



(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 201736399 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：105143894

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 12 月 29 日

(51)Int. Cl. : C07K16/22 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

G01N33/53 (2006.01)

(30)優先權：2015/12/31 美國

62/273,515

(71)申請人：財團法人生物技術開發中心 (中華民國) DEVELOPMENT CENTER FOR BIOTECHNOLOGY (TW)

新北市汐止區康寧街 169 巷 101 號

(72)發明人：賴建勳 LAI, JIANN-SHIUN (TW)；艾麗霜 AI, LI-SHUANG (TW)；賴彥達 LAI, YAN-DA (TW)；吳彥宥 WU, YEN-YU (TW)；蔡宜珊 TSAI, YI-SAN (TW)；蔡宜珏 TSAI, YI-JIUE (TW)；黃若羽 HUANG, JUO-YU (TW)；游成州 YU, CHENG-CHOU (TW)；徐銓龍 HSU, CHUAN-LUNG (TW)；官建村 KUAN, CHIEN-TSUN (TW)；賴思良 LAI, SZU-LIANG (TW)；王麗雅 WANG, LI-YA (TW)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：17 共 82 頁

(54)名稱

抗 VEGFR 抗體及其應用

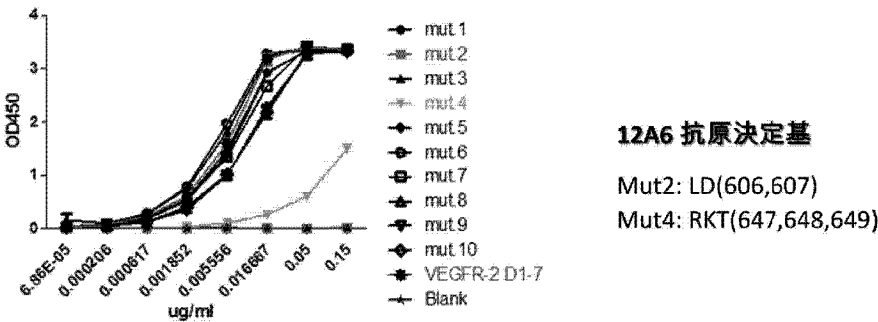
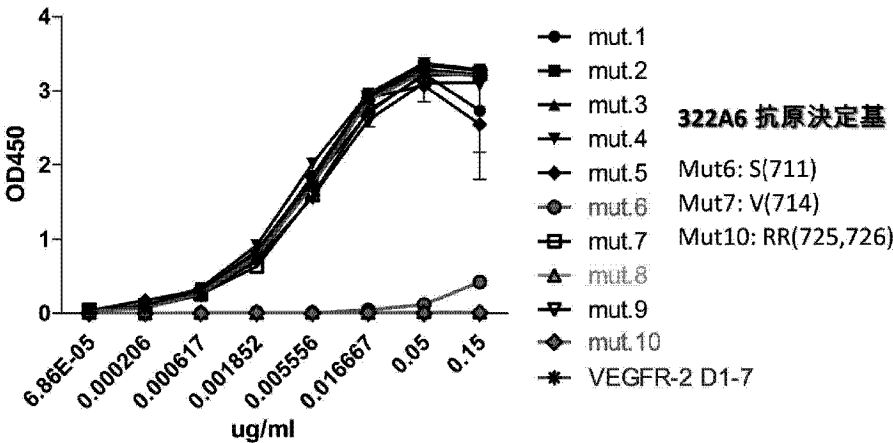
ANTI-VEGFR ANTIBODY AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明關於一種抗體或其抗原結合片段，其與人類第二型血管內皮生長因子受體（vascular endothelial growth factor receptor 2，VEGFR-2）結合。本發明亦關於一種於一需要個體中抑制 VEGFR-2 調控之訊息傳遞的方法、一種治療患有由 VEGFR-2 之活性及／或訊息傳遞所導致或與其相關聯疾病及／或失調之個體之方法、一種治療患有腫瘤之個體之方法、一種於一需要個體中抑制內皮細胞之細胞增生的方法及一種偵測一樣品中之人類第二型血管內皮生長因子受體的方法。

The present invention relates to an antibody or antigen-binding fragment thereof that bind human vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2). The present invention also relates to a method for inhibiting VEGFR-2-mediated signaling in a subject in need, a method for treating diseases and/or disorders caused by or related to VEGFR-2 activity and/or signaling in a subject afflicted with the diseases and disorders, a method for treating tumor in a subject afflicted with the tumor, a method for inhibiting cell proliferation of endothelial cells in a subject in need, and a method for detecting human vascular endothelial growth factor receptor in a sample.

指定代表圖：



結構域 6 (551-660):

PEITLQPD^{Mut1}MQ-PTEQESVSLWCTADRSTFENLTWYKLGPQPLPIHV^{Mut2}GELPT

PVCK(604)NLD(606.607)TLWKL^{Mut3}NATMFSNSTNDILIMELKNASLQDQGD

YVCLAQ(645)DRKT(647.648.649)KK(651)RHC^{Mut4}VVRQLT

Mut5

結構域 7 (667-753)

PTITGNLENQTTSIGESIEV^{Mut6}SCTASGNPPPQIMW

FKDNETLVEDS(711)GIV(714)LKD(716.717)G^{Mut7}NRN(720.721)LTIRR(725.726

)VRKEDEGLYTCQACSVLGCAKVEAFFI

Mut8 Mut9 Mut10

【圖 4】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗人類血管內皮生長因子受體之抗體及其應用

【英文發明名稱】

ANTI-VEGFR ANTIBODY AND USES THEREOF

【技術領域】

[0001] 本發明係關於一種抗體或其抗原結合片段及其應用，該抗體或其抗原結合片段針對人類血管內皮生長因子受體（VEGFR）具特異性。

【先前技術】

[0002] 血管內皮生長因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）之訊息傳遞路徑的功能即是促進血管新生，血管新生係指由原有血管形成新的微血管。血管新生的調控異常和許多疾病的致病機轉有關，同時也是多種癌症的一個特徵。參與此訊息傳遞最主要的即是血管內皮生長因子家族的蛋白質及其受體，此路徑的活化會引發複雜的訊息傳遞網絡，促進血管內皮細胞的生長、移動和存活。此訊息傳遞路徑被認為與腫瘤血管新生有密切關連，因此抑制血管內皮生長因子訊息路徑為腫瘤血管新生的重要調控點。

[0003] 血管內皮生長因子包括一群序列高度保守的同源（homologous）雙體醣蛋白（dimeric glycoprotein），以雙硫鍵連結二條分子量各為24 kDa的單鏈分子後才具有生物活性。目前已知的血管內皮生長因子家族成員有VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D與胎盤生長因子（placenta growth factor，PlGF），其中VEGF-A最早被發現且研究最為透徹，其在血管新生中扮演關鍵性的角色。

[0004] 當血管內皮生長因子與血管內皮生長因子受體（VEGF receptor，VEGFR）結合時，血管內皮生長因子受體會形成雙體，並互相磷酸化。血管內皮生長因子受體的細胞外結構域共有七個似免疫球蛋白結構域（Ig-like domains），大致來說，第一至第三結構域負責受體與配體的結合，而第四至第七結構域則負責受體間雙體化，並導致磷酸化及下游的訊息傳遞。

[0005] 血管內皮生長因子受體屬於酪胺酸激酶（tyrosine kinase，TK）家族的成員之一，在細胞訊息傳遞過程中扮演極重要的角色，可以將細胞外誘導細胞生長、繁殖、以及抗凋亡的訊號傳遞到細胞內。血管內皮生長因子受體分為三類，分別為VEGFR-1（或稱flt-1）、VEGFR-2（或稱KDR/flk-1）與VEGFR-3（或稱flt-4）。VEGF-A會和VEGFR-1及VEGFR-2結合，兩種受體均表現於血管內皮細胞，而血管內皮生長因子的訊號最主要是經由第二型血管內皮生長因子受體傳達。第一型血管內皮生長因子受體與配體的結合能力較第二型血管內皮生長因子受體強了十倍以上，但卻只有相對較弱的激酶活性。第三型血管內皮生長因子受體則主要表現於淋巴內皮細胞上。

[0006] 目前已知腫瘤的血管新生除了由原有的周邊血管內皮細胞增生形成外，也可藉由VEGFR-2的調控吸引血管內皮母細胞移動至腫瘤內或其周邊，再分化為血管內皮細胞。由於和血管內皮生長因子有關的血管新生只發生於傷口修復和婦女生理週期時，阻斷血管內皮生長因子訊息路徑對於正常生理作用的影響有限，因此抑制血管內皮生長因子訊息路徑便成為抑制腫瘤血管新生的重要調控點，進而導致腫瘤細胞死亡。血管內皮生長因子已知在多種實體腫瘤中有過度表現的情形，如大腸直腸癌、乳癌、

前列腺癌、肺癌等。

[0007] 因此，仍需發展新的方法，以阻斷血管內皮生長因子之信息傳遞路徑。

【發明內容】

[0008] 本發明提供一種抗體或其抗原結合片段，其與人類第二型血管內皮生長因子受體（vascular endothelial growth factor receptor 2，VEGFR-2）或一人類第二型血管內皮生長因子受體片段結合。本發明之抗體可用於抑制VEGFR-2所調控之訊息傳遞，及治療由VEGFR-2之活性或訊息傳遞所導致或與其相關聯疾病或失調。本發明之抗體亦可用於抑制內皮細胞之細胞增生。

[0009] 本發明提供一種於一需要個體中抑制VEGFR-2調控之訊息傳遞的方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含前述之抗體或其抗原結合片段。

[0010] 本發明提供一種治療患有由VEGFR-2之活性或訊息傳遞所導致或與其相關聯疾病或失調之個體之方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含前述之抗體或其抗原結合片段。

[0011] 本發明提供一種治療患有腫瘤之個體之方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含前述之抗體或其抗原結合片段。

[0012] 本發明提供一種於一需要個體中抑制內皮細胞之細胞增生的方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含前述之抗體或其抗原結合片段。

[0013] 本發明提供一種偵測一樣品中之人類第二型血管內皮生長因子受體的方法，包含將該樣品與請前述之抗體或其抗原結合片段接觸。

[0014] 本發明將於下述段落中詳述，本發明之其他特徵、目的及優點可見於實施方式及申請專利範圍中。

【圖式簡單說明】

[0015] 圖1展示本發明抗體對小鼠VEGFR-2、人類VEGFR-1或VEGFR-3之結合親和力分析的ELISA結果。

[0016] 圖2展示本發明抗體之結合域定位(結構域1至結構域3及結構域4至結構域7)的ELISA結果。

[0017] 圖3展示本發明抗體之結合域定位的ELISA結果。

[0018] 圖4展示本發明抗體之抗原決定基定位的ELISA結果。

[0019] 圖5展示本發明抗體之HUVEC增生抑制分析。

[0020] 圖6藉由流式細胞測量術展示本發明抗體之抗體內在化至HUVEC中之結果。

[0021] 圖7展示藉由DeltaVision顯微鏡成像系統觀測之抗體內在化結果。

[0022] 圖8展示根據本發明之抗體-藥物接合物(ADC)的尺寸排阻層析分析結果。

[0023] 圖9展示根據本發明之抗體-藥物接合物的電泳分析結果。

[0024] 圖10藉由流式細胞測量術展示根據本發明之ADC抗體內在化至HUVEC中之結果。

[0025] 圖11展示本發明之ADC之HUVEC增生抑制分析。

[0026] 圖12展示根據本發明之嵌合抗原受體T細胞(CAR-T)藉由流式細胞測量術之定量分析。

[0027] 圖13展示根據本發明之嵌合抗原受體T細胞的細胞毒性分析。

[0028] 圖14展示用放射性同位素標記根據本發明之抗體的效率。

[0029] 圖15展示藉由放射線標記根據本發明之抗體在HT-29異種移植小鼠之NanoSPECT/CT中之腫瘤偵測的結果。

[0030] 圖16展示人源化、小鼠及人類抗體之V_L片段的比對。M：322A6；Hd：Hu322B1HdH。

[0031] 圖17展示人源化、小鼠及人類抗體之V_H片段的比對。M：322A6；Hu：人類模板IGHV1-46*01 F；HuB1：Hu322B1HdH。

【實施方式】

[0032] 本發明提供一種抗體或其抗原結合片段，其與人類第二型血管內皮生長因子受體（vascular endothelial growth factor receptor 2，VEGFR-2）或一人類第二型血管內皮生長因子受體片段結合。

[0033] 詳言之，本發明之抗體或其抗原結合片段與人類第二型血管內皮生長因子受體或其片段中的一抗原決定基特异性結合，其中該人類第二型血管內皮生長因子受體具有如SEQ ID NO：1所示之胺基酸序列，且該抗原決定基包含：

SEQ ID NO：1中第606位點之白胺酸、第607位點之天冬胺酸、第647位點之精胺酸、第648位點之離胺酸及第649位點之蘇胺酸；或

SEQ ID NO：1中第711位點之絲胺酸、第714位點之纈胺酸及第725及726位點之精胺酸。

[0034] 本發明之抗體可以是全長的（例如IgG1或IgG4抗體），或可僅包含一個抗原結合部分（例如Fab、F(ab')₂或scFv片段），並可加以修飾以影響其功能。

[0035] 本發明之抗體或其抗原結合片段與VEGFR-2或其片段中的一

抗原決定基特異性結合。VEGFR-2，或稱KDR或flk-1，係為一種血管內皮生長因子的受體，且藉由與配體（ligand）結合時，其形成雙體並互相磷酸化而活化。VEGFR-2的細胞外區域共有七個似免疫球蛋白結構域（Ig-like domains），大致來說，第一至第三結構域負責受體與配體的結合，而第四至第七結構域則負責受體間雙體化，並導致磷酸化及下游的訊息傳遞。較佳地，本發明之抗體或其抗原結合片段結合至VEGFR-2之細胞外區域的第六至第七結構域。

[0036] 本發明包含一種抗VEGFR-2抗體及抗原結合片段，其以高度親和力結合至單體或雙體化之VEGFR-2分子。

[0037] 於本發明一較佳實施例中，VEGFR-2具有如SEQ ID NO：1所示之胺基酸序列；VEGFR-2之細胞外區域的第六結構域具有如SEQ ID NO：2所示之胺基酸序列；VEGFR-2之細胞外區域的第七結構域具有如SEQ ID NO：3所示之胺基酸序列。

[0038] 本發明所屬技術領域中具通常知識者已知許多技術可用於確定一個抗體是否與一個多肽或蛋白內的「一個或多個胺基酸特異性結合」。示範性技術包括，例如Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., N.Y.)中所述的慣用交聯-阻斷分析、丙胺酸掃描突變分析、肽印跡分析（Reineke, 2004, Methods Mol Biol 248:443-463），以及肽切割分析。另外，還可採用諸如抗原的抗原決定基切除、抗原決定基提取和化學修飾的方法（Tomer, 2000, Protein Science 9：487-496）。可用於鑑定多肽內與抗體特異性結合的胺基酸的另一方法是用質譜檢測的氫/氘交換。總的說來，氫/氘交換法涉及用氘標記所關注的蛋白，隨後使抗體與氘標記的蛋白結合。然後，將該蛋白/抗體複合物轉移至水中，除了

受抗體保護的殘基（其維持氙標記狀態），讓所有殘基均發生氫-氙交換。在抗體解離後，進行標靶蛋白的蛋白酶裂解和質譜分析，從而揭示與抗體相互作用的特定胺基酸對應的那些氙標記的殘基。參閱例如Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259；Engen and Smith (2001) *Anal.Chem.* 73:256A-265A。

[0039] 於本發明一較佳實施例中，該抗原決定基包含SEQ ID NO：1中第606位點之白胺酸、第607位點之天冬胺酸、第647位點之精胺酸、第648位點之離胺酸及第649位點之蘇胺酸。

[0040] 於本發明另一較佳實施例中，該抗原決定基包含SEQ ID NO：1中第711位點之絲胺酸、第714位點之纈胺酸及第725及726位點之精胺酸。

[0041] 本發明另包含一種抗VEGFR-2抗體，其特異性結合至相同抗原決定基。類似地，本發明亦包含一種抗VEGFR-2抗體，其與此處所述之任何特定範例抗體競爭結合VEGFR-2。

[0042] 使用本領域內周知的慣用方法，可以輕易地確定一種抗體是否與本發明之對照抗EGFR抗體一樣，與同樣的抗原決定基結合，或在結合過程中競爭。例如，為了確定一種試驗抗體是否與本發明之對照抗VEGFR-2抗體一樣與同樣的抗原決定基結合，可讓該對照抗體與一個VEGFR-2蛋白（例如該VEGFR-2胞外結構域的一個可溶性部分或細胞表面表現的VEGFR-2）結合。然後，評估試驗抗體與該VEGFR-2分子結合的能力。如果該試驗抗體在與對照抗VEGFR-2抗體飽和結合之後能夠與VEGFR-2結合，就可得出結論，該試驗抗體和對照抗VEGFR-2抗體分別與不同的抗原決定基結合。在另一方面，如果該試驗抗體在與對照抗VEGFR-2抗體飽和結合之後不能與VEGFR-2分子結合，則該試驗抗體的抗

原決定基就可能與本發明之對照抗VEGFR-2抗體所結合的抗原決定基相同。然後可進行其他常規的實驗（例如肽突變和結合分析），以確定所觀察到試驗抗體無法結合的原因，實際上是由於與對照抗體所結合的抗原決定基相同，或是空間位阻（或另一現象）而導致。這類實驗可採用ELISA、RIA、Biacore、流式細胞計數法或本領域內可供利用的任何其他定量或定性的抗體結合分析法來完成。按照本發明之某些實施例，如果例如1倍、5倍、10倍、20倍或100倍過量的抗體對另一抗體結合的抑制作用達至少50%，但較佳的是75%、90%或甚至99%（如競爭結合分析所測量），則兩種抗體就是與同一個（或重疊的）抗原決定基結合。或者，如果抗原中減弱或消除一個抗體結合的幾乎所有胺基酸突變都能減弱或消除另一個抗體的結合，則可認為兩個抗體與相同的抗原決定基結合。若能減弱或消除一個抗體的結合的胺基酸突變，僅有一部分能減弱或消除另一個抗體的結合，則可認為兩個抗體具有「重疊的抗原決定基」。

[0043] 為了確定一抗體是否與對照抗VEGFR-2抗體在結合過程中競爭，可在兩個方面上實施上述結合方法：第一個方面，在飽和條件下讓對照抗體與一個VEGFR-2蛋白（例如該VEGFR-2胞外結構域的可溶部分或細胞表面表現的VEGFR-2）結合，隨後評估該試驗抗體與VEGFR-2分子的結合情況。第二個方面，在飽和條件下讓試驗抗體與VEGFR-2分子結合，然後評估對照抗體與該VEGFR-2分子的結合。如果在這兩個方向只有第一個（飽和）抗體能夠與VEGFR-2分子結合，那就可以得出結論，該試驗抗體與對照抗體在與VEGFR-2結合過程中競爭。如同本領域習知技藝人士所能理解的，與對照抗體在結合過程中競爭的抗體，其抗原決定基未必與對照抗體所結合之抗原決定基相同，但可能與一重疊或鄰近的抗原決定基結

合，而在空間上阻斷該對照抗體之結合。

[0044] 本文所用的術語「抗體」意為包含至少一個互補決定區（complementarity determining region，簡稱CDR）的任何抗原結合分子或分子複合體，該互補決定區特異性地與一個特定的抗原（如VEGFR-2）結合或與其相互作用。術語「抗體」包括由四條多肽鏈，即兩條重（H）鏈和兩條輕（L）鏈，以雙硫鍵相互連接而組成的免疫球蛋白分子，及其多聚體（例如IgM）。每條重鏈均包含一個重鏈可變區（heavy chain variable region，本文簡稱HCVR或V_H）和一個重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個域，C_{H1}、C_{H2}和C_{H3}。每條輕鏈均包含一個輕鏈可變區（本文簡稱LCVR或V_L）和一個輕鏈恆定區。該輕鏈恆定區包含一個域（C_{L1}）。V_H和V_L區可進一步分成被稱為互補決定區（CDRs）的高變異區域，以及散佈於其中的被稱為框架區（frame work regions，FR）的保守區域。每個V_H和V_L均由三個CDR和四個FR組成，從胺基端到羧基端按以下順序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本發明的另一些實施例中，抗VEGFR抗體（或其抗原結合部分）的FRs可能與人類種系序列相同，或可能經過天然或人工的修飾。一個胺基酸共有序列可根據兩個或兩個以上CDR的並排分析而予以定義。

[0045] 本文所用的術語「抗體」還包括整個抗體分子的抗原結合片段。本文所用的抗體的「抗原結合部分」、抗體的「抗原結合片段」等術語，包括與一個抗原特異性結合而形成複合體的任何天然產生的、以酶促方式獲得的、合成的或基因改造的多肽或醣蛋白。抗體的抗原結合片段可以利用任何適宜的標準技術，例如蛋白水解消化或涉及編碼抗體可變區或恆定區的DNA之操縱和表現的重組基因改造技術，例如從完整的抗體分子

產生。這樣的DNA是已知及／或容易從例如商業來源、DNA資料庫（包括例如噬菌體-抗體資料庫）獲得，或可為合成而得。該DNA可被定序，且可以化學方法或分子生物學技術加以操縱，例如將一個或多個可變區及／或恆定區排列成一種合適的構型，或引入密碼子、產生半胱胺酸殘基、修飾、添加或刪除胺基酸等。

[0046] 抗原結合片段的非限制性實例包括：(i) Fab片段；(ii) F(ab')₂片段；(iii) Fd片段；(iv) Fv片段；(v)單鏈Fv(scFv)分子；(vi) dAb片段；以及(vii)由模擬該抗體高變區（例如：一個孤立的互補決定區CDR，如一個CDR3胜肽）或一個受限制之FR3-CDR3-FR4胜肽的胺基酸殘基組成的最小識別單位。其他工程分子，如結構域特異性抗體、單域抗體、結構域刪除的抗體、嵌合抗體、CDR移植抗體、雙抗體、三聚抗體、四聚抗體、微型抗體、奈米抗體（例如單價奈米抗體、二價奈米抗體等）、小模組化免疫藥物（SMIP），以及鯊魚可變IgNAR域，也包括在本文所用的「抗原結合片段」這一表述中。

[0047] 一個抗體的抗原結合片段通常包含至少一個可變區。可變區可以是任何尺寸或具有任何胺基酸組成，且通常包含至少一個CDR，其鄰近或位於一或多個框架序列之框架內。在含有與V_L區相關聯之V_H區的抗原結合片段中，該V_H區和V_L區的相對位置可處於任何適宜的排列。例如，該可變區可為二聚化且含有V_H-V_H、V_H-V_L或V_L-V_L二聚體。或者，一個抗體的抗原結合片段可含有一個單一的V_H區或V_L區。

[0048] 在某些實施例中，一個抗體的抗原結合片段可含有與至少一個恆定區共價連接的至少一個可變區。在本發明之抗體的抗原結合片段內可發現的可變區和恆定區的非限制性示範性構型包括：(i) V_H-C_{H1}；(ii)

V_H-C_{H2} ; (iii) V_H-C_{H3} ; (iv) $V_H-C_{H1}-C_{H2}$; (v) $V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (vi) $V_H-C_{H2}-C_{H3}$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_{H1} ; (ix) V_L-C_{H2} ; (x) V_L-C_{H3} ; (xi) $V_L-C_{H1}-C_{H2}$; (xii) $V_L-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (xiii) $V_L-C_{H2}-C_{H3}$; 以及(xiv) V_L-C_L 。

在可變區和恆定區的任何構型中，包括上述任何示範性構型，該可變區和恆定區可直接地相互連接或可藉由一個完全的或部分的鉸鏈區或連接區連接。一個鉸鏈區可含有至少2個（例如5、10、15、20、40、60個或更多的）胺基酸，其在一個單一肽分子中相鄰的可變區及／或恆定區之間形成一種具彈性或半彈性的連接。此外，本發明之抗體的抗原結合片段可包含上述可變區和恆定區的任何構型的同二聚體或異二聚體（或其他多聚體），該可變區和恆定區以非共價鍵相互連接及／或與一或多個單一的 V_H 區或 V_L 區（例如通過雙硫鍵）連接。

[0049] 如同完整的抗體分子，抗原結合片段可以是單特異性或多特異性（例如雙特異性）。一個抗體的多特異性抗原結合片段通常包含至少兩個不同的可變區，其中每個可變區能夠特異性地與另一個抗原或同一抗原的不同抗原決定基結合。對於任何多特異性抗體形式，包括本文所揭露的示範性雙特異性抗體形式，均可用本領域內可利用的慣用技術，使其可可用於涉及本發明之抗體的抗原結合片段的用途。

[0050] 較佳地，根據本發明之該抗體或其抗原結合片段係為一哺乳類抗體。

[0051] 本文所用的術語「哺乳類抗體」意在包括含有衍生自哺乳類種系（germline）免疫球蛋白序列的可變區和恆定區的抗體。本發明之哺乳類抗體可包括非由哺乳類種系免疫球蛋白序列編碼的胺基酸殘基（例如通過體外隨機誘變或位點特異性誘變，或通過體內體細胞突變所引入的突

變)，例如可在CDR中，尤其是在CDR3中包括上述胺基酸殘基。

[0052] 本文所用的術語「重組哺乳類抗體」意在包括所有以重組方法製備、表現、產生或分離的哺乳類抗體，例如用轉染到宿主細胞中的重組表現載體表現的抗體（將在下文進一步描述），從重組的、組合的人抗體庫分離的抗體（將在下文進一步描述），從人類免疫球蛋白基因轉基因的動物（例如小鼠）分離的抗體，或者以任何其他涉及將哺乳類免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列上的方法所製備、表現、產生或分離的抗體。這類重組哺乳類抗體含有衍生自哺乳類種系免疫球蛋白序列的可變區和恆定區。但是，在某些實施例中，這類重組哺乳類抗體經受體外誘變（或當使用人類Ig序列轉基因動物時，經受體內體細胞誘變），從而使得該重組抗體的V_H區和V_L區的胺基酸序列成為這樣的序列：它們雖然衍生自人類種系V_H序列和V_L序列並與人類種系V_H序列和V_L序列有親緣關係，但也許並不天然地存在於所有的哺乳類種系體內抗體之中。

[0053] 哺乳類抗體，例如人類抗體，具有兩種與鉸鏈異質性有關的形式。在第一種形式中，一個免疫球蛋白分子包含一個約150-160 kDa的穩定的四鏈構建物，其中兩個二聚體由鏈間重鏈雙硫鍵連接在一起。在第二種形式中，該二聚體不是由鏈間雙硫鍵連接在一起，而是形成由共價偶聯的輕鏈和重鏈（半抗體）組成的約75-80 kDa的分子。分離這些形式極為困難，甚至在親和純化之後也是如此。

[0054] 本文披露的抗VEGFR-2抗體與衍生該抗體的相應種系序列相比，在重鏈和輕鏈可變區的框架區及／或CDR區可包含一個或多個胺基酸的取代、插入及／或缺失。通過將本文披露的胺基酸序列與從例如公共抗體序列數據庫可獲得的種系序列相比，可以輕易地證實這類突變。本發明

包括衍生自本文所披露的任何胺基酸序列的抗體及其抗原結合片段，其中一或多個框架區及／或CDR區內的一或多個胺基酸突變為衍生該抗體的種系序列的相應殘基，或突變為另一個哺乳類種系序列的相應殘基，或突變為相應的種系序列殘基的保守胺基酸取代（這類序列變化在本文中統稱為「種系突變」）。本發明所屬技術領域中具通常知識者從本文披露的重鏈和輕鏈可變區序列開始，能夠輕易地產生許多包含一個或多個單個種系突變或其組合的抗體及其抗原結合片段。在某些實施例中，上述V_H及／或V_L區內的所有框架及／或CDR殘基均回復突變為在衍生該抗體的原始種系序列中發現的殘基。在其他實施例中，只有某些殘基才回復突變為原始種系序列，例如，只有FR1的最先8個胺基酸或FR4的最後8個胺基酸中發現突變殘基，或只有CDR1、CDR2或CDR3中發現突變殘基。在其他某些實施例中，一或多個框架及／或CDR殘基回復突變為一個不同種系序列（即一個不同於最初衍生該抗體的種系序列的種系序列）的相應殘基。此外，本發明之抗體可在框架區及／或CDR區內含有兩個或多個突變的任何組合，例如，其中某些殘基分別突變為一特定種系序列的相應殘基，而某些其他不同於原始種系序列的殘基則保持不變或突變為一個不同種系序列的相應殘基。一旦獲得含有一或多個種系突變的抗體和抗原結合片段之後，可輕易地測試其一或多種所需的特性，例如改善的結合特異性、提高的結合親和力、改善或增強的拮抗性或促進的生物學特性（視情況而定）、下降的免疫原性等。以此一般方式獲得的抗體和抗原結合片段均包括在本發明範圍內。

[0055] 本發明還包括含有本文所披露的任何V_H、V_L及／或CDR胺基酸序列之變異體的抗VEGFR-2抗體，該變異體含有一個或多個保守的胺基

酸取代。例如，本發明包括含有V_H、V_L及／或CDR胺基酸序列的抗VEGFR-2抗體，該胺基酸序列相對於本文所披露的任何V_H、V_L及／或CDR胺基酸序列，含有例如10個或以下、8個或以下、6個或以下、4個或以下等保守的胺基酸取代。

[0056] 術語「實質的相同性」或「實質上相同」，當指一個核酸或其碎片時，表示當以適當的核苷酸插入或刪除與另一個核酸（或其互補鏈）進行最佳比對時，以下述任何已知的序列同一性算法如FASTA、BLAST或Gap測量，至少有95%的核苷酸序列同一性，較佳的是至少有96%、97%、98%或99%的核苷酸鹼基相同性。在某些情況下，一個與參照核酸分子實質上相同的核酸分子，可編碼具有與該參照核酸分子編碼的多肽相同或實質上類似的胺基酸序列的多肽。

[0057] 當應用於多肽時，術語「實質的相似性」或「實質上相似」意為兩個肽序列用諸如GAP或BESTFIT等程式的預設間隙權重排列達到最佳比對時，兩者至少有95%的序列同一性，更佳的是至少有98%或99%的序列同一性。較佳的是，不相同的殘基位置的差別係為保守性的胺基酸取代。「保守性的胺基酸取代」是指，一個胺基酸殘基被另一個具有相似化學性質（例如電荷或疏水性）側鏈（取代基團）的胺基酸殘基所取代。一般而言，保守性的胺基酸取代不會在實質上改變蛋白質的功能性質。在兩個或更多的胺基酸序列相互之間的差別僅在於某些保守性取代的情況中，可將序列同一性百分比或相似性程度向上調整，以針對取代的保守特性作出校正。進行這種調整的方法是本領域習知技藝人士眾所周知的。含有化學性質相似側鏈的胺基酸類別的實例包括：(1)脂肪族側鏈：甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸和異白胺酸；(2)脂肪族羥基側鏈：絲胺酸和蘇胺

酸；(3)含醯胺側鏈：天冬醯胺酸和麩醯胺酸；(4)芳香族側鏈：苯丙胺酸、酪胺酸和色胺酸；(5)鹼性側鏈：離胺酸、精胺酸和組胺酸；以及(6)酸性側鏈：天冬醯胺酸和麩醯胺酸，以及(7)含硫側鏈：半胱胺酸和甲硫胺酸。較佳的保守性胺基酸取代基是：纈胺酸-白胺酸-異白胺酸、苯丙胺酸-酪胺酸、離胺酸-精胺酸、丙胺酸-纈胺酸、麩醯胺酸-天冬醯胺酸，以及天冬醯胺酸-麩醯胺酸。或者，保守性取代是Gonnet et al. (1992)Science 256:1443-1445中所披露的PAM250對數似然矩陣(PAM250 log-likelihood matrix)中任何具有非負值的變化。

[0058] 多肽的序列相似性，也稱為序列同一性，通常是用序列分析軟體來測量的。蛋白質分析軟體是用指定給各種取代（包括保守性胺基酸取代）、缺失和其他修飾的相似性程度對相似的序列進行比對。例如，GCG軟體含有諸如Gap和Bestfit程式，可在系統內定參數情況下使用這些程式，以確定緊密相關的多肽（例如來自不同生物物種的同源多肽）之間的序列同源性或序列同一性，或者野生型蛋白質與其突變後形成的蛋白質之間的序列同源性或序列同一性。也可以用GCG Version 6.1程式FASTA（例如FASTA2和FASTA3）中系統內定參數或推薦參數來比較多肽序列，而提供被查詢序列和被搜索序列之間的最佳重疊區域的比對和序列同一性百分比（Pearson(2000)，出處同上）。當將本發明之序列與含有大量源自不同生物之序列的數據庫進行比較時，另一較佳的算法是BLAST電腦程式，尤其是BLASTP或TBLASTN，使用系統內定參數。參閱例如Altschul et al. (1990)J. Mol. Biol. 215:403-410及Altschul et al. (1997)Nucleic Acids Res. 25:3389-402，每篇論文均以引用方式納入本文。

[0059] 於本發明一較佳實施例中，該抗體或其抗原結合片段包含重

鏈可變區之互補決定區（complementarity determining regions，CDRs）及輕鏈可變區之互補決定區，其中該重鏈可變區之互補決定區包含CDRH1、CDRH2及CDRH3區，且該輕鏈可變區之互補決定區包含CDRL1、CDRL2及CDRL3區，且

該CDRH1區包含如SEQ ID NO：4所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

該CDRH2區包含如SEQ ID NO：5所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

該CDRH3區包含如SEQ ID NO：6所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

該CDRL1區包含如SEQ ID NO：7所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

該CDRL2區包含如SEQ ID NO：8所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

及該CDRL3區包含如SEQ ID NO：9所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列。

[0060] 於本發明另一較佳實施例中，該抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區之互補決定區（CDRs）及輕鏈可變區之互補決定區，其中該重鏈可變區之互補決定區包含CDRH1、CDRH2及CDRH3區，且該輕鏈可變區之互補決定區包含CDRL1、CDRL2及CDRL3區，且

該CDRH1區包含如SEQ ID NO：10所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

該CDRH2區包含如SEQ ID NO：11所示之胺基酸序列，或具有至少

90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

該CDRH3區包含如SEQ ID NO：12所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

該CDRL1區包含如SEQ ID NO：13所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

該CDRL2區包含如SEQ ID NO：14所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

及該CDRL3區包含如SEQ ID NO：15所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列。

[0061] 於本發明一較佳實施例中，一抗體322A6或其抗原結合片段包含一重鏈可變區，包含如SEQ ID NO：17所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列。較佳地，該重鏈可變區域係由如SEQ ID NO：16所示之核苷酸序列所編碼。322A6或其抗原結合片段包含一輕鏈可變區，包含如SEQ ID NO：19所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列。較佳地，該輕鏈可變區域係由如SEQ ID NO：18所示之核苷酸序列所編碼。

[0062] 於本發明另一較佳實施例中，一抗體12A6或其抗原結合片段包含一重鏈可變區，包含如SEQ ID NO：21所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列。較佳地，該重鏈可變區域係由如SEQ ID NO：22所示之核苷酸序列所編碼/12A6或其抗原結合片段一輕鏈可變區，包含如SEQ ID NO：23所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性

之實質相似序列。較佳地，該輕鏈可變區域係由如SEQ ID NO：24所示之核苷酸序列所編碼。

[0063] 於另一方面，本發明之抗體較佳為人源化抗體（humanized antibody）。「人源化抗體」唯一重組蛋白，其中，來自一物種（例如：小鼠）之一抗體的CDRs，由小鼠抗體之重鏈及輕鏈可變區域轉移至人類之重鏈及輕鏈可變區域，包含人類框架序列。該抗體分子的恆定區則衍生自一人類抗體之恆定區。

[0064] 為改良根據本發明之人源化抗體的結合親和力，人類框架區中之一些胺基酸殘基經CDR之物種(例如小鼠)中的相對應胺基酸殘基替換。較佳地，人源化抗體Hu322B1HdH或其抗原結合片段包含有包含SEQ ID NO：25之胺基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性的大體上類似序列的重鏈可變區。較佳地，重鏈可變區由SEQ ID NO：24之核酸序列編碼。Hu322B1HdH或其抗原結合片段包含有包含SEQ ID NO：27之胺基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性的大體上類似序列或其大體上類似序列的輕鏈可變區。較佳地，輕鏈可變區由SEQ ID NO：26之核酸序列編碼。

[0065] 較佳地，本發明之抗體係為一單株抗體。

[0066] 本發明之抗體可以是單特異性、雙特異性或多特異性的抗體。多特異性抗體可以針對同一標靶多肽的不同抗原決定基具有特異性，或可含有針對一個以上標靶多肽具有特異性的抗原結合結構域。本發明之抗VEGFR-2抗體可與另一個功能分子，例如另一胜肽或蛋白，連接或共表現。例如，一個抗體或其片段可與一個或多個其他分子實體，如另一個抗體或抗體片段實現功能性（例如以化學偶聯、基因融合、非共價鍵連接或

其他方式) 連接, 以產生具有第二種結合特異性的雙特異性或多特異性抗體。例如, 本發明包括雙特異性抗體, 其中免疫球蛋白的一臂對人類 VEGFR-2 或其片段具有特異性, 而免疫球蛋白的另一臂則對第二種治療靶標具有特異性或與一治療基團偶聯。

[0067] 於本發明一較佳實施例中, 該抗體或其抗原結合片段係與一治療劑接合。

[0068] 如本文所使用, 「治療劑」表示細胞生長抑制或細胞毒性劑或具有相對應放射性同位素的同位素螯合劑。細胞生長抑制或細胞毒性劑之實例包括(但不限於)抗代謝物(例如, 氟尿嘧啶(5-FU)、氟尿苷(5-FUdR)、甲胺喋呤、甲醯四氫葉酸、羥基尿素、硫鳥嘌呤(6-TG)、巯基嘌呤(6-MP)、阿糖胞苷、噴司他丁(pentostatin)、氟達拉賓磷酸鹽(fludarabine phosphate)、克拉屈濱(cladribine) (2-CDA)、天冬醯胺酶、吉西他濱(gemcitabine)、卡培他濱(capecitabine)、硫唑嘌呤、胞嘧啶甲胺喋呤、三甲氧苄二胺嘧啶(trimethoprim)、嘧啶甲胺(pyrimethamine)或培美曲塞(pemetrexed)); 烷化劑(例如, 美法倫(melphalan)、苯丁酸氮芥、白消安(busulfan)、噻替派(thiotepa)、異環磷醯胺、卡莫司汀(carmustine)、洛莫司汀(lomustine)、司莫司汀(semustine)、鏈脲菌素、達卡巴嗪(dacarbazine)、絲裂黴素C、環磷醯胺、氮芥、烏拉莫司汀(uramustine)、二溴甘露醇、四硝酸酯、丙卡巴肼(procarbazine)、六甲蜜胺、米托唑胺(mitozolomide)或替莫唑胺(temozolomide)); 類烷化劑(例如, 順鉑(cisplatin)、卡鉑(carboplatin)、奈達鉑(nedaplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)、賽特鉑(satraplatin)或特瑞鉑(triplatin)); DNA小溝槽烷化劑(例如, 倍癌黴素(duocarmycin), 諸如CC-1065及其任何類似物或衍生

物；吡咯并苯并二氮雜卓(pyrrolobenzodiazapene)或其任何類似物或衍生物)；蒽環類藥物(anthracycline) (例如，道諾黴素(daunorubicin)、小紅莓(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、艾達黴素(idarubicin)或伐柔比星(valrubicin))；抗生素(例如，放線菌素d (dactinomycin)、博萊黴素(bleomycin)、光神黴素(mithramycin)、安麴黴素(anthracycline)、鏈佐黴素(streptozotocin)、短桿菌素D (gramicidin D)、絲裂黴素(mitomycin) (例如，絲裂黴素C)；卡其黴素(calicheamicin)；抗有絲分裂劑(包括例如，類美登素(maytansinoid) (諸如DM1、DM3及DM4)、奧瑞他汀(auristatin) (包括例如，單甲基奧瑞他汀E (MMAE)及單甲基奧瑞他汀F (MMAF))、海兔毒素(dolastatin)、念珠藻環肽(cryptophycin)、長春花屬生物鹼(例如，長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、長春地辛(vindesine)、長春瑞賓(vinorelbine))、紫杉烷(例如，太平洋紫杉醇、多烯紫杉醇或新穎紫杉烷)、特吡萊辛(tubulysin)及秋水仙鹼)；拓撲異構酶抑制劑(例如，伊立替康(irinotecan)、拓撲替康(topotecan)、喜樹鹼(camptothecin)、依託泊苷(etoposide)、替尼泊苷(teniposide)、安吡啶(amsacrine)或米托蒽醌(mitoxantrone))；HDAC抑制劑(例如，伏立諾他(vorinostat)、羅米地辛(romidepsin)、西達本胺(chidamide)、帕比司他(panobinostat)或貝林諾他(belinostat))；蛋白酶體抑制劑(例如，肽基硼酸)；以及放射性同位素，諸如 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 或 Bi^{213} 、 P^{32} 及Lu之放射性同位素，包括 Lu^{177} 。同位素螯合劑之實例包括(但不限於)乙二胺四乙酸(EDTA)、二伸乙基三胺-N,N,N',N'',N'''-五乙酸酯(DTPA)、1,4,7,10-四氮雜環十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸酯(DOTA)、1,4,7,10-肆(2-羥丙基)-1,4,7,10-四氮雜環十二烷(THP)、三伸乙基四胺-N,N,N',N'',N''',N'''-六

乙酸酯(TTHA)、1,4,7,10-四氮雜環十二烷-N,N',N'',N'''-四(亞甲基膦酸酯)(DOTP)及巯基乙醯基三甘胺酸(MAG3)。

[0069] 在本發明之一個較佳實施例中，抗體或其抗原結合片段可使用任何數目之表現系統產生，包括原核及真核表現系統。在一些實施例中，表現系統為哺乳動物細胞表現(諸如融合瘤)或CHO細胞表現系統。諸多此類系統係廣泛購自商業供應商。在抗體包含V_H及V_L區之實施例中，V_H及V_L區可例如在雙順反子表現單元中或在不同啟動子的控制下，使用單一載體表現。在其他實施例中，V_H及V_L區可使用單獨載體表現。如本文所述之V_H或V_L區可視情況包含N端處之甲硫胺酸。

[0070] 編碼相關抗體之重鏈及輕鏈的基因可選殖於細胞，例如，編碼單株抗體之基因可選殖於融合瘤且用於產生重組單株抗體。編碼單株抗體之重鏈及輕鏈的基因庫亦可由融合瘤或漿細胞製得。重鏈及輕鏈基因產物之隨機組合生成具有不同抗原特異性之大抗體池(參見例如，Kuby, Immunology (第3版 1997))。

[0071] 用於製造單鏈抗體或重組抗體的技術(US 4,946,778、US 4,816,567)可適用於製造本發明之抗體及多肽。並且，轉基因小鼠或其他生物體，例如其他哺乳類，可用於表現人源化抗體或人類抗體(參見例如US 5,545,807、US 5,545,806、US 5,569,825、US 5,625,126、US 5,633,425、US 5,661,016、Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)、Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994)、Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-51 (1996)、Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996)及Lonberg & Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995))。

[0072] 於本發明一較佳實施例中，該抗體或其抗原結合片段係表現於一細胞之表面。較佳地，該細胞為T細胞。

[0073] 本發明提供了一些含有本發明之抗VEGFR-2抗體或其抗原結合片段的醫藥組合物。本發明之醫藥組合物是與適宜的載體、賦形劑以及改善轉移、遞送、耐受性等的其他試劑一起配製的。在這本所有藥劑化學師都知道的處方集裏可以找到大量的適宜配方：Remington's Pharmaceutical Sciences（雷氏藥學大全），Mack Publishing Company, Easton, PA。這些配方包括，例如粉劑、糊劑、油膏、凝膠、蠟劑、油劑、脂質、含有（陽離子或陰離子）脂質的泡囊（如LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA）、DNA偶聯物、無水吸收性糊劑、水包油或油包水乳劑、乳膠狀碳蠟（各種分子量的聚乙二醇）、半固體狀凝膠以及含有碳蠟的半固體狀混合物。還可參閱Powell et al., Compendium of excipients for parenteral formulations（非腸道用配方之賦形劑概論），PDA(1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0074] 給患者施用的抗體劑量可根據即將受藥的患者之年齡和體形大小、標靶疾病、病症、給藥途徑等因素而改變。較佳的劑量通常是按照體重或身體表面積計算的。當本發明之抗體用於治療成人患者的與VEGFR-2活性相關的某種病症和疾病時，將本發明之抗體經由靜脈輸入也許較有效，通常是單劑量按體重計約0.01至約20 mg/kg給藥，較佳為約0.02至約7 mg/kg、約0.03至約5 mg/kg，或約0.05至約3mg/kg。取決於病症的嚴重程度，治療的頻率和持續時間可以調整。抗VEGFR-2抗體給藥的有效劑量和計劃可根據經驗確定；例如，可通過定期評估來監視患者病情的進展並相應地調整劑量。而且，可以使用本領域眾所周知的方法進行劑量的

跨物種類推（例如Mordenti et al., 1991, *Pharmaceut. Res.*8:1351）。

[0075] 已知有多種藥物遞送系統可用來施用本發明的醫藥組合物，例如封裝在能夠表現變異病毒、受體介導的胞吞作用的脂質體、微顆粒、微膠囊、重組細胞中（參見如Wu et al. , 1987, *J.Biol.Chem.*262 : 4429-4432）。給藥方法包括但不限於皮內、肌內、腹腔內、靜脈、皮下、經鼻、硬膜外以及經口給藥。該組合物可經由任何方便的途徑給藥，例如，輸注或快速注射，經上皮或黏膜（例如口腔黏膜、直腸和腸黏膜等）吸收，並可與其他生物活性劑一起給藥。給藥方式可為全身性或局部性。

[0076] 本發明之醫藥組合物可用標準的針頭和針筒經皮下或靜脈注射。此外，對於皮下給藥，一種筆型給藥裝置可方便地用於本發明之醫藥組合物的給藥。這種筆型給藥裝置可以是重複使用型或用後即棄型。可重複使用的筆型給藥裝置一般採用一種可更換的含醫藥組合物的藥筒。一旦藥筒內所有醫藥組合物均已輸出、藥筒變空，則可方便地丟棄空藥筒，並用一個含醫藥組合物的新藥筒取代，該筆型給藥裝置即可重複使用。在用後即丟棄的筆型給藥裝置中，則無可更換的藥筒。相反地，該用後即丟棄的筆型給藥裝置具有一個預先灌滿醫藥組合物的貯液器。一旦該貯液器內醫藥組合物用完，整個裝置即被丟棄。

[0077] 在某些情況下，該醫藥組合物可用一種控制釋放系統給藥。在一個實施例中，可使用一種泵（參閱Langer，出處同上；Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14 : 201）。在另一個實施例中，可採用聚合物材料；參閱Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974 , CRC Pres., Boca Raton, Florida。在又一個實施例中，可將一種控制釋放系統置於該組合物靶標的附近，從而只需要全身性劑量的一

部分（參閱例如，Goodson, 1984, in *Medical Applications of Controlled Release*，出處同上，vol. 2, pp. 115-138）。其他控制釋放系統在Langer, 1990，*Science* 249:1527-1533的綜述中也被論及。

[0078] 注射用製劑可包括靜脈注射、皮下、皮內和肌內注射、滴注輸液等劑型。這些注射用製劑可以公知的方法製備。例如，可以將上述抗體或其鹽溶解、懸浮或乳化在無菌水介質中，或通常用於注射的油性介質中，以此方式製備該注射用製劑。作為注射用的水介質有例如生理鹽水、含葡萄糖和其他助劑的等滲壓溶液等，可結合使用適當的增溶劑，如醇類（如乙醇）、多元醇類（如丙二醇、聚乙二醇），非離子型表面活性劑，例如聚山梨醇酯80、HCO-50（50莫耳的氫化蓖麻油的聚氧乙烯加合物）等。作為油性介質，可採用例如芝麻油、豆油等，可結合使用增溶劑，如苯甲酸苯甲酯、苯甲醇等。如此製備的注射液最好是裝入一種適當的安瓶中。

[0079] 較佳地，上述口服或注射用醫藥組合物可製備成單位劑量的劑型，以容納一定劑量的活性成分。這種單位劑量的劑型包括例如片劑、丸劑、膠囊、注射液（安瓶）、栓劑等。單位劑量的上述抗體含量一般為每劑約5 mg至約500 mg；尤其是注射劑型，較佳的是上述抗體含量為約5 mg至約100 mg，其他劑型中抗體含量為約10 mg至約250 mg。

[0080] 本發明之抗體可用於一需要個體中抑制VEGFR-2調控之訊息傳遞，或治療由VEGFR-2之活性或訊息傳遞所導致或與其相關聯疾病或失調。本發明之抗體亦可用於抑制內皮細胞之細胞增生。

[0081] 本發明提供一種於一需要個體中抑制VEGFR-2調控之訊息傳遞的方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含前述之抗體或其抗原結合片段。

[0082] 本發明提供一種治療患有由VEGFR-2之活性或訊息傳遞所導致或與其相關聯疾病或失調之個體之方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含前述之抗體或其抗原結合片段。

[0083] 本發明提供一種治療患有腫瘤之個體之方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含前述之抗體或其抗原結合片段。

[0084] 本發明提供一種於一需要個體中抑制內皮細胞之細胞增生的方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含前述之抗體或其抗原結合片段。

[0085] 如本文所用，術語「治療(treating/treatment)」係指向罹患不良病狀、病症或疾病之有臨床症狀的個體投與藥劑或調配物，以便實現症狀之嚴重程度及／或頻率降低、消除症狀及／或其潛在病因及／或有助於損傷好轉或修復。術語「預防(preventing/prevention)」係指向易罹患特定不良病狀、病症或疾病之無臨床症狀的個體投與藥劑或組合物，且因此係關於預防症狀出現及／或其潛在病因。如熟習此項技術者所理解，預防(prevention/preventing)不必達成病狀之絕對(完全)阻斷或避免。確切而言，預防可達成待預防之疾病或病狀之基本上(例如，超過約50%)減輕或避免。除非本文中另外明確地或藉由暗示指明，否則若在未提及可能的預防的情況下使用術語「治療(treatment/treating)」，則意欲亦涵蓋預防。

[0086] 「癌症」、「腫瘤」、「轉型」及類似術語包括癌變前、贅生性、轉型及癌細胞，且可指實體腫瘤，或非實體癌症(參見例如，Edge等人 AJCC Cancer Staging Manual (第7版 2009)；Cibas and Ducatman Cytology: Diagnostic principles and clinical correlates (第3版 2009))。癌症包括良性贅瘤及惡性贅瘤(異常生長)兩者。「轉型」係指自發的或誘發

的表現型變化，例如，細胞之不朽化、形態變化、異常細胞生長、減少的接觸抑制及固著及／或惡性病(參見Freshney, *Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique* (第3版 1994))。儘管轉型可由轉型病毒之感染及新基因組DNA之併入或外源DNA之攝入引起，但其亦可以自發方式或在暴露於誘癌物之後產生。

[0087] 除其他用途外，本發明之抗體可用於治療、預防和/或改善與VEGFR-2的表現或活性相關或由VEGFR-2的表現或活性媒介的任何疾病或失調，或通過阻斷VEGFR-2和VEGFR-2配體之間的相互作用可治療的任何疾病或失調，或可用於抑制VEGFR-2活性及／或信號，及／或促進受體內在化，及／或減少細胞表面受體的數目。例如，本發明之抗體和抗原結合片段可用於治療表現高水平VEGFR-2的腫瘤。本發明之抗體和抗原結合片段可用於治療在下列器官中產生的例如原發性及／或轉移性腫瘤：腦和腦脊膜、口咽、肺和支氣管樹、胃腸道、男性和女性生殖道、肌肉、骨骼、皮膚及附屬物、結締組織、脾臟、免疫系統、造血細胞和骨髓、肝臟、泌尿道，以及某些特殊的感覺器官如眼睛。在某些實施例中，本發明之抗體和抗原結合片段被用於治療一種或多種下列癌症：腎細胞癌、胰腺癌、乳癌、頭頸部癌、前列腺癌、惡性膠質瘤、骨肉瘤、大腸直腸癌、胃癌（如MET擴增的胃癌）、惡性間皮瘤、多發性骨髓瘤、卵巢癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌（例如VEGFR-2依賴性非小細胞肺癌）、滑膜肉瘤、甲狀腺癌或黑色素瘤。

[0088] 本發明提供一種偵測一樣品中之人類血管內皮生長因子受體的方法，包含將該樣品與前述之抗體或其抗原結合片段接觸。

[0089] 本發明之抗VEGFR-2抗體也可用於檢測及／或測量樣品中

VEGFR-2或表現VEGFR-2的細胞，例如用於診斷目的。例如，抗VEGFR-2抗體或其片段可用於診斷特徵為VEGFR-2異常表現（例如過度表現、表現不足、缺乏表現等）的症狀或疾病。示範性VEGFR-2診斷分析法可包括例如用一種本發明之抗VEGFR-2抗體與獲自患者的樣品接觸，其中該抗VEGFR-2抗體以一種可檢測的標記或報導基因分子標記。或者，在診斷應用中也可以將一種未標記的抗VEGFR-2抗體與本身具有可檢測標記的第二種抗體結合使用。該可檢測標記或報導基因分子可以是一種放射性同位素，如³H、¹⁴C、³²P、³⁵S或¹²⁵I；一種螢光或化學發光基團，如異硫氰酸螢光素，或羅丹明；或一種酶如鹼性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣根過氧化物酶，或螢光素酶。可用於檢測或測量樣品中VEGFR-2的特別的示範性測定法包括酵素結合免疫吸附分析（ELISA）、放射免疫分析（RIA），以及螢光激活細胞分選（FACS）。

[0090] 可依照本發明用於VEGFR-2診斷分析的樣品，包括獲自病人的在正常或病理條件下含有可檢測量VEGFR-2蛋白或其片段的任何組織或體液樣品。一般而言，先從一位健康病人（例如未患與VEGFR-2異常水平或活性相關的疾病或症狀的病人）獲得特定的樣品並測量其VEGFR-2表現水平，以建立VEGFR-2水平的基準線或標準。然後，可將這VEGFR-2基準線水平與從疑為患有VEGFR-2相關性疾病或狀況的人員所獲得的樣品測得的VEGFR-2表現水平進行比較。

[0091] 提供以下實例以幫助熟習此項技術者實踐本發明。

實例

scFv/Fab 抗體庫之構築

[0092] 使用含有SEQ ID NO：1之序列的融合蛋白質VEGFR2-Fc-His

作為抗原使小鼠免疫，每兩週6次。在免疫接種後，犧牲小鼠以獲得脾臟。提取出脾臟之全部RNA且藉由引子在RT-PCR程序中反轉錄以構築含有V_H、V_L、V_H-CH1、V_L-CL之抗體片段。抗體片段在聚合酶鏈反應中組裝成scFv片段以構築scFv庫。首先，藉由來自V_L-CL片段之V_L-CL庫將Fab庫構築至質體中。隨後，將V_H-CH1片段構築至含有V_L-CL片段之質體中，產生最終Fab庫。

製備用於生物淘選之scFv/Fab噬菌體

[0093] 將所獲得之庫接種至含有100 µg/ml安比西林(ampicillin)及2%葡萄糖(2YTAG)之2×YT培養基中，且在37°C振盪下培育，直至OD 600 nm達到0.5。用輔助噬菌體感染培養物且隨後在37°C水浴中無振盪培養30 min。收集細胞且將其懸浮於含有100 µg/ml安比西林及25 µg/ml卡那黴素(kanamycin) (2YTAK)之2×YT培養基中，且再在30°C振盪下培育隔夜。收集培養物之上清液且將其與1/5體積之PEG/NaCl (20%聚乙二醇8000，2.5 M NaCl)混合，且在4°C下保持1小時或大於1小時。離心之後，收集離心塊且將其懸浮於40 mL PBS中且再次離心以收集上清液。

使用ELISA方法選擇

[0094] 將ELISA培養盤(Nunc)每孔塗佈1 µg/100 µL之抗原，且在pH 9.6之碳酸氫鈉緩衝液中在4°C下保持隔夜。孔用PBS洗滌3次且用每孔300 µL之PBS-5%脫脂牛奶(MPBS)在37°C下阻斷1.5小時。用PBS洗滌3次之後，添加100 µL於5% MPBS中之噬菌體，該MPBS具有含有his標記之融合蛋白質，且在37°C下培育90分。用PBS-0.05% Tween 20 (PBST)洗滌10次及用PBS洗滌10次之後，噬菌體藉由添加100 µL之100 mM三乙胺(TEA)溶離且在37°C下反應30分。100 µL之經溶離噬菌體用pH 7.4、50 µL之1 M

Tris中和。將10 ml在指數生長階段之TG1添加至150 μ L之經溶離噬菌體中。培養物在37°C下無振盪培育30分進行感染。將經感染TG1細菌離心且收集且隨後懸浮於2×YT中，並塗鋪於2×YT-AG培養盤上。細菌在30°C下培育隔夜。

使用戴諾珠粒(*Dynabeads*)方法選擇

[0095] 在預清潔噬菌體步驟中，戴諾珠粒用1 ml PBS預洗滌3次，且懸浮於PBS中。隨後，將0.3 mL噬菌體與0.5 ml之5% MPBS及含有his標記之融合蛋白質混合，且在旋轉器上培育30分，且隨後移出戴諾珠粒。

[0096] 使戴諾珠粒與生物素標記之VEGFR2-His反應90分。戴諾珠粒用1 ml PBS洗滌3次且懸浮於5% MPBS中並培育90分，且隨後用1 ml PBS洗滌3次。將預清潔噬菌體添加至具有戴諾珠粒之VEGFR2-His中，且在旋轉器上再培育30分。戴諾珠粒隨後用1 ml之0.05% PBST、0.2% MPBS及PBS洗滌。所結合之噬菌體用1 ml之100 mM TEA溶離。為快速中和，將pH 7.4、0.5 ml之1 M Tris添加至經溶離噬菌體中。隨後，採用6 ml之TG1之指數生長培養物且添加經TEA溶離之噬菌體。培養物在37°C下(水浴)無振盪培育30分。合併經感染TG1細菌且離心以收集離心塊。將塊狀之細菌懸浮於1 ml之2×YT中且塗鋪於大的2×YT-AG培養盤上。細菌在30°C下培育隔夜。

製備下一輪噬菌體

[0097] 將5至6 ml之2×YT、15%甘油添加至細菌培養盤中且菌落藉由玻璃塗抹棒變鬆散。隨後，將10 μ l刮下的細菌添加至10 ml之2×YT-AG中且細菌在37°C振盪下生長，直至在600 nm下之OD達到0.5。藉由添加輔助噬菌體用M13KO7輔助噬菌體以1:20之比率感染10 ml培養物，且經感染

培養物在37°C水浴中無振盪培育30分。培養物經離心以收集離心塊，且離心塊藉由50 mL之2×YT-AK懸浮，且隨後在30°C下培養隔夜。此外，使40 ml之隔夜培養物在10,000 rpm下離心20 min以收集上清液，且將1/5體積(8 ml) PEG/NaCl添加至上清液中。將孔混合且在4°C下保持1小時或大於1小時。混合物在10,000 rpm下離心20分且收集離心塊並將其懸浮於2 ml PBS中。懸浮液在12000 rpm下離心10分以移除大部分剩餘的細菌殘渣。

藉由ELISA篩檢VEGFR2陽性噬菌體

[0098] 將來自培養盤之單獨菌落接種至200 µl之2×YT-AG 96孔盤中，且在37°C下在振盪下生長隔夜，且隨後將50 µl轉移至每孔含有200 µl之2×YT-AG的第二96孔盤中，在37°C下振盪2小時。隨後，將50 µl之具有10⁹ pfu M13KO7輔助噬菌體的2×YT-AG添加至第二培養盤的各孔中。混合物在37°C下靜置30 min且隨後在37°C下振盪1小時。在4000 rpm下離心30分之後，抽出上清液，且將離心塊懸浮於300 µl之2×YT-AK中，在30°C下在振盪下生長隔夜。培養物在4000 rpm下離心30分且取出100 µl之培養物上清液用於噬菌體ELISA。

[0099] 將ELISA培養盤每孔塗佈1 µg/mL之蛋白質抗原，且隨後用PBS淋洗3次，且用每孔300 µl之2% MPBS在37°C下阻斷2小時。用PBS再淋洗3次之後，添加100 µl如上文詳細說明之噬菌體培養物上清液且在37°C下培育90分。捨棄噬菌體溶液，且孔用PBST洗滌6次及用PBS洗滌6次，隨後添加HRP-抗M13抗體於5% MPBS中之適當稀釋液。混合物在37°C下培育60 min，且用PBST洗滌6次及用PBS洗滌6次。孔用基質溶液(TMB)顯色，且反應藉由添加50 µl之1 M硫酸中止。顏色變成黃色，且分析OD 650 nm及OD 450 nm。

[0100] 篩檢之後，鑑定出總共379個純系及66種CDRH3。

全長抗體之表現

[0101] 將編碼抗VEGFR2抗體之V_H及V_L鏈的基因插入至表現載體中。藉由所構築之載體轉染Free-style 293細胞。遵循以下程序，在30 ml體積中轉染懸浮液FreeStyle™ 293細胞。在轉染之前大約24小時，以2 × 10⁶個細胞/毫升轉移15 ml之FreeStyle™ 293細胞。將燒瓶置放於37°C、8% CO₂培育箱中。隨後將37.5 μg之質體DNA稀釋至1.5 ml之無菌150 mM NaCl中，使總體積達1.5 ml。在另一管中，將37.5 μL之PEI (2.0 mg/ml) 稀釋於1.5 ml之無菌150 mM NaCl中。使DNA及PEI溶液在室溫下靜置5分鐘，藉由將管倒轉輕輕混合，且在室溫下靜置約10-20分鐘。立即添加DNA-PEI混合物至F293細胞中且在37°C、8% CO₂培育箱中在以135-150 rpm旋轉之定軌振盪器平台上培育經轉染細胞4小時。隨後添加相同體積新鮮培養基至總體積達30 ml，且培養5-7天。收集細胞進行蛋白質純化及定量。

[0102] 鑑定出總共78個菌落，包括322A6及12A6。

結合親和力分析

[0103] 將ELSA培養盤塗佈每孔100 μL/之人類VEGFR-2、小鼠VEGFR2、人類VEGFR1或人類VEGFR3，在4°C下隔夜，且隨後用PBS淋洗3次，且在37°C下用300 μL/孔之5% MPBS阻斷2小時。孔用PBS淋洗3次，且添加100 μL之抗VEGFR2抗體2倍連續稀釋液並在37°C下培育90 min。捨棄測試溶液且用PBS洗滌3次。添加HRP-抗人類IgG抗體於5% MPBS中之適當稀釋液(1:10000)且在37°C下培育60 min，且孔用PBS洗滌3次。孔用100 μL之基質溶液TMB顯色，且反應藉由添加50 μL之1 M硫酸

終止。顏色變成黃色，且分析OD 650 nm及OD 450 nm。

[0104] 數種抗體之結合親和力的結果展示於圖1及表1中。其展示12A6及322 A6抗體對人類VEGFR-2具有結合親和力。322A6抗體對小鼠VEGFR-2具有結合親和力，但對人類VEGFR-1及VEGFR-3不具有親和力。因此，322A6對VEGFR-2具有特異性。

表1：

分析物	VEGFR-2 (結構域1至7)				
抗體	K _a	K _d	K _D	R _{max} (RU)	Chi ² (RU ²)
12A6	4.488E+4	2.066E-4	4.604E-9	276.9	0.457
322A6	8.247E+5	5.547E-4	6.726E-10	102.2	4.29

[0105] 322A6及12A6之CDR的序列展示於表2中。322A6包含有包含SEQ ID NO：17之胺基酸序列的重鏈可變區，且重鏈可變區由SEQ ID NO：16之核酸序列編碼。322A6包含有包含SEQ ID NO：19之胺基酸序列的輕鏈可變區，且輕鏈可變區由SEQ ID NO：18之核酸序列編碼。12A6包含有包含SEQ ID NO：21之胺基酸序列的重鏈可變區，且重鏈可變區由SEQ ID NO：20之核酸序列編碼。12A6包含有包含SEQ ID NO：23之胺基酸序列的輕鏈可變區，且輕鏈可變區由SEQ ID NO：22之核酸序列編碼。

表2：

樣品	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
322A6	GYAFTTY WMH (SEQ ID NO：4)	MIDFSDS ETKLNQR FKG (SEQ ID NO：5)	DVRGNF DV (SEQ ID NO：6)	RASKSVS TSGYSYM H (SEQ ID NO：7)	LASNLES (SEQ ID NO：8)	QHSRELP WT (SEQ ID NO：9)
12A6	GYSFTDY SMY (SEQ ID NO：10)	YIDPYND DTSYKQK FKG (SEQ ID NO：11)	GYADAM DY (SEQ ID NO：12)	HASQNIN VWLS (SEQ ID NO：13)	KASNLHT (SEQ ID NO：14)	QQGQSY LT (SEQ ID NO：15)

結構域定位分析

[0106] 構築人類VEGFR-2之片段。片段以如上所述之結合親和力分析。結構域定位之結果展示於圖2及圖3及表3及表4中。

表3：

結合結構域	322A6 (45)	12A6
R2 D1-2	-	-
R2 D1-3	-	-
R2 D1-4	-	-
R2 D1-5	-	-
R2 D1-6	-	+++++
R2 D1-7	+++++	+++++
R2 D6-7	+++++	+++++
R2 D6	-	+++
R2 D7	++++	++++

表4：

樣品	結合結構域
322A6	7
12A6	6-7

抗原決定基定位

[0107] 在人類VEGFR-2之結構域6 (SEQ ID NO：2)及結構域7 (SEQ ID NO：3)中，構築若干點突變體。突變體以如上所述之結合親和力分析。突變位點之位置展示於圖4中。12A6之抗原決定基包含位置606處之白胺酸殘基、位置607處之天冬胺酸殘基、位置647處之精胺酸殘基、位置648處之離胺酸殘基及位置649處之蘇胺酸殘基。322A6之抗原決定基包含位置711處之絲胺酸殘基、位置714處之纈胺酸殘基及位置725及位置726處之精胺酸殘基。

抗VEGF R2 Ab-HUVEC增生抑制分析

[0108] 材料：HUVEC (Cascade Biologics，目錄號C-003-5C)，培

培養基200 (Cascade Biologics，目錄號M-200-500)，融合瘤培養基(10% FBS-DMEM)，FBS (Hyclone，#SH30071.03)，DMEM (GIBCO，#11995)，人類CHO VEGF、hVEGF (PROSPEC，目錄號CYT-260)，抗VEGFR2抗體、WST-1 (Roche，目錄號11644807001)。

[0109] 將100 μ L於10% FBS-DMEM中的抗體樣品接種至96孔盤的各孔中，且每個樣品雙重複。收集細胞且將其以 8×10^4 個細胞/毫升懸浮於培養基200中，且在37°C、5% CO₂下培育30分鐘。以培養基200(Medium 200)稀釋hVEGF至50 ng/ml，且將50 μ L之標準hVEGF添加至培養盤中，在37°C、5% CO₂下培育96小時。隨後，將20 μ L之WST-1添加至各孔中且在37°C、5% CO₂下培育4小時。使用ELISA讀取器量測吸光度(OD 450-655 nm)。

[0110] 增生分析之結果展示於圖5中。如圖5中所示，當抗體濃度愈高時，VEGFR-2信號抑制之效果愈強，且HUVEC之數目(OD 450-655 nm)愈少。在抗體當中，12A6具有最強效果，其中IC₅₀ = 3.9 μ g/ml。

抗VEGFR-2抗體至HUVEC中之內在化

[0111] 藉由流式細胞測量術分析抗體至HUVEC中之內在化。

流式細胞測量術(CytoFLEX)

細胞株：HUVEC

第1抗體：322A6

第2抗體：山羊抗人類 κ 輕鏈，Bethyl，目錄A80-115F

培養基200 (M200)，Thermo，目錄C-003-25P-A，低血清生長補充劑(LSGS)。目錄S00310

FBS (Gibco，目錄10082-147)，FACS緩衝劑(1×PBS，1% FBS，0.02%

NaN3)

15 mL法爾康(Falcon)管(Corning，目錄CS352096)

T150：組織培養瓶(TPP，90150)

[0112] 計數HUVEC之細胞數目，且將其與322A6混合並在冰上培育1小時。細胞藉由離心收集，且藉由10 mL冰冷的FACS緩衝劑洗滌3次。將 2×10^5 個細胞/反應/孔(24孔盤)接種於RPMI培養基w/2% FBS中，且隨後在37°C或4°C下培育指定時間段。在各時間點，藉由10 mL冰冷的FACS緩衝劑洗滌細胞，且將第2抗體(α -hIgG-FITC，藉由冰冷的FACS緩衝劑1:200稀釋)添加於冰上持續1小時。藉由10 mL冰冷的FACS緩衝劑洗滌3次之後，將細胞接種(藉由FACS緩衝劑， 2×10^5 個細胞/反應/管)且在37°C或4°C下培育指定時間段。在各時間點，將細胞懸浮且藉由流式細胞測量術及CytExpert軟體分析。

[0113] 結果展示於表5及圖6中。在抗體內在化發生之前(0 min)，藉由流式細胞測量術偵測由抗體結合之HUVEC細胞。在抗體內在化發生之後，抗體自細胞表面易位至細胞內部之核內體，且流式細胞測量術之信號消失。因此，若抗體具有較強的抗體內在化傾向，則與靶細胞之相對結合較少。如表5及圖6中可見，322A6具有較強的抗體內在化傾向。

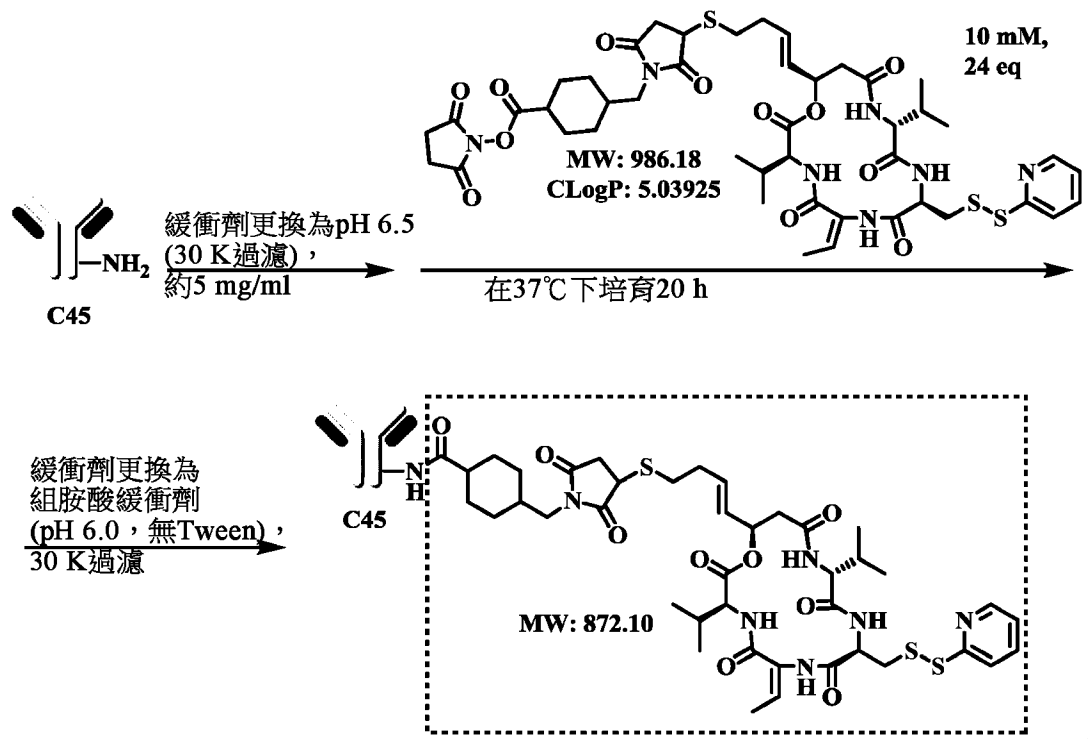
表5：

時間(min)	細胞群體(%)				
	322A6	3	32	59	80
0	31.4	18.1	38.7	31.1	39.9
10	25.1	18.6	35.3	27.0	34.0
30	21.6	17.5	33.7	20.6	35.9
60	15.1	15.1	29.3	17.0	32.9
90	6.8	1.1	25.7	14.6	7.5
120	1.7	3.7	16.1	5.9	5.2

[0114] 亦藉由DeltaVision顯微鏡成像系統在顯微鏡下觀察抗體內在化，且展示於圖7中。以Rab5a作為陽性對照，且以DAPI標記細胞核。藉由同時標記322A6及核內體，其展示322A6成功地內在化至細胞中。

抗VEGFR2抗體與羅米地辛之接合

[0115] 322A6 (C45)抗體根據以下流程與羅米地辛(亦稱為伊斯達斯(Istodax)，抗癌劑)接合：



[0116] 接合條件列於表6中。

表6：

批號	322A6	TMB355-SMCC-Romid-Spy	抗體-藥物接合物 (antibody-drug conjugate；ADC)
14-0151-00-01	1 mg	於DMA中之SMCC-Romid-SPy (160413-1)： 10 mM，24 eq 濃度：5 mg/ml 37°C，17 h	濃度：4.06 µg/µl (回收率：73%) 聚集體：2.1% DAR：1.93

[0117] 藉由尺寸排阻層析(SEC)分析所獲得之抗體-藥物接合物

(ADC) (11-0151-00-01)：

管柱：Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE)

樣品：IgG及IgG-ADC，0.3 mg/mL

樣品體積：100 µL

流速：0.5 mL/min

緩衝劑：1×PBS

系統：ÄKTA

[0118] 層析結果展示於圖8及表7中。亦對ADC進行電泳且展示於圖9中。

表7：

	c45 (322A6)		14-0151-00-01 (322A6之ADC)	
	滯留(mL)	峰面積(%)	滯留(mL)	峰面積(%)
聚集體	-	0.0	7.74	2.1
IgG二聚體	10.61	3.3	10.42	6.0
IgG單體	12.46	95.4	12.34	91.3
片段	19.22+20.30	1.3	19.15	0.6

[0119] 如圖8中所示，所獲得之抗體-藥物接合物具有95.4%之單體及95%之純度。

[0120] 亦如上所述分析ADC之內在化。結果展示於圖10中，且322A6之ADC中的內在化傾向與僅322 A6抗體(c45)中的傾向類似。

[0121] 亦如上所述分析ADC對HUVEC增生的抑制。結果展示於圖11中。單獨的322A6抗體(c45)在抑制HUVEC增生方面之效果適中。其意謂322A6抗體在VEGFR-2訊息傳遞方面之阻斷效果不是非常強。然而，當經處理之322A6與羅米地辛接合時(c45-ADC)，HUVEC之相對細胞存活率顯

著下降。不受理論限制，咸信HUVEC之相對細胞存活率的下降由322A6體之ADC的細胞毒性導致，而非HUVEC增生之抑制。

嵌合抗原受體T細胞(CAR-T)免疫療法

[0122] 自健康供體分離外周血液單核細胞(PBMC)且用具有10% FBS (hyclone)及100 U/mL重組介白素-2 (Roche)之RPMI中的 Dynabeads®人類T活化劑CD3/CD28 (Gibco)刺激48小時。使用人類Pan T細胞分離套組(Miltenyi Biotec)，根據製造商之說明書收集經活化之T細胞。慢病毒載體含有抗VEGFR-2抗體之單鏈可變片段，及4-1BB及CD3-z之信號傳導域。藉由用轉移基因組質體及慢病毒封裝輔助質體pMD2.G及pCMVΔR8.91瞬時轉染HEK293T細胞而產生病毒上清液，且將其用以在塗有RetroNectin之培養盤(TaKaRa Bio Inc.)上轉導人類T細胞。藉由流式細胞測量術分析轉導效率。

[0123] 結果展示於圖12中。定量分析分別展示5.1%、10.4%及7.79%之在T細胞上表現的1121、12A6及322A6 CAR。

抗原受體T細胞之細胞毒性分析

[0124] 藉由使用細胞毒性偵測套組(Roche, Indianapolis, IN, USA)，根據製造商說明書量測細胞毒性活性。將抗VEGFR-2 CAR T細胞與VEGFR2陽性細胞株以指定E:T比率在37°C下一起培育16小時。使用下式計算特異性細胞溶解百分比： $(\text{測試} - \text{效應劑對照} - \text{低對照} / \text{高對照} - \text{低對照}) * 100$ 。高對照在靶細胞於1% Triton X 100中培育之後計算；效應劑對照為單獨的T細胞之自發LDH釋放值；低對照為單獨的靶細胞之自發LDH釋放值。效應細胞：藉由抗VEGFR-2 CAR轉導之原生T細胞(第1次轉導5天後)。靶細胞：FS293 (過度表現的VEGFR-2)。效應細胞及靶細胞共

培養16小時。

[0125] 亦使用CD19之scFv片段製造CAR-T作為對照(CD19)。亦將單獨的T細胞視為對照(T)。1121抗體為特異性結合於VEGFR-2之結構域2及結構域3的已知抗VEGFR-2抗體，該等結構域遠離VEGFR-2中之細胞膜。1121之CAR-T在分析中用於比較。結果展示於圖13中。12A6及322A6之CAR-T均具有比1121之CAR-T強的細胞毒性。不受理論限制，咸信12A6及322A6抗體特異性結合於VEGFR-2之結構域6及／或結構域7，該等結構域靠近VEGFR-2中之細胞膜。

產生放射性、碘結合抗體

[0126] 將1 ml之25 mM Tris-HCl (pH 7.5)及0.4 M NaCl緩衝溶液添加至ODO-gen管中，且隨後捨棄。將100 μ l之緩衝溶液添加至管中，且隨後添加1 μ l之I-123或I-131，在室溫下在輕微振盪下反應6分鐘。添加抗VEGFR-2抗體，在室溫下在輕微振盪下反應6至9分鐘。藉由將反應物轉移至新的微量離心管中來終止反應。藉由85%甲醇顯色溶液及ITLC/SG紙用Radio-TLC分析標記方法之效率。

[0127] 標記方法¹³¹I-抗VEGFR-2-純系45 (322A6)之效率展示於圖14中。超過96.8%之抗體經標記。

放射性碘結合抗體在血清中之穩定性

[0128] 將經標記抗體與來源於人類或大鼠之血清以1:19之體積比混合且在37°C下反應。在第0.25、0.5、1、4、8、24、48及72小時，將800 μ l之10% TCA添加至10 μ l樣品中且混合。含於樣品中之蛋白質藉由冰浴15分鐘沈澱。藉由0.45 μ m PVDF膜過濾上清液且計數液體之比率活性，展現經解離之I-131。穩定性 = (過濾前的活性 - 過濾後的活性)/過濾前的活性。

[0129] 結果展示於表8中，顯示¹³¹I-抗VEGFR-2-純系-45在72小時內在血清中不降解。

表8：

¹³¹ I-抗VEGFR-2-c45在人類及大鼠血清中之放射線結合穩定性，%		
時間(小時)	人類血清	大鼠血清
0	95.06±0.59	89.95±7.08
0.25	94.51±0.68	91.67±5.89
0.5	94.54±0.58	93.11±4.58
1	93.59±0.68	92.52±5.16
4	94.54±0.66	93.56±4.41
8	94.61±0.67	93.65±4.29
24	94.47±0.49	93.21±4.64
48	94.33±0.64	93.06±4.75
72	94.38±0.61	93.17±4.59

藉由放射性碘結合抗體偵測腫瘤

[0130] 採用SPECT/CT，藉由根據本發明之放射線結合抗體偵測腫瘤。於HT-29異種移植小鼠靜脈內注射4至8 μCi/μg之放射性。向各小鼠投予1至2 mg/kg之B.W. ¹³¹I或¹²³I標記的抗VEGFR2抗體。在第1、4、24及48小時，藉由SPECT/CT掃描小鼠。

[0131] 結果展示於圖15中。結果顯示，放射線結合抗體322A6能夠特異性結合於HT-29異種移植腫瘤且放射性信號積聚於腫瘤中。最強信號在第18小時出現於腫瘤中。抗體在第18小時後降解，且幾乎所有抗體在第48小時後降解。

組合療法

[0132] 以6至8週齡之雄性B6 (C57BL/6JNarl)小鼠作為動物模型。小鼠在12小時光亮/黑暗循環下餵食且任意採食PMI飼料(RMH3000-5P76)及水。將小鼠分組為：

第1組：IgG (Mu) (非功能IgG抗體)，15 mpk/i.v.，兩次/週，n = 6

第2組：αCTLA-4 (Mu)，5 mpk/i.v. + IgG (Mu)，10 mpk/i.v.，兩次/週，n = 6

第3組：αCTLA-4 (Mu)，5 mpk/i.v. + 322 A6，10 mpk/i.v.，兩次/週，n = 6

第4組：IgG (Mu)，5 mpk/i.v. + 322 A6，10 mpk/i.v.，兩次/週，n = 6

[0133] 量測腫瘤尺寸且列於表9中。抗CTLA4抗體及抗VEGFR-2抗體(322A6)之組合具有協同效應。

表9：

腫瘤體積(mm ³)	第0天	第4天	第7天	第11天	第14天	第21天
IgG (Mu)，15 mpk	0.0	0.0	30.9	195.3	866.2	3540.5
αCTLA-4 (Mu) 5 mpk + IgG (Mu)10 mpk	0.0	0.0	5.4	211.0	634.6	2425.5
αCTLA-4 (Mu) 5 mpk + 322A6 10 mpk	0.0	0.0	12.7	86.9	365.0	1140.3
IgG(Mu) 5 mpk + 322 A6 10 mpk	0.0	0.0	3.0	174.7	739.5	3240.9

[0134] 亦量測體重且列於表10中，且其顯示所有組之體重大體上相同。

表10：

體重(公克)	第0天	第4天	第7天	第11天	第14天	第21天
IgG (Mu)，15 mpk	25.1	26.2	26.2	26.1	26.1	31.7
αCTLA-4 (Mu) 5 mpk + IgG (Mu)10 mpk	25.0	25.0	25.8	25.6	25.5	28.7
αCTLA-4 (Mu) 5 mpk + 322A6 10 mpk	25.6	25.6	26.2	26.2	26.1	28.2
IgG(Mu) 5 mpk + 322A6 10 mpk	25.4	25.4	26.4	26.2	26.8	31.8

抗體之人源化

[0135] 人類V區框架之選擇：自IMGT資料庫(<http://www.imgt.org/>)及常用VH3/Vk1(4D5)鑑別與322A6框架區具有最高程度的同源性之人類V區框架序列人類生殖系V_L及V_H序列的序列選擇。最後，分別針對VH框

架及VL框架選擇VH3及Vk1之框架序列。標記為Hu之人源化框架來自IMGT資料庫且Hd系列來自4D5框架。

[0136] 全長CDR移植Ab構築：322A6 (HH)由具有6個完整鼠類CDR序列之完整人類框架(VL κ 亞群I及V_H亞群III)組成。322A6(HH)及半人源化(MH或HM)抗體構築體藉由PCR及限制酶切割組裝，用於定向次選殖至經修飾之抗體表現載體pTCAE8.3中。質體含有編碼人類 κ 輕鏈及人類IgG1 C區之DNA片段。全長抗體在Free-style 293細胞中表現。

[0137] 回復突變：選擇純系322A6 (HuB1-Hd)自CDR移植框架進行1-3輪回復突變，用於結合活性恢復。簡言之，吾等藉由5Å鄰近度、上部核心區、界面面積進行電腦模型化來分析CDR移植框架，且亦應用成功案例中最常用之先前經驗。吾等已選擇3輪，可能有5至11個胺基酸發生回復突變。此等位點視為CDR結合及結構之重要位點。在選殖及抗體表現之後，藉由ELISA及BIAcore測定結合活性。具有7個胺基酸回復突變(7+0)的重鏈(HuB1)及輕鏈(Hd)之組合純系為VEGFR2結合之適合候選。

[0138] 人源化抗體Hu322B1HdH係由包含如SEQ ID NO：25所示之胺基酸序列的重鏈可變區，及包含如SEQ ID NO：27所示之胺基酸序列的輕鏈可變區所構築而成。該重鏈可變區係由如SEQ ID NO：24所示之核苷酸序列所編碼，且該輕鏈可變區係由如SEQ ID NO：26所示之核苷酸序列所編碼。V_L片段的比對結果係如圖16所示，V_H片段的比對結果係如圖17所示。

[0139] 本發明係配合前述特定實施例以說明，其替換、調整及變化為本領域中具通常知識者可以理解。這些替換、調整及變化仍屬於本發明之範圍。

【序列表】

<110> 財團法人生物技術發展中心

<120> 抗人類血管內皮生長因子受體之抗體及其應用

<130> 無

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 764

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu
1 5 10 15

Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro
 20 25 30

Arg Leu Ser Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr
 35 40 45

Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro
 50 55 60

Asn Asn Gln Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser
65 70 75 80

Asp Gly Leu Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn
 85 90 95

Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser
 100 105 110

Val Ile Tyr Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser
115 120 125

Val Ser Asp Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys
130 135 140

Thr Val Val Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser
145 150 155 160

Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg
165 170 175

Ile Ser Trp Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile
180 185 190

Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser
195 200 205

Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr
210 215 220

Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
225 230 235 240

Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
245 250 255

Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
260 265 270

Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe
275 280 285

Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
290 295 300

Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
305 310 315 320

Phe Val Arg Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met
325 330 335

Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala
340 345 350

Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly
355 360 365

Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr
370 375 380

Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu
385 390 395 400

Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val
405 410 415

Val Tyr Val Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val
420 425 430

Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr
435 440 445

Ala Ile Pro Pro Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu
450 455 460

Glu Cys Ala Asn Glu Pro Ser His Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr
465 470 475 480

Pro Cys Glu Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys
485 490 495

Ile Glu Val Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys
500 505 510

Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr
515 520 525

Lys Cys Glu Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser
530 535 540

Phe His Val Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln
545 550 555 560

Pro Thr Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser
565 570 575

Thr Phe Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro
580 585 590

Ile His Val Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr
595 600 605

Leu Trp Lys Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile
610 615 620

Leu Ile Met Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr
625 630 635 640

Val Cys Leu Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val
645 650 655

Arg Gln Leu Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn
660 665 670

Leu Glu Asn Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys
675 680 685

Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn
690 695 700

Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg
705 710 715 720

Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr
725 730 735

Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe
740 745 750

Ile Ile Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu
755 760

<210> 2
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln Pro Thr Glu Gln Glu Ser
1 5 10 15

Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser Thr Phe Glu Asn Leu Thr
20 25 30

Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro Ile His Val Gly Glu Leu
35 40 45

Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr Leu Trp Lys Leu Asn Ala
50 55 60

Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile Leu Ile Met Glu Leu Lys
65 70 75 80

Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Val Cys Leu Ala Gln Asp
85 90 95

Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val Arg Gln Leu Thr
100 105 110

<210> 3
<211> 87
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Pro Thr Ile Thr Gly Asn Leu Glu Asn Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu
1 5 10 15

Ser Ile Glu Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile
20 25 30

Met Trp Phe Lys Asp Asn Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val
35 40 45

Leu Lys Asp Gly Asn Arg Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu
50 55 60

Asp Glu Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala
65 70 75 80

Lys Val Glu Ala Phe Phe Ile
85

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

Gly Tyr Ala Phe Thr Thr Tyr Trp Met His
1 5 10

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

Met Ile Asp Phe Ser Asp Ser Glu Thr Lys Leu Asn Gln Arg Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6

Asp Val Arg Gly Asn Phe Asp Val
1 5

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 9

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Ser Met Tyr
1 5 10

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 11

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Asp Thr Ser Tyr Lys Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 12

Gly Tyr Ala Asp Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 13

His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 14
<211> 7

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 14

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 15

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 16
<211> 351
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(351)

<400> 16
gag gtg cag ctg cag cag tct ggg cct cag ctg gtt agg cct ggg gct 48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gln Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

tca gcg aag ata tcc tgc aag gct tct ggt tac gca ttc acc acc tac 96
Ser Ala Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

tgg atg cac tgg gtg aaa cag agg cct gga caa ggt ctt gag tgg att 144
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

ggc atg att gat ttt tcc gat agt gaa act aag tta aat cag agg ttc 192
Gly Met Ile Asp Phe Ser Asp Ser Glu Thr Lys Leu Asn Gln Arg Phe
50 55 60

aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac 240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg caa ctc agc agc ccg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt 288
Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca aga gat gtc aga ggg aac ttc gat gtc tgg ggc gca ggg acc acg 336
Ala Arg Asp Val Arg Gly Asn Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
100 105 110

gtc acc gtc tcc tca 351
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 117
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 17

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

Ser Ala Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Met Ile Asp Phe Ser Asp Ser Glu Thr Lys Leu Asn Gln Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Val Arg Gly Asn Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 336
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(336)

<400> 18
gat att gtg ttg aca cag tct cct gct tcc tta gct gta tct ctg ggg 48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

cag agg gcc acc atc tca tgc agg gcc agc aaa agt gtc agt aca tct 96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

ggc tat agt tat atg cac tgg tac caa cag aaa cca gga cag cca ccc 144
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

aaa ctc ctc atc tat ctt gca tcc aac cta gaa tct ggg gtc cct gcc 192
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc aac atc cat 240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

cct gtg gag gag gag gat gct gca acc tat tac tgt cag cac agt agg 288
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

gag ctt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa cgt 336
Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 19
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 19

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 20
<211> 351
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(351)

<400> 20
cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg gtg aag cct ggg gct 48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act gac tac 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

agc atg tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt gag tgg att 144
Ser Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

gga tat att gat cct tac aat gat gat act agc tac aag cag aag ttc 192
Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Asp Thr Ser Tyr Lys Gln Lys Phe
50 55 60

aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc aca gcc ttc 240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80

atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt 288
Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca aag ggt tac gcg gat gct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca 336
Ala Lys Gly Tyr Ala Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

gtc acc gtc tcc tca 351
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 117
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 21

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Asp Thr Ser Tyr Lys Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Tyr Ala Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 324
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 22
gat att cag atg att cag tct cca tcc agt ctg tct gca tcc ctt gga 48
Asp Ile Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

gac aca att acc atc act tgc cat gcc agt cag aac att aat gtt tgg 96
Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

tta age tgg tac cag cag aaa cca gga aat att cct aaa cta ttg atc 144
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat aag gct tcc aac ttg cac aca ggc gtc cca tca agg ttt agt ggc 192
Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct gga aca ggt ttc aca tta acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gac att gcc acc tac tac tgt caa cag ggt caa agt tat ccg ctc 288
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgg 324
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 23
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 23
Asp Ile Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 24
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(351)

<400> 24
caa gtg cag ctg gtg cag tct ggc gcc gaa gtg aag aaa cca ggc gcc 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

agc gtg aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac gcc ttc acc acc tac 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

tgg atg cat tgg gtg cgc cag gcc cct gga cag ggc ctg gaa tgg atc 144
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

ggc atg atc gac ttc agc gac agc gag aca aag ctg aac cag cgg ttc 192
Gly Met Ile Asp Phe Ser Asp Ser Glu Thr Lys Leu Asn Gln Arg Phe
50 55 60

aag ggc aag gcc acc ctg acc gtg gac aag agc acc agc acc gcc tac 240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc 288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gct aga gat gtg cgg ggc aac ttc gac gtg tgg ggc cag gga aca ctc 336
Ala Arg Asp Val Arg Gly Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

gtg acc gtg tct agc 351
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 25

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Met Ile Asp Phe Ser Asp Ser Glu Thr Lys Leu Asn Gln Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Val Arg Gly Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(336)

<400> 26
gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg tct gcc agc gtg ggc 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac aga gtg acc atc acc tgt cgg gcc agc aag agc gtg tcc acc agc 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

ggc tac agc tac atg cac tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc 144
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

aag ctg ctg atc tac ctg gcc agc aac ctg gaa agc ggc gtg ccc agc 192
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

aga ttt tcc ggc agc ggc tct ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc 240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

tcc ctg cag ccc gag gac ttc gcc acc tac tac tgc cag cac agc aga 288
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

gag ctg ccc tgg acc ttt ggc cag ggc acc aag gtg gaa atc aag cgg 336
Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 27
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu 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 Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110



201736399

申請日: 105/12/29

【發明摘要】

IPC分類: **G07K 16/22** (2006.01)
G07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

【中文發明名稱】

抗人類血管內皮生長因子受體之抗體及其應用

【英文發明名稱】

ANTI-VEGFR ANTIBODY AND USES THEREOF

【中文】

本發明關於一種抗體或其抗原結合片段，其與人類第二型血管內皮生長因子受體（vascular endothelial growth factor receptor 2，VEGFR-2）結合。本發明亦關於一種於一需要個體中抑制VEGFR-2調控之訊息傳遞的方法、一種治療患有由VEGFR-2之活性及／或訊息傳遞所導致或與其相關聯疾病及／或失調之個體之方法、一種治療患有腫瘤之個體之方法、一種於一需要個體中抑制內皮細胞之細胞增生的方法及一種偵測一樣品中之人類第二型血管內皮生長因子受體的方法。

【英文】

The present invention relates to an antibody or antigen-binding fragment thereof that bind human vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2). The present invention also relates to a method for inhibiting VEGFR-2-mediated signaling in a subject in need, a method for treating diseases and/or disorders caused by or related to VEGFR-2 activity and/or signaling in a subject afflicted with the diseases and disorders, a method for treating tumor in a subject afflicted with the tumor, a method for inhibiting cell proliferation of endothelial cells in a subject in need, and a method for detecting human vascular endothelial growth factor

receptor in a sample.

【指定代表圖】

圖4

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種與人類第二型血管內皮生長因子受體（vascular endothelial growth factor receptor 2，VEGFR-2）或其片段中的一抗原決定基特異性結合的抗體或其抗原結合片段，其中該人類第二型血管內皮生長因子受體具有如SEQ ID NO：1所示之胺基酸序列，且該抗原決定基包含：

SEQ ID NO：1中第606位點之白胺酸、第607位點之天冬胺酸、第647位點之精胺酸、第648位點之離胺酸及第649位點之蘇胺酸；或

SEQ ID NO：1中第711位點之絲胺酸、第714位點之纈胺酸及第725及726位點之精胺酸。

【第2項】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其係為一哺乳類抗體。

【第3項】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區之互補決定區（complementarity determining regions，CDRs）及輕鏈可變區之互補決定區，其中該重鏈可變區之互補決定區包含CDRH1、CDRH2及CDRH3區，且該輕鏈可變區之互補決定區包含CDRL1、CDRL2及CDRL3區，該CDRH1區包含如SEQ ID NO：4所示之胺基酸序列或其實質相似序列；該CDRH2區包含如SEQ ID NO：5所示之胺基酸序列或其實質相似序列；該CDRH3區包含如SEQ ID NO：6所示之胺基酸序列或其實質相似序列；該CDRL1區包含如SEQ ID NO：7所示之胺基酸序列或其實質相似序列；該CDRL2區包含如SEQ ID NO：8所示之胺基酸序列或其實質相似序列；及該CDRL3區包含如SEQ ID NO：9所示之胺基酸序列或其實質相似序列。

【第4項】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區之互補決定區（CDRs）及輕鏈可變區之互補決定區，其中該重鏈可變區之互補決定區包含CDRH1、CDRH2及CDRH3區，且該輕鏈可變區之互補決定區包含CDRL1、CDRL2及CDRL3區，該CDRH1區包含如SEQ ID NO：10所示之胺基酸序列或其實質相似序列；該CDRH2區包含如SEQ ID NO：11所示之胺基酸序列或其實質相似序列；該CDRH3區包含如SEQ ID NO：12所示之胺基酸序列或其實質相似序列；該CDRL1區包含如SEQ ID NO：13所示之胺基酸序列或其實質相似序列；該CDRL2區包含如SEQ ID NO：14所示之胺基酸序列或其實質相似序列；及該CDRL3區包含如SEQ ID NO：15所示之胺基酸序列或其實質相似序列。

【第5項】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其包含一重鏈可變區，包含如SEQ ID NO：17所示之胺基酸序列或其實質相似序列；及一輕鏈可變區，包含如SEQ ID NO：19所示之胺基酸序列或其實質相似序列。

【第6項】

如請求項5之抗體或其抗原結合片段，其中該重鏈可變區域係由如SEQ ID NO：16所示之核苷酸序列所編碼；該輕鏈可變區域係由如SEQ ID NO：18所示之核苷酸序列所編碼。

【第7項】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其包含一重鏈可變區，包含如SEQ ID NO：21所示之胺基酸序列或其實質相似序列；及一輕鏈可變區，包含如SEQ ID NO：23所示之胺基酸序列或其實質相似序列。

【第8項】

如請求項5之抗體或其抗原結合片段，其中該重鏈可變區域係由如SEQ ID NO：22所示之核苷酸序列所編碼；該輕鏈可變區域係由如SEQ ID NO：24所示之核苷酸序列所編碼。

【第9項】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其包含一重鏈可變區，包含如SEQ ID NO：25所示之胺基酸序列或其實質相似序列；及一輕鏈可變區，包含如SEQ ID NO：27所示之胺基酸序列或其實質相似序列。

【第10項】

如請求項5之抗體或其抗原結合片段，其中該重鏈可變區域係由如SEQ ID NO：24所示之核苷酸序列所編碼；該輕鏈可變區域係由如SEQ ID NO：26所示之核苷酸序列所編碼。

【第11項】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其係與一治療劑接合。

【第12項】

如請求項11之抗體或其抗原結合片段，其中該治療劑係選自由抗代謝物、烷化劑、類烷化劑、DNA小溝槽烷化劑、蒽環類藥物（anthracyclines）、抗生素、卡其黴素（calicheamicins）、抗有絲分裂劑、拓撲酶抑制劑、HDAC抑制劑、蛋白酶體抑制劑及放射線同位素所組成之群組。

【第13項】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其係表現於一細胞之表面。

【第14項】

如請求項13之抗體或其抗原結合片段，其中該細胞係為一T細胞。

【第15項】

一種於一需要個體中抑制VEGFR-2調控之訊息傳遞的方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含請求項1之抗體或其抗原結合片段。

【第16項】

一種治療患有由VEGFR-2之活性或訊息傳遞所導致或與其相關聯疾病或失調之個體之方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含請求項1之抗體或其抗原結合片段。

【第17項】

一種治療患有腫瘤之個體之方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含請求項1之抗體或其抗原結合片段。

【第18項】

如請求項17之方法，該腫瘤為實體腫瘤。

【第19項】

如請求項18之方法，該腫瘤係選自由腎細胞癌、胰腺癌、乳癌、頭頸部癌、前列腺癌、惡性膠質瘤、骨肉瘤、大腸直腸癌、胃癌、惡性間皮瘤、多發性骨髓瘤、卵巢癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、滑膜肉瘤、甲狀腺癌或黑色素瘤。

【第20項】

一種於一需要個體中抑制內皮細胞之細胞增生的方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含請求項1之抗體或其抗原結合片段。

【第21項】

一種偵測一樣品中之人類第二型血管內皮生長因子受體的方法，包含

將該樣品與請求項1之抗體或其抗原結合片段接觸。

【第22項】

如請求項21之方法，係用以偵測VEGFR-2之第六至第七結構域。

【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗VEGFR抗體及其應用

【英文發明名稱】

ANTI-VEGFR ANTIBODY AND USES THEREOF

【技術領域】

[0001] 本發明係關於一種抗體或其抗原結合片段及其應用，該抗體或其抗原結合片段針對人類血管內皮生長因子受體（VEGFR）具特異性。

【先前技術】

[0002] 血管內皮生長因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）之訊息傳遞路徑的功能即是促進血管新生，血管新生係指由原有血管形成新的微血管。血管新生的調控異常和許多疾病的致病機轉有關，同時也是多種癌症的一個特徵。參與此訊息傳遞最主要的即是血管內皮生長因子家族的蛋白質及其受體，此路徑的活化會引發複雜的訊息傳遞網絡，促進血管內皮細胞的生長、移動和存活。此訊息傳遞路徑被認為與腫瘤血管新生有密切關連，因此抑制血管內皮生長因子訊息路徑為腫瘤血管新生的重要調控點。

[0003] 血管內皮生長因子包括一群序列高度保守的同源（homologous）雙體醣蛋白（dimeric glycoprotein），以雙硫鍵連結二條分子量各為24 kDa的單鏈分子後才具有生物活性。目前已知的血管內皮生長因子家族成員有VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D與胎盤生長因子（placenta growth factor，PlGF），其中VEGF-A最早被發現且研究最為透徹，其在血管新生中扮演關鍵性的角色。

[0004] 當血管內皮生長因子與血管內皮生長因子受體（VEGF receptor，VEGFR）結合時，血管內皮生長因子受體會形成雙體，並互相磷酸化。血管內皮生長因子受體的細胞外結構域共有七個似免疫球蛋白結構域（Ig-like domains），大致來說，第一至第三結構域負責受體與配體的結合，而第四至第七結構域則負責受體間雙體化，並導致磷酸化及下游的訊息傳遞。

[0005] 血管內皮生長因子受體屬於酪胺酸激酶（tyrosine kinase，TK）家族的成員之一，在細胞訊息傳遞過程中扮演極重要的角色，可以將細胞外誘導細胞生長、繁殖、以及抗凋亡的訊號傳遞到細胞內。血管內皮生長因子受體分為三類，分別為VEGFR-1（或稱flt-1）、VEGFR-2（或稱KDR/flk-1）與VEGFR-3（或稱flt-4）。VEGF-A會和VEGFR-1及VEGFR-2結合，兩種受體均表現於血管內皮細胞，而血管內皮生長因子的訊號最主要是經由第二型血管內皮生長因子受體傳達。第一型血管內皮生長因子受體與配體的結合能力較第二型血管內皮生長因子受體強了十倍以上，但卻只有相對較弱的激酶活性。第三型血管內皮生長因子受體則主要表現於淋巴內皮細胞上。

[0006] 目前已知腫瘤的血管新生除了由原有的周邊血管內皮細胞增生形成外，也可藉由VEGFR-2的調控吸引血管內皮母細胞移動至腫瘤內或其周邊，再分化為血管內皮細胞。由於和血管內皮生長因子有關的血管新生只發生於傷口修復和婦女生理週期時，阻斷血管內皮生長因子訊息路徑對於正常生理作用的影響有限，因此抑制血管內皮生長因子訊息路徑便成為抑制腫瘤血管新生的重要調控點，進而導致腫瘤細胞死亡。血管內皮生長因子已知在多種實體腫瘤中有過度表現的情形，如大腸直腸癌、乳癌、

前列腺癌、肺癌等。

[0007] 因此，仍需發展新的方法，以阻斷血管內皮生長因子之信息傳遞路徑。

【發明內容】

[0008] 本發明提供一種抗體或其抗原結合片段，其與人類第二型血管內皮生長因子受體（vascular endothelial growth factor receptor 2，VEGFR-2）或一人類第二型血管內皮生長因子受體片段結合。本發明之抗體可用於抑制VEGFR-2所調控之訊息傳遞，及治療由VEGFR-2之活性或訊息傳遞所導致或與其相關聯疾病或失調。本發明之抗體亦可用於抑制內皮細胞之細胞增生。

[0009] 本發明提供一種於一需要個體中抑制VEGFR-2調控之訊息傳遞的方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含前述之抗體或其抗原結合片段。

[0010] 本發明提供一種治療患有由VEGFR-2之活性或訊息傳遞所導致或與其相關聯疾病或失調之個體之方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含前述之抗體或其抗原結合片段。

[0011] 本發明提供一種治療患有腫瘤之個體之方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含前述之抗體或其抗原結合片段。

[0012] 本發明提供一種於一需要個體中抑制內皮細胞之細胞增生的方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含前述之抗體或其抗原結合片段。

[0013] 本發明提供一種偵測一樣品中之人類第二型血管內皮生長因子受體的方法，包含將該樣品與請前述之抗體或其抗原結合片段接觸。

[0014] 本發明將於下述段落中詳述，本發明之其他特徵、目的及優點可見於實施方式及申請專利範圍中。

【圖式簡單說明】

[0015] 圖1展示本發明抗體對小鼠VEGFR-2、人類VEGFR-1或VEGFR-3之結合親和力分析的ELISA結果。

[0016] 圖2展示本發明抗體之結合域定位(結構域1至結構域3及結構域4至結構域7)的ELISA結果。

[0017] 圖3展示本發明抗體之結合域定位的ELISA結果。

[0018] 圖4展示本發明抗體之抗原決定基定位的ELISA結果。

[0019] 圖5展示本發明抗體之HUVEC增生抑制分析。

[0020] 圖6藉由流式細胞測量術展示本發明抗體之抗體內在化至HUVEC中之結果。

[0021] 圖7展示藉由DeltaVision顯微鏡成像系統觀測之抗體內在化結果。

[0022] 圖8展示根據本發明之抗體-藥物接合物(ADC)的尺寸排阻層析分析結果。

[0023] 圖9展示根據本發明之抗體-藥物接合物的電泳分析結果。

[0024] 圖10藉由流式細胞測量術展示根據本發明之ADC抗體內在化至HUVEC中之結果。

[0025] 圖11展示本發明之ADC之HUVEC增生抑制分析。

[0026] 圖12展示根據本發明之嵌合抗原受體T細胞(CAR-T)藉由流式細胞測量術之定量分析。

[0027] 圖13展示根據本發明之嵌合抗原受體T細胞的細胞毒性分析。

[0028] 圖14展示用放射性同位素標記根據本發明之抗體的效率。

[0029] 圖15展示藉由放射線標記根據本發明之抗體在HT-29異種移植小鼠之NanoSPECT/CT中之腫瘤偵測的結果。

[0030] 圖16展示人源化、小鼠及人類抗體之V_L片段的比對。M：322A6；Hd：Hu322B1HdH。

[0031] 圖17展示人源化、小鼠及人類抗體之V_H片段的比對。M：322A6；Hu：人類模板IGHV1-46*01 F；HuB1：Hu322B1HdH。

【實施方式】

[0032] 本發明提供一種抗體或其抗原結合片段，其與人類第二型血管內皮生長因子受體（vascular endothelial growth factor receptor 2，VEGFR-2）或一人類第二型血管內皮生長因子受體片段結合。

[0033] 詳言之，本發明之抗體或其抗原結合片段與人類第二型血管內皮生長因子受體或其片段中的一抗原決定基特異性結合，其中該人類第二型血管內皮生長因子受體具有如SEQ ID NO：1所示之胺基酸序列，且該抗原決定基包含：

SEQ ID NO：1中第606位點之白胺酸、第607位點之天冬胺酸、第647位點之精胺酸、第648位點之離胺酸及第649位點之蘇胺酸；或

SEQ ID NO：1中第711位點之絲胺酸、第714位點之纈胺酸及第725及726位點之精胺酸。

[0034] 本發明之抗體可以是全長的（例如IgG1或IgG4抗體），或可僅包含一個抗原結合部分（例如Fab、F(ab')₂或scFv片段），並可加以修飾以影響其功能。

[0035] 本發明之抗體或其抗原結合片段與VEGFR-2或其片段中的一

抗原決定基特異性結合。VEGFR-2，或稱KDR或flk-1，係為一種血管內皮生長因子的受體，且藉由與配體（ligand）結合時，其形成雙體並互相磷酸化而活化。VEGFR-2的細胞外區域共有七個似免疫球蛋白結構域（Ig-like domains），大致來說，第一至第三結構域負責受體與配體的結合，而第四至第七結構域則負責受體間雙體化，並導致磷酸化及下游的訊息傳遞。較佳地，本發明之抗體或其抗原結合片段結合至VEGFR-2之細胞外區域的第六至第七結構域。

[0036] 本發明包含一種抗VEGFR-2抗體及抗原結合片段，其以高度親和力結合至單體或雙體化之VEGFR-2分子。

[0037] 於本發明一較佳實施例中，VEGFR-2具有如SEQ ID NO：1所示之胺基酸序列；VEGFR-2之細胞外區域的第六結構域具有如SEQ ID NO：2所示之胺基酸序列；VEGFR-2之細胞外區域的第七結構域具有如SEQ ID NO：3所示之胺基酸序列。

[0038] 本發明所屬技術領域中具通常知識者已知許多技術可用於確定一個抗體是否與一個多肽或蛋白內的「一個或多個胺基酸特異性結合」。示範性技術包括，例如Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., N.Y.)中所述的慣用交聯-阻斷分析、丙胺酸掃描突變分析、肽印跡分析（Reineke, 2004, Methods Mol Biol 248:443-463），以及肽切割分析。另外，還可採用諸如抗原的抗原決定基切除、抗原決定基提取和化學修飾的方法（Tomer, 2000, Protein Science 9：487-496）。可用於鑑定多肽內與抗體特異性結合的胺基酸的另一方法是用質譜檢測的氫/氘交換。總的說來，氫/氘交換法涉及用氘標記所關注的蛋白，隨後使抗體與氘標記的蛋白結合。然後，將該蛋白/抗體複合物轉移至水中，除了

受抗體保護的殘基（其維持氙標記狀態），讓所有殘基均發生氫-氙交換。在抗體解離後，進行標靶蛋白的蛋白酶裂解和質譜分析，從而揭示與抗體相互作用的特定胺基酸對應的那些氙標記的殘基。參閱例如Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259；Engen and Smith (2001) *Anal.Chem.* 73:256A-265A。

[0039] 於本發明一較佳實施例中，該抗原決定基包含SEQ ID NO：1 中第606位點之白胺酸、第607位點之天冬胺酸、第647位點之精胺酸、第648位點之離胺酸及第649位點之蘇胺酸。

[0040] 於本發明另一較佳實施例中，該抗原決定基包含SEQ ID NO：1 中第711位點之絲胺酸、第714位點之纈胺酸及第725及726位點之精胺酸。

[0041] 本發明另包含一種抗VEGFR-2抗體，其特異性結合至相同抗原決定基。類似地，本發明亦包含一種抗VEGFR-2抗體，其與此處所述之任何特定範例抗體競爭結合VEGFR-2。

[0042] 使用本領域內周知的慣用方法，可以輕易地確定一種抗體是否與本發明之對照抗EGFR抗體一樣，與同樣的抗原決定基結合，或在結合過程中競爭。例如，為了確定一種試驗抗體是否與本發明之對照抗VEGFR-2抗體一樣與同樣的抗原決定基結合，可讓該對照抗體與一個VEGFR-2蛋白（例如該VEGFR-2胞外結構域的一個可溶性部分或細胞表面表現的VEGFR-2）結合。然後，評估試驗抗體與該VEGFR-2分子結合的能力。如果該試驗抗體在與對照抗VEGFR-2抗體飽和結合之後能夠與VEGFR-2結合，就可得出結論，該試驗抗體和對照抗VEGFR-2抗體分別與不同的抗原決定基結合。在另一方面，如果該試驗抗體在與對照抗VEGFR-2抗體飽和結合之後不能與VEGFR-2分子結合，則該試驗抗體的抗

原決定基就可能與本發明之對照抗VEGFR-2抗體所結合的抗原決定基相同。然後可進行其他常規的實驗（例如肽突變和結合分析），以確定所觀察到試驗抗體無法結合的原因，實際上是由於與對照抗體所結合的抗原決定基相同，或是空間位阻（或另一現象）而導致。這類實驗可採用ELISA、RIA、Biacore、流式細胞計數法或本領域內可供利用的任何其他定量或定性的抗體結合分析法來完成。按照本發明之某些實施例，如果例如1倍、5倍、10倍、20倍或100倍過量的抗體對另一抗體結合的抑制作用達至少50%，但較佳的是75%、90%或甚至99%（如競爭結合分析所測量），則兩種抗體就是與同一個（或重疊的）抗原決定基結合。或者，如果抗原中減弱或消除一個抗體結合的幾乎所有胺基酸突變都能減弱或消除另一個抗體的結合，則可認為兩個抗體與相同的抗原決定基結合。若能減弱或消除一個抗體的結合的胺基酸突變，僅有一部分能減弱或消除另一個抗體的結合，則可認為兩個抗體具有「重疊的抗原決定基」。

[0043] 為了確定一抗體是否與對照抗VEGFR-2抗體在結合過程中競爭，可在兩個方面上實施上述結合方法：第一個方面，在飽和條件下讓對照抗體與一個VEGFR-2蛋白（例如該VEGFR-2胞外結構域的可溶部分或細胞表面表現的VEGFR-2）結合，隨後評估該試驗抗體與VEGFR-2分子的結合情況。第二個方面，在飽和條件下讓試驗抗體與VEGFR-2分子結合，然後評估對照抗體與該VEGFR-2分子的結合。如果在這兩個方向只有第一個（飽和）抗體能夠與VEGFR-2分子結合，那就可以得出結論，該試驗抗體與對照抗體在與VEGFR-2結合過程中競爭。如同本領域習知技藝人士所能理解的，與對照抗體在結合過程中競爭的抗體，其抗原決定基未必與對照抗體所結合之抗原決定基相同，但可能與一重疊或鄰近的抗原決定基結

合，而在空間上阻斷該對照抗體之結合。

[0044] 本文所用的術語「抗體」意為包含至少一個互補決定區（complementarity determining region，簡稱CDR）的任何抗原結合分子或分子複合體，該互補決定區特異性地與一個特定的抗原（如VEGFR-2）結合或與其相互作用。術語「抗體」包括由四條多肽鏈，即兩條重（H）鏈和兩條輕（L）鏈，以雙硫鍵相互連接而組成的免疫球蛋白分子，及其多聚體（例如IgM）。每條重鏈均包含一個重鏈可變區（heavy chain variable region，本文簡稱HCVR或V_H）和一個重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個域，C_{H1}、C_{H2}和C_{H3}。每條輕鏈均包含一個輕鏈可變區（本文簡稱LCVR或V_L）和一個輕鏈恆定區。該輕鏈恆定區包含一個域（C_{L1}）。V_H和V_L區可進一步分成被稱為互補決定區（CDRs）的高變異區域，以及散佈於其中的被稱為框架區（frame work regions，FR）的保守區域。每個V_H和V_L均由三個CDR和四個FR組成，從胺基端到羧基端按以下順序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本發明的另一些實施例中，抗VEGFR抗體（或其抗原結合部分）的FRs可能與人類種系序列相同，或可能經過天然或人工的修飾。一個胺基酸共有序列可根據兩個或兩個以上CDR的並排分析而予以定義。

[0045] 本文所用的術語「抗體」還包括整個抗體分子的抗原結合片段。本文所用的抗體的「抗原結合部分」、抗體的「抗原結合片段」等術語，包括與一個抗原特異性結合而形成複合體的任何天然產生的、以酶促方式獲得的、合成的或基因改造的多肽或糖蛋白。抗體的抗原結合片段可以利用任何適宜的標準技術，例如蛋白水解消化或涉及編碼抗體可變區或恆定區的DNA之操縱和表現的重組基因改造技術，例如從完整的抗體分子

產生。這樣的DNA是已知及／或容易從例如商業來源、DNA資料庫（包括例如噬菌體-抗體資料庫）獲得，或可為合成而得。該DNA可被定序，且可以化學方法或分子生物學技術加以操縱，例如將一個或多個可變區及／或恆定區排列成一種合適的構型，或引入密碼子、產生半胱胺酸殘基、修飾、添加或刪除胺基酸等。

[0046] 抗原結合片段的非限制性實例包括：(i) Fab片段；(ii) F(ab')₂片段；(iii) Fd片段；(iv) Fv片段；(v)單鏈Fv(scFv)分子；(vi) dAb片段；以及(vii)由模擬該抗體高變區（例如：一個孤立的互補決定區CDR，如一CDR3胜肽）或一個受限制之FR3-CDR3-FR4胜肽的胺基酸殘基組成的最小識別單位。其他工程分子，如結構域特異性抗體、單域抗體、結構域刪除的抗體、嵌合抗體、CDR移植抗體、雙抗體、三聚抗體、四聚抗體、微型抗體、奈米抗體（例如單價奈米抗體、二價奈米抗體等）、小模組化免疫藥物（SMIP），以及鯊魚可變IgNAR域，也包括在本文所用的「抗原結合片段」這一表述中。

[0047] 一個抗體的抗原結合片段通常包含至少一個可變區。可變區可以是任何尺寸或具有任何胺基酸組成，且通常包含至少一個CDR，其鄰近或位於一或多個框架序列之框架內。在含有與V_L區相關聯之V_H區的抗原結合片段中，該V_H區和V_L區的相對位置可處於任何適宜的排列。例如，該可變區可為二聚化且含有V_H-V_H、V_H-V_L或V_L-V_L二聚體。或者，一個抗體的抗原結合片段可含有一個單一的V_H區或V_L區。

[0048] 在某些實施例中，一個抗體的抗原結合片段可含有與至少一個恆定區共價連接的至少一個可變區。在本發明之抗體的抗原結合片段內可發現的可變區和恆定區的非限制性示範性構型包括：(i) V_H-C_{H1}；(ii)

V_H-C_{H2} ; (iii) V_H-C_{H3} ; (iv) $V_H-C_{H1}-C_{H2}$; (v) $V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (vi) $V_H-C_{H2}-C_{H3}$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_{H1} ; (ix) V_L-C_{H2} ; (x) V_L-C_{H3} ; (xi) $V_L-C_{H1}-C_{H2}$; (xii) $V_L-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (xiii) $V_L-C_{H2}-C_{H3}$; 以及 (xiv) V_L-C_L 。

在可變區和恆定區的任何構型中，包括上述任何示範性構型，該可變區和恆定區可直接地相互連接或可藉由一個完全的或部分的鉸鏈區或連接區連接。一個鉸鏈區可含有至少2個（例如5、10、15、20、40、60個或更多的）胺基酸，其在一個單一肽分子中相鄰的可變區及／或恆定區之間形成一種具彈性或半彈性的連接。此外，本發明之抗體的抗原結合片段可包含上述可變區和恆定區的任何構型的同二聚體或異二聚體（或其他多聚體），該可變區和恆定區以非共價鍵相互連接及／或與一或多個單一的 V_H 區或 V_L 區（例如通過雙硫鍵）連接。

[0049] 如同完整的抗體分子，抗原結合片段可以是單特異性或多特異性（例如雙特異性）。一個抗體的多特異性抗原結合片段通常包含至少兩個不同的可變區，其中每個可變區能夠特異性地與另一個抗原或同一抗原的不同抗原決定基結合。對於任何多特異性抗體形式，包括本文所揭露的示範性雙特異性抗體形式，均可用本領域內可利用的慣用技術，使其可可用於涉及本發明之抗體的抗原結合片段的用途。

[0050] 較佳地，根據本發明之該抗體或其抗原結合片段係為一哺乳類抗體。

[0051] 本文所用的術語「哺乳類抗體」意在包括含有衍生自哺乳類種系（*germline*）免疫球蛋白序列的可變區和恆定區的抗體。本發明之哺乳類抗體可包括非由哺乳類種系免疫球蛋白序列編碼的胺基酸殘基（例如通過體外隨機誘變或位點特異性誘變，或通過體內體細胞突變所引入的突

變)，例如可在CDR中，尤其是在CDR3中包括上述胺基酸殘基。

[0052] 本文所用的術語「重組哺乳類抗體」意在包括所有以重組方法製備、表現、產生或分離的哺乳類抗體，例如用轉染到宿主細胞中的重組表現載體表現的抗體（將在下文進一步描述），從重組的、組合的人抗體庫分離的抗體（將在下文進一步描述），從人類免疫球蛋白基因轉基因的動物（例如小鼠）分離的抗體，或者以任何其他涉及將哺乳類免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列上的方法所製備、表現、產生或分離的抗體。這類重組哺乳類抗體含有衍生自哺乳類種系免疫球蛋白序列的可變區和恆定區。但是，在某些實施例中，這類重組哺乳類抗體經受體外誘變（或當使用人類Ig序列轉基因動物時，經受體內體細胞誘變），從而使得該重組抗體的V_H區和V_L區的胺基酸序列成為這樣的序列：它們雖然衍生自人類種系V_H序列和V_L序列並與人類種系V_H序列和V_L序列序列有親緣關係，但也許並不天然地存在於所有的哺乳類種系體內抗體之中。

[0053] 哺乳類抗體，例如人類抗體，具有兩種與鉸鏈異質性有關的形式。在第一種形式中，一個免疫球蛋白分子包含一個約150-160 kDa的穩定的四鏈構建物，其中兩個二聚體由鏈間重鏈雙硫鍵連接在一起。在第二種形式中，該二聚體不是由鏈間雙硫鍵連接在一起，而是形成由共價偶聯的輕鏈和重鏈（半抗體）組成的約75-80 kDa的分子。分離這些形式極為困難，甚至在親和純化之後也是如此。

[0054] 本文披露的抗VEGFR-2抗體與衍生該抗體的相應種系序列相比，在重鏈和輕鏈可變區的框架區及／或CDR區可包含一個或多個胺基酸的取代、插入及／或缺失。通過將本文披露的胺基酸序列與從例如公共抗體序列數據庫可獲得的種系序列相比，可以輕易地證實這類突變。本發明

包括衍生自本文所披露的任何胺基酸序列的抗體及其抗原結合片段，其中一或多個框架區及／或CDR區內的一或多個胺基酸突變為衍生該抗體的種系序列的相應殘基，或突變為另一個哺乳類種系序列的相應殘基，或突變為相應的種系序列殘基的保守胺基酸取代（這類序列變化在本文中統稱為「種系突變」）。本發明所屬技術領域中具通常知識者從本文披露的重鏈和輕鏈可變區序列開始，能夠輕易地產生許多包含一個或多個單個種系突變或其組合的抗體及其抗原結合片段。在某些實施例中，上述V_H及／或V_L區內的所有框架及／或CDR殘基均回復突變為在衍生該抗體的原始種系序列中發現的殘基。在其他實施例中，只有某些殘基才回復突變為原始種系序列，例如，只有FR1的最先8個胺基酸或FR4的最後8個胺基酸中發現突變殘基，或只有CDR1、CDR2或CDR3中發現突變殘基。在其他某些實施例中，一或多個框架及／或CDR殘基回復突變為一個不同種系序列（即一個不同於最初衍生該抗體的種系序列的種系序列）的相應殘基。此外，本發明之抗體可在框架區及／或CDR區內含有兩個或多個突變的任何組合，例如，其中某些殘基分別突變為一特定種系序列的相應殘基，而某些其他不同於原始種系序列的殘基則保持不變或突變為一個不同種系序列的相應殘基。一旦獲得含有一或多個種系突變的抗體和抗原結合片段之後，可輕易地測試其一或多種所需的特性，例如改善的結合特異性、提高的結合親和力、改善或增強的拮抗性或促進的生物學特性（視情況而定）、下降的免疫原性等。以此一般方式獲得的抗體和抗原結合片段均包括在本發明範圍內。

[0055] 本發明還包括含有本文所披露的任何V_H、V_L及／或CDR胺基酸序列之變異體的抗VEGFR-2抗體，該變異體含有一個或多個保守的胺基

酸取代。例如，本發明包括含有V_H、V_L及／或CDR胺基酸序列的抗VEGFR-2抗體，該胺基酸序列相對於本文所披露的任何V_H、V_L及／或CDR胺基酸序列，含有例如10個或以下、8個或以下、6個或以下、4個或以下等保守的胺基酸取代。

[0056] 術語「實質的相同性」或「實質上相同」，當指一個核酸或其碎片時，表示當以適當的核苷酸插入或刪除與另一個核酸（或其互補鏈）進行最佳比對時，以下述任何已知的序列同一性算法如FASTA、BLAST或Gap測量，至少有95%的核苷酸序列同一性，較佳的是至少有96%、97%、98%或99%的核苷酸鹼基相同性。在某些情況下，一個與參照核酸分子實質上相同的核酸分子，可編碼具有與該參照核酸分子編碼的多肽相同或實質上類似的胺基酸序列的多肽。

[0057] 當應用於多肽時，術語「實質的相似性」或「實質上相似」意為兩個肽序列用諸如GAP或BESTFIT等程式的預設間隙權重排列達到最佳比對時，兩者至少有95%的序列同一性，更佳的是至少有98%或99%的序列同一性。較佳的是，不相同的殘基位置的差別係為保守性的胺基酸取代。「保守性的胺基酸取代」是指，一個胺基酸殘基被另一個具有相似化學性質（例如電荷或疏水性）側鏈（取代基團）的胺基酸殘基所取代。一般而言，保守性的胺基酸取代不會在實質上改變蛋白質的功能性質。在兩個或更多的胺基酸序列相互之間的差別僅在於某些保守性取代的情況中，可將序列同一性百分比或相似性程度向上調整，以針對取代的保守特性作出校正。進行這種調整的方法是本領域習知技藝人士眾所周知的。含有化學性質相似側鏈的胺基酸類別的實例包括：(1)脂肪族側鏈：甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸和異白胺酸；(2)脂肪族羥基側鏈：絲胺酸和蘇胺

酸；(3)含醯胺側鏈：天冬醯胺酸和麩醯胺酸；(4)芳香族側鏈：苯丙胺酸、酪胺酸和色胺酸；(5)鹼性側鏈：離胺酸、精胺酸和組胺酸；以及(6)酸性側鏈：天冬醯胺酸和麩醯胺酸，以及(7)含硫側鏈：半胱胺酸和甲硫胺酸。較佳的保守性胺基酸取代基是：纈胺酸-白胺酸-異白胺酸、苯丙胺酸-酪胺酸、離胺酸-精胺酸、丙胺酸-纈胺酸、麩醯胺酸-天冬醯胺酸，以及天冬醯胺酸-麩醯胺酸。或者，保守性取代是Gonnet et al. (1992)Science 256:1443-1445中所披露的PAM250對數似然矩陣(PAM250 log-likelihood matrix)中任何具有非負值的變化。

[0058] 多肽的序列相似性，也稱為序列同一性，通常是用序列分析軟體來測量的。蛋白質分析軟體是用指定給各種取代（包括保守性胺基酸取代）、缺失和其他修飾的相似性程度對相似的序列進行比對。例如，GCG軟體含有諸如Gap和Bestfit程式，可在系統內定參數情況下使用這些程式，以確定緊密相關的多肽（例如來自不同生物物種的同源多肽）之間的序列同源性或序列同一性，或者野生型蛋白質與其突變後形成的蛋白質之間的序列同源性或序列同一性。也可以用GCG Version 6.1程式FASTA（例如FASTA2和FASTA3）中系統內定參數或推薦參數來比較多肽序列，而提供被查詢序列和被搜索序列之間的最佳重疊區域的比對和序列同一性百分比（Pearson(2000)，出處同上）。當將本發明之序列與含有大量源自不同生物之序列的數據庫進行比較時，另一較佳的算法是BLAST電腦程式，尤其是BLASTP或TBLASTN，使用系統內定參數。參閱例如Altschul et al. (1990)J. Mol. Biol. 215:403-410及Altschul et al. (1997)Nucleic Acids Res. 25:3389-402，每篇論文均以引用方式納入本文。

[0059] 於本發明一較佳實施例中，該抗體或其抗原結合片段包含重

鏈可變區之互補決定區（complementarity determining regions，CDRs）及輕鏈可變區之互補決定區，其中該重鏈可變區之互補決定區包含CDRH1、CDRH2及CDRH3區，且該輕鏈可變區之互補決定區包含CDRL1、CDRL2及CDRL3區，且

該CDRH1區包含如SEQ ID NO：4所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

該CDRH2區包含如SEQ ID NO：5所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

該CDRH3區包含如SEQ ID NO：6所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

該CDRL1區包含如SEQ ID NO：7所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

該CDRL2區包含如SEQ ID NO：8所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

及該CDRL3區包含如SEQ ID NO：9所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列。

[0060] 於本發明另一較佳實施例中，該抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區之互補決定區（CDRs）及輕鏈可變區之互補決定區，其中該重鏈可變區之互補決定區包含CDRH1、CDRH2及CDRH3區，且該輕鏈可變區之互補決定區包含CDRL1、CDRL2及CDRL3區，且

該CDRH1區包含如SEQ ID NO：10所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

該CDRH2區包含如SEQ ID NO：11所示之胺基酸序列，或具有至少

90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

該CDRH3區包含如SEQ ID NO：12所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

該CDRL1區包含如SEQ ID NO：13所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

該CDRL2區包含如SEQ ID NO：14所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列；

及該CDRL3區包含如SEQ ID NO：15所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列。

[0061] 於本發明一較佳實施例中，一抗體322A6或其抗原結合片段包含一重鏈可變區，包含如SEQ ID NO：17所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列。較佳地，該重鏈可變區域係由如SEQ ID NO：16所示之核苷酸序列所編碼。322A6或其抗原結合片段包含一輕鏈可變區，包含如SEQ ID NO：19所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列。較佳地，該輕鏈可變區域係由如SEQ ID NO：18所示之核苷酸序列所編碼。

[0062] 於本發明另一較佳實施例中，一抗體12A6或其抗原結合片段包含一重鏈可變區，包含如SEQ ID NO：21所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性之實質相似序列。較佳地，該重鏈可變區域係由如SEQ ID NO：22所示之核苷酸序列所編碼/12A6或其抗原結合片段一輕鏈可變區，包含如SEQ ID NO：23所示之胺基酸序列，或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性

之實質相似序列。較佳地，該輕鏈可變區域係由如SEQ ID NO：24所示之核苷酸序列所編碼。

[0063] 於另一方面，本發明之抗體較佳為人源化抗體（humanized antibody）。「人源化抗體」唯一重組蛋白，其中，來自一物種（例如：小鼠）之一抗體的CDRs，由小鼠抗體之重鏈及輕鏈可變區域轉移至人類之重鏈及輕鏈可變區域，包含人類框架序列。該抗體分子的恆定區則衍生自一人類抗體之恆定區。

[0064] 為改良根據本發明之人源化抗體的結合親和力，人類框架區中之一些胺基酸殘基經CDR之物種(例如小鼠)中的相對應胺基酸殘基替換。較佳地，人源化抗體Hu322B1HdH或其抗原結合片段包含有包含SEQ ID NO：25之胺基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性的大體上類似序列的重鏈可變區。較佳地，重鏈可變區由SEQ ID NO：24之核酸序列編碼。Hu322B1HdH或其抗原結合片段包含有包含SEQ ID NO：27之胺基酸序列或其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性的大體上類似序列或其大體上類似序列的輕鏈可變區。較佳地，輕鏈可變區由SEQ ID NO：26之核酸序列編碼。

[0065] 較佳地，本發明之抗體係為一單株抗體。

[0066] 本發明之抗體可以是單特異性、雙特異性或多特異性的抗體。多特異性抗體可以針對同一標靶多肽的不同抗原決定基具有特異性，或可含有針對一個以上標靶多肽具有特異性的抗原結合結構域。本發明之抗VEGFR-2抗體可與另一個功能分子，例如另一胜肽或蛋白，連接或共表現。例如，一個抗體或其片段可與一個或多個其他分子實體，如另一個抗體或抗體片段實現功能性（例如以化學偶聯、基因融合、非共價鍵連接或

其他方式) 連接, 以產生具有第二種結合特異性的雙特異性或多特異性抗體。例如, 本發明包括雙特異性抗體, 其中免疫球蛋白的一臂對人類 VEGFR-2 或其片段具有特異性, 而免疫球蛋白的另一臂則對第二種治療靶標具有特異性或與一治療基團偶聯。

[0067] 於本發明一較佳實施例中, 該抗體或其抗原結合片段係與一治療劑接合。

[0068] 如本文所使用, 「治療劑」表示細胞生長抑制或細胞毒性劑或具有相對應放射性同位素的同位素螯合劑。細胞生長抑制或細胞毒性劑之實例包括(但不限於)抗代謝物(例如, 氟尿嘧啶(5-FU)、氟尿苷(5-FUdR)、甲胺喋呤、甲醯四氫葉酸、羥基尿素、硫鳥嘌呤(6-TG)、巯基嘌呤(6-MP)、阿糖胞苷、噴司他丁(pentostatin)、氟達拉賓磷酸鹽(fludarabine phosphate)、克拉屈濱(cladribine) (2-CDA)、天冬醯胺酶、吉西他濱(gemcitabine)、卡培他濱(capecitabine)、硫唑嘌呤、胞嘧啶甲胺喋呤、三甲氧苄二胺嘧啶(trimethoprim)、嘧啶甲胺(pyrimethamine)或培美曲塞(pemetrexed)); 烷化劑(例如, 美法倫(melphalan)、苯丁酸氮芥、白消安(busulfan)、噻替派(thiotepa)、異環磷醯胺、卡莫司汀(carmustine)、洛莫司汀(lomustine)、司莫司汀(semustine)、鏈脲菌素、達卡巴嗪(dacarbazine)、絲裂黴素C、環磷醯胺、氮芥、烏拉莫司汀(ureamustine)、二溴甘露醇、四硝酸酯、丙卡巴肼(procarbazine)、六甲蜜胺、米托唑胺(mitozolomide)或替莫唑胺(temozolomide)); 類烷化劑(例如, 順鉑(cisplatin)、卡鉑(carboplatin)、奈達鉑(nedaplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)、賽特鉑(satraplatin)或特瑞鉑(triplatin)); DNA小溝槽烷化劑(例如, 倍癌黴素(duocarmycin), 諸如CC-1065及其任何類似物或衍生

物；吡咯并苯并二氮雜卓(pyrrolobenzodiazapene)或其任何類似物或衍生物)；蒽環類藥物(anthracycline) (例如，道諾黴素(daunorubicin)、小紅莓(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、艾達黴素(idarubicin)或伐柔比星(valrubicin))；抗生素(例如，放線菌素d (dactinomycin)、博萊黴素(bleomycin)、光神黴素(mithramycin)、安甯黴素(anthracycline)、鏈佐黴素(streptozotocin)、短桿菌素D (gramicidin D)、絲裂黴素(mitomycin) (例如，絲裂黴素C)；卡其黴素(calicheamicin)；抗有絲分裂劑(包括例如，類美登素(maytansinoid) (諸如DM1、DM3及DM4)、奧瑞他汀(auristatin) (包括例如，單甲基奧瑞他汀E (MMAE)及單甲基奧瑞他汀F (MMAF))、海兔毒素(dolastatin)、念珠藻環肽(cryptophycin)、長春花屬生物鹼(例如，長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、長春地辛(vindesine)、長春瑞賓(vinorelbine))、紫杉烷(例如，太平洋紫杉醇、多烯紫杉醇或新穎紫杉烷)、特吡萊辛(tubulysin)及秋水仙鹼)；拓撲異構酶抑制劑(例如，伊立替康(irinotecan)、拓撲替康(topotecan)、喜樹鹼(camptothecin)、依託泊苷(etoposide)、替尼泊苷(teniposide)、安吡啶(amsacrine)或米托蒽醌(mitoxantrone))；HDAC抑制劑(例如，伏立諾他(vorinostat)、羅米地辛(romidepsin)、西達本胺(chidamide)、帕比司他(panobinostat)或貝林諾他(belinostat))；蛋白酶體抑制劑(例如，肽基硼酸)；以及放射性同位素，諸如At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²或Bi²¹³、P³²及Lu之放射性同位素，包括Lu¹⁷⁷。同位素螯合劑之實例包括(但不限於)乙二胺四乙酸(EDTA)、二伸乙基三胺-N,N,N',N'',N'''-五乙酸酯(DTPA)、1,4,7,10-四氮雜環十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸酯(DOTA)、1,4,7,10-肆(2-羥丙基)-1,4,7,10-四氮雜環十二烷(THP)、三伸乙基四胺-N,N,N',N'',N''',N'''-六

乙酸酯(TTHA)、1,4,7,10-四氮雜環十二烷-N,N',N'',N'''-四(亞甲基膦酸酯)(DOTP)及巯基乙醯基三甘胺酸(MAG3)。

[0069] 在本發明之一個較佳實施例中，抗體或其抗原結合片段可使用任何數目之表現系統產生，包括原核及真核表現系統。在一些實施例中，表現系統為哺乳動物細胞表現(諸如融合瘤)或CHO細胞表現系統。諸多此類系統係廣泛購自商業供應商。在抗體包含V_H及V_L區之實施例中，V_H及V_L區可例如在雙順反子表現單元中或在不同啟動子的控制下，使用單一載體表現。在其他實施例中，V_H及V_L區可使用單獨載體表現。如本文所述之V_H或V_L區可視情況包含N端處之甲硫胺酸。

[0070] 編碼相關抗體之重鏈及輕鏈的基因可選殖於細胞，例如，編碼單株抗體之基因可選殖於融合瘤且用於產生重組單株抗體。編碼單株抗體之重鏈及輕鏈的基因庫亦可由融合瘤或漿細胞製得。重鏈及輕鏈基因產物之隨機組合生成具有不同抗原特異性之大抗體池(參見例如，Kuby, Immunology (第3版 1997))。

[0071] 用於製造單鏈抗體或重組抗體的技術(US 4,946,778、US 4,816,567)可適用於製造本發明之抗體及多肽。並且，轉基因小鼠或其他生物體，例如其他哺乳類，可用於表現人源化抗體或人類抗體(參見例如US 5,545,807、US 5,545,806、US 5,569,825、US 5,625,126、US 5,633,425、US 5,661,016、Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)、Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994)、Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-51 (1996)、Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996)及Lonberg & Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995))。

[0072] 於本發明一較佳實施例中，該抗體或其抗原結合片段係表現於一細胞之表面。較佳地，該細胞為T細胞。

[0073] 本發明提供了一些含有本發明之抗VEGFR-2抗體或其抗原結合片段的醫藥組合物。本發明之醫藥組合物是與適宜的載體、賦形劑以及改善轉移、遞送、耐受性等的其他試劑一起配製的。在這本所有藥劑化學師都知道的處方集裏可以找到大量的適宜配方：Remington's Pharmaceutical Sciences（雷氏藥學大全），Mack Publishing Company, Easton, PA。這些配方包括，例如粉劑、糊劑、油膏、凝膠、蠟劑、油劑、脂質、含有（陽離子或陰離子）脂質的泡囊（如LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA）、DNA偶聯物、無水吸收性糊劑、水包油或油包水乳劑、乳膠狀碳蠟（各種分子量的聚乙二醇）、半固體狀凝膠以及含有碳蠟的半固體狀混合物。還可參閱Powell et al., Compendium of excipients for parenteral formulations（非腸道用配方之賦形劑概論），PDA(1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0074] 給患者施用的抗體劑量可根據即將受藥的患者之年齡和體形大小、標靶疾病、病症、給藥途徑等因素而改變。較佳的劑量通常是按照體重或身體表面積計算的。當本發明之抗體用於治療成人患者的與VEGFR-2活性相關的某種病症和疾病時，將本發明之抗體經由靜脈輸入也許較有效，通常是單劑量按體重計約0.01至約20 mg/kg給藥，較佳為約0.02至約7 mg/kg、約0.03至約5 mg/kg，或約0.05至約3mg/kg。取決於病症的嚴重程度，治療的頻率和持續時間可以調整。抗VEGFR-2抗體給藥的有效劑量和計劃可根據經驗確定；例如，可通過定期評估來監視患者病情的進展並相應地調整劑量。而且，可以使用本領域眾所周知的方法進行劑量的

跨物種類推（例如Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res.8:1351）。

[0075] 已知有多種藥物遞送系統可用來施用本發明的醫藥組合物，例如封裝在能夠表現變異病毒、受體介導的胞吞作用的脂質體、微顆粒、微膠囊、重組細胞中（參見如Wu et al. , 1987,J.Biol.Chem.262 : 4429-4432）。給藥方法包括但不限於皮內、肌內、腹腔內、靜脈、皮下、經鼻、硬膜外以及經口給藥。該組合物可經由任何方便的途徑給藥，例如，輸注或快速注射，經上皮或黏膜（例如口腔黏膜、直腸和腸黏膜等）吸收，並可與其他生物活性劑一起給藥。給藥方式可為全身性或局部性。

[0076] 本發明之醫藥組合物可用標準的針頭和針筒經皮下或靜脈注射。此外，對於皮下給藥，一種筆型給藥裝置可方便地用於本發明之醫藥組合物的給藥。這種筆型給藥裝置可以是重複使用型或用後即棄型。可重複使用的筆型給藥裝置一般採用一種可更換的含醫藥組合物的藥筒。一旦藥筒內所有醫藥組合物均已輸出、藥筒變空，則可方便地丟棄空藥筒，並用一個含醫藥組合物的新藥筒取代，該筆型給藥裝置即可重複使用。在用後即丟棄的筆型給藥裝置中，則無可更換的藥筒。相反地，該用後即丟棄的筆型給藥裝置具有一個預先灌滿醫藥組合物的貯液器。一旦該貯液器內醫藥組合物用完，整個裝置即被丟棄。

[0077] 在某些情況下，該醫藥組合物可用一種控制釋放系統給藥。在一個實施例中，可使用一種泵（參閱Langer，出處同上；Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14 : 201）。在另一個實施例中，可採用聚合物材料；參閱Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974 , CRC Pres., Boca Raton, Florida。在又一個實施例中，可將一種控制釋放系統置於該組合物靶標的附近，從而只需要全身性劑量的一

部分（參閱例如，Goodson, 1984, in *Medical Applications of Controlled Release*，出處同上，vol. 2, pp. 115-138）。其他控制釋放系統在Langer, 1990，*Science* 249:1527-1533的綜述中也被論及。

[0078] 注射用製劑可包括靜脈注射、皮下、皮內和肌肉注射、滴注輸液等劑型。這些注射用製劑可以公知的方法製備。例如，可以將上述抗體或其鹽溶解、懸浮或乳化在無菌水介質中，或通常用於注射的油性介質中，以此方式製備該注射用製劑。作為注射用的水介質有例如生理鹽水、含葡萄糖和其他助劑的等滲壓溶液等，可結合使用適當的增溶劑，如醇類（如乙醇）、多元醇類（如丙二醇、聚乙二醇），非離子型表面活性劑，例如聚山梨醇酯80、HCO-50（50莫耳的氫化蓖麻油的聚氧乙烯加合物）等。作為油性介質，可採用例如芝麻油、豆油等，可結合使用增溶劑，如苯甲酸苯甲酯、苯甲醇等。如此製備的注射液最好是裝入一種適當的安瓶中。

[0079] 較佳地，上述口服或注射用醫藥組合物可製備成單位劑量的劑型，以容納一定劑量的活性成分。這種單位劑量的劑型包括例如片劑、丸劑、膠囊、注射液（安瓶）、栓劑等。單位劑量的上述抗體含量一般為每劑約5 mg至約500 mg；尤其是注射劑型，較佳的是上述抗體含量為約5 mg至約100 mg，其他劑型中抗體含量為約10 mg至約250 mg。

[0080] 本發明之抗體可用於一需要個體中抑制VEGFR-2調控之訊息傳遞，或治療由VEGFR-2之活性或訊息傳遞所導致或與其相關聯疾病或失調。本發明之抗體亦可用於抑制內皮細胞之細胞增生。

[0081] 本發明提供一種於一需要個體中抑制VEGFR-2調控之訊息傳遞的方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含前述之抗體或其抗原結合片段。

[0082] 本發明提供一種治療患有由VEGFR-2之活性或訊息傳遞所導致或與其相關聯疾病或失調之個體之方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含前述之抗體或其抗原結合片段。

[0083] 本發明提供一種治療患有腫瘤之個體之方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含前述之抗體或其抗原結合片段。

[0084] 本發明提供一種於一需要個體中抑制內皮細胞之細胞增生的方法，包含給予該個體一醫藥組合物，該醫藥組合物包含前述之抗體或其抗原結合片段。

[0085] 如本文所用，術語「治療(treating/treatment)」係指向罹患不良病狀、病症或疾病之有臨床症狀的個體投與藥劑或調配物，以便實現症狀之嚴重程度及／或頻率降低、消除症狀及／或其潛在病因及／或有助於損傷好轉或修復。術語「預防(preventing/prevention)」係指向易罹患特定不良病狀、病症或疾病之無臨床症狀的個體投與藥劑或組合物，且因此係關於預防症狀出現及／或其潛在病因。如熟習此項技術者所理解，預防(prevention/preventing)不必達成病狀之絕對(完全)阻斷或避免。確切而言，預防可達成待預防之疾病或病狀之基本上(例如，超過約50%)減輕或避免。除非本文中另外明確地或藉由暗示指明，否則若在未提及可能的預防的情況下使用術語「治療(treatment/treating)」，則意欲亦涵蓋預防。

[0086] 「癌症」、「腫瘤」、「轉型」及類似術語包括癌變前、贅生性、轉型及癌細胞，且可指實體腫瘤，或非實體癌症(參見例如，Edge 等人 AJCC Cancer Staging Manual (第7版 2009)；Cibas and Ducatman Cytology: Diagnostic principles and clinical correlates (第3版 2009))。癌症包括良性贅瘤及惡性贅瘤(異常生長)兩者。「轉型」係指自發的或誘發

的表現型變化，例如，細胞之不朽化、形態變化、異常細胞生長、減少的接觸抑制及固著及／或惡性病(參見Freshney, *Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique* (第3版 1994))。儘管轉型可由轉型病毒之感染及新基因組DNA之併入或外源DNA之攝入引起，但其亦可以自發方式或在暴露於誘癌物之後產生。

[0087] 除其他用途外，本發明之抗體可用於治療、預防和/或改善與VEGFR-2的表現或活性相關或由VEGFR-2的表現或活性媒介的任何疾病或失調，或通過阻斷VEGFR-2和VEGFR-2配體之間的相互作用可治療的任何疾病或失調，或可用於抑制VEGFR-2活性及／或信號，及／或促進受體內在化，及／或減少細胞表面受體的數目。例如，本發明之抗體和抗原結合片段可用於治療表現高水平VEGFR-2的腫瘤。本發明之抗體和抗原結合片段可用於治療在下列器官中產生的例如原發性及／或轉移性腫瘤：腦和腦脊膜、口咽、肺和支氣管樹、胃腸道、男性和女性生殖道、肌肉、骨骼、皮膚及附屬物、結締組織、脾臟、免疫系統、造血細胞和骨髓、肝臟、泌尿道，以及某些特殊的感覺器官如眼睛。在某些實施例中，本發明之抗體和抗原結合片段被用於治療一種或多種下列癌症：腎細胞癌、胰腺癌、乳癌、頭頸部癌、前列腺癌、惡性膠質瘤、骨肉瘤、大腸直腸癌、胃癌（如MET擴增的胃癌）、惡性間皮瘤、多發性骨髓瘤、卵巢癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌（例如VEGFR-2依賴性非小細胞肺癌）、滑膜肉瘤、甲狀腺癌或黑色素瘤。

[0088] 本發明提供一種偵測一樣品中之人類血管內皮生長因子受體的方法，包含將該樣品與前述之抗體或其抗原結合片段接觸。

[0089] 本發明之抗VEGFR-2抗體也可用於檢測及／或測量樣品中

VEGFR-2或表現VEGFR-2的細胞，例如用於診斷目的。例如，抗VEGFR-2抗體或其片段可用於診斷特徵為VEGFR-2異常表現（例如過度表現、表現不足、缺乏表現等）的症狀或疾病。示範性VEGFR-2診斷分析法可包括例如用一種本發明之抗VEGFR-2抗體與獲自患者的樣品接觸，其中該抗VEGFR-2抗體以一種可檢測的標記或報導基因分子標記。或者，在診斷應用中也可以將一種未標記的抗VEGFR-2抗體與本身具有可檢測標記的第二種抗體結合使用。該可檢測標記或報導基因分子可以是一種放射性同位素，如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I ；一種螢光或化學發光基團，如異硫氰酸螢光素，或羅丹明；或一種酶如鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、辣根過氧化物酶，或螢光素酶。可用於檢測或測量樣品中VEGFR-2的特別的示範性測定法包括酵素結合免疫吸附分析（ELISA）、放射免疫分析（RIA），以及螢光激活細胞分選（FACS）。

[0090] 可依照本發明用於VEGFR-2診斷分析的樣品，包括獲自病人的在正常或病理條件下含有可檢測量VEGFR-2蛋白或其片段的任何組織或體液樣品。一般而言，先從一位健康病人（例如未患與VEGFR-2異常水平或活性相關的疾病或症狀的病人）獲得特定的樣品並測量其VEGFR-2表現水平，以建立VEGFR-2水平的基準線或標準。然後，可將這VEGFR-2基準線水平與從疑為患有VEGFR-2相關性疾病或狀況的人員所獲得的樣品測得的VEGFR-2表現水平進行比較。

[0091] 提供以下實例以幫助熟習此項技術者實踐本發明。

實例

scFv/Fab 抗體庫之構築

[0092] 使用含有SEQ ID NO：1之序列的融合蛋白質VEGFR2-Fc-His

作為抗原使小鼠免疫，每兩週6次。在免疫接種後，犧牲小鼠以獲得脾臟。提取出脾臟之全部RNA且藉由引子在RT-PCR程序中反轉錄以構築含有V_H、V_L、V_H-CH1、V_L-CL之抗體片段。抗體片段在聚合酶鏈反應中組裝成scFv片段以構築scFv庫。首先，藉由來自V_L-CL片段之V_L-CL庫將Fab庫構築至質體中。隨後，將V_H-CH1片段構築至含有V_L-CL片段之質體中，產生最終Fab庫。

製備用於生物淘選之scFv/Fab噬菌體

[0093] 將所獲得之庫接種至含有100 µg/ml安比西林(ampicillin)及2%葡萄糖(2YTAG)之2×YT培養基中，且在37°C振盪下培育，直至OD 600 nm達到0.5。用輔助噬菌體感染培養物且隨後在37°C水浴中無振盪培養30 min。收集細胞且將其懸浮於含有100 µg/ml安比西林及25 µg/ml卡那黴素(kanamycin) (2YTAK)之2×YT培養基中，且再在30°C振盪下培育隔夜。收集培養物之上清液且將其與1/5體積之PEG/NaCl (20%聚乙二醇8000，2.5 M NaCl)混合，且在4°C下保持1小時或大於1小時。離心之後，收集離心塊且將其懸浮於40 mL PBS中且再次離心以收集上清液。

使用ELISA方法選擇

[0094] 將ELISA培養盤(Nunc)每孔塗佈1 µg/100 µL之抗原，且在pH 9.6之碳酸氫鈉緩衝液中在4°C下保持隔夜。孔用PBS洗滌3次且用每孔300 µL之PBS-5%脫脂牛奶(MPBS)在37°C下阻斷1.5小時。用PBS洗滌3次之後，添加100 µL於5% MPBS中之噬菌體，該MPBS具有含有his標記之融合蛋白質，且在37°C下培育90分。用PBS-0.05% Tween 20 (PBST)洗滌10次及用PBS洗滌10次之後，噬菌體藉由添加100 µL之100 mM三乙胺(TEA)溶離且在37°C下反應30分。100 µL之經溶離噬菌體用pH 7.4、50 µL之1 M

Tris中和。將10 ml在指數生長階段之TG1添加至150 μ L之經溶離噬菌體中。培養物在37°C下無振盪培育30分進行感染。將經感染TG1細菌離心且收集且隨後懸浮於2×YT中，並塗鋪於2×YT-AG培養盤上。細菌在30°C下培育隔夜。

使用戴諾珠粒(Dynabeads)方法選擇

[0095] 在預清潔噬菌體步驟中，戴諾珠粒用1 ml PBS預洗滌3次，且懸浮於PBS中。隨後，將0.3 mL噬菌體與0.5 ml之5% MPBS及含有his標記之融合蛋白質混合，且在旋轉器上培育30分，且隨後移出戴諾珠粒。

[0096] 使戴諾珠粒與生物素標記之VEGFR2-His反應90分。戴諾珠粒用1 ml PBS洗滌3次且懸浮於5% MPBS中並培育90分，且隨後用1 ml PBS洗滌3次。將預清潔噬菌體添加至具有戴諾珠粒之VEGFR2-His中，且在旋轉器上再培育30分。戴諾珠粒隨後用1 ml之0.05% PBST、0.2% MPBS及PBS洗滌。所結合之噬菌體用1 ml之100 mM TEA溶離。為快速中和，將pH 7.4、0.5 ml之1 M Tris添加至經溶離噬菌體中。隨後，採用6 ml之TG1之指數生長培養物且添加經TEA溶離之噬菌體。培養物在37°C下(水浴)無振盪培育30分。合併經感染TG1細菌且離心以收集離心塊。將塊狀之細菌懸浮於1 ml之2×YT中且塗鋪於大的2×YT-AG培養盤上。細菌在30°C下培育隔夜。

製備下一輪噬菌體

[0097] 將5至6 ml之2×YT、15%甘油添加至細菌培養盤中且菌落藉由玻璃塗抹棒變鬆散。隨後，將10 μ l刮下的細菌添加至10 ml之2×YT-AG中且細菌在37°C振盪下生長，直至在600 nm下之OD達到0.5。藉由添加輔助噬菌體用M13KO7輔助噬菌體以1:20之比率感染10 ml培養物，且經感染

培養物在37°C水浴中無振盪培育30分。培養物經離心以收集離心塊，且離心塊藉由50 mL之2×YT-AK懸浮，且隨後在30°C下培養隔夜。此外，使40 ml之隔夜培養物在10,000 rpm下離心20 min以收集上清液，且將1/5體積(8 ml) PEG/NaCl添加至上清液中。將孔混合且在4°C下保持1小時或大於1小時。混合物在10,000 rpm下離心20分且收集離心塊並將其懸浮於2 ml PBS中。懸浮液在12000 rpm下離心10分以移除大部分剩餘的細菌殘渣。

藉由ELISA篩檢VEGFR2陽性噬菌體

[0098] 將來自培養盤之單獨菌落接種至200 µl之2×YT-AG 96孔盤中，且在37°C下在振盪下生長隔夜，且隨後將50 µl轉移至每孔含有200 µl之2×YT-AG的第二96孔盤中，在37°C下振盪2小時。隨後，將50 µl之具有10⁹ pfu M13KO7輔助噬菌體的2×YT-AG添加至第二培養盤的各孔中。混合物在37°C下靜置30 min且隨後在37°C下振盪1小時。在4000 rpm下離心30分之後，抽出上清液，且將離心塊懸浮於300 µl之2×YT-AK中，在30°C下在振盪下生長隔夜。培養物在4000 rpm下離心30分且取出100 µl之培養物上清液用於噬菌體ELISA。

[0099] 將ELISA培養盤每孔塗佈1 µg/mL之蛋白質抗原，且隨後用PBS淋洗3次，且用每孔300 µl之2% MPBS在37°C下阻斷2小時。用PBS再淋洗3次之後，添加100 µl如上文詳細說明之噬菌體培養物上清液且在37°C下培育90分。捨棄噬菌體溶液，且孔用PBST洗滌6次及用PBS洗滌6次，隨後添加HRP-抗M13抗體於5% MPBS中之適當稀釋液。混合物在37°C下培育60 min，且用PBST洗滌6次及用PBS洗滌6次。孔用基質溶液(TMB)顯色，且反應藉由添加50 µl之1 M硫酸中止。顏色變成黃色，且分析OD 650 nm及OD 450 nm。

[0100] 篩檢之後，鑑定出總共379個純系及66種CDRH3。

全長抗體之表現

[0101] 將編碼抗VEGFR2抗體之V_H及V_L鏈的基因插入至表現載體中。藉由所構築之載體轉染Free-style 293細胞。遵循以下程序，在30 ml體積中轉染懸浮液FreeStyle™ 293細胞。在轉染之前大約24小時，以2 × 10⁶個細胞/毫升轉移15 ml之FreeStyle™ 293細胞。將燒瓶置放於37°C、8% CO₂培育箱中。隨後將37.5 μg之質體DNA稀釋至1.5 ml之無菌150 mM NaCl中，使總體積達1.5 ml。在另一管中，將37.5 μL之PEI (2.0 mg/ml) 稀釋於1.5 ml之無菌150 mM NaCl中。使DNA及PEI溶液在室溫下靜置5分鐘，藉由將管倒轉輕輕混合，且在室溫下靜置約10-20分鐘。立即添加DNA-PEI混合物至F293細胞中且在37°C、8% CO₂培育箱中以135-150 rpm旋轉之定軌振盪器平台上培育經轉染細胞4小時。隨後添加相同體積新鮮培養基至總體積達30 ml，且培養5-7天。收集細胞進行蛋白質純化及定量。

[0102] 鑑定出總共78個菌落，包括322A6及12A6。

結合親和力分析

[0103] 將ELSA培養盤塗佈每孔100 μL/之人類VEGFR-2、小鼠VEGFR2、人類VEGFR1或人類VEGFR3，在4°C下隔夜，且隨後用PBS淋洗3次，且在37°C下用300 μL/孔之5% MPBS阻斷2小時。孔用PBS淋洗3次，且添加100 μL之抗VEGFR2抗體2倍連續稀釋液並在37°C下培育90 min。捨棄測試溶液且用PBS洗滌3次。添加HRP-抗人類IgG抗體於5% MPBS中之適當稀釋液(1:10000)且在37°C下培育60 min，且孔用PBS洗滌3次。孔用100 μL之基質溶液TMB顯色，且反應藉由添加50 μL之1 M硫酸

終止。顏色變成黃色，且分析OD 650 nm及OD 450 nm。

[0104] 數種抗體之結合親和力的結果展示於圖1及表1中。其展示12A6及322 A6抗體對人類VEGFR-2具有結合親和力。322A6抗體對小鼠VEGFR-2具有結合親和力，但對人類VEGFR-1及VEGFR-3不具有親和力。因此，322A6對VEGFR-2具有特異性。

表1：

分析物	VEGFR-2 (結構域1至7)				
抗體	K _a	K _d	K _D	R _{max} (RU)	Chi ² (RU ²)
12A6	4.488E+4	2.066E-4	4.604E-9	276.9	0.457
322A6	8.247E+5	5.547E-4	6.726E-10	102.2	4.29

[0105] 322A6及12A6之CDR的序列展示於表2中。322A6包含有包含SEQ ID NO：17之胺基酸序列的重鏈可變區，且重鏈可變區由SEQ ID NO：16之核酸序列編碼。322A6包含有包含SEQ ID NO：19之胺基酸序列的輕鏈可變區，且輕鏈可變區由SEQ ID NO：18之核酸序列編碼。12A6包含有包含SEQ ID NO：21之胺基酸序列的重鏈可變區，且重鏈可變區由SEQ ID NO：20之核酸序列編碼。12A6包含有包含SEQ ID NO：23之胺基酸序列的輕鏈可變區，且輕鏈可變區由SEQ ID NO：22之核酸序列編碼。

表2：

樣品	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
322A6	GYAFTTY WMH (SEQ ID NO：4)	MIDFSDS ETKLNQR FKG (SEQ ID NO：5)	DVRGNF DV (SEQ ID NO：6)	RASKSVS TSGYSYM H (SEQ ID NO：7)	LASNLES (SEQ ID NO：8)	QHSRELP WT (SEQ ID NO：9)
12A6	GYSFTDY SMY (SEQ ID NO：10)	YIDPYND DTSYKQK FKG (SEQ ID NO：11)	GYADAM DY (SEQ ID NO：12)	HASQNIN VWLS (SEQ ID NO：13)	KASNLHT (SEQ ID NO：14)	QQGQSY LT (SEQ ID NO：15)

結構域定位分析

[0106] 構築人類VEGFR-2之片段。片段以如上所述之結合親和力分析。結構域定位之結果展示於圖2及圖3及表3及表4中。

表3：

結合結構域	322A6 (45)	12A6
R2 D1-2	-	-
R2 D1-3	-	-
R2 D1-4	-	-
R2 D1-5	-	-
R2 D1-6	-	+++++
R2 D1-7	+++++	+++++
R2 D6-7	+++++	+++++
R2 D6	-	+++
R2 D7	++++	++++

表4：

樣品	結合結構域
322A6	7
12A6	6-7

抗原決定基定位

[0107] 在人類VEGFR-2之結構域6 (SEQ ID NO：2)及結構域7 (SEQ ID NO：3)中，構築若干點突變體。突變體以如上所述之結合親和力分析。突變位點之位置展示於圖4中。12A6之抗原決定基包含位置606處之白胺酸殘基、位置607處之天冬胺酸殘基、位置647處之精胺酸殘基、位置648處之離胺酸殘基及位置649處之蘇胺酸殘基。322A6之抗原決定基包含位置711處之絲胺酸殘基、位置714處之纈胺酸殘基及位置725及位置726處之精胺酸殘基。

抗VEGF R2 Ab-HUVEC增生抑制分析

[0108] 材料：HUVEC (Cascade Biologics，目錄號C-003-5C)，培養基200 (Cascade Biologics，目錄號M-200-500)，融合瘤培養基(10% FBS-DMEM)，FBS (Hyclone，#SH30071.03)，DMEM (GIBCO，#11995)，人類CHO VEGF、hVEGF (PROSPEC，目錄號CYT-260)，抗VEGFR2抗體、WST-1 (Roche，目錄號11644807001)。

[0109] 將100 μ L於10% FBS-DMEM中的抗體樣品接種至96孔盤的各孔中，且每個樣品雙重複。收集細胞且將其以 8×10^4 個細胞/毫升懸浮於培養基200中，且在37°C、5% CO₂下培育30分鐘。以培養基200(Medium 200)稀釋hVEGF至50 ng/ml，且將50 μ L之標準hVEGF添加至培養盤中，在37°C、5% CO₂下培育96小時。隨後，將20 μ L之WST-1添加至各孔中且在37°C、5% CO₂下培育4小時。使用ELISA讀取器量測吸光度(OD 450-655 nm)。

[0110] 增生分析之結果展示於圖5中。如圖5中所示，當抗體濃度愈高時，VEGFR-2信號抑制之效果愈強，且HUVEC之數目(OD 450-655 nm)愈少。在抗體當中，12A6具有最強效果，其中IC₅₀ = 3.9 μ g/ml。

抗VEGFR-2抗體至HUVEC中之內在化

[0111] 藉由流式細胞測量術分析抗體至HUVEC中之內在化。

流式細胞測量術(CytoFLEX)

細胞株：HUVEC

第1抗體：322A6

第2抗體：山羊抗人類 κ 輕鏈，Bethyl，目錄A80-115F

培養基200 (M200)，Thermo，目錄C-003-25P-A，低血清生長補充劑(LSGS)。目錄S00310

FBS (Gibco，目錄10082-147)，FACS緩衝劑(1×PBS，1% FBS，0.02% NaN3)

15 mL法爾康(Falcon)管(Corning，目錄CS352096)

T150：組織培養瓶(TPP，90150)

[0112] 計數HUVEC之細胞數目，且將其與322A6混合並在冰上培育1小時。細胞藉由離心收集，且藉由10 mL冰冷的FACS緩衝劑洗滌3次。將 2×10^5 個細胞/反應/孔(24孔盤)接種於RPMI培養基w/2% FBS中，且隨後在37°C或4°C下培育指定時間段。在各時間點，藉由10 mL冰冷的FACS緩衝劑洗滌細胞，且將第2抗體(α -hIgG-FITC，藉由冰冷的FACS緩衝劑1:200稀釋)添加於冰上持續1小時。藉由10 mL冰冷的FACS緩衝劑洗滌3次之後，將細胞接種(藉由FACS緩衝劑， 2×10^5 個細胞/反應/管)且在37°C或4°C下培育指定時間段。在各時間點，將細胞懸浮且藉由流式細胞測量術及CytExpert軟體分析。

[0113] 結果展示於表5及圖6中。在抗體內在化發生之前(0 min)，藉由流式細胞測量術偵測由抗體結合之HUVEC細胞。在抗體內在化發生之後，抗體自細胞表面易位至細胞內部之核內體，且流式細胞測量術之信號消失。因此，若抗體具有較強的抗體內在化傾向，則與靶細胞之相對結合較少。如表5及圖6中可見，322A6具有較強的抗體內在化傾向。

表5：

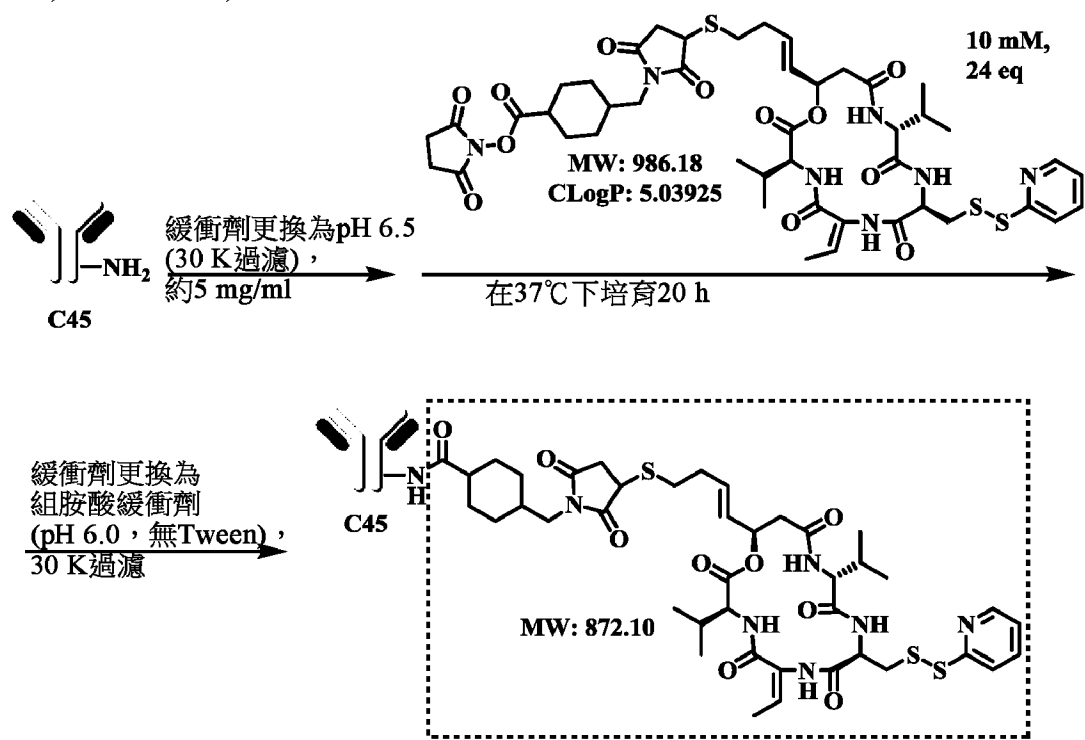
時間(min)	細胞群體(%)				
	322A6	3	32	59	80
0	31.4	18.1	38.7	31.1	39.9
10	25.1	18.6	35.3	27.0	34.0
30	21.6	17.5	33.7	20.6	35.9
60	15.1	15.1	29.3	17.0	32.9

90	6.8	1.1	25.7	14.6	7.5
120	1.7	3.7	16.1	5.9	5.2

[0114] 亦藉由DeltaVision顯微鏡成像系統在顯微鏡下觀察抗體內在化，且展示於圖7中。以Rab5a作為陽性對照，且以DAPI標記細胞核。藉由同時標記322A6及核內體，其展示322A6成功地內在化至細胞中。

抗VEGFR2抗體與羅米地辛之接合

[0115] 322A6 (C45)抗體根據以下流程與羅米地辛(亦稱為伊斯達斯(Istodax)，抗癌劑)接合：



[0116] 接合條件列於表6中。

表6：

批號	322A6	TMB355-SMCC-Romid-Spy	抗體-藥物接合物 (antibody-drug conjugate；ADC)
14-0151-00-01	1 mg	於DMA中之SMCC-Romid-SPy (160413-1)： 10 mM，24 eq 濃度：5 mg/ml 37℃，17 h	濃度：4.06 μg/μl (回收率：73%) 聚集體：2.1% DAR：1.93

[0117] 藉由尺寸排阻層析(SEC)分析所獲得之抗體-藥物接合物(ADC) (11-0151-00-01)：

管柱：Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE)

樣品：IgG及IgG-ADC，0.3 mg/mL

樣品體積：100 µL

流速：0.5 mL/min

緩衝劑：1×PBS

系統：ÄKTA

[0118] 層析結果展示於圖8及表7中。亦對ADC進行電泳且展示於圖9中。

表7：

	c45 (322A6)		14-0151-00-01 (322A6之ADC)	
	滯留(mL)	峰面積(%)	滯留(mL)	峰面積(%)
聚集體	-	0.0	7.74	2.1
IgG二聚體	10.61	3.3	10.42	6.0
IgG單體	12.46	95.4	12.34	91.3
片段	19.22+20.30	1.3	19.15	0.6

[0119] 如圖8中所示，所獲得之抗體-藥物接合物具有95.4%之單體及95%之純度。

[0120] 亦如上所述分析ADC之內在化。結果展示於圖10中，且322A6之ADC中的內在化傾向與僅322 A6抗體(c45)中的傾向類似。

[0121] 亦如上所述分析ADC對HUVEC增生的抑制。結果展示於圖11中。單獨的322A6抗體(c45)在抑制HUVEC增生方面之效果適中。其意謂322A6抗體在VEGFR-2訊息傳遞方面之阻斷效果不是非常強。然而，當經

處理之322A6與羅米地辛接合時(c45-ADC)，HUVEC之相對細胞存活率顯著下降。不受理論限制，咸信HUVEC之相對細胞存活率的下降由322A6抗體之ADC的細胞毒性導致，而非HUVEC增生之抑制。

嵌合抗原受體T細胞(CAR-T)免疫療法

[0122] 自健康供體分離外周血液單核細胞(PBMC)且用具有10% FBS (hyclone)及100 U/mL重組介白素-2 (Roche)之RPMI中的Dynabeads®人類T活化劑CD3/CD28 (Gibco)刺激48小時。使用人類Pan T細胞分離套組(Miltenyi Biotec)，根據製造商之說明書收集經活化之T細胞。慢病毒載體含有抗VEGFR-2抗體之單鏈可變片段，及4-1BB及CD3-z之信號傳導域。藉由用轉移基因組質體及慢病毒封裝輔助質體pMD2.G及pCMVΔR8.91瞬時轉染HEK293T細胞而產生病毒上清液，且將其用以在塗有RetroNectin之培養盤(TaKaRa Bio Inc.)上轉導人類T細胞。藉由流式細胞測量術分析轉導效率。

[0123] 結果展示於圖12中。定量分析分別展示5.1%、10.4%及7.79%之在T細胞上表現的1121、12A6及322A6 CAR。

抗原受體T細胞之細胞毒性分析

[0124] 藉由使用細胞毒性偵測套組(Roche, Indianapolis, IN, USA)，根據製造商說明書量測細胞毒性活性。將抗VEGFR-2 CAR T細胞與VEGFR2陽性細胞株以指定E:T比率在37°C下一起培育16小時。使用下式計算特異性細胞溶解百分比： $(\text{測試} - \text{效應劑對照} - \text{低對照} / \text{高對照} - \text{低對照}) * 100$ 。高對照在靶細胞於1% Triton X 100中培育之後計算；效應劑對照為單獨的T細胞之自發LDH釋放值；低對照為單獨的靶細胞之自發LDH釋放值。效應細胞：藉由抗VEGFR-2 CAR轉導之原生T細胞(第1次轉

導5天後)。靶細胞：FS293 (過度表現的VEGFR-2)。效應細胞及靶細胞共培養16小時。

[0125] 亦使用CD19之scFv片段製造CAR-T作為對照(CD19)。亦將單獨的T細胞視為對照(T)。1121抗體為特異性結合於VEGFR-2之結構域2及結構域3的已知抗VEGFR-2抗體，該等結構域遠離VEGFR-2中之細胞膜。1121之CAR-T在分析中用於比較。結果展示於圖13中。12A6及322A6之CAR-T均具有比1121之CAR-T強的細胞毒性。不受理論限制，咸信12A6及322A6抗體特異性結合於VEGFR-2之結構域6及／或結構域7，該等結構域靠近VEGFR-2中之細胞膜。

產生放射性、碘結合抗體

[0126] 將1 ml之25 mM Tris-HCl (pH 7.5)及0.4 M NaCl緩衝溶液添加至ODO-gen管中，且隨後捨棄。將100 μ l之緩衝溶液添加至管中，且隨後添加1 μ l之I-123或I-131，在室溫下在輕微振盪下反應6分鐘。添加抗VEGFR-2抗體，在室溫下在輕微振盪下反應6至9分鐘。藉由將反應物轉移至新的微量離心管中來終止反應。藉由85%甲醇顯色溶液及ITLC/SG紙用Radio-TLC分析標記方法之效率。

[0127] 標記方法¹³¹I-抗VEGFR-2-純系45 (322A6)之效率展示於圖14中。超過96.8%之抗體經標記。

放射性碘結合抗體在血清中之穩定性

[0128] 將經標記抗體與來源於人類或大鼠之血清以1:19之體積比混合且在37°C下反應。在第0.25、0.5、1、4、8、24、48及72小時，將800 μ l之10% TCA添加至10 μ l樣品中且混合。含於樣品中之蛋白質藉由冰浴15分鐘沈澱。藉由0.45 μ m PVDF膜過濾上清液且計數液體之比率活性，展現

經解離之I-131。穩定性 = (過濾前的活性 - 過濾後的活性)/過濾前的活性。

[0129] 結果展示於表8中，顯示¹³¹I-抗VEGFR-2-純系-45在72小時內在血清中不降解。

表8：

¹³¹ I-抗VEGFR-2-c45在人類及大鼠血清中之放射線結合穩定性，%		
時間(小時)	人類血清	大鼠血清
0	95.06±0.59	89.95±7.08
0.25	94.51±0.68	91.67±5.89
0.5	94.54±0.58	93.11±4.58
1	93.59±0.68	92.52±5.16
4	94.54±0.66	93.56±4.41
8	94.61±0.67	93.65±4.29
24	94.47±0.49	93.21±4.64
48	94.33±0.64	93.06±4.75
72	94.38±0.61	93.17±4.59

藉由放射性碘結合抗體偵測腫瘤

[0130] 採用SPECT/CT，藉由根據本發明之放射線結合抗體偵測腫瘤。於HT-29異種移植小鼠靜脈內注射4至8 μCi/μg之放射性。向各小鼠投予1至2 mg/kg之B.W. ¹³¹I或¹²³I標記的抗VEGFR2抗體。在第1、4、24及48小時，藉由SPECT/CT掃描小鼠。

[0131] 結果展示於圖15中。結果顯示，放射線結合抗體322A6能夠特異性結合於HT-29異種移植腫瘤且放射性信號積聚於腫瘤中。最強信號在第18小時出現於腫瘤中。抗體在第18小時後降解，且幾乎所有抗體在第48小時後降解。

組合療法

[0132] 以6至8週齡之雄性B6 (C57BL/6JNarl)小鼠作為動物模型。小鼠在12小時光亮/黑暗循環下餵食且任意採食PMI飼料(RMH3000-5P76)及

水。將小鼠分組為：

第1組：IgG (Mu) (非功能IgG抗體)，15 mpk/i.v.，兩次/週，n = 6

第2組：αCTLA-4 (Mu)，5 mpk/i.v. + IgG (Mu)，10 mpk/i.v.，兩次/週，n = 6

第3組：αCTLA-4 (Mu)，5 mpk/i.v. + 322 A6，10 mpk/i.v.，兩次/週，n = 6

第4組：IgG (Mu)，5 mpk/i.v. + 322 A6，10 mpk/i.v.，兩次/週，n = 6

[0133] 量測腫瘤尺寸且列於表9中。抗CTLA4抗體及抗VEGFR-2抗體(322A6)之組合具有協同效應。

表9：

腫瘤體積(mm ³)	第0天	第4天	第7天	第11天	第14天	第21天
IgG (Mu)，15 mpk	0.0	0.0	30.9	195.3	866.2	3540.5
αCTLA-4 (Mu) 5 mpk + IgG (Mu)10 mpk	0.0	0.0	5.4	211.0	634.6	2425.5
αCTLA-4 (Mu) 5 mpk + 322A6 10 mpk	0.0	0.0	12.7	86.9	365.0	1140.3
IgG(Mu) 5 mpk + 322 A6 10 mpk	0.0	0.0	3.0	174.7	739.5	3240.9

[0134] 亦量測體重且列於表10中，且其顯示所有組之體重大體上相同。

表10：

體重(公克)	第0天	第4天	第7天	第11天	第14天	第21天
IgG (Mu)，15 mpk	25.1	26.2	26.2	26.1	26.1	31.7
αCTLA-4 (Mu) 5 mpk + IgG (Mu)10 mpk	25.0	25.0	25.8	25.6	25.5	28.7
αCTLA-4 (Mu) 5 mpk + 322A6 10 mpk	25.6	25.6	26.2	26.2	26.1	28.2
IgG(Mu) 5 mpk + 322A6 10 mpk	25.4	25.4	26.4	26.2	26.8	31.8

抗體之人源化

[0135] 人類V區框架之選擇：自IMGT資料庫(<http://www.imgt.org/>)及常用VH3/Vk1(4D5)鑑別與322A6框架區具有最高程度的同源性之人類

V區框架序列人類生殖系V_L及V_H序列的序列選擇。最後，分別針對VH框架及VL框架選擇VH3及Vk1之框架序列。標記為Hu之人源化框架來自IMGT資料庫且Hd系列來自4D5框架。

[0136] 全長CDR移植Ab構築：322A6 (HH)由具有6個完整鼠類CDR序列之完整人類框架(VL κ 亞群I及V_H亞群III)組成。322A6(HH)及半人源化(MH或HM)抗體構築體藉由PCR及限制酶切割組裝，用於定向次選殖至經修飾之抗體表現載體pTCAE8.3中。質體含有編碼人類 κ 輕鏈及人類IgG1 C區之DNA片段。全長抗體在Free-style 293細胞中表現。

[0137] 回復突變：選擇純系322A6 (HuB1-Hd)自CDR移植框架進行1-3輪回復突變，用於結合活性恢復。簡言之，吾等藉由5Å鄰近度、上部核心區、界面面積進行電腦模型化來分析CDR移植框架，且亦應用成功案例中最常用之先前經驗。吾等已選擇3輪，可能有5至11個胺基酸發生回復突變。此等位點視為CDR結合及結構之重要位點。在選殖及抗體表現之後，藉由ELISA及BIAcore測定結合活性。具有7個胺基酸回復突變(7+0)的重鏈(HuB1)及輕鏈(Hd)之組合純系為VEGFR2結合之適合候選。

[0138] 人源化抗體Hu322B1HdH係由包含如SEQ ID NO：25所示之胺基酸序列的重鏈可變區，及包含如SEQ ID NO：27所示之胺基酸序列的輕鏈可變區所構築而成。該重鏈可變區係由如SEQ ID NO：24所示之核苷酸序列所編碼，且該輕鏈可變區係由如SEQ ID NO：26所示之核苷酸序列所編碼。V_L片段的比對結果係如圖16所示，V_H片段的比對結果係如圖17所示。

[0139] 本發明係配合前述特定實施例以說明，其替換、調整及變化為本領域中具通常知識者可以理解。這些替換、調整及變化仍屬於本發明

之範圍。



申請日:

【發明摘要】

IPC分類: **C07K 16/22** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

【中文發明名稱】

抗VEGFR抗體及其應用

【英文發明名稱】

ANTI-VEGFR ANTIBODY AND USES THEREOF

【中文】

本發明關於一種抗體或其抗原結合片段，其與人類第二型血管內皮生長因子受體（vascular endothelial growth factor receptor 2，VEGFR-2）結合。本發明亦關於一種於一需要個體中抑制VEGFR-2調控之訊息傳遞的方法、一種治療患有由VEGFR-2之活性及／或訊息傳遞所導致或與其相關聯疾病及／或失調之個體之方法、一種治療患有腫瘤之個體之方法、一種於一需要個體中抑制內皮細胞之細胞增生的方法及一種偵測一樣品中之人類第二型血管內皮生長因子受體的方法。

【英文】

The present invention relates to an antibody or antigen-binding fragment thereof that bind human vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2). The present invention also relates to a method for inhibiting VEGFR-2-mediated signaling in a subject in need, a method for treating diseases and/or disorders caused by or related to VEGFR-2 activity and/or signaling in a subject afflicted with the diseases and disorders, a method for treating tumor in a subject afflicted with the tumor, a method for inhibiting cell proliferation of endothelial cells in a subject in need, and a method for detecting human vascular endothelial growth factor

receptor in a sample.

【指定代表圖】

圖4

【代表圖之符號簡單說明】

無