且右圖顯示對腫瘤溶解產物中Axl表現之西方墨點分析。圖塊A：A549AxlshRNA。圖塊B：H1299AxlshRNA。圖塊C：MDA-MB-231AxlshRNA。該等曲線圖代表三個獨立實驗。誤差長條圖表示平均值標準誤差(每個實驗中，每組n=10)；

圖4顯示阻斷Axl基因表現可抑制MDA-MB-231乳癌細胞轉移至肺部。圖塊A：實驗設計之示意性說明。圖塊B：原發性腫瘤移除後5週肺部之生物發光成像。圖塊C：原發性腫瘤移除後5週肺部之蘇木素及曙紅染色(H&E staining)。圓圈表示腫瘤塊。此圖代表三個獨立實驗(每個實驗中，每組n=5)；

圖5顯示阻斷HUVEC中之Axl基因表現會減少內皮小管形成。圖塊A：用對照物(GL2)或Axl siRNA轉染後96小時對HUVEC細胞表面上之Axl表現的FACS分析。圖塊B：Axl siRNAs減少內皮管形成。左圖：在ImageXpressMICRO成

像系統下觀察且拍攝小管。右圖：藉由使用MetaXpress軟體量測小管長度來定量總小管形成；

圖6顯示Axl基因表現被阻斷之HUVEC之基因表現概況。圖塊A：阻斷Axl基因表現後、上調及下調幅度最大之基因之清單。用對照物或Axl siRNA轉染HUVEC且在轉染後72小時製備RNA。微陣列及資料分析描述於材料及方法中。相較於對照物之基因表現變化倍數如圖所示。清單中基因之定義：MYCN：N-Myc；HLX：H2.0樣間源盒；GAS7：生長抑制特異性7；HDAC9：組蛋白脫乙酰基酶9；E2F1：E2F轉錄因子1；CXCR4：趨化因子(C-X-C基元)受體4；PMCH：促黑色素聚集激素；ANG-2：促血管生成素2(angiotensin 2)；IFI44L：干擾素誘導蛋白44樣；GJA4：間隙接合蛋白， $\alpha 4$ ；IFIT1：具有三角形四肽重複1之干擾素誘導蛋白；SCG5：分泌粒蛋白V(secretogranin V)，CYTL1：細胞激素樣1；DPP4：二肽基肽酶4；DKK3：Dickkopf 3。圖塊B：阻斷Axl基因表現後對DKK3及Ang-2 mRNA含量之定量RT-PCR。圖塊C：阻斷DKK3或Ang-2 siRNA基因表現對內皮小管形成之影響。左圖：在ImageXpressMICRO成像系統下觀察且拍攝小管(左圖)。藉由使用MetaXpress軟體量測小管長度來定量總小管形成(右圖)；

圖7顯示阻斷Axl基因表現與抗VEGF具有相加效應。在抗VEGF存在或不存在的情況下用對照物、Axl或DKK3 siRNA轉染HUVEC細胞且與PASMC一起共培養。共培養後

3天藉由結合FITC之抗CD31抗體染色來分析小管形成。上圖：在ImageXpressMICRO成像系統下觀察且拍攝小管。下圖：藉由使用MetaXpress軟體量測小管長度來定量總小管形成；

圖8顯示Axl mAb之表徵。圖塊A：Axl mAb抑制Baf3Axl細胞生長。Baf3Axl細胞在含有200 ng/ml Gas6之培養基中生長且用指定濃度之Axl mAb處理48小時。藉由CellTiter Glo分析法量測細胞存活率。圖塊B：mAb 3G9及8B5阻斷Gas6與Axl結合(B1：ELISA且B2：FACS)。圖塊C：mAb下調A549中之Axl表現(西方墨點分析)及H1299細胞中經Gas6誘導之Axl磷酸化(ELISA)。圖塊D：抗原決定基定位。活體外轉錄及轉譯Axl ECD之各部分且用作ELISA中之抗原；

圖9顯示Axl mAb抑制A549異種移植腫瘤生長。圖塊A：腫瘤生長曲線。當平均腫瘤尺寸達到100 mm³時開始腹膜內投與單株抗體，30 mg/kg，每週兩次。第一劑(第0天)及最後一劑(第40天)mAb投與用箭頭指示。該曲線圖代表三個獨立實驗。誤差長條圖表示平均值標準誤差(每個實驗中，每組n=10)。圖塊B：Axl mAb下調Axl表現。以30 mg/kg之mAb處理小鼠且在指定時間點切除腫瘤。腫瘤之細胞溶解產物用於西方墨點法分析Axl表現。圖塊C：投與Axl mAb12A11後72小時腫瘤樣品之Ki67染色；

圖10顯示藉由siRNA阻斷HUVEC中之Axl基因表現。用螢光素對照物(GL2)siRNA或用Axl特異性(D1-4、Axl2及

Axl4)siRNA轉染HUVEC。藉由FACS分析轉染後48小時細胞表面上之Axl表現。圖塊A：FACS分析之Axl表現概況。條形圖表示FACS之定量。圖塊B：siRNA序列(SEQ ID NO:3-16)。圖塊C：阻斷Axl基因表現對HUVEC生長之影響。轉染後72小時藉由CellTiter Glo分析法測定細胞存活率；

圖11顯示藉由RNAi阻斷DKK3或Ang2基因表現不會影響HUVEC中之Axl蛋白質含量。用對照物(GL2)、Axl、Dkk3或Ang-2 siRNA轉染HUVEC。轉染後48小時，藉由FACS分析Axl蛋白質含量且藉由ELISA測定培養基中DKK3及Ang-2之蛋白質含量。以相較於對照物之基因表現變化倍數表示；

圖12顯示用於篩檢Axl單株抗體(mAb)之以細胞為基礎之分析法。圖塊A：Axl穩定表現於Baf3細胞中(西方墨點法)。圖塊B：Baf3Axl細胞之Gas6依賴性生長。圖塊C：AxlFc抑制Baf3Axl細胞之Gas6依賴性生長。圖塊D：篩檢阻斷Gas6依賴性Baf3Axl生長之Axl mAb。Baf3Axl細胞在200 ng/ml Gas6(C及D)存在下、用指定劑量之AxlFc(C)或融合瘤上清液(D)培養72小時。藉由CellTiter Glo測定細胞存活率。誤差長條圖表示標準差(n=8)；

圖13顯示Axl mAb之交叉反應性。圖塊A：Axl mAb不與鼠類Axl交叉反應。圖塊B：Axl mAb不與Mer及Tyro-3交叉反應。使用人類AxlFc、鼠類AxlFc、及人類MerFc及Tyro-3Fc作為供抗體結合之抗原執行ELISA；

圖 14：Axl mAb YW327.6S2 之表徵。A. 使用 BIAcore 量測 YW327.6S2 之親和力。使用一對一朗繆爾 (Langmuir) 結合模型計算結合速率 (k_{on}) 及解離速率 (k_{off})。平衡解離常數 (K_d) 係由 k_{on}/k_{off} 比率推算。B. YW327.6S2 之交叉反應性。YW327.6S2 與鼠類 Axl 及獼猴 Axl 而不與 Tyro3 或 Mer 交叉反應。用抗人類 IgG Fc 塗佈培養盤，接著與人類 Axl、Mer、Tyro3 Fcs、小鼠 AxlFcs 或獼猴 AxlFcs 一起培育。洗滌後，添加同型對照抗體或 YW327.6S2，接著添加結合 HRP 之抗人類 IgG。C. YW327.6S2 阻斷 Gas6 與 Axl 結合。上圖：ELISA。用抗人類 IgG Fc 塗佈培養盤且與人類 Axl-Fc 一起培育。洗滌後，在抗體存在或不存在下添加 Gas6。藉由結合生物素之抗 Gas6 抗體及抗生物蛋白鏈菌素-HRP 結合物偵測 Gas6 之結合。下圖：FACS。收集 HUVEC 且用 YW327.6S2 或對照抗體處理，接著在冰上與 Gas6 一起培育 30 分鐘。藉由結合生物素之抗 Gas6 抗體及抗生物蛋白鏈菌素-PE 結合物偵測 Gas6 與細胞表面之結合。D. YW327.6S2 下調 Axl 表現。A549 細胞與 1 μ g/ml YW327.6S2 一起培育指定時間，且藉由 FACS 測定細胞表面 Axl 表現(上圖)並藉由西方墨點法分析總蛋白質表現(下圖)。E. YW327.6S2 抑制 Gas6 誘導之 Axl 磷酸化及信號傳導。H1299 細胞在不含血清之培養基中培養隔夜，用 YW327.6S2 預培育 4 小時並用 Gas6 處理 30 分鐘。藉由 ELISA 量測磷酸化 Axl(上圖)且藉由西方墨點法分析磷酸化 Akt(下圖)。F. YW327.6S2 抑制 Baf3Axl 細胞生長。Baf3Axl 細胞在含有

200 ng/ml Gas6 之培養基中生長且用指定濃度之 YW327.6S2 處理 72 小時。藉由 CellTiter Glo 分析法量測細胞存活率；

圖 15：YW327.6S2 減弱 A549 異種移植腫瘤生長且增強抗 VEGF 之作用。A. 腫瘤生長曲線。當平均腫瘤尺寸達到 100 mm³ 時開始 (第 0 天) 腹膜內投與 mAb，10 mg/kg (YW327.6S2 及同型對照抗體) 或 1 mg/kg (抗 VEGF)，每週兩次。誤差長條圖表示平均值之標準誤差 (每個實驗中，每組 n=10)。p=0.0003 (YW327.6S2 相較於對照物)，p=10⁻¹¹ (YW327.6S2 相較於組合療法)。B. 各處理組之卡普蘭-麥爾曲線。當其腫瘤尺寸達到 800 mm³ 時，即自研究中移除該小鼠，且對各組中剩餘動物 (剩餘百分比) 作圖。C. 12A11 增強抗 VEGF 之作用。當平均腫瘤尺寸達到 100 mm³ 時開始 (第 0 天) 分別以 30 mg/kg 及 1 mg/kg 腹膜內投與 12A11 及抗 VEGF，每週兩次。誤差長條圖表示平均值標準誤差 (每個實驗中，每組 n=10)。p=0.006 (12A11 相較於對照物)；p=0.0001 (12A11 相較於組合療法)。D. YW327.6S2 下調 Axl 表現。用 10 mg/kg 之 YW327.6S2 處理小鼠且在指定時間點切除腫瘤。藉由西方墨點法針對 Axl 表現分析腫瘤之細胞溶解產物。E. YW327.6S2 誘導細胞凋亡。切除經對照物或 YW327.6S2 處理 2 週之腫瘤且執行 CC3 IHC 以量測細胞凋亡。F. YW327.6S2 增強抗 VEGF 在降低瘤內血管密度中之作用。給藥後 0 小時及 72 小時切除如上述 D 中所處理之小鼠之腫瘤且藉由 MECA32 免疫組織化學染色來顯現腫瘤血管結構且

藉由影像分析定量(以平方微米表示)。對各對樣品執行學生t檢驗(對於對照物相較於組合療法, $p < 0.05$) ;

圖 16 : YW327.6S2增強A549異種移植模型中埃羅替尼及化學療法之抗腫瘤作用。A. YW327.6S2增強埃羅替尼之作用。抗體投與與圖2中相同。以100 毫克/公斤/天經口管飼投與埃羅替尼。每組 $n=10$ 。 $p=1.7 \times 10^{-9}$ (YW327.6S2相較於對照物), $p=2.3 \times 10^{-10}$ (YW327.6S2相較於組合療法)。B. YW327.6S2增強化學療法。抗體投與與圖2中相同。治療開始時(第0天)分別皮下投與6.25毫克/公斤/天之太平洋紫杉醇5天及100 mg/kg單一劑量之卡鉑。每組 $n=10$ 。 $p=3 \times 10^{-5}$ (YW327.6S2相較於對照物), $p=10^{-9}$ (化學療法相較於對照物), $p=10^{-5}$ (組合療法相較於單獨化學療法);

圖 17 : YW327.6S2藉由調節腫瘤受質功能來減弱MDA-MB-231異種移植腫瘤生長。A及B. YW327.6S2而非12A11降低MDA-MB-231腫瘤生長且增強抗VEGF之作用。平均腫瘤尺寸達到100 mm³時開始(第0天), 以20 mg/kg(YW327.6S2及同型對照抗體)、30 mg/kg(12A11)及2 mg/kg(抗VEGF)腹膜內投與mAb, 每週兩次。誤差長條圖表示平均值標準誤差(每個實驗中, 每組 $n=10$)。 $p=8.5 \times 10^{-6}$ (YW327.6S2相較於對照物), $p=2.8 \times 10^{-8}$ (YW327.6S2相較於組合療法), $p=0.05$ (12A11相較於對照物), $p=0.145$ (抗VEGF相較於組合療法)。C及D. YW327.6S2下調Axl表現。用20 mg/kg之mAb處理含有MDA-MB231異種移植腫瘤(平均尺寸500 mm³)之小鼠且在指定時間點切除腫瘤。腫瘤之

細胞溶解產物用於西方墨點法分析 Axl 表現。E. YW327.6S2 降低腫瘤相關血管結構之密度。0 小時及給藥後 1 週切除如上述 C 中所處理之小鼠之腫瘤且藉由 MECA32 免疫組織化學染色來顯現腫瘤血管結構且藉由影像分析定量(以平方微米表示)。對各對樣品執行學生 t 檢驗(對於 YW327.6S2 相較於對照物、抗 VEGF 相較於對照物，及抗 VEGF 相較於組合療法， $p < 0.05$)。F. Axl 高度表現於原發性人類乳癌之浸潤性巨噬細胞中。使用免疫組織化學檢查 79 種原發性腫瘤。21% 此等腫瘤在浸潤性巨噬細胞中表現高含量 Axl。藉由抗 CD68 染色來鑑別巨噬細胞，且藉由抗 Axl/CD68 雙重 IHC 測定巨噬細胞上 Axl 之表現。使用一系列切片。G. YW327.6S2 抑制腫瘤相關巨噬細胞發炎性分泌細胞激素/趨化因子。用 20 mg/kg 之對照抗體、YW327.6S2 或 12A11 處理含有 MDA-MB231 異種移植腫瘤(平均尺寸 500 mm^3)之小鼠且在處理 1 週後切除腫瘤。藉由分選 F4/80 陽性細胞來分離腫瘤相關巨噬細胞且培養隔夜。使用 Bio-Plex 小鼠細胞激素分析套組量測分泌入培養基中之細胞激素及趨化因子；

圖 18：YW327.6S2 減少 MDA-MB-231 乳癌細胞向骨骼之轉移。A. 尾靜脈注射腫瘤細胞後 4 週進行的生物發光成像。將 200 μL 含 25 mg/mL D-螢光素(Invitrogen)之 PBS 腹膜內(i.p)注入小鼠中且在成像期間使用異氟烷經由鼻錐麻醉小鼠。用具有增強式電荷耦合器件攝影機之光子成像器(Biospace Lab, Paris, France)獲得生物發光影像。B. 脛骨

切片之H及E染色。實驗結束時收集組織且固定於4%甲醛中，切片且用H&E染色。上圖中之圓圈顯示侵襲骨骼之腫瘤細胞。下圖詳細顯示骨髓中之贅生性細胞；及

圖 19：例示性人類 Axl 序列 RefSeq NM_001699 (SEQ ID NO:17)。

序列表

<110> 美商建南德克公司

<120> 組合療法

<130> P4347R1

<140> 099124592

<141> 2010/07/26

<150> US 61/228,915

<151> 2009-07-27

<150> US 61/356,498

<151> 2010-06-19

<160> 19

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 1

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	
1				5					10					15	
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	
				20					25					30	
Gly	Ser	Trp	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
				35					40					45	
Glu	Trp	Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Ala	Tyr	Tyr	
				50					55					60	
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	
				65					70					75	
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
				80					85					90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Tyr	Ser	Gly	Trp	Gly	Gly	
				95					100					105	
Ser	Ser	Val	Gly	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
				110					115					120	

Val

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 2

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	
1				5					10					15	
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	
				20					25					30	
Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	
				35					40					45	
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
				50					55					60	
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	

	65		70		75									
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
			80						85					90
Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105

Ile Lys Arg

<210> 3
<211> 21
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 3
cguacgcgga auacuucgat t 21

<210> 4
<211> 21
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 4
ucgaaguauu ccgcguacgt t 21

<210> 5
<211> 21
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 5
gaaagaagga gacccgttat t 21

<210> 6
<211> 21
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 6
taacgggtct ccttctttct t 21

<210> 7
<211> 21
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 7
ccaagaagat ctacaatggt t 21

<210> 8
<211> 21
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 8

ccattgtaga tcttcttggt t 21

<210> 9
<211> 21
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 9
ggaactgcat gctgaatgat t 21

<210> 10
<211> 21
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 10
tcattcagca tgcagttcct t 21

<210> 11
<211> 21
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 11
gaaggagacc cgttatggat t 21

<210> 12
<211> 21
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 12
tccataacgg gtctccttct t 21

<210> 13
<211> 21
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 13
gacatcctct ttctcctgct t 21

<210> 14
<211> 21
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 14
gcaggagaaa gaggatgtct t 21

<210> 15
<211> 21
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 15
gatttggaga acacactgat t 21

<210> 16
<211> 21
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 16
tcagtgtggt ctccaaatct t 21

<210> 17
<211> 875
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17
Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp
1 5 10 15
Cys Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr
20 25 30
Gln Ala Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr
35 40 45
Gly Ala Arg Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val
50 55 60
Gln Gly Glu Pro Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile
65 70 75
Leu Glu Leu Ala Asp Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu
80 85 90
Asp Glu Gln Asp Asp Trp Ile Trp Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser
95 100 105
Leu Gln Leu Ser Asp Thr Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu
110 115 120
Gly His Gln Thr Phe Val Ser Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu
125 130 135
Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala
140 145 150
Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys Gln Ala Gln Gly Pro Pro
155 160 165
Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp Ala Val Pro Leu Ala
170 175 180
Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu His Val Pro Gly
185 190 195
Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His Asn Ala Lys
200 205 210
Gly Trp Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu Pro Gln Gln Pro
215 220 225
Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu Leu Glu Val
230 235 240
Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr His Cys
245 250 255
Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Met Gly Ile Gln Ala
260 265 270

Gly	Glu	Pro	Asp	Pro	Pro	Glu	Glu	Pro	Leu	Thr	Ser	Gln	Ala	Ser	
				275					280					285	
Val	Pro	Pro	His	Gln	Leu	Arg	Leu	Gly	Ser	Leu	His	Pro	His	Thr	
				290					295					300	
Pro	Tyr	His	Ile	Arg	Val	Ala	Cys	Thr	Ser	Ser	Gln	Gly	Pro	Ser	
				305					310					315	
Ser	Trp	Thr	His	Trp	Leu	Pro	Val	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Pro	
				320					325					330	
Leu	Gly	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Ala	Thr	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	
				335					340					345	
Ala	Phe	Val	His	Trp	Gln	Glu	Pro	Arg	Ala	Pro	Leu	Gln	Gly	Thr	
				350					355					360	
Leu	Leu	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ala	Tyr	Gln	Gly	Gln	Asp	Thr	Pro	Glu	
				365					370					375	
Val	Leu	Met	Asp	Ile	Gly	Leu	Arg	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Glu	Leu	
				380					385					390	
Gln	Gly	Asp	Gly	Ser	Val	Ser	Asn	Leu	Thr	Val	Cys	Val	Met	Tyr	
				395					400					405	
Thr	Met	Gly	Asp	Gly	Pro	Trp	Ser	Leu	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Ala	
				410					415					420	
Trp	Arg	Pro	Val	Lys	Glu	Pro	Ser	Thr	Pro	Ala	Phe	Ser	Trp	Pro	
				425					430					435	
Trp	Trp	Tyr	Val	Leu	Leu	Gly	Ala	Trp	Ala	Ala	Ala	Cys	Val	Leu	
				440					445					450	
Ile	Leu	Ala	Leu	Phe	Leu	Val	His	Arg	Arg	Lys	Lys	Glu	Thr	Arg	
				455					460					465	
Tyr	Gly	Glu	Val	Phe	Glu	Pro	Thr	Val	Glu	Arg	Gly	Glu	Leu	Trp	
				470					475					480	
Arg	Tyr	Arg	Val	Arg	Lys	Ser	Tyr	Ser	Arg	Arg	Thr	Thr	Glu	Ala	
				485					490					495	
Thr	Leu	Asn	Ser	Leu	Gly	Ile	Ser	Glu	Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Leu	
				500					505					510	
Arg	Asp	Val	Met	Val	Asp	Arg	His	Lys	Val	Ala	Leu	Gly	Lys	Thr	
				515					520					525	
Leu	Gly	Glu	Gly	Glu	Phe	Gly	Ala	Val	Met	Glu	Gly	Gln	Leu	Asn	
				530					535					540	
Gln	Asp	Asp	Ser	Ile	Leu	Lys	Val	Ala	Val	Lys	Thr	Met	Lys	Ile	
				545					550					555	
Ala	Ile	Cys	Thr	Arg	Ser	Glu	Leu	Glu	Asp	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	
				560					565					570	
Val	Cys	Met	Lys	Glu	Phe	Asp	His	Pro	Asn	Val	Met	Arg	Leu	Ile	
				575					580					585	
Gly	Val	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Glu	Arg	Glu	Ser	Phe	Pro	Ala	Pro	
				590					595					600	
Trp	Ile	Leu	Pro	Phe	Met	Lys	His	Gly	Asp	Leu	His	Ser	Phe	Leu	
				605					610					615	
Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Gly	Asp	Gln	Pro	Trp	Leu	Pro	Thr	Gln	Met	
				620					625					630	
Leu	Val	Lys	Phe	Met	Ala	Asp	Ile	Ala	Ser	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	
				635					640					645	

Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys
 650 655 660
 Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu
 665 670 675
 Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg Gln Gly Arg Ile
 680 685 690
 Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser Leu Ala Asp
 695 700 705
 Arg Trp Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Thr Met
 710 715 720
 Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly Val Glu
 725 730 735
 Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu Lys
 740 745 750
 Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg
 755 760 765
 Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu
 770 775 780
 Arg Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln
 785 790 795
 Glu Pro Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly
 800 805 810
 Tyr Pro Glu Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr
 815 820 825
 Gln Pro Asp Pro Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu
 830 835 840
 Val His Pro Ala Gly Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro
 845 850 855
 Ser Pro Ala Gln Pro Ala Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly
 860 865 870
 Gln Glu Asp Gly Ala
 875

<210> 18
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 18
 Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp
 1 5 10 15
 Cys Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr
 20 25 30
 Gln Ala Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr
 35 40 45
 Gly Ala Arg Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val
 50 55 60
 Gln Gly Glu Pro Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile
 65 70 75
 Leu Glu Leu Ala Asp Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu
 80 85 90
 Asp Glu Gln Asp Asp Trp Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr
 95 100 105

201106972

Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe
110 115 120

Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser Gln Pro Gly Tyr Val Gly
125 130

<210> 19
<211> 104
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19
Ile Thr Val Leu Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser
1 5 10 15

Arg Gln Pro Thr Glu Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser
20 25 30

Gly Ile Tyr Pro Leu Thr His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser
35 40 45

Asp Asp Gly Met Gly Ile Gln Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu
50 55 60

Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser Val Pro Pro His Gln Leu Arg
65 70 75

Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro Tyr His Ile Arg Val Ala
80 85 90

Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp Thr His Trp Leu
95 100

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99124592

A61K39/395 (2006.01)
C07K16/30 (2006.01)

※申請日：99.7.26

※IPC 分類：A61P35/00

(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

組合療法

COMBINATION TREATMENTS

二、中文發明摘要：

本發明提供Axl拮抗劑及其使用方法。

三、英文發明摘要：

The invention provides Axl antagonists and methods of using the same.

七、申請專利範圍：

1. 一種治療個體癌症之方法，其包括向該個體投與治療有效量之Axl拮抗劑及VEGF拮抗劑。
2. 一種抑制個體癌症轉移之方法，其包括向該個體投與治療有效量之Axl拮抗劑及VEGF拮抗劑。
3. 一種抑制個體血管生成之方法，其包括向該個體投與治療有效量之Axl拮抗劑及VEGF拮抗劑。
4. 一種抑制個體細胞增殖之方法，其包括向該個體投與治療有效量之Axl拮抗劑及VEGF拮抗劑。
5. 如請求項1、2、3或4之方法，其中該癌症為乳癌、結腸直腸癌、直腸癌、非小細胞肺癌、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkins lymphoma; NHL)、腎細胞癌、前列腺癌、肝癌(諸如肝細胞癌)、胰臟癌、軟組織肉瘤、卡波西氏肉瘤(kaposi's sarcoma)、類癌瘤、頭頸癌、黑色素瘤、卵巢癌、胃癌、間皮瘤及多發性骨髓瘤。
6. 如請求項1、2、3或4之方法，其中該Axl拮抗劑為抗Axl抗體。
7. 如請求項6之方法，其中該抗Axl抗體包括含有序列
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSGSWIHWVRQ
APGKGLEWVGWINPYRGYAYYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYSGWGGSSVGYAMDY
WGQGTLV(SEQ ID NO:1)的重鏈可變區，及含有序列
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQK
PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP

EDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR(SEQ ID NO:2)

的輕鏈可變區。

8. 如請求項6之方法，其中該抗Axl抗體為抗體3G9或抗體3G9之人類化形式。
9. 如請求項1、2、3或4之方法，其中該VEGF拮抗劑為抗VEGF抗體。
10. 如請求項9之方法，其中該抗VEGF抗體為貝伐珠單抗(bevacizumab)。

八、圖式：

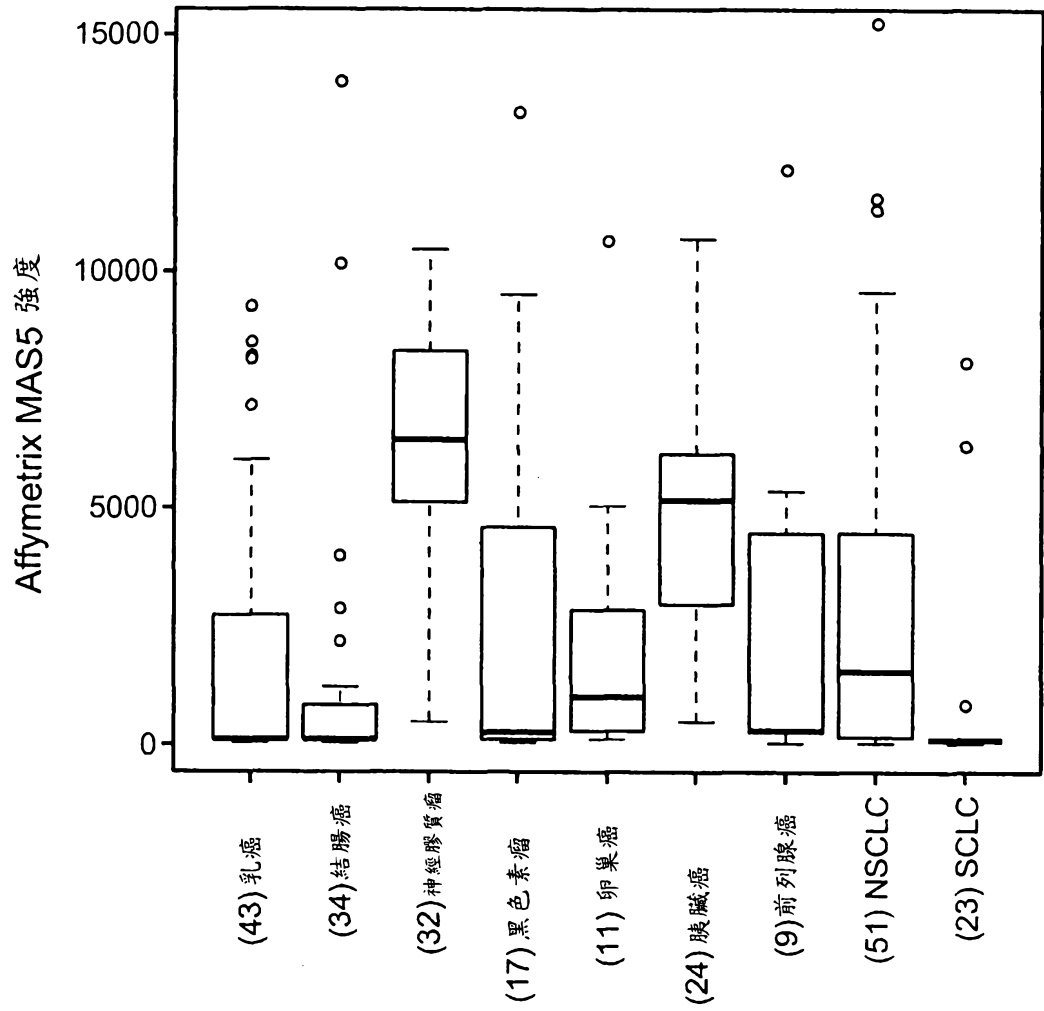


圖1A

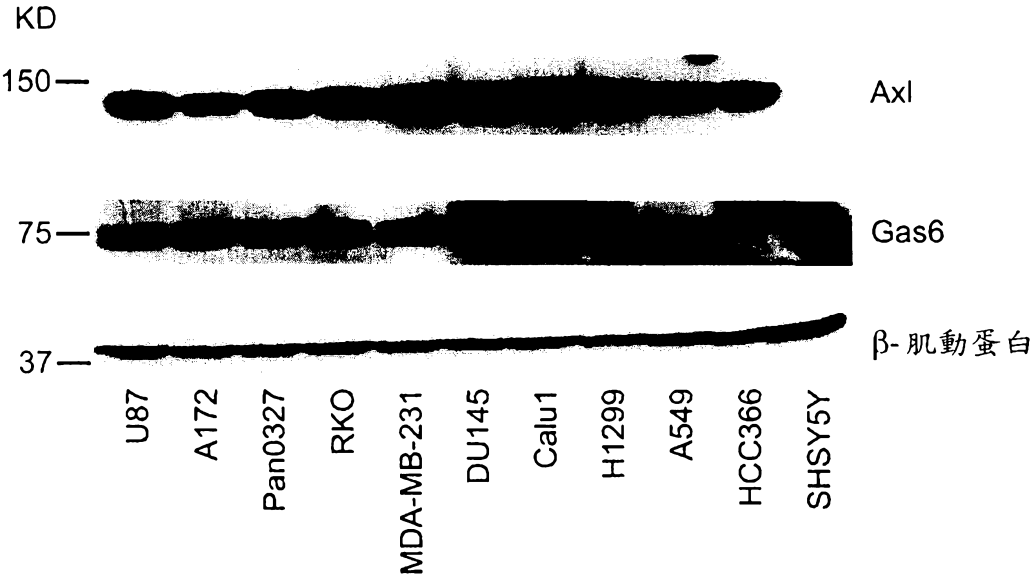


圖 1B

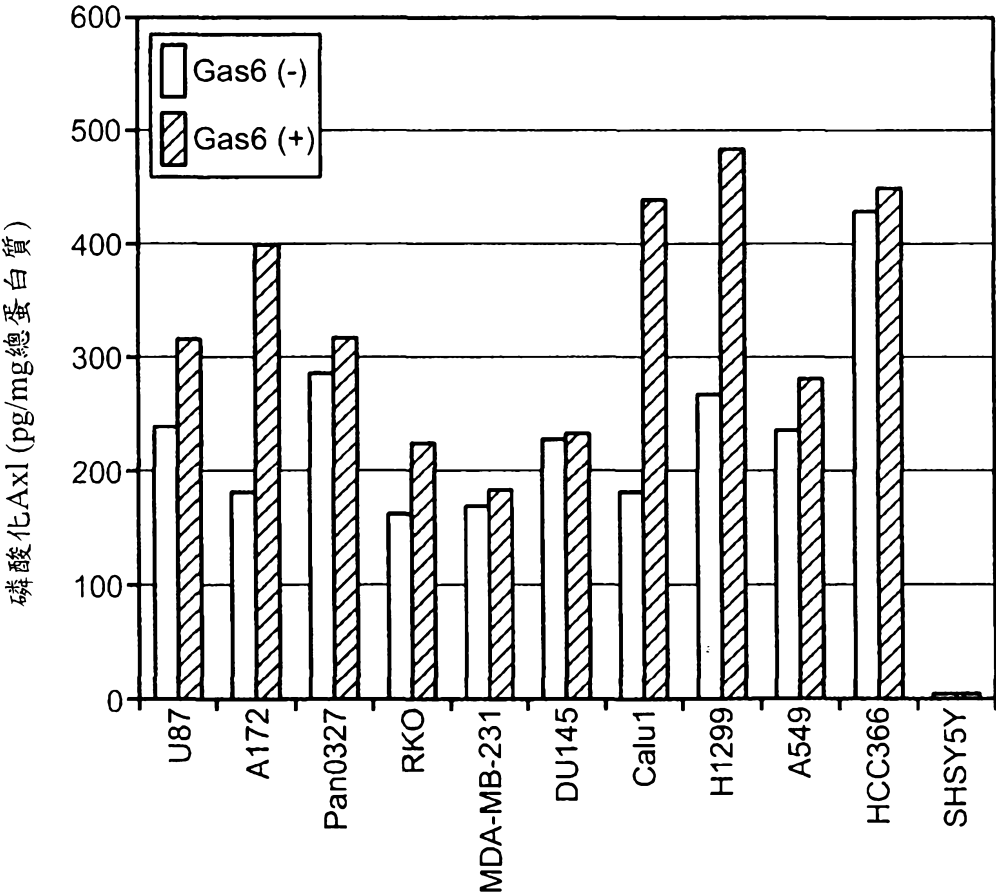


圖 1C

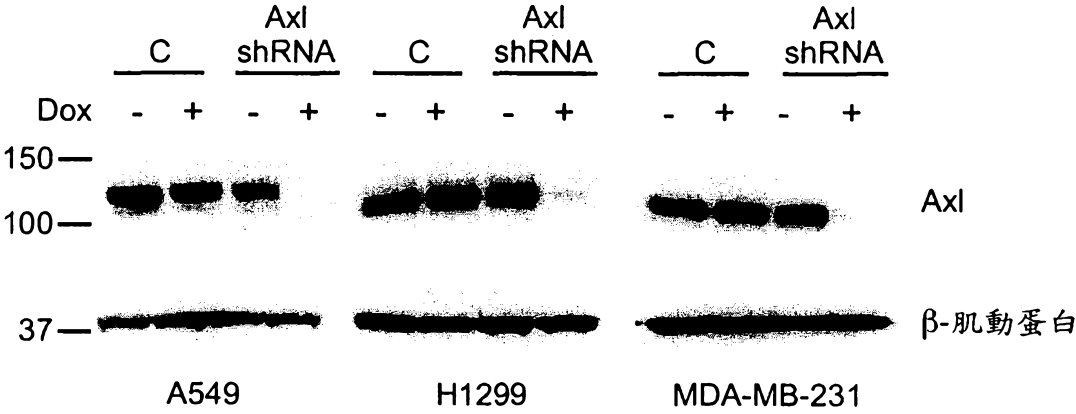


圖2A

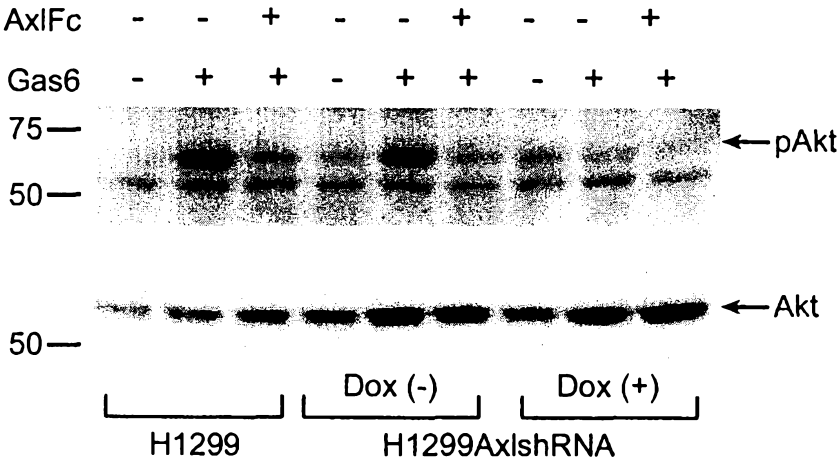


圖2B

圖 2C

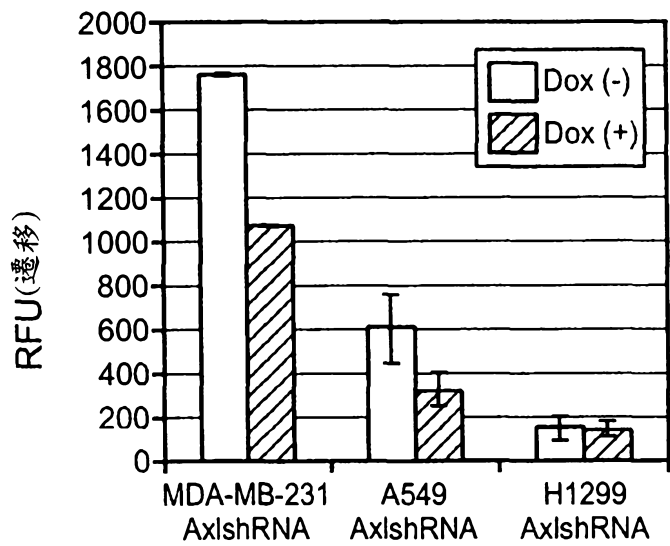
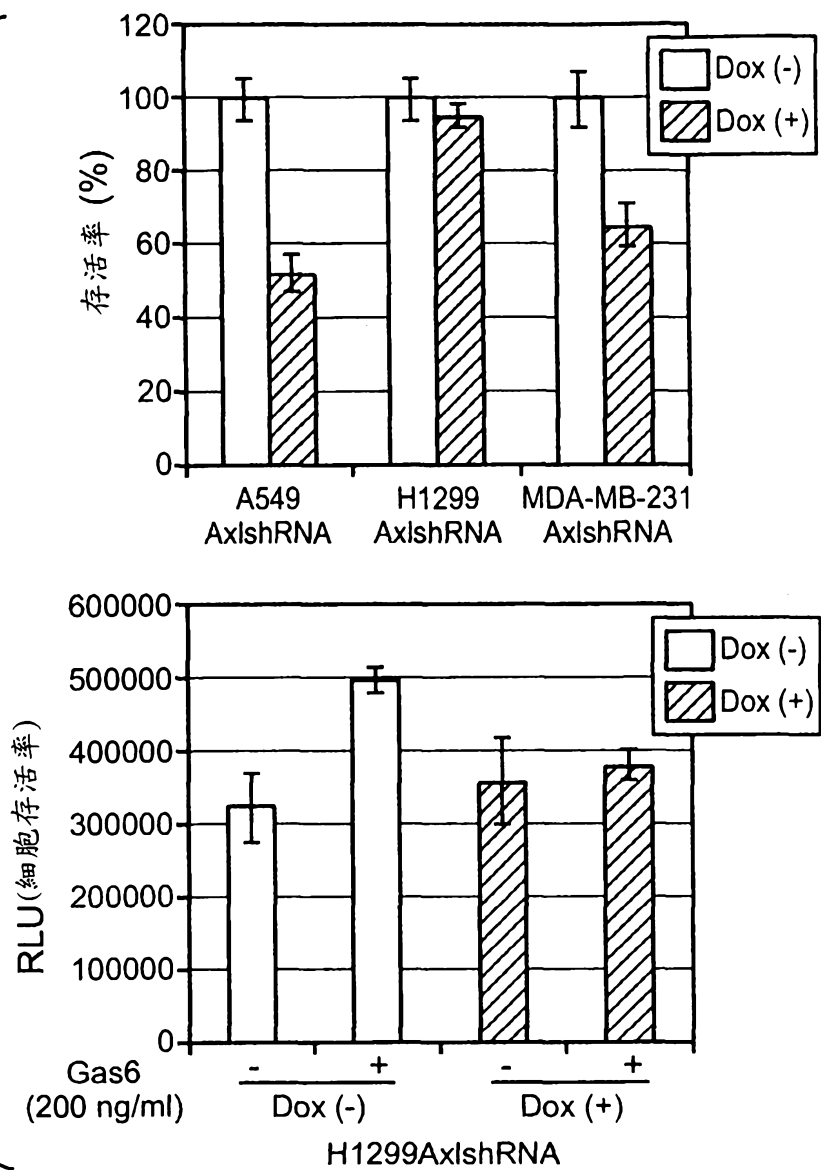


圖 2D

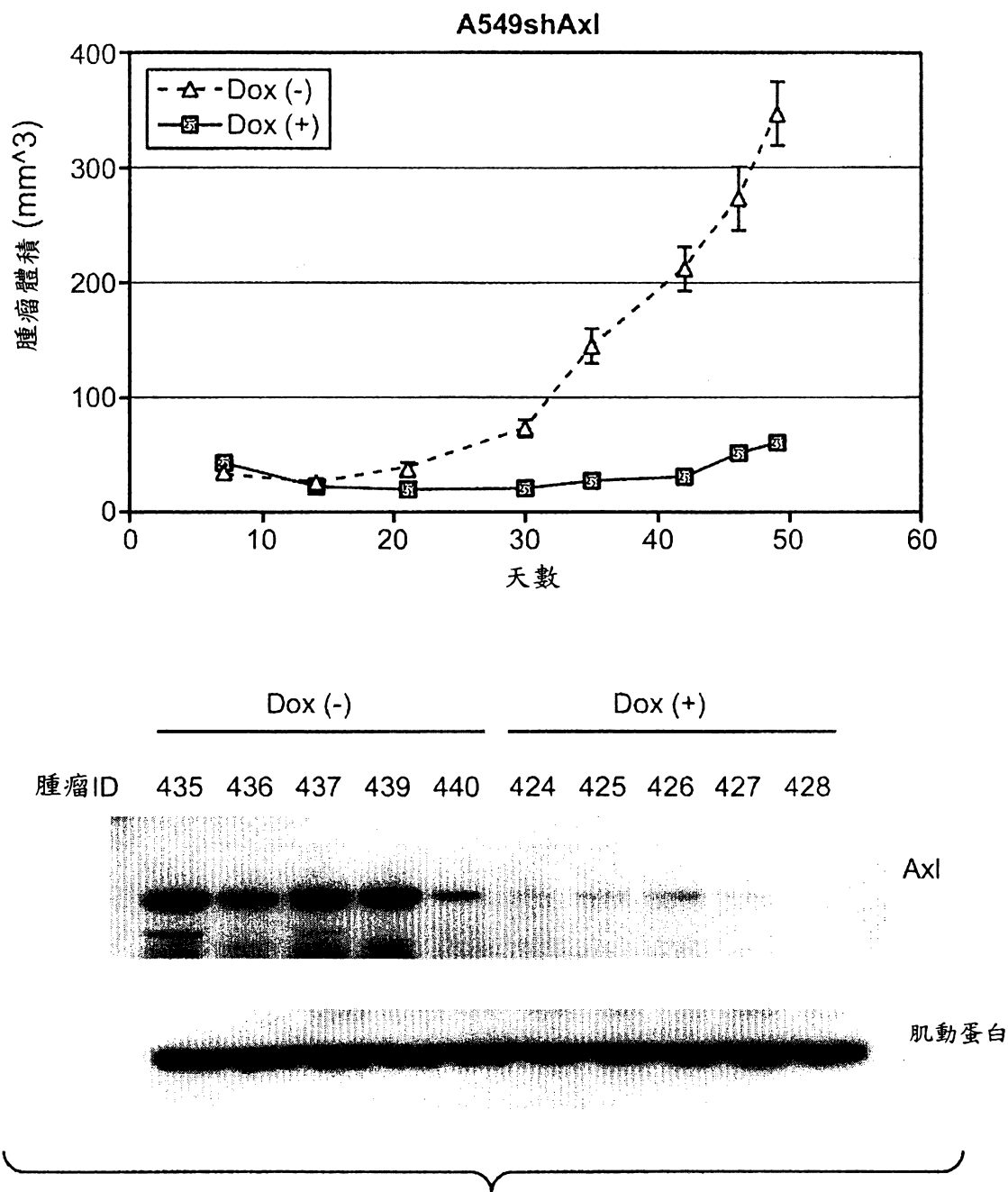


圖3A

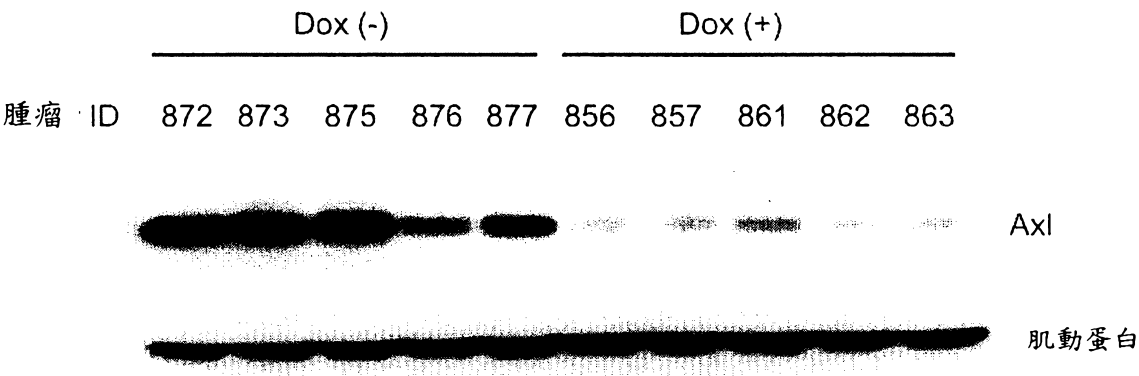
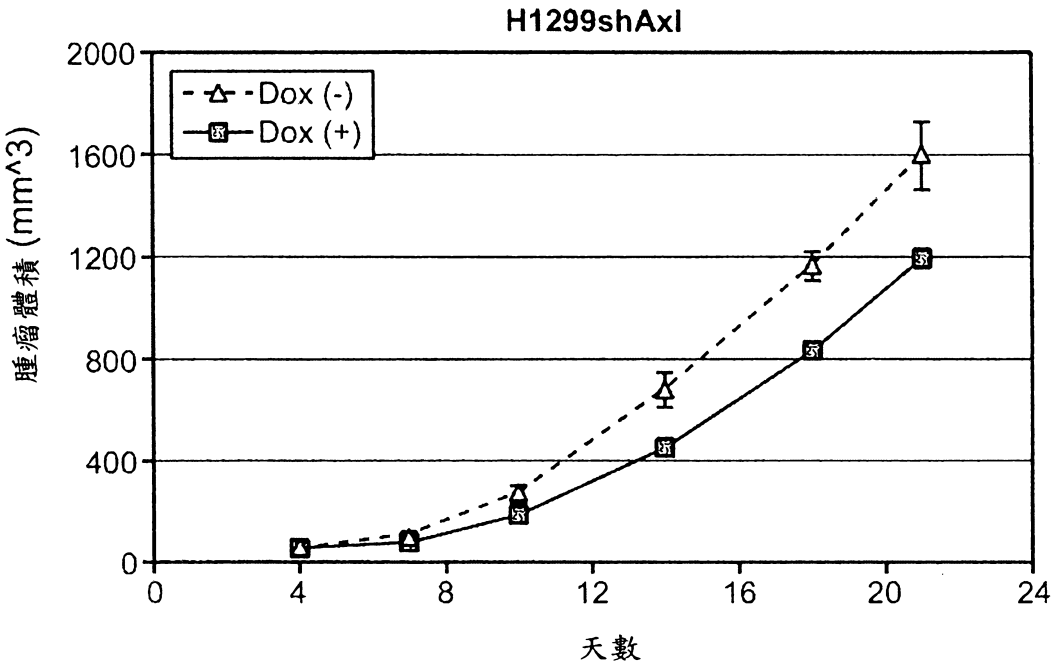


圖 3B

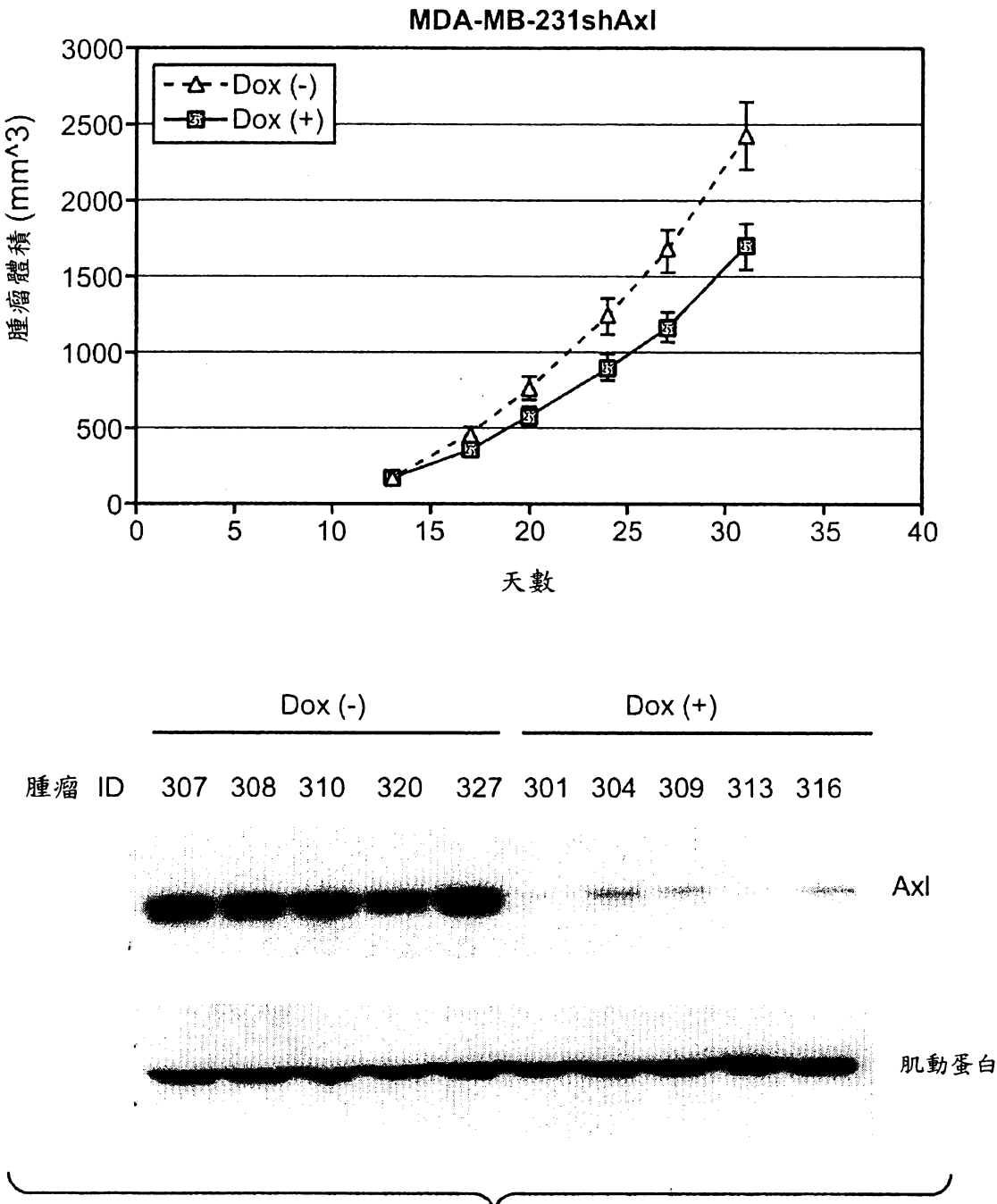


圖3C

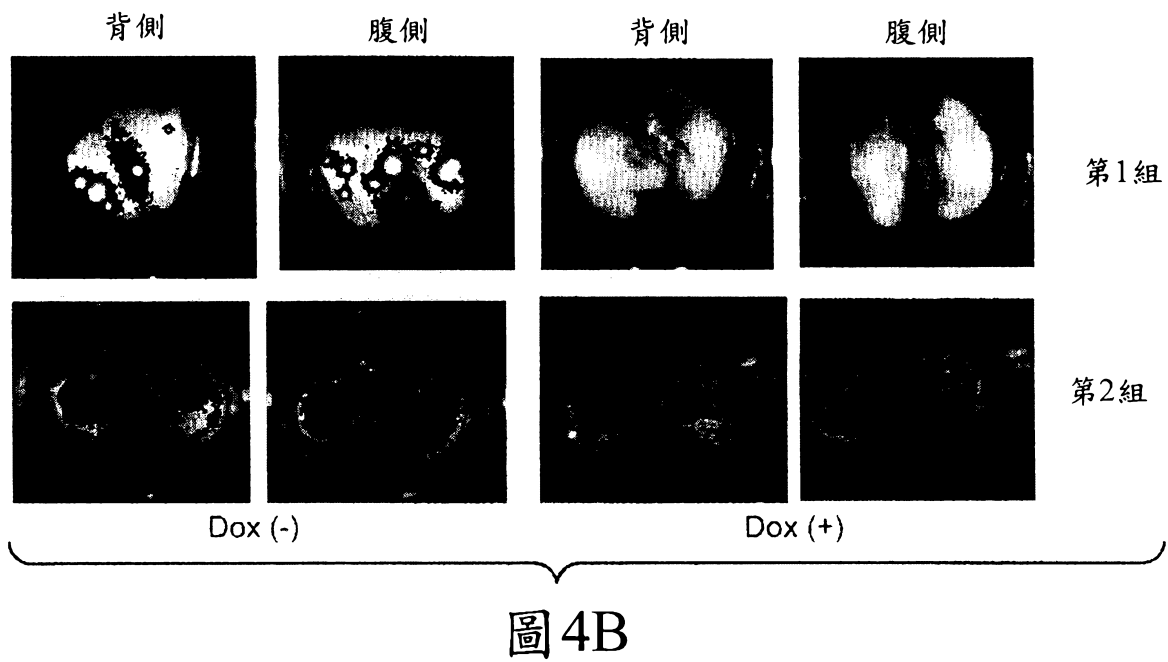
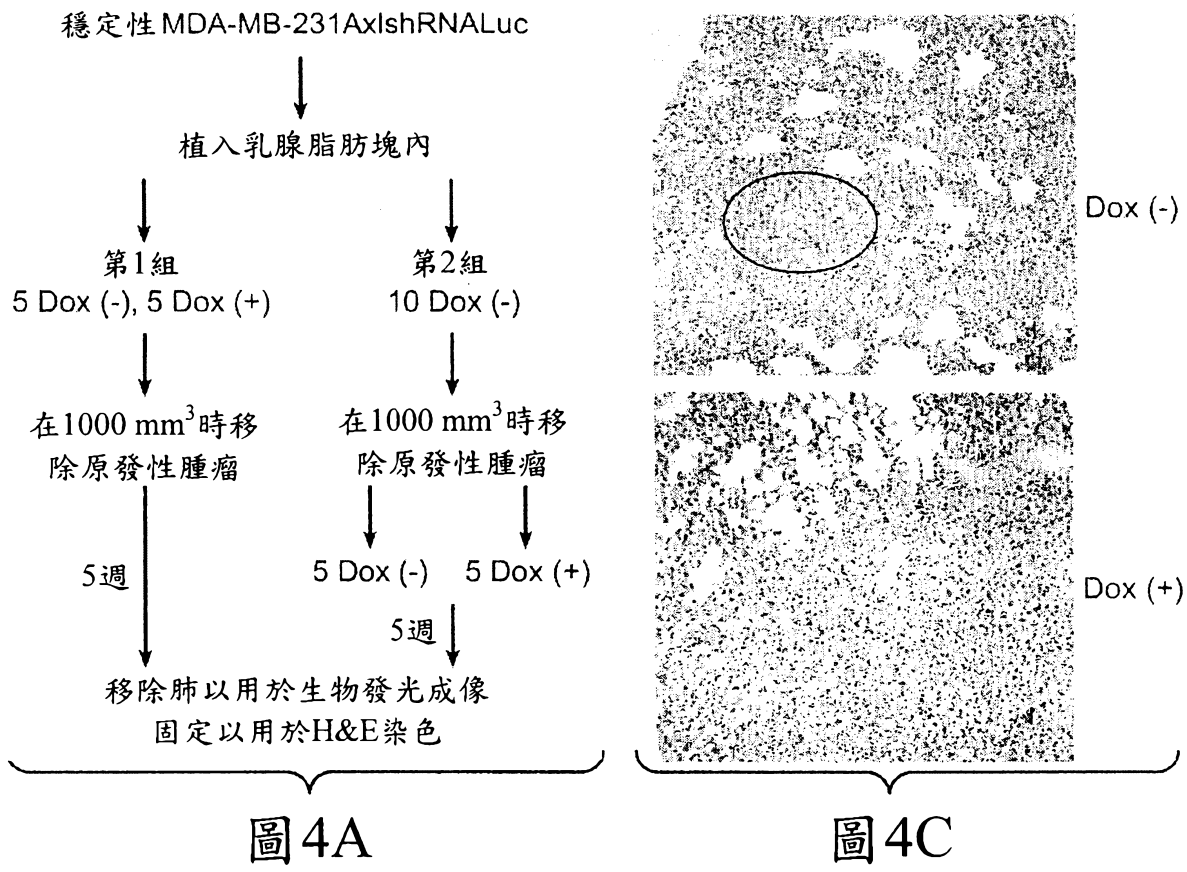


圖 5A

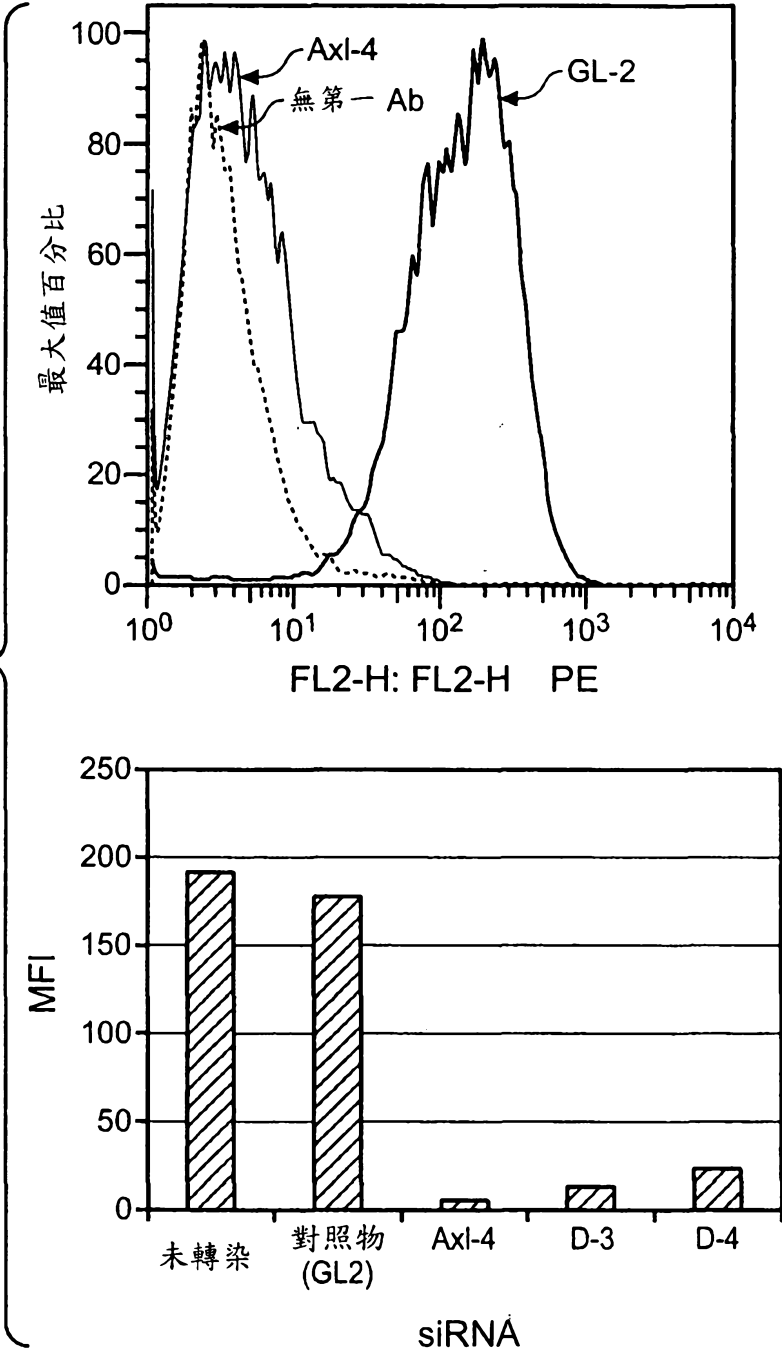
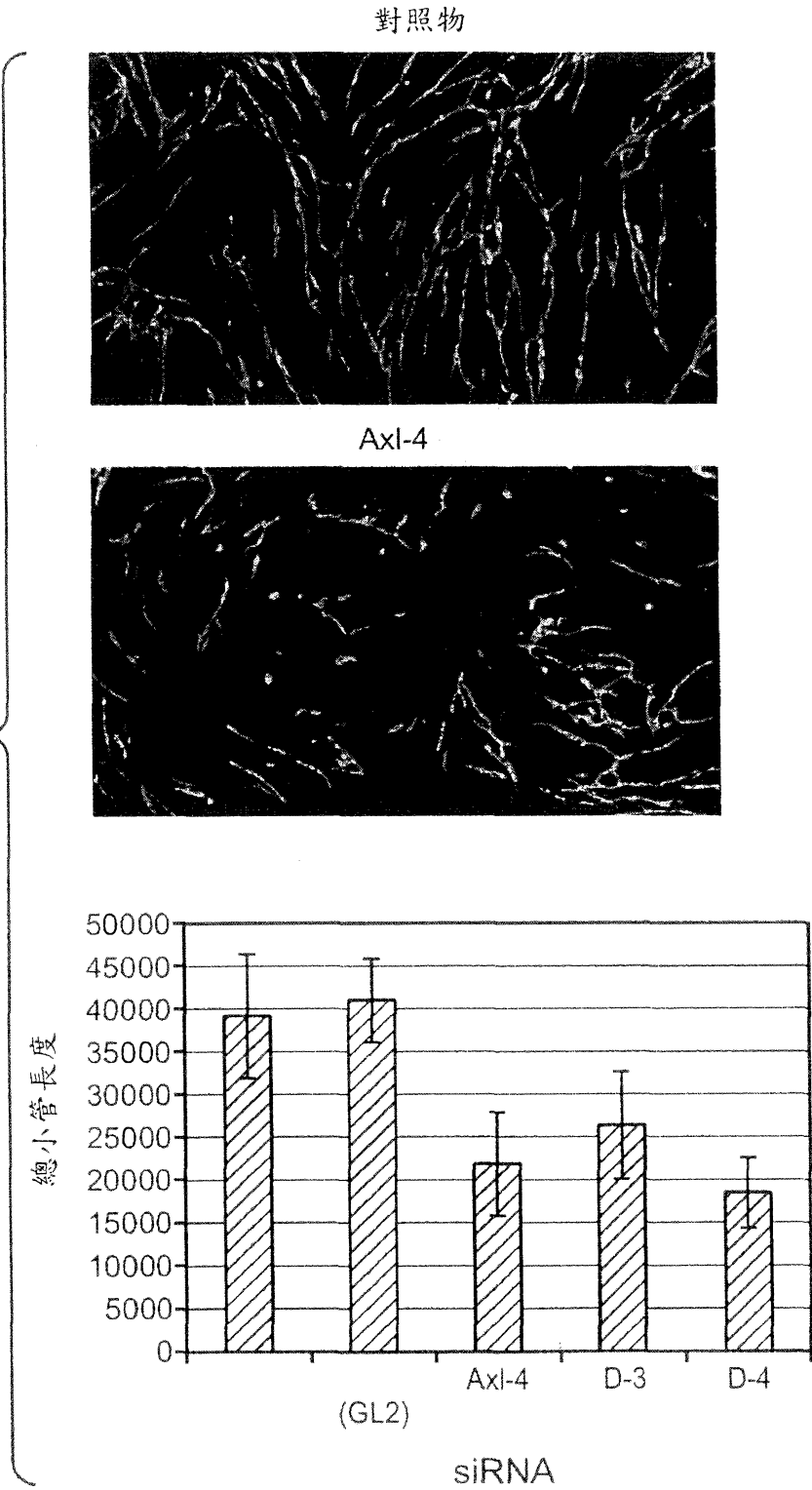


圖 5B



上調	下調
MYCN (9.1)	IFI44L (-98)
HLX (4.5)	GJA4 (-56)
GAS7 (4.5)	Axl (-20)
HDAC9 (4.1)	IFIT1 (-14)
E2F1 (3.9)	SCG5 (-8.2)
CXCR4 (3.6)	CYTL1 (-8.1)
PMCH (3.4)	DPP4 (-7.3)
ANG-2 (3.3)	DKK3 (-5.3)

圖6A

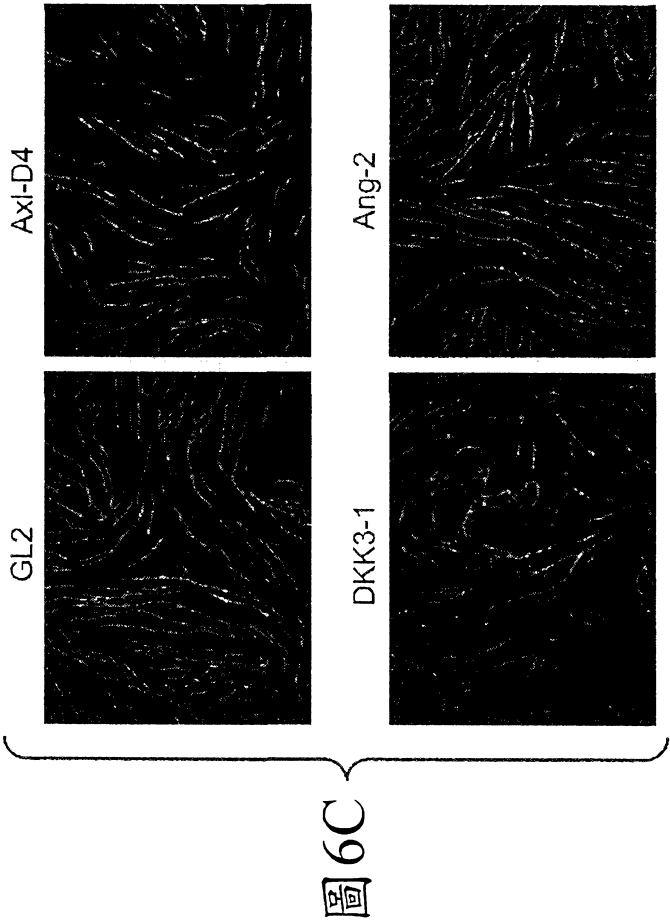
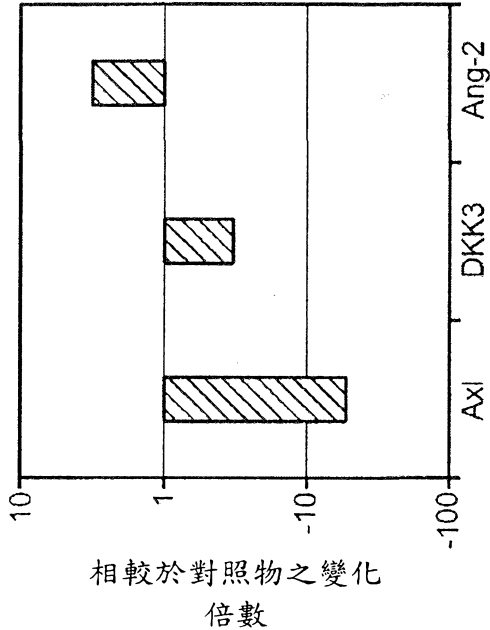
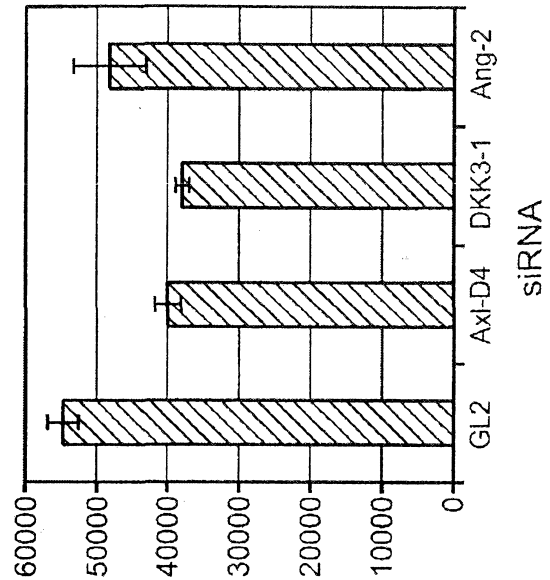


圖6B



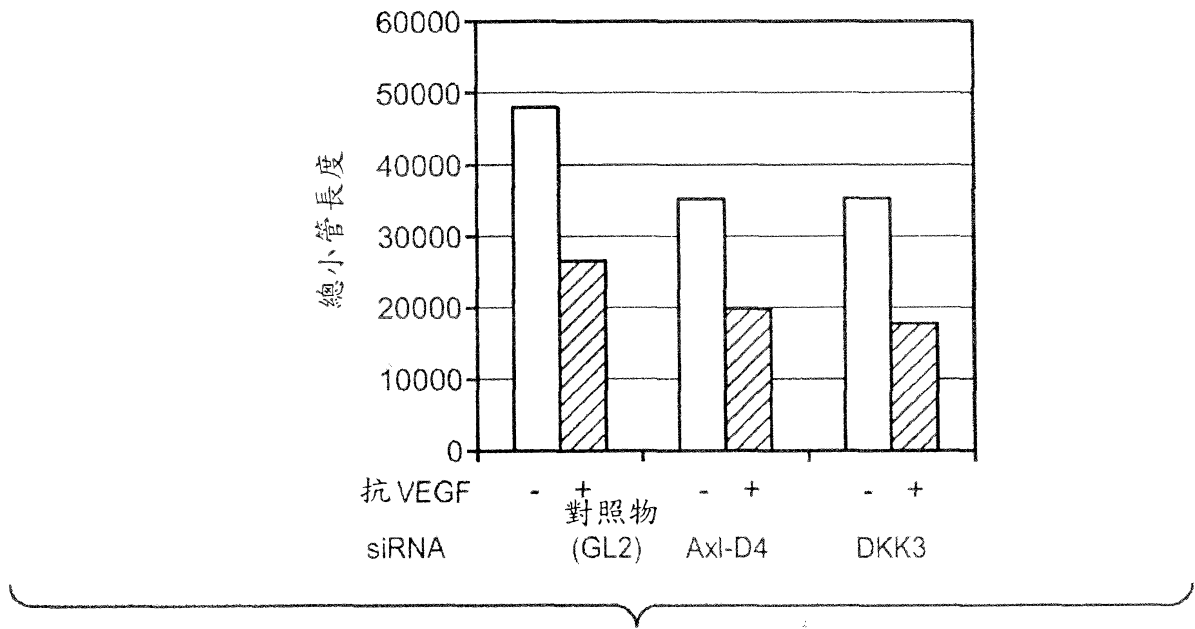
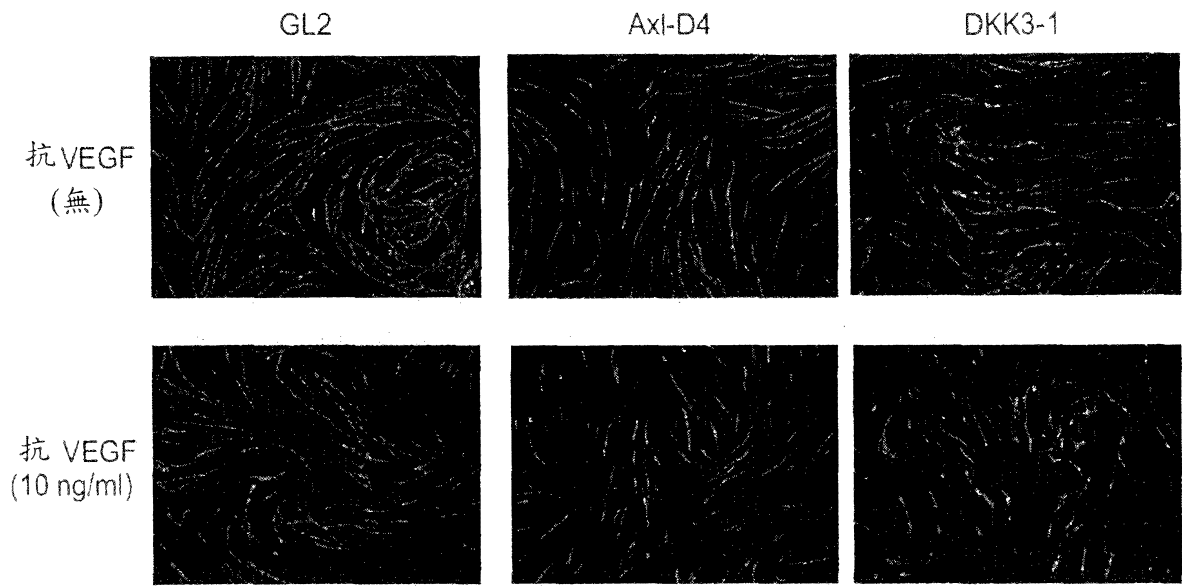


圖 7

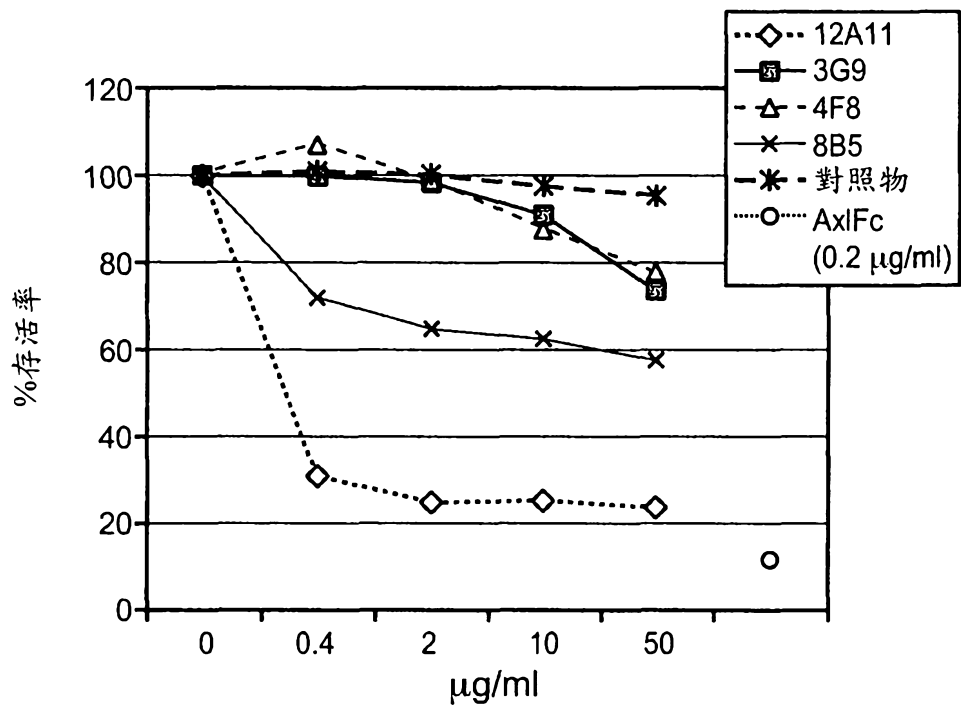


圖 8A

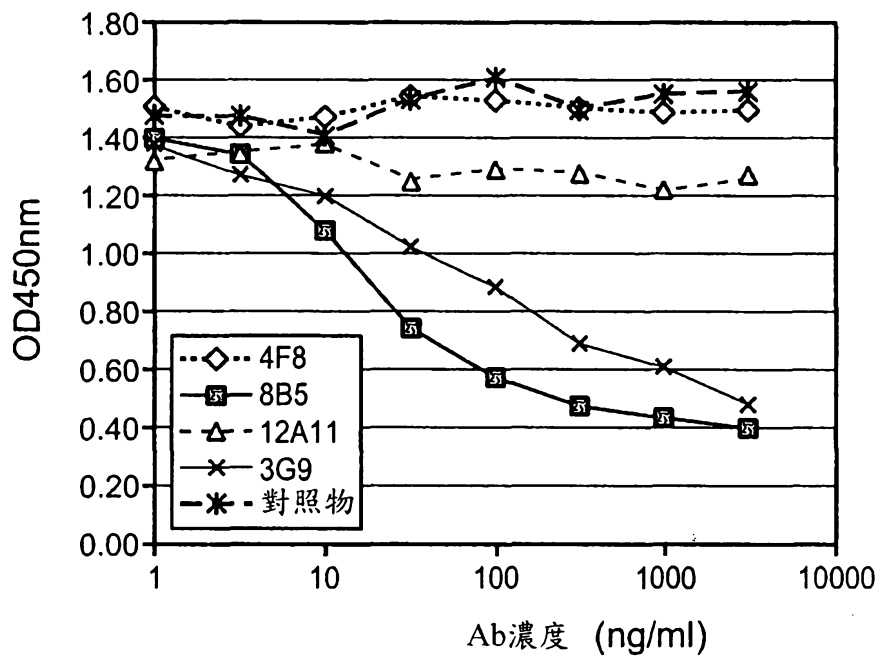


圖 8B-1

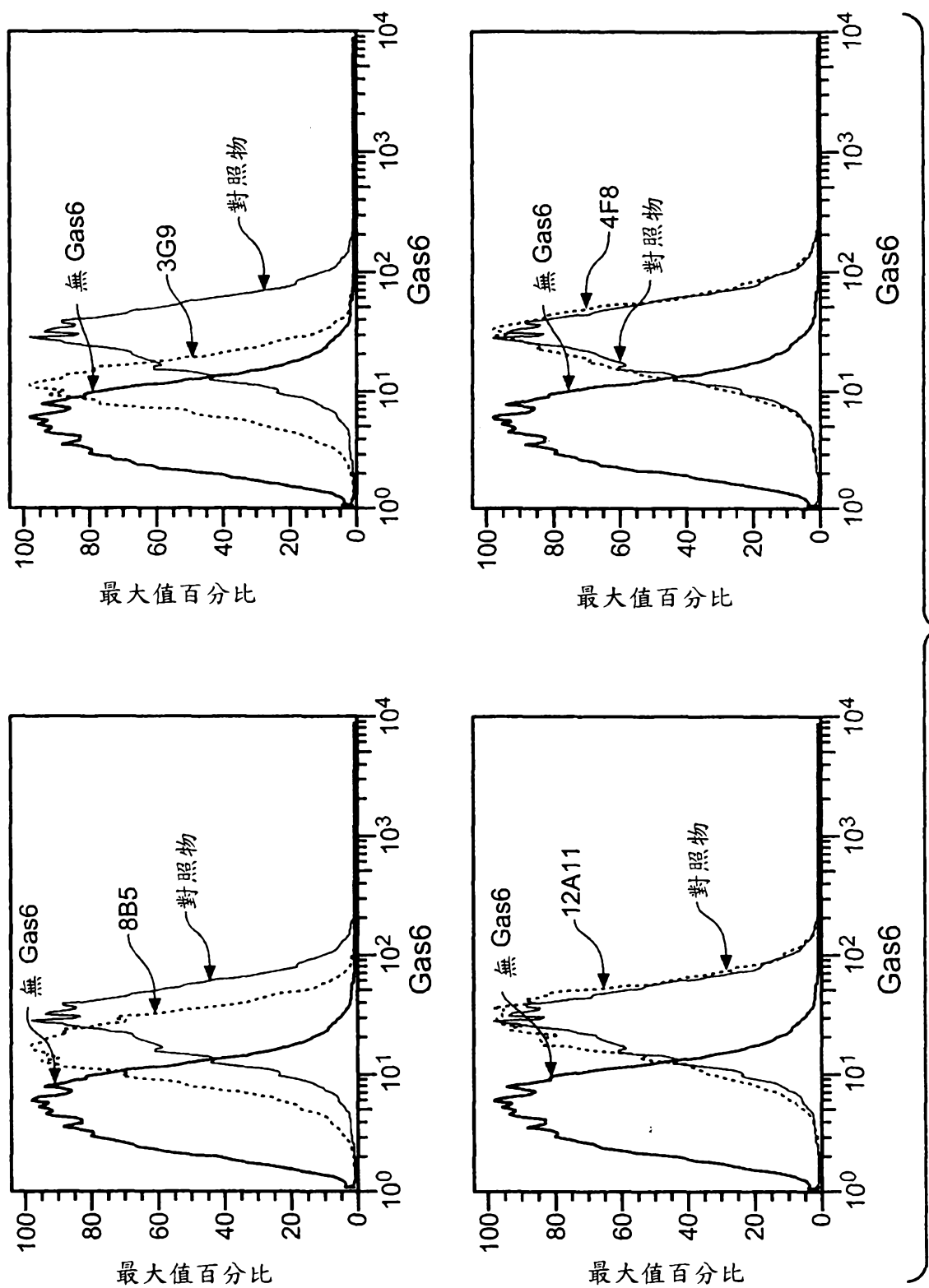
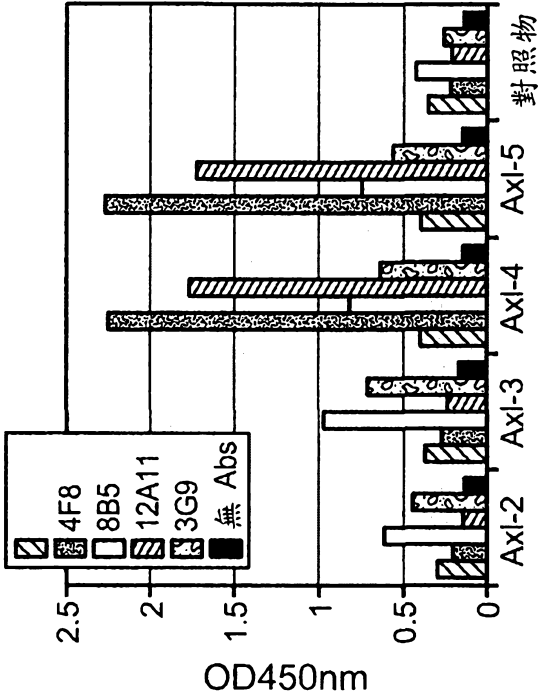
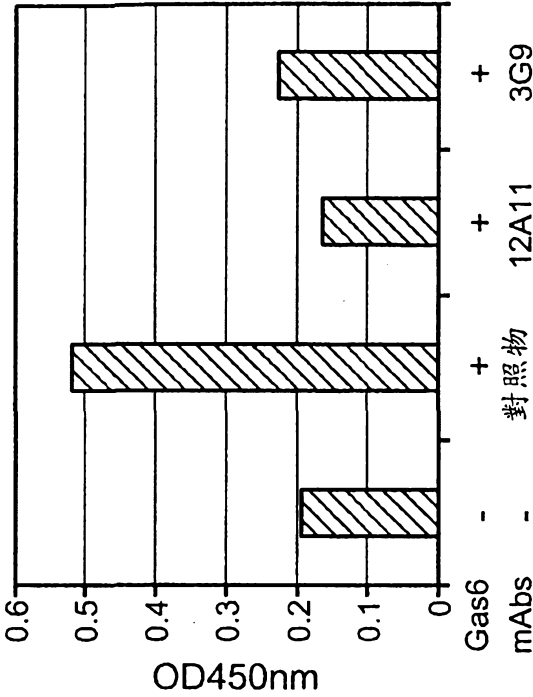
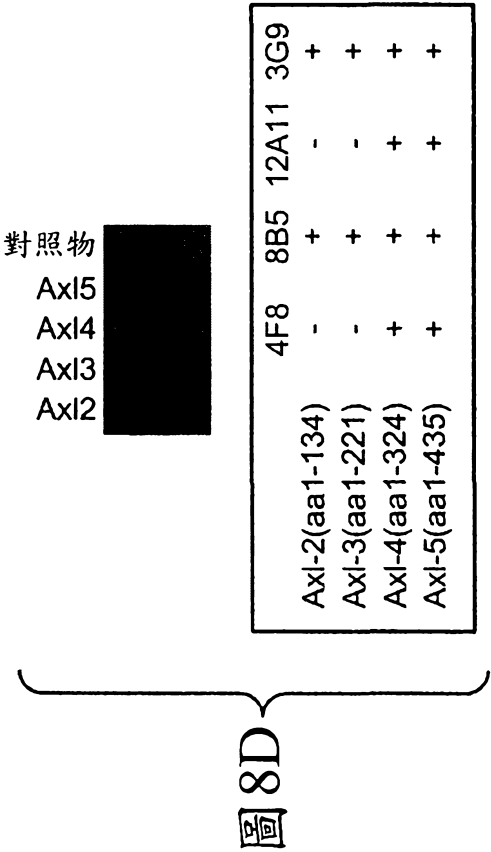
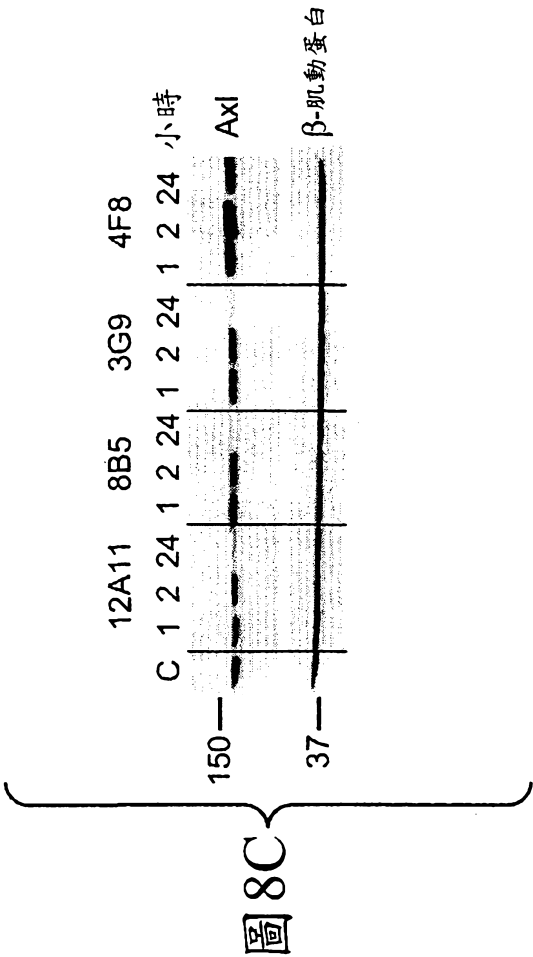


圖8B-2



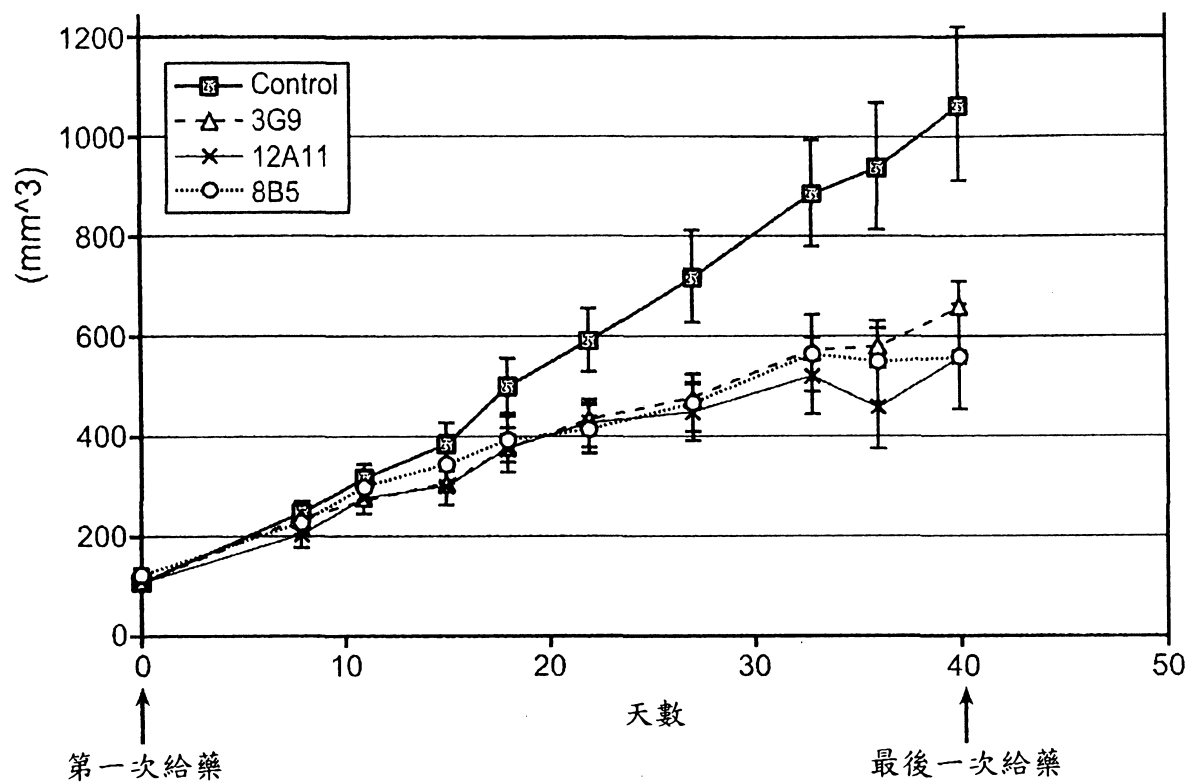


圖9A

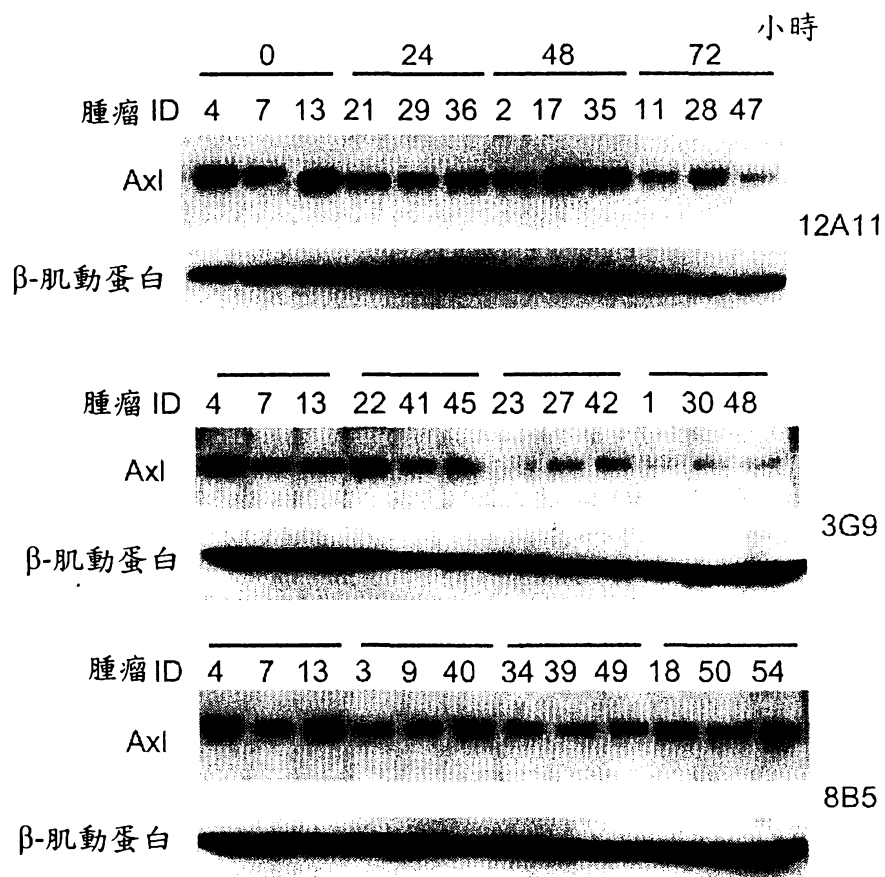
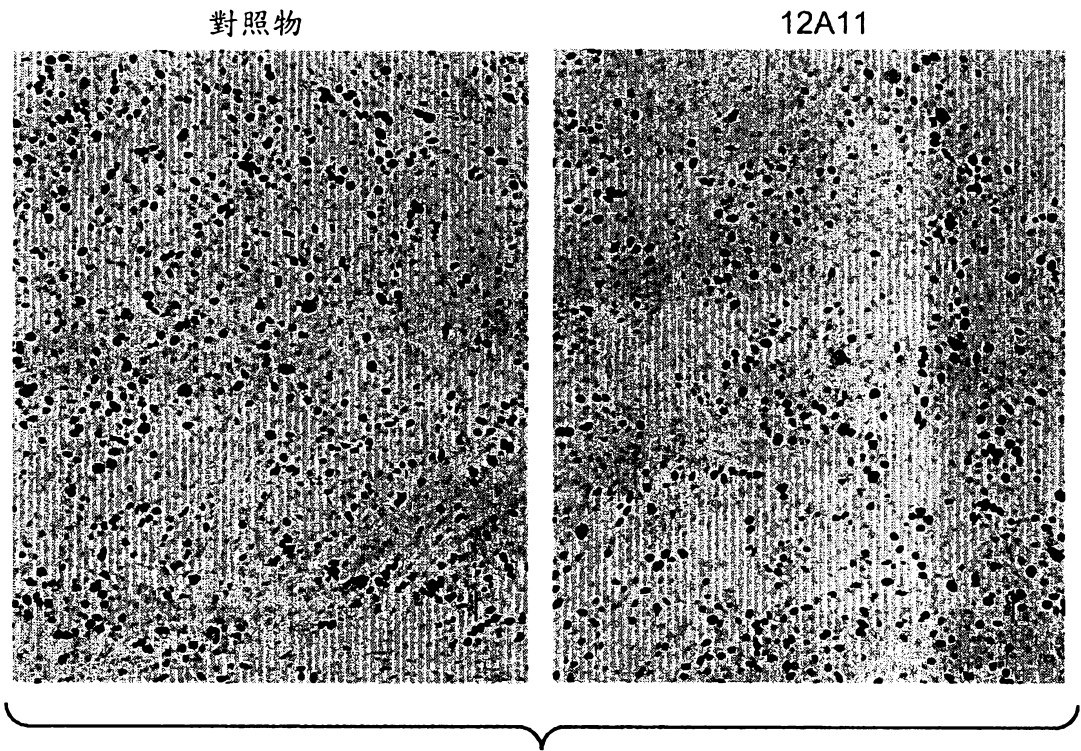


圖9B



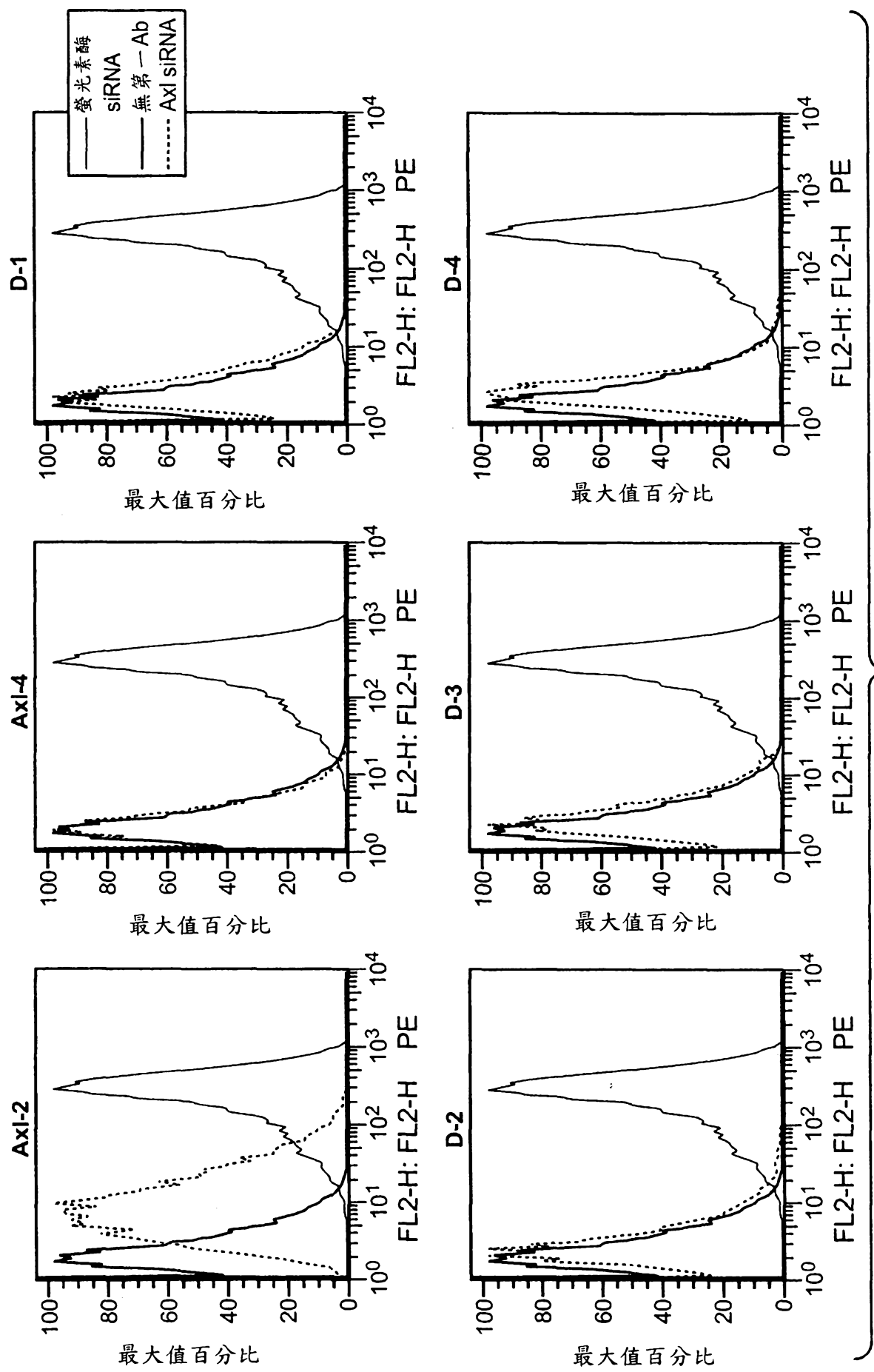


圖10A-1

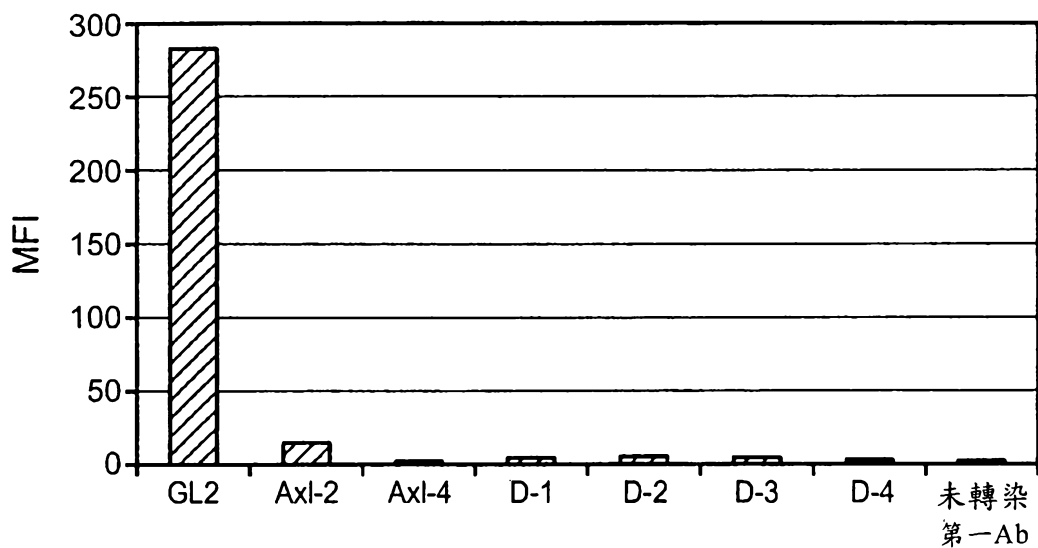


圖 10A-2

螢光素酶 GL2 siRNA	
前向：	CGU ACG CGG AAU ACU UCG ATT
反向：	UCG AAG UAU UCC GCG UAC GTT
Dharmacon-1	
前向：	GAA AGA AGG AGA CCC GTT ATT
反向：	TAA CGG GTC TCC TTC TTT CTT
Dharmacon-2	
前向：	CCA AGA AGA TCT ACA ATG GTT
反向：	CCA TTG TAG ATC TTC TTG GTT
Dharmacon-3	
前向：	GGA ACT GCA TGC TGA ATG ATT
反向：	TCA TTC AGC ATG CAG TTC CTT
Dharmacon-4	
前向：	GAA GGA GAC CCG TTA TGG ATT
反向：	TCC ATA ACG GGT CTC CTT CTT
Axl-2	
前向：	GAC ATC CTC TTT CTC CTG CTT
反向：	GCA GGA GAA AGA GGA TGT CTT
Axl-4	
前向：	GAT TTG GAG AAC ACA CTG ATT
反向：	TCA GTG TGT TCT CCA AAT CTT

圖 10B

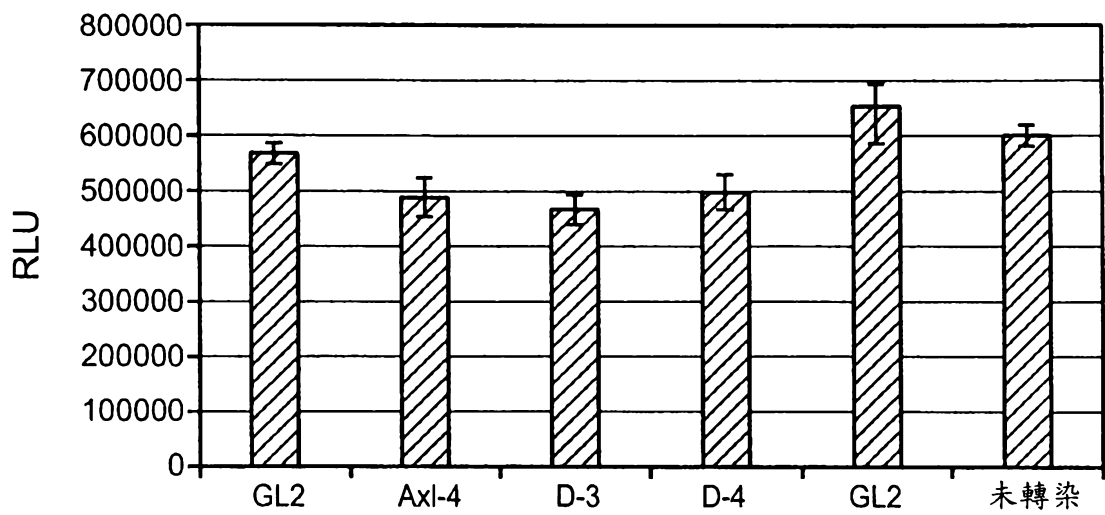


圖 10C

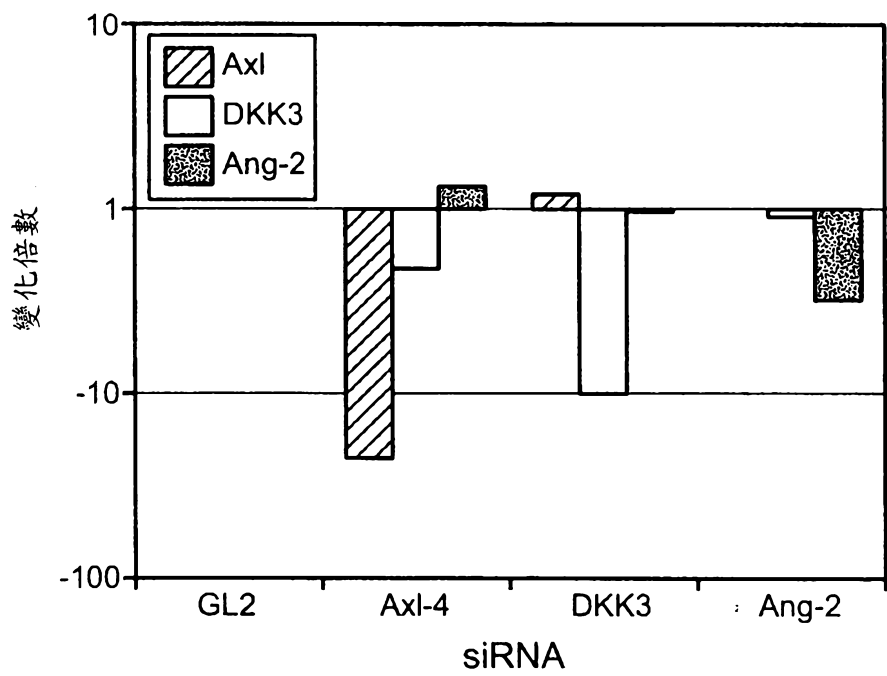


圖 11

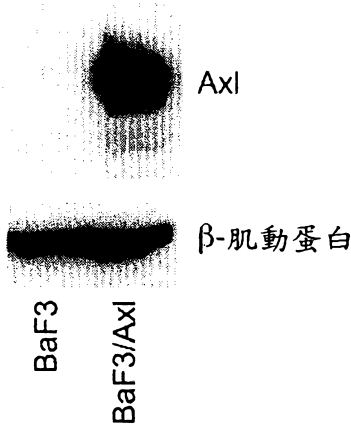


圖 12A

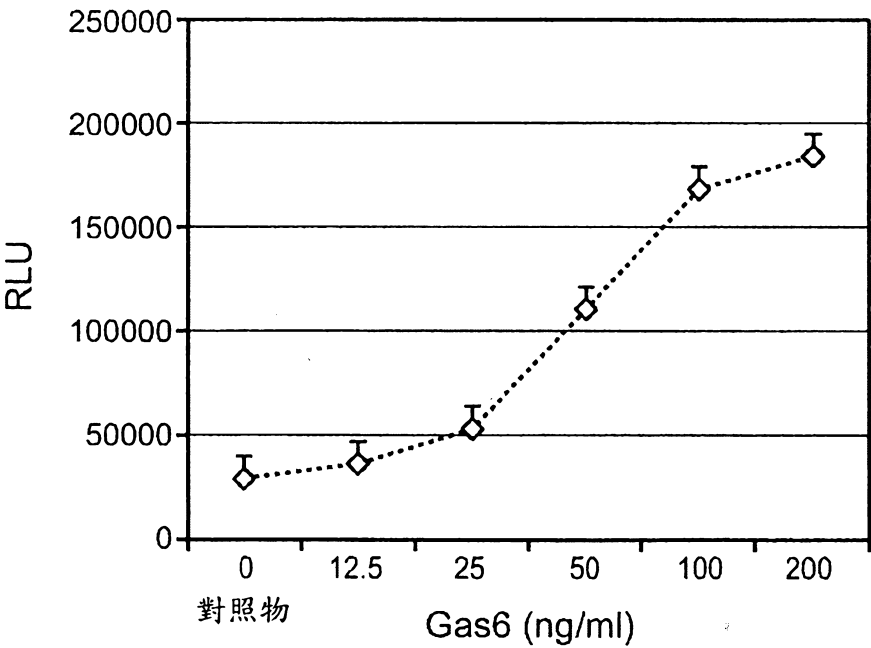


圖 12B

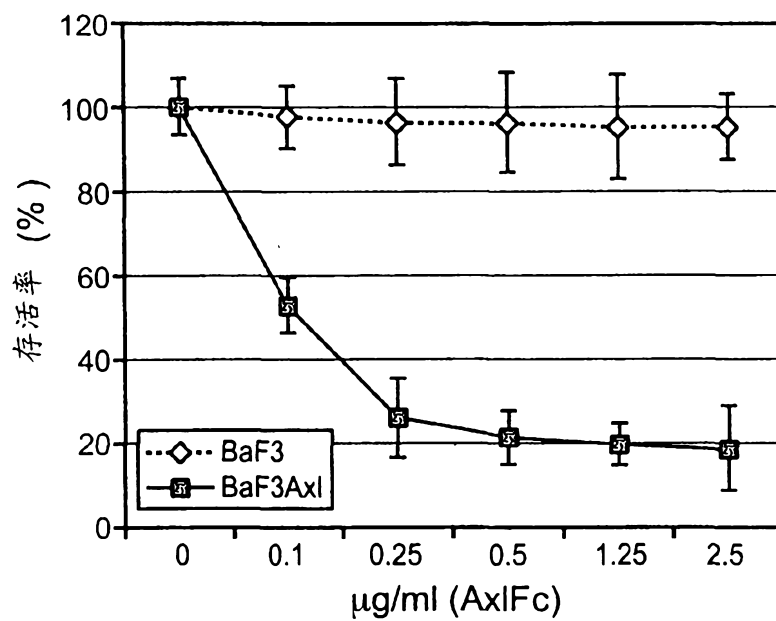


圖 12C

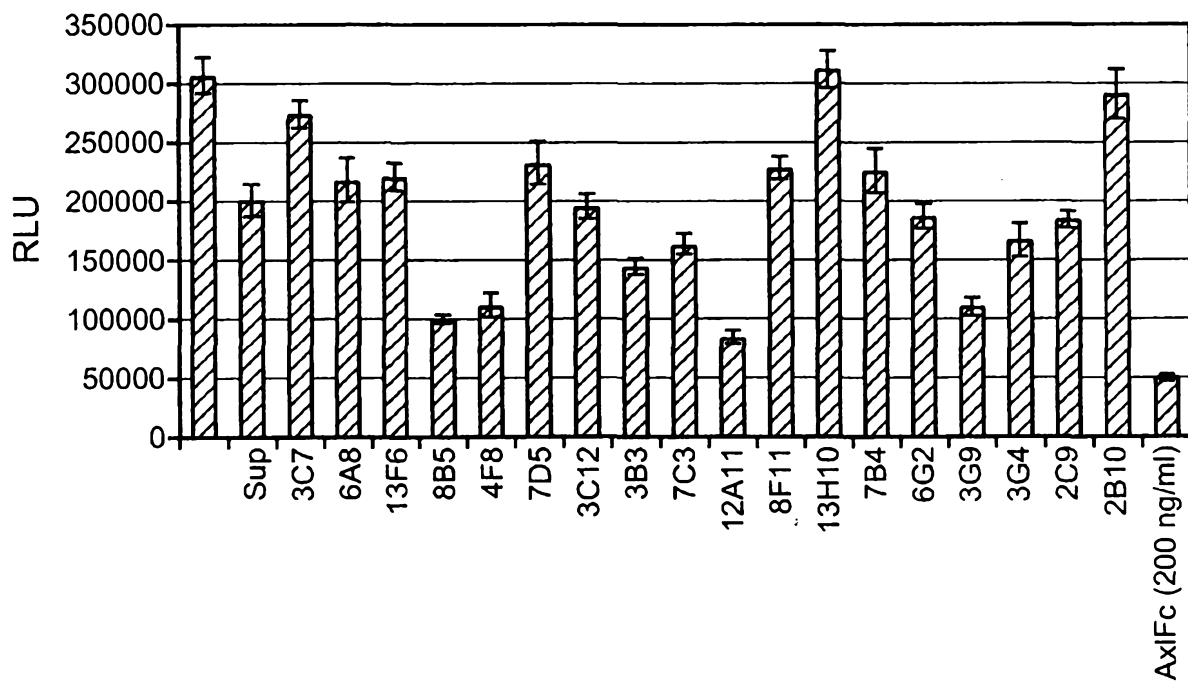


圖 12D

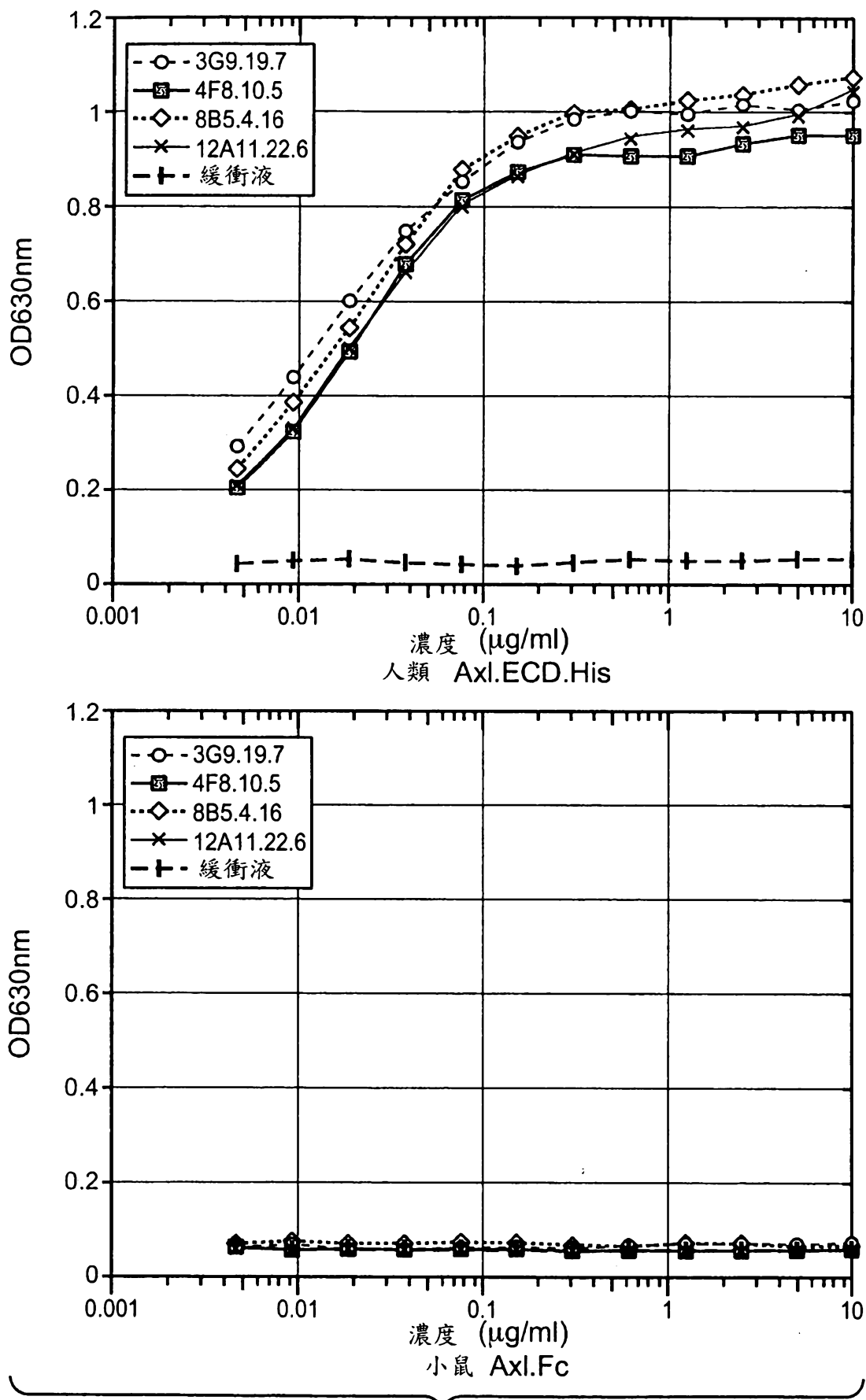


圖 13A

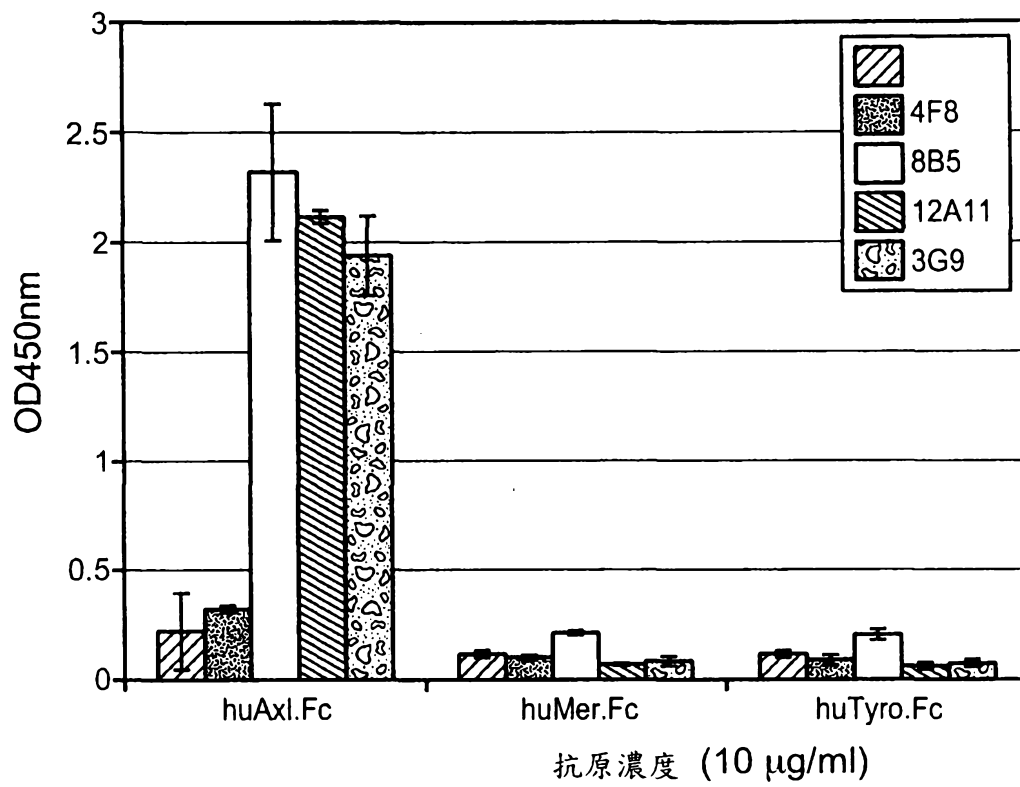


圖 13B

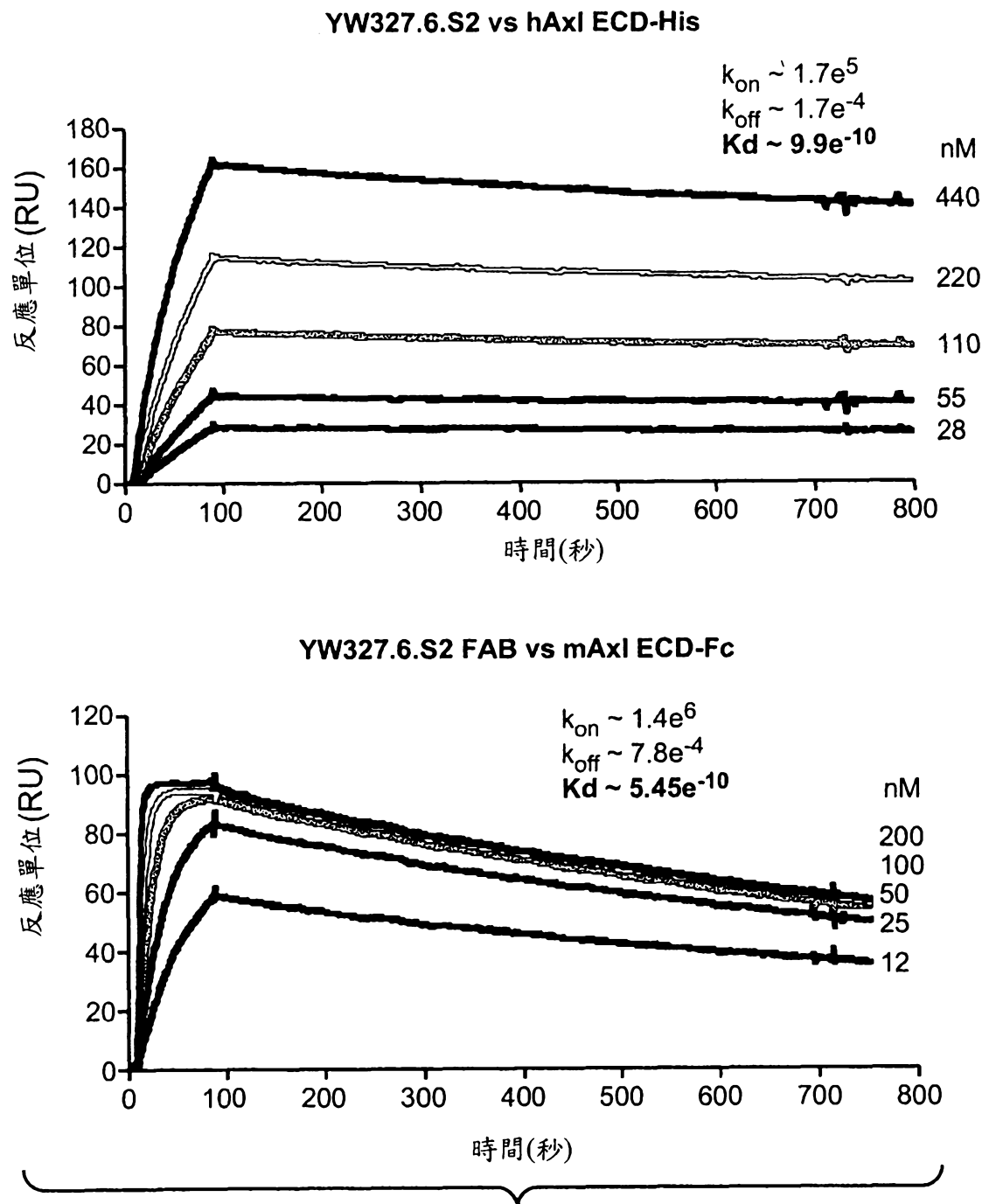


圖 14A

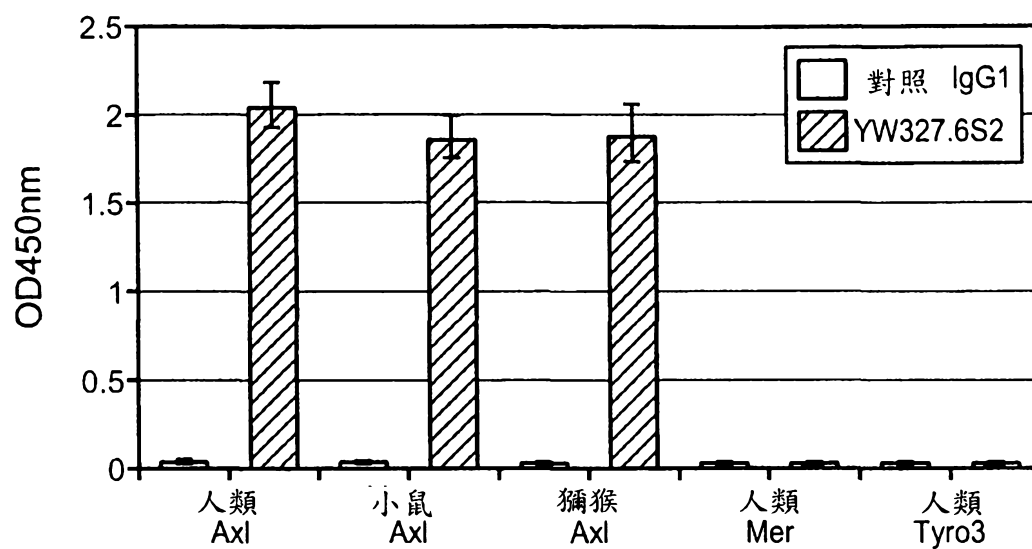


圖 14B

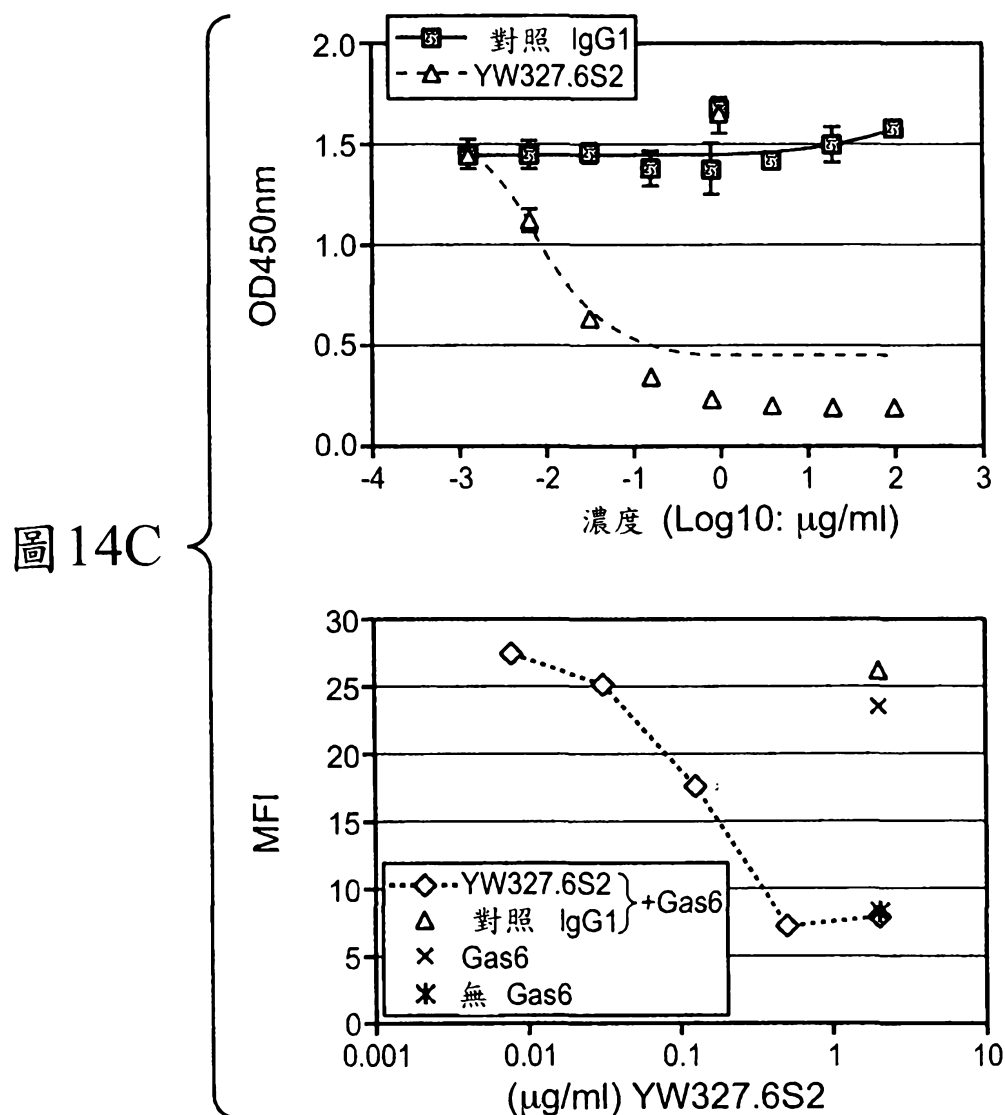


圖 14C

圖 14D

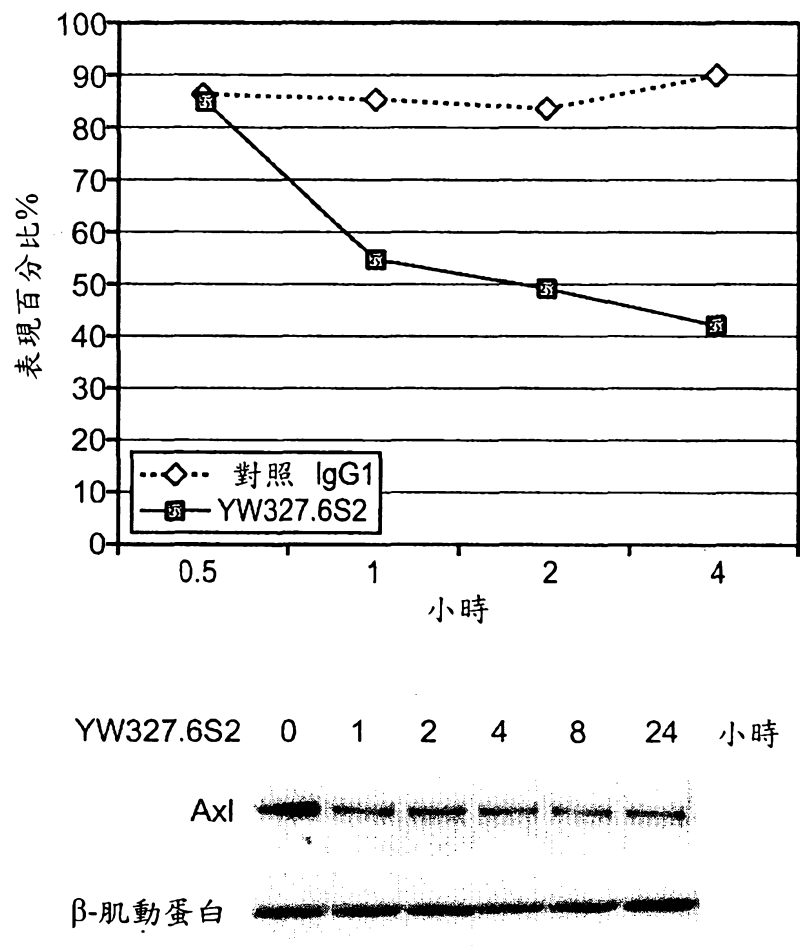


圖 14E

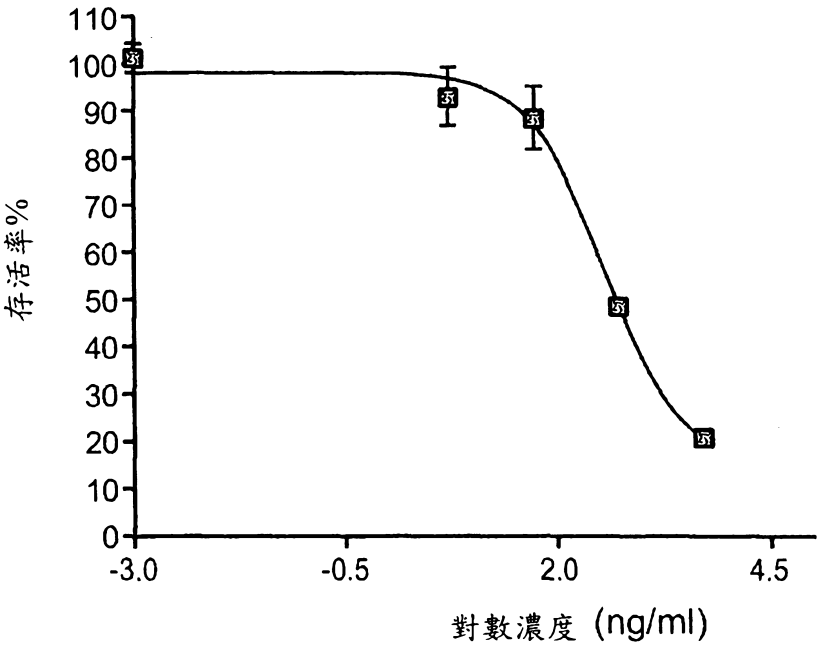
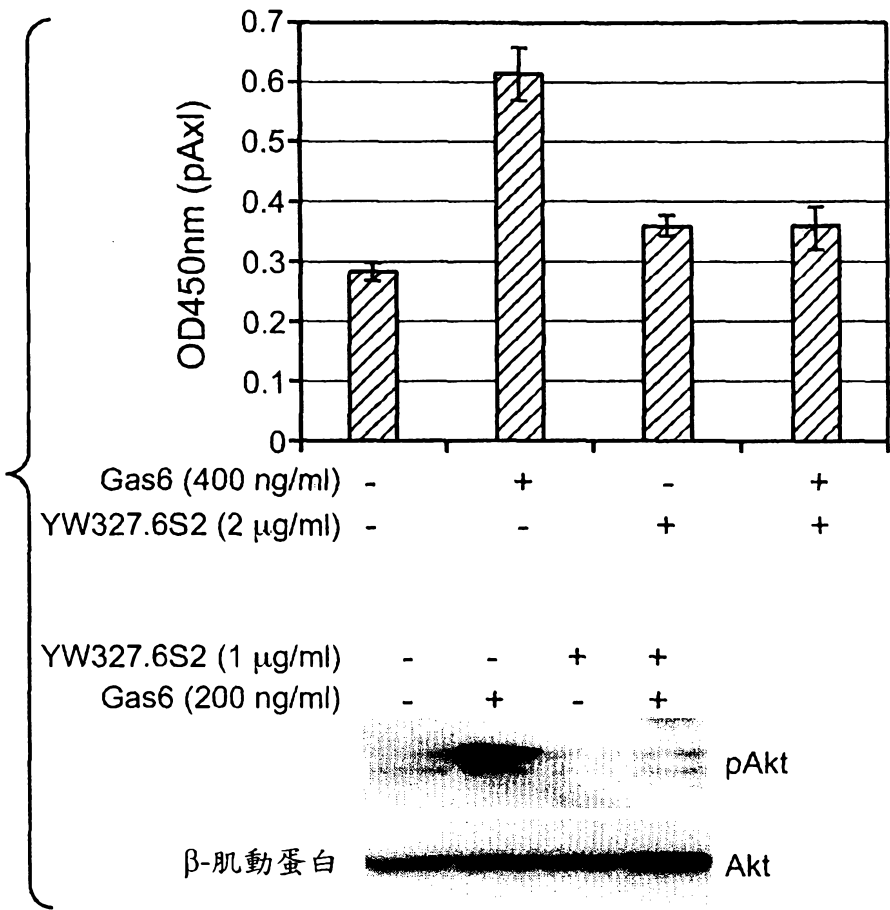


圖 14F

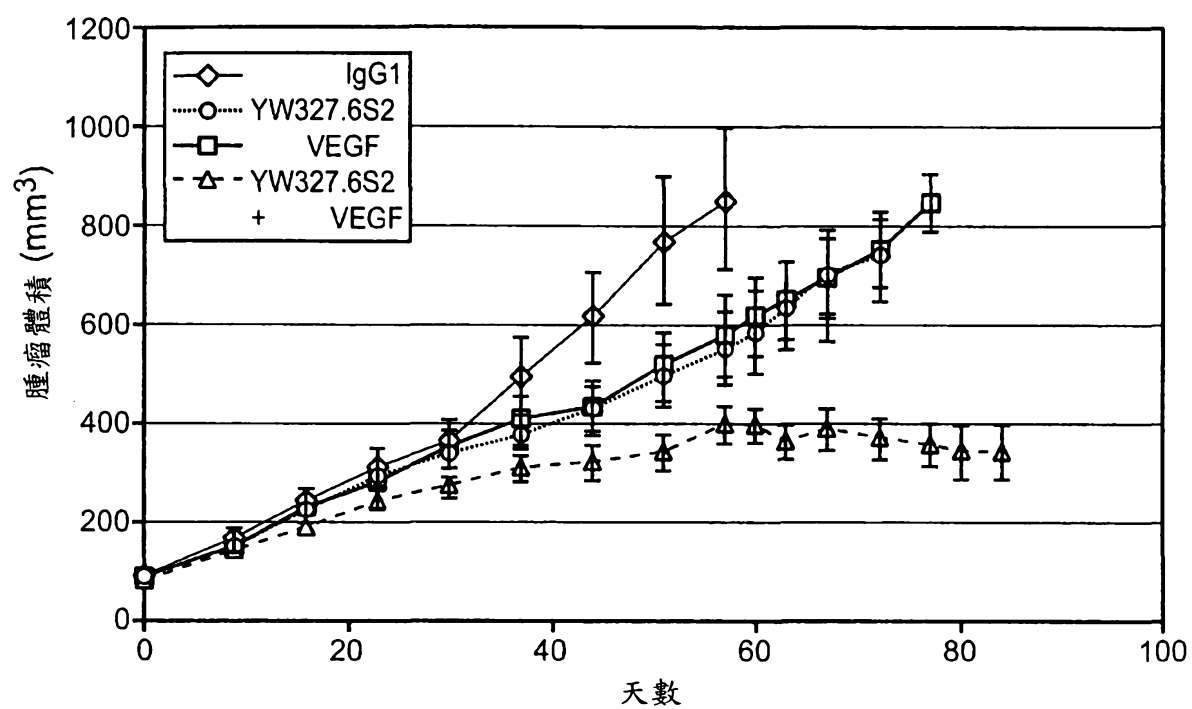


圖15A

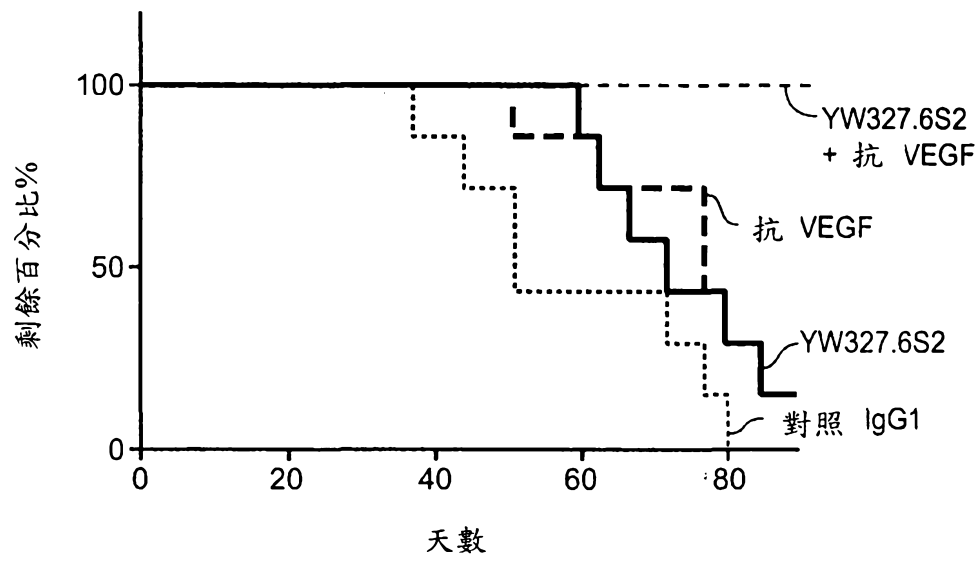


圖15B

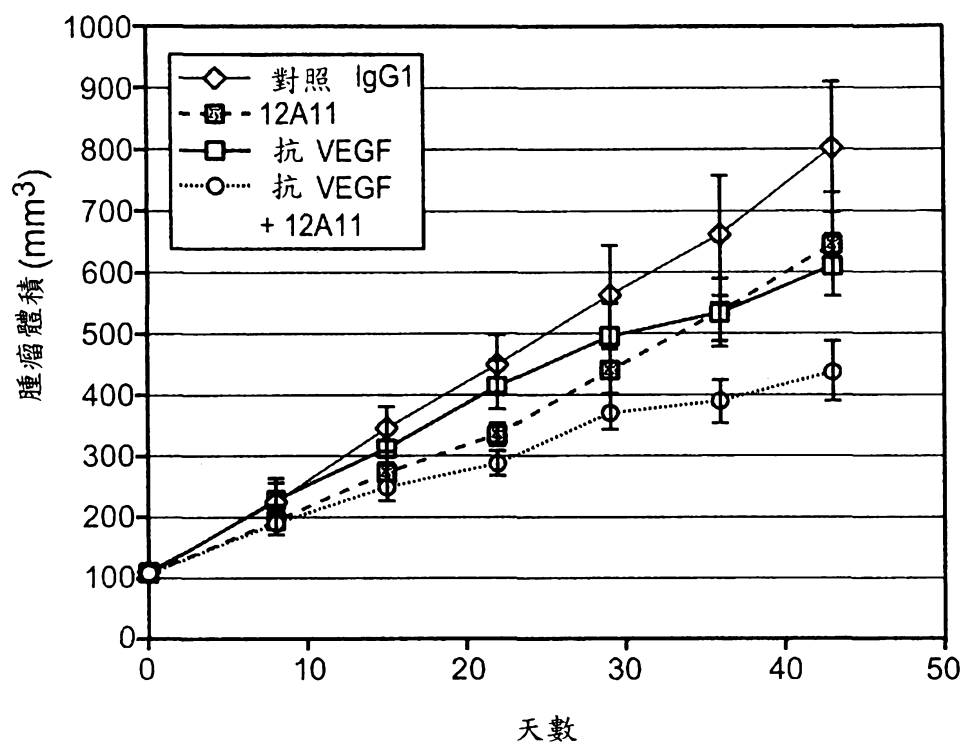


圖 15C

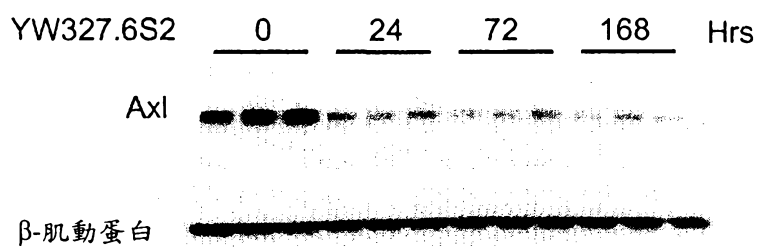


圖 15D

圖 15E

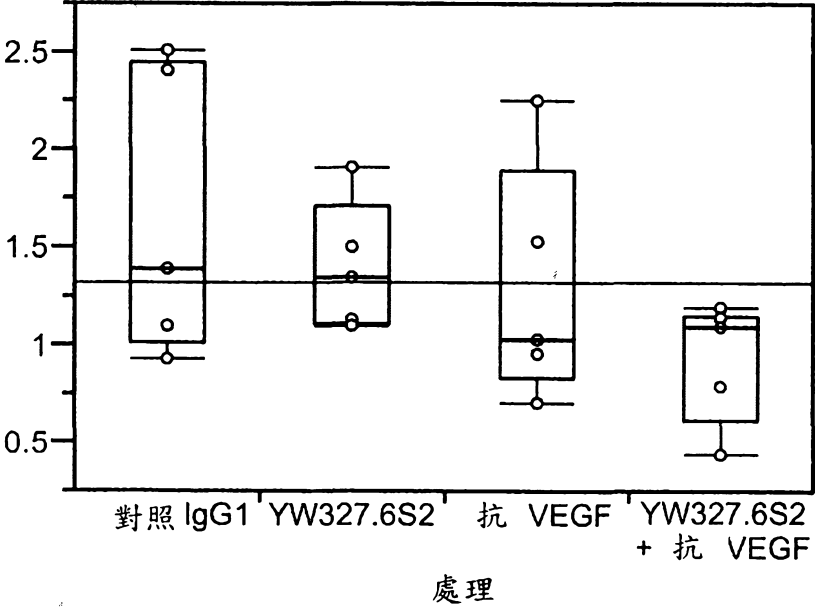
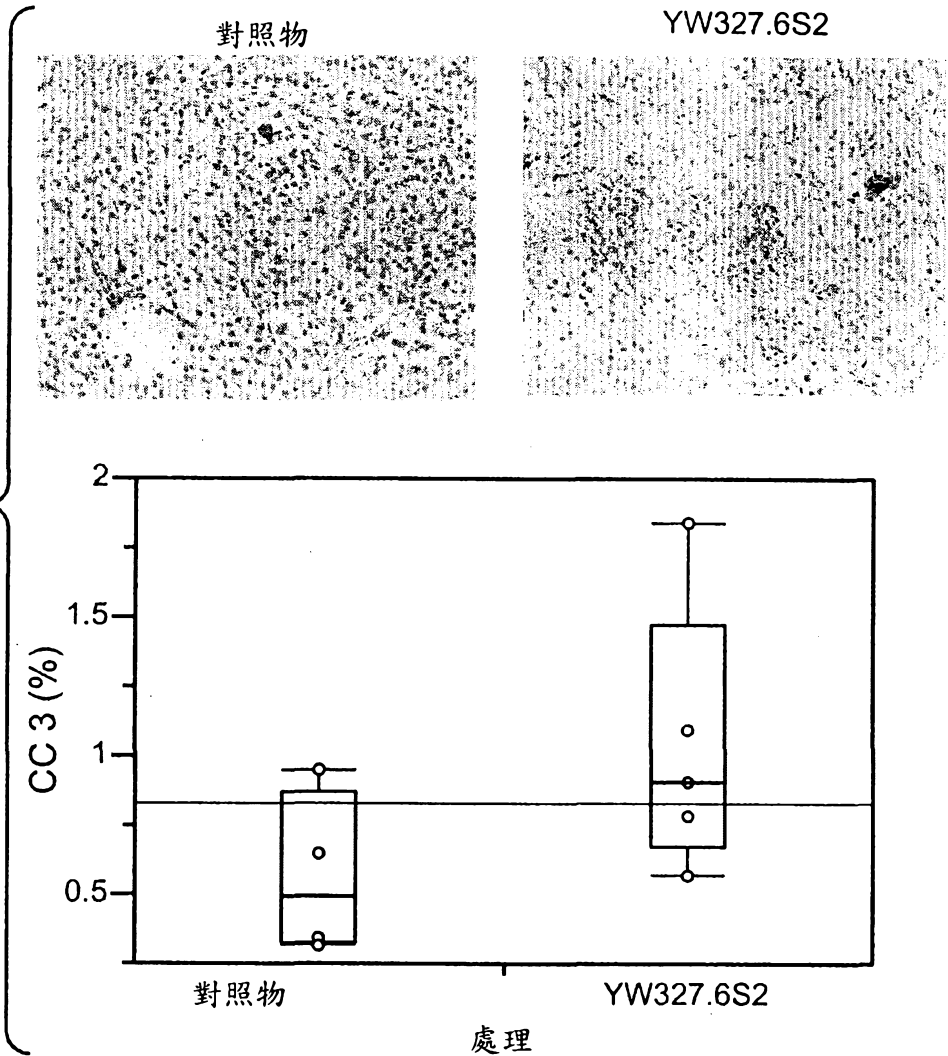


圖 15F

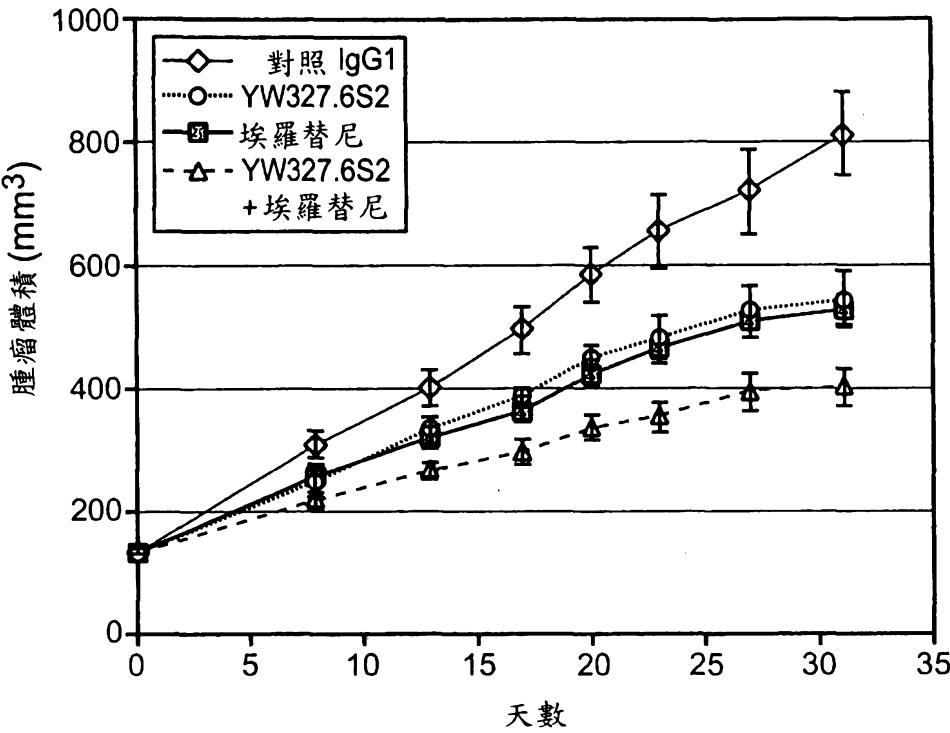


圖 16A

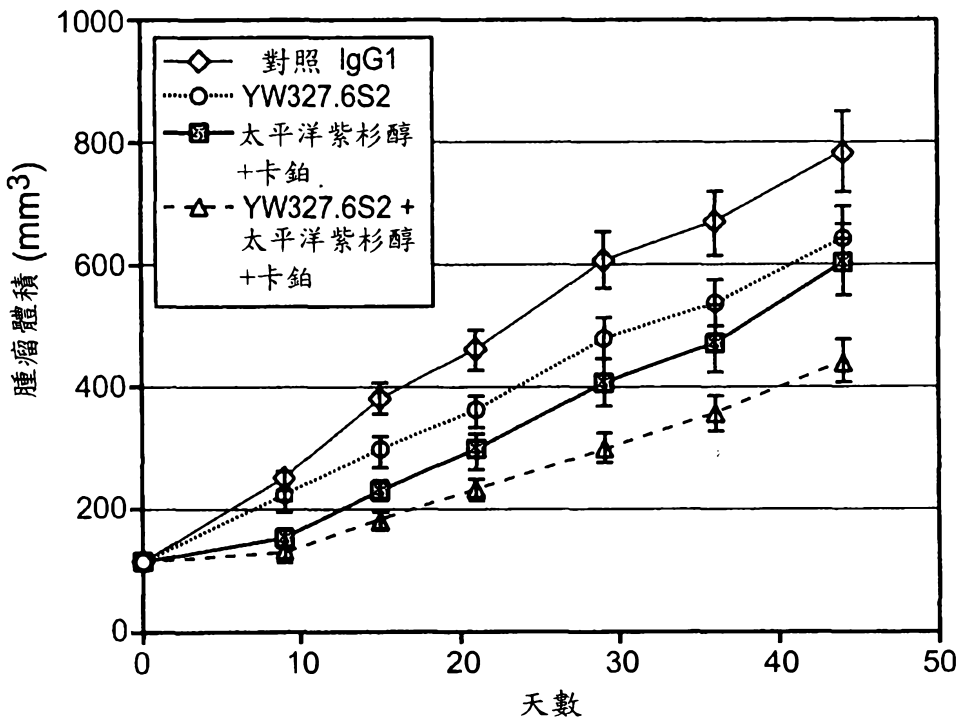
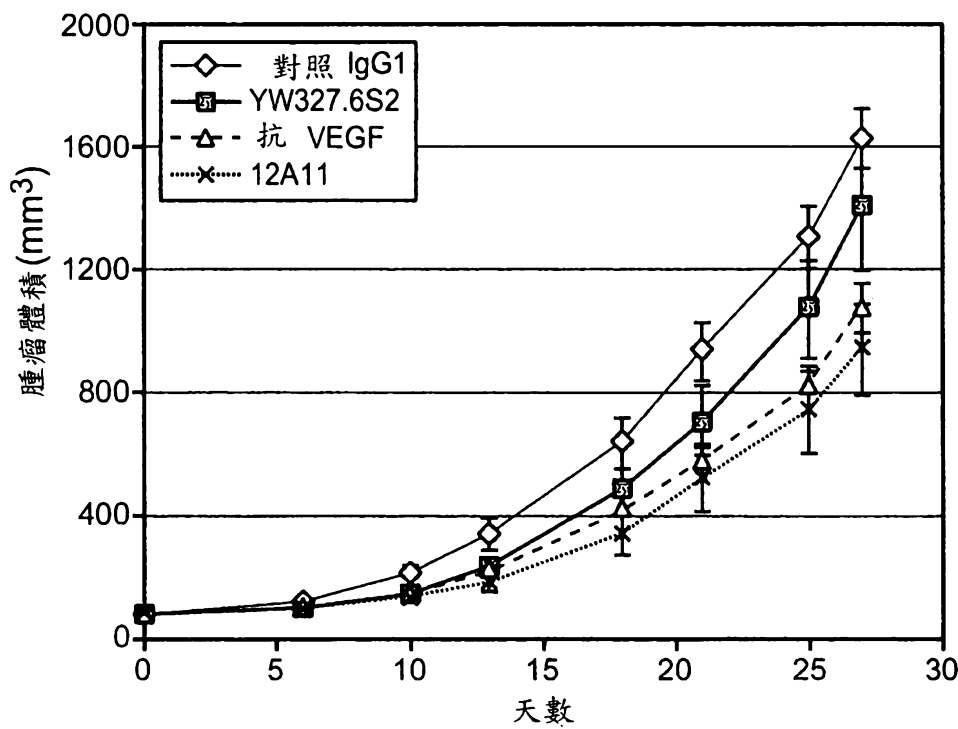
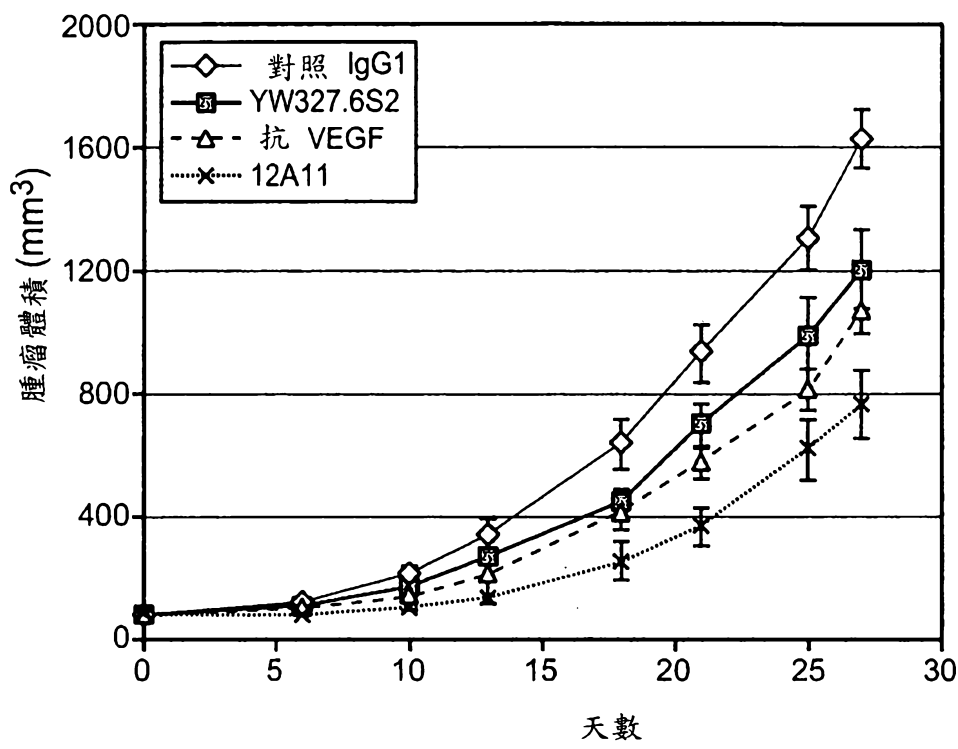


圖 16B



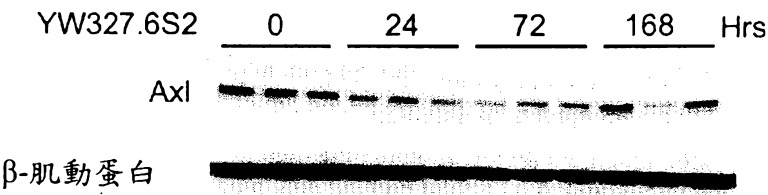


圖 17C

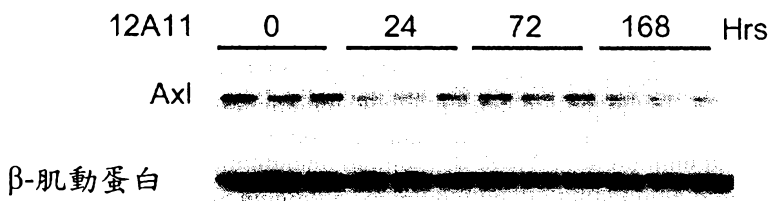


圖 17D

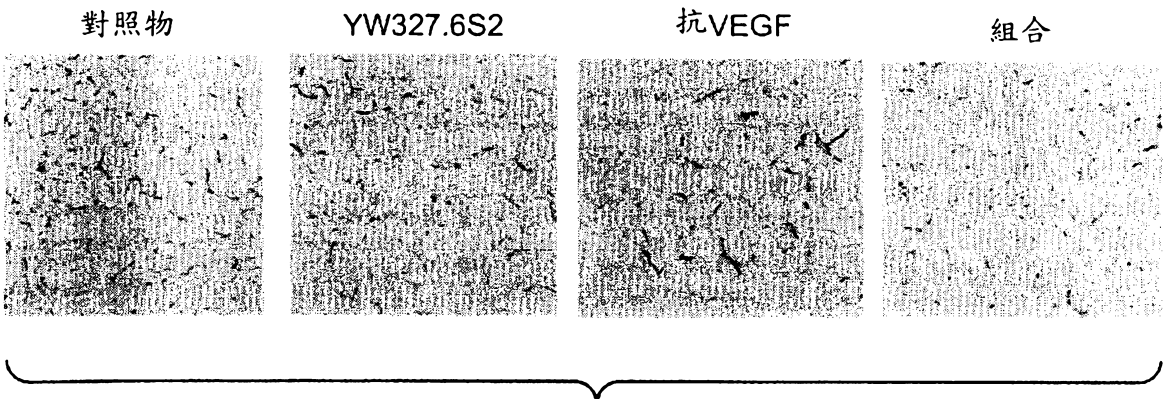
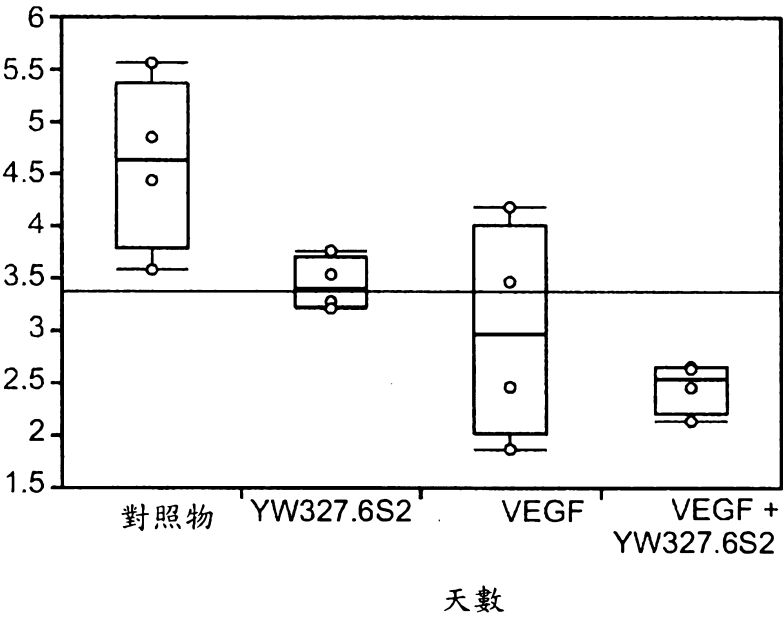


圖 17E

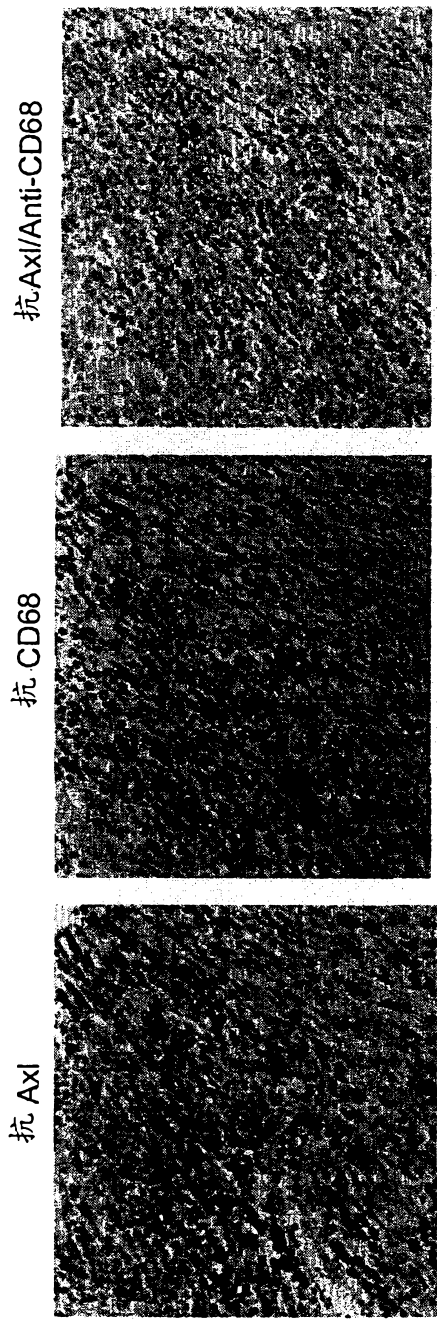


圖17F

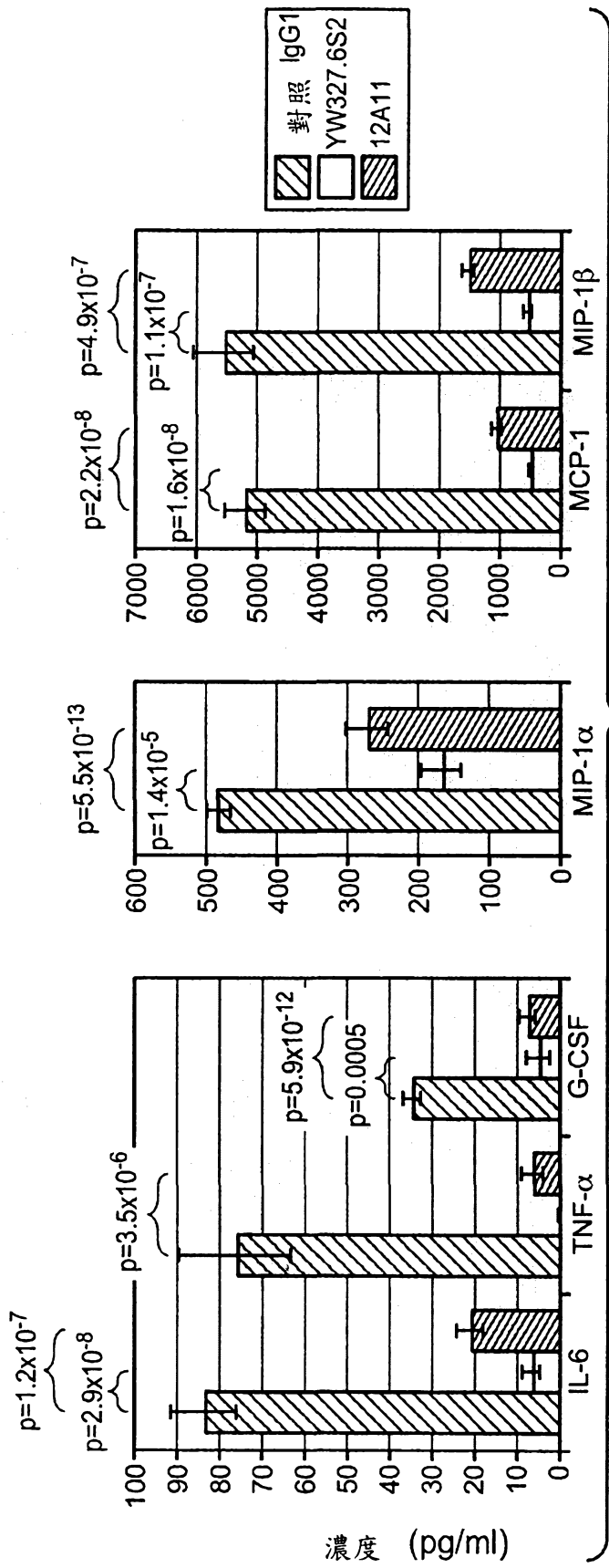


圖17G

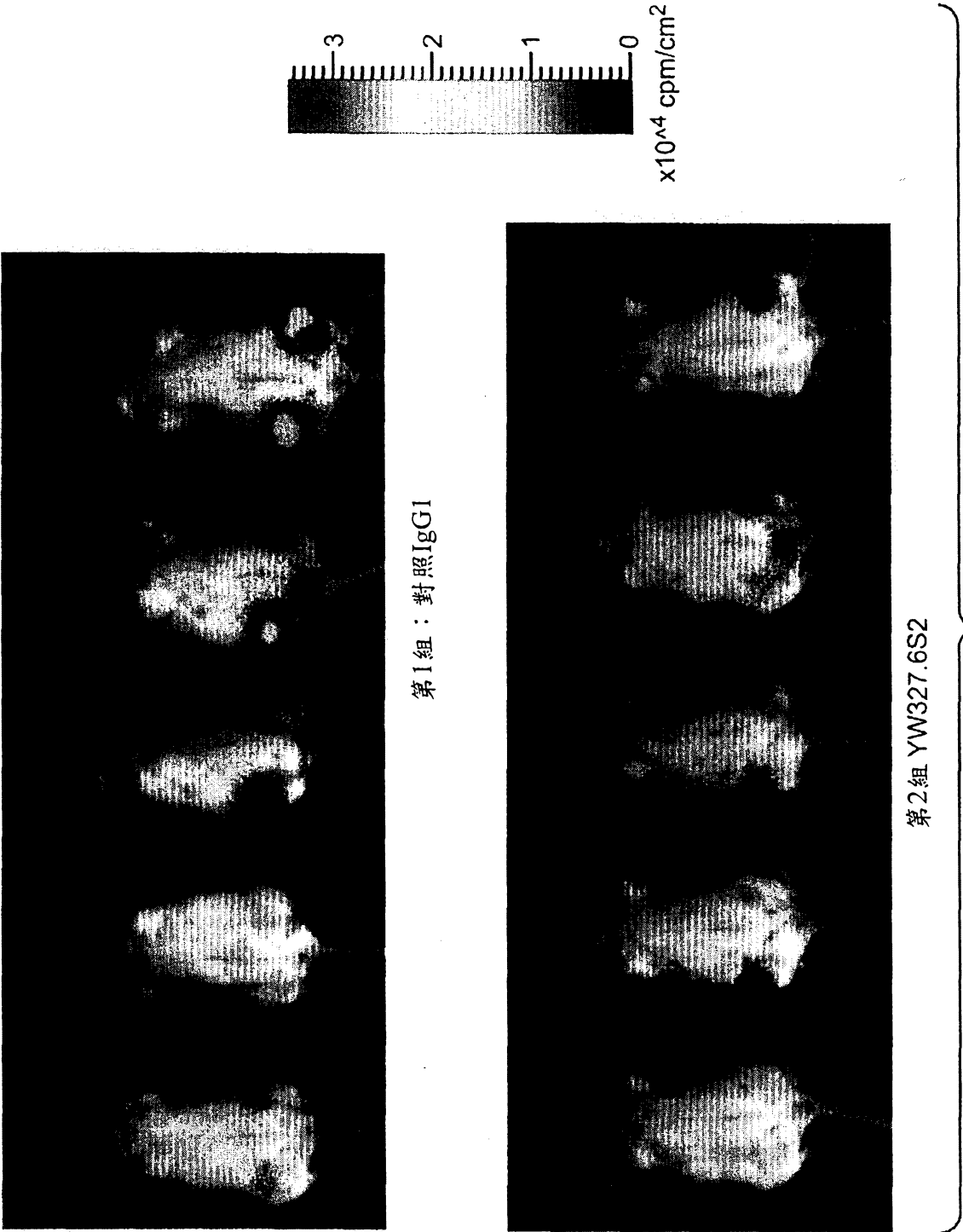


圖18A

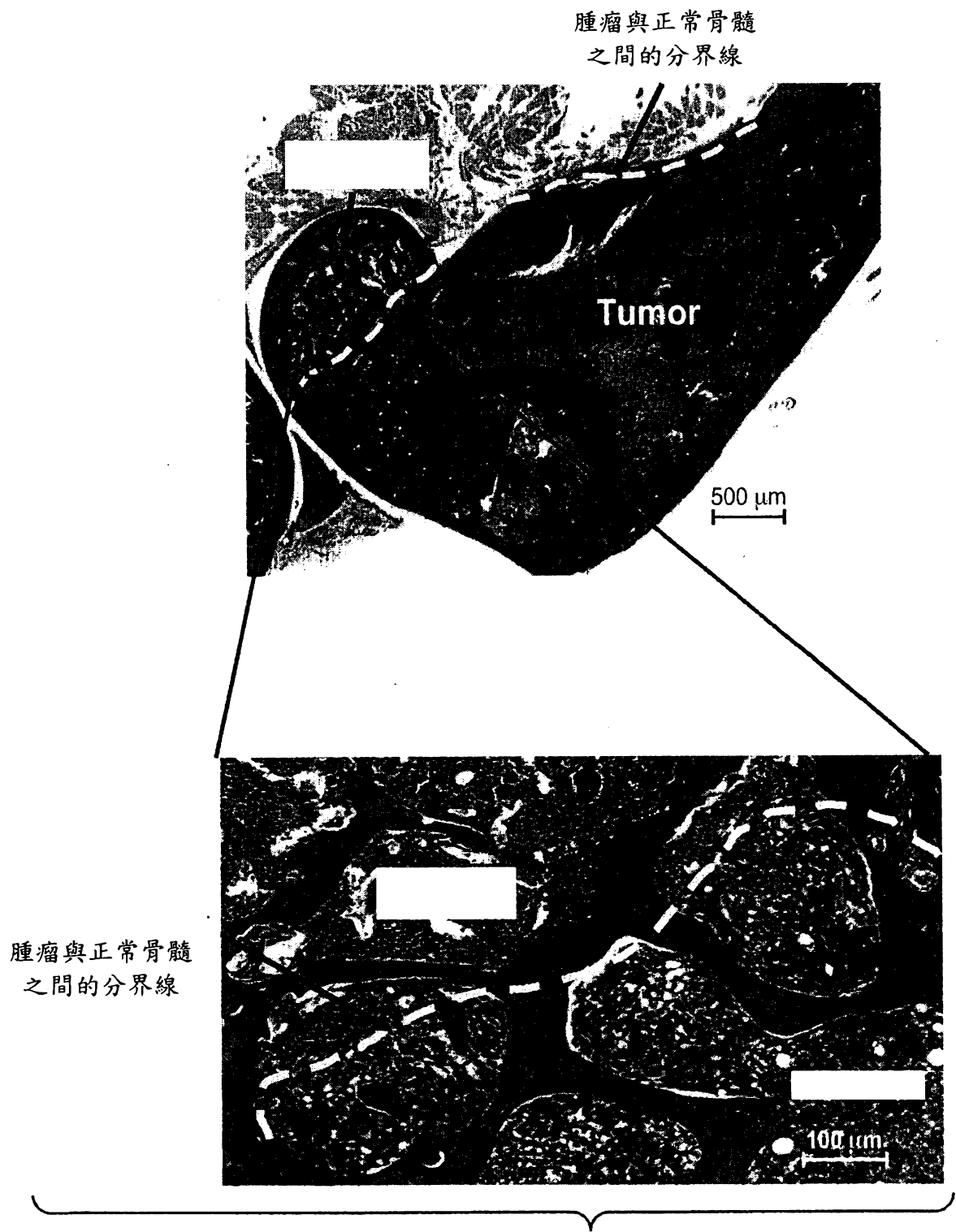


圖 18B

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGNPGNI
TGARGLTGTLRCQLQVQGEPPVHWRDQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQ
RITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVSQPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSC
QAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSLSHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSRT
ATITVLPQQPRNLHLVSRQPTTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEP
DPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPL
GPPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTL
LQGDGSVSNLTVCVAAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVV
AAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFETPVERGELVVRYRVRKSYSRRTTEATLNSLG
ISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKVAVKTMKIAICT
RSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSHLL
YSRLGDQPVYLPQTMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADF
GLSKKIYNGDYRQGRKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWEIATRGQTP
YPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTL
KALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGR
YVLCPSSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA (SEQ ID NO:17)

圖 19

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(7)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)