



(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 201429989 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：102138933

(22)申請日：中華民國 96 (2007) 年 01 月 19 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2006/01/20 美國

60/760,891

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

美國

(72)發明人：吳 彥 WU, YAN (US) ; 嚴民宏 YAN, MINHONG (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：30 項 圖式數：9 共 183 頁

(54)名稱

抗-E P H R I N B 2 抗體及使用該抗體的方法

ANTI-EPHRINB2 ANTIBODIES AND METHODS USING SAME

(57)摘要

本發明提供抗-EphrinB2 抗體，及包含該等抗體之組合物及使用該等抗體之方法。

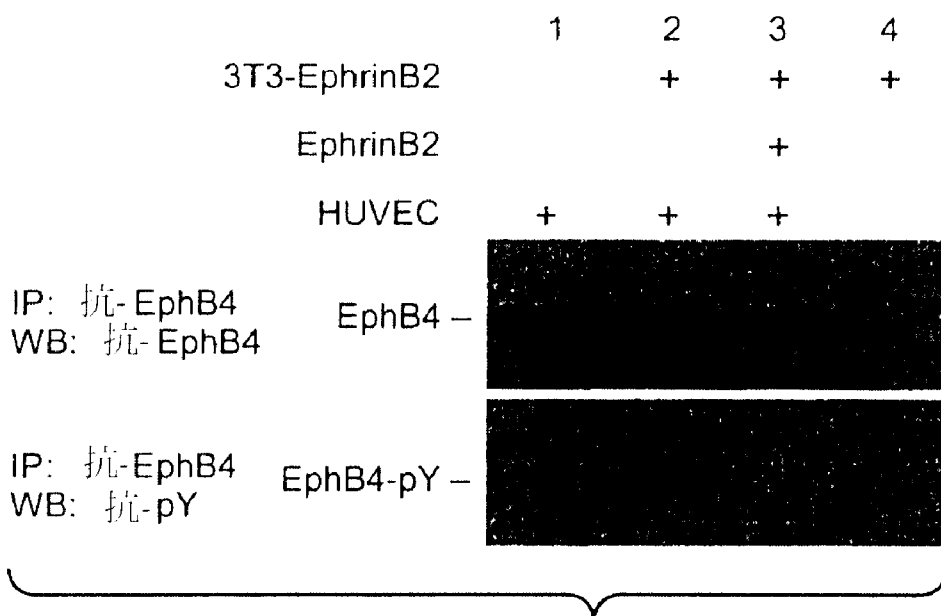


圖7

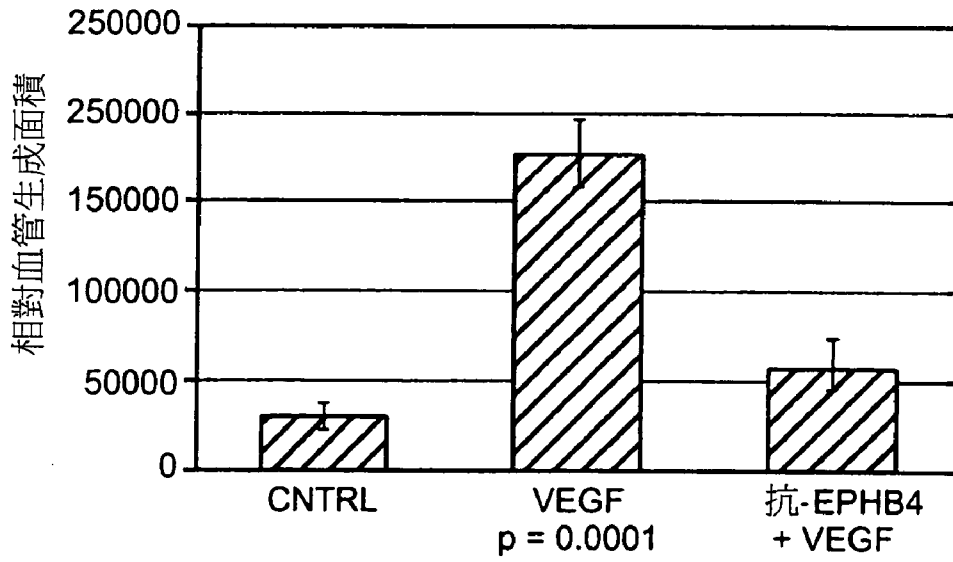


圖8

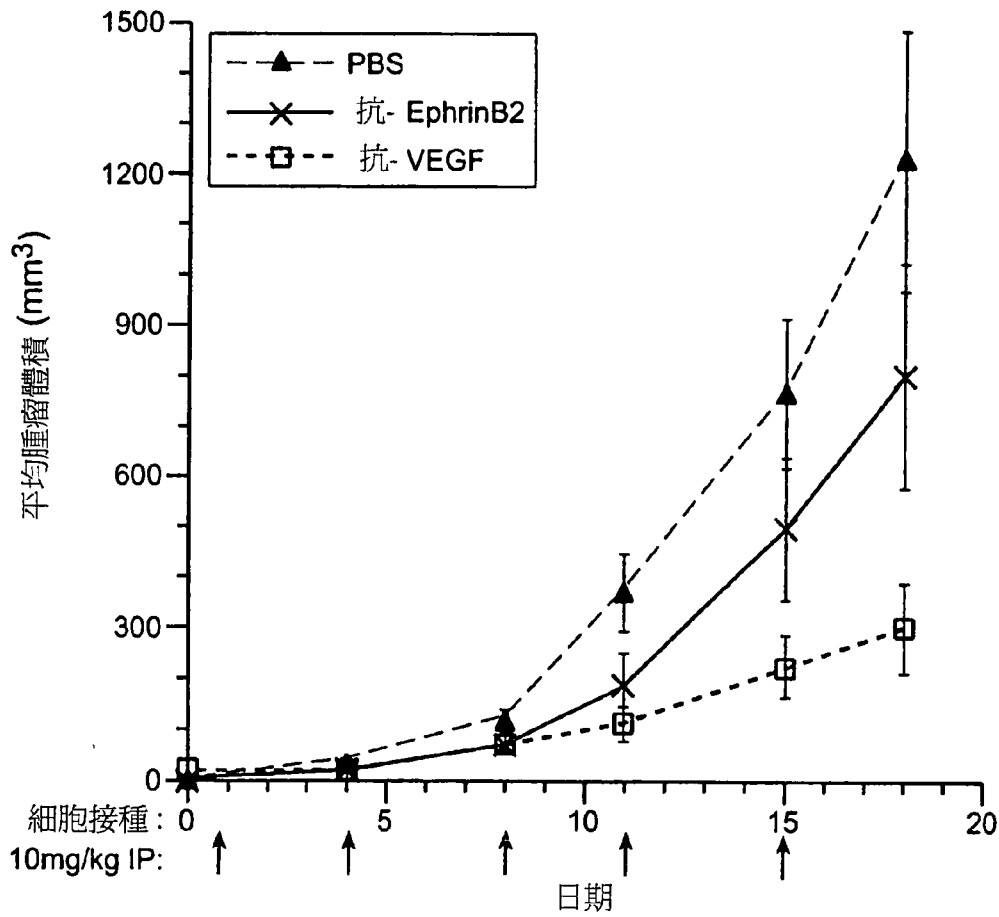


圖9



(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 201429989 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：102138933

(22)申請日：中華民國 96 (2007) 年 01 月 19 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2006/01/20 美國

60/760,891

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

美國

(72)發明人：吳 彥 WU, YAN (US) ; 嚴民宏 YAN, MINHONG (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：30 項 圖式數：9 共 183 頁

(54)名稱

抗-E P H R I N B 2 抗體及使用該抗體的方法

ANTI-EPHRINB2 ANTIBODIES AND METHODS USING SAME

(57)摘要

本發明提供抗-EphrinB2 抗體，及包含該等抗體之組合物及使用該等抗體之方法。

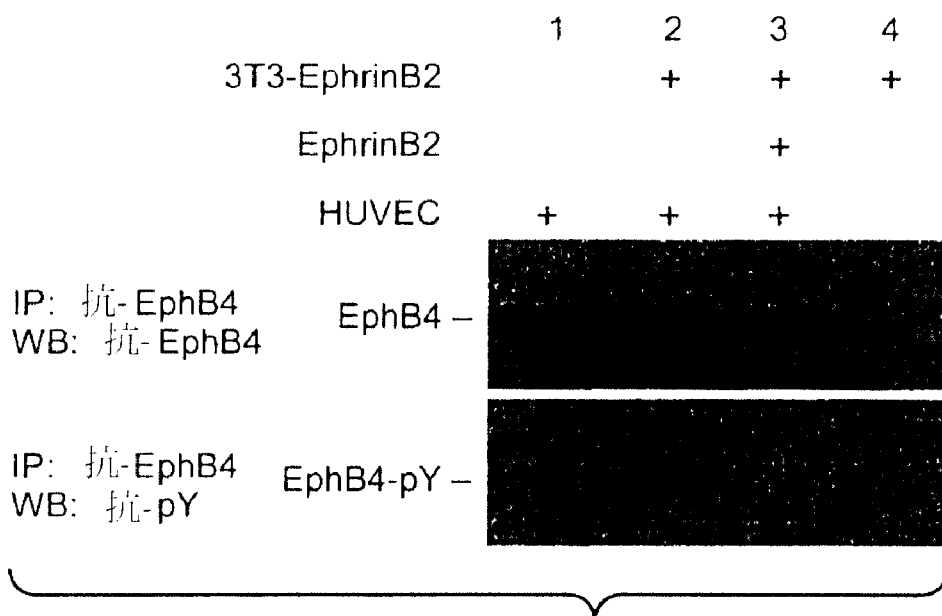


圖7

發明摘要

※ 申請案號：102138933 (由36102168分割)

※ 申請日：36.1.19

※IPC 分類：C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】

抗-EPHRINB2抗體及使用該抗體的方法

ANTI-EPHRINB2 ANTIBODIES AND METHODS USING SAME

【中文】

本發明提供抗-EphrinB2抗體，及包含該等抗體之組合物及使用該等抗體之方法。

【英文】

(無)

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（7、8、9）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

（ 無 ）

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（ 無 ）

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

抗-EPHRINB2抗體及使用該抗體的方法

ANTI-EPHRINB2 ANTIBODIES AND METHODS USING SAME

【技術領域】

本發明一般係關於分子生物學領域。更具體而言，本發明係關於抗-EphrinB2抗體及該等抗體之用法。

【先前技術】

改善血管供應是很多生理學及病理學過程的基本要求。諸如胚及瘤之活躍生長中的組織需要充足的血液供應。其藉由產生促血管生成因子來滿足該需要，促血管生成因子經由所謂血管生成之過程促進新血管形成。血管形成為一種複雜但有序的生物學事件，其包括以下步驟中之所有或多個步驟：a)內皮細胞(EC)由現有EC增殖或由祖細胞分化；b)EC遷移且聚結以形成索樣結構；c)血管索接著經歷血管生成以形成具有中央腔的血管；d)現有血管索或血管長芽以形成第二血管；e)原始血管叢再經歷重塑及再成形；及f)內皮周圍細胞得到募集以包覆內皮管，向血管提供維持功能及調節功能；該等細胞包括小毛細血管之周細胞、較大血管之平滑肌細胞及心臟中之心肌細胞。Hanahan, *Science* 277:48-50 (1997); Hogan & Kolodziej, *Nat. Rev. Genet.* 3:513-23 (2002); Lubarsky & Krasnow, *Cell* 112:19-28 (2003)。

現已充分證實血管生成係與多種病症之致病原因有關。該等病症包括實性腫瘤及癌轉移、動脈粥樣硬化症、晶狀體後纖維增生症、血管瘤、慢性炎症、眼內新生血管性疾病(諸如增生性視網膜病(例如糖尿病性視網膜病))、年齡相關之黃斑變性(AMD)、新生血管性青光

眼、所移植之角膜組織及其他組織之免疫性排斥反應、類風濕性關節炎及牛皮癬。Folkman等人，*J. Biol. Chem.* 267:10931-34 (1992); Klagsbrun等人，*Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39 (1991)；及Garner A., "Vascular diseases," In: *Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach*, Garner A., Klintworth GK, 編，第二版(Marcel Dekker, NY, 1994)，第1625-1710頁。

在腫瘤生長之狀況中，血管生成對於過度增生轉變為腫瘤形成以及為腫瘤生長及轉移提供營養似乎起著決定性的作用。Folkman等人，*Nature* 339:58 (1989)。與正常細胞相比，新血管生成讓腫瘤細胞獲得生長優勢及增生性自主權。腫瘤一般以單個異常細胞開始，由於距離可利用之毛細血管床遠，因此該異常細胞僅會增殖為幾立方毫米之大小，且其會長期'蟄伏'而不進一步生長及擴散。有些腫瘤細胞接著轉變為血管生成表現型以激活內皮細胞，增殖且長成為新毛細血管。該等新形成之血管不僅可使原發瘤繼續生長，而且使轉移性瘤細胞擴散且重新遷殖。因此，已注意到腫瘤切片中之微血管密度與乳癌及其他若干腫瘤之患者倖存之間存在相互關係。Weidner等人，*N. Engl. J. Med.* 324:1-6 (1991); Horak等人，*Lancet* 340:1120-24 (1992); Macchiarini等人，*Lancet* 340:145-46 (1992)。控制血管生成轉變之準確機制未瞭解清楚，但吾人咸信腫瘤塊之新血管生成係因大量血管生成刺激物及抑制物之淨平衡引起(Folkman, *Nat. Med.* 1 (1) :27-31 (1995))。

可緊密調節血管形成之過程。迄今為止，很多種分子，大多為周圍細胞所產生之分泌性因子，經證明可調節EC分化、增殖、遷移及聚結成索樣結構。舉例而言，血管內皮生長因子(VEGF)已確定為與刺激血管生成及誘導血管通透性相關的關鍵因子。Ferrara 等人，*Endocr. Rev.* 18:4-25 (1997)。即便單個VEGF等位基因之缺損亦可造成

胚死亡的結論表明該因子在血管系統之形成及分化中所起的作用無法替代。此外，VEGF經證明為與腫瘤及眼內病症關聯之新血管生成的關鍵介體。Ferrara等人，*Endocr. Rev.* 同上。VEGF mRNA被大部分所檢查之人類腫瘤過度表現。Berkman等人，*J. Clin. Invest.* 91:153-59 (1993); Brown等人，*Human Pathol.* 26:86-91 (1995); Brown等人，*Cancer Res.* 53:4727-35 (1993); Mattern等人，*Brit. J. Cancer* 73:931-34 (1996); Dvorak等人，*Am. J. Pathol.* 146:1029-39 (1995)。

又，VEGF在眼流體中濃度量與患有糖尿病性視網膜病及其他局部缺血相關視網膜病之患者中存在血管之有效增殖高度關聯。Aiello等人，*N. Engl. J. Med.* 331:1480-87 (1994)。此外，研究證明，在受AMD侵染之患者中，VEGF侷限於脈絡膜新生血管膜中。Lopez等人，*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37:855-68 (1996)。

抗-VEGF中和抗體在裸鼠中可抑制多種人類腫瘤細胞株之生長(Kim等人，*Nature* 362:841-44 (1993); Warren等人，*J. Clin. Invest.* 95:1789-97 (1995); Borgström等人，*Cancer Res.* 56:4032-39 (1996); Melnyk等人，*Cancer Res.* 56:921-24 (1996))且亦可在局部缺血性視網膜病症模型中抑制眼內血管生成(Adamis等人，*Arch. Ophthalmol.* 114:66-71 (1996))。因此，抗-VEGF單株抗體或VEGF作用之其他抑制物有望選用於治療腫瘤及各種眼內新生血管性病變。該等抗體例如描述於EP 817,648(1998年1月14日公開)及WO 98/45331及WO 98/45332(兩者均於1998年10月15日公開)中。一種抗-VEGF抗體貝伐單抗(bevacizumab)已獲FDA批准，該抗體可與化學療法組合使用以治療轉移性結腸直腸癌(CRC)。而貝伐單抗正在多個正在進行之治療各種癌適應症之臨床試驗中接受調查。

EphrinB2配體("Ephrin-B2"或"EphrinB2")為ephrin配體家族之成員，該ephrin配體家族組成人類基因組中之酪胺酸激酶受體之大家族

(回顧於Dodelet, Oncogene, 19: 5614-5619, 2000)。人類ephrin配體酪胺酸激酶按照序列一致性可分為A類及B類，相應的A型及B型受體稱為Ephs或Eph受體。信號傳導可以其中受體酪胺酸激酶由配體激活之轉遞方式存在，且可以其中跨膜ephrinB配體藉由與受體相互作用來激活之反向方式存在。與Eph受體-配體相互作用相關的大範圍生物功能包括軸突導向、組織邊界形成、血管生成及細胞活動性(Kullander等人，Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 3: 475-486, 2002；Cheng等人，Cytokine Growth Factor Rev., 13: 75-85, 2002；Coulthard等人，Int. J. Dev. Biol., 46: 375-384, 2002)。

顯然，仍需要具有臨床特徵、最佳作為治療劑開發的藥劑。本文中所述之本發明可滿足該需要且可提供其他益處。

本文中所引用之全部參考文獻，包括專利申請案及公開案，皆以引用方式全文併入本文中。

【發明內容】

本發明部分地係基於鑑定各種EphrinB2結合劑(諸如抗體及其片段)。EphrinB2係作為一種重要且有利的治療靶物出現，且本發明提供基於結合EphrinB2的組合物及方法。如本文中所述，本發明之EphrinB2結合劑可提供重要的治療劑及診斷劑，其使用係針對與EphrinB2配體通道之表現及/或活性關聯之病理性病狀。因此，本發明提供與EphrinB2結合有關的方法、組合物、套組及製品。

本發明提供結合(諸如特定結合)EphrinB2的抗體。

在一態樣中，本發明提供經分離之抗-EphrinB2抗體，其中全長IgG形式之該抗體以30 pM或更佳之結合親和力特定結合人類EphrinB2。配體與其受體之結合親和力可使用多種檢定中之任一種測定且可以多種數值表示，此在該項技術中已充分確認。因此，在一實施例中，結合親和力可表示為K_d值且表現固有的結合親和力(例如，

減至最小的親和力結果)。一般且較佳而言，結合親和力係在活體外量測，無論在無細胞背景或在細胞關聯之背景中。該項技術中已知之多種檢定中之任一種，包括本文中所述之彼等檢定，例如包括Biacore、放射免疫測定法(RIA)及ELISA，可用於獲得結合親和力量測。

在一態樣中，本發明提供一種結合EphrinB2之Eph受體(諸如EphB1、EphB2及/或EphB3)結合區域的分離抗體。

在一態樣中，本發明提供一種結合多肽的分離抗體，該多肽包含EphrinB2胞外域，由或大體由EphrinB2胞外域組成。

在一態樣中，本發明提供一種與Eph受體(諸如EphB1、EphB2、EphB3)競爭結合EphrinB2的分離抗-EphrinB2抗體。

在一態樣中，本發明提供一種抑制、減少及/或阻遏EphrinB2活性的分離抗-EphrinB2抗體。在有些實施例中，EphrinB2自體磷酸化被抑制、減少及/或阻遏。

在一態樣中，本發明之抗-EphrinB2抗體包含：

(a)至少一、兩、三、四或五個高變區(HVR)序列，該或該等序列係選自由以下序列組成之群：

(i) 包含序列 A1-A11 之 HVR-L1，其中 A1-A11 為 RASQDVSTAVA(SEQ ID NO: 6)

(ii)包含序列 B1-B7之HVR-L2，其中B1-B7為SASFLYS(SEQ ID NO:8)

(iii)包含序列 C1-C9之HVR-L3，其中C1-C9為EQTDSTPPT(SEQ ID NO:12)

(iv) 包含序列 D1-D10 之 HVR-H1，其中 D1-D10 為 GFTVSSGWIH(SEQ ID NO:2)

(v) 包含序列 E1-E18 之 HVR-H2，其中 E1-E18 為

AVIFHNKGGTDYADSVKG(SEQ ID NO:4)及

(vi) 包含序列 F1-F14 之 HVR-H3，其中 F1-F14 為 ARTSAWAQLGAMDY(SEQ ID NO:5)；及

(b)至少一變體HVR，其中該變體HVR序列包含所述SEQ ID NO:1-12序列中之至少一個經修飾的殘基。

在一態樣中，本發明提供一種包含一、兩、三、四、五或六個HVR的抗體，其中各HVR包含、由或大體由選自由SEQ ID NO:1-12組成之群的序列組成，且其中SEQ ID NO:6或7對應於HVR-L1，SEQ ID NO:8或9對應於HVR-L2，SEQ ID NO:10、11或12對應於HVR-L3，SEQ ID NO:1或2對應於HVR-H1，SEQ ID NO:3或4對應於HVR-H2，且SEQ ID NO:5對應於HVR-H3。

在一實施例中，本發明之抗體包含HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3，其中各HVR依序包含SEQ ID NO:6、8、10、1、3、5。

在一實施例中，本發明之抗體包含HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3，其中各HVR依序包含SEQ ID NO:7、9、11、1、3、5。

在一實施例中，本發明之抗體包含HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3，其中各HVR依序包含SEQ ID NO:6、8、12、2、4、5。

本發明之抗體中之變體HVR在HVR內可具有一或多(諸如兩、三、四、五或五以上)個經修飾的殘基。

在一實施例中，HVR-L1變體包含1-4(1、2、3或4)處於以下位置之任一組合中之取代：A7(S或D)；A8(T或S)；A9(A或S)；及A10(V或L)。

在一實施例中，HVR-L2變體包含1-3(1、2或3)處於以下位置之任

一組合中之取代：B1(S或A)；B4(F或N)；及B6(Y或E)。

在一實施例中，HVR-L3變體包含1-6(1、2、3、4、5或6)處於以下位置之任一組合中之取代：C1(Q或E)；C3(S或T)；C4(Y或D)；C5(T、D或S)；C6(T或N)；及C8(P或F)。

在一實施例中，HVR-H1變體包含1-4(1、2、3或4)處於以下位置之任一組合中之取代：D4(I或V)；D5(T或S)；D6(G或S)；及D7(S或G)。

在一實施例中，HVR-H2變體包含1-4(1、2、3或4)處於以下位置之任一組合中之取代：E4(Y或F)；E5(P或H)；E7(N或K)；及E9(A或G)。

在一實施例中，HVR-H3變體包含1-14處於以下位置中之取代：F1(A)；F2(R)；F3(T)；F4(S)；F5(A)；F6(W)；F7(A)；F8(Q)；F9(L)；F10(G)；F11(A)；F12(M)；F13(D)及F14(Y)。各位置後之括號中的字母表示說明性取代(亦即置換)胺基酸；可使用該項技術中已知之技術及/或本文中所述之技術例行評定其他適用作本文中所述之上下文中取代胺基酸的胺基酸，此對於熟習該項技術者顯而易見。

在一態樣中，本發明提供一種包含包括SEQ ID NO:1或2之序列之HVR-H1區域的抗體。在一態樣中，本發明提供一種包含包括SEQ ID NO:3或4之序列之HVR-H2區域的抗體。在一態樣中，本發明提供一種包含包括SEQ ID NO: 5之序列之HVR-H3區域的抗體。在一實施例中，本發明提供一種包含包括SEQ ID NO:6或7之序列之HVR-L1區域的抗體。在一實施例中，本發明提供一種包含包括SEQ ID NO: 8或9之序列之HVR-L2區域的抗體。在一實施例中，本發明提供一種包含包括SEQ ID NO: 10、11或12之序列之HVR-L3區域的抗體。

在一態樣中，本發明提供一種包含以下序列中之至少一個、至少兩個或全部三個序列的抗體：

- (i)包含SEQ ID NO: 2序列的HVR-H1序列；
- (ii)包含SEQ ID NO: 4序列的HVR-H2序列；
- (iii)包含SEQ ID NO: 5序列的HVR-H3序列。

在一態樣中，本發明提供一種包含以下序列中之至少一個、至少兩個或全部三個序列的抗體：

- (i)包含SEQ ID NO: 6序列的HVR-L1序列；
- (ii)包含SEQ ID NO: 8序列的HVR-L2序列；
- (iii)包含SEQ ID NO: 12序列的HVR-L3序列。

單個HVR(亦即H1、H2或H3)之SEQ ID NO:1-12之胺基酸序列編號如圖1中所示，編號與如下所述之Kabat編號系統一致。

在一態樣中，本發明提供包含如圖1中所描繪之重鏈HVR序列的抗體。

在一態樣中，本發明提供包含如圖1中所描繪之輕鏈HVR序列的抗體。

本發明之抗體之某些實施例包含人源化4D5抗體(huMAb4D5-8)(HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA)(亦參見美國專利第6,407,213號及Lee等人，J. Mol. Biol. (2004), 340 (5):1073-93)之輕鏈可變域，如以下SEQ ID NO:13中所描繪。

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser
Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly
Thr Lys Val Glu Ile Lys 107(SEQ ID NO:13)(HVR殘基加有下劃線)。

在一實施例中，huMAb4D5-8輕鏈可變域序列在位置30、66及91

中之一或多個位置處經修飾(如以上以粗體/斜體分別所示之Asn、Arg及His)。在一實施例中，經修飾之huMAb4D5-8序列包含位置30中之Ser、位置66中之Gly及/或位置91中之Ser。因此，在一實施例中，本發明之抗體包含包括以下於SEQ ID NO:14中所描繪之序列的輕鏈可變域：

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val **Ser** Thr Ala Val
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser
Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser **Gly** Ser
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln **Ser** Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly
Thr Lys Val Glu Ile Lys 107(SEQ ID NO:14)(HVR殘基加有下劃線)。

相對於huMAb4D5-8經取代之殘基在上文中係以粗體/斜體表示。

若與EphrinB2之結合活性大體上保持，則本發明之抗體可包含任何適當的框架可變域序列。舉例而言，在有些實施例中，本發明之抗體包含人類亞群III重鏈框架一致序列。在該等抗體之一實施例中，框架一致序列包含位置71、73及/或78處之取代。在該等抗體之某些實施例中，位置71為A，73為T且/或78為A。在一實施例中，該等抗體包含huMAb4D5-8(HERCEPTIN[®], Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA)(亦參見美國專利第6,407,213號及第5,821,337號，及Lee等人，J. Mol. Biol. (2004), 340 (5):1073-93)之重鏈可變域框架序列。在一實施例中，該等抗體另外包含人類κI輕鏈框架一致序列。在一實施例中，該等抗體包含如美國專利第6,407,213號及第5,821,337號中所述之huMAb4D5-8之輕鏈HVR序列。在一實施例中，該等抗體包含huMAb4D5-8(HERCEPTIN[®], Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA)(亦參見美國專利第6,407,213號及第5,821,337號，及Lee等人，J.

Mol. Biol. (2004), 340 (5):1073-93)之輕鏈可變域序列。

在一實施例中，本發明之抗體包含重鏈可變域，其中框架序列包含序列SEQ ID NO: 19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36及/或37，且HVR H1、H2及H3序列分別為SEQ ID NO: 2、4及/或5。在一實施例中，本發明之抗體包含輕鏈可變域，其中框架序列包含序列SEQ ID NO: 38、39、40及/或41，且HVR L1、L2及L3序列分別為SEQ ID NO: 6、8及/或12。

在一實施例中，本發明之抗體包含重鏈可變域，其中框架序列包含序列SEQ ID NO: 42、43、44及/或45，且HVR H1、H2及H3序列分別為SEQ ID NO: 1、3及/或5。在一實施例中，本發明之抗體包含輕鏈可變域，其中框架序列包含序列SEQ ID NO: 15、16、17及/或18，且HVR L1、L2及L3序列分別為SEQ ID NO: 6、8及/或10。

在一實施例中，本發明之抗體包含重鏈可變域，其中框架序列包含序列SEQ ID NO: 42、43、47及/或45，且HVR H1、H2及H3序列分別為SEQ ID NO: 1、3及/或5。在一實施例中，本發明之抗體包含輕鏈可變域，其中框架序列包含序列SEQ ID NO: 15、16、47及/或18，且HVR L1、L2及L3序列分別為SEQ ID NO: 7、9及/或11。

在一實施例中，本發明之抗體親和力成熟可獲得所要之靶物結合親和力。在一實施例中，本發明之親和力成熟抗體包含以下胺基酸位置之一或多處之取代：H29、H30、H31、H32、H52、H52a、H54、H56、L30、L31、L32、L33、L50、L53、L55、L89、L91、L92、L93、L94及L96。在一實施例中，本發明之親和力成熟抗體包含一或多個以下取代：(a)在重鏈中，V29I、S30T、S31G、G32S、F52Y、H52aP、K54N及G56A；或(b)在輕鏈中，S30D、T31S、A32S、V33L、S50A、F53N、Y55E、E89Q、T91S、D92Y、S93D或T、T94N及P96F。

在一實施例中，本發明之抗體包含包括序列SEQ ID NO:49的重鏈可變域。在一實施例中，本發明之抗體包含包括序列SEQ ID NO:48的輕鏈可變域。在一實施例中，本發明之抗體包含包括序列SEQ ID NO:49的重鏈可變域及包括序列SEQ ID NO:48的輕鏈可變域。

在一實施例中，本發明之抗體包含包括序列SEQ ID NO:51的重鏈可變域。在一實施例中，本發明之抗體包含包括序列SEQ ID NO:50的輕鏈可變域。在一實施例中，本發明之抗體包含包括序列SEQ ID NO:51的重鏈可變域及包括序列SEQ ID NO:50的輕鏈可變域。

在一實施例中，本發明之抗體包含包括序列SEQ ID NO:53的重鏈可變域。在一實施例中，本發明之抗體包含包括序列SEQ ID NO:52的輕鏈可變域。在一實施例中，本發明之抗體包含包括序列SEQ ID NO:53的重鏈可變域及包括序列SEQ ID NO:52的輕鏈可變域。

在一態樣中，本發明提供一種與上述任一抗體競爭結合EphrinB2的抗體。在一態樣中，本發明提供一種結合與上述任一抗體相同或類似之EphrinB2上之抗原決定基的抗體。

如該項技術中已知，且如下文中更詳描述，界定抗體高變區之胺基酸位置/邊界可視本上下文及該項技術中已知之各種定義而變(如下所述)。可變域內部的某些位置可視為雜交高變位置，其中該等位置按一類標準可認為處於高變區內，而按不同類標準可認為處於高變區之外。該等位置中之一或多者亦可見於擴展高變區內(如下文進一步定義)。

在有些實施例中，該抗體為單株抗體。在有些實施例中，該抗體為多株抗體。在有些實施例中，該抗體係選自由嵌合抗體、親和力成

熟抗體、人源化抗體及人類抗體組成之群。在有些實施例中，該抗體為抗體片段。在有些實施例中，該抗體為Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂或scFv。

在一實施例中，該抗體為嵌合抗體，例如包含接合至異源非人類、人類或人源化序列(例如框架及/或恆定域序列)之來源於非人類供體之抗原結合序列的抗體。在一實施例中，非人類供體為小鼠。在一實施例中，抗原結合序列係合成的，例如藉由突變誘發所製得(例如噬菌體呈現篩選等)。在一實施例中，本發明之嵌合抗體具有鼠V區及人類C區。在一實施例中，鼠輕鏈V區係融合至人類κ輕鏈。在一實施例中，鼠重鏈V區係融合至人類IgG1 C區。

本發明之人源化抗體包括在FR中具有胺基酸取代的彼等抗體及具有在所接合之CDR中有改變之親和力成熟變體的彼等抗體。CDR或FR中經取代之胺基酸不限於供體或受體抗體中所存在的彼等胺基酸。在其他實施例中，本發明之抗體另外包含Fc區中經改變的胺基酸殘基，其可使效應功能改良，包括增強CDC及/或ADCC功能及殺死B細胞。本發明之其他抗體包括具有可改良穩定性之特定改變的彼等抗體。在其他實施例中，本發明之抗體包含Fc區中經改變的胺基酸殘基，其可使效應功能減弱，例如減弱CDC及/或ADCC功能及/或減少B細胞殺死。在有些實施例中，本發明之抗體的特徵為減少結合(諸如不結合)天然殺手(NK)細胞上的人類互補因子C1q及/或人類Fc受體。在有些實施例中，本發明之抗體的特徵為減少結合(諸如不結合)人類FcγRI、FcγRIIA及/或FcγRIIIA。在有些實施例中，本發明之抗體屬於IgG類(例如IgG1或IgG4)且在E233、L234、G236、D265、D270、N297、E318、K320、K322、A327、A330、P331及/或P329(根據EU索引編號)中包含至少一突變。在有些實施例中，該等抗體包含突變L234A/L235A或D265A/N297A。

在一態樣中，本發明提供包含本文中所提供之任一抗原結合序列的抗-EphrinB2多肽，其中抗-EphrinB2多肽特定結合EphrinB2。

本發明之抗體結合(諸如特定結合)EphrinB2，且有些實施例中可調節EphrinB2關聯效應之一或多個態樣，其包括但不限於EphrinB2激活、EphrinB2下游分子信號傳導、EphrinB2結合Eph受體(例如EphB1、EphB2及/或EphB3)激活、EphrinB2結合Eph受體(例如EphB1、EphB2及/或EphB3)下游分子信號傳導、中斷EphrinB2結合Eph受體(例如EphB1、EphB2及/或EphB3)結合EphrinB2、EphrinB2磷酸化作用及/或EphrinB2多聚化及/或EphrinB2結合Eph受體磷酸化作用，及/或中斷任何生物學上關聯之EphrinB2及/或EphrinB2結合Eph受體(例如EphB1、EphB2及/或EphB3)生物學通道，及/或治療及/或預防腫瘤、細胞增殖性病變或癌；及/或治療或預防與EphrinB2表現及/或活性關聯之病變(諸如EphrinB2表現及/或活性增強)。在有些實施例中，本發明之抗體特定結合EphrinB2。在有些實施例中，該抗體特定結合EphrinB2胞外域(ECD)。在有些實施例中，該抗體特定結合包含或大體包含EphrinB2胞外域的多肽。在有些實施例中，該抗體以30 pm或更強之Kd特定結合EphrinB2。在有些實施例中，本發明之抗體可活體內及/或活體外減少、抑制及/或阻遏EphrinB2活性。在有些實施例中，該抗體可減少、抑制及/或阻遏EphrinB2自體磷酸化。在有些實施例中，該抗體與EphrinB2結合Eph受體(例如EphB1、EphB2及/或EphB3)競爭(減少及/或阻遏)結合性。

在一態樣中，本發明提供本發明之抗體在製備用於治療性治療及/或預防性治療病變(諸如癌、腫瘤及/或細胞增殖性病變)之藥物中的用途。在有些實施例中，該病變為神經病或神經變性疾病。

在一態樣中，本發明提供包含本發明之一或多種抗體及載劑的組合物。在一實施例中，該載劑為醫藥學上可接受之載劑。

在一態樣中，本發明提供編碼本發明之抗-EphrinB2抗體的核酸。

在一態樣中，本發明提供包含本發明之核酸的載體。

在一態樣中，本發明提供包含本發明之一或多種核酸及載劑的組合物。在一實施例中，該載劑為醫藥學上可接受之載劑。

在一態樣中，本發明提供包含本發明之核酸或載體的宿主細胞。載體可為任何類型之載體，例如重組載體，諸如表現載體。可使用多種宿主細胞中的任一種。在一實施例中，宿主細胞為原核細胞，例如大腸桿菌(*E. coli*)。在一實施例中，宿主細胞為真核細胞，例如哺乳動物細胞，諸如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。

在一態樣中，本發明提供製備本發明之抗體的方法。舉例而言，本發明提供製備抗-EphrinB2抗體(如本文中定義，其包括全長抗體及其片段)，該方法包含：在適當的宿主細胞中表現編碼本發明之該抗體(其片段)的重組載體及回收該抗體。

在一態樣中，本發明提供一種包含一容器之製品及該容器內所含之組合物，其中該組合物包含本發明之一或多種抗-EphrinB2抗體。在一實施例中，該組合物包含本發明之核酸。在一實施例中，包含抗體之組合物另外包含載劑，該載劑在有些實施例中為醫藥學上可接受之載劑。在一實施例中，本發明之製品另外包含將組合物(例如抗體)投與受檢者的說明書(諸如本文中所述任一方法的說明書)。

在一態樣中，本發明提供一種包含一第一容器及一第二容器的套組，該第一容器包含一組合物，該組合物包含一或多種本發明之抗-EphrinB2抗體且該第二容器包含一緩衝劑。在一實施例中，該緩衝劑為醫藥學上可接受之緩衝劑。在一實施例中，包含抗體之組合物另外包含載劑，該載劑在有些實施例中為醫藥學上可接受之載劑。在一實施例中，套組另外包含將組合物(例如抗體)投與受檢者的說明書。

在一態樣中，本發明提供本發明之抗-EphrinB2抗體在製備用於治療性治療及/或預防性治療病症(諸如癌、腫瘤及/或細胞增殖性病變)之藥物中的用途。在有些實施例中，該病症為神經病或神經變性疾病。在有些實施例中，該病症為與血管生成關聯的病理性病狀。

在一態樣中，本發明提供本發明之抗體在製備用於抑制血管生成之藥物中的用途。

在一態樣中，本發明提供本發明之核酸在製備用於治療性治療及/或預防性治療病症(諸如癌、腫瘤及/或細胞增殖性病變)之藥物中的用途。在有些實施例中，該病症為神經病或神經變性疾病。在有些實施例中，該病症為與血管生成關聯的病理性病狀。

在一態樣中，本發明提供本發明之表現載體在製備用於治療性治療及/或預防性治療病症(諸如癌、腫瘤及/或細胞增殖性病變)之藥物中的用途。在有些實施例中，該病症為神經病或神經變性疾病。在有些實施例中，該病症為與血管生成關聯的病理性病狀。

在一態樣中，本發明提供本發明之宿主細胞在製備用於治療性治療及/或預防性治療病症(諸如癌、腫瘤及/或細胞增殖性病變)之藥物中的用途。在有些實施例中，該病症為神經病或神經變性疾病。在有些實施例中，該病症為與血管生成關聯的病理性病狀。

在一態樣中，本發明提供本發明之製品在製備用於治療性治療及/或預防性治療病症(諸如癌、腫瘤及/或細胞增殖性病變)之藥物中的用途。在有些實施例中，該病症為神經病或神經變性疾病。

在一態樣中，本發明提供本發明之套組在製備用於治療性治療及/或預防性治療病症(諸如癌、腫瘤及/或細胞增殖性病變)之藥物中的用途。在有些實施例中，該病症為神經病或神經變性疾病。在有些實施例中，該病症為與血管生成關聯的病理性病狀。

本發明提供適用於調節與EphrinB2之表現及/或活性關聯之病態

(諸如表現及/或活性增強或減弱或非所要之表現及/或活性)的方法及組合物。

在一態樣中，本發明提供與EphrinB2之表現及/或活性增強關聯之腫瘤、癌及/或細胞增殖性病症的治療或預防方法，該等方法包含將有效量之抗-EphrinB2抗體投與需要該治療之受檢者。

在一態樣中，本發明提供殺死細胞(諸如癌細胞或腫瘤細胞)的方法，該等方法包含將有效量之抗-EphrinB2抗體投與需要該治療之受檢者。

在一態樣中，本發明提供減少、抑制、阻遏或預防腫瘤或癌生長的方法，該等方法包含將有效量之抗-EphrinB2抗體投與需要該治療之受檢者。

在一態樣中，本發明提供治療或預防神經病或神經變性疾病或修復受損神經細胞的方法，該等方法包含將有效量之抗-EphrinB2抗體投與需要該治療之受檢者。

在一態樣中，本發明提供促進神經元發育、增殖、維持或再生的方法，該等方法包含將有效量之抗-EphrinB2抗體投與需要該治療之受檢者。

在一態樣中，本發明提供抑制血管生成的方法，該等方法包含將有效量之抗-EphrinB2抗體投與需要該治療之受檢者。在有些實施例中，血管生成位置為腫瘤或癌。

在一態樣中，本發明提供與血管生成關聯之病理性病狀的治療方法，該等方法包含將有效量之抗-EphrinB2抗體投與需要該治療之受檢者。在有些實施例中，與血管生成關聯之病理性病狀為腫瘤、癌及/或細胞增殖性病症。在有些實施例中，與血管生成關聯之病理性病狀為眼內新生血管疾病。

本發明之方法可用於改變任何適當的病理性狀態。例示性病症描述

於本文中，且包括癌，其選自由以下癌組成之群：小細胞肺癌、神經母細胞瘤、黑素瘤、乳癌、胃癌、結腸直腸癌(CRC)及肝細胞癌。

在一實施例中，本發明之方法中靶指的細胞為癌細胞。舉例而言，癌細胞可為選自由以下細胞組成之群之一：乳癌細胞、結腸直腸癌細胞、肺癌細胞、乳頭狀癌細胞、結腸癌細胞、胰癌細胞、卵巢癌細胞、子宮頸癌細胞、中樞神經系統癌細胞、成骨性瘤細胞、腎癌細胞、肝細胞癌細胞、膀胱癌細胞、胃癌細胞、頭頸鱗狀癌細胞、黑素瘤細胞、白血病細胞及結腸腺瘤細胞。在一實施例中，本發明之方法中靶指的細胞為高度增生性及/或增生性細胞。在一實施例中，本發明之方法中靶指的細胞為發育異常細胞。在另一實施例中，本發明之方法中靶指的細胞為癌轉移細胞。

本發明之方法另外可包含其他治療步驟。舉例而言，在一實施例中，一方法另外包含其中使靶細胞及/或靶組織(例如癌細胞)暴露於輻射處理或化學治療劑的步驟。

在一態樣中，本發明提供的方法包含將有效量之抗-EphrinB2抗體與有效量之另一治療劑(諸如抗血管生成劑)組合投與。舉例而言，使用抗-EphrinB2抗體與抗癌劑或抗血管生成劑組合以治療各種贅生性或非贅生性病狀。在一實施例中，該贅生性或非贅生性病狀為與血管生成關聯的病理性病狀。在有些實施例中，另一治療劑為抗血管生成劑、抗贅生劑及/或化學治療劑。

抗-EphrinB2抗體可連續或與有效達成彼等目的之其他治療劑組合、以同一組合物或作為各別組合物投藥。抗-EphrinB2抗體與其他治療劑(例如抗癌劑、抗血管生成劑)之投藥可例如以單一組合物，或以兩種或兩種以上不同的組合物、使用相同或不同的投藥途徑同時進行。或者，或此外，可以任一順序連續進行投藥。或者，或此外，該等步驟既可以任意順序之組合連續執行，亦可同時執行。在某些實施

例中，兩種或兩種以上組合物之投藥間隔期可為數分鐘至數日、至數週至數月。舉例而言，抗癌劑可首先投與，繼之投與抗-EphrinB2抗體。然而，亦可考慮同時投藥或首先投與抗-EphrinB2抗體。因此，在一態樣中，本發明提供的方法包含投與抗-EphrinB2抗體後、再投與抗血管生成劑(諸如抗VEGF抗體，諸如貝伐單抗)。在某些實施例中，兩種或兩種以上組合物之投藥間隔期可為數分鐘至數日、至數週至數月。

在某些態樣中，本發明提供藉由投與有效量之抗-EphrinB2抗體及/或血管生成抑制劑及一或多種化學治療劑來治療病症(諸如腫瘤、癌及/或細胞增殖性病變)的方法。本發明之組合治療方法中可使用各種化學治療劑。可考慮之化學治療劑之例示性及非限制性列表提供於本文中之"定義"項下。抗-EphrinB2抗體及化學治療劑之投藥可以單一組合物，或以兩種或兩種以上不同的組合物、使用相同或不同的投藥途徑同時進行。或者，或此外，可以任一順序連續進行投藥。或者，或此外，該等步驟既可以任意順序之組合連續執行，亦可同時執行。在某些實施例中，兩種或兩種以上組合物之投藥間隔期可為數分鐘至數日、至數週至數月。舉例而言，化學治療劑可首先投與，繼之投與抗-EphrinB2抗體。然而，亦可考慮同時投藥或首先投與抗-EphrinB2抗體。因此，在一態樣中，本發明提供的方法包含投與抗-EphrinB2抗體後、再投與化學治療劑。在某些實施例中，兩種或兩種以上組合物之投藥間隔期可為數分鐘至數日、至數週至數月。

在一態樣中，本發明提供增強抗血管生成劑在患有與血管生成關聯之病理性病狀之受檢者中之功效的方法，該方法包含將該有效量之抗-EphrinB2抗體與抗血管生成劑組合投藥，從而增強該抗血管生成劑的抑制活性。

在一態樣中，本發明提供抑制或預防復發性腫瘤生長或復發性癌

細胞生長的方法及組合物。復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長係用於描述一種病狀，其中正經歷或經一或多種現行療法(例如癌療法，諸如化學療法、放射療法、手術療法、激素療法及/或生物學療法/免疫療法、抗VEGF抗體療法，尤其對於特定癌之標準治療方案)治療之患者，在臨床上不足以治療該等患者，或該等患者已未自治療中收到任何有益效果，以致該等患者需要其他有效療法。

在另一態樣中，本發明提供偵測EphrinB2的方法，該等方法包含偵測樣本中之EphrinB2-抗EphrinB2抗體複合物。如本文中所使用之術語"偵測"包括在有或無對照物參考下的定性偵測及/或定量偵測(量測水準)。

在另一態樣中，本發明提供診斷與EphrinB2表現及/或活性關聯之病症的方法，該等方法包含偵測來自患有或疑似患有該病症之患者之生物樣本中的EphrinB2-抗EphrinB2抗體複合物。在有些實施例中，EphrinB2表現為表現增強或異常表現。在有些實施例中，該病症為腫瘤、癌及/或細胞增殖性病症。

在另一態樣中，本發明提供包含本文中所述之任一抗EphrinB2抗體，其中抗EphrinB2抗體包含可偵測標記。

在另一態樣中，本發明提供本文中所述之任一抗EphrinB2抗體與EphrinB2的複合物。在有些實施例中，該複合物係於活體內或活體外。在有些實施例中，該複合物包含癌細胞。在有些實施例中，抗EphrinB2抗體具有可偵測標記。

【圖式簡單說明】

圖1：抗EphrinB2抗體之重鏈及輕鏈HVR環序列。該圖展示H1、H2及H3重鏈HVR序列及L1、L2及L3輕鏈HVR序列。序列編號如下：純系31.19(HVR-H1為SEQ ID NO:1；HVR-H2為SEQ ID NO:3；HVR-H3為SEQ ID NO:5；HVR-L1為SEQ ID NO:6；HVR-L2為SEQ ID

NO:8 ; HVR-L3為SEQ ID NO:10) ; 純系31.19.1D8(HVR-H1為SEQ ID NO:1 ; HVR-H2為SEQ ID NO:3 ; HVR-H3為SEQ ID NO:5 ; HVR-L1為SEQ ID NO:7 ; HVR-L2為SEQ ID NO:9 ; HVR-L3為SEQ ID NO:11) ; 及純系31.19.2D3(HVR-H1為SEQ ID NO:2 ; HVR-H2為SEQ ID NO:4 ; HVR-H3為SEQ ID NO:5 ; HVR-L1為SEQ ID NO:6 ; HVR-L2為SEQ ID NO:8 ; HVR-L3為SEQ ID NO:12) 。

胺基酸位置係根據如下所述之Kabat編號系統編號。

圖2A、B及3描繪用於實施本發明之例示性受體人類一致框架序列，序列識別符係如下：

可變區重鏈(VH)一致框架(圖2A, B)

缺Kabat CDR之人類VH亞群I一致框架(SEQ ID NO:19)
 缺擴展高變區之人類VH亞群I一致框架(SEQ ID NO:20-22)
 缺Kabat CDR之人類VH亞群II一致框架(SEQ ID NO:23)
 缺擴展高變區之人類VH亞群II一致框架(SEQ ID NO:24-26)
 缺擴展之人類VH亞群II一致框架
 缺Kabat CDR之人類VH亞群III一致框架(SEQ ID NO:27)
 缺擴展高變區之人類VH亞群III一致框架(SEQ ID NO:28-30)
 缺Kabat CDR之人類VH受體框架(SEQ ID NO:31)
 缺擴展高變區之人類VH受體框架(SEQ ID NO:32-33)
 缺Kabat CDR之人類VH受體2框架(SEQ ID NO:34)
 缺擴展高變區之人類VH受體2框架(SEQ ID NO:35-37)

可變區輕鏈(VL)一致框架(圖3)

人類VL κ 亞群I一致框架(SEQ ID NO:38)
 人類VL κ 亞群II一致框架(SEQ ID NO:39)
 人類VL κ 亞群III一致框架(SEQ ID NO:40)
 人類VL κ 亞群IV一致框架(SEQ ID NO:41)

圖4描繪huMAb4D5-8輕鏈及重鏈之框架區序列。根據Kabat，上標/粗體編號表示胺基酸位置。

圖5描繪huMAb4D5-8輕鏈及重鏈之經修飾/變體框架區序列。根據Kabat，上標/粗體編號表示胺基酸位置。

圖6描繪抗EphrinB2單株抗體純系31.19之輕鏈可變區(SEQ ID NO:48)及重鏈可變區(SEQ ID NO:49)、抗EphrinB2單株抗體純系31.19.1D8之輕鏈可變區(SEQ ID NO:50)及重鏈可變區(SEQ ID NO:51)及抗EphrinB2單株抗體純系31.19.2D之輕鏈可變區(SEQ ID NO:52)及重鏈可變區(SEQ ID NO:53)。

圖7：描繪在基於細胞之檢定中，經抗EphrinB2單株抗體治療，阻遏了EphB4受體-ephrinB2配體信號傳導。

圖8：描繪在大鼠背部袖珍室檢定中，經抗EphrinB2單株抗體治療，減少了血管生成。

圖9：描繪經抗EphrinB2抗體治療，抑制了活體內腫瘤生長。

【實施方式】

本發明於本文中提供適用於例如治療或預防與EphrinB2之表現及/或活性關聯之病態(諸如表現及/或活性增強或非所要之表現及/或活性)的抗EphrinB2抗體。在有些實施例中，本發明之抗體係用於治療腫瘤、癌及/或細胞增殖性病征。

在另一態樣中，本發明之抗EphrinB2抗體提供作為偵測及/或分離EphrinB2(諸如滯留各種組織及細胞類型中之EphrinB2)之試劑的用途。

本發明另外提供製備抗EphrinB2抗體及編碼抗EphrinB2抗體之多核苷酸的方法。

通用技術

使用熟習該項技術者習知之方法，諸如於以下文獻中所述之廣泛

使用方法，通常容易理解並普通使用本文中所述或所參考之技術及程序：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))；METHODS IN ENZYMOLOGY系列(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))。

定義

"分離"抗體為一種已經識別且分離且/或自其自然環境之成分中復原的抗體。其自然環境之雜質成分為干擾抗體之診斷性或治療性使用的物質，且可包括酶、激素及其他蛋白溶質或非蛋白溶質。在較佳實施例中，該抗體(1)如藉由Lowry方法所測定，經純化為大於95重量%之抗體，且最佳大於99重量%；(2)純化至足以經由利用旋杯式序列測定儀獲得至少15個殘基之N-末端或內部胺基酸序列的程度；或(3)使用考馬斯藍(Coomassie blue)或較佳銀染劑，在還原條件或非還原條件下，純化至SDS-PAGE之均質性。由於不存在抗體自然環境之至少一成分，因此分離抗體包括重組細胞內部的原位抗體。然而，分離抗體通常藉由至少一純化步驟來製備。

"分離"核酸分子為一種經識別且與至少一雜質核酸分子分離的核酸分子，其在該抗體核酸之天然來源中通常與雜質核酸分子關聯。分離核酸分子並非處於其本質上存在之形式或背景。因此分離核酸分子與存在於天然細胞中的核酸分子不同。然而，分離核酸分子包括正常表現抗體之細胞中所含的核酸分子，其中例如該核酸分子所在染色體位置與天然細胞者不同。

術語"Kabat中編號之可變域殘基"或"Kabat中編號之胺基酸位置"及其變化形式，均係指 Kabat 等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)中用於編碼抗體之重鏈可變域或輕鏈可變域的編號系統。使用該編號系統，實際的線性胺基酸序列可含有更少或其他胺基酸，其相當於簡化或插入可變域之FR或CDR。舉例而言，重鏈可變域可包括H2之殘基52後面的單胺基酸插入子(殘基52a，根據Kabat)及重鏈FR殘基82後面的插入殘基(例如殘基82a、82b及82c等，根據Kabat)。指定抗體之殘基之Kabat編號可藉由將該抗體序列之同源區與"標準"編號序列對準來確定。

如本文中所用，短語"大體上類似"或"大體上相同"表示兩個數值之間足夠高度的類似性(一般而言，一數值與本發明之抗體關聯而另一數值與參考/比較抗體關聯)，以使得熟習該項技術者認為兩值之間的差異在該等值(例如Kd值)所量測之生物學特徵之範圍內幾乎沒有生物學及/或統計顯著性。該兩值之間的差異作為參考/比較抗體之值的函數較佳小於約50%、較佳小於約40%、較佳小於約30%、較佳小於約20%、較佳小於約10%。

"結合親和力"泛指一分子(例如抗體)之單個結合位點與其結合夥伴(例如抗原)之間非共價相互作用力的總和。除非另有說明，否則如本文中所用之"結合親和力"係指表現結合對成員(例如抗體與抗原)之間之1:1相互作用的內在結合親和力。分子X對其夥伴Y之親和力一般可藉由解離常數(Kd)表示。親和力可藉由該項技術中已知之普通方法(包括本文中所述之彼等方法)量測。低親和力抗體結合抗原一般較慢且易傾向於解離，而高親和力抗體結合抗原一般較快且傾向於更持久地結合。各種量測結合親和力之方法在該項技術中係已知的，其中任一方法可用於本發明。具體的說明性實施例描述於下文中。

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檢定(RIA)量測，該檢定用所研究之抗體之Fab型與其抗原執行，執行如以下檢定所述：藉由在一系列用於滴定之非標記抗原存在下以最低濃度之(^{125}I)-標記抗原平衡Fab、接著以塗有抗-Fab抗體之孔板捕獲結合抗原來量測Fab對抗原之溶解結合親和力(Chen等人，(1999) *J. Mol Biol* 293:865-881)。為建立檢定條件，將微量滴定板(Dynex)以50 mM碳酸鈉(pH 9.6)中之5 $\mu\text{g/ml}$ 之捕獲抗-Fab抗體(Cappel Labs)塗履隔夜，且隨後在室溫下(約23°C)以PBS中之2%(w/v)牛血清白蛋白阻斷兩至五小時。在無吸附劑孔板(Nunc #269620)中，將100 pM或26 pM [^{125}I]-抗原與連續稀釋之所研究之Fab(例如Presta等人，(1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599中符合評定之抗-VEGF抗體，Fab-12)混合。接著將所研究之Fab培養隔夜；然而該培養可持續更長的時期(例如65個小時)以確保達成平衡。其後，將混合物轉移入捕獲孔板以便在室溫下培養(例如一小時)。接著將溶液移除且將孔板以PBS中之0.1% Tween-20洗滌八次。當孔板乾燥時，添加150微升/孔閃爍體(MicroScint-20；Packard)，且將孔板以Topcount伽瑪計數儀(Packard)計數十分鐘。將產生小於或等於最大結合之20%之濃度之各Fab選用於競爭性結合檢定。根據另一實施例，在25°C，使用BIAcoreTM-2000或BIAcoreTM-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)，使用表面電漿共振檢定，以~10響應單元(RU)之固定抗原CM5晶片量測 K_d 或 K_d 值。簡而言之，根據供應商說明書，將羧甲基化聚葡萄糖生物感應器晶片(CM5, BIAcore Inc.)以N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二醯亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基丁二醯亞胺(NHS)活化。將抗原以10 mM乙酸鈉(pH 4.8)稀釋成5 $\mu\text{g/ml}$ (~0.2 μM)，再以5微升/分鐘流速注射，以獲得約10個響應單元(RU)之偶合蛋白。注射抗原之後，注射1M乙醇胺以阻斷未反應之基團。對於動力學量測，在25°C，將經具有0.05% Tween 20(PBST)之

PBS兩倍連續稀釋之Fab(0.78 nM至500 nM)以約25 $\mu\text{l}/\text{min}$ 流速注射。締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})使用簡單的一比一朗繆爾(Langmuir)結合模型(BIAcore Evaluation Software版本3.2)、藉由同時擬合締合及解離感應圖來計算。平衡解離常數(K_d)以比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 計算。參見例如Chen, Y.等人, (1999) J. Mol Biol 293:865-881。藉由以上表面電漿共振檢定, 若締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$, 則締合速率可藉由使用螢光淬滅技術測定, 該技術係在 25°C 、在如光譜儀(諸如具有攪拌式紅色比色管之止流裝備型光譜儀(Aviv Instruments)或8000系列SLM-Aminco光譜儀(ThermoSpectronic))中所量測之濃度增大之抗原存在下量測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)之增大或減小。

根據本發明, "締合速率"或" k_{on} "亦可在 25°C 、使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)、以~10響應單元(RU)之固定抗原CM5晶片根據上述相同的表面電漿共振技術測定。簡而言之, 根據供應商說明書, 將羧甲基化聚葡萄糖生物感應器晶片(CM5, BIAcore Inc.)以N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二醯亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基丁二醯亞胺(NHS)活化。將抗原以10 mM乙酸鈉(pH 4.8)稀釋成5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (~0.2 μM), 再以5微升/分鐘流速注射, 以獲得約10個響應單元(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。對於動力學量測, 在 25°C 將經具有0.05% Tween 20(PBST)之PBS兩倍連續稀釋之Fab(0.78 nM至500 nM)以約25 $\mu\text{l}/\text{min}$ 流速注射。締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})使用簡單的一比一朗繆爾(Langmuir)結合模型(BIAcore Evaluation Software版本3.2)、藉由同時擬合締合及解離感應圖來計算。平衡解離常數(K_d)以比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 計算。參見例如Chen, Y.等人, (1999) J. Mol Biol 293:865-881。然而, 藉由以上表面電漿共振檢定, 若締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$, 則締合速

率較佳藉由使用螢光淬滅技術測定，該技術係在25℃、在如光譜儀(諸如具有攪拌式比色管之止流裝備型光譜儀(Aviv Instruments)或8000系列SLM-Aminco光譜儀(ThermoSpectronic))中所量測之濃度增大之抗原存在下量測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)之增大或減小。

如本文中所使用，術語"載體"欲指一種核酸分子，其能夠輸送已與其連接之另一核酸。一種類型之載體為"質體"，其係指可接合其他DNA片段的環狀雙股DNA環。另一類型之載體為噬菌體載體。另一類型之載體為病毒載體，其中其他DNA片段可接合入該病毒基因組。某些載體能夠在其所導入之宿主細胞中自主複製(例如具有細菌性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)可經導入宿主細胞而整合入宿主細胞之基因組內，且從而隨同該宿主基因組一起複製。此外，某些載體能夠引導其操作性連接之基因的表現。該等載體在本文中稱為"重組表現載體"(或簡稱"重組載體")。一般而言，表現載體在重組DNA技術中之應用常為質體之形式。由於質體為載體之最常用形式，因此在本說明書中，"質體"及"載體"可互換使用。

如本文中可互換使用之"多核苷酸"或"核酸"係指任何長度之核苷酸之聚合物，且包括DNA及RNA。核苷酸可為脫氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾之核苷酸或鹼基，及/或其類似物，或任何可藉由DNA或RNA聚合酶或藉由合成反應整合入聚合物內的底物。多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，則可在聚合物組裝之前或之後對核苷酸結構加以修飾。核苷酸序列可由非核苷酸成分插斷。多核苷酸可在合成之後進一步修飾，諸如藉由與標記結合。其他類型之修飾例如包括："帽子"，一或多種天然存在之核苷酸被類似物取代；核苷酸間修飾，諸如具有不荷電鍵之彼等物

(例如磷酸甲酯、磷酸三酯、磷醯胺酸、胺基甲酸酯等)及具有荷電鍵之彼等物(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)、含有懸垂部分之彼等物(諸如蛋白(例如核酸酶、毒素、抗體、信號肽、ply-L-離胺酸等)、具有嵌入劑之彼等物(例如吡啶(acridine)、補骨脂素(psoralen)等)、含有螯合劑之彼等物(例如金屬、放射性金屬、硼、氧化性金屬等)、含有烷化劑之彼等物、具有經修飾之鍵之彼等物(例如 α 變旋異構體核酸等)以及多核苷酸之未修飾形式。此外，通常存在於糖中之任一羥基可置換為例如藉由標準保護基所保護之磷酸酯基、磷酸基，或加以活化以製備與其他核苷酸之其他鍵，或可與固體或半固體載體結合。5'端及3'端OH可磷酸化或經胺或1至20個碳原子之有機封端基團部分取代。其他羥基亦可衍生為標準保護基。多核苷酸亦可含有該項技術中一般已知之核糖或脫氧核糖的類似形式，其例如包括2'-O-甲基-核糖、2'-O-烯丙基核糖、2'-氟-核糖或2'-疊氮基-核糖、碳環形糖類似物、 α -變旋異構體糖、差向異構體糖(諸如阿拉伯糖、木糖或來蘇糖(lyxoses)、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖(sedoheptuloses))、非環形類似物及基本核苷類似物，諸如甲基核糖核苷。一或多種磷酸二酯鍵可置換為替代鍵聯基團。該等替代鍵聯基團包括但不限於如下實施例，其中磷酸酯基置換為P(O)S("硫代酸酯")、P(S)S("二硫代酸酯")、(O)NR₂("醯胺化物")、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂("甲縮醛")，其中各R或R'獨立地為H或視需要含有醚鍵(-O-)、芳基、烯基、環烷基、環烯基或芳烷基(araldyl)之經取代或未經取代的烷基(1-20 C)。多核苷酸中並非所有的鍵聯必需相同。以上說明適用於本文中所述之所有多核苷酸，包括RNA及DNA。

如本文中所使用，"寡核苷酸"泛指一般單股之一般合成的短多核苷酸，其長度一般(但不一定)小於約200個核苷酸。術語"寡核苷酸"及"多核苷酸"不是互不相容的。以上多核苷酸說明同樣完全適用於寡核

苷酸。

對於肽或多肽序列之"胺基酸序列一致性百分率(%)"係定義為：在對準序列且(若需要)導入缺口序列後(以獲得最大百分率序列一致性且不將任何保守性取代視作序列一致性之部分)，與特定肽或多肽序列中胺基酸殘基相同之候選序列中胺基酸殘基的百分率。為測定胺基酸序列一致性百分率之對準可以該項技術內熟知之多種方式獲得，例如使用公用電腦軟體，諸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign(DNASTAR)軟體。熟習該項技術者可測定用於量測對準之適當參數，包括為獲得與所比較之全長序列對準之最大值所需要的任何演算法。然而，為本文起見，胺基酸序列一致性%值係使用序列比較電腦程式ALIGN-2產生，其中用於ALIGN-2程式之全部原始碼提供於以下表A中。ALIGN-2序列比較電腦程式係由Genentech, Inc.創作且以下表A所示原始碼已以用戶文件說明備案於美國版權辦公室(U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559)，其中其係以美國版權寄存第TXU510087號寄存。ALIGN-2程式可公開購得於Genentech, Inc., South San Francisco, California或可根據以下表A中所提供之原始碼編寫。所編ALIGN-2程式應可用於UNIX操作系統，較佳數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數由ALIGN-2程式設定且不改變。

表A

```
/*
*
* C-C increased from 12 to 15
* Z is average of EQ
* B is average of ND
* match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
*/
#define _M -8 /* value of a match with a stop */
```

```

int _day[26][26] = {
/*   A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z*/
/* A */    { 2, 0,-2, 0, 0,-4, 1,-1,-1, 0,-1,-2,-1, 0,_M, 1, 0,-2, 1, 1, 0, 0,-6, 0,-3, 0},
/* B */    { 0, 3,-4, 3, 2,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 0, 0, 0,-2,-5, 0,-3, 1},
/* C */    {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2, 0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4, 0,-2, 0,-2,-8, 0, 0,-5},
/* D */    { 0, 3,-5, 4, 3,-6, 1, 1,-2, 0, 0,-4,-3, 2,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 2},
/* E */    { 0, 2,-5, 3, 4,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 1,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 3},
/* F */    {-4,-5,-4,-6,-5, 9,-5,-2, 1, 0,-5, 2, 0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3, 0,-1, 0, 0, 7,-5},
/* G */    { 1, 0,-3, 1, 0,-5, 5,-2,-3, 0,-2,-4,-3, 0,_M,-1,-1,-3, 1, 0, 0,-1,-7, 0,-5, 0},
/* H */    {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
/* I */    {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */    {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
/* L */    {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1,-2},
/* M */    {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},
/* N */    { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */    {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,
            0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */    { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */    { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */    {-2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */    { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */    { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */    { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */    {-6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */    {-3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */    { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
};

```

```

/*
 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP 16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS 1024      /* max jmps in an path */
#define MX 4          /* save if there's at least MX-1 bases since last
                        jmp */

#define DMAT 3         /* value of matching bases */
#define DMIS 0         /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0 8         /* penalty for a gap */
#define DINS1 1         /* penalty per base */
#define PINS0 8         /* penalty for a gap */
#define PINS1 4         /* penalty per residue */

struct jmp {
    short      n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int      score; /* score at last jmp */
    long      offset; /* offset of prev block */
    short      ijmp; /* current jmp index */
    struct jmp      jp; /* list of jmps */
};

```

```

struct path {
    int          spc;          /* number of leading spaces */
    short       n[JMPSP];    /* size of jmp (gap) */
    int         x[JMPSP];    /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char          *ofile;      /* output file name */
char          *namex[2];   /* seq names: getseqs() */
char          *prog;       /* prog name for err msgs */
char          *seqx[2];    /* seqs: getseqs() */
int           dmax;        /* best diag: nw() */
int           dmax0;       /* final diag */
int           dna;         /* set if dna: main() */
int           endgaps;     /* set if penalizing end gaps */
int           gapx, gapy;   /* total gaps in seqs */
int           len0, len1;   /* seq lens */
int           ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int           smax;        /* max score: nw() */
int           *xbm;        /* bitmap for matching */
long          offset;     /* current offset in jmp file */
struct diag    *dx;        /* holds diagonals */
struct path    pp[2];     /* holds path for seqs */

char          *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char          *getseq(), *g_calloc();

```

```

/* Needleman-Wunsch alignment program

```

```

*

```

```

* usage: progs file1 file2

```

```

*   where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.

```

```

*   The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity

```

- * Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
- * Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
- * A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
- * Output is in the file "align.out"
- *
- * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
- * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
- */

```
#include "nw.h"
```

```
#include "day.h"
```

```
static  _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};
```

```
static  _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};
```

```
main(ac, av)
```

```
main
```

```
    int    ac;
```

```
    char   *av[];
```

```
{
```

```
    prog = av[0];
```

```
    if (ac != 3) {
```

```
        fprintf(stderr,"usage: %s file1 file2\n", prog);
```

```
        fprintf(stderr,"where file1 and file2 are two dna or two protein
        sequences.\n");
```

```

    fprintf(stderr,"The sequences can be in upper- or lower-case\n");
    fprintf(stderr,"Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
    fprintf(stderr,"Output is in the file \"align.out\"\n");
    exit(1);
}
namex[0] = av[1];
namex[1] = av[2];
seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

endgaps = 0;          /* 1 to penalize endgaps */
ofile = "align.out";  /* output file */

nw();      /* fill in the matrix, get the possible jmps */
readjmps(); /* get the actual jmps */
print();    /* print stats, alignment */

cleanup(0); /* unlink any tmp files */
}

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()
{
    char      *px, *py;      /* seqs and ptrs */

```

nw

```

int          *ndely, *dely;    /* keep track of dely */
int          ndelx, delx;      /* keep track of delx */
int          *tmp;             /* for swapping row0, row1 */
int          mis;              /* score for each type */
int          ins0, ins1;       /* insertion penalties */
register     id;               /* diagonal index */
register     ij;               /* jmp index */
register     *col0, *col1;     /* score for curr, last row */
register     xx, yy;           /* index into seqs */

```

```

dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

```

```

ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));

```

```

dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));

```

```

col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));

```

```

col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));

```

```

ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;

```

```

ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

```

```

smax = -10000;

```

```

if (endgaps) {

```

```

    for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {

```

```

        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;

```

```

        ndely[yy] = yy;

```

```

    }

```

```

    col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */

```

```

}

```

```

else

```

```

    for (yy = 1; yy <= len1; yy++)

```

```

        dely[yy] = -ins0;

```

```
/* fill in match matrix
```

```
*/
```

```
for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
```

```
    /* initialize first entry in col
```

```
    */
```

```
    if (endgaps) {
```

```
        if (xx == 1)
```

```
            col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
```

```
        else
```

```
            col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
```

```
        ndelx = xx;
```

```
    }
```

```
    else {
```

```
        col1[0] = 0;
```

```
        delx = -ins0;
```

```
        ndelx = 0;
```

```
    }
```

...nw

```
for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
```

```
    mis = col0[yy-1];
```

```
    if (dna)
```

```
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
```

```
    else
```

```
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];
```

```
/* update penalty for del in x seq;
```

```
    * favor new del over ongong del
```

```
    * ignore MAXGAP if weighting endgaps
```

```
    */
```

```
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
```

```

    if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
        ndely[yy] = 1;
    } else {
        dely[yy] -= ins1;
        ndely[yy]++;
    }
} else {
    if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
        ndely[yy] = 1;
    } else
        ndely[yy]++;
}

/* update penalty for del in y seq;
 * favor new del over ongong del
 */
if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else {
        delx -= ins1;
        ndelx++;
    }
} else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else

```

```

        ndelx++;
    }

    /* pick the maximum score; we're favoring
     * mis over any del and delx over dely
     */

                                                                    ...nw

    id = xx - yy + len1 - 1;
    if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
        coll[yy] = mis;
    else if (delx >= dely[yy]) {
        coll[yy] = delx;
        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
            dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejumps(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
    else {
        coll[yy] = dely[yy];

```

```

        ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = dely[yy];
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (coll[yy] > smax) {
        smax = coll[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1];
    dmax = id;
}

```

```

        }
        tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
    }
    (void) free((char *)ndely);
    (void) free((char *)dely);
    (void) free((char *)col0);
    (void) free((char *)col1);    }

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() - -put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC3

#define P_LINE 256 /* maximum output line */
#define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

```

print()

print

```

{
    int lx, ly, firstgap, lastgap;    /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
}

```

```

    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */

```

static

```
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
```

getmat

```

    int lx, ly;          /* "core" (minus endgaps) */
    int firstgap, lastgap; /* leading trailing overlap */
{
    int          nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char         outx[32];
    double       pct;
    register     n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;

```

```

        n1++;
        siz0--;
    }
    else if (siz1) {
        p0++;
        n0++;
        siz1--;
    }
    else {
        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
            nm++;
        if (n0++ == pp[0].x[i0])
            siz0 = pp[0].n[i0++];
        if (n1++ == pp[1].x[i1])
            siz1 = pp[1].n[i1++];
        p0++;
        p1++;
    }
}

/* pct homology:
 * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
 * else, knock off overhangs and take shorter core
 */
if (endgaps)
    lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
else
    lx = (lx < ly)? lx : ly;
pct = 100.*((double)nm)/((double)lx;
fprintf(fx, "\n");
fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",

```

```
nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
```

```
fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
```

...getmat

```
if (gapx) {
```

```
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
```

```
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
```

```
    fprintf(fx, "%s", outx);
```

```
fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
```

```
if (gapy) {
```

```
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
```

```
        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
```

```
    fprintf(fx, "%s", outx);
```

```
}
```

```
if (dna)
```

```
    fprintf(fx,
```

```
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per
```

```
base)\n",
```

```
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
```

```
else
```

```
    fprintf(fx,
```

```
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per
```

```
residue)\n",
```

```
        smax, PINS0, PINS1);
```

```
if (endgaps)
```

```
    fprintf(fx,
```

```
        "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
```

```
        firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
```

```
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
```

else

fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");

}

static nm; /* matches in core -- for checking */

static lmax; /* lengths of stripped file names */

static ij[2]; /* jmp index for a path */

static nc[2]; /* number at start of current line */

static ni[2]; /* current elem number -- for gapping */

static siz[2];

static char *ps[2]; /* ptr to current element */

static char *po[2]; /* ptr to next output char slot */

static char out[2][P_LINE]; /* output line */

static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*

* print alignment of described in struct path pp[]

*/

static

pr_align()

pr_align

{

int nn; /* char count */

int more;

register i;

for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {

nn = stripname(nameex[i]);

if (nn > lmax)

lmax = nn;

nc[i] = 1;

```

ni[i] = 1;
siz[i] = ij[i] = 0;
ps[i] = seqx[i];
po[i] = out[i];          }

```

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; )
{
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;
        }
    }
}

```

```

        /*
        * are we at next gap for this seq?
        */
        if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
            /*
            * we need to merge all gaps
            * at this location
            */
            siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
            while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
        }
        ni[i]++;
    }
}

if (++nn == olen || !more && nn) {
    dumpblock();
    for (i = 0; i < 2; i++)
        po[i] = out[i];
    nn = 0;
}
}

/*
* dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
*/
static
dumpblock()
{
    dumpblock

```

```
register i;
```

```
for (i = 0; i < 2; i++)
```

```
    *po[i]-- = '\0';
```

...dumpblock

```
(void) putc('\n', fx);
```

```
for (i = 0; i < 2; i++) {
```

```
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
```

```
        if (i == 0)
```

```
            nums(i);
```

```
        if (i == 0 && *out[1])
```

```
            stars();
```

```
        putline(i);
```

```
        if (i == 0 && *out[1])
```

```
            fprintf(fx, star);
```

```
        if (i == 1)
```

```
            nums(i);
```

```
    }
```

```
}
```

```
}
```

```
/*
```

```
 * put out a number line: dumpblock()
```

```
*/
```

```
static
```

```
nums(ix)
```

nums

```
    int ix; /* index in out[] holding seq line */
```

```
{
```

```
    char        nline[P_LINE];
```

```
    register    i, j;
```

```
register char    *pn, *px, *py;
```

```
for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
```

```
    *pn = ' ';
```

```
for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
```

```
    if (*py == ' ' || *py == '-')
```

```
        *pn = ' ';
```

```
    else {
```

```
        if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
```

```
            j = (i < 0)? -i : i;
```

```
            for (px = pn; j; j /= 10, px--)
```

```
                *px = j%10 + '0';
```

```
            if (i < 0)
```

```
                *px = '-';
```

```
        }
```

```
    else
```

```
        *pn = ' ';
```

```
    i++;
```

```
}
```

```
}
```

```
*pn = '\0';
```

```
nc[ix] = i;
```

```
for (pn = nline; *pn; pn++)
```

```
    (void) putc(*pn, fx);
```

```
(void) putc('\n', fx);
```

```
}
```

```
/*
```

```
* put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
```

```
*/
```

```
static
```

putline(ix)

putline

```
int ix;      {
```

...putline

```
int      i;
```

```
register char    *px;
```

```
for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
```

```
    (void) putc(*px, fx);
```

```
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
```

```
    (void) putc(' ', fx);
```

```
/* these count from 1:
```

```
 * ni[] is current element (from 1)
```

```
 * nc[] is number at start of current line
```

```
 */
```

```
for (px = out[ix]; *px; px++)
```

```
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
```

```
(void) putc('\n', fx);
```

```
}
```

```
/*
```

```
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
```

```
 */
```

```
static
```

```
stars()
```

stars

```
{
```

```
int      i;
```

```
register char    *p0, *p1, cx, *px;
```

```
if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
```

```

        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
    return;
px = star;
for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
    *px++ = ' ';

for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
    if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
            cx = '*';
            nm++;
        }
        else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
            cx = '!';
        else
            cx = ' ';

    }
    else
        cx = ' ';

    *px++ = cx;
}
*px++ = '\n';
*px = '\0';
}

```

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */

```

static

stripname(pn)

stripname

```

    char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
    register char    *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";    /* tmp file for jumps */
FILE    *fj;

int cleanup();    /* cleanup tmp file */
long    lseek();

```

```

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */

```

```
cleanup(i)
```

cleanup

```

    int i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

```

```

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */

```

```
char *
```

```
getseq(file, len)
```

getseq

```

    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */
{
    char line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int natgc, tlen;
    FILE *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;

```

```

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++)
        if (isupper(*px) || islower(*px))
            tlen++;
}
if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
    fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6,
file);
    exit(1);
}
pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

```

...getseq

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

```

```

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
}

```

```

    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

```

```

char *

```

```

g_malloc(msg, nx, sz)                                g_malloc

    char *msg;          /* program, calling routine */
    int nx, sz;          /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_malloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx,
sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

```

```

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */

```

```

readjmps()                                            readjmps
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;

```

```
register i, j, xx;
```

```
if (fj) {
```

```
    (void) fclose(fj);
```

```
    if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
```

```
        fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
```

```
        cleanup(1);
```

```
    }
```

```
}
```

```
for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
```

```
    while (1) {
```

```
        for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
```

```
            ;
```

...readjumps

```
        if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
```

```
            (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
```

```
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
```

```
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
```

```
            dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
```

```
        }
```

```
        else
```

```
            break;
```

```
    }
```

```
if (i >= JMPS) {
```

```
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
```

```
    cleanup(1);
```

```
}
```

```
if (j >= 0) {
```

```
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
```

```
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
```

```

    dmax += siz;
    if (siz < 0) {      /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
           */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
    /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
    /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}

/* reverse the order of jmps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;

```

```

        i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
    }
    for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
    }
    if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
    if (fj) {
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;
    }

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejumps(ix)                                writejumps
{
    int ix;

    char    *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
}

```

}

`(void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);``(void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);`

在其中ALIGN-2用於胺基酸序列比較之狀況中，給定胺基酸序列A與給定胺基酸序列B之胺基酸序列一致%(其或者可表示為具有或包含與給定胺基酸序列B一致之某%胺基酸序列的給定胺基酸序列A)計算如下：

100乘分數X/Y

其中X為在A與B之程式對準中、藉由序列對準程式ALIGN-2評價為一致匹配之胺基酸殘基數目，且其中Y為B中胺基酸殘基之總數目。應瞭解當胺基酸序列A之長度不等於胺基酸序列B之長度時，A與B之胺基酸序列一致%不等於B與A之胺基酸序列一致%。

除非另有具體說明，否則本文中所使用之全部的胺基酸序列一致%值可如前一段中所述使用ALIGN-2電腦程式獲得。

除非另有具體說明或上下文說明，否則如本文中所使用之術語"EphrinB2"(可互換地稱為"EphrinB2配體")係指任何天然的或變體(無論天然的或合成的)EphrinB2多肽。術語"天然序列"具體包括天然存在之截短形式或分泌形式(例如胞外域序列)、天然存在之變體形式(例如，替代性接合形式)及天然存在之等位變體。術語"野生型EphrinB2"泛指包含天然存在之EphrinB2蛋白之胺基酸序列的多肽。術語"野生型EphrinB2序列"泛指出現於天然存在之EphrinB2中的胺基酸序列。

除非另有具體說明或上下文說明，否則本文中所使用之術語"Eph受體"(諸如EphB受體，諸如EphB1、EphB2及/或EphB3)係指任何天然或變體(無論天然的或合成的)Eph受體多肽。術語"天然序列"具體包括天然存在之截短形式或分泌形式(例如胞外域序列)、天然存在之變體形式(例如，替代性接合形式)及天然存在之等位變體。術語"野生

型Eph受體"泛指包含天然存在之Eph受體蛋白之胺基酸序列的多肽。術語"野生型Eph受體序列"泛指出現於天然存在之Eph受體中的胺基酸序列。

術語"抗體"及"免疫球蛋白"在廣義上可互換使用，包括單株抗體(例如全長或完整單株抗體)、多株抗體、多價抗體、多特異性抗體(例如，雙特異性抗體，只要其展現所要生物活性)，亦可包括某些抗體片段(如本文中之更詳細描述)。抗體可為人類抗體、人源化抗體及/或親和力成熟抗體。

術語"可變"係指如下事實：可變域之某些部分在各抗體之間於序列上廣泛不同，可用於各特定抗體對其特定抗原的結合及特異性。然而，可變性並非在抗體之整個可變域內均勻分佈。其集中於輕鏈可變域與重鏈可變域中之三個稱為互補性決定區(CDRs)或高變區的片段。可變域之較高度保守部分稱為框架(FR)。天然重鏈及輕鏈之可變域各包含四個FR區，大部分採用 β -片狀組態，藉由三個CDRs連接，其形成連接 β -片狀結構之環，在有些狀況中形成 β -片狀結構之部分。各鏈中之CDRs藉由FR區緊密結合在一起，且與其他鏈中之CDRs形成抗體之抗原結合位點(參見 Kabat 等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第五版，National Institute of Health, Bethesda, MD (1991))。恆定域不直接涉及抗體結合至抗原，而是展現各種效應功能，諸如使抗體參與抗體依賴型細胞毒性。

抗體經木瓜酶消化產生兩個相同的抗原結合片段，稱作"Fab"片段(各具有單一抗原結合位點)及殘餘的"Fc"片段，其名稱反映其易於結晶的能力。胃蛋白酶處理產生 $F(ab')_2$ 片段，其具有兩個抗原結合位點且仍可交聯抗原。

"Fv"為含有一個完整抗原識別與抗原結合位點的最小抗體片段。在雙鏈Fv種類中，此區域包含一重鏈可變域與一輕鏈可變域以非共價

緊緊締合之二聚體。在單鏈Fv種類中，一重鏈可變域與一輕鏈可變域可藉由一個柔性肽連接子以共價聯結，使得輕鏈與重鏈可以類似於雙鏈Fv種類中之"二聚體"結構締合。在此組態中，各可變域中之三個CDRs相互作用以界定VH-VL二聚體表面上的抗原結合位點。六個CDRs共同使抗體具有抗原結合特異性。然而，甚至單一可變域(或Fv之一半，僅包含三個具有抗原特異性之CDRs)亦具有識別及結合抗原之能力，儘管親和力低於整個結合位點。

Fab片段亦含有輕鏈之恆定域及重鏈之第一恆定域(CH1)。Fab'片段與Fab片段不同之處在於重鏈CH1域之羧基末端處增加一些殘基，包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸。Fab'-SH在本文中為其中恆定域之半胱胺酸殘基帶有自由硫醇基之Fab'的命名。F(ab')₂抗體片段最初係作為一對Fab'片段(其之間具有鉸鏈半胱胺酸)產生。其他化學偶合之抗體片段亦已獲知。

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(稱作 κ 及 λ)之一。

免疫球蛋白視其重鏈之恆定域之胺基酸序列而定，可分為不同類。免疫球蛋白主要存在五類：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且該等類中之若干類可進一步劃分為亞類(同型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於各類免疫球蛋白之重鏈恆定域分別稱作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。各類免疫球蛋白之亞單位結構及三維組態已為吾人熟知。

"抗體片段"僅包含完整抗體之一部分，其中該部分較佳保持與彼部分當存在於完整抗體中時一般關聯之功能中之至少一功能，較佳大部分或全部功能。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；及由抗體片段所形成的多特異性抗體。在一實施例中，抗體片段包含完整抗體之抗原結合位點且

因而保持結合抗原之能力。在另一實施例中，一抗體片段，例如一包含Fc區的抗體片段，保持與該Fc區當存在於完整抗體中時一般關聯之生物功能中之至少一功能，例如FcRn結合、抗體半衰期調節、ADCC功能及互補結合。在一實施例中，一抗體片段為具有大體上與完整抗體類似之活體內半衰期的單價抗體。舉例而言，該抗體片段可包含與Fc序列連接之抗原結合臂，Fc序列能夠使該片段具有活體內穩定性。

術語"高變區"、"HVR"或"HV"當用於本文中時係指抗體可變域中序列為高變且/或在結構上形成限定環的區域。通常，抗體包含六個高變區；三個在VH(H1、H2、H3)中且三個在VL(L1、L2、L3)。本文中使用大量高變區圖解且其涵蓋於本文中。Kabat互補決定區(CDR)係基於序列可變性且使用最常見(Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothia另外指出結構環之位置(Chothia及Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))。AbM高變區表現出Kabat CDR與Chothia結構環之間的妥協且被Oxford Molecular's AbM抗體建模軟體利用。"接觸"高變區係基於分析現有的複合物晶體結構。該等各高變區中之殘基記錄如下。

	Loop Kabat	AbM	Chothia	Contact
	-----	---	-----	-----
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

高變區可包含如下"擴展高變區": VL中之24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)及89-97(L3)以及VH中之26-35(H1)、50-65或49-65(H2)及93-102、94-102或95-102(H3)。可變域殘基係根據上文Kabat等人之該等各定義編號。

"框架"或"FR"殘基為除如本文中所定義高變區殘基之外的彼等可變域殘基。

非人類(例如鼠)抗體之"人源化"形式為含有源自非人類免疫球蛋白之最小序列的嵌合抗體。人源化抗體多半為人類免疫球蛋白(受體抗體)，其中來自受體之高變區之殘基係置換為來自具有所要特異性、親和力及能力之諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物之非人類種(供體抗體)之高變區之殘基。在有些情況下，人類免疫球蛋白之框架區(FR)殘基係置換為對應的非人類殘基。此外，人源化抗體可包含受體抗體中或供體抗體中不存在的殘基。可作出該等修飾以進一步改進抗體效能。一般而言，人源化抗體包含至少一個可變域而一般至少兩個可變域中之大體上全部的可變域，其中全部或大體上全部的高變環與非人類免疫球蛋白之彼等環對應，且全部或大體上全部的FR為人類免疫球蛋白序列之彼等FR。人源化抗體視需要亦可包含免疫球蛋白恆定區(Fc)、一般人類免疫球蛋白恆定區之至少一部分。更多詳情，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)。亦可參見其中所引用之如下評論文章及參考文獻：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)。

"嵌合"抗體(免疫球蛋白)以及只要能展現所要生物活性的該等抗體之片段具有與源自特定種或屬於特定抗體類或亞類之抗體中之相應序列相同或同源之重鏈及/或輕鏈中之一部分，而鏈中之其餘部分與源自另一種或屬於另一抗體類或亞類之抗體中之相應序列相同或同源(美國專利第4,816,567號；及Morrison等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984))。如本文中所使用之人源化抗體為一亞組之嵌合抗體。

"單鏈Fv"或"scFv"抗體片段包含抗體之VH及VL域，其中該等域存在於單個多肽鏈中。通常，scFv多肽進一步包含介於VH與VL域之間、能使scFv形成抗原結合所要結構的多肽連接子。回顧scFv，參見Pluckthun，於The Pharmacology of Monoclonal Antibodies中，第113卷，Rosenburg及Moore編，Springer-Verlag, New York，第269-315頁(1994)。

"抗原"為抗體可選擇性結合的預定抗原。靶抗原可為多肽、碳水化合物、核酸、脂質、半抗原或其他天然存在化合物或合成化合物。靶抗原較佳為多肽。

術語"雙功能抗體"係指具有兩個抗原結合位點的小抗體片段，該等片段包含與同一多肽鏈中之輕鏈可變域(VL)連接的重鏈可變域(VH)(VH-VL)。藉由利用太短而使同一鏈上之兩個域無法配對的連接子，可迫使該等域與另一鏈中之互補域配對且產生兩個抗原結合位點。雙功能抗體更多描述於例如EP 404,097；WO 93/11161；及Hollinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)中。

"人類抗體"為一種具有與人類所產生之抗體之胺基酸序列對應之胺基酸序列的抗體，且可利用如本文中所揭露之任一種製備人類抗體之技術製得。人類抗體之此定義明確地不包括包含非人類抗原結合殘基的人源化抗體。

"親和力成熟"抗體為一種在其一或多個CDR中具有一或多處可使得抗體對抗原之親和力改良(與不具有彼等修改之親本抗體相比)之修改的抗體。親和力成熟抗體較佳具有對靶抗原之奈莫耳(nanomolar)、乃至皮莫耳(picomolar)親和力。親和力成熟抗體可藉由該項技術中已知之程序製得。Marks等人, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)描述藉由VH與VL域改組之親和力成熟。CDR及/或框架殘基之隨機突變誘發描述於: 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)。

抗體"效應功能"係指可歸因於抗體之Fc區(天然序列Fc區或胺基酸序列變體Fc區)且隨抗體同型變化的彼等生物活性。抗體效應功能之實例包括: C1q結合及互補依賴性細胞毒性; Fc受體結合; 抗體依賴型細胞介導之細胞毒性(ADCC); 吞噬細胞作用; 細胞表面受體(例如B細胞受體)之減量調節; 及B細胞激活。

"抗體依賴型細胞介導之細胞毒性"或"ADCC"係指細胞毒性之一種形式, 其中存在於某些細胞毒素細胞(例如天然殺手(NK)細胞、嗜中性白細胞及巨噬細胞)上之Fc受體(FcR)所結合之分泌型Ig使該等細胞毒素效應細胞能夠特定結合至攜有抗原之靶細胞且隨後以細胞毒素殺死靶細胞。抗體"武裝"細胞毒素細胞且為該殺死所絕對需要的。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表現總結於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)之第464頁上之表格3中。為評定所研究之分子的ADCC活性, 可執行活體外ADCC檢定, 諸如美國專利第5,500,362號或第5,821,337號或Presta美國專利第6,737,056號中所述之彼檢定。適用於該等檢定的效應細胞包括周圍血液單核細

胞(PBMC)及天然殺手(NK)細胞。或者，或此外，所研究之分子之ADCC活性例如可在動物模型(諸如Clynes等人，PNAS (USA) 95:652-656 (1998)中所揭示之動物模型)中活體內評定。

"人類效應細胞"為表現一或多個FcR且執行效應功能的白細胞。該等細胞較佳表現至少FcγRIII且執行ADCC效應功能。可介導ADCC之人類白細胞之實例包括周圍血液單核細胞(PBMC)、天然殺手(NK)細胞、單核細胞、細胞毒性T細胞及嗜中性白細胞；PBMC及NK細胞較佳。效應細胞可由自生來源、例如由血液中分離出。

"Fc受體"或"FcR"描述結合抗體之Fc區的受體。FcR較佳為天然序列人類FcR。此外，FcR較佳為結合IgG抗體(γ受體)且包括FcγRI、FcγRII及FcγRIII亞類之受體的FcR，包括該等受體之等位變體及替代接合形式。FcγRII受體包括具有相似胺基酸序列之FcγRIIA("活化受體")及FcγRIIB ("抑制受體")，相似胺基酸序列主要係在細胞質域中不一致。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M.於Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)中之評述)。FcR見述於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)。其他FcR，包括有待將來識別之彼等FcR，皆涵蓋於本文中之術語"FcR"。該術語亦包括新生兒受體FcRn，其負責將母本IgG傳遞至胎兒(Guyer 等人, *J. Immunol.* 117:587 (1976)及Kim等人, *J. Immunol.* 24:249 (1994))且調節免疫球蛋白之穩衡。

WO 00/42072(Presta)描述經改良或經減弱之結合FcR的抗體變體。彼專利公開案之內容以引用方式特別併入本文中。亦可參見Shields等人, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)。

量測結合FcRn之方法係已知(參見例如 Ghetie 1997, Hinton 2004)。活體內結合人類FcRn及人類FcRn高親和力結合多肽之血清半衰期例如可在轉殖基因小鼠中檢定或在表現人類FcRn之轉染人類細胞株中檢定，或在經Fc變體多肽投藥之靈長類動物中檢定。

"互補依賴性細胞毒性"或"CDC"係指靶細胞在補體存在下之溶解。典型補體通道之激活藉由補體系統之第一成分(C1q)與結合其同源抗原之(適當亞類之)抗體結合開始。為評定補體激活，可執行CDC檢定，例如 Gazzano-Santoro 等人，*J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)中所述之檢定。

具有經改動之Fc區胺基酸序列及經增減之C1q結合能力的多肽變體描述於美國專利第6,194,551B1號及WO 99/51642中。彼等專利公開案之內容以引用方式特別併入本文中。亦可參見 Idusogie 等人，*J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)。

術語"包含Fc區之多肽"係指包含Fc區的多肽，諸如抗體或免疫黏附素(參見下文定義)。Fc區之C末端離胺酸(殘基447，根據EU編號系統)例如可在多肽純化期間移除或藉由重組設計編碼多肽之核酸移除。因此，本發明之包含具有Fc區之多肽的組合物可包含具有K447之多肽、所有K447被移除之多肽或具有K447殘基之多肽與無K447殘基之多肽之混合物。

"阻斷"抗體或"拮抗"抗體為一種抑制或降低其所結合之抗原之生物活性的抗體。阻斷抗體或拮抗抗體大體上或完全地抑制抗原之生物活性較佳。

如本文中所使用之"促效抗體"為一種模擬所研究之多肽之至少一種功能活性的抗體。

用於本文中之"受體人類框架"為包含源自人免疫球蛋白框架或源自人類一致框架之VL或VH框架之胺基酸序列的框架。"源自"人免疫

球蛋白框架或人類一致框架之受體人類框架可包含其相同的胺基酸序列或可含有原有胺基酸序列變換。若存在原有胺基酸變換，則較佳存在不超過5處且較佳4或小於4處、或3或小於3處的原有胺基酸變換。若原有胺基酸變換存在於VH中，則彼等變換僅在位置71H、73H及78H之三處、兩處或一處較佳；例如彼等位置處之胺基酸殘基可為71A、73T及/或78A。在一實施例中，VL受體人類框架的序列與VL人免疫球蛋白框架序列或人類一致框架序列相同。

"人類一致框架"為一種表示在人免疫球蛋白VL或VH框架序列之選擇中最普遍存在之胺基酸殘基的框架。通常，人免疫球蛋白VL或VH序列係選自可變域序列之亞群。通常，該等序列之亞群為如Kabat等人所述之亞群。在一實施例中，VL之亞群為如Kabat等人所述之亞群κI。在一實施例中，VH之亞群為如Kabat等人所述之亞群III。

"VH亞群III一致框架"包含獲自Kabat等人之可變域重鏈亞群III之胺基酸序列中的一致序列。在一實施例中，VH亞群III一致框架胺基酸序列包含以下各序列之至少一部分或全部：
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:42)- H1-
WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:43)-H2-RFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:44)-H3-WGQ GTLVTVSS (SEQ ID
NO:45)。

"VL亞群I一致框架"包含獲自Kabat等人之可變域輕鏈κ亞群I之胺基酸序列中的一致序列。在一實施例中，VH亞群I一致框架胺基酸序列包含以下各序列之至少一部分或全部：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:15)-L1-
WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:16)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFT
LTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:17)-L3-FGQGTK VEIK (SEQ ID
NO:18)。

"病症"或"疾病"為經本發明之物質/分子或方法治療可得益的任何病狀。此包括慢性及急性病症或疾病，包括預先使哺乳動物傾向於感染所述病症的病理性病狀。本文中欲治療之病症之非限制實例包括惡性及良性瘤、癌、胚細胞瘤及肉瘤。

術語"細胞增殖性病症"及"增殖性病症"係指與某種程度之異常細胞增殖關聯的病症。在一實施例中，細胞增殖性病症為癌。

如本文中所使用之"腫瘤"係指所有的贅生性細胞生長及增殖，無論惡性或良性，以及所有的癌變前及癌細胞及組織。術語"癌"、"癌的"、"細胞增殖性病症"、"增殖性病症"及"腫瘤"如本文中所引述並非互相排斥的。

術語"癌"及"癌的"係指或描述哺乳動物中通常以無限制細胞生長/增殖為特徵的生理性病狀。癌實例包括但不限於：癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病。該等癌之更具體實例包括鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺之腺癌、肺之鱗狀癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、胰腺癌、成膠質細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌或子宮癌、唾液腺癌、腎癌、肝癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌、胃癌、黑素瘤及各種類型之頭頸癌。血管生成之失調會引起多種病症，該等病症可藉由本發明之組合物及方法治療。該等病症包括非贅生性病狀與贅生性病狀。贅生性病包括但不限於上述彼等病症。非贅生性病包括但不限於非所要之或異常肥大、關節炎、類風濕性關節炎(RA)、牛皮癬、牛皮癬斑、類肉瘤病、動脈粥樣硬化症、動脈粥樣斑、糖尿病性及其他增殖性視網膜病(包括早熟性視網膜病)、晶狀體後纖維增生症、新生血管青光眼、年齡相關性黃斑變性、糖尿病性黃斑水腫、角膜新血管生成、角膜移植新血管生成、角膜移植排斥、視網膜/脈絡膜新血管生成、眼角新血管生成(虹膜紅變)、眼新生血管疾

病、血管再狹窄、動靜脈畸形(AVM)、腦脊膜瘤、血管瘤、血管纖維瘤、甲狀腺過度增生(包括Grave氏疾病)、角膜及其他組織移植、慢性炎症、肺炎、急性肺損傷/ ARDS、敗血症、原發性肺動脈高壓、惡性肺引流、腦水腫(例如，與急性中風/封閉式頭部損傷/創傷關聯)、滑液炎、RA中之血管翳形成、化骨性肌炎、肥厚性骨形成、骨關節炎(OA)、難治性腹水、多囊性卵巢疾病、子宮內膜異位、第三間隙流體疾病(胰腺炎、隔室症候群、燒傷、腸病)、子宮纖維瘤、早產、慢性炎症(諸如IBD(Crohn氏疾病及潰瘍性結腸炎))、腎同種異體移植排斥、炎症性腸病、腎病症候群、非所要之或異常組織大量生長(非癌)、血友病性關節病、肥厚性瘢痕、毛髮生長抑制、Osler-Weber症候群、化膿性肉芽腫晶狀體後纖維增生症、硬皮病、顆粒性結膜炎、血管黏著、滑膜炎、皮炎、子癇前期、腹水、心包腔積液(諸如，與心包炎關聯之彼病)及胸膜腔積液。

廣義使用之術語"神經變性疾病"及"神經變性病"包括涉及神經元退化及/或功能失調之病理的所有病症，包括而不限於：周圍神經病；運動神經元病症，諸如肌萎縮性側索硬化(ALS；Lou Gehrig氏疾病)、Bell氏麻痺及涉及脊髓性肌萎縮或麻痺的各種病狀；及其他人類神經變性疾病，諸如阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、癲癇症、多發性硬化症、慢性遺傳性舞蹈病(Huntington's chorea)、Down氏症候群、神經性耳聾及美尼爾氏病(Meniere's disease)。

"周圍神經病"為影響周圍神經的神經變性病，最常表現為運動、感覺、感覺運動或自主功能失調其中之一者或組合。周圍神經病例如可遺傳而得，可由全身性疾病引起，或可由毒性劑(諸如神經毒藥，例如抗腫瘤藥劑或工業或環境污染物)誘發。"周圍感覺神經病"的特徵為周圍感覺神經元之退化，其可為自發性的，例如可能由於以

下病而發生：糖尿病(糖尿病性神經病變)、癌症中之細胞抑制藥物治療(例如，以諸如如下化學治療劑治療：長春新鹼(vincristine)、順鉑(cisplatin)、甲胺喋呤、3'-疊氮基-3'-脫氧胸腺嘧啶核苷，或紫杉烷(taxane)，例如太平洋紫杉醇(paclitaxel)[TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.] 及多西他賽(doxetaxel)[TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France])、酒精中毒、後天免疫缺乏症候群(AIDS)或遺傳傾向性。遺傳獲得之周圍神經病例如包括Refsum氏疾病、Krabbe氏疾病、異染腦白質病變、Fabry氏疾病、Dejerine-Sottas症候群、無 β 脂蛋白血症及Charcot-Marie-Tooth(CMT)病(亦稱腓骨肌萎縮症或遺傳性運動感覺神經病(HMSN))。多數類型之周圍神經病發展緩慢，歷經時期數月或數年。在臨床實踐中，該等神經病稱為慢性的。有時周圍神經病發展快速，歷經數天期間，因而稱為急性的。周圍神經病一般同時影響感覺神經與運動神經，以致產生混合型感覺與運動神經病，但單純感覺神經病及單純運動神經病亦已知。

如本文中所使用，"治療"係指臨床介入以求改變所治療之個體或細胞之自然過程，且可為預防而執行或在臨床病理期間執行。理想的治療效果包括預防疾病發作或復發、減輕症狀、減少疾病之任何直接或間接病理性後果、預防病灶轉移、降低疾病行進速率、改善或減緩疾病狀態及症狀緩解或預後改良。在有些實施例中，本發明之抗體係用於延緩疾病或病症之發展。

"個體"為脊椎動物，較佳哺乳動物，更佳人類。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。

用於治療之"哺乳動物"係指分類為哺乳動物的任何動物，包括人類、家畜及農畜，及動物園、運動會或玩賞動物，諸如狗、馬、貓、

牛等。哺乳動物為人類較佳。

"有效量"係指以需要劑量及時期有效獲得所要治療結果或預防結果的量。

"治療有效量"之本發明之物質/分子、促效劑或拮抗劑可根據諸如以下因素而變：個體之疾病狀態、年齡、性別及重量，以及該物質/分子、促效劑或拮抗劑在個體中引發所要反應的能力。治療有效量亦為一種治療有益效應超過該物質/分子、促效劑或拮抗劑之任何有毒效應或有害效應的有效量。"預防有效量"係指以需要劑量及時期有效獲得所要預防結果的量。由於預防劑量係在患病之前或在患病早期用於受檢者，因此預防有效量通常(但不一定)小於治療有效量。

如本文中所使用之術語"細胞毒性劑"係指一種抑制或防止細胞功能且/或使細胞毀壞的物質。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} 及Lu之放射性同位素)；化學治療劑，例如甲胺喋呤、阿黴素(adriamycin)、長春生物鹼類(vinca alkaloids)(長春新鹼(vincristine)、長春花鹼(vinblastine)、依託泊苷(etoposide))、阿黴素(doxorubicin)、美法侖(melphalan)、絲裂黴素C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、道諾黴素(daunorubicin)或其他插入劑、酶及其片段(諸如核酸分解酶、抗生素及毒素，諸如細菌、真菌、植物或動物來源之小分子毒素或酶促活性毒素，包括其片段及/或變體)，以及下文所揭示之各種抗瘤劑或抗癌劑。其他細胞毒性劑在下文中描述。殺腫瘤劑可使腫瘤細胞毀壞。

"化學治療劑"為適用於治療癌的化合物。化學治療劑之實例包括：烷化劑，諸如硫替派(thiotepa)及CYTOXAN®環磷醯胺；烷基磺酸鹽類，諸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶類，諸如苯唑多巴(benzodopa)、卡巴醌

(carboquone)、米特多巴(meturedopa)及尤利多巴(uredopa)；伸乙基亞胺類及甲基密胺類，包括六甲蜜胺(altretamine)、三伸乙基密胺(triethylenemelamine)、三伸乙基磷醯胺(trietylenephosphoramide)、三伸乙基硫代磷醯胺(triethylenethiophosphoramide)及三甲密胺(trimethylolomelamine)；多聚乙醯類(acetogenins)(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))； Δ -9-四氫大麻酚(delta-9-tetrahydrocannabinol)(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(伊諾替康(irinotecan；CAMPTOSAR®)、乙醯基喜樹鹼(acetylcamptothecin)、斯考普萊叮(scopolectin)及9-胺基喜樹鹼)；苔蘚蟲素(bryostatin)；卡利斯塔叮(callystatin)；CC-1065(包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新合成類似物)；足葉草毒素(podophyllotoxin)；足葉草酸(podophyllinic acid)；替尼泊甙(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)；海綿素(spongistatin)；氮芥類，諸如苯丁酸氮芥、萘氮芥(chlornaphazine)、環磷醯胺、雌氮芥(estramustine)、異環磷醯胺、二氯甲二乙胺、鹽酸二氯甲二乙胺氧化物(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法侖、新氮芥(novembichin)、膽固醇苯乙酸氮芥(phenesterine)、松龍苯芥(prednimustine)、氯乙環磷醯胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)；硝基脲，諸如亞硝脲氮芥(carmustine)、氯脲黴素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、環己亞硝脲(lomustine)、嘧啶亞硝脲(nimustine)及拉甯司汀

(ranimnustine)；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 1及刺孢黴素 ω 1(參見，例如，Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))；達米辛(dynemicin)，包括達米辛A；艾斯帕米辛(esperamicin)；以及新製癌菌素(neocarzinostatin)發色團及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團)、克拉斯米辛(aclacinomysins)、放線菌素(actinomycin)、奧斯拉米辛(authramycin)、重氮絲胺酸(azaserine)、博萊黴素(bleomycin)、放線菌素C(cactinomycin)、卡拉比辛(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌黴素(carzinophilin)、克羅米辛(chromomycinis)、放線菌素(dactinomycin)、道諾黴素、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-側氧-L-正白胺酸、ADRIAMYCIN®阿黴素(包括嗎啉并-阿黴素(morpholino-doxorubicin)、氰基嗎啉并-阿黴素(cyanomorpholino-doxorubicin)、2-吡咯并-阿黴素及去氧阿黴素(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(mitomycins)(諸如絲裂黴素C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycins)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、奎那黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑菌素(streptonigrin)、鏈脲黴素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤及5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)(5-FU)；葉酸類似物，諸如倭諾特呤(denopterin)、甲胺喋呤、喋羅呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉濱(fludarabine)、6-巰基嘌呤(6-mercaptopurine)、噻咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，諸如環胞苷(ancitabine)、阿紮胞苷(azacitidine)、6-氮尿

苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙脫氧
 尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱
 (enocitabine)、氟尿核苷(floxuridine)；雄性激素，諸如二甲甾酮
 (calusterone)、屈他雄酮丙酸酯(dromostanolone propionate)、環硫雄
 醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、甾內酯(testolactone)；抗腎上
 腺劑，諸如胺基苯乙哌啶酮(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、
 曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如夫羅林酸(frolic acid)；醋
 葡內酯(aceglatone)；醛磷醯胺葡萄糖甙(aldophosphamide glycoside)；胺
 基果糖酸(aminolevulinic acid)；伊利盧拉(eniluracil)；胺苯吡啶
 (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)；地吡醯
 (diaziquone)；艾弗利散(elfornithine)；依利醋鉍(elliptinium acetate)；
 埃坡黴素(epothilone)；乙環氧啶(etoglucid)；硝酸鎂(gallium
 nitrate)；羥基脲(hydroxyurea)；香菇糖(lentinan)；羅尼達寧
 (lonidainine)；美登素類(maytansinoids)，諸如美登素(maytansine)及
 胺沙托辛(ansamitocins)；丙脒脲(mitoguazone)；米托蒽醯
 (mitoxantrone)；莫比達摩(mopidanmol)；硝拉維林(nitraerine)；噴司
 他丁(pentostatin)；凡那明(phenamet)；比柔比星(pirarubicin)；洛索蒽
 醯(losoxantrone)；2-乙基醯肼(2-ethylhydrazide)；普魯苳肼
 (procarbazine)；PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene,
 OR)；丙亞胺(razoxane)；根黴菌素(rhizoxin)；西佐糖(sizofiran)；螺
 鍺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醯
 (triaziquone)；2,2'-2"-三氯三乙基胺；單端孢黴烯族毒素
 (trichothecenes)(尤其T-2毒素、弗納庫林A(verracurin A)、桿孢菌素
 A(roridin A)及胺癸叮(anguidine))；烏拉坦(urethan)；去乙醯長春醯胺
 (vindesine)(ELDISINE®, FILDESIN®)；氮烯唑胺(dacarbazine)；甘露

醇氮芥(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；雙溴丙基哌嗪(pipobroman)；甲托辛(gacytosine)；阿糖胞苷(arabinoside)("Ara-C")；硫替派(thiotepa)；紫杉醇(taxoids)，例如TAXOL®太平洋紫杉醇(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)；ABRAXANETM 無Cremophor-太平洋紫杉醇之白蛋白設計奈米微粒調配物(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)及TAXOTERE®多西他賽(doxetaxel)(Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France)；克羅南布(chloranbucil)；吉西他濱(gemcitabine)(GEMZAR®)；6-硫鳥嘌呤(6-thioguanine)；巯基嘌呤(mercaptopurine)；甲胺喋呤；鉑類似物，諸如順鉑(cisplatin)及卡鉑(carboplatin)；長春花鹼(vinblastine)(VELBAN®)；鉑；依託泊苷(VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌(mitoxantrone)；長春新鹼(vincristine)(ONCOVIN®)；奧沙利鉑(oxaliplatin)；盧考弗文(leucovorin)；長春瑞賓(vinorelbine) (NAVELBINE®)；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(difluoromethylornithine)(DMFO)；類視色素類，諸如視黃酸(retinoic acid)；卡培他濱(capecitabine) (XELODA®)；以上任一種治療劑之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物；以及以上兩種或兩種以上治療劑之組合，諸如CHOP(環磷醯胺、阿黴素、長春新鹼與潑尼松龍(prednisolone)之混合治療之縮寫)及FOLFOX(奧沙利鉑(oxaliplatin)(ELOXATINTM)與5-FU及盧考弗文組合治療方案之縮寫)。

該定義中亦包括具有調節、減少、阻斷或抑制可促進癌生長之激素之效應之作用的抗激素劑，該等抗激素劑通常為系統性或全身性治療之形式。其可為激素本身。實例包括抗雌激素及選擇性雌激素受體

調節劑(SERM)，例如包括它莫西芬(tamoxifen)(包括NOLVADEX®它莫西芬)、EVISTA®雷洛西芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羥基它莫西芬(4-hydroxytamoxifen)、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛昔芬鹽酸鹽(keoxifene)、LY117018、歐納氏酮(onapristone)及FARESTON®托瑞米芬(toremifene)；抗黃體酮；雌激素受體減量調節劑(ERD)；具有抑制或制止卵巢之功能的藥劑，例如黃體素釋放激素(LHRH)促效劑，諸如LUPRON®及ELIGARD®醋酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)、醋酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、醋酸布舍瑞林(buserelin acetate)及曲特瑞林(tripterelin)；其他抗雄性激素，諸如氟他胺(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)及必卡他胺(bicalutamide)；以及抑制芳香酶的芳香酶抑制劑(芳香酶可調節腎上腺中之雌激素產生)，諸如4(5)-咪唑、胺基苯乙哌啶酮(aminoglutethimide)、MEGASE®醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)、AROMASIN®依西美坦(exemestane)、弗米斯坦(formestane)、法偈唑(fadrozole)、RIVISOR®伏氯唑(vorozole)、FEMARA®來曲唑(letrozole)及ARIMIDEX®瑞寧德(anastrozole)。此外，該定義之化學治療劑包括：雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)(例如，BONEFOS®或OSTAC®)、DIDROCAL®依替膦酸鹽(etidronate)、NE- 58095、ZOMETA®唑來膦酸/唑來膦酸鹽、FOSAMAX®阿倫膦酸鹽(alendronate)、AREDIA®帕米膦酸鹽(pamidronate)、SKELID®替魯膦酸鹽(tiludronate)或ACTONEL®利塞膦酸鹽(risedronate)；以及曲沙他濱(troxacitabine)(1,3-二氧戊環核苷胞嘧啶類似物)；反義寡核苷酸，尤其抑制基因在與異常細胞增殖相關之信號傳導通道中之表現的彼等物，諸如PKC- α 、Raf、H-Ras及表皮生長因子受體(EGF-R)；疫苗，諸如THERATOPE®疫苗及基因治療疫苗，例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗及VAXID®疫苗；LURTOTECAN®拓撲異構酶1抑制劑；ABARELIX® rmRH；拉帕

替尼對甲苯磺酸鹽(lapatinib ditosylate)(ErbB-2與EGFR二元酪胺酸激酶小分子抑制劑，亦稱GW572016)；及以上任一治療劑之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

"生長抑制劑"在本文中使用時係指一種可活體外或活體內抑制細胞(諸如表現EphrinB2之細胞)生長的化合物或組合物。因此，生長抑制劑可為大量降低S階段細胞(諸如表現EphrinB2之細胞)百分率的藥劑。生長抑制劑之實例包括阻斷(在除S階段以外的位置之)細胞週期進程的藥劑，諸如誘發G1中斷及M-階段中斷的藥劑。典型的M-階段阻斷劑包括長春花(長春新鹼及長春花鹼)、紫杉烷及拓撲異構酶II抑制劑，諸如阿黴素、表柔比星、道諾黴素、依託泊苷及博萊黴素。可中斷G1的彼等藥劑亦可中斷S-階段，例如DNA烷化劑，諸如它莫西芬、潑尼松、氮烯唑胺、二氯甲二乙胺、順鉑、甲胺喋呤、5-氟尿嘧啶及ara-C。其他資訊可見於The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及Israel編，第1章，Murakami等人之標題"Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs"(WB Saunders: Philadelphia, 1995)，尤其第13頁。紫杉烷(太平洋紫杉醇及多西他賽)均為源自紫杉樹的抗癌藥物。源自歐洲紫杉(European yew)的多西他賽(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer)為太平洋紫杉醇之半合成類似物(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb)。太平洋紫杉醇及多西他賽促進微管蛋白二聚物組裝成微管體且藉由防止解聚來穩定微管體，從而抑制細胞中之有絲分裂。

"阿黴素"為蒽環黴素抗生素。阿黴素之全化學名稱為(8S-順)-10-[(3-胺基-2,3,6-三去氧- α -L-lyxo-六吡喃糖基)氧]-7,8,9,10-四氫-6,8,11-三羥基-8-(羥基乙醯基)-1-甲氧基-5,12-萘二酮。

術語"抗贅生性組合物"係指適用於治療癌、包含至少一種活性治療劑(例如"抗癌劑")的組合物。治療劑(抗癌劑，本文中亦稱"抗贅生

劑")實例包括但不限於，例如，化學治療劑、生長抑制劑、細胞毒性劑、放射療法中使用的藥劑、抗血管生成劑、細胞凋亡劑、抗微管蛋白劑、毒素及其他癌治療劑，例如抗VEGF中和抗體、VEGF拮抗劑、抗-HER-2、抗-CD20、表皮生長因子受體(EGFR)拮抗劑(例如，酪胺酸激酶抑制劑)、HER1/EGFR抑制劑、埃羅替尼(erlotinib)、COX-2抑制劑(例如，塞來考昔(celecoxib))、干擾素、細胞激素、結合ErbB2、ErbB3、ErbB4或VEGF受體中一或多者之拮抗劑(例如中和抗體)、血小板源生長因子(PDGF)及/或幹細胞因子(SCF)之受體酪胺酸激酶之抑制劑(例如，伊馬替尼甲磺酸鹽(imatinib mesylate)(Gleevec® Novartis))、TRAIL/Apo2及其他生物活性藥劑及有機化學藥劑等。

如本申請案中所使用之術語"前藥"係指醫藥學上活性物質之前驅物或衍生形式，該形式與親本藥物相比，對腫瘤細胞的細胞毒性小，且能夠酶促活化或轉化成活性更強之親本形式。參見例如Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, 第375-382頁, 615th Meeting Belfast (1986)及Stella等人, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, "Directed Drug Delivery, Borchardt等人, (編), 第247-267頁, Humana Press (1985)。本發明之前藥包括但不限於：含有磷酸鹽之前藥、含有硫代磷酸鹽之前藥、含有硫酸鹽之前藥、含有肽之前藥、經D-胺基酸修飾之前藥、糖基化前藥、含有 β -內醯胺之前藥、含有視需要經取代之苯氧基乙醯胺之前藥或含有視需要經取代之苯乙醯胺之前藥、可轉化成活性更強之細胞毒性游離藥物之5-氟胞嘧啶及其他5-氟尿苷前藥。可衍生為用於本發明之前藥形式之細胞毒性藥物之實例包括但不限於上述彼等化學治療劑。

"抗血管生成劑"或"血管生成抑制劑"係指直接地或間接地抑制血管生成或非所要之血管通透性的小分子量物質、多核苷酸、多肽、分

離蛋白、重組蛋白、抗體或其結合蛋白或融合蛋白。舉例而言，抗血管生成劑為如上文所定義之抗體或抗血管生成劑之其他拮抗劑，例如抗VEGF抗體、抗VEGF受體之抗體、阻斷VEGF受體信號傳導之小分子(例如PTK787/ZK2284、SU6668、SUTENT/SU11248(舒尼替尼蘋果酸鹽(sunitinib malate))、AMG706)。抗血管生成劑亦包括天然的血管生成抑制劑，例如，血管抑制素(angiotatin)、血管內皮抑素(endostatin)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(12):1359-1364 (1999); Tonini等人, *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (例如表2列出抗血管生成因子); 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)。

本發明之組合物及其製備方法

本發明包括包含抗-EphrinB2抗體與包含編碼抗-EphrinB2抗體之序列之多核苷酸的組合物，包括醫藥組合物。如本文中所使用，組合物包含一或多種結合EphrinB2的抗體及/或一或多種包含編碼一或多種結合EphrinB2之抗體之序列的多核苷酸。該等組合物另外可包含該項技術中熟知之適當載劑，諸如醫藥學上可接受之賦形劑(包括緩衝劑)。

本發明亦包括分離抗體及多核苷酸實施例。本發明亦包括大體純的抗體及多核苷酸實施例。

本發明之抗-EphrinB2抗體較佳為單株抗體。本文中所提供之抗-EphrinB2抗體的Fab、Fab'、Fab'-SH及F(ab')₂片段亦包括本發明之範圍內。該等抗體片段可藉由傳統方式(諸如酶促消化)製得，或藉由重組技術產生。該等抗體片段可為嵌合的或經人源化。該等片段適用於

下文所述之診斷性及治療性用途。

單株抗體可獲自大體上同源抗體之群體，亦即組成該群體之個別抗體相同，除可能天然發生之少量存在之突變之外。因此，修飾語"單株"表示抗體並非為離散抗體之混合物的特性。

本發明之抗-EphrinB2單株抗體可使用雜交瘤方法(最先由Kohler等人，Nature, 256:495 (1975)描述)製得，或藉由重組DNA方法製得(美國專利第4,816,567號)。

在雜交瘤方法中，將小鼠或其他適當的宿主動物(諸如倉鼠)免疫以得到產生或能夠產生特定結合用於免疫之蛋白的抗體的淋巴細胞。EphrinB2抗體通常藉由在動物體內多次皮下(sc)或腹膜內(ip)注射EphrinB2與助劑產生。EphrinB2可使用該項技術中熟知之方法製備，其中一些方法另外描述於本文中。舉例而言，下文描述了EphrinB2之重組製備。在一實施例中，將動物以EphrinB2衍生物免疫，EphrinB2衍生物含有與免疫球蛋白重鏈之Fc部分融合之EphrinB2胞外域(ECD)。在一較佳實施例中，將動物以EphrinB2-IgG1融合蛋白免疫。動物一般以EphrinB2與單磷醯基脂質A(MPL)/海藻糖二黴菌酸酯(TDM)之免疫原性結合物或衍生物(Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT)免疫，且在多處皮內注射溶液。兩週以後，該等動物補強。7至14天後，對動物抽血且檢定血清的抗-EphrinB2效價。動物補強直至效價穩定為止。

或者，淋巴細胞可於活體外免疫。接著使用適當的融合劑(諸如聚乙二醇)使淋巴細胞與骨髓瘤細胞融合，以形成雜交瘤細胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第59-103頁(Academic Press, 1986))。

由此所製得之雜交瘤細胞接種且培養於適當培養基中，該培養基含有一或多種可抑制未融合之親本骨髓瘤細胞之生長或存活的物質較

佳。舉例而言，若親本骨髓瘤細胞缺乏酶次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶(HGPRT或HPRT)，則雜交瘤之培養基通常應包括次黃嘌呤、胺基嘌呤及胸腺嘧啶核苷(HAT培養基)，該等物質可防止缺HGPRT之細胞的生長。

骨髓瘤細胞較佳為有效融合、有助於藉由所選抗體產生細胞大量穩定產生抗體且對培養基(諸如HAT培養基)敏感的彼等細胞。其中，骨髓瘤細胞株較佳為鼠骨髓瘤細胞株，諸如源自MOPC-21及MPC-11小鼠腫瘤的彼等細胞株(可購得於Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA)及SP-2或X63-Ag8-653細胞(可購得於American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA)。人類骨髓瘤及小鼠-人類雜合骨髓瘤細胞株亦經描述用於人類單株抗體之製備(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))。

檢定培育雜交瘤細胞之培養基中之抗EphrinB2之單株抗體的產量。雜交瘤細胞所產生之單株抗體的結合特異性較佳係藉由免疫沉澱法或藉由活體外結合性檢定(諸如放射免疫測定法(RIA)或酶聯免疫吸附檢定(ELISA))測定。

單株抗體之結合親和力例如可藉由Munson等人, Anal. Biochem., 107:220 (1980)的斯卡查德(Scatchard)分析測定。

鑑別產生所要特異性、親和力及/或活性之抗體之雜交瘤細胞之後，可將該等純系藉由限制性稀釋程序次選殖且藉由標準方法培育(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第59-103頁(Academic Press, 1986))。適用於此目的的培養基例如包括D-MEM或RPMI-1640培養基。此外，雜交瘤細胞可活體內培育，如動物體內之腹水腫瘤。

藉由習知的免疫球蛋白純化程序，諸如蛋白A-瓊脂糖、羥基磷灰石層析法、凝膠電泳法、滲析法或親和層析法，適當地將次純系所分泌之單株抗體自培養基、腹水流體、或血清中分離。

本發明之抗-EphrinB2抗體可藉由使用組合文庫篩選具有所要活性之合成抗體純系來獲得。原則上，合成抗體純系係藉由篩選含有可呈現與噬菌體外被蛋白所融合之抗體可變區(Fv)之各種片段之噬菌體的噬菌體文庫來選定。該等噬菌體文庫可藉由親和層析法、針對所要抗原來全面篩選。表現能夠結合所要抗原之Fv片段的純系被吸附至該抗原，且從而與文庫中之非結合純系分離。接著將結合純系自抗原溶離，且可藉由其他輪之抗原吸附/溶離進一步增殖。本發明之任一種抗-EphrinB2抗體可藉由設計適當的抗原篩選程序以選定所研究之噬菌體純系、再使用源自所研究之噬菌體純系之Fv序列及描述於以下文獻中之適當恆定域(Fc)序列建構全長抗-EphrinB2抗體純系來獲得：Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991)，第1-3卷。

抗體之抗原結合域係由兩個約110個胺基酸之可變(V)區形成，各可變區係由輕鏈(VL)與重鏈(VH)形成，兩個區均呈現三個高變環或互補性確定區(CDR)。可變域可在噬菌體上功能地呈現為單鏈Fv(scFv)片段，其中VH與VL經由柔性短肽、以共價鍵鍵聯；或呈現為Fab片段，其中VH與VL各自與恆定域融合且以非共價鍵相互作用，如Winter等人，*Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455(1994)中所述。如本文中所使用，編碼噬菌體純系之scFv以及編碼噬菌體純系之Fab統稱為"Fv噬菌體純系"或"Fv純系"。

VH與VL基因文庫可藉由聚合酶鏈反應(PCR)分別選殖，且在噬菌體文庫隨機重組，接著可搜得抗原結合純系，如Winter等人，*Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455(1994)中所述。獲自免疫來源之文庫可提

供免疫原之高親和力抗體，而無需建構雜交瘤。或者，天然文庫可經選殖以向大範圍未經任何免疫之非自體抗原以及自體抗原提供單一來源之人類抗體，如Griffiths等人，EMBO J, 12: 725-734 (1993)所述。最後，天然文庫亦可以合成方式、藉由選殖幹細胞之未經重排之以V-基因片段並使用含有隨機序列之PCR引子編碼高可變CDR3區及完成活體外重排來製得，如Hoogenboom及Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)所述。

絲狀噬菌體係用於呈現與次要外被蛋白pIII融合的抗體片段。抗體片段可呈現為單鏈Fv片段，其中VH與VL域例如係藉由柔性多肽間隔基連接於同一多肽鏈上，如Marks等人，J. Mol. Biol., 222: 581-597(1991)中所述；或呈現為Fab片段，其中例如一鏈與pIII融合而另一鏈分泌進入細菌性宿主細胞周質內，在周質內藉由置換野生型外被蛋白中一部分組裝呈現於噬菌體表面上的Fab-外被蛋白結構，如Hoogenboom等人，Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137(1991)中所述。

一般而言，編碼抗體基因片段之核酸可自獲自人類或動物之免疫細胞中得到。若需要偏重於抗-EphrinB2純系的文庫，則以EphrinB2使受檢者免疫以產生抗體反應，且可回收脾細胞及/或循環B細胞及其他周圍血液淋巴細胞(PBL)用於文庫建構。在一較佳實施例中，偏重於抗-EphrinB2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(且缺乏功能性內源性抗體產生系統)之轉殖基因小鼠中產生抗-EphrinB2抗體反應以使得EphrinB2免疫使得B細胞產生抗EphrinB2之人類抗體來獲得。人類抗體產生轉殖基因小鼠之繁殖描述如下。

抗-EphrinB2反應性細胞群體之額外增殖可藉由使用適當的篩選程序分離表現EphrinB2特異膜結合抗體之B細胞(例如，藉由EphrinB2親和層析法或吸附細胞至螢光染料標記EphrinB2、再藉由流式活化細

胞分類術(FACS)進行細胞分離)來獲得。

或者，使用獲自未免疫供體之脾細胞及/或B細胞或其他PBL可提供表現良好之可能抗體文庫，且亦容許使用其中EphrinB2並非抗原性之任何動物(人類或非人類)種類建構抗體文庫。對於建構包括活體外抗體基因之文庫，可自受檢者收穫幹細胞以提供編碼未重排抗體基因片段的核酸。所研究之免疫細胞可獲自各種動物種類，諸如人類、小鼠、大鼠、兔、狼(luprine)、犬、貓、豬、牛、馬及鳥種類等。

編碼抗體可變基因片段(包括VH及VL片段)之核酸可自所研究之細胞中回收且可擴增。在重排VH與VL基因文庫之狀況中，所要DNA可藉由自淋巴細胞中分離基因組DNA或mRNA、再以與重排VH與VL基因之5'端及3'端匹配之引子藉由聚合酶鏈反應(PCR)獲得，如Orlandi等人於Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)中所述，從而製得用於表現之各種V基因文庫。V基因可自cDNA及基因組DNA擴增，後向引子在編碼成熟V-域之外顯子的5'端，而前向引子定位於J-片段內部，如Orlandi等人(1989)及Ward等人，Nature, 341: 544-546(1989)中所述。然而，對於自cDNA擴增，後向引子亦可定位於前導外顯子，如Jones等人，Biotechnol., 9: 88-89 (1991)中所述，而前向引子定位於恆定區內部，如Sastry等人，Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989)中所述。為使互補性最大化，可簡併引子，如Orlandi等人(1989)或Sastry等人(1989)所述。較佳地，文庫多樣性例如可以各V-基因家族為靶物、藉由使用PCR引子以擴增所有存在於免疫細胞核酸樣本中的可用VH及VL排列來最大化，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。對於將擴增DNA選殖入表現載體內，可在PCR引子內導入稀疏的限制性位點作為一端處之標記，如Orlandi等人(1989)所述；或以標記引子進一步擴增

PCR，如Clackson等人，*Nature*, 352: 624-628 (1991)中所述。

合成上重排之V基因文庫可活體外獲自V基因片段。人類VH-基因片段中的大部分已經選殖且定序(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；可使用該等選殖片段(包括H1及H2環之所有主要構形)與編碼各種序列及長度之H3環之PCR引子一起形成各種VH基因文庫，如Hoogenboom及Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)中所述。亦可獲得在有序列多樣性中以單長度之長H3環為主的VH文庫，如Barbas等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461(1992)中所述。人類V κ 及V λ 片段已經選殖且定序(報導於Williams及 Winter, *Eur. J.Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993))中，且可用於獲得合成性輕鏈文庫。基於VH及VL折疊之範圍以及L3及H3長度的合成性V基因文庫可編碼大量結構多樣性的抗體。繼擴增編碼DNA之V-基因後，可根據Hoogenboom及Winter, *J. Mol. Biol.*, 227 : 381-388 (1992)之方法將生殖系V-基因片段活體外重排。

抗體片段之文庫可以若干方式組合VH與VL基因文庫而建構。各文庫可形成於不同載體及例如Hogrefe等人，*Gene*, 128: 119-126 (1993)中所述之活體外重組之載體中，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，形成於活體內重組載體中。活體內重組方法利用Fab片段之雙鏈特性以克服大腸桿菌轉化效率對文庫大小所施加的限制。天然VH及VL文庫係經分別選殖，一個選殖為噬體而另一個選殖為噬菌體載體。兩個文庫接著藉由噬菌體感染含有噬體之細菌來組合，以使得各細胞含有不同的組合且文庫大小僅受所呈現之細胞數目限制(約 10^{12} 個純系)。兩種載體均含有活體內重組信號，以使得VH與VL基因重組於單複製子上而共封裝於噬菌體病毒子內。該等龐大文庫可提供大量優

良親和力(約 10^{-8} M之 K_d^{-1})的各種抗體。

或者，該等文庫例如可連續選殖入同一載體，如Barbas等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991)中所述；或例如藉由PCR組裝在一起，且接著選殖，如Clackson等人，*Nature*, 352: 624-628 (1991)中所述。PCR組裝亦可用於將VH及VL DNA與編碼柔性肽間隔基之DNA接合以形成單鏈Fv(scFv)文庫。"在細胞PCR組裝中"在另一技術中係用於在淋巴細胞內藉由PCR組合VH與VL基因且接著選殖連鎖基因之文庫，如Embleton等人，*Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837(1992)中所述。

天然文庫所產生之抗體(天然的或合成的)可具有中度的親和力(約 10^6 至 10^7 M $^{-1}$ 之 K_d^{-1})，然而親和力成熟亦可自第二文庫中藉由建構及重選來活體外模擬，如Winter等人(1994)(同上)所述。舉例而言，在Hawkins等人，*J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992)之方法中，或在Gram等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992)之方法中，可藉由使用易出錯聚合酶(報導於Leung等人，*Technique*, 1: 11-15 (1989)中)於活體外隨意引入突變。此外，親和力成熟可藉由使一或多個CDR隨機突變(例如，在選定個別Fv純系中以攜有跨越所研究之CDR之隨機序列的引子使用PCR且篩選較高親和力純系)來進行。WO 9607754(1996年3月14日公佈)描述一種在免疫球蛋白輕鏈之互補確定區內誘導突變發生以形成輕鏈基因文庫的方法。另一種有效方法係將藉由噬菌體呈現所選定之VH或VL域與獲自未免疫供體之天然存在V域之文庫重組，以及在若干輪鏈改組中篩選較高親和力，如Marks等人，*Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992)中所述。此技術容許產生具有 10^{-9} M範圍內之親和力的抗體及抗體片段。

EphrinB2核酸及胺基酸序列已知於該項技術。編碼EphrinB2之核酸序列可使用EphrinB2之所要區域之胺基酸序列設計。或者，可使用

GenBank入藏登記第NM_004093號之cDNA序列(或其片段)。編碼EphrinB2之核酸可藉由該項技術已知的各種方法所製備。該等方法包括但不限於Engels等人, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989)中所述之任一化學合成方法, 諸如三酯、亞磷酸酯、胺基磷酸酯及H-磷酸酯方法。在一實施例中, 表現宿主細胞較佳之密碼子係用於設計編碼EphrinB2的DNA。或者, 可將編碼EphrinB2之DNA自基因組或cDNA文庫中分離。

繼建構編碼EphrinB2之DNA分子後, 使DNA分子操作性連接至表現載體(諸如質體)內之表現控制序列, 其中控制序列由經載體轉化之宿主細胞識別。一般而言, 質體載體含有獲自於與宿主細胞相容之種類的複製序列及控制序列。載體一般攜有複製位點, 以及編碼能夠在轉化細胞中提供表型選擇之蛋白的序列。適用於在原核宿主細胞及真核宿主細胞內表現的載體已知於該項技術, 且有些載體進一步描述於本文中。可使用真核生物, 諸如酵母, 或源自多細胞有機體(諸如哺乳動物)的細胞。

視需要, 可使編碼EphrinB2之DNA操作性連接至分泌性前導序列, 從而將宿主細胞之表現產物分泌進入培養基。分泌性前導序列之實例包括stII、大腸桿菌抑制劑(ecotin)、lamB、疱疹GD、lpp、鹼性磷酸酶、轉化酶及 α 因子。亦適用於本文中的為蛋白質A之36個胺基酸前導序列(Abrahmsen等人, EMBO J., 4: 3901 (1985))。

宿主細胞可經本發明之上述表現載體或選殖載體轉染且較佳經轉化, 且可在視需要經改質之習知營養物培養基中培養以便誘導啟動子、選擇轉化體或擴增編碼所要序列之基因。

轉染係指表現載體被宿主細胞佔據, 無論事實上表現任何編碼序列與否。諸多轉染方法已為普通熟習該項技術者所知, 例如CaPO₄沉澱法及電穿孔法。一般在指示該載體之操作發生於宿主細胞內時識別

成功轉染。轉染方法已熟知於該項技術中，且有些方法在本文中進一步描述。

轉化意謂將DNA引入有機體以使得DNA可複製為染色體外成分或染色體成分。視所用宿主細胞而定，轉化可使用適用於該等細胞之標準技術進行。轉化方法已熟知於該項技術中，且有些方法進一步描述於本文中。

用於產生EphrinB2的原核宿主細胞可如Sambrook等人(同上)中一般性描述加以培養。

用於產生EphrinB2的哺乳動物宿主細胞可培養於各種培養基中，此已熟知於該項技術中且其中有些在本文中描述。

本揭示案中所參考之宿主細胞包括活體外培養的細胞以及宿主動物內的細胞。

EphrinB2純化可使用該項技術公認之方法完成，其中有些在本文中描述。

純化EphrinB2可附著於適當基質，諸如瓊脂糖粒、丙烯醯胺粒、玻璃珠粒、纖維素、各種丙烯酸系共聚物、羥基甲基丙烯酸酯凝膠劑、聚丙烯酸及聚甲基丙烯酸共聚物、耐綸、中性及離子性載劑及類似物，以供噬菌體呈現純系之親和力層析分離使用。EphrinB2蛋白附著至基質可藉由Methods in Enzymology，第44卷(1976)中所述之方法完成。用於將蛋白配體附著至多醣基質(例如瓊脂糖、聚葡萄糖或纖維素)的常用技術包括以鹵化氰活化載劑及隨後將肽配體之第一脂族胺或芳族胺偶合至活化基質。

或者，可使用EphrinB2塗佈吸附板之孔，表現於附著至吸附板之宿主細胞上或用於細胞分類，或結合至生物素以便經塗有抗生蛋白鏈菌素之珠粒捕獲，或用於其他任何該項技術已知的方法中以便全面選定噬菌體呈現文庫。

在適合噬菌體顆粒之至少一部分與吸附劑結合之條件下，使噬菌體文庫樣本與固著EphrinB2接觸。通常，選擇包括pH、離子濃度、溫度及類似條件在內之條件模擬生理條件。將與固相結合之噬菌體洗滌，且接著例如藉由酸溶離，如Barbas等人，Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88:7978-7982(1991)所述；或例如藉由鹼溶離，如Marks等人，J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)中所述；或例如藉由EphrinB2抗原競爭、以與Clackson等人，Nature, 352: 624-628 (1991)之抗原競爭方法類似之程序溶離。噬菌體可以單輪選擇增殖20-1,000倍。此外，增殖噬菌體可培養於細菌培養基中且經受更多輪之選擇。

選擇效率取決於多種因素，包括洗滌期間之解離動力學以及單噬菌體上之多抗體片段是否可同時與抗原結合。具有快速解離動力學(及弱結合親和力)之抗體可藉由利用瞬間洗滌、多價噬菌體呈現及抗原在固相中之高塗佈密度來保持。高密度不但可經由多價相互作用穩定噬菌體，而且有利於已解離之噬菌體之再結合。選擇具有慢速解離動力學(及良好結合親和力)之抗體可藉由利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)及抗原之低塗佈密度(如Marks等人，Biotechnol., 10: 779-783 (1992)中所述)來促成。

可在不同親和力之噬菌體抗體之間、甚至可在具有對EphrinB2稍微不同之親和力之噬菌體抗體之間選擇。然而，所選抗體之隨機突變(例如，在上述親和力成熟技術中所進行的隨機突變)可能產生多種突變株，該等突變株中大部分可與抗原結合且有些具有較高親和力。經由限制EphrinB2，可淘汰稀疏的高親和力噬菌體。為保留所有的較高親和力突變株，噬菌體不僅可以過量之經結合生物素之EphrinB2培育，而且可在莫耳濃度比EphrinB2之指定莫耳親和常數低之濃度下、以經結合生物素之EphrinB2培育。接著可藉由塗有抗生蛋白鏈菌素之

順磁珠粒捕獲高親和力結合噬菌體。該"平衡捕獲"容許根據抗體結合親和力來選擇具有可將具有僅僅兩倍高親和力之突變株純系自顯著過量之具有較低親和力之噬菌體中分離之靈敏度的抗體。亦可操控用於洗滌與固相結合之噬菌體的條件以根據解離動力學辨別。

抗-EphrinB2純系可根據活性選擇。在一實施例中，本發明提供可阻斷EphB受體(諸如EphB1、EphB2及/或EphB3)與EphrinB2之間結合、但不阻斷EphB受體與第二蛋白(諸如EphrinB1及/或EphrinB3)之間結合的抗-EphrinB2抗體。對應於該等抗-EphrinB2抗體的Fv純系可藉由如下步驟選擇：(1)如上所述自噬菌體文庫中分離抗-EphrinB2純系，及視需要藉由在適當的細菌宿主中培育該群體來擴增噬菌體純系之分離群體；(2)針對分別需要阻斷活性及非阻斷活性來選擇EphrinB2及第二蛋白；(3)將抗-EphrinB2噬菌體純系吸附至固著EphrinB2；(4)使用過量的第二蛋白溶離任何可識別與第二蛋白之結合決定子重疊或共有之EphrinB2結合決定子的非所要純系；及(5)溶離步驟(4)完成後仍吸附的純系。視需要，具有所要阻斷/非阻斷性質之純系可藉由將本文中所述之選擇程序重複一或多次來進一步增殖。

編碼源自雜交瘤之單株抗體或本發明之噬菌體呈現Fv純系的DNA易使用習知程序(例如，使用設計成能自雜交瘤或噬菌體DNA模板特定擴增所研究之重鏈編碼區及輕鏈編碼區的寡核苷酸引子)分離及定序。DNA一旦分離，則可置於表現載體內，接著轉染入諸如大腸桿菌細胞、猴COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞之宿主細胞內(否則不產生免疫球蛋白)，以獲得所要單株抗體在重組宿主細胞內之合成。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)。

編碼本發明之Fv純系的DNA可與編碼重鏈恆定區及/或輕鏈恆定

區之已知DNA序列組合(例如，適當的DNA序列可獲自Kabat等人，同上)以形成編碼全長或部分長度重鏈及/或輕鏈的純系。應瞭解，任何同型之恆定區(包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恆定區)可用於此目的，且該等恆定區可獲自任何人類或動物種類。如本文中所使用之"嵌合"及"雜交"抗體之定義包括獲自一動物(諸如人類)種類之可變域DNA且接著融合至另一動物種類之恆定區DNA以形成"雜交"、全長重鏈及/或輕鏈之編碼序列的Fv純系。在一較佳實施例中，將源自人類可變DNA之Fv純系與人類恆定區DNA融合以形成所有人類、全長或部分長度重鏈及/或輕鏈的編碼序列。

編碼本發明之獲自雜交瘤之抗-EphrinB2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獲自雜交瘤純系的同源鼠序列(例如，用Morrison等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)之方法)。編碼雜交瘤或獲自Fv純系之抗體或片段的DNA可藉由將非免疫球蛋白多肽之編碼序列之全部或部分以共價方式接合於免疫球蛋白編碼序列來進一步修飾。可以此方式製得具有本發明之Fv純系之結合特異性或獲自雜交瘤純系之抗體之結合特異性的"嵌合"或"雜交"抗體。

抗體片段

本發明包括抗體片段。在某些環境中，存在使用抗體片段而非完整抗體的優勢。更小尺寸之片段容許快速廓清，且可使接近實性腫瘤得以改良。

已開發各種用於製備抗體片段的技術。通常，該等片段可經由完整抗體之蛋白水解消化獲得(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，該等片段現可藉由重組宿主細胞直接製得。Fab、Fv及ScFv抗體片段皆可表現於大腸桿菌中且由大腸

桿菌分泌，從而可易產生大量該等片段。抗體片段可自上述抗體噬菌體文庫中分離。或者，Fab'-SH片段可自大腸桿菌中直接回收且在化學上偶合以形成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中直接分離。活體內半衰期增大之包含補救受體結合抗原決定基殘基的Fab及F(ab')₂片段描述於美國專利第5,869,046號中。其他製備抗體片段的技術對於熟習者而言顯而易見。在其他實施例中，所選抗體為單鏈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sFv為具有完整結合位點、缺乏恆定區的唯一種類，因此，其適用於在活體內使用期間減少非特異性結合。sFv融合蛋白可經建構成使效應蛋白在sFv之胺基末端或羧基末端融合。參見Antibody Engineering, Borrebaeck編，同上。抗體片段例如亦可為"線性抗體"，如美國專利第5,641,870中所述。該等線性抗體片段可為單特異性的或雙特異性的。

人源化抗體

本發明包括人源化抗體。人源化非人類抗體的各種方法已知於該項技術中。舉例而言，人源化抗體可具有一或多個引入其內部、來自於非人類源的胺基酸殘基。該等非人類胺基酸殘基常稱為"輸入"殘基，其通常獲自"輸入"可變域。人源化主要可按照Winter及其同事之方法(Jones等人(1986) Nature 321:522-525; Riechmann等人(1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen等人(1988) Science 239:1534-1536)、藉由用高變區序列取代人類抗體之相應序列來進行。因此，該等"人源化"抗體為其中大體上近似完整之人類可變域已經非人類種類之相應序列取代的嵌合抗體(美國專利第4,816,567號)。實際上，人源化抗體通常為其中有些高變區殘基及可能有些FR殘基經鼠類抗體中之類似位點處之殘基取代的人類抗體。

選擇用於製備人源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。根據所謂的"最佳擬合"方法，可對照已知人類可變域序列之完整文庫篩選鼠類抗體之可變域之序列。接著將與鼠類序列最近之人類序列當作人源化抗體之人類框架(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輕鏈或重鏈之特定亞群之所有人類抗體之一致序列的特定框架。幾種不同的人源化抗體可使用相同的框架(Carter等人(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta等人(1993) J. Immunol., 151:2623)。

更重要的係使抗體在保持對抗原之高親和力及其他良好的生物性質下人源化。為達成此目標，根據一種方法，使用親本序列及人源化序列之三維模型、藉由分析親本序列及各種設想之人源化產物的過程來製備人源化抗體。三維免疫球蛋白模型一般可購得且為熟習該項技術者所熟悉。說明及呈現所選候選免疫球蛋白序列之大致三維構型結構的電腦程式可購得。對該等呈現之檢驗可分析殘基在候選免疫球蛋白序列之功能運作中的可能作用，亦即分析影響候選免疫球蛋白與其抗原之結合能力的殘基。以此方法，FR殘基可自受體及輸入序列中選擇且組合，以便獲得所要的抗體特性，諸如對靶抗原之親和力增強。一般而言，高變區殘基直接且最實質上參與對抗原結合的影響。

人類抗體

本發明之人類抗-EphrinB2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建構。或者，本發明之人類單株抗-EphrinB2抗體可藉由雜交瘤方法製得。用於製備人類單株抗體之人類骨髓瘤細胞株及小鼠-人類雜合骨髓瘤細胞株例如已描述於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)，其在無內源性免疫球蛋白產生下，經免疫能夠產生人類抗體之完整文庫。舉例而言，嵌合及生殖系突變小鼠中抗體重鏈接合區(JH)基因之同型結合缺失導致內源性抗體產生之完整抑制。人類生殖系免疫球蛋白基因陣列在該等生殖系突變小鼠中之轉移導致人類抗體在抗原攻擊下產生。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)。

基因改組亦可用於由非人類(例如，鼠類)抗體獲得人類抗體，其中該人類抗體具有與初始非人類抗體類似的親和力及特異性。根據此方法(其亦稱為"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可變區或輕鏈可變區可置換為人類V域基因之文庫，產生非人類鏈/人類鏈scFv或Fab嵌合體之群體。經抗原選擇可產生非人類鏈/人類鏈嵌合scFv或Fab之分離，其中人類鏈在移除主要噬菌體呈現純系中之相應的非人類鏈後恢復所破壞的抗原結合位點，亦即抗原決定基決定(印記)人類鏈夥伴之選擇。當為了置換剩餘非人類鏈而重複該過程時，獲得人類抗體(參見1993年4月1日公佈的PCT WO 93/06213)。不像藉由CDR移植對非人類抗體之傳統人源化，該技術可提供不具非人類來源之FR或CDR殘基的全部人類抗體。

雙特異性抗體

雙特異性抗體為具有對至少兩種不同抗原之結合特異性的單株抗體，較佳人類或人源化抗體。在此狀況中，其中一種結合特異性係針對EphrinB2而另一種結合特異性係針對其他任一種抗原。例示性雙特

異性抗體可結合EphrinB2蛋白之兩種不同的抗原決定基。雙特異性抗體亦可用於使細胞毒性劑定位於表現EphrinB2的細胞。該等抗體具有EphrinB2結合臂及細胞毒性劑(例如，沙泊寧(saporin)、抗干擾素- α 、長春花生物鹼、蓖麻素A鏈、甲胺喋呤或放射性同位素半抗原)結合臂。雙特異性抗體可製備為全長抗體或抗體片段(例如，F(ab')₂雙特異性抗體)。

雙特異性抗體製備方法已知於該項技術中。通常，重組製備雙特異性抗體係基於兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之共表現，其中該兩個重鏈具有不同的特異性(Milstein及Cuello, *Nature*, 305:537 (1983))。由於免疫球蛋白重鏈與輕鏈之隨機分配，因此該等雜交瘤(四源雜交瘤)可產生10種不同抗體分子的可能混合物，其中僅一種具有恰當的雙特異性結構。恰當分子之純化(一般藉由親和層析步驟進行)相當麻煩，且產物產量低。類似程序揭示於1993年5月13日公開的WO 93/08829及Traunecker等人，*EMBO J.*, 10: 3655 (1991)中。

根據不同方法及更佳方法，可使具有所要結合特異性(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。較佳與免疫球蛋白重鏈恆定域融合，包含鉸鏈、CH₂及CH₃區之至少部分。較佳具有存在於融合之至少一者中、含有輕鏈結合所需要之位點的第一重鏈恆定區(CH₁)。將編碼免疫球蛋白重鏈融合之DNA及(若需要)免疫球蛋白輕鏈插入各別表現載體中且共轉染入適當的宿主有機體內。此舉可在實施例中提供調節三種多肽片段之相互比例之顯著靈活性，屆時用於建構之該三種多肽鏈之不等比率可提供最佳產量。然而，當至少兩種等比率之多肽鏈之表現產生高產量時或當該等比率不具有特定意義時，可在一表現載體中插入兩種或所有三種多肽鏈之編碼序列。

在該方法之一較佳實施例中，該等雙特異性抗體包含一臂中之具有第一結合特異性之雜交免疫球蛋白重鏈以及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)。吾人發現，由於免疫球蛋白輕鏈存在於雙特異性分子之僅一半中而為分離提供便捷方法，因此該不對稱結構可促進所要雙特異性化合物自不需要之免疫球蛋白鏈組合中分離。此方法揭示於WO 94/04690。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)。

根據另一種方法，一對抗體分子之間的介面可經設計以使自重組細胞培養物中所回收之雜二聚物之百分率最大化。介面較佳包含抗體恆定域之C_H3域之至少一部分。以此方法，來自第一抗體分子之介面的一或多個小胺基酸側鏈置換為更大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)。尺寸與大側鏈相同或類似之補償性"腔"藉由將大胺基酸側鏈置換為更小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)而形成於第二抗體分子之介面上。此舉可提供增大雜二聚物而非其他不需要終產物(諸如同源二聚物)之產量的機制。

雙特異性抗體包括交聯抗體或"雜結合"抗體。舉例而言，雜結合物中一抗體可偶合至抗生物素蛋白，另一抗體偶合至生物素。該等抗體意欲例如使免疫系統細胞靶向不需要細胞(美國專利第4,676,980號)及用於治療HIV感染(WO 91/00360、WO 92/00373及EP 03089)。雜結合抗體可使用任何方便的交聯方法製得。適當的交聯劑以及很多交聯技術已熟知於該項技術中，且揭示於美國專利第4,676,980號中。

由抗體片段產生雙特異性抗體的技術亦描述於文獻中。舉例而言，雙特異性抗體可使用化學鍵製備。Brennan等人，Science, 229: 81 (1985)描述一種其中完整抗體為經蛋白質裂解以產生F(ab')₂片段的程序。該等片段在雙硫醇錯合劑亞砷酸鈉之存在中減少以穩定鄰近的雙硫醇且防止分子間二硫化物形成。接著使所產生之Fab'片段轉化成硫硝基苯甲酸鹽(TNB)衍生物。接著使Fab'-TNB衍生物其中一者藉由

巯基乙胺還原再轉化為Fab'-硫醇，且與等莫耳量之另一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酶之選擇性固著劑。

最新進程推動了Fab'-SH片段自大腸桿菌中之直接回收，其係經化學偶合以形成雙特異性抗體。Shalaby等人，J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)描述了完全人源化雙特異性抗體F(ab')₂分子之製備。各Fab'片段分別由大腸桿菌分泌且經受活體外導向化學偶合以形成雙特異性抗體。由此所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T細胞，而且使人類細胞毒性淋巴細胞對人類乳房腫瘤靶物產生分解活性。

直接由重組細胞培養物製備及分離雙特異性抗體片段的各種技術亦有描述。舉例而言，雙特異性抗體可使用白胺酸拉鏈製備。Kostelny等人，J. Immunol., 148 (5):1547-1553 (1992)。來自Fos及Jun蛋白之白胺酸拉鏈肽藉由基因融合與兩種不同抗體之Fab'部分連接。抗體同源二聚物在絞鏈區被還原以形成單體且接著再氧化以形成抗體雜二聚物。該方法亦可用於製備抗體同源二聚物。Hollinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)所述之"雙功能抗體"技術為製備雙特異性抗體片段提供了替代機制。該等片段包含重鏈可變域(VH)，該重鏈可變域(VH)藉由太短而無法使同一鏈上之兩個域之間配對的连接子與輕鏈可變域(VL)連接。因此，一片段之VH域及VL域被迫與另一片段之互補性VL域及VH域配對，從而形成兩個抗原結合位點。利用單鏈Fv(sFv)二聚物製備雙特異性抗體片段的另一種策略亦有報導。參見Gruber等人，J. Immunol., 152:5368 (1994)。

具有兩價以上的抗體亦考慮在內。舉例而言，可製備三特異性抗體。Tutt等人，J. Immunol. 147:60 (1991)。

多價抗體

多價抗體藉由表現與抗體結合之抗原的細胞、比二價抗體更快地內在化(及/或分解代謝)。本發明之抗體可為具有三個或三個以上抗原結合位點的多價抗體(除IgM類抗體之外)(例如，四價抗體)，其藉由重組表現編碼抗體之多肽鏈的核酸而容易製備。多價抗體可包含二聚域及三個或三個以上的抗原結合位點。二聚域較佳包含(或包括)Fc區或鉸鏈區。在此狀況中，抗體包含Fc區及Fe區之三個或三個以上抗原結合位點胺基末端。本文中之多價抗體較佳包含(或包括)三個至約八個、然而較佳四個抗原結合位點。多價抗體包含至少一個多肽鏈(而較佳兩個多肽鏈)，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Fc區之一多肽鏈，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。本文中之多價抗體較佳進一步包含至少兩個(而較佳四個)輕鏈可變域多肽。本文中之多價抗體例如可包含約兩個至約八個輕鏈可變域多肽。本文所考慮之輕鏈可變域多肽包含輕鏈可變域，且視需要進一步包含CL域。

抗體變體

在有些實施例中，可考慮本文中所述之抗體之胺基酸序列修飾。舉例而言，可能需要改良抗體之結合親和力及/或其他生物性質。抗體之胺基酸序列變體可藉由將適當的核苷酸修改引入抗體核酸或藉由肽合成來製備。該等修飾例如包括抗體之胺基酸序列內之殘基的缺失及/或插入及/或取代。可作出缺失、插入與取代之任一組合以達成最終建構，條件是最終建構具有所要特性。胺基酸修改可在製備序列時引入受檢者抗體胺基酸序列。

適用於鑑別抗體之某些殘基或區域為突變發生之較佳位置的方法稱作"丙胺酸掃描誘變"，如Cunningham及Wells (1989) Science,

244:1081-1085所述。此處，殘基或靶殘基組經鑑別(例如，荷電殘基，諸如arg、asp、his、lys及glu)且置換為中性或荷負電胺基酸(最佳丙胺酸或聚丙胺酸)以影響胺基酸與抗原之相互作用。接著藉由在取代之位點或適於取代之位點引入更多或其他變體，可改進證明對取代之功能敏感性的彼等胺基酸位置。因此，儘管引入一個胺基酸序列變異的位點係預先確定，但突變本身的性質不一定預先確定。舉例而言，為分析突變在一定位點之表現，可在靶密碼子或靶區進行ala掃描或隨機誘變，及篩選所要活性之表現免疫球蛋白。

胺基酸序列之插入包括長度範圍由一個殘基至含有一百個或一百個以上之殘基之多肽的胺基端融合體及/或羧基端融合體，以及單或多胺基酸殘基的序列內插入。末端插入之實例包括具有N-端甲硫胺醯基殘基的抗體或融合於細胞毒性多肽的抗體。抗體分子之其他插入型變體包括抗體之N-端或C-端與一種酶(例如，對於ADEPT)或一種可增加抗體之血清半衰期之多肽的融合體。

多肽之糖基化通常為N-連接或O-連接。N-連接係指碳水化合物部分連接於天冬醯胺酸殘基之側鏈。三肽序列天冬醯胺酸-X-絲胺酸及天冬醯胺酸-X-蘇胺酸(其中X為除脯胺酸之外的任一種胺基酸)為碳水化合物部分經酶連接於天冬醯胺酸側鏈的識別序列。因此，該等三肽序列之任一者存在於多肽中均可形成一個潛在的糖基化位點。O-連接糖基化係指糖N-乙醯半乳胺糖、半乳糖或木糖中之一者連接於羥基胺基酸，儘管亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸，但最通常為絲胺酸或蘇胺酸。

抗體添加糖基化位點可方便地藉由修改胺基酸序列以使其含有上述三肽序列中之一或多者來完成(用於N-連接糖基化位點)。修改亦可藉由將一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基加入或取代原抗體之序列而作出(用於O-連接糖基化位點)。

若抗體包含一個Fc區，則可改變所連接之碳水化合物。舉例而言，具有一個缺少海藻糖連接於抗體Fc區之成熟碳水化合物結構的抗體描述於美國專利申請案第US 2003/0157108號(Presta, L.)。亦參見US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。在連接於抗體Fc區之碳水化合物中具有一個對分N-乙醯葡萄糖胺(GlcNAc)之抗體可參考WO 2003/011878(Jean-Mairet等人)及美國專利第6,602,684號(Umana等人)。在連接於抗體Fc區之寡聚糖中具有至少一個半乳糖殘基的抗體報導於WO 1997/30087(Patel等人)中。關於具有修改之碳水化合物連接於抗體Fc區之抗體，亦參見WO 1998/58964(Raju, S.)及WO 1999/22764(Raju, S.)。關於具有修飾性糖基化之抗原結合分子，亦參見US 2005/0123546(Umana等人)。

本文中之糖基化變體較佳包含Fc區，其中連接於Fc區的碳水化合物結構缺少海藻糖。該等變體具有經改良之ADCC功能。視需要，Fc區另外可包含一或多個進一步改良ADCC的胺基酸取代，例如Fc區中位置298、333及/或334(殘基之Eu編號)的取代。與"去海藻糖基化"或"海藻糖缺乏"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；Okazaki等人，J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki等人，Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)。產生海藻糖基化不足(defucosylated)抗體之細胞株之實例包括海藻糖基化不足之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)，及敲出細胞株，諸如α-

1,6-海藻糖基轉移酶基因、FUT8、敲出CHO細胞(Yamane-Ohnuki等人, Biotech. Bioeng. 87:614 (2004))。

另一類型之變體為胺基酸取代變體。該等變體在抗體分子中具有至少一個經不同殘基置換之胺基酸殘基。取代性誘變最關注之位點包括高變區，但亦可考慮FR修改。保守性取代以標題"較佳取代"展示於表1中。若該等取代導致生物活性變化，則可引入更多實質性修改(如表1命名為"例示性取代"，或下文參考胺基酸類進一步所述)，且篩選產物。

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
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (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
---------	----------------------------------	-----

實質性修改抗體之生物性質可藉由選擇對維持(a)取代區域內多肽主鏈之結構，例如，為片狀或螺旋狀構型；(b)分子在靶位點處之電荷性或疏水性或(c)側鏈之松密度之作用顯著不同的取代來實現。天然存在之殘基可基於共同側鏈性質分成如下之組：

- (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)影響鏈取向的殘基：gly、pro；及
- (6)芳香族：trp、tyr、phe。

非保守性取代需要將該等類中一類之成員交換為另一類。

一類型之取代變體包含取代親本抗體(例如，人源化抗體或人類抗體)中之一或多個高變區殘基。通常，所得選用於進一步開發之變體相對於產生其之親本抗體具有經改良的生物性質。產生該等取代變體的便捷方法包括使用噬菌體呈現之親和力成熟。簡而言之，若干高變區位點(例如，6-7個位點)經突變可在各位點產生所有可能的胺基酸取代。由此所產生之抗體自絲狀噬菌體顆粒中呈現為封裝於各顆粒內部之M13之基因III產物之融合體。接著如本文中所揭示，按照生物活性(例如結合親和力)篩選噬菌體呈現變體。為鑑別用於修飾之候選高變區位點，可執行丙胺酸掃描誘變以鑑別對抗原結合作用顯著的高變區殘基。或者，或此外，可有利地分析抗原-抗體複合物之晶體結構以鑑別抗體與抗原之間的接觸點。根據本文中詳述之技術，該等接觸殘基及鄰近殘基可候選用於取代。一旦產生該等變體，則使一組變體如本文中所述經受篩選，且在一或多個相關檢定中具有優良性質的抗

體可選用於進一步開發。

編碼抗體之胺基酸序列變體的核酸分子可藉由該項技術中已知的各種方法製備。該等方法包括但不限於：自天然源中分離(在天然存在之胺基酸序列變體之狀況中)或藉由抗體之早先製備變體型或非變體型之寡核苷酸介導(或定點)誘變、PCR誘變及暗匣誘變來製備。

可能需要將一或多個胺基酸修飾引入本發明之免疫球蛋白多肽之Fc區，從而產生Fc區變體。Fc區變體可包含包括一或多個胺基酸位置處之胺基酸修飾(例如取代)的人類Fc區序列(例如，人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)，該等胺基酸位置包括鉸鏈半胱胺酸之位置。根據此描述及該項技術之教示，可設想在有些實施例中，用於本發明之方法中的抗體可包含例如Fc區中之一或多處修改(與野生型相應抗體相比)。但該等抗體與野生型相應抗體相比大體上仍保持治療應用所需要之相同特性。舉例而言，吾人認為，例如可在Fc區中作出某些修改，從而C1q結合及/或互補依賴細胞毒性(CDC)更改(亦即，改良或減弱)，如WO 99/51642中所述。關於Fc區變體之其他實例，亦參見Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988)；美國專利第5,648,260號；美國專利第5,624,821號；及WO 94/29351。WO 00/42072 (Presta)及WO 2004/056312 (Lowman)描述具有經改良或經減弱之FcR結合的抗體變體。該等專利公開案之內容以引用方式特別併入本文中。亦可參見Shields等人，J. Biol. Chem. 9 (2): 6591-6604 (2001)。具有經增大之半衰期及經改良之結合新生兒Fc受體(FcRn)、負責將母本IgG傳遞至胎兒(Guyer等人，J. Immunol. 117:587 (1976)及Kim等人，J. Immunol. 24:249 (1994))的抗體描述於US2005/0014934A1中(Hinton等人)。該等抗體包含具有一或多個取代於其中的Fc區，該等取代可改良Fc區與FcRn之結合。具有經修改之Fc區胺基酸序列及經增減之C1q結合能力的多肽變體描述於美國專利第6,194,551B1號、WO 99/51642

中。彼等專利公開案之內容以引用方式特別併入本文中。亦參見 Idusogie等人，J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)。

抗體衍生物

本發明之抗體可進一步修飾成含有該項技術中已知且易獲得的其他非蛋白部分。適於衍生抗體之部分較佳為水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制實例包括但不限於：聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇之共聚物、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(正乙基吡咯啉酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、環氧丙烷/環氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如，甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由於其在水中的穩定性而具有製造優勢。聚合物可具有任一分子量，且可為分枝的或無分枝的。聚合物附著於抗體的數量可改變，且若附著一種以上的聚合物，則其可為相同或不同分子。一般而言，用於衍生作用之聚合物的數量及/或類型可根據以下考慮確定，包括但不限於：欲改良之抗體之特定性質或功能；抗體衍生物是否用於限定條件下之治療等等。

篩選具有所要性質的抗體

本發明之抗體的特徵在於可藉由該項技術中已知的各種檢定確定其物理/化學性質及生物功能。在有些實施例中，抗體的特徵為以下任一者或多者：減少或阻斷EphrinB2活化；減少或阻斷EphrinB2下游分子信號傳導；減少或阻斷EphrinB2結合Eph受體(諸如EphB1、EphB2及/或EphB3)活化；減少或阻斷EphrinB2結合Eph受體(例如，EphB1、EphB2及/或EphB3)下游分子信號傳導；中斷或阻斷EphrinB2結合Eph受體(例如，EphB1、EphB2及/或EphB3)結合EphrinB2；EphrinB2磷酸化作用及/或EphrinB2多聚化，及/或EphrinB2結合Eph受

體(例如，EphB1、EphB2及/或EphB3)磷酸化作用，及/或治療及/或預防腫瘤、細胞增殖性病變或癌；及/或減少、阻斷或抑制血管生成；及/或治療或預防與EphrinB2表現及/或活性(諸如，EphrinB2表現及/或活性增強)關聯之病變。

純化抗體的特徵可藉由一系列檢定進一步確定，該等檢定包括但不限於：N-末端定序、胺基酸分析、非變性尺寸排除高壓液相層析(HPLC)、質譜法、離子交換層析及木瓜酶消化。

在本發明之某些實施例中，本文中所產生之抗體可分析其生物活性。在有些實施例中，本發明之抗體可測試其抗原結合活性。該項技術中已知且本文中可使用的抗原結合檢定包括但不限於任何直接或競爭性結合檢定，該等檢定使用諸如以下技術：西方墨點法、放射免疫檢定、ELISA(酶聯免疫吸附檢定)、“夾心”免疫檢定、免疫沉澱檢定、螢光免疫檢定及蛋白質A免疫檢定。下文在實例部分中提供說明性抗原結合檢定。

在又一實施例中，本發明提供與31.19抗體、31.19.1D8抗體及/或31.19.2D3抗體競爭結合EphrinB2的抗-EphrinB2單株抗體。該等競爭者抗體包括可識別與EphrinB2抗原決定基(其可被抗體31.19抗體、31.19.1D8抗體及/或31.19.2D3識別)相同或重疊之EphrinB2抗原決定基的抗體。該等競爭者抗體可藉由篩選與標記31.19抗體、31.19.1D8抗體及/或31.19.2D3抗體競爭結合固著型EphrinB2之抗-EphrinB2雜交瘤表層物來獲得。與含有無關(或無)抗體之對照結合混合物中所偵測之結合標記抗體的量比較，含有競爭者抗體之雜交瘤表層物可減少該競爭結合混合物中所偵測之結合標記抗體的量。本文中所述之任一種競爭結合檢定適用於以上程序。

在另一態樣中，本發明提供包含31.19抗體、31.19.1D8抗體及/或31.19.2D3抗體之一或多(諸如2、3、4、5及/或6)個HVR的抗-EphrinB2

單株抗體。包含31.19抗體、31.19.1D8抗體及/或31.19.2D3之一或多個HVR的抗-EphrinB2單株抗體可藉由以下步驟建構：將31.19抗體、31.19.1D8抗體及/或31.19.2D3之一或多個HVR移植於模板抗體序列(例如與親本抗體之相應鼠序列最近的人類抗體序列，或所有人類抗體在親本抗體輕鏈或重鏈之特定亞群中的一致序列)，以及在如本文中所述之重組宿主細胞中表現具有或不具有伴隨恆定區序列之所得嵌合輕鏈及/或重鏈可變區序列。

具有本文中所述之獨特性質的本發明之抗-EphrinB2抗體可藉由任一種便利方法篩選所要性質的抗-EphrinB2雜交瘤純系來獲得。舉例而言，若需要阻斷或不阻斷EphrinB2結合夥伴(例如EphB受體)與EphrinB2結合的抗-EphrinB2單株抗體，則候選抗體可以諸如競爭性結合ELISA之結合競爭檢定測試，其中將板孔以EphrinB2塗佈，且使所研究之過量EphrinB2結合夥伴中之抗體溶液分層於所塗孔板上，且結合抗體以酶促方式偵測，例如，使結合抗體與HRP結合抗-Ig抗體或經結合生物素之抗-Ig抗體接觸且顯現HRP呈色反應，例如，以抗生蛋白鏈菌素-HRP及/或過氧化氫顯現孔板且藉由490 nm之分光光度術、以ELISA孔板讀取器偵測HRP呈色反應。

若需要抑制EphrinB2活化的抗-EphrinB2抗體，則候選抗體可以EphrinB2磷酸化檢定來測試。該等檢定已知於該項技術中，且其中一該檢定描述於實例部分中。

若需要抑制細胞生長的抗-EphrinB2抗體，則候選抗體可以量測細胞生長之抑制之活體外及/或活體內檢定來測試。該等檢定已知於該項技術中，且在本文中進一步描述且例證。

在一實施例中，本發明設計一種具有某些但非全部效應功能的修改抗體，其成為多種應用(其中活體內抗體之半衰期為重要的，但某些效應功能(諸如互補及ADCC)為不必要的或有害的)之所要候選抗

體。在某些實施例中，所產生之免疫球蛋白之Fc活性經量測以確保僅維持所要性質。可執行活體外及/或活體內細胞毒性檢定以證實CDC及/或ADCC活性之減少/降低。舉例而言，可執行Fc受體(FcR)結合檢定，以確保抗體缺乏FcγR結合能力(從而可能缺乏ADCC活性)，但保持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。FcR在造血細胞上之表現總結於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)之第464頁上的表3中。活體外檢定評價所研究之分子之ADCC活性的實例描述於美國專利第5,500,362號或第5,821,337號中。適用於該等檢定的效應細胞包括周圍血液單核細胞(PBMC)及天然殺手(NK)細胞。或者，或此外，所研究之分子之ADCC活性例如可在動物模型(諸如Clynes等人 *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)中所揭示之彼動物模型)中活體內評定。亦可進行C1q結合檢定以證實抗體無法結合C1q且從而缺乏CDC活性。為評定補體激活，可執行CDC檢定，例如Gazzano-Santoro等人，*J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)中所述之檢定。亦可使用該項技術中已知的方法，例如實例部分所述的彼等方法，執行FcRn結合測定及活體內廓清/半衰期測定。

載體、宿主細胞及重組方法

對於本發明之抗體之重組產生，可將編碼其之核酸分離且插入可複製載體中以便進一步選殖(擴增DNA)或表現。編碼抗體之DNA易使用習知程序(例如藉由使用能夠特定結合編碼抗體之重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)分離及定序。很多載體可獲得。載體之選擇部分地視欲使用之宿主細胞而定。通常，宿主細胞較佳為原核來源或真核(通常哺乳動物)來源。應瞭解，任何同型之恆定區(包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恆定區)可用於此目的，且該等恆定區可獲自任何人類或動物種類。

a.使用原核宿主細胞產生抗體：

i.載體建構

編碼本發明之抗體之多肽成分之多核苷酸序列可使用標準重組技術獲得。所要多核苷酸序列可自抗體產生細胞(諸如雜交瘤細胞)中分離且定序。或者，多核苷酸可使用核苷酸合成儀或PCR技術合成。編碼多肽之序列一旦獲得，則插入能夠複製及表現原核宿主中之異源多核苷酸之重組載體中。為本發明起見，可使用很多可獲得且已知於該項技術中的載體。適當載體之選擇主要取決於待插入載體中之核酸及待以載體轉化之特定宿主細胞之大小。各種載體含有不同成分，此取決於其功能(異源多核苷酸之擴增或表現，或兩者)及其與其駐留之特定宿主細胞之相容性。載體成分通常包括但不限於：複製起點、選擇性標記基因、啟動子、核糖體結合位點(RBS)、信號序列、異源核酸插入序列及轉錄終止序列。

一般而言，結合該等宿主，使用含有複製子及控制序列、獲自與宿主細胞相容之種類的質體載體。載體一般攜有複製位點，以及能夠在轉化細胞中提供表型選擇的標記序列。舉例而言，大腸桿菌通常使用pBR322(獲自大腸桿菌種類之質體)轉化。pBR322含有編碼安比西林(ampicillin；Amp)及四環素(tetracycline；Tet)抗藥性的基因，且從而提供易鑑別轉化細胞的方式。pBR322、其衍生物或其他微生物質體或噬菌體亦可含有或經修飾成含有啟動子，啟動子藉由用於表現內源性蛋白質之微生物有機體使用。用於表現特定抗體之pBR322衍生物之實例詳述於Carter等人之美國專利第5,648,237號中。

此外，結合該等宿主，可使用含有複製子及控制序列、與宿主微生物相容的噬菌體載體作為轉化載體。舉例而言，可利用諸如λGEM.TM.-11之噬菌體製備可用於轉化諸如大腸桿菌LE392之易感宿主細胞的重組載體。

本發明之表現載體可包含兩個或兩個以上編碼各多肽成分的啟動子-順反子對。啟動子為位於調節其表現之順反子上游(5')的末轉譯調控序列。原核啟動子通常分成兩種類型：可誘導型及組成型。可誘導型啟動子為在其控制下啟動順反子之增強水準之轉錄以響應培養條件之變化(例如，存在或缺少養分或溫度變化)的啟動子。

各種潛在宿主細胞所識別之大量啟動子已熟知。所選啟動子藉由經由限制酶消化自源DNA中移除啟動子且將分離啟動子序列插入本發明之載體中可操作性地連接至編碼輕鏈或重鏈之順反子DNA。天然啟動子序列與多種異源啟動子可用於直接擴增及/或表現靶基因。在有些實施例中，可利用異源啟動子，因為與天然靶多肽啟動子相比，其一般容許所表現之靶基因之更多轉錄及更高產量。

適合與原核宿主使用之啟動子包括PhoA啟動子、 β -半乳糖酶及乳糖啟動子系統、色胺酸(trp)啟動子系統及雜交啟動子(諸如tac或trc啟動子)。然而，其他在細菌中起作用的啟動子(諸如其他已知細菌啟動子或噬菌體啟動子)亦適用。其核苷酸序列已公開，從而可使熟習工人使用連接子或接頭將其操作性接合至編碼靶輕鏈及重鏈的順反子(Siebenlist等人(1980) Cell 20:269)以提供任何需要的限制性位點。

在本發明之一態樣中，重組載體內的各順反子包含引導所表現之多肽遷移跨越膜的分泌信號序列成分。一般而言，信號序列可為載體之成分，或可為插入載體中之靶多肽DNA的一部分。選用於本發明之信號序列應為可藉由宿主細胞識別及處理(亦即藉由信號肽酶裂解)的信號序列。對於不識別及處理異源多肽之天然信號序列的原核宿主細胞，信號序列可經選自例如由以下物組成之群的原核信號序列取代：鹼性磷酸酶、青黴素酶、Ipp或熱穩定腸毒素II(STII)引子、LamB、PhoE、PelB、OmpA及MBP。在本發明之一實施例中，用於表現系統之兩順反子的信號序列為STII信號序列或其變體。

在另一態樣中，根據本發明產生的免疫球蛋白可存在於宿主細胞之細胞質中，且因此不需要分泌信號序列存在於各順反子內部。從而，免疫球蛋白輕鏈及重鏈經表現、折疊且組裝以在細胞質內形成功能性免疫球蛋白。某些宿主株(例如大腸桿菌Gene, 159:203 (1995)。

適於表現本發明之抗體的原核宿主細胞包括古細菌 (Archaeobacteria) 及真細菌 (Eubacteria)，諸如革蘭氏陰性 (Gram-negative) 或革蘭氏陽性 (Gram-positive) 有機體。適用細菌之實例包括埃希氏桿菌屬 (*Escherichia*) (例如大腸桿菌)、桿菌屬 (例如枯草芽孢桿菌 (*B. subtilis*))、腸道細菌、假單胞菌屬種類 (例如銅綠假單胞菌 (*P. aeruginosa*))、鼠傷寒沙門氏桿菌 (*Salmonella typhimurium*)、黏質沙雷菌 (*Serratia marcescans*)、克雷伯氏菌屬 (*Klebsiella*)、變形桿菌屬 (*Proteus*)、志賀桿菌屬 (*Shigella*)、根瘤菌屬 (*Rhizobia*)、透明顫菌 (*Vitreoscilla*) 或副球菌屬 (*Paracoccus*)。在一實施例中，使用革蘭氏陰性細胞。在一實施例中，本發明使用大腸桿菌細胞作為宿主。大腸桿菌株之實例包括菌株 W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, 第2卷 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 第1190-1219頁; ATCC寄存第27,325號) 及其衍生物，包括具有基因型 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR 之株 33D3 (美國專利第5,639,635號)。其他菌株及其衍生物 (諸如大腸桿菌 294 (ATCC 31,446)、大腸桿菌 B、大腸桿菌 λ 1776 (ATCC 31,537) 及大腸桿菌 RV308 (ATCC 31,608)) 亦為適用的。該等實例為說明性的而非限制性的。具有限定基因型之上述任一種細菌之衍生物的建構方法已知於該項技術中且描述於例如，Bass 等人，*Proteins*, 8:309-314 (1990) 中。考慮複製子在細菌之細胞中的複製性，

一般需要選擇適當的細菌。舉例而言，當使用諸如 pBR322、pBR325、pACYC177 或 pKN410 之熟知質體提供複製子時，可適當地使用大腸桿菌、沙雷氏菌屬或沙門氏菌屬種類作為宿主。宿主細胞通常應分泌最小量之蛋白水解酶，且可能需要將其他蛋白酶抑制劑併入細胞培養中。

ii. 抗體製備

宿主細胞可經上述表現載體轉化，且視需要培養於經改質習知培養基中以便誘導啟動子、選擇轉化體或擴增編碼所要序列之基因。

轉化意謂將 DNA 引入原核宿主以使得 DNA 可複製為染色體外成分或染色體成分。視所用宿主細胞而定，轉化可使用適用於該等細胞之標準技術進行。使用氯化鈣之鈣處理一般係用於含有實質性細胞壁障壁的細菌細胞。另一種轉化方法係使用聚乙二醇/DMSO。又一種所用技術為電穿孔。

用於產生本發明之多肽的原核細胞係培養於該項技術已知且適於培養所選擇之宿主細胞的培養基中。適當培養基之實例包括蛋白陳培養基(LB)外加必需的營養補充物。在有些實施例中，該培養基亦含有基於建構表現載體所選之選擇劑，以選擇性地容許含有表現載體之原核細胞的生長。舉例而言，將安比西林添加至培養基以便培養表現安比西林抗藥性基因之細胞。

除碳、氮及無機磷酸鹽源外，亦可包括單獨引入或作為與其他補充物或培養基(諸如錯合物氮源)之混合物之適當濃度的任何必要補充物。培養基視需要可含有一或多種選自由麩胱甘肽、半胱胺酸、胱胺、硫乙醇酸鹽、二硫赤藻糖醇及二硫蘇糖醇組成之群的還原劑。

原核宿主細胞在適當溫度下培養。對於例如大腸桿菌培養，較佳溫度的範圍為約 20°C 至約 39°C、更佳約 25°C 至約 37°C、更佳約 30°C。培養基之 pH 可為約 5 至約 9 範圍內的任一 pH，此主要視宿主有機體而

定。對於大腸桿菌，pH較佳為約6.8至約7.4，而更佳約7.0。

若本發明之表現載體中使用可誘導啟動子，則蛋白質表現係在適於激活啟動子的條件下誘導。在本發明之一態樣中，PhoA啟動子係用於控制多肽之轉錄。因此，將所轉化之宿主細胞培養於磷酸鹽限制培養基中以便誘導。磷酸鹽限制培養基較佳為C.R.A.P培養基(參見，例如，Simmons等人，J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147)。如該項技術中已知，可根據所使用之載體建構，使用各種其他誘導物。

在一實施例中，本發明之所表現之多肽分泌進入宿主細胞之胞外質內且自其回收。蛋白質回收通常包括分裂微生物，一般藉由諸如滲透性衝擊、超音波處理或溶解之方式分裂微生物。細胞一旦分裂，則可藉由離心作用或過濾移除細胞碎片或整個細胞。蛋白質例如可藉由親和力樹脂層析法進一步純化。或者，可將蛋白質輸送入培養基內且於其中分離。細胞可自培養基中移除，且培養基上清液可經過濾且濃縮以便進一步純化所產生之蛋白質。所表現之多肽可使用一般已知之方法(諸如聚丙烯醯胺凝膠電泳(PAGE)及西方墨點法檢定)進一步分離且鑑別。

在本發明之一態樣中，抗體製備係藉由醱酵方法大量進行。可獲得製備重組蛋白質的各種大規模饋入分批醱酵程序。大規模醱酵具有至少1000公升之容量、較佳約1,000至100,000公升之容量。該等醱酵器使用攪拌器葉輪分配氧及養料，尤其葡萄糖(較佳碳/能量來源)。小規模醱酵一般係指體積容量不超過約100公升且可在約1公升至約100公升範圍內之醱酵器中的醱酵。

在一醱酵方法中，蛋白質表現之誘導通常在細胞在適宜條件下培養至所要密度(例如約180-220之OD550)之後開始，在該階段，細胞處於早期靜止期。如該項技術中已知及以上所述，可根據所使用之載體建構，使用各種誘導物。細胞可培養較短時期後再誘導。細胞一般誘

導約12-50個小時，儘管可使用更長或更短的誘導時間。

為改良本發明之多肽之生產產量及品質，可修改各種醱酵條件。舉例而言，為改良所分泌之抗體多肽之適當組裝及折疊，可使用過度表現伴隨蛋白(諸如Dsb蛋白(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD及/或DsbG)或FkpA(具有伴隨活性的肽基脯胺醯基順反-異構酶)的其他載體共轉化宿主原核細胞。伴隨蛋白已經證明可促進細菌宿主細胞中所產生之異源蛋白質的適當折疊及溶解性。Chen等人(1999) J Bio Chem 274:19601-19605; Georgiou等人，美國專利第6,083,715號; Georgiou等人，美國專利第6,027,888號; Bothmann及Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm及Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie等人(2001) Mol. Microbiol. 39:199-210。

為使所表現之異源蛋白質(尤其對蛋白質裂解敏感的彼等異源蛋白質)之蛋白質水解作用降至最小，本發明可使用某些缺乏蛋白水解酶的宿主菌株。舉例而言，宿主細胞菌株可經修飾以實現編碼已知細菌蛋白酶(諸如蛋白酶III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶I、蛋白酶Mi、蛋白酶V、蛋白酶VI及其組合)之基因中的遺傳突變。有些缺乏大腸桿菌蛋白酶之菌株可獲得且描述於例如，Joly等人(1998),同上; Georgiou等人，美國專利第5,264,365號; Georgiou等人，美國專利第5,508,192號; Hara等人，Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)中。

在一實施例中，缺乏蛋白水解酶且經過度表現一或多種伴隨蛋白之質體所轉化的大腸桿菌菌株在本發明之表現系統中用作宿主細胞。

iii. 抗體純化

可使用該項技術中已知的標準蛋白質純化方法。以下程序列舉為適當的純化程序：免疫親和柱或離子交換柱上之分餾、乙醇沉澱、逆相HPLC、二氧化矽層析或陽離子交換樹脂(諸如DEAE)層析、色層焦

集、SDS-PAGE、硫酸銨沉澱及使用例如Sephadex G-75之凝膠過濾。

在一態樣中，使用固著於固相上之蛋白質A免疫親和純化本發明之全長抗體產物。蛋白質A為來自金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的41kD細胞壁蛋白質，其可以高親和力結合抗體之Fc區。Lindmark等人(1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13。固著蛋白質A之固相較佳為包含玻璃或二氧化矽表面之柱，更佳控制小孔玻璃柱或矽酸柱。在有些應用中，該柱已塗有試劑，諸如甘油，以試圖防止污染物之非特定黏著。

作為純化之第一步驟，可將如上所述獲自細胞培養之製劑塗施於蛋白質A固著之固相上以容許所研究之抗體特定結合蛋白質A。接著洗滌固相以移除非特定結合固相的污染物。最後，藉由溶離自固相中回收所研究之抗體。

b.使用真核宿主細胞產生抗體：

載體成分一般包括但不限於以下物中之一或多者：信號序列、複製起點、一或多個標記基因、增強子成分、啟動子及轉錄終止序列。

(i)信號序列成分

用於真核宿主細胞中的載體亦可含有信號序列或其他在所研究之成熟蛋白質或多肽之N-末端具有特定分裂位點的多肽。所選擇的異源信號序列較佳為可藉由宿主細胞識別及處理(亦即藉由信號肽酶裂解)的信號序列。在哺乳動物細胞表現中，可獲得哺乳動物信號序列以及病毒分泌引子，例如單純性疱疹gD信號。

該前導區之DNA係在閱讀框中與編碼抗體之DNA接合。

(ii)複製起點

哺乳動物表現載體一般不需要複製起點成分。舉例而言，通常使用SV40起點僅因為其含有早期啟動子。

(iii)選擇基因成分

表現載體及選殖載體可含有選擇基因，亦稱可選擇標記。典型的選擇基因編碼：(a)賦予對於抗生素或其他毒素(例如，安比西林、新黴素、甲胺喋呤或四環素)之抗藥性的蛋白質；(b)補充營養缺陷性不足(若相關)的蛋白質；或(c)提供複合物培養基未提供之關鍵營養的蛋白質。

選擇方案之一實例係利用藥物中斷宿主細胞之生長。可成功地以異源基因轉化的彼等細胞可產生賦予抗藥性的蛋白質，且因此自選擇方案中倖存。該主導選擇之實例係使用藥物新黴素、黴酚酸及潮黴素。

適用於哺乳動物細胞之可選擇標記的另一實例為能夠識別能容納抗體核酸之細胞的彼等物，諸如DHFR、胸苷激酶、金屬硫蛋白-I及金屬硫蛋白-II，較佳靈長類動物之金屬硫蛋白基因、腺苷脫胺酶、鳥胺酸脫羧酶等。

舉例而言，首先藉由在含有甲胺喋呤(Mtx)、DHFR之競爭性拮抗劑的培養基中培養所有轉化體來鑑別以DHFR選擇基因轉化的細胞。適當的宿主細胞(當使用野生型DHFR時)為缺乏DHFR活性的中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株(例如，ATCC CRL-9096)。

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、新黴素或G418)的培養基中培養細胞來選擇經編碼抗體、野生型DHFR蛋白質及另一種可選擇標記(諸如胺基糖苷3'-磷酸轉移酶(APH)之DNA序列所轉化或共轉化的宿主細胞(尤其含有內源性DHFR的野生型宿主)。參見美國專利第4,965,199號。

(iv) 啟動子成分

表現載體及選殖載體一般含有藉由宿主有機體識別且操作性連接至抗體多肽核酸的啟動子。真核細胞的啟動子序列已知。實際上所有的真核基因皆具有位於距啟動轉錄處之位點之上游約25至30鹼基處的

AT-富集區。發現於距多種基因之轉錄起始處上游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。可為添加poly A尾至編碼序列之3'末端之信號的AATAAA序列在大部分真核基因的3'末端處。所有該等序列可適當地插入真核表現載體中。

哺乳動物宿主細胞中來自載體之抗體多肽轉錄例如可藉由獲自諸如多形瘤病毒、傳染性上皮瘤病毒、腺病毒(諸如腺病毒2)、牛乳頭狀瘤病毒、鳥肉瘤病毒、巨細胞病毒、反轉錄病毒、肝炎-B病毒及猿猴病毒40(SV40)之病毒之基因組之啟動子、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)、熱休克啟動子控制，條件是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可方便地作為亦含有SV40病毒之複製起點的SV40限制性片段獲得。人類巨細胞病毒之直接早期啟動子可方便地作為HindIII E限制性片段獲得。美國專利第4,419,446號中揭示在哺乳動物宿主中使用牛乳頭狀瘤病毒作為載體表現DNA的系統。該系統之修飾描述於美國專利第4,601,978號中。或者，可使用勞斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus)長重複末端作為啟動子。

(v) 增強子要素成分

藉由較高級真核細胞轉錄編碼本發明之抗體多肽的DNA通常藉由將增強子序列插入載體內來增強。現已知多種來自哺乳動物基因(球蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、 α -胎蛋白及胰島素)的增強子序列。然而，吾人通常使用來自真核細胞病毒的增強子。實例包括複製起點(bp 100-270)之後側的SV40增強子、巨細胞病毒早期啟動子增強子、複製起點之後側的多形瘤增強子及腺病毒增強子。關於激活真核啟動子的增強要素，亦參見Yaniv, Nature 297:17-18(1982)。增強子可在載體內於位置5'或3'處接合入抗體多肽編碼序列，但較佳定位於啟動子之位點5'處。

(vi)轉錄終止成分

用於真核宿主細胞中的表現載體通常亦含有為終止轉錄及為穩定 mRNA 所需要的序列。該等序列一般可獲自真核或病毒 DNA 或 cDNA 之 5' 及偶而 3' 末轉譯區。該等區在編碼抗體之 mRNA 之末轉譯部分中含有轉錄為多聚腺嘌呤化片段的核苷酸片段。一種適用的轉錄終止成分為牛生長激素多聚腺嘌呤區。參見 WO 94/11026 及其中所揭示之表現載體。

(vii) 宿主細胞之選擇及轉化

本文中適用於選殖或表現 DNA 於載體中的宿主細胞包括本文所述之較高級真核細胞，包括脊椎動物宿主細胞。脊椎動物細胞在培養(組織培養)中之繁殖已成為常規程序。適用哺乳動物宿主細胞株之實例為藉由 SV40(COS-7、ATCC CRL 1651)所轉化的猴腎 CV1 株；人類胚腎株(經次選殖在懸浮液培養中生長的 293 或 293 細胞、Graham 等人，J. Gen Virol. 36:59 (1977))；幼倉鼠腎細胞(BHK, ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR(CHO, Urlaub 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；小鼠支持細胞(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)；人類宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34)；水牛大鼠肝細胞(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；及人類肝細胞瘤株(Hep G2)。

宿主細胞經上述表現載體或選殖載體轉化以便產生抗體，且培養於視需要經改質之習知培養基中以便誘導啟動子、選擇轉化體或擴增編碼所要序列之基因。

(viii) 培養宿主細胞

用於產生本發明之抗體的宿主細胞可培養於各種培養基中。市購培養基，諸如Ham氏F10(Sigma)、最低必需培養基(MEM)(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)及Dulbecco氏修飾之Eagle氏培養基(DMEM)(Sigma)，適用於培養宿主細胞。此外，以下文獻中所述之任一種培養基可用作宿主細胞之培養基：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。該等任一種培養基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、氯化鈣、氯化鎂及磷酸鹽)、緩衝劑(諸如HEPES)、核苷(諸如腺苷及胸苷)、抗生素(諸如GENTAMYCIN™藥)、痕量元素(定義為一般以微莫耳範圍內之最後濃度存在的無機化合物)及葡萄糖或相當能量來源。亦可包括熟習該項技術者已知之適當濃度的其他任何必要補充物。諸如溫度、pH及類似條件之培養條件為前述選用於表現之宿主細胞所使用的彼等培養條件且對普通熟習者顯而易見。

(ix) 抗體純化

當使用重組技術時，抗體可在細胞內產生，或直接分泌進入培養基。若抗體係細胞內產生，則作為第一步驟，將微粒碎片(宿主細胞或溶解片段)例如藉由離心作用或超濾作用移除。若抗體分泌進入培養基，則通常首先使用市購蛋白質濃縮過濾器(例如Amicon或Millipore Pellicon超濾裝置)濃縮獲自該等表現系統的上清液。以上任一步驟中可包括諸如PMSF之蛋白酶抑制劑以抑制蛋白質水解，且可包括抗生素以防止偶生污染物之滋長。

由細胞所製備的抗體組合物可使用例如羥基磷灰石層析、凝膠電



泳、滲析及親和層析加以純化，較佳純化技術為親和層析法。蛋白質A適用作親和配體視存在於抗體中之任何免疫球蛋白Fc域之種類及同型而定。蛋白質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))。蛋白質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))。親和配體附著之基質最通常為瓊脂糖，但可利用其他基質。機械性穩定的基質，諸如控制小孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯，與瓊脂糖相比可獲得更快的流動速率及更短的處理時間。若抗體包含CH3域，則Bakerbond ABX™樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)適用於純化。視待回收之抗體而定，亦可使用其他蛋白質純化技術，諸如離子交換柱上之分餾、乙醇沉澱、逆相HPLC、二氧化矽上之層析、肝素SEPHAROSE™上之層析、陰離子或陽離子交換樹脂(諸如聚天冬胺酸柱)上之層析、色層焦集、SDS-PAGE及硫酸銨沉澱。

任何初步純化步驟之後，可使用pH在2.5-4.5之間之溶離緩衝劑使包含所研究之抗體及污染物的混合物經受低pH疏水性相互作用層析，較佳在低鹽濃度下(例如約0-0.25 M鹽)執行。

免疫結合物

本發明亦提供免疫結合物(可互換地稱作"抗體-藥結合物"或"ADC")，包含與細胞毒性劑(諸如化學治療劑、藥物、生長抑制劑、毒素(例如細菌、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)結合之本文中所述之任一種抗-EphrinB2抗體。

使用局部傳遞細胞毒性劑或細胞抑制劑(亦即在癌治療中殺死或抑制腫瘤細胞的藥物)的抗體-藥物結合物(Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614；Niculescu-Duvaz及Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172；美國專利第4,975,278號)可使藥物部

分靶向傳遞至腫瘤且於其中累積於細胞內，其中全身性投與該等未結合藥劑可能導致正常細胞以及設法去除之腫瘤細胞之無法接受之毒性水準(Baldwin等人，(1986) *Lancet* pp. (1986年3月15日:603-05; Thorpe, (1985)"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera等人(編)，第475-506頁)。因此應設法使毒性最小而功效最大。經報導，多株抗體與單株抗體均適用於該等策略(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)。抗體-毒素結合物中使用的毒素包括細菌毒素，諸如白喉毒素、植物毒素(諸如蓖麻毒素)、小分子毒素(諸如格爾德黴素(geldanamycin)(Mandler等人(2000) *Jour. of the 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))、美登素類(maytansinoids)(EP 1391213; Liu等人，(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623)及刺孢黴素(Lode等人(1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman等人(1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342))。該等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實現其細胞毒性及細胞抑制效應。有些細胞毒性藥物當與大抗體或蛋白質受體配體結合時易為非活性的或較少活性的。

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-螯合劑所結合之抗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，但在大部分患者投藥會導致嚴重及延長性血細胞減少症。MYLOTARG(吉妥珠單抗奧唑米星(gemtuzumab ozogamicin)，Wyeth Pharmaceuticals)，一種由連接至刺孢黴素的hu CD33抗體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連接至類美登素藥物部分DM1之huC242抗體組成的抗體藥物結合物，正進入可表現CanAg之癌(諸如結腸癌、胰腺癌、胃癌及其他癌)之治療之階段II試驗。MLN-2704(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)，一種由連接至類美登素藥物部分DM1之抗-前列腺特定膜抗原(PSMA)單株抗體組成的抗體藥物結合物，正在開發用於前列腺腫瘤之潛在治療。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，係與嵌合單株抗體cBR96(特異於癌科中之Lewis Y)及cAC10(特異於惡性血液腫瘤上之CD30)結合(Doronina等人(2003) *Nature Biotechnology* 21 (7):778-784)且正在治療開發中。

適用於產生免疫結合物的化學治療劑描述於本文中(例如上述)。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(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A鏈、相思豆毒素A鏈、葫蘆根毒蛋白A鏈、 α -帶麴菌素(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(*crotin*)、肥皂草(*sapaonaria officinalis*)抑制劑、重組植物毒素(*gelonin*)、有絲分裂素(*mitogellin*)、侷限麴菌素(*restrictocin*)、酚黴素、伊諾黴素(*enomycin*)及黴菌毒素(*tricothecene*)。參見例如1993年10月28日公開的WO 93/21232。製備放射性結合物抗體可利用各種放射性核素。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各種雙官能蛋白質偶合劑製備，該等偶合劑諸如N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸鹽(SPDP)、亞胺硫堊(IT)、亞胺基酯之雙官能衍生物(諸如乙二醯亞胺二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如二琥珀醯亞胺基辛二酸酯)、醛(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)、雙重氮衍生物(諸如雙(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸鹽(諸如甲苯2,6-二異氰酸鹽)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-異硫氰基苄基-3-甲基二乙烯三胺五乙酸(MX-DTPA)為用於放射性核苷酸與抗體結合的例示性螯合劑。參見WO 94/11026。

本文中亦可考慮抗體與一或多種小分子毒素(諸如刺孢黴素、類美登素、海兔毒素、奧利斯坦叮、黴菌毒素及CC1065，及具有毒素活性之該等毒素之衍生物)的結合物。

i. 美登素及類美登素

在有些實施例中，免疫結合物包含結合至一或多個類美登素分子之本發明之抗體(全長或片段)。

類美登素為有絲分裂(*mitototic*)抑制劑，其藉由抑制微管蛋白聚合而起作用。美登素最先係自東非灌木齒葉美登木(*Maytenus serrata*)中分離而得(美國專利第3,896,111號)。隨後，吾人發現某些微生物亦可產生類美登素(諸如美登醇(*maytansinol*)及C-3美登醇酯)(美國專利

第4,151,042號)。合成美登醇及其衍生物及類似物例如揭示於美國專利第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。

類美登素藥物部分在抗體藥物結合物中為吸引人的藥物部分，原因在於：(i)相對易可藉由醃酵或醃酵產物之化學修飾、衍生作用製備；(ii)易於以適合經由非二硫化物連接子結合至抗體的官能基團發生衍生化；(iii)在血漿中穩定；及(iv)有效抗各種腫瘤細胞株。

含有類美登素之免疫結合物、製備其之方法及其治療用途例如揭示於美國專利第5,208,020號、第5,416,064號及歐洲專利EP 0 425 235 B1中，其揭示內容以引用方式特別併入本文中。Liu等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996)描述包含連接至抗人類結腸直腸癌之單株抗體C242之類美登素(命名為DM1)的免疫結合物。結合物經發現對所培養之結腸癌細胞為高度細胞毒性，且在活體內腫瘤生長檢定中展示抗瘤活性。Chari等人，*Cancer Research* 52:127-131 (1992)描述其中類美登素經由二硫化物連接子與結合人類結腸癌細胞株上之抗原之鼠抗體A7結合或與結合HER-2/neu致癌基因之另一種鼠單株抗體TA.1結合的免疫結合物。TA.1-類美登素結合物之細胞毒性係活體外在人類乳癌細胞株SK-BR-3上測試，該細胞株每個細胞表現 3×10^5 個HER-2表面抗原。藥物結合物獲得與自由類美登素藥物類似的細胞毒性度，該細胞毒性度可隨每抗體分子的類美登素分子數目的增加而增加。A7-類美登素結合物在小鼠中展示低的全身性細胞毒性。

抗體-類美登素結合物係藉由使抗體化學連接類美登素分子所製

備，而不會大量減弱抗體或類美登素分子之生物活性。參見，例如，美國專利第5,208,020號(其揭示內容以引用方式特別併入本文中)。每個抗體分子所結合之平均3-4個類美登素分子展示增強靶細胞之細胞毒性的功效，而不會對抗體之功能或溶解性造成不利影響，儘管與使用裸抗體相比，甚至一分子之毒素/抗體有望增強細胞毒性。類美登素熟知於該項技術中，且可藉由已知技術合成或自天然源中分離。適當的類美登素例如揭示於美國專利第5,208,020號中及上文中所參考之其他專利及非專利公開案中。類美登素較佳為美登醇及美登醇分子之芳環中或其他位置處所修飾的美登醇類似物，諸如各種美登醇酯。

該項技術已知之用於製備抗體-類美登素結合物的多種鍵聯基團包括，例如，美國專利第5,208,020號或EP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(2004年10月8日申請)中所揭示的彼等物，該等揭示內容以引用方式特別併入本文中。包含連接子成分SMCC的抗體-類美登素結合物可如美國專利申請案第10/960,602(2004年10月8日申請)中所揭示加以製備。如以上鑑定專利中所揭示，鍵聯基團包括二硫基、硫醚基、酸不穩定基團、光不穩基團、肽酶不穩定基團或酯酶不穩定基團，二硫基及硫醚基較佳。本文中描述且例示了其他鍵聯基團。

抗體與類美登素之結合物可使用各種雙官能蛋白質偶合劑製備，該等偶合劑諸如N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸鹽(SPDP)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺甲基)環己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亞胺硫堊(IT)、亞胺基酯之雙官能衍生物(諸如乙二醯亞胺二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如二琥珀醯亞胺基辛二酸酯)、醛(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)、雙重氮衍生物(諸如雙(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸鹽(諸如甲苯2,6-二異氰酸鹽)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。偶合劑尤其較佳包

括可提供二硫鍵的N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸鹽(SPDP)(Carlsson等人, Biochem. J. 173:723-737 (1978))及N-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基硫基)戊酸鹽(SPP)。

連接子可在各種位置附著於類美登素分子, 此視連接類型而定。舉例而言, 酯鍵可藉由使用習知偶合技術與羥基反應而形成。該反應可發生於具有羥基之C-3位置處、經羥甲基修飾之C-14位置處、經羥基修飾之C-15位置處及具有羥基之C-20位置處。在一較佳實施例中, 該鍵可在美登醇或美登醇類似物之C-3位置處形成。

ii. 奧利斯坦叮及海兔毒素

在有些實施例中, 免疫結合物包含與海兔毒素或海兔毒素肽類似物及衍生物、奧利斯坦叮結合之本發明之抗體(美國專利第5635483號、第5780588號)。海兔毒素及奧利斯坦叮經證明可干擾微管體動力學、GTP水解及核分裂及細胞分裂(Woyke等人(2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45 (12):3580-3584)且具有抗癌活性(US 5663149)及抗真菌活性(Pettit等人(1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)。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)末端附著於抗體(WO 02/088172)。

例示性奧利斯坦叮實施例包括"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US Ser. No.10/983,340(2004年11月5日申請, 其揭示內容以引用方式全文併入特別本文中)中所揭示的N-末端連接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的胺基酸及/或肽片段之間形成肽鍵而製備。該等肽鍵例如可根據肽化學領域中熟知之液相合成方法(參見E. Schröder and K. Lübke, "The Peptides", 第1卷, 第76-136頁, 1965, Academic Press)製備。奧利斯坦叮/海兔毒素藥物部分可根據以下文獻中之方法製備: 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", US Ser. No.10/983,340, 2004年11月5日申請，其以引用方式全文併入本文中(例如，揭示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)。

iii. 刺孢黴素

在其他實施例中，免疫結合物包含結合至一或多個刺孢黴素分子之本發明之抗體。抗生素之刺孢黴素家族能夠產生亞皮莫耳(sub-picomolar)濃度的雙股DNA斷裂。對於刺孢黴素家族之結合物之製備，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、第5,877,296號(全部屬於American Cyanamid Company)。可使用之刺孢黴素之結構類似物包括但不限於： γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙醯基- γ_1^I 、PSAG及 θ_1^I (Hinman等人，Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode等人，Cancer Research 58:2925-2928 (1998)及 American Cyanamid之上述美國專利)。另一種可結合抗體的抗腫瘤藥物為QFA，其為抗葉酸物。刺孢黴素與QFA均具有細胞內作用位點且不易跨越質膜。因此，該等藥劑經由抗體介導內在化之細胞吸收極大增強了其細胞毒性效應。

iv. 其他細胞毒性劑

其他可結合本發明之抗體的抗腫瘤劑包括BCNU；斯曲普托辛(streptozocin)；長春新鹼及5-氟尿嘧啶；美國專利5,053,394、5,770,710中所述、全體已知為LL-E33288複合物之藥劑家族；以及艾

斯帕米辛(esperamicins)(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、葫蘆根毒蛋白A鏈、 α -帚麴菌素、油桐蛋白質、康乃馨蛋白質、美洲商陸蛋白質(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜抑制劑、麻瘋樹毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(*saponaire officinalis*)抑制劑、重組植物毒素、有絲分裂素、侷限麴菌素、酚黴素、伊諾黴素及黴菌毒素。參見，例如，1993年10月28日所公開之WO 93/21232。

本發明此外涵蓋在抗體與具有核酸分解活性之化合物(例如，核糖核酸酶或DNA核酸內切酶，諸如脫氧核糖核酸酶；DNase)之間所形成的免疫結合物。

為選擇性摧毀腫瘤，抗體可包含高放射性原子。製備放射性結合抗體可利用各種放射性同位素。實例包括At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²及Lu之放射性同位素。當結合物係用於偵測時，其可包含用於閃爍造影研究的放射性原子，例如tc^{99m}或I¹²³；或用於核磁共振(NMR)成像(亦稱磁共振成像，mri)之自旋標記物，又諸如碘-123、碘-131、銥-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、釷、錳或鐵。

放射性標記或其他標記可以已知方式併入結合物中。舉例而言，此肽可經生物合成，或可藉由化學胺基酸合成、使用適當的胺基酸前驅物(例如包括氟-19而非氫)合成。諸如tc^{99m}或I¹²³、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸及In¹¹¹之標記可經由肽中之半胱胺酸殘基附著。釷-90可經由離胺酸殘基附著。可使用IODOGEN方法(Fraker等人(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57)併入碘-123。"Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy"(Chatal,CRC Press 1989)詳細地描述其他方法。

可使用各種雙官能蛋白質偶合劑製備抗體與細胞毒性劑之結合

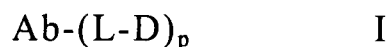
物，該等偶合劑諸如N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸鹽(SPDP)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺甲基)環己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亞胺硫堊(IT)、亞胺基酯之雙官能衍生物(諸如乙二醯亞胺二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如二琥珀醯亞胺基辛二酸酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸鹽(諸如甲苯2,6-二異氰酸鹽)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人，*Science*, 238:1098 (1987)中所述加以製備。碳-14標記之1-異硫氰基苄基-3-甲基二乙烯三胺五乙酸(MX-DTPA)為用於放射性核苷酸與抗體結合的例示性螯合劑。參見WO 94/11026。連接子可為有利於在細胞中釋放細胞毒性藥物的"可分裂連接子"。舉例而言，可使用酸不穩定連接子、肽酶敏感連接子、光不穩定連接子、二甲基連接子或含二硫化物連接子(Chari等人，*Cancer Research* 52:127-131 (1992)；美國專利第5,208,020號)。

本發明之化合物特別涵蓋但不限於經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、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC及磺基-SMPB，及可市購(例如，購自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)之SVSB(琥珀醯亞胺基-(4-乙烯基磺)苯甲酸鹽)。參見2003-2004 Applications Handbook and Catalog第467-498頁。

v. 抗體藥物結合物之製備

在本發明之抗體藥物結合物(ADC)中，抗體(Ab)經由連接子(L)結合至一或多個藥物部分(D)，例如每個抗體約1至約20個藥物部分。式I之ADC可藉由若干途徑、使用熟習該項技術者已知之有機化學反應、條件及試劑製備，包括：(1)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，繼之與藥物部分D反應；及(2)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，繼之與抗體之親核基團反應。本文中描述製備ADC的其他方法。



連接子可由一或多種連接子成分組成。例示性連接子成分包括6-順丁烯二醯亞胺己醯基("MC")、順丁烯二醯亞胺丙醯基("MP")、纈胺酸-瓜胺酸("val-cit")、丙胺酸-苯丙胺酸("ala-phe")、對胺基苄基氧基羰基("PAB")、N-琥珀醯亞胺基4-(2-吡啶基硫基)戊酸鹽("SPP")、N-琥珀醯亞胺基4-(N-順丁烯二醯亞胺甲基)環己烷-1羧酸鹽("SMCC")及N-琥珀醯亞胺基(4-碘基-乙醯基)胺基苯甲酸鹽("SIAB")。其他連接子成分已知於該項技術中且有些描述於本文中。亦參見"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US Ser. No.10/983,340，2004年11月5日申請，其內容以引用方式全文併入本文中。

在有些實施例中，連接子可包含胺基酸殘基。例示性胺基酸連接子成分包括二肽、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)。包含胺基酸連接子成分的胺基酸殘基包括天然存在的彼等物，以及次要的胺基酸及非天然存在的胺基酸類似物，諸如瓜胺酸。胺基酸連接子成分在其對藉由特定酶(例如腫瘤關聯蛋白酶、組織蛋白酶B、C及D或纖溶酶蛋白酶)之酶促分裂之選擇性方面可最優化設計。

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)糖羥基或胺基，其中抗體經糖基化。胺、硫醇及羥基為親核性的且能夠與連接

子部分及連接子試劑上之親電子基團反應以形成共價鍵，連接子部分及連接子試劑包括：(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵甲酸酯及醯基鹵；(ii)烷基鹵及苄基鹵，諸如鹵乙醯胺；(iii)醛基、酮基、羧基及順丁烯二醯亞胺基團。某些抗體具有可還原之鏈間二硫化物，亦即半胱胺酸橋。抗體可藉由以還原劑(諸如DTT(二硫蘇糖醇))處理獲得與連接子試劑結合的反應性。因此各半胱胺酸橋理論上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-亞胺硫堁(Traut試劑)之反應引入抗體，從而使胺轉化成硫醇。反應性硫醇基可藉由引入一、兩、三、四或四個以上的半胱胺酸殘基而引入抗體(或其片段)(例如製備包含一或多個非天然半胱胺酸胺基酸殘基的突變株抗體)。

本發明之抗體藥物結合物亦可藉由修飾抗體以引入親電子部分(其可與連接子試劑或藥物上之親核取代基反應)而製備。糖基化抗體中之糖可例如經過碘酸鹽氧化劑氧化，以形成可與連接子試劑或藥物部分之胺基反應的醛基或酮基。所產生之亞胺希夫鹼(Schiff base)基團可形成穩定的鍵，或例如藉由硼氫化物試劑還原以形成穩定的胺鍵。在一實施例中，糖基化抗體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在能與藥物上之適當基團反應之蛋白質中產生羰基(醛基及酮基)(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 & 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。

同樣，藥物部分上之親核基團包括但不限於能夠與連接子部分及連接子試劑上之親電子基團反應以形成共價鍵的胺、硫醇、羥基、醯肼、肟、肼、硫半卡(thiosemicarbazone)、羧酸肼及芳基醯肼基團，連接子部分及連接子試劑包括：(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、

鹵甲酸酯及醯基鹵；(ii)烷基鹵及苄基鹵，諸如鹵乙醯胺；(iii)醛基、酮基、羧基及順丁烯二醯亞胺基團。

或者，包含抗體及細胞毒性劑之融合蛋白例如可藉由重組技術或肽合成法製備。DNA長度可包含編碼結合物之彼此相鄰或由編碼連接子肽(其不破壞結合物之所要性質)之區域分開之兩部分的各自區域。

在另一實施例中，抗體可結合至用於預靶向腫瘤的"受體"(諸如抗生蛋白鏈菌素)，其中將抗體-受體結合物投與患者，繼之使用廓清劑將未結合之結合物自循環系統中移除，且接著投與結合至細胞毒性劑(例如，放射性核苷酸)的"配體"(例如，抗生物素蛋白)。

醫藥調配物

包含本發明之抗體的治療調配物藉由將具有所要純度之抗體與任選生理學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(Remington: The Science and Practice of Pharmacy第20版(2000))混合、以水溶液、凍乾型或其他乾燥型調配物之形式製備以便儲存。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所使用之劑量及濃度下對受者無毒性，且包括：緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽、組胺酸及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如十八基二甲基苄基氯化銨；氯化六氫季銨(hexamethonium chloride)；氯化苯甲氫銨(benzalkonium chloride)；苄索氯銨(benzethonium chloride)；苯酚；丁醇或苯甲醇；對羥苯甲酸烷基酯，諸如對羥苯甲酸甲酯或對羥苯甲酸丙酯；兒茶酚(catechol)；間苯二酚(resorcinol)；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；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，諸如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、組胺酸、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，諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；鹽形成抗衡離子，諸如鈉離

子；金屬錯合物(例如鋅蛋白質錯合物)；及/或非離子型界面活性劑，諸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

本文中之調配物亦可含有一種以上為所治療之特定適應症所需的活性化合物，較佳具有彼此無不利影響之補充活性的彼等物。該等分子適當地以有效實現預定目標之量組合存在。

該等活性成分亦可例如藉由團聚技術或藉由界面聚合法、分別以膠狀藥物傳遞系統(例如，脂質體、白蛋白微球體、微乳狀液、奈米顆粒及奈米囊)或以巨乳狀液捕集於所製備之微囊中，例如羥甲基纖維素或明膠微囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微囊。該等技術揭示於Remington: The Science and Practice of Pharmacy第20版(2000)中。

用於活體內投藥的調配物必須為無菌的。此易經由無菌過濾膜、藉由過濾完成。

可製備持續釋放型製劑。持續釋放型製劑之適當實例包括含有本發明之免疫球蛋白之固體疏水性聚合物之半透性基質，該等基質為成形物品之形式，例如，膜或微囊。持續釋放型基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如，聚(2-羥基乙基-甲基丙烯酸酯)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-乙醇酸共聚物與亮丙瑞林醋酸鹽組成之可注射微球體))及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。某些水凝膠釋放蛋白質的時期較短，而諸如乙烯-乙酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸之聚合物卻能使分子釋放逾100天。當囊封免疫球蛋白在軀體中長久保持時，其可能因在37℃下、暴露於潮濕而變性或聚集，導致生物活性失去及可能的免疫原性變化。視所涉及之機制而定，可設計出針對穩定性的合理策略。舉例而言，若發現聚集機制為經由硫基-二硫化物互換之分子間S-S鍵形成，則可藉由修飾氫硫基殘基、自酸性溶液凍乾、控制濕含量、使用

適當添加劑及開發特定聚合物基質組合物而獲得穩定性。

用途

本發明之抗體例如可用於活體外、離體及活體內治療方法中。

在一態樣中，本發明提供與EphrinB2之表現及/或活性增強關聯之腫瘤、癌及/或細胞增殖性病症的治療方法，該等方法包含將有效量之抗-EphrinB2抗體投與需要該治療之受檢者。

在一態樣中，本發明提供減少、抑制或預防腫瘤或癌生長的方法，該等方法包含將有效量之抗-EphrinB2抗體投與需要該治療之受檢者。

本發明之抗體亦適用於抑制血管生成。在有些實施例中，血管生成位置為腫瘤或癌。

在一態樣中，本發明提供抑制血管生成的方法，該等方法包含將有效量之抗-EphrinB2抗體投與需要該治療之受檢者。

在一態樣中，本發明提供與血管生成關聯之病理性病狀的治療方法，該等方法包含將有效量之抗-EphrinB2抗體投與需要該治療之受檢者。在有些實施例中，與血管生成關聯之病理性病狀為腫瘤、癌及/或細胞增殖性病症。在有些實施例中，與血管生成關聯之病理性病狀為眼內新生血管疾病。

此外，本發明之抗體中之至少一部分可結合來自其他種之抗原。因此，本發明之抗體可用於例如在含有抗原之細胞培養中、在具有可與本發明之抗體交叉反應之抗原的人類受檢者或在其他哺乳動物受檢者(例如黑猩猩、狒狒、狨猴、食蟹猴及恆河猴、豬或小鼠)中結合特定活性抗原。在一實施例中，本發明之抗體藉由使抗體與抗原接觸以使得抗原活性被抑制而用於抑制抗原活性。抗原較佳為人類蛋白質分子。

在一實施例中，本發明之抗體可用於患與抗原表現及/或活性增

強關聯之病症之受檢者中之抗原的結合方法，該方法包含將本發明之抗體投與受檢者以使得受檢者中之抗原被結合。較佳地，抗原為人類蛋白質分子且受檢者為人類受檢者。或者，受檢者可為表現與本發明之抗體結合之抗原的哺乳動物。此外，受檢者可為(例如藉由抗原之投藥或藉由抗原轉殖基因之表現)已引入抗原的哺乳動物。本發明之抗體可投與人類受檢者用於治療。此外，本發明之抗體可投與用於獸醫學目的或作為人類疾病之動物模型、表現可與免疫球蛋白交叉反應之抗原的非人類哺乳動物(例如靈長類、豬或小鼠)。關於後者，該等動物模型可適用於評價本發明之抗體之治療功效(例如，測試劑量及投藥時間進程)。

本發明之抗體可用於治療、抑制與一或多種抗原分子之表現及/或活性關聯之疾病、病症或病狀，延緩其進行、防止/延緩其復發，改善或預防該等疾病、病症或病狀。

例示性病症包括癌、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病或惡性淋巴樣瘤。該等癌之更具體實例包括：鱗狀細胞癌(例如上皮鱗狀細胞癌)、肺癌(包括小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺之腺癌及肺之鱗狀癌)、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌(包括胃腸癌)、胰腺癌、成膠質細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、尿道癌、肝細胞瘤、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌或子宮癌、唾液腺癌、腎癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌、直腸癌、陰莖癌、黑色素瘤、多發性骨髓瘤及B細胞淋巴瘤、腦癌，以及頭頸癌，及相關癌轉移。在有些實施例中，癌係選自由以下癌組成之群：小細胞肺癌、神經母細胞瘤、黑色素瘤、乳癌、胃癌、結腸直腸癌(CRC)及肝細胞癌。

本發明之抗體亦適用於治療(包括預防)病理涉及細胞變性或功能失調之病症，諸如治療各種(慢性)神經變性病症及急性神經細胞損

傷。該等神經變性病包括(不限於)周圍神經病；運動神經元病症，諸如肌萎縮性側索硬化(ALS, Lou Gehrig氏病)、Bell氏麻痺症及各種涉及脊髓性肌萎縮或麻痺的病狀；及其他人類神經變性疾病，諸如阿茲海默氏病、帕金森氏病、癲癇症、多發性硬化症、慢性遺傳性舞蹈病、Down氏症候群、神經性耳聾及美尼爾氏病；及急性神經細胞損傷，例如由於創傷或脊索損傷。

在某些實施例中，將包含與一或多種細胞毒性劑所結合之抗體的免疫結合物投與患者。在有些實施例中，免疫結合物及/或結合其之抗原係藉由細胞內在化，從而增強免疫結合物殺死結合其之靶細胞的治療功效。在一實施例中，細胞毒性劑靶向或干擾靶細胞中之核酸。在一實施例中，細胞毒性劑靶向或干擾微管體聚合。該等細胞毒性劑之實例包括本文中所述之任一種化學治療劑(諸如類美登素、奧利斯坦叮、海兔毒素或刺孢黴素)、放射性同位素或核糖核酸酶或DNA核酸內切酶。

本發明之抗體在治療中可單獨或者與其他組合物組合使用。舉例而言，本發明之抗體可與另一種抗體、化學治療劑(包括化學治療劑混合物)、其他細胞毒性劑、抗血管生成劑、細胞激素及/或生長抑制劑共投藥。若本發明之抗體抑制腫瘤生長，則尤其需要將其與一或多種亦抑制腫瘤生長之其他治療劑組合。或者，或此外，患者可接受組合照射治療(例如，外光束照射，或經放射性標記劑(諸如抗體)治療)。上述該等組合療法包括組合投藥(其中將兩種或兩種以上的藥劑歸併入同一調配物或單獨調配物中)及分開投藥(此狀況中，本發明之抗體可在輔助治療或治療之投藥之後及/或之後進行投藥)。

組合療法

如以上所指出，本發明提供其中結合另一種治療投與抗-EphrinB2抗體的組合療法。舉例而言，抗-EphrinB2抗體可與抗癌治

療劑或抗新血管生成治療劑組合使用以治療各種贅生性或非贅生性病狀。在一實施例中，該贅生性或非贅生性病症的特徵為與異常或非所要之血管生成關聯的病理性病症。抗-EphrinB2抗體可連續或與有效達成彼等目的之另一藥劑組合、以同一組合物或作為各別組合物投藥。或者，或此外，可投與EphrinB2之多種抑制劑。

抗-EphrinB2抗體之投藥可使用相同或不同的投藥途徑同時(例如，作為單一組合物或作為兩種或兩種以上不同的組合物)進行。或者，或此外，可以任一順序連續進行投藥。在某些實施例中，兩種或兩種以上組合物之投藥間隔期可為數分鐘至數日、至數週至數月。舉例而言，抗癌劑可首先投與，繼之投與EphrinB2抑制劑。然而，亦可考慮同時投藥或首先投與抗-EphrinB2抗體。

與抗-EphrinB2抗體組合投藥之有效量之治療劑由醫師或獸醫裁定。調整投藥劑量以獲得待治療之病狀之最大控制。此外，劑量視諸如待用治療劑之類型及所治療之特定患者之因素而定。適用於抗癌劑之劑量為目前所使用的彼等劑量，且因抗癌劑與抗-EphrinB2抗體之組合作用(協同作用)而可降低。在某些實施例中，抑制劑之組合可強化單一抑制劑之功效。術語"強化"係指治療劑在其普通劑量或批准劑量下功效之改良。

通常，抗-EphrinB2抗體及抗癌劑適用於相同或類似疾病以阻遏或減緩病理性病症，諸如腫瘤生長或癌細胞生長。在一實施例中，抗癌劑為抗血管生成劑。

與癌相關之抗血管生成治療為針對抑制提供營養支持腫瘤生長所需要之腫瘤血管之發展的癌治療策略。由於血管生成涉及原發瘤生長與轉移，因此本發明所提供之抗血管生成治療能夠抑制腫瘤在原發位置處之贅生性生長，以及預防腫瘤在繼發位置處之轉移，從而容許藉由其他治療劑破壞腫瘤。

多種抗血管生成劑已經鑑定且已知於該項技術中，該等抗血管生成劑包括本文中所列舉的彼等物，例如，定義下所列舉的彼等物，及例如，Carmeliet及Jain, *Nature* 407:249-257(2000)；Ferrara等人，*Nature Reviews:Drug Discovery*, 3:391-400 (2004)；及Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003)中所列舉的彼等物。亦參見美國專利申請案US20030055006。在一實施例中，抗-EphrinB2抗體係與抗-VEGF中和抗體(或片段)及/或另一種VEGF拮抗劑或VEGF受體拮抗劑組合使用，包括但不限於，例如，可溶性VEGF受體(例如，VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、neuropillins(例如，NRP1、NRP2))片段、能夠阻斷VEGF或VEGFR之適體、中和抗-VEGFR抗體、VEGFR酪胺酸激酶(RTK)之低分子量抑制劑、VEGF之反義策略、針對VEGF或VEGF受體之核糖酶、VEGF之拮抗劑變體；及其任一組合。或者，或此外，兩種或兩種以上的血管生成抑制劑，以及VEGF拮抗劑及其他藥劑，視需要可共投與患者。在某些實施例中，一或多種其他治療劑(例如，抗癌劑)可與抗-EphrinB2抗體、VEGF拮抗劑及抗血管生成劑組合投藥。

在本發明之某些態樣中，適用於與抗-EphrinB2抗體組合治療腫瘤的治療劑包括其他癌療法(例如，手術、放射性治療(例如，涉及照射或放射性物質投藥))、化學療法、本文中所列舉及該項技術中已知之抗癌劑之治療或其組合)。或者，或此外，本文中所揭示之兩種或兩種以上結合相同或兩種或兩種以上不同抗原的抗體可共投與患者。有時，將一或多種細胞激素投與患者亦為有益。

化學治療劑

在某些態樣中，本發明提供一種藉由將有效量之抗-EphrinB2拮抗劑及/或血管生成抑制劑及一或多種化學治療劑投與易患癌或診斷有癌之患者來阻遏或減緩腫瘤生長或癌細胞生長的方法。各種化學治

療劑可用於本發明之組合治療方法中。可考慮之化學治療劑之例示性及非限制性列表提供於本文中之"定義"項下。

如一般熟習該項技術者應瞭解，適當劑量之化學治療劑通常為已用於臨床治療中的彼等物，其中化學治療劑單獨或與其他化學治療劑組合投藥。視所治療之病狀而定，可能存在劑量變化。施行治療之醫師能確定個別受檢者之適當劑量。

復發性腫瘤生長

本發明亦提供抑制或預防復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長的方法及組合物。復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長係用於描述一種病狀，其中正經歷或經一或多種現行療法(例如癌療法，諸如化學療法、放射療法、手術療法、激素療法及/或生物學療法/免疫療法、抗VEGF抗體療法，尤其對於特定癌之標準治療方案)治療之患者，在臨床上不足以治療該等患者，或該等患者已未自治療中收到任何有益效果，以致該等患者需要其他有效療法。如本文中所使用，該短語亦係指"非響應性/難治性"患者之病狀，例如，其描述了以下患者：雖對治療有反應但遭受副作用之痛苦、產生抗藥性；對治療無反應；對治療的反應不令人滿意，等等。在各種實施例中，癌為復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長，其中癌細胞數目未顯著減少或增多，或腫瘤尺寸未顯著減小或增大，或癌細胞尺寸或數目無任何進一步的減少。藉由該項技術已知之檢定癌細胞治療有效性的任一方法，在該背景中使用"復發性"或"難治性"或"非響應性"之該項技術公認含義，可活體內或活體外測定癌細胞是否為復發性腫瘤生長或為復發性癌細胞生長。對抗-VEGF治療有抗性的腫瘤為復發性腫瘤生長之實例。

本發明提供藉由投與一或多種抗-EphrinB2抗體來阻遏或減緩受檢者之復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長，以阻遏或減緩受檢者之復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長的方法。在某些實施例中，拮抗

劑可在癌治療劑之後投藥。在某些實施例中，抗-EphrinB2抗體與癌治療劑同時投藥。或者，或此外，抗-EphrinB2抗體治療與另一種癌治療交替進行，此可以任一種順序進行。本發明亦涵蓋投與一或多種抑制性抗體以防止經預診患有癌之患者之癌的發作或復發的方法。通常，受檢者過去經歷癌治療或當前經歷癌治療。在一實施例中，癌治療以抗血管生成劑(例如，VEGF拮抗劑)治療。抗血管生成劑包括該項技術中已知的彼等物及本文中定義提供的彼等物。在一實施例中，抗血管生成劑為抗VEGF中和抗體或片段(例如，人源化A4.6.1、AVASTIN®(Genentech, South San Francisco, CA)、Y0317、M4、G6、B20、2C3，等等)。參見，例如，美國專利6,582,959、6,884,879、6,703,020；WO 98/45332；WO 96/30046；WO 94/10202；EP 0666868B1；美國專利申請案20030206899、20030190317、20030203409及20050112126；Popkov等人，Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)；及WO 2005012359。其他藥劑可與VEGF拮抗劑及抗-EphrinB2抗體組合投藥，以便阻遏或減緩復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長，例如，參見本文中之標題為組合治療之部分。

本發明之抗體(及輔助治療劑)可藉由任一適當方式(包括非經腸、皮下、腹膜內、肺內及鼻內)投藥，且若需要局部治療，則為疾病部位內投藥。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，抗體可適當地藉由脈動輸注投藥，尤其輸注下降劑量之抗體。給藥可藉由任一適當途徑，例如藉由注射，諸如靜脈內注射或皮下注射，此部分地視投藥是否為短期或長期而定。

本發明之抗體組合物以符合良好醫療實踐之方式調配、配量及投藥。本上下文中應考慮的因素包括所治療之具體病症、所治療之具體哺乳動物、單個患者之臨床病狀、病症之病因、藥劑傳遞位置、投藥

方法、投藥進度及執業醫師已知的其他因素。抗體不一定而是視需要與一或多種目前所使用之藥劑調配以預防或治療所述病症。該等其他藥劑之有效量視本發明之抗體存在於調配物中的量、病症或治療類型及上述其他因素而定。該等藥劑通常以相同劑量及如上文中所使用之投藥途徑或至今所用劑量之約1%至99%使用。

對於預防或治療疾病，本發明之抗體(當單獨使用或與諸如化學治療劑之其他劑組合使用時)之適當劑量視待治療之疾病類型、抗體類型、疾病嚴重程度及病程、抗體投藥是否為預防性或治療性目的、過去治療、患者臨床史及對抗體之反應及主診醫師之判斷而定。抗體一次性或經一系列治療投與患者適當。無論藉由一或多次分開投藥，或藉由連續輸注，視疾病類型及嚴重程度而定，抗體投與患者的初始候選劑量例如為約1 $\mu\text{g/kg}$ 至15 mg/kg (例如，0.1 mg/kg -10 mg/kg)。一種典型的每日劑量範圍可為約1 $\mu\text{g/kg}$ 至100 mg/kg 或100 mg/kg 以上，此視上述因素而定。對於歷經數天或更長時間的重複投藥，治療視病狀而定，可持續至疾病症狀之所要抑制發生為止。抗體之一例示性劑量的範圍為約0.05 mg/kg 至約10 mg/kg 。因此，可向患者投與約0.5 mg/kg 、2.0 mg/kg 、4.0 mg/kg 或10 mg/kg (或其任一組合)之一或多種劑量。該等劑量可間歇地投與，例如，每週或每三週(例如，以使得患者接受約二至約二十(例如約六)個劑量的抗體)。開始可投與較高負荷的劑量，繼之投與一或多種較低的劑量。例示性給藥方案包含初始投與負荷約4 mg/kg 之劑量、繼之投與約2 mg/kg 之每週維持劑量的抗體。然而，可使用其他給藥方案。此治療之進行易藉由習知技術及檢定監視。

本發明之抗-EphrinB2抗體適用於在特定細胞或組織內偵測EphrinB2表現的檢定中(諸如診斷性檢定或預後性檢定)，其中抗體如下所述被標記且/或固著於不溶性基質上。

在另一態樣中，本發明提供偵測EphrinB2的方法，該等方法包含偵測樣本中之EphrinB2-抗EphrinB2抗體複合物。如本文中所使用之術語"偵測"包括在有或無對照物參考下的定性偵測及/或定量偵測(量測水準)。

在另一態樣中，本發明提供診斷與EphrinB2表現及/或活性關聯之病症的方法，該等方法包含偵測來自患有或疑似患有該病症之患者之生物樣本中的EphrinB2-抗EphrinB2抗體複合物。在有些實施例中，EphrinB2表現為增強型表現或異常(非所要)表現。在有些實施例中，該病症為腫瘤、癌及/或細胞增殖性病變。

在另一態樣中，本發明提供包含本文中所述之任一抗EphrinB2抗體，其中抗EphrinB2抗體包含可偵測標記。

在另一態樣中，本發明提供本文中所述之任一抗EphrinB2抗體與EphrinB2的複合物。在有些實施例中，該複合物係於活體內或活體外。在有些實施例中，該複合物包含癌細胞。在有些實施例中，抗EphrinB2抗體具有可偵測標記。

抗-EphrinB2抗體可用於以諸多任一熟知偵測檢定法偵測EphrinB2。舉例而言，生物樣本可藉由自所要來源獲取樣本、將樣本與抗-EphrinB2混合以使抗體與該混合物中所存在之任一EphrinB2形成抗體/EphrinB2複合物及偵測存在於該混合物中之任何抗體/EphrinB2複合物來檢定EphrinB2。用於檢定的生物樣本可藉由該項技術已知之適於特定樣本之方法製備。樣本與抗體混合之方法及偵測抗體/EphrinB2複合物之方法可根據所用檢定類型選擇。該等檢定包括免疫組織化學、競爭性檢定及夾心檢定及空間阻抑檢定。

EphrinB2之分析方法皆使用以下試劑中之一或多者：標記EphrinB2類似物、固著EphrinB2類似物、標記抗-EphrinB2抗體、固著抗-EphrinB2抗體及空間結合物。標記試劑亦稱作"示蹤劑"。

所用標記為不干擾EphrinB2與抗-EphrinB2抗體結合的任何可偵測功能性。多種標記已知用於免疫檢定，實例包括可直接偵測的部分，諸如螢光染料、化學發光標記及放射性標記；以及須經反應或衍生化以待偵測的部分，諸如酶。該等標記之實例包括：

所用標記為不干擾EphrinB2與抗-EphrinB2抗體結合的任何可偵測功能性。多種標記已知用於免疫檢定，實例包括可直接偵測的部分，諸如螢光染料、化學發光標記及放射性標記；以及須經反應或衍生化以待偵測的部分，諸如酶。該等標記之實例包括：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及其衍生物；若丹明(rhodamine)及其衍生物；丹磺醯(dansyl)；繖酮(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)；螢光素；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；糖氧化酶，例如，葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶；與使用過氧化氫氧化染料前驅物(諸如HRP)之酶偶合的雜環氧化酶，諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶；乳過氧化酶，或微過氧化酶；生物素/抗生物素蛋白；自旋標記；細菌噬菌體標記；穩定性自由基，及類似物。

可利用習知方法使該等標記以共價方式結合至蛋白質或多肽。舉例而言，可使用諸如二醛、碳化二醯亞胺、二順丁烯二醯亞胺、雙醯亞胺酯、雙重氮化聯苯胺及類似物之偶合劑、以上述螢光標記、化學發光標記及酶標記來標記抗體。參見，例如美國專利第3,940,475號(螢光測定)及第3,645,090號(酶)；Hunter等人，*Nature*, **144**: 945 (1962)；David等人，*Biochemistry*, **13**: 1014-1021 (1974)；Pain等人，*J. Immunol. Methods*, **40**: 219-230 (1981)；及Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, **30**: 407-412 (1982)。本文中標記較佳為酶，諸如辣根過氧

化酶及鹼性磷酸酶。該標記(包括該等酶)與抗體之結合為一般熟習免疫檢定技術者的標準操作程序。參見，例如 O'Sullivan 等人，"Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay, "in *Methods in Enzymology*, J.J. Langone及H. Van Vunakis編，第73卷(Academic Press, New York, New York, 1981)，第147-166頁。

某些檢定方法需要固著試劑。固著需要將抗-EphrinB2抗體與保持自由溶解的任何EphrinB2分離。此舉通常藉由在檢定程序之前降低抗-EphrinB2抗體或EphrinB2類似物之可溶性，如吸附至水不溶性基質或表面(Bennich等人，U.S. 3,720,760)、然後共價偶合(例如，使用戊二醛交聯)或例如藉由免疫沉澱法降低抗-EphrinB2抗體或EphrinB2類似物可溶性來實現。

蛋白質在樣本中之表現可使用免疫組織化學法及著色方案檢查。組織切片之免疫組織化學著色經證明為評定或偵測樣本中蛋白質之存在的可靠方法。免疫組織化學("IHC")技術通常藉由發色方法或螢光方法、利用抗體探測且顯現原位細胞抗原。對於樣本製劑，可使用來自哺乳動物(通常人類患者)的組織或細胞樣本。樣本之實例包括但不限於：癌細胞，諸如結腸、乳房、前列腺、卵巢、肺、胃、胰腺、淋巴瘤及白血病的癌細胞。樣本可藉由該項技術中已知的各種程序獲得，該等程序包括但不限於手術切除、抽吸或活組織檢查。該組織可為新鮮的或冷凍的。在一實施例中，樣本係經固定且嵌入石蠟或類似物中。組織樣本可藉由習知方法固定(亦即保持)。一般熟習該項技術者應瞭解固定劑之選擇由如下意圖決定：樣本係待組織著色或另外分析。一般熟習該項技術者亦應瞭解，固定長度視組織樣本之尺寸及所用固定劑而定。

IHC可與其他技術(諸如形態著色及/或螢光原位雜交)組合執行。

可利用IHC之兩種一般方法：直接檢定及間接檢定。根據第一檢定，抗體與靶抗原(例如EphrinB2)之結合係直接測定。此直接檢定使用無需進一步之抗體相互作用而可顯現的標記試劑，諸如螢光標記或酶標記初級抗體。在典型的間接檢定中，未結合之第一抗體結合抗原，且接著所標記之第二抗體結合第一抗體。若第二抗體結合至酶標記，則添加發色底物或螢光底物以提供抗原之顯現。信號擴增發生的原因係若干第二抗體可與第一抗體上之不同抗原決定基反應。

用於免疫組織化學法中的第一抗體及/或第二抗體係以可偵測部分標記。可利用多種標記，該等標記通常分為以下類：

除上述樣本製備程序外，可能需要在IHC之前、期間或IHC之後進一步處理組織切片。舉例而言，可執行抗原決定基修補方法，諸如在檸檬酸鹽緩衝劑中加熱組織樣本(參見，例如，Leong等人，Appl. Immunohistochem. 4 (3):201 (1996))。

繼任選阻斷步驟之後，在適當的條件下將組織切片暴露於第一抗體足夠的時期，以使得第一抗體結合組織樣本中之靶蛋白抗原。完成此舉的適當條件可由常規實驗確定。抗體與樣本結合的程度係利用上述任一種可偵測標記測定。標記較佳為酶標記(例如HRPO)，其可催化發色底物(諸如3,3'-二胺基聯苯胺發色團)之化學修改。酶標記較佳與特定結合第一抗體的抗體結合(例如，第一抗體為兔多株抗體而第二抗體為山羊抗兔抗體)。

由此所製備之樣本可固定且加裝蓋玻片。接著，例如使用顯微鏡測定載片評價值，且可使用該項技術中通常使用的著色強度標準。著色強度標準可評價如下：

表2

著色圖案	得分
細胞中未觀測到著色。	0
超過10%的細胞中偵測到微弱/依稀可辨的著色。	1+
超過10%的細胞中觀測到微弱至中度的著色。	2+
超過10%的細胞中觀測到中度至強烈的著色。	3+

通常，在IHC檢定中約2+或更高的著色圖案分數為診斷性的及/或預後性的。在有些實施例中，約1+或更高的著色圖案分數為診斷性的及/或預後性的。在其他實施例中，約3之較高著色圖案分數為診斷性的及/或預後性的。應瞭解，當利用IHC檢查來自腫瘤或結腸腺瘤之細胞及/或組織時，(與可能存在於樣本中之基質組織或周圍組織相反)著色一般在腫瘤細胞及/或腫瘤組織中測定或評定。

其他檢定方法(已知為競爭性檢定或夾心檢定)已良好建立且廣泛用於商業性診斷行業。

競爭性檢定視示蹤劑EphrinB2類似物與測試樣本EphrinB2競爭有限數目之抗EphrinB2抗體抗原結合位點的能力而定。抗EphrinB2抗體在競爭之前或之後一般降低可溶性，且接著將結合抗EphrinB2抗體之示蹤劑及EphrinB2與未結合之示蹤劑及EphrinB2分離。此分離藉由傾析(其中結合夥伴經預降低可溶性)或離心(其中結合夥伴在競爭反應之後沉澱)來實現。如藉由標記物質之量所量測，測試樣本EphrinB2之量與結合示蹤劑之量成反比。製備EphrinB2之量已知的劑量-反應曲線，且與測試結果比較以定量測定EphrinB2存在於測試樣本中的量。當酶用作可偵測標記時，該等檢定稱作ELISA系統。

另一種競爭性檢定，稱作"同源"檢定，不需要相分離。此處，酶與EphrinB2之結合物經製備及使用以使得當抗EphrinB2抗體結合EphrinB2時，抗EphrinB2抗體之存在可修改酶活性。在此狀況中，EphrinB2或其免疫活性片段經雙官能有機橋結合至酶，諸如過氧化

酶。供抗EphrinB2抗體使用之結合物經選擇以使得抗EphrinB2抗體之結合可抑制或強化標記之酶活性。此方法本身可以EMIT之名稱廣泛施行。

空間結合物係用於同源檢定之空間位阻方法中。該等結合物藉由使低分子量半抗原與小EphrinB2片段共價連接以使得結合半抗原之抗體大體上沒有能力與抗EphrinB2抗體同時結合結合物。在此檢定程序下，存在於測試樣本中的EphrinB2結合抗EphrinB2抗體，從而容許抗半抗原結合結合物，導致結合物半抗原之特性變化，例如，當半抗原為螢光團時螢光之變化。

夾心檢定尤其適用於測定EphrinB2或抗EphrinB2抗體。在連續夾心檢定中，使用固著抗EphrinB2抗體吸附測試樣本EphrinB2，測試樣本藉由洗滌移除，使用結合EphrinB2吸附第二標記抗EphrinB2抗體，且接著自殘餘示蹤劑中分離出結合物質。結合示蹤劑之量與測試樣本EphrinB2成正比。在"同時"夾心檢定中，在添加標記抗EphrinB2之前，不分離測試樣本。利用抗EphrinB2單株抗體作為一種抗體且使用多株抗EphrinB2抗體作為另一種抗體的連續夾心檢定適用於EphrinB2之測試樣本。

上文僅為EphrinB2之例示性偵測檢定。本文之範疇包括目前或今後所開發之其他使用抗EphrinB2抗體測定EphrinB2的方法，包括本文中所述之生物檢定。

製品

在本發明之另一態樣中，提供含有適用於治療、預防及/或診斷上述病症之物質的製品。該製品包含一容器及與該容器關聯之標記或內頁說明。適當的容器例如包括瓶子、小瓶、注射器等。容器可由諸如玻璃或塑料之各種材料形成。容器容納單獨或當與另一種組合物組合時有效治療、預防及/或診斷病狀的組合物，且可具有無菌進入孔

(例如，容器可為靜脈內溶液包或具有可藉由皮下注射針刺透之瓶塞的小瓶)。組合物中至少一種活化劑為本發明之抗體。標記或內頁說明書係指示該組合物用於治療所選病狀，諸如癌。此外，製品可包含(a)內含組合物的第一容器，其中該組合物包含本發明之抗體；及(b)內含組合物的第二容器，其中該組合物包含另一種細胞毒性劑。本發明之實施例中的製品可另外包含內頁說明書，該內頁說明書指示第一與第二抗體組合物可用於治療特定病狀，例如癌。或者，或此外，該製品可另外包含第二(或第三)容器，該容器可包含醫藥學上可接受之緩衝劑，諸如注射用之抑菌水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、Ringer氏溶液及葡萄糖溶液。它另外可包括商業上及使用者所需要的其他物質，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

以下為本發明之方法與組合物之實例。鑒於以上係提供一般性說明，應瞭解亦可實施其他各種實施例。

實例

實例1：產生抗EphrinB2抗體

產生可獲得所研究之抗體的噬菌體呈現文庫的各種方法已知於該項技術中。合成性噬菌體抗體文庫藉由在重鏈及輕鏈之互補確定區(CDR)內引入多樣化而建立於單框架上(人源化抗ErbB2抗體，4D5)(Lee, C. V.等人，J Mol Biol 340, 1073-93 (2004); Liang, W. C.等人，J Biol Chem 281, 951-61 (2006))。對固著於maxisorp免疫孔板上之His標記人類EphrinB2執行天然文庫之孔板海選。四輪增殖之後，隨機選出純系，且使用噬菌體ELISA鑑別特定接合物。所得hEphrinB2結合純系進一步以His標記鼠EphrinB2蛋白篩選以鑑別交叉種純系。純系19可有利地以該等檢定執行，且可選用於其他特徵鑑定。對於各種陽性噬菌體純系，可將重鏈及輕鏈之可變區次選殖入經設計以表現全長IgG鏈的pRK表現載體。將重鏈及輕鏈結構共轉染入

293細胞或CHO細胞，且使用蛋白質A親和柱自無血清培養基中純化所表現之抗體。純化抗體藉由ELISA測試對EphrinB2與EphB受體之間相互作用之阻斷，藉由FACS測試與表現全長人類EphrinB2或鼠EphrinB2之穩定細胞株的結合。對於親和力成熟，藉由軟隨機化策略建構具有CDR環之三種不同組合(CDR-L3、CDR-H1及CDR-H2)、來源於所研究之初始純系的噬菌體文庫，以使得各所選位置突變為非野生型殘基或以約50:50出現率作為野生型維持 (Liang等人，2006，同上)。接著以進行性增加之嚴格度經由四輪抗人類與鼠His標記EphrinB2蛋白質之液相淘選來鑑別高親和力純系。所選純系藉由噬菌體ELISA篩選且接著表現為Fab蛋白質且其親和力係使用Biacore測定。親本純系19及親和力成熟純系之HVR區之序列展示於表1中。

實例2：抗EphrinB2抗體之特徵鑑定

為測定小鼠抗ephrinB2 Mab之結合親和力，使用BIAcore-3000™之表面電漿共振(SRP)量測(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)。簡而言之，根據供應商說明書將羧基甲基化葡聚糖生物感測器晶片(CM5, BIAcore Inc.)以N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二醯亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基琥珀醯亞胺(NHS)激活。將抗EphrinB2抗體用10 mM乙酸鈉(pH 4.8)稀釋成5 µg/ml，再以5 µl/min之流速注射，以獲得約500個響應單元(RU)之偶合抗體。緊接著，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應之基團。對於動力學量測，在25°C下，以25 µl/min之流速注射經具有0.05% Tween 20之PBS兩倍連續稀釋之人類或鼠EphrinB2-His分子(0.7 nM至500 nM)。締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})係使用簡單的一比一朗繆爾(Langmuir)結合模型(BIAcore評價軟體版3.2)計算。平衡解離常數(K_d)以比率 k_{off}/k_{on} 計算。此實驗之結果展示於表3中。"NA"表示未進行量測。

表3：抗EphrinB2抗體結合人類及小鼠EphrinB2之結合親和力及

動力學

抗EphrinB2 抗體	鼠抗原			人類抗原		
	kon/10 ⁵	koff/10 ⁻⁴	Kd(nM)	kon/10 ⁵	koff/10 ⁻⁴	Kd(nM)
YW31.19	20.7	4.77	0.23	2.44	12.7	5.2
YW31.19.1D8	94.3	1.65	0.017	11.2	0.76	0.07
YW31.19.2D3	40.2	0.61	0.015	5.69	0.43	0.08

實例3：在基於細胞之檢定中以抗EphrinB2抗體處理可阻斷EphB4信號傳導

為證明抗EphrinB2抗體阻斷膜結合EphrinB2與EphB4之相互作用的能力，吾人執行基於細胞之檢定，其中EphB4及EphrinB2以不同細胞類型展現。使用過度表現人類EphrinB2之3T3細胞刺激不僅表現高含量之EphB4而且表現低含量之EphrinB2的HUVEC細胞，且測試抗EphB4抗體抑制EphB4活化的能力。

過度表現人類EphrinB2之3T3細胞如下加以製備：將人類全長EphrinB2選殖入pcDNA5/FRT載體(Invitrogen)且隨後用於根據製造商手冊以3T3.Flp細胞(Invitrogen)產生穩定細胞株。

在有或無抗EphB4抗體存在下，將過度表現人類EphrinB2之3T3細胞在HUVEC細胞上疊加15或30分鐘。EphB4受體之活化藉由免疫沉澱EphB4蛋白質評定，接著使用抗磷酸基酪胺酸抗體(抗體4G10；Upstate)、使用西方墨點法偵測EphB4受體酪胺酸磷酸化作用之存在與否。簡而言之，將細胞以RIPA緩衝劑溶解。細胞溶解產物藉由離心作用澄清，且以5微克/樣本添加抗EphB4抗體35.2D8。在4°C培育兩小時之後，使用蛋白質A瓊脂糖拆分免疫複合物。使用1 µg/ml濃度之抗磷酸基酪胺酸抗體4G10(Upstate)、藉由西方墨點法分析EphB4磷酸化作用。

此實驗之結果展示於圖7中。3T3細胞疊加於HUVEC細胞上產生EphB4之顯著的酪胺酸磷酸化作用(泳道2)。將具有抗EphB4抗體(5

μg/ml之純系19.2D3)之HUVEC進行30分鐘預培育，有效地消除了藉由疊加3T3-EphrinB2細胞所誘發的EphB4酪胺酸磷酸化作用(泳道3)。相比之下，未處理之HUVEC細胞未證明EphB4活化(泳道1)且未處理之3T3- ephrinB2細胞未證明EphB4活化(泳道4)。該等結果證實，以抗EphrinB2抗體處理在直接細胞-細胞接觸之背景中可阻斷EphrinB2配位體-EphB4受體相互作用。

實例4：在大鼠角膜囊檢定中以抗EphrinB2抗體處理可抑制血管生成

單株抗EphrinB2抗體之抗活性在大鼠角膜囊檢定中測試。簡而言之，使用異氟烷及低劑量可注射麻醉劑將Harlan Sprague-Dawley大鼠麻醉。眼睛輕微前垂且使用非創傷鑷子適當緊固。用15號刀片，靠近角膜中心完成1.5 mm切割。使用微抹刀，經由靠近眼睛外眥之基質謹慎地將切痕無峰剖開。將含有生長因子(200 ng VEGF)、甲基纖維素及硫糖鋁(aluminum sucrafate)之吸水性丙烯酸聚合物顆粒插入角膜囊基質中。抗ephrinB2抗體純系19.2D3(10微克/顆粒)若添加，則歸併入顆粒中。手術之後，將眼睛塗上正大黴素(gentamicin)軟膏。6天後，給動物注射高分子量螢光素異硫氰酸鹽-葡聚糖且實施安樂死以便目測脈管系統。整裝角膜係由所摘出之眼睛製成，且使用電腦輔助影像分析(Image-Pro Plus)進行新脈管面積之量測。

此實驗之結果展示於圖8中。以抗EphrinB2抗體處理顯著減少VEGF誘導之新血管生成，證明抗ephrinB2抗體在此模型中具有抗血管生成活性。對照處理(缺VEGF)展示有限的新血管生成，而VEGF處理之陽性對照展示顯著的新血管生成。

實例5：在小鼠背房室檢定中以抗EphrinB2抗體處理可抑制血管生成

單株抗EphrinB2抗體之抗血管生成活性在小鼠背房室檢定中測

試。用於背視窗室檢定中之程序及技藝基本上如 Papernfuss, D. *Microvascs. Res.*, 18:311-318, 1979及 Shan, S. *Clinical Cancer Research*, 7:2590-2596, 2001中所述來執行。簡而言之，沿背部標記解剖中點線，且以4-0絲縫線將C形卡子縫合入位。使用具有滅菌標記之模板(等於房室圈之外徑)描繪出概括切痕輪廓之圓形。追蹤輪廓之周界進行環切，繼之藉由十字形解剖刀進一步超越肌膜循至真皮。接著以一對精細鑷與虹膜剪整理且修剪表面。將全部不過兩層之肌膜層自皮膚褶之單側移除；該等層保持完整的脈管系統。接著移除C形卡子。將中央具有視窗框之房室插入皮膚褶中且以4-0絲縫線固定就位。將腫瘤細胞注射入視窗中之肌膜內。將視窗以玻璃蓋片密封。在縫合線及切痕創口上塗履新孢素(neosporin)抗生素之薄層以預防傳染。在解剖立體顯微鏡下觀察動物以證明房室內之循環。容許動物在循環加熱毯上恢復直至其自麻醉中完全恢復為止，且最後放回至其微隔離籠中之其房間。抗體(抗EphrinB2抗體純系19.2D3及抗小鼠VEGF抗體G6)以10 mg/kg給藥兩次，一劑量在細胞注射時給藥，且第二劑量藉由在第三天直接注射入房室內給藥。腫瘤面積及腫瘤脈管系統係使用Image-Pro計算。

抗EphrinB2抗體顯著減少新血管生成，證明抗ephrinB2抗體在此模型中具有抗血管生成活性。以陽性對照物抗小鼠VEGF抗體處理展示新血管生成如所預計顯著減少。相比之下，未處理對照展示大範圍的新血管生成。

實例6：以抗Ephrin B2抗體處理可活體內抑制腫瘤生長

為測定抗EphrinB2抗體活體內抑制腫瘤生長的能力，如下以腫瘤異種圖(xenograph)模型測試抗EphrinB2抗體。簡而言之，依照實驗動物養護及使用指導供養米色裸鼠(Charles River Laboratories, Hollister, CA)。將A673人類橫紋肌肉瘤細胞懸浮在無血清培養基中，且與等量

的matrigel混合。為建立皮下腫瘤異種移植，將 5×10^6 細胞注射入6-8週齡雌性小鼠之右側。細胞接種後24小時，以0.2 ml抗體、以10 mg/kg體重之劑量對動物腹膜內給藥每週兩次。腫瘤生長藉由卡規量測來定量。腫瘤體積(mm^3)藉由量測長度(l)及寬度(w)且計算體積($V=lw^2/2$)來測定。每組十隻動物每週兩次接受PBS、10 mg/kg體重之抗EphrinB2抗體純系19.2D3或10 mg/kg體重之抗小鼠VEGF(B6)(圖9中以箭頭表示)。

此實驗之結果展示於圖9中。以抗EphrinB2抗體處理減少了平均腫瘤體積，證明以抗EphrinB2抗體處理可活體內抑制腫瘤生長。平均腫瘤體積以SE表示。

儘管上述本發明為清晰理解起見已較詳細地經由說明及實例加以描述，但該等說明及實例不應理解為限制本發明之範圍。

序列表

<110> 美商建南德克公司
<120> 抗-EPHRINB2 抗體及使用該抗體的方法
<130> P2299R1

<140> 096102168
<141> 2007-01-19

<150> US 60/760,891
<151> 2006-01-20

<160> 53

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> HVR-H1

<400> 1
Gly Phe Thr Ile Thr Gly Ser Trp Ile His
 5 10

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> HVR-H1

<400> 2
Gly Phe Thr Val Ser Ser Gly Trp Ile His
 5 10

<210> 3
<211> 18
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> HVR-H2

<400> 3
Ala Val Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15
Val Lys Gly

<210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> HVR-H2

<400> 4
Ala Val Ile Phe His Asn Lys Gly Gly Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15
Val Lys Gly

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> HVR-H3

<400> 5
Ala Arg Thr Ser Ala Trp Ala Gln Leu Gly Ala Met Asp Tyr
5 10

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> HVR-L1

<400> 6
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
5 10

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> HVR-L1

<400> 7
Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Ser Ser Leu Ala
5 10

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> HVR-L2

<400> 8
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
5

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> HVR-L2

<400> 9
Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> HVR-L3

<400> 10
Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> HVR-L3

<400> 11
Gln Gln Ser Asp Asp Asn Pro Phe Thr



<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> HVR-L3

<400> 12
Glu Gln Thr Asp Ser Thr Pro Pro Thr
5

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> huMab4D5-8之輕鏈可變域

<400> 13
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 Asn
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 Arg 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
His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys

<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 14
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

<210> 15

<211> 23

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 15

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

20

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 16

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

1 5 10 15

<210> 17

<211> 32

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 17

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Cys

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 18

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

5 10

<210> 19

<211> 87

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 19

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

1 5 10 15

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



20	25	30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly	Leu Glu Trp Met Gly Arg	
35	40	45
Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr	Ser Thr Ala Tyr Met Glu	
50	55	60
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	
65	70	75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr	Val Ser Ser	
80	85	

<210> 20
<211> 81
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 20
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 21
<211> 80
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 21
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75
Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 22
<211> 79
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 22
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75
Thr Val Ser Ser

<210> 23
<211> 87
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 23
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg
35 40 45
Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
50 55 60
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 24
<211> 81
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 24
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 25

<211> 80
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 25
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75
Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 26
<211> 79
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 26
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75
Thr Val Ser Ser

<210> 27
<211> 87
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 27
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 Thr Phe Ser
20 25 30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
35 40 45
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
50 55 60
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

657075

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

8085

<210> 28<211> 81<212> PRT<213> 人造序列

<220><223> 序列係經合成

<400> 28Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly1511015Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala202530Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp354045Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala505560Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr657075Leu Val Thr Val Ser Ser80

<210> 29<211> 80<212> PRT<213> 人造序列

<220><223> 序列係經合成

<400> 29Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly11511015Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala202530Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp354045Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala505560Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu657075Val Thr Val Ser Ser80

<210> 30<211> 79<212> PRT<213> 人造序列

<220><223> 序列係經合成

<400> 30Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly11511015Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala202530Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

35 40 45
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75
Thr Val Ser Ser

<210> 31
<211> 87
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 31
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 Asn Ile Lys
20 25 30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
35 40 45
Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
50 55 60
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 32
<211> 81
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 32
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 Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 33
<211> 80
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 33
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 Trp Val Arg Gln Ala	20	25	30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp	35	40	45
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala	50	55	60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu	65	70	75
Val Thr Val Ser Ser	80		

<210> 34
<211> 87
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 34			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly	1	5	10
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys	20	25	30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg	35	40	45
Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln	50	55	60
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	65	70	75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	80	85	

<210> 35
<211> 81
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 35			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly	1	5	10
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala	20	25	30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp	35	40	45
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala	50	55	60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr	65	70	75
Leu Val Thr Val Ser Ser	80		

<210> 36
<211> 80
<212> PRT
<213>人造序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 36

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 Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
 35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
 80

<210> 37

<211> 79

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 37

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 Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
 35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 38

<211> 80

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 38

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 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 20 25 30

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 50 55 60

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
 65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys

80

<210> 39
<211> 80
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 39
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
1 5 10 15
Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
50 55 60
Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 40
<211> 80
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 40
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15
Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
50 55 60
Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 41
<211> 80
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 41
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15
Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

50

55

60

Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr

657075

Lys Val Glu Ile Lys

80

<210> 42

<211> 25

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 42

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

151015

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

2025

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 43

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

510

<210> 44

<211> 30

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 44

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

151015

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

202530

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 45

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

510

<210> 46

<211> 32

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 46

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

151015

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

20

25

30

Tyr Cys

<210> 47

<211> 30

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 48

<211> 108

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 48

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> 49

<211> 118

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 49

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 Thr Ile Thr

20 25 30

Gly Ser Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35 40 45

Glu Trp Val Ala Val Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Ala Thr Asp 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 Thr Ser	Ala Trp Ala Gln Leu
95	100	105
Gly Ala Met Asp Tyr	Trp Gly Gln Gly Thr	Leu Val Thr
110	115	

<210> 50
<211> 108
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 50
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 Asp
20 25 30
Ser Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu 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 Asp Asp Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg

<210> 51
<211> 118
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 51
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 Thr Ile Thr
20 25 30
Gly Ser Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Ala Val Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Ala Thr Asp 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 Thr Ser Ala Trp Ala Gln Leu
95 100 105
Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

110 115

<210> 52
<211> 108
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 52
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 Glu Gln
80 85 90
Thr Asp Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg

<210> 53
<211> 118
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列係經合成

<400> 53
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 Thr Val Ser
20 25 30
Ser Gly Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Ala Val Ile Phe His Asn Lys Gly Gly Thr Asp 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 Thr Ser Ala Trp Ala Gln Leu
95 100 105
Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
110 115

申請專利範圍

1. 一種抗EphrinB2 (EphB2)抗體之用途，其係用於製備降低、抑制及/或阻斷EphB2活性之藥物，其中該抗體係選自由以下所組成之群：
 - (a) 一抗體，其包含HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3，其中各依序為SEQ ID NO:6、8、10、1、3、5；
 - (b) 一抗體，其包含HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3，其中各依序為SEQ ID NO:7、9、11、1、3、5；及
 - (c) 一抗體，其包含HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3，其中各依序為SEQ ID NO:6、8、12、2、4、5。
2. 如請求項1之用途，其中該藥物降低、抑制及/或阻斷EphB2自體磷酸化作用。
3. 如請求項1之用途，其中該藥物中之抗體競爭結合EphB2配體。
4. 如請求項1之用途，其中該藥物中之抗體以約30 pm或更強之解離常數(Kd)結合EphB2配體。
5. 如請求項1之用途，其中該藥物中之抗體中斷或阻斷配體結合至EphB2。
6. 如請求項1之用途，其中該藥物中之抗體降低EphB2酪胺酸磷酸化。
7. 一種抗EphB2抗體的抗體片段，其中該抗EphB2抗體係選自由以下所組成之群：
 - (a) 一抗體，其包含HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、

- HVR-H2及HVR-H3，其中各依序為SEQ ID NO:6、8、10、1、3、5；
- (b) 一抗體，其包含HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3，其中各依序為SEQ ID NO:7、9、11、1、3、5；
- (c) 一抗體，其包含HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3，其中各依序為SEQ ID NO:6、8、12、2、4、5。
8. 如請求項7之抗體片段，其中該片段為Fab、Fab'、F(ab')₂、或Fv片段。
9. 一種多核苷酸，其編碼如請求項7或8之抗體片段。
10. 一種載體，其包含如請求項9之多核苷酸。
11. 如請求項10之載體，其中該載體為表現載體。
12. 一種宿主細胞，其包含如請求項10或11之載體。
13. 如請求項12之宿主細胞，其中該宿主細胞為原核者。
14. 如請求項12之宿主細胞，其中該宿主細胞為真核者。
15. 如請求項14之宿主細胞，其中該宿主細胞為哺乳動物者。
16. 一種製備抗EphB2抗體片段的方法，該方法包含(a)在適當的宿主細胞中表現如請求項10或11之載體，及(b)製備該抗體片段。
17. 如請求項16之方法，其進一步包含(c)回收該抗體。
18. 一種有效量之如請求項7或8之抗體片段之用途，其係用於製備抑制有需要之個體中血管生成的藥物。
19. 如請求項18之用途，其中該藥物係與抗血管生成劑組合使用。
20. 如請求項19之用途，其中該抗血管生成劑係在該抗EphB2抗體片段投藥之前或之後投藥。
21. 如請求項19之用途，其中該抗血管生成劑係與該抗EphB2抗體片

段同時投藥。

22. 如請求項18至21中任一項之用途，其中該抗血管生成劑為血管內皮細胞生長因子(VEGF)之拮抗劑。
23. 如請求項22之用途，其中該VEGF拮抗劑為抗VEGF抗體。
24. 如請求項23之用途，其中該抗VEGF抗體為貝伐單抗(bevacizumab)。
25. 如請求項18之用途，其中該藥物係與有效量之化學治療劑組合使用。
26. 如請求項18至21中任一項之用途，其中該抗EphB2抗體片段係與可偵測標記或細胞毒性劑結合。
27. 如請求項18至21中任一項之用途，其中該個體係經診斷罹患癌、腫瘤及/或細胞增殖性病症。
28. 一種如請求項7或8之抗體片段之用途，其係用於製備偵測EphB2之製品或套組，該偵測包含偵測生物樣本中的EphB2-抗EphB2抗體片段複合物。
29. 如請求項28之用途，其中該抗EphB2抗體片段係加有可偵測標記。
30. 如請求項28或29之用途，其中該生物樣本係來自罹患癌、腫瘤及/或細胞增殖性病症之個體。

圖式

純系 #	H1									
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
31.19	G	F	T	I	T	G	S	W	I	H
A31.19.1D8	G	F	T	I	T	G	S	W	I	H
A1.19.2D3	G	F	T	V	S	S	G	W	I	H

純系 #	H2																	
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
31.19	A	V	I	Y	P	N	N	G	A	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
31.19.1D8	A	V	I	Y	P	N	N	G	A	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
31.19.2D3	A	V	I	F	H	N	K	G	G	T	D	Y	A	D	S	V	K	G

純系 #	H3													
	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	101	102
31.19	A	R	T	S	A	W	A	Q	L	G	A	M	D	Y
31.19.1D8	A	R	T	S	A	W	A	Q	L	G	A	M	D	Y
31.19.2D3	A	R	T	S	A	W	A	Q	L	G	A	M	D	Y

純系 #	L1										
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
31.19	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
31.19.1D8	R	A	S	Q	D	V	D	S	S	L	A
31.19.2D3	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A

純系 #	L2						
	50	51	52	53	54	55	56
31.19	S	A	S	F	L	Y	S
31.19.1D8	A	A	S	N	L	E	S
31.19.2D3	S	A	S	F	L	Y	S

純系 #	L3								
	89	90	91	92	93	94	95	96	97
31.19	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
31.19.1D8	Q	Q	S	D	D	N	P	F	T
31.19.2D3	E	Q	T	D	S	T	P	P	T

圖1

I	A	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYTFT	-H1-	WVRQAPGQGLEWMG	-H2-
	B	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
	C	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
	D	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
II	A	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLTCTVSGGSVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-
	B	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
	C	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
	D	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
III	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
受體					
第二受體	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
第三受體	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-

圖2A

圖 2B

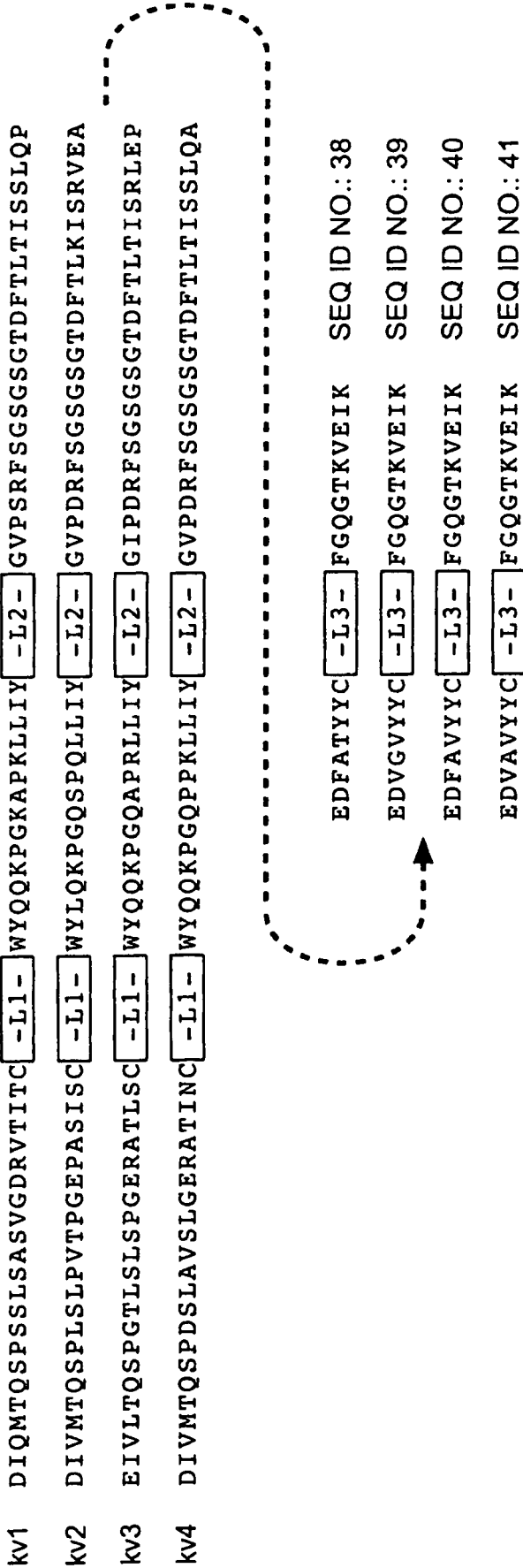


圖3

huMAb4D5-8輕鏈之框架序列

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 15)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEQ ID NO: 16)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEQ ID NO: 17)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 18)

huMAb4D5-8重鏈之框架序列

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 42)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEQ ID NO: 43)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹²
(SEQ ID NO: 44)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 45)

圖4

在位置66處經修飾之huMAb4D5-8輕鏈之框架序列（下劃線）

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 15)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEQ ID NO: 16)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEQ ID NO: 46)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 18)

在位置71、73及78處經修飾之huMAb4D5-8重鏈之框架序列（下劃線）

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 42)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEQ ID NO: 43)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys⁹² (SEQ ID NO: 47)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 45)

圖5

31.19
VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTITGSIHWVRQAPGKGLEWVAVIYPNNGATDYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARTSAWAQLGAMDYWGQGLVT

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYTTPPTFGQGTKVEIKR

31.19.1D8
VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTITGSIHWVRQAPGKGLEWVAVIYPNNGATDYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARTSAWAQLGAMDYWGQGLVT

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVDSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGS
SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSDNPPTFGQGTKVEIKR

31.19.2D3
VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSGSIHWVRQAPGKGLEWVAVIFHNKGGTDYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARTSAWAQLGAMDYWGQGLVT

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCEQTDSTPPTFGQGTKVEIKR

圖6

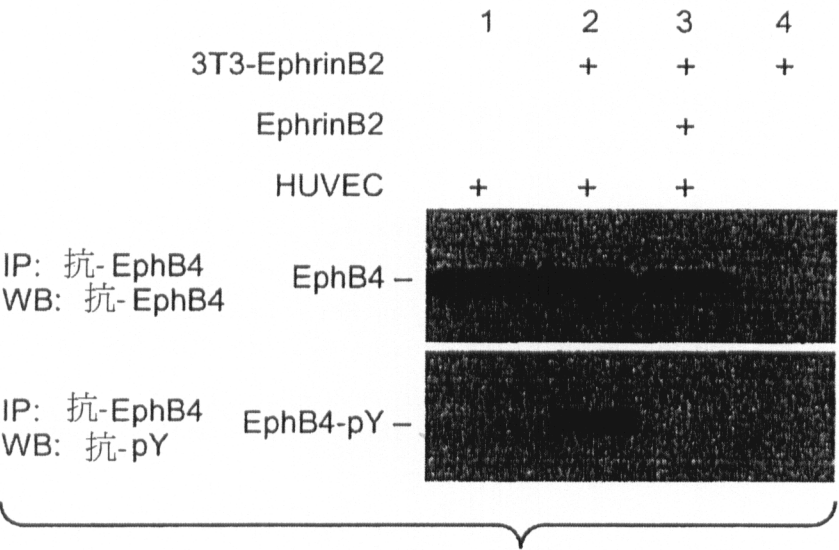


圖7

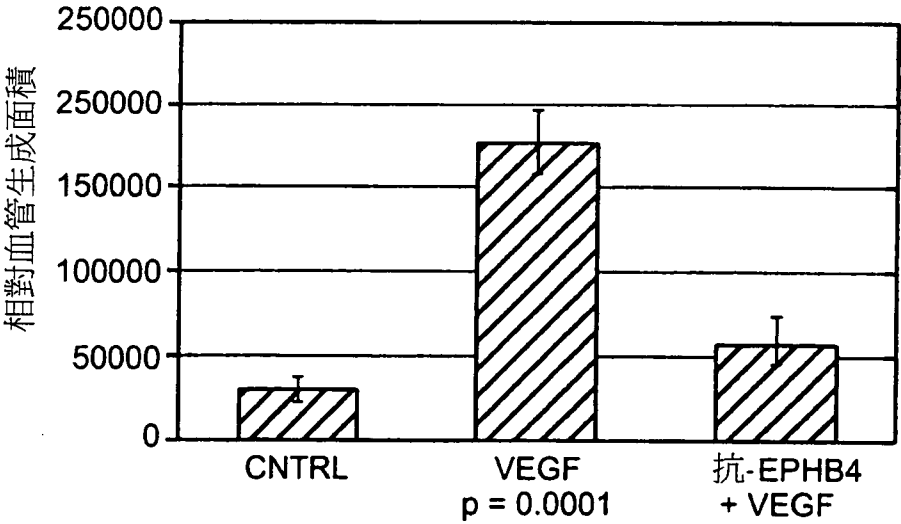


圖8

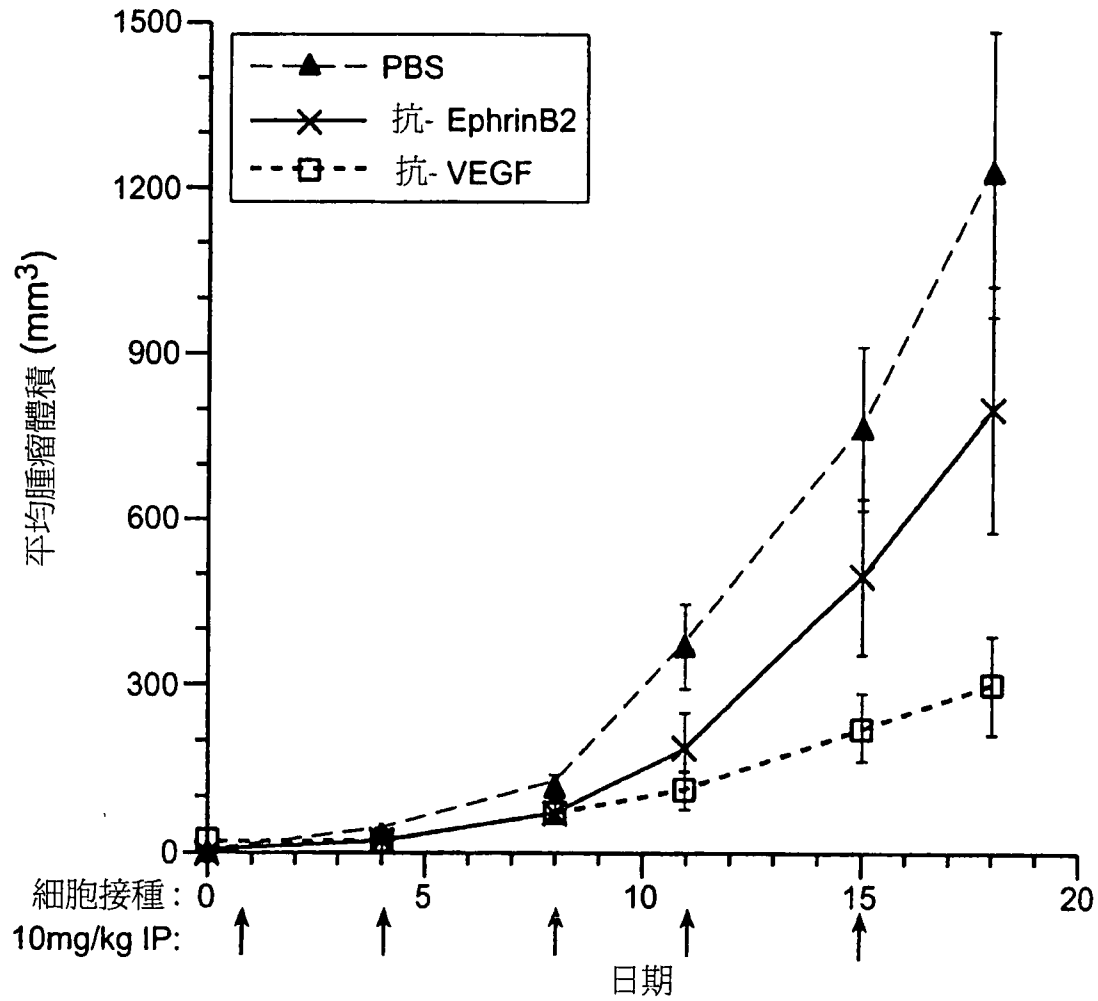


圖9