



(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 201019960 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：098132098

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 09 月 23 日

(51)Int. Cl.：

A61K39/395 (2006.01)

C07K16/22 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2008/09/26 歐洲專利局 08016952.7

2009/04/02 歐洲專利局 09004908.1

(71)申請人：赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)

瑞士

克雷雅生物公司 (瑞士) GLYCART BIOTECHNOLOGY AG (CH)

瑞士

(72)發明人：賓克曼 烏拉奇 BRINKMANN, ULRICH (DE)；克斯戴兒 雷貝卡 CROASDALE, REBECCA (GB)；多梅耶 威爾瑪 DORMEYER, WILMA (DE)；捷德斯 克里斯汀 GERDES, CHRISTIAN (AR)；赫夫曼 艾克 HOFFMANN, EIKE (DE)；克萊 克里斯汀 KLEIN, CHRISTIAN (DE)；昆克里 克勞斯 彼得 KUENKELE, KLAUS-PETER (DE)；雪弗 瓦夫崗 SCHAEFER, WOLFGANG (DE)；史翠奇 珍 歐拉夫 STRACKE, JAN OLAF (DE)；優瑪那 帕伯羅 UMANA, PABLO (CR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：11 項 圖式數：22 共 178 頁

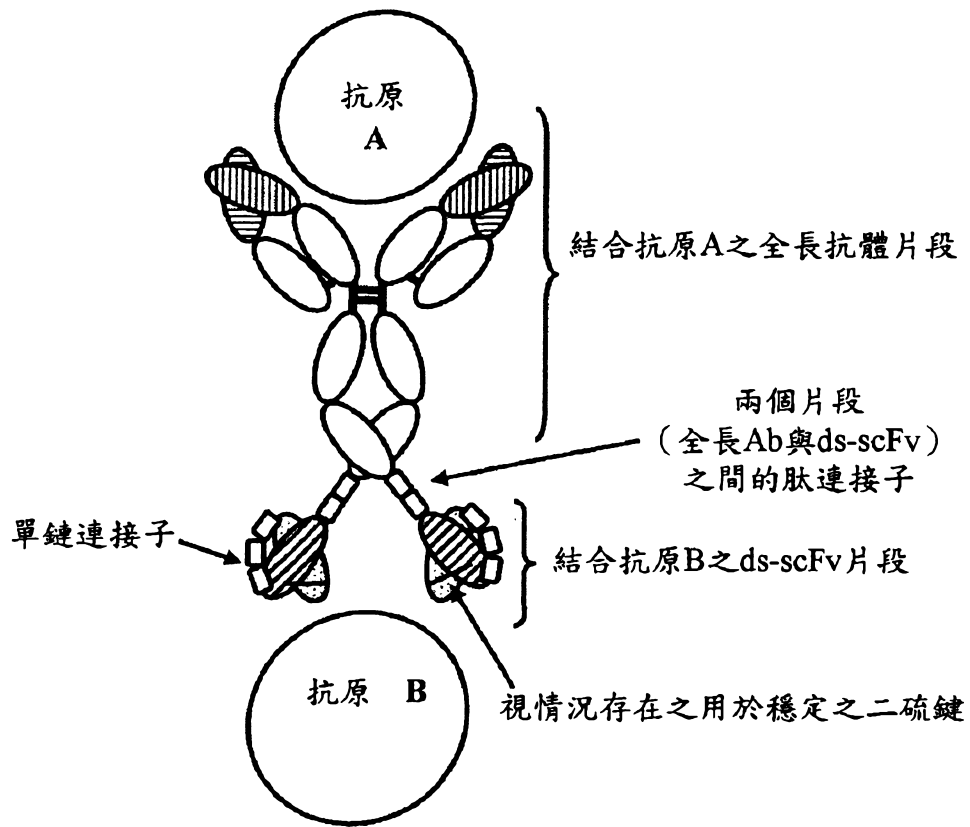
(54)名稱

雙重專一性之抗－E G F R / 抗－I G F－1 R 抗體

BISPECIFIC ANTI-EGFR/ANTI-IGF-1R ANTIBODIES

(57)摘要

本發明係關於針對 EGFR 且針對 IGF-1R 之雙重專一性抗體、其產生方法、含有該等抗體之醫藥組合物及其用途。





(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 201019960 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：098132098

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 09 月 23 日

(51)Int. Cl.：

A61K39/395 (2006.01)

C07K16/22 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2008/09/26

歐洲專利局

08016952.7

2009/04/02

歐洲專利局

09004908.1

(71)申請人：赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)

瑞士

克雷雅生物公司 (瑞士) GLYCART BIOTECHNOLOGY AG (CH)

瑞士

(72)發明人：賓克曼 烏拉奇 BRINKMANN, ULRICH (DE)；克斯戴兒 雷貝卡 CROASDALE, REBECCA (GB)；多梅耶 威爾瑪 DORMEYER, WILMA (DE)；捷德斯 克里斯汀 GERDES, CHRISTIAN (AR)；赫夫曼 艾克 HOFFMANN, EIKE (DE)；克萊 克里斯汀 KLEIN, CHRISTIAN (DE)；昆克里 克勞斯 彼得 KUENKELE, KLAUS-PETER (DE)；雪弗 瓦夫崗 SCHAEFER, WOLFGANG (DE)；史翠奇 珍 歐拉夫 STRACKE, JAN OLAF (DE)；優瑪那 帕伯羅 UMANA, PABLO (CR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：11 項 圖式數：22 共 178 頁

(54)名稱

雙重專一性之抗－E G F R / 抗－I G F－1 R 抗體

BISPECIFIC ANTI-EGFR/ANTI-IGF-1R ANTIBODIES

(57)摘要

本發明係關於針對 EGFR 且針對 IGF-1R 之雙重專一性抗體、其產生方法、含有該等抗體之醫藥組合物及其用途。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於針對EGFR且針對IGF-1R之雙重專一性抗體、其產生方法、含有該等抗體之醫藥組合物及其用途。

【先前技術】

EGFR及抗EGFR抗體

人類表皮生長因子受體(亦稱作HER-1或Erb-B1，且本文中稱作「EGFR」)為c-erbB原致癌基因編碼之170 kDa跨膜受體且展現固有酪胺酸激酶活性(Modjtahedi, H.等人，Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235；Herbst, R.S.及Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611)。SwissProt資料庫條目P00533提供EGFR之序列。亦存在EGFR之同功異型物及變異體(例如替代性RNA轉錄物、截短型式、多形現象等)，包括(但不限於)由Swissprot資料庫條目號P00533-1、P00533-2、P00533-3及P00533-4鑑別之EGFR。已知EGFR結合配位體，包括表皮生長因子(EGF)、轉型生長因子- α (TGf- α)、雙調蛋白、肝素結合EGF(hb-EGF)、 β 細胞調節素及表皮調節素(Herbst, R.S.及Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611；Mendelsohn, J.及Baselga, J., Oncogene 19 (2000) 6550-6565)。EGFR經由酪胺酸激酶介導之信號轉導路徑調節諸多細胞過程，包括(但不限於)活化控制細胞增殖、分化、細胞存活、細胞凋亡、血管生成、致有絲分裂及癌轉移之信號轉導路徑(Atalay, G.等人，Ann. Oncology 14 (2003) 1346-1363；Tsao, A.S.及Herbst, R.S., Signal 4 (2003) 4-9；Herbst, R.S.及Shin,

D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611 ; Modjtahedi, H.等人 , Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235)。

在諸多人類惡性病狀中已報導EGFR之過度表現，該等病狀包括膀胱、腦、頭部及頸部、胰腺、肺、乳房、卵巢、結腸、前列腺及腎之癌症。(Atalay, G.等人 , Ann. Oncology 14 (2003) 1346-1363 ; Herbst, R.S.及Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611 ; Modjtahedi, H.等人 , Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235)。在許多此等病狀中，EGFR之過度表現與患者之不良預後關聯或相關。(Herbst R.S.及Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611 ; Modjtahedi, H.等人 , Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235)。EGFR亦表現於正常組織之細胞中，尤其表現於皮膚、肝臟及胃腸道之上皮組織中，但其表現量通常低於在惡性細胞中之表現量(Herbst, R.S.及Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611)。

非結合型單株抗體(mAb)可為治療癌症之有用藥物，如由美國食品與藥品管理署(U.S. Food and Drug Administration)批准曲妥珠單抗(Trastuzumab)(Herceptin™ ; Genentech Inc,)用於治療晚期乳癌(Grillo-Lopez, A.J.等人 , Semin. Oncol. 26 (1999) 66-73; Goldenberg, M.M., Clin. Ther. 21 (1999) 309-18)、批准利妥昔單抗(Rituximab)(Rituxan™ ; IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA,及Genentech Inc., San Francisco, CA)用於治療CD20陽性B細胞低級或濾泡性非霍奇金氏淋巴瘤(Non-Hodgkin's lymphoma)、批准吉妥單抗(Gemtuzumab)(Mylotarg™, Celltech/Wyeth-Ayerst)用

於治療復發性急性骨髓白血病，且批准阿倫單抗(Alemtuzumab) (CAMPATH™, Millenium Pharmaceuticals/Schering AG)用於治療B細胞慢性淋巴球性白血病所證明。此等產品之成功不僅依靠其功效，而且依靠其顯著之安全概況(Grillo-Lopez, A.J.等人，Semin. Oncol. 26 (1999) 66-73；Goldenberg, M.M., Clin. Ther. 21 (1999) 309-18)。儘管此等藥物已有如此成就，但目前仍對獲得比非結合型mAb療法通常所提供高之專一性抗體活性存在極大興趣。

諸多研究結果表明Fc受體依賴性機制實質上促成細胞毒性抗體針對腫瘤之作用且表明針對腫瘤之最佳抗體應優先與活化Fc受體結合且最低限度地與抑制性搭配物FcγRIIB結合。(Clynes, R.A.等人，Nature Medicine 6(4) (2000) 443-446；Kalergis, A.M.及Ravetch, J.V., J. Exp. Med. 195(12) (2002) 1653-1659)。舉例而言，至少一項研究之結果表明FcγRIIIa受體中之多形現象尤其與抗體療法之功效高度相關。(Cartron, G.等人，Blood 99 (3) (2002) 754-758)。該研究展示同種接合FcγRIIIa患者對利妥昔單抗之反應優於異種接合患者。設計者推斷，該優良反應係歸因於抗體與FcγRIIIa之較佳活體內結合，由此使得針對淋巴瘤細胞之ADCC活性較佳(Cartron, G.等人，Blood 99(3) (2002) 754-758)。

已報導靶向EGFR及阻斷EGFR信號傳導路徑之多種策略。小分子酪胺酸激酶抑制劑(如吉非替尼(gefitinib)、埃羅替尼(erlotinib)及CI-1033)阻斷EGFR在細胞內酪胺酸激酶區域中之自體磷酸化，由此抑制下游信號傳導事件

(Tsao, A.S.及Herbst, R.S., Signal 4 (2003) 4-9)。另一方面，單株抗體靶向EGFR之細胞外部分，其引起配位體結合之阻斷且由此抑制下游事件(諸如細胞增殖)(Tsao, A.S.及Herbst, R.S., Signal 4 (2003) 4-9)。

已產生數種達成此活體外阻斷之鼠類單株抗體且已評估其影響小鼠異種移植模型中腫瘤生長之能力(Masui, H.等人, Cancer Res. 46 (1986) 5592-5598; Masui, H.等人, Cancer Res. 44 (1984) 1002-1007; Goldstein, N.等人, Clin. Cancer Res. 1 (1995) 1311-1318)。舉例而言，EMD 55900(EMD Pharmaceuticals)為一種鼠類抗EGFR單株抗體，其係針對人類表皮樣癌細胞株A431而產生且在患有晚期喉或咽下部鱗狀細胞癌的患者之臨床研究中加以測試(Bier, H.等人, Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 252 (1995) 433-9)。另外，結合EGFR細胞外域之大鼠單株抗體ICR16、ICR62及ICR80已展示有效抑制EGF及TGF- α 與該受體之結合。(Modjtahedi, H.等人, Int. J. Cancer 75 (1998) 310-316)。

鼠類單株抗體425為另一種MAb，其係針對人類A431癌細胞株而產生且發現其與人類表皮生長因子受體外部域上之多肽抗原決定基結合。(Murthy, U.等人, Arch. Biochem. Biophys. 252(2) (1987) 549-560)。在治療性處理中使用鼠類抗體之潛在問題在於，非人類單株抗體可被人類宿主識別成外來蛋白；因此，反覆注射該等外來抗體可能導致誘發引起有害過敏反應之免疫反應。對於基於鼠類之單株抗體，此通常稱作人類抗小鼠抗體反應或「HAMA」反應或

人類抗大鼠抗體反應或「HARA」反應。另外，此等「外來」抗體可受到宿主免疫系統攻擊使得其在到達其標靶位點之前實際上已被中和。此外，非人類單株抗體(例如鼠類單株抗體)通常缺乏人類效應子功能，亦即其尤其不能介導補體依賴性溶解或經由抗體依賴性細胞毒性或Fc受體介導之吞噬作用來溶解人類標靶細胞。

已開發包含來自兩種或兩種以上不同物種(例如小鼠及人類)之抗體部分的嵌合抗體作為「結合型」抗體之替代物。舉例而言，US 5,891,996(Mateo de Acosta del Rio, C.M.等人)論述針對EGFR之小鼠/人類嵌合抗體R3，且US 5,558,864論述嵌合及人類化形式之鼠類抗EGFR MAbs 425的產生。IMC-C225(Erbix[®]; ImClone)亦為嵌合小鼠/人類抗EGFR單株抗體(基於小鼠M225單株抗體，其在人類臨床試驗中產生HAMA反應)，已報導其在多種人類異種移植模型中顯示抗腫瘤功效。(Herbst, R.S.及Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611)。IMC-C225之功效歸因於數種機制，包括抑制由EGFR信號傳導路徑及可能由增加之抗體依賴性細胞毒性(ADCC)活性調節之細胞事件(Herbst, R.S.及Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611)。IMC-C225亦用於臨床試驗，包括與放射療法及化學療法組合使用(Herbst, R.S.及Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611)。近來，Abgenix, Inc.(Fremont, CA)開發出用於癌症治療之ABX-EGF。ABX-EGF為全人類抗EGFR單株抗體。(Yang, X.D.等人，Crit. Rev. Oncol./Hematol. 38 (2001) 17-23。

WO 2006/082515提及源自大鼠單株抗體ICR62的人類化抗EGFR單株抗體，且提及其用於癌症治療之糖基工程改造形式。

IGF-1R及抗IGF-1R抗體

胰島素樣生長因子I受體(IGF-1R、IGF-IR、CD 221抗原)屬於跨膜蛋白酪胺酸激酶家族(LeRoith, D.等人, *Endocrin. Rev.* 16 (1995) 143-163; 及Adams, T.E.等人, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1093)。IGF-IR以高親和力結合IGF-I且引發活體內對此配位體之生理反應。IGF-IR亦與IGF-II結合，但親和力略低。IGF-IR過度表現促進細胞之贅生性轉型，且有證據表明IGF-IR參與細胞之惡性轉型，且因此為開發治療癌症之治療劑的有用標靶(Adams, T.E.等人, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1093)。

針對IGF-IR之抗體為現有技術中所熟知的且對其活體外及活體內抗腫瘤作用進行研究(Benini, S.等人, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 1790-1797; Scotlandi, K.等人, *Cancer Gene Ther.* 9 (2002) 296-307; Scotlandi, K.等人, *Int. J. Cancer* 101 (2002) 11-16; Brunetti, A.等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165 (1989) 212-218; Prigent, S.A.等人, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 9970-9977; Li, S.L.等人, *Cancer Immunol. Immunother.* 49 (2000) 243-252; Pessino, A.等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162 (1989) 1236-1243; Surinya, K.H.等人, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 16718-16725; Soos, M. A.等人, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 12955-12963; Soos, M.A.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 86 (1989) 5217-5221 ; O'Brien, R., M. 等人 , EMBO J. 6 (1987) 4003-4010 ; Taylor, R. 等人 , Biochem. J. 242 (1987) 123-129 ; Soos, M.A. 等人 , Biochem. J. 235 (1986) 199-208 ; Li, S.L. 等人 , Biochem. Biophys. Res. Commun. 196 (1993) 92-98 ; Delafontaine, P. 等人 , J. Mol. Cell. Cardiol. 26 (1994) 1659-1673 ; Kull, F.C., Jr. 等人 J. Biol. Chem. 258 (1983) 6561-6566 ; Morgan, D.O. 及 Roth, R.A., Biochemistry 25 (1986) 1364-1371 ; Forsayeth, J.R. 等人 , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 3448-3451 ; Schaefer, E.M. 等人 , J. Biol. Chem. 265 (1990) 13248-13253 ; Gustafson, T.A. 及 Rutter, W.J., J. Biol. Chem. 265 (1990) 18663-18667 ; Hoyne, P.A. 等人 , FEBS Lett. 469 (2000) 57-60 ; Tulloch, P.A. 等人 , J. Struct. Biol. 125 (1999) 11-18 ; Rohlik, Q.T. 等人 , Biochem. Biophys. Res. Comm. 149 (1987) 276-281 ; 及 Kalebic, T. 等人 , Cancer Res. 54 (1994) 5531-5534 ; Adams, T.E. 等人 , Cell. Mol. Life Sci. 57 (2000) 1050-1093 ; Dricu, A. 等人 , Glycobiology 9 (1999) 571-579 ; Kanter-Lewensohn, L. 等人 , Melanoma Res. 8 (1998) 389-397 ; Li, S.L. 等人 , Cancer Immunol. Immunother. 49 (2000) 243-252)。針對IGF-IR之抗體亦描述於大量其他公開案中，該等其他公開案例如Arteaga, C.L. 等人 , Breast Cancer Res. Treatment 22 (1992) 101-106 ; 及 Hailey, J. 等人 , Mol. Cancer Ther. 1 (2002) 1349-1353。

特定而言，稱作 α IR3之針對IGF-IR之單株抗體廣泛用於

研究 IGF-IR 介導過程及 IGF-I 介導疾病(諸如癌症)的研究中。Kull, F.C., J. Biol. Chem. 258 (1983) 6561-6566 描述 α -IR-3。同時, 已公開約一百項公開案, 其涉及 α IR3(單獨及與細胞生長抑制劑(諸如小紅莓(doxorubicin)及長春新鹼(vincristine))一起)在其抗腫瘤作用方面之研究及治療用途。 α IR3 為一種鼠類單株抗體, 已知其抑制 IGF-I 與 IGF 受體之結合, 但不抑制 IGF-II 與 IGF-IR 之結合。 α IR3 在高濃度下刺激腫瘤細胞增殖及 IGF-IR 磷酸化(Bergmann, U. 等人, Cancer Res. 55 (1995) 2007-2011; Kato, H. 等人, J. Biol. Chem. 268 (1993) 2655-2661)。存在其他抗體(例如 1H7, Li, S., L. 等人, Cancer Immunol. Immunother. 49 (2000) 243-252), 與抑制 IGF-I 與 IGF-IR 之結合相比, 其更有效地抑制 IGF-II 與 IGF-IR 之結合。Adams, T.E. 等人, Cell. Mol. Life Sci. 57 (2000) 1050-1093 描述抗體及其特性及特徵之現有技術之概要。

現有技術中所述之大多數抗體均來源於小鼠。如現有技術中所熟知, 該等抗體在不作其他變化(如嵌合或人類化)的情況下不適用於治療人類患者。基於此等缺點, 人類抗體明顯較佳作為治療人類患者之治療劑。人類抗體為現有技術中所熟知的(van Dijk, M.A. 及 van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374)。基於該技術, 可產生針對多種標靶之人類抗體。針對 IGF-IR 之人類抗體之實例描述於 WO 02/053596 中。

WO 2005/005635 提及人類抗 IGF-1R 抗體 <IGF-1R>

HUMAB純系 18(DSM ACC 2587)或<IGF-1R> HUMAB純系 22(DSM ACC 2594)及其於癌症治療之用途。

雙重專一性抗體

不久之前，已藉由使例如IgG抗體形式及單鏈域融合而開發出多種重組抗體形式(例如四價雙重專一性抗體)(參見例如 Coloma, M.J.等人，Nature Biotech 15 (1997) 159-163；WO 2001/077342；及Morrison, S.L., Nature Biotech 25 (2007) 1233-1234)。

亦已開發出數種其他新穎形式，其中不再保留抗體核心結構(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)，該等新穎形式諸如二功能抗體、三功能抗體或四功能抗體、微型抗體、數種單鏈形式(scFv、Bis-scFv)，其能夠結合兩個或兩個以上抗原(Holliger, P.等人，Nature Biotech 23 (2005) 1126-1136；Fischer, N., Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14；Shen, J.等人，Journal of Immunological Methods 318 (2007) 65-74；Wu, C.等人，Nature Biotech. 25 (2007) 1290-1297)。

所有該等形式均使用連接子使抗體核心(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)與另一結合蛋白(例如scFv)融合或使例如兩個Fab片段或scFv融合(Fischer, N., Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14)。需注意吾人可能意欲藉由保持與天然存在抗體之高度類似性而保留效應功能，諸如補體依賴性細胞毒性(CDC)或抗體依賴性細胞毒性(ADCC)，該等效應功能係經由Fc受體結合介導。

WO 2007/024715中報導作為工程改造多價及多專一性結

合蛋白之雙可變域免疫球蛋白。US 6,897,044中報導製備生物活性抗體二聚物之方法。US 7,129,330中報導具有至少四個經肽連接子彼此連接之可變域的多價F_V抗體構築體。US 2005/0079170中報導二聚及多聚抗原結合結構。US 6,511,663中報導包含三個或四個由連接結構彼此共價結合之Fab片段的三價或四價單專一性抗原結合蛋白，該蛋白不為天然免疫球蛋白。WO 2006/020258中報導四價雙重專一性抗體，其可有效表現於原核及真核細胞中且適用於治療及診斷方法。US 2005/0163782中報導使經由至少一鏈間二硫鍵連接之二聚物與未經由至少一鏈間二硫鍵連接之二聚物自包含該兩種多肽二聚物之混合物分離或優先合成前者的方法。US 5,959,083中報導雙重專一性四價受體。WO 2001/077342中報導具有三個或三個以上功能性抗原結合位點的工程改造抗體。

WO 1997/001580中報導多專一性及多價抗原結合多肽。WO 1992/004053報導同質結合物(homoconjugate)，其通常由結合同一抗原決定子之IgG類單株抗體藉由合成交聯共價連接而製備。WO 1991/06305報導對抗原具有高親合力(avidity)之寡聚單株抗體，由此分泌通常為IgG類之寡聚物，其具有兩個或兩個以上免疫球蛋白單體結合在一起形成四價或六價IgG分子。US 6,350,860中報導源自綿羊之抗體及工程改造抗體構築體，其可用於治療干擾素 γ 活性為病原的疾病。US 2005/0100543中報導可靶向構築體，其為雙重專一性抗體之多價載體，亦即每一分子之可靶向構

築體可用作兩個或兩個以上雙重專一性抗體的載體。WO 1995/009917中報導遺傳工程改造雙重專一性四價抗體。WO 2007/109254中報導由穩定scFv組成或包含穩定scFv的穩定結合分子。

針對EGFR及IGF-1R之雙重專一性抗體自Lu, D.等人, Biochemical and Biophysical Research Communications 318 (2004) 507-513; J. Biol. Chem., 279 (2004) 2856-2865; 及J. Biol Chem. 280 (2005) 19665-72中獲知。然而, 此等雙重專一性抗EGFR/抗IGF-1R抗體與母單專一性抗體之組合相比(尤其在EGFR與IGF-1R兩者之表現量均相等(高)之腫瘤細胞中)展示明顯減小之腫瘤生長抑制。

【發明內容】

吾等現已意外地發現新穎雙重專一性抗EGFR/抗IGF-1R抗體, 其與母單專一性抗體之組合相比(尤其在EGFR與IGF-1R兩者之表現量均相等(高)之腫瘤細胞中)展示至少類似的腫瘤生長抑制(僅使用減少量之雙重專一性抗體)。

本發明之一第一態樣為與EGFR及IGF-1R結合之雙重專一性抗體, 其包含與EGFR結合之第一抗原結合位點及與IGF-1R結合之第二抗原結合位點, 該雙重專一性抗體之特徵在於

i) 該等抗原結合位點各為一對抗體重鏈可變域與抗體輕鏈可變域;

ii) 該第一抗原結合位點在該重鏈可變域中包含SEQ ID NO:1之CDR3區、SEQ ID NO:2之CDR2區及SEQ ID

NO:3之CDR1區，且在該輕鏈可變域中包含SEQ ID NO:4之CDR3區、SEQ ID NO:5之CDR2區及SEQ ID NO:6之CDR1區；且

- iii) 該第二抗原結合位點在該重鏈可變域中包含SEQ ID NO:11之CDR3區、SEQ ID NO:12之CDR2區及SEQ ID NO:13之CDR1區，且在該輕鏈可變域中包含SEQ ID NO:14之CDR3區、SEQ ID NO:15之CDR2區及SEQ ID NO:16之CDR1區；

或該第二抗原結合位點在該重鏈可變域中包含SEQ ID NO:17之CDR3區、SEQ ID NO:18之CDR2區及SEQ ID NO:19之CDR1區，且在該輕鏈可變域中包含SEQ ID NO:20之CDR3區、SEQ ID NO:21之CDR2區及SEQ ID NO:22之CDR1區。

在本發明之一實施例中，該雙重專一性抗體之特徵在於

- i) 該第一抗原結合位點包含SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8作為重鏈可變域，且包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10作為輕鏈可變域，
- ii) 該第二抗原結合位點包含SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24作為重鏈可變域，且包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:26作為輕鏈可變域。

在本發明之一實施例中，該雙重專一性抗體之特徵在於

- i) 該第一抗原結合位點包含SEQ ID NO:8作為重鏈可變域且包含SEQ ID NO:10作為輕鏈可變域；
- ii) 該第二抗原結合位點包含SEQ ID NO:23作為重鏈可

變域且包含SEQ ID NO:25作為輕鏈可變域。

該等雙重專一性抗體至少為二價抗體且可為三價、四價或多價抗體。本發明之雙重專一性抗體較佳為二價、三價或四價抗體。

本發明之另一態樣為一種編碼該雙重專一性抗體鏈之核酸分子。

本發明之另一態樣為一種包含該雙重專一性抗體的醫藥組合物，該組合物係用於治療癌症；該雙重專一性抗體於製造治療癌症之藥物的用途；治療患有癌症之患者的方法，其係藉由向需要該治療之患者投與該雙重專一性抗體而達成。

本發明之雙重專一性抗體對需要EGFR及IGF-1R靶向療法之患者展示益處。本發明之抗體具有新穎及獨創特性，該等特性對患有該疾病，尤其患有癌症之患者產生益處。

【實施方式】

本發明之一實施例為與EGFR及IGF-1R結合之雙重專一性抗體，其包含與EGFR結合之第一抗原結合位點及與IGF-1R結合之第二抗原結合位點，該雙重專一性抗體之特徵在於

- i) 該等抗原結合位點各為一對抗體重鏈可變域與抗體輕鏈可變域；
- ii) 該第一抗原結合位點在該重鏈可變域中包含SEQ ID NO:1之CDR3區、SEQ ID NO:2之CDR2區及SEQ ID NO:3之CDR1區，且在該輕鏈可變域中包含SEQ ID

NO:4之CDR3區、SEQ ID NO:5之CDR2區及SEQ ID NO:6之CDR1區；且

- iii) 該第二抗原結合位點在該重鏈可變域中包含SEQ ID NO:11之CDR3區、SEQ ID NO:12之CDR2區及SEQ ID NO:13之CDR1區，且在該輕鏈可變域中包含SEQ ID NO:14之CDR3區、SEQ ID NO:15之CDR2區及SEQ ID NO:16之CDR1區。

本發明之另一實施例為與EGFR及IGF-1R結合之雙重專一性抗體，其包含與EGFR結合之第一抗原結合位點及與IGF-1R結合之第二抗原結合位點，該雙重專一性抗體之特徵在於

- i) 該等抗原結合位點各為一對抗體重鏈可變域與抗體輕鏈可變域；
- ii) 該第一抗原結合位點在該重鏈可變域中包含SEQ ID NO:1之CDR3區、SEQ ID NO:2之CDR2區及SEQ ID NO:3之CDR1區，且在該輕鏈可變域中包含SEQ ID NO:4之CDR3區、SEQ ID NO:5之CDR2區及SEQ ID NO:6之CDR1區；且
- iii) 該第二抗原結合位點在該重鏈可變域中包含SEQ ID NO:17之CDR3區、SEQ ID NO:18之CDR2區及SEQ ID NO:19之CDR1區，且在該輕鏈可變域中包含SEQ ID NO:20之CDR3區、SEQ ID NO:21之CDR2區及SEQ ID NO:22之CDR1區。

本發明之另一實施例為與EGFR及IGF-1R結合之雙重專

一性抗體，其包含與EGFR結合之第一抗原結合位點及與IGF-1R結合之第二抗原結合位點，該雙重專一性抗體之特徵在於

- i) 該等抗原結合位點各為一對抗體重鏈可變域與抗體輕鏈可變域；
- ii) 該第一抗原結合位點包含SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8作為重鏈可變域，且包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10作為輕鏈可變域，
- iii) 該第二抗原結合位點包含SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24作為重鏈可變域，且包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:26作為輕鏈可變域。

本發明之另一實施例為與EGFR及IGF-1R結合之雙重專一性抗體，其包含與EGFR結合之第一抗原結合位點及與IGF-1R結合之第二抗原結合位點，該雙重專一性抗體之特徵在於

- i) 該等抗原結合位點各為一對抗體重鏈可變域與抗體輕鏈可變域；
- ii) 該第一抗原結合位點包含SEQ ID NO:7作為重鏈可變域且包含SEQ ID NO:10作為輕鏈可變域，
- iii) 該第二抗原結合位點包含SEQ ID NO:23作為重鏈可變域且包含SEQ ID NO:25作為輕鏈可變域。

本發明之另一實施例為與EGFR及IGF-1R結合之雙重專一性抗體，其包含與EGFR結合之第一抗原結合位點及與IGF-1R結合之第二抗原結合位點，該雙重專一性抗體之特

徵在於

- i) 該等抗原結合位點各為一對抗體重鏈可變域與抗體輕鏈可變域；
- ii) 該第一抗原結合位點包含SEQ ID NO:8作為重鏈可變域且包含SEQ ID NO:10作為輕鏈可變域，
- iii) 該第二抗原結合位點包含SEQ ID NO:23作為重鏈可變域且包含SEQ ID NO:25作為輕鏈可變域。

本發明之另一實施例為與EGFR及IGF-1R結合之雙重專一性抗體，其包含與EGFR結合之第一抗原結合位點及與IGF-1R結合之第二抗原結合位點，該雙重專一性抗體之特徵在於

- i) 該等抗原結合位點各為一對抗體重鏈可變域與抗體輕鏈可變域；
- ii) 該第一抗原結合位點包含SEQ ID NO:7作為重鏈可變域且包含SEQ ID NO:10作為輕鏈可變域，
- iii) 該第二抗原結合位點包含SEQ ID NO:24作為重鏈可變域且包含SEQ ID NO:26作為輕鏈可變域。

本發明之另一實施例為與EGFR及IGF-1R結合之雙重專一性抗體，其包含與EGFR結合之第一抗原結合位點及與IGF-1R結合之第二抗原結合位點，該雙重專一性抗體之特徵在於

- i) 該等抗原結合位點各為一對抗體重鏈可變域與抗體輕鏈可變域；
- ii) 該第一抗原結合位點包含SEQ ID NO:8作為重鏈可變

域且包含SEQ ID NO:10作為輕鏈可變域，

iii) 該第二抗原結合位點包含SEQ ID NO:24作為重鏈可變域且包含SEQ ID NO:26作為輕鏈可變域。

如本文所用之「抗體」係指包含抗原結合位點之結合蛋白。如本文所用之術語「結合位點」或「抗原結合位點」表示抗體分子中實際與配位體結合之區域。本發明抗體中之結合位點可各由一對兩個可變域(亦即一重鏈可變域與一輕鏈可變域)形成。抗體中之最小結合位點決定子為重鏈CDR3區。在本發明之一實施例中，各結合位點包含抗體重鏈可變域(VH)及/或抗體輕鏈可變域(VL)，且較佳由一對抗體輕鏈可變域(VL)與抗體重鏈可變域(VH)形成。

抗體專一性係指抗體對抗原之特定抗原決定基的選擇性識別。天然抗體例如具有單專一性。本發明之「雙重專一性抗體」為具有兩個不同抗原結合專一性的抗體。若抗體具有一個以上專一性，則所識別之抗原決定基可與單一抗原或與一個以上抗原有關。本發明之抗體對兩個不同抗原(亦即EGFR作為第一抗原且IGF-1R作為第二抗原)具有專一性。

如本文所用之術語「單專一性」抗體表示具有一或多個結合位點之抗體，該等結合位點各結合相同抗原之相同抗原決定基。

如本申請案中所用之術語「價」表示抗體分子中存在特定數目之結合位點。因此，術語「二價」、「四價」及「六價」分別表示抗體分子中存在兩個結合位點、四個結合位

點及六個結合位點。本發明之雙重專一性抗體至少為「二價」抗體且可為「三價」或「多價」(例如「四價」或「六價」)抗體。本發明之雙重專一性抗體較佳為二價、三價或四價抗體。在一實施例中，該雙重專一性抗體為二價抗體。在一實施例中，該雙重專一性抗體為三價抗體。在一實施例中，該雙重專一性抗體為四價抗體。

本發明之抗體具有兩個或兩個以上結合位點且具有雙重專一性。亦即，即使在存在兩個以上結合位點(亦即抗體為三價或多價抗體)的情況下，抗體亦可具有雙重專一性。本發明之雙重專一性抗體包括例如多價單鏈抗體、雙功能抗體及三功能抗體以及具有全長抗體恆定域結構之抗體，其中其他抗原結合位點(例如單鏈Fv、VH域及/或VL域、Fab或(Fab)₂)經由一或多個肽連接子與該恆定域結構連接。抗體可為來自單一物種之全長抗體，或為嵌合抗體或人類化抗體。對於具有兩個以上抗原結合位點之抗體而言，一些結合位點可能相同，只要該蛋白質具有針對兩個不同抗原之結合位點即可。亦即，第一結合位點對EGFR具有專一性，而第二結合位點對IGF-1R具有專一性。

如同天然抗體一般，本發明抗體之抗原結合位點通常含有六個互補決定區(CDR)，其在不同程度上促成結合位點對抗原之親和力。存在三個重鏈可變域CDR(CDRH1、CDRH2及CDRH3)及三個輕鏈可變域CDR(CDRL1、CDRL2及CDRL3)。藉由與彙編胺基酸序列資料庫對比來確定CDR及構架區(FR)之範圍，在該資料庫中已根據序列間之

可變性界定此等區域。本發明之範疇內亦包括包含較少 CDR 之功能性抗原結合位點(亦即，其中結合專一性係由三個、四個或五個 CDR 決定)。舉例而言，整套 6 個以下 CDR 可能足以結合。在一些情況下，VH 或 VL 域將足夠。

在某些實施例中，本發明之抗體另外包含一或多個免疫球蛋白類別之免疫球蛋白恆定區。免疫球蛋白類別包括 IgG、IgM、IgA、IgD 及 IgE 同型，且在 IgG 及 IgA 的情況下，包括其亞型。在一較佳實施例中，本發明之抗體具有 IgG 型抗體之恆定域結構，但具有四個抗原結合位點。此藉由使兩個專一性結合 EGFR 之完整抗原結合位點(例如單鏈 Fv)與專一性結合 IGF-1R 之完整抗體之 N 或 C 末端重鏈或輕鏈連接來實現。該四個抗原結合位點較佳對於兩個不同結合專一性各包含兩個結合位點。

如本文所用之術語「單株抗體」或「單株抗體組合物」係指單一胺基酸組成之抗體分子之製劑。

術語「嵌合抗體」係指包含來自一種來源或物種之可變區(亦即結合區)及源自不同來源或物種之恆定區之至少一部分的抗體，其通常藉由重組 DNA 技術製備。包含鼠類可變區及人類恆定區之嵌合抗體較佳。本發明所包涵之「嵌合抗體」之其他較佳形式為以下形式，其中恆定區已相對於原始抗體經修飾或改變以產生本發明之尤其與 C1q 結合及/或 Fc 受體(FcR)結合有關之特性。該等「嵌合」抗體亦稱作「類別轉換抗體」。嵌合抗體為包含編碼免疫球蛋白可變區之 DNA 片段及編碼免疫球蛋白恆定區之 DNA 片段的

已表現免疫球蛋白基因之產物。產生嵌合抗體之方法涉及此項技術中所熟知之習知重組DNA及基因轉染技術。參見例如Morrison, S.L.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238及US 5,204,244。

術語「人類化抗體」係指構架或「互補決定區」(CDR)已經修飾以包含與母免疫球蛋白相比具有不同專一性之免疫球蛋白之CDR的抗體。在一較佳實施例中,將鼠類CDR移植至人類抗體之構架區中以製備「人類化抗體」。參見例如Riechmann, L.等人, Nature 332 (1988) 323-327; 及Neuberger, M.S.等人, Nature 314 (1985) 268-270。尤其較佳之CDR對應於呈現識別上文針對嵌合抗體所述之抗原之序列的CDR。本發明所包涵之「人類化抗體」之其他形式為以下形式,其中恆定區已相對於原始抗體經另外修飾或改變以產生本發明之尤其與C1q結合及/或Fc受體(FcR)結合有關之特性。

如本文所用之術語「人類抗體」意欲包括具有源自人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區的抗體。人類抗體為現有技術中所熟知的(van Dijk, M.A.及van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374)。人類抗體亦可在轉殖基因動物(例如小鼠)中產生,該等轉殖基因動物在免疫之後能夠在無內源免疫球蛋白產生的情況下產生整套或選定部分之人類抗體。人類生殖系免疫球蛋白基因陣列轉移至該等生殖系突變小鼠中將使得在抗原激發之後產生人類抗體(參見例如Jakobovits, A.等人, Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555 ; Jakobovits, A. 等人 , Nature 362 (1993) 255-258 ; Bruggemann, M. 等人 , Year Immunol. 7 (1993) 33-40)。亦可在噬菌體呈現文庫中產生人類抗體(Hoogenboom, H.R.及 Winter, G.J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D.等人 , J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597)。Cole等人及 Boerner等人之技術亦可用於製備人類單株抗體(Cole, S.P.C.等人 , Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss (1985) 77-96 ; 及 Boerner, P. 等人 , J. Immunol. 147 (1991) 86-95)。如已針對本發明之嵌合及人類化抗體提及，如本文所用之術語「人類抗體」亦包含在恆定區中例如藉由「類別轉換」(亦即使Fc部分變化或突變(例如IgG1至IgG4及/或IgG1/IgG4突變))修飾以產生本發明之尤其與C1q結合及/或FcR結合有關之特性的抗體。

如本文所用之術語「重組人類抗體」意欲包括藉由重組方法製備、表現、產生或分離的所有人類抗體，諸如自宿主細胞(諸如NS0或CHO細胞)或人類免疫球蛋白基因之轉殖基因動物(例如小鼠)分離之抗體或使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體表現的抗體。該等重組人類抗體具有重排形式之可變區及恆定區。本發明之重組人類抗體已經歷活體內體細胞超突變。因此，重組抗體之VH及VL區之胺基酸序列為以下序列，其雖然源自人類生殖系VH及VL序列且與該等序列有關，但可能不天然存在於活體內人類抗體生殖系譜系中。如本文所用之「可變域」(輕鏈(VL)之

可變域、重鏈(VH)之可變區)表示直接參與抗體與抗原之結合的各對輕鏈與重鏈。人類輕鏈及重鏈之可變域具有相同通式結構，且各域包含由3個「高變區」(或互補決定區，CDR)連接的4個構架(FR)區，其序列為廣泛保守的。構架區採用 β 摺疊構形且CDR可形成連接該 β 摺疊結構之環。各鏈中之CDR由構架區保持其三維結構，且與來自另一鏈之CDR一起形成抗原結合位點。抗體重鏈及輕鏈CDR3區在本發明抗體之結合專一性/親和力中發揮尤其重要作用之作用且因此提供本發明之另一目的。

本文所用之術語「高變區」或「抗體之抗原結合部分」係指抗體中負責抗原結合之胺基酸殘基。高變區包含「互補決定區」或「CDRs」之胺基酸殘基。「構架」區或「FR」區為除本文所定義之高變區殘基以外的可變域區。因此，抗體之輕鏈及重鏈自N端至C端包含FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4域。各鏈上之CDRs由該等構架胺基酸分隔。尤其，重鏈之CDR3為對抗原結合貢獻最大之區域。CDR區及FR區係根據Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)之標準定義決定。

本發明之雙重專一性抗體另外包括具有「保守序列修飾」的抗體(其稱為雙重專一性抗體之「變異體」)。此意謂不影響或改變本發明抗體之上述特徵的核苷酸及胺基酸序列修飾。修飾可由此項技術中已知之標準技術引入，該

等標準技術諸如定點突變誘發及PCR介導之突變誘發。保守胺基酸取代包括胺基酸殘基經具有類似側鏈之胺基酸殘基置換之取代。此項技術中已定義具有類似側鏈之胺基酸殘基家族。此等家族包括具有鹼性側鏈的胺基酸(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、具有酸性側鏈的胺基酸(例如天冬胺酸、麩胺酸)、具有不帶電極性側鏈的胺基酸(例如甘胺酸、天冬醯胺酸、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、具有非極性側鏈的胺基酸(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸)、具有 β -分支鏈側鏈的胺基酸(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及具有芳族側鏈的胺基酸(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。因此，在雙重專一性<EGFR-IGF1R>抗體中預計之非必需胺基酸殘基較佳可經相同側鏈家族之另一胺基酸殘基置換。因此，「變異」雙重專一性<EGFR-IGF1R>抗體在本文中係指胺基酸序列與「母」雙重專一性<EGFR-IGF1R>抗體胺基酸序列不同之處在於「母」抗體之一或多個可變區或恆定區中添加、刪除及/或取代多達十個、較佳約二個至約五個胺基酸的分子。胺基酸取代可藉由基於Riechmann, L.等人，Nature 332 (1988) 323-327及Queen, C.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033所述之分子模型化的突變誘發來執行。

本文中序列之一致性或同源性定義為在比對序列及引入空隙(若必要)以達成最大序列一致性百分比之後，候選序

列中與母序列一致之胺基酸殘基之百分比。N末端、C末端或內部延長、刪除或插入抗體序列中均不應視為會影響序列一致性或同源性。變異體保留結合人類EGFR及人類IGF-1R之能力。

如本文所用之術語「結合」或「專一性結合」係指活體外檢定中，較佳在使用表現野生型抗原之CHO細胞的基於細胞之ELISA中，抗體與抗原之抗原決定基的結合。結合意謂結合親和力(K_D)為 10^{-8} M或 10^{-8} M以下，較佳 10^{-13} M至 10^{-9} M。可藉由BIAcore檢定(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden)研究抗體與抗原或FcγRIII之結合。結合親和力係由術語 k_a (抗體/抗原複合物中抗體之締合速率常數)、 k_D (解離常數)及 $K_D(k_D/k_a)$ 定義。

術語「抗原決定基」包括能夠與抗體專一性結合的任何多肽決定子。在某些實施例中，抗原決定基決定子包括分子之化學活性表面基團(諸如胺基酸、糖側鏈、磷醯基或磺醯基)，且在某些實施例中，其可具有特定三維結構特徵及/或特定電荷特徵。抗原決定基為抗原中與抗體結合之區域。在某些實施例中，當抗體在蛋白質及/或大分子之複雜混合物中優先識別其標靶抗原時，認為該抗體專一性結合抗原。

人類表皮生長因子受體(亦稱作HER-1或Erb-B1，且本文中稱作「EGFR」)為由c-erbB原致癌基因編碼之170 kDa跨膜受體且展現固有酪胺酸激酶活性(Modjtahedi, H.等人，Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235；Herbst, R.S.及Shin,

D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611)。SwissProt資料庫條目P00533提供EGFR之序列。亦存在EGFR之同功異型物及變異體(例如替代性RNA轉錄物、截短型式、多態現象等)，包括(但不限於)由Swissprot資料庫條目號P00533-1、P00533-2、P00533-3及P00533-4鑑別之EGFR。已知EGFR結合配位體，包括表皮生長因子(EGF)、轉型生長因子- α (TGF- α)、雙調蛋白、肝素結合EGF(hb-EGF)、 β 細胞調節素及表皮調節素(Herbst, R.S.及Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611；Mendelsohn, J.及Baselga, J., Oncogene 19 (2000) 6550-6565)。EGFR經由酪胺酸激酶介導之信號轉導路徑調節諸多細胞過程，包括(但不限於)活化控制細胞增殖、分化、細胞存活、細胞凋亡、血管生成、致有絲分裂及癌轉移之信號轉導路徑(Atalay, G.等人，Ann. Oncology 14 (2003) 1346-1363；Tsao, A.S.及Herbst, R.S., Signal 4 (2003) 4-9；Herbst, R.S.及Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611；Modjtahedi, H.等人，Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235)。

胰島素樣生長因子I受體(IGF-IR，CD 221抗原)屬於跨膜蛋白酪胺酸激酶家族(LeRoith, D.等人，Endocrin. Rev. 16 (1995) 143-163；及Adams, T.E.等人，Cell. Mol. Life Sci. 57 (2000) 1050-1063)。SwissProt資料庫條目P08069提供IGF-1R之序列。IGF-IR以高親和力結合IGF-I且引發活體內對此配位體之生理反應。IGF-IR亦與IGF-II結合，但親和力略低。IGF-IR過度表現促進細胞之贅生性轉型，且有

證據表明IGF-IR參與細胞之惡性轉型，且因此為開發治療癌症之治療劑的有用標靶(Adams, T.E.等人，Cell. Mol. Life Sci. 57 (2000) 1050-1063)。

在本發明之一實施例中，雙重專一性抗體包含全長母抗體作為骨架。

術語「全長抗體」表示由兩條「全長抗體重鏈」及兩條「全長抗體輕鏈」組成之抗體(對於無CH4域之「全長抗體」之示意性結構，參見圖10。亦參見圖1及圖12中連接有單鏈Fv(XGFR)及單鏈Fab之四價雙重專一性形式的全長部分(scFab-XGFR))。「全長抗體重鏈」為沿N末端至C末端方向由抗體重鏈可變域(VH)、抗體重鏈恆定域1(CH1)、抗體鉸鏈區(HR)、抗體重鏈恆定域2(CH2)及抗體重鏈恆定域3(CH3)組成的多肽，簡寫為VH-CH1-HR-CH2-CH3；且視情況而言，在亞類IgE之抗體的情況下存在抗體重鏈恆定域4(CH4)。「全長抗體重鏈」較佳為沿N末端至C末端方向由VH、CH1、HR、CH2及CH3組成的多肽。「全長抗體輕鏈」為沿N末端至C末端方向由抗體輕鏈可變域(VL)及抗體輕鏈恆定域(CL)組成的多肽，簡寫為VL-CL。抗體輕鏈恆定域(CL)可為 κ 或 λ 。兩條全長抗體鏈經由CL域與CH1域之間及全長抗體重鏈鉸鏈區之間的多肽間二硫鍵連接在一起。典型全長抗體之實例為天然抗體，如IgG(例如IgG 1及IgG2)、IgM、IgA、IgD及IgE。本發明之全長抗體可來自單一物種(例如人類)，或其可為嵌合抗體或人類化抗體。本發明之全長抗體包含兩個各由一對VH與VL形成之

抗原結合位點，該兩個抗原結合位點與相同抗原專一性結合。因此，包含第一抗原結合位點且由兩條抗體輕鏈及兩條抗體重鏈組成的單專一性二價(=全長)抗體為全長抗體。該全長抗體重鏈或輕鏈之C末端表示該重鏈或輕鏈C末端的最後一個胺基酸。該全長抗體重鏈或輕鏈之N末端表示該重鏈或輕鏈N末端的最後一個胺基酸。

在一實施例中，該雙重專一性抗體為二價抗體，其使用例如 a) WO 2009/080251、WO 2009/080252或WO 2009/080253所述之形式(域交換抗體-參見實例14)，或 b) 基於 scFab-Fc 融合抗體之形式，在該抗體中一單鏈 Fab 片段對 EGFR 具有專一性且另一片段對 IGF-1R 具有專一性(參見實例17)，或 c) 歐洲申請案第 07024867.9 號(WO 2009/080251)，Ridgway, J.B., Protein Eng. 9 (1996) 617-621；WO 96/027011；Merchant A.M等人，Nature Biotech 16 (1998) 677-681；Atwell, S.等人，J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35及 EP 1870459A1 中所述之形式。在一實施例中，本發明雙重專一性抗體之特徵在於包含 SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32 及 SEQ ID NO:33 或其變異體之胺基酸序列。在一實施例中，本發明雙重專一性抗體之特徵在於包含 SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36 及 SEQ ID NO:37 或其變異體之胺基酸序列。在一實施例中，本發明雙重專一性抗體之特徵在於包含 SEQ ID NO:38 及 SEQ ID NO:39 或其變異體之胺基酸序列。此等胺基酸序列係基於 SEQ ID NO:8 之重鏈可變域及 SEQ ID NO:10 之輕鏈可變域(源自人類化

<EGFR>ICR62)作為結合EGFR之第一抗原結合位點，且基於SEQ ID NO:23之重鏈可變域及SEQ ID NO:25之輕鏈可變域(源自人類抗IGF-1R抗體<IGF-1R> HUMAB純系18(DSM ACC 2587))作為結合IGF-1R之第二抗原結合位點。

在一實施例中，該雙重專一性抗體為三價抗體，其使用例如基於專一性結合兩種受體EGFR或IGF-1R中之一者的全長抗體僅在一條重鏈之一C末端與專一性結合兩種受體EGFR或IGF-1R中之另一者的scFab片段融合的形式，包括杵入白技術(knobs-into holes technology)，如例如歐洲申請案第09004909.9號所述；或例如基於專一性結合兩種受體中之一者EGFR或IGF-1R的全長抗體在一條重鏈之一C末端與VH或VH-CH1片段且在第二條重鏈之另一C末端與VL或VL-CL片段(該VH或VH-CH1片段及VL或VL-CL片段專一性結合兩種受體EGFR或IGF-1R中之另一者)融合的形式，包括杵入白技術，如例如歐洲申請案第09005108.7號所述。

在一實施例中，該雙重專一性抗體為四價抗體，其使用如例如WO 2007/024715或WO 2007/109254或歐洲申請案第09004909.9號所述之形式(結合第一抗原之全長抗體與結合另一抗原之兩個scFab片段融合)(參見例如實例1或9)。

在一實施例中，該雙重專一性抗體為四價抗體且由以下組成：

a) 單專一性二價抗體，其包含該第一抗原結合位點且

由兩條抗體輕鏈及兩條抗體重鏈組成，各鏈僅包含一可變域，

b) 兩個肽連接子，及

c) 兩個單價單專一性單鏈抗體(單專一性單價單鏈Fv)，其包含該第二抗原結合位點且各由輕鏈可變域、重鏈可變域及該輕鏈可變域與該重鏈可變域之間的單鏈連接子組成；

其中該等單鏈抗體(該等單鏈Fv)與單專一性二價抗體輕鏈或抗體重鏈之同一末端連接。

在另一實施例中，該雙重專一性抗體為四價抗體且由以下組成：

a) 單專一性二價抗體，其包含該第二抗原結合位點且由兩條抗體輕鏈及兩條抗體重鏈組成，各鏈僅包含一可變域，

b) 兩個肽連接子，及

c) 兩個單價單專一性單鏈抗體(單專一性單價單鏈Fv)，其包含該第一抗原結合位點且各由輕鏈可變域、重鏈可變域及該輕鏈可變域與該重鏈可變域之間的單鏈連接子組成；

其中該等單鏈抗體(該等單鏈Fv)與單專一性二價抗體輕鏈或抗體重鏈之相同末端連接。

在另一實施例中，該雙重專一性抗體為四價抗體且由以下組成：

a) 全長抗體，其包含該抗原結合位點且由兩條抗體重鏈及

兩條抗體輕鏈組成；及

b) 兩個相同單鏈Fab片段，其包含該第二抗原結合位點，

其中b)中之該等單鏈Fab片段與a)中之該全長抗體在該全長抗體之重鏈或輕鏈的C末端或N末端經由肽連接子融合。

在另一實施例中，該雙重專一性抗體為四價抗體且由以下組成：

a) 全長抗體，其包含該第二抗原結合位點且由兩條抗體重鏈及兩條抗體輕鏈組成；及

b) 兩個相同單鏈Fab片段，其包含該第一抗原結合位點，

其中b)中之該等單鏈Fab片段與a)中之該全長抗體在該全長抗體之重鏈或輕鏈的C末端或N末端經由肽連接子融合。

較佳地，b)中之該等單鏈Fab片段與a)中之該全長抗體在該全長抗體之重鏈或輕鏈的C末端經由肽連接子融合。

在一實施例中，結合第二抗原之兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體在該全長抗體之各重鏈或輕鏈的C末端經由肽連接子融合。

在一實施例中，結合第二抗原之兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體在該全長抗體之各重鏈的C末端經由肽連接子融合。

在一實施例中，結合第二抗原之兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體在該全長抗體之各輕鏈的C末端經由肽連接子融合。

在另一實施例中，該四價雙重專一性抗體具有以下特徵：

-其由以下組成：

- a) 單專一性二價母(全長)抗體，其由兩條全長抗體重鏈及兩條全長抗體輕鏈組成，其中各鏈僅包含一可變域，
- b) 兩個肽連接子，
- c) 兩個單專一性單價單鏈抗體(單專一性單價單鏈Fv)，其各由抗體重鏈可變域、抗體輕鏈可變域及該抗體重鏈可變域與該抗體輕鏈可變域之間的單鏈連接子組成；

且較佳該等單鏈抗體(該等單鏈Fv)與單專一性二價抗體重鏈之相同末端(C末端及N末端)或與單專一性二價抗體輕鏈之相同末端(較佳C末端)且更佳與單專一性二價抗體重鏈之相同末端(C末端及N末端)連接。

如本發明所用之術語「肽連接子」表示胺基酸序列較佳源於合成之肽。本發明之此等肽連接子用於將不同抗原結合位點及/或最終包含不同抗原結合位點的抗體片段(例如單鏈Fv、全長抗體、VH域及/或VL域、Fab、(Fab)₂、Fc部分)連接在一起形成本發明之雙重專一性抗體。肽連接子可包含以下表1所列之一或多個胺基酸序列以及其他任意選擇之胺基酸。該等肽連接子為胺基酸序列之長度為至少5個胺基酸，較佳至少10個胺基酸，更佳長度在10個胺基酸與50個胺基酸之間的肽。b)中之該等肽連接子較佳為胺基酸序列之長度為至少10個胺基酸的肽。在一實施例中，該肽連接子為(GxS)_n，其中G=甘胺酸，S=絲胺酸，(x=3且

$n=3$ 、 4 、 5 或 6)或($x=4$ 且 $n=2$ 、 3 、 4 或 5)，較佳地， $x=4$ 且 $n=2$ 或 3 ，更佳地，其中 $x=4$ ， $n=2((G_4S)_2)$ 。該 $(GxS)_n$ 肽連接子中亦可添加額外 G =甘胺酸，例如 GG 或 GGG 。

如本發明所用之術語「單鏈連接子」表示胺基酸序列較佳源於合成之肽。本發明之此等單鏈連接子用於使 VH 域與 VL 域連接形成單鏈 F_v 。較佳地，c)中之該單鏈連接子為胺基酸序列之長度為至少 15 個胺基酸，更佳長度為至少 20 個胺基酸之肽。在一實施例中，該單鏈連接子為 $(GxS)_n$ ，其中 G =甘胺酸， S =絲胺酸，($x=3$ 且 $n=4$ 、 5 或 6)或($x=4$ 且 $n=3$ 、 4 或 5)，較佳地，其中 $x=4$ ， $n=4$ 或 5 ，更佳地，其中 $x=4$ ， $n=4$ 。

此外，該等單鏈(單鏈 F_v)抗體較佳用二硫鍵穩定。單鏈抗體之該進一步二硫鍵穩定係藉由在單鏈抗體可變域之間引入二硫鍵而達成，且例如描述於 $WO\ 94/029350$ ，Rajagopal, V.等人，*Prot. Engin.* 10 (12) (1997) 1453-59；Kobayashi, H.等人，*Nuclear Medicine & Biology* 25 (1998) 387-393；或Schmidt, M.等人，*Oncogene* 18 (1999) 1711-1721中。

在二硫鍵穩定之單鏈(單鏈 F_v)抗體之一實施例中，本發明抗體中所包含之單鏈抗體之可變域之間之二硫鍵對於各單鏈抗體係獨立地選自：

- i) 重鏈可變域 44 位至輕鏈可變域 100 位，
- ii) 重鏈可變域 105 位至輕鏈可變域 43 位，或
- iii) 重鏈可變域 101 位至輕鏈可變域 100 位。

在一實施例中，本發明抗體中所包含之單鏈抗體的可變域之間的二硫鍵在重鏈可變域44位與輕鏈可變域100位之間。在一實施例中，本發明抗體中所包含之單鏈抗體的可變域之間的二硫鍵在重鏈可變域105位與輕鏈可變域43位之間。

在一實施例中，在單鏈抗體(單鏈Fv)之可變域VH與VL之間無該視情況存在的二硫鍵穩定的該等單鏈(單鏈Fv)抗體較佳。

在另一實施例中，雙重專一性抗體之特徵在於

- 兩個抗原結合位點各由單專一性二價母抗體之兩對重鏈與輕鏈可變域形成，且兩者結合相同抗原決定基，
- 另外兩個抗原結合位點各由一單鏈抗體之重鏈及輕鏈可變域形成，
- 單鏈抗體各與一重鏈或一輕鏈經由肽連接子連接，由此各抗體鏈末端僅連接一個單鏈抗體。

在另一實施例中，該四價雙重專一性抗體之特徵在於a)中之該單專一性二價(全長)抗體部分與EGFR結合，且c)中之該兩個單價單專一性單鏈抗體與IGF-1R結合。

在另一實施例中，該四價雙重專一性抗體之特徵在於a)中之該單專一性二價(全長)抗體部分與IGF-1R結合，且c)中之該兩個單價單專一性單鏈抗體與EGFR結合。

本發明之與EGFR及IGF-1R結合之雙重專一性抗體的此第一四價實施例之結構，其中抗原A或B中之一者為EGFR，而另一者為IGF-1R。該結構係基於結合抗原A之全

長抗體與結合抗原B之兩個(視情況用二硫鍵穩定)單鏈Fv經由肽連接子連接，此例示於圖1及圖2之圖解中。

在第二四價實施例中，四價雙重專一性抗體包含

- a) 專一性結合該第一抗原(兩種抗原中之一者EGFR或IGF-1R)且由兩條抗體重鏈及兩條抗體輕鏈組成之全長抗體；及
- b) 專一性結合該第二抗原(兩種抗原EGFR或IGF-1R中之另一者)之兩個相同單鏈Fab片段，

其中b)中之該等單鏈Fab片段與a)中之該全長抗體在該全長抗體之重鏈或輕鏈的C末端或N末端經由肽連接子融合。

在一實施例中，結合第二抗原之兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體在該全長抗體之各重鏈或輕鏈的C末端經由肽連接子融合。

在一實施例中，結合第二抗原之兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體在該全長抗體之各重鏈的C末端經由肽連接子融合。

在一實施例中，結合第二抗原之兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體在該全長抗體之各輕鏈的C末端經由肽連接子融合。

「單鏈Fab片段」(參見圖11)為由抗體重鏈可變域(VH)、抗體恆定域1(CH1)、抗體輕鏈可變域(VL)、抗體輕鏈恆定域(CL)及連接子組成之多肽，其中該等抗體域及該連接子沿N末端至C末端方向具有以下次序之一：

- a)VH-CH1-連接子-VL-CL， b)VL-CL-連接子-VH-CH1，

c)VH-CL-連接子-VL-CH1或d)VL-CH1-連接子-VH-CL；且其中該連接子為具有至少30個胺基酸，較佳在32個與50個胺基酸之間的多肽。該等單鏈Fab片段a)VH-CH1-連接子-VL-CL、b)VL-CL-連接子-VH-CH1、c)VH-CL-連接子-VL-CH1及d)VL-CH1-連接子-VH-CL經由CL域與CH1域之間的天然二硫鍵穩定。術語「N末端」表示N末端之最後一個胺基酸。術語「C末端」表示C末端之最後一個胺基酸。

在一較佳實施例中，該單鏈Fab片段中之該等抗體域及該連接子沿N末端至C末端方向具有以下次序之一：

a) VH-CH1-連接子-VL-CL或b)VL-CL-連接子-VH-CH1，更佳VL-CL-連接子-VH-CH1。

在另一較佳實施例中，該單鏈Fab片段中之該等抗體域及該連接子沿N末端至C末端方向具有以下次序之一：

a) VH-CL-連接子-VL-CH1或b)VL-CH1-連接子-VH-CL。

如本發明所用之術語「肽連接子」表示胺基酸序列較佳源於合成之肽。本發明之此等肽連接子用於使單鏈Fab片段與全長抗體之C末端或N末端融合以形成本發明之多專一性抗體。較佳地，b)中之該等肽連接子為胺基酸序列之長度為至少5個胺基酸，較佳長度為5至100個胺基酸，更佳10至50個胺基酸的肽。在一實施例中，該肽連接子為 $(GxS)_n$ 或 $(GxS)_nG_m$ ，其中G=甘胺酸，S=絲胺酸且 $(x=3, n=3、4、5或6, 且m=0、1、2或3)$ 或 $(x=4, n=2、3、4或5, 且m=0、1、2或3)$ ，較佳地， $x=4$ 且 $n=2或3$ ，更佳地，其中 $x=4, n=2$ 。在一實施例中，該肽連接子為 $(G_4S)_2$ 。

如本發明所用之術語「連接子」表示胺基酸序列較佳源於合成之肽。本發明之此等肽用於連接 a) VH-CH1 與 VL-CL, b) VL-CL 與 VH-CH1, c) VH-CL 與 VL-CH1 或 d) VL-CH1 與 VH-CL 以形成本發明之以下單鏈 Fab 片段: a) VH-CH1-連接子-VL-CL, b) VL-CL-連接子-VH-CH1, c) VH-CL-連接子-VL-CH1 或 d) VL-CH1-連接子-VH-CL。單鏈 Fab 片段中之該連接子為胺基酸序列之長度為至少 30 個胺基酸, 較佳長度為 32 至 50 個胺基酸的肽。在一實施例中, 該連接子為 $(G_xS)_n$, 其中 G=甘胺酸, S=絲胺酸, ($x=3$, $n=8$ 、9 或 10, 且 $m=0$ 、1、2 或 3) 或 ($x=4$ 且 $n=6$ 、7 或 8, 且 $m=0$ 、1、2 或 3), 較佳地, 其中 $x=4$, $n=6$ 或 7, 且 $m=0$ 、1、2 或 3, 更佳地, 其中 $x=4$, $n=7$ 且 $m=2$ 。在一實施例中, 該連接子為 $(G_4S)_6G_2$ 。

視情況, 在該單鏈 Fab 片段中, 除 CL 域與 CH1 域之間之天然二硫鍵以外, 抗體重鏈可變域 (VH) 及抗體輕鏈可變域 (VL) 亦藉由在以下位置間引入二硫鍵來穩定:

- i) 重鏈可變域 44 位至輕鏈可變域 100 位,
- ii) 重鏈可變域 105 位至輕鏈可變域 43 位, 或
- iii) 重鏈可變域 101 位至輕鏈可變域 100 位 (編號始終根據 Kabat 之 EU 索引)。

單鏈 Fab 片段之該進一步二硫鍵穩定係藉由在單鏈 Fab 片段之可變域 VH 與 VL 之間引入二硫鍵而達成。引入非天然二硫橋以穩定單鏈 Fv 之技術描述於例如 WO 94/029350, Rajagopal, V. 等人, Prot. Engin. (1997) 1453-59;

Kobayashi, H.等人；Nuclear Medicine & Biology, 第25卷, (1998) 387-393；或Schmidt, M.等人，Oncogene (1999) 18, 1711-1721中。在一實施例中，本發明抗體中所包含之單鏈Fab片段的可變域之間視情況存在的二硫鍵在重鏈可變域44位與輕鏈可變域100位之間。在一實施例中，本發明抗體中所包含之單鏈Fab片段的可變域之間視情況存在的二硫鍵在重鏈可變域105位與輕鏈可變域43位之間(編號始終根據Kabat之EU索引)。

在一實施例中，單鏈Fab片段之可變域VH與VL之間無視情況存在的二硫鍵穩定的單鏈Fab片段較佳。

本發明四價雙重專一性抗體之該第二實施例較佳包含兩個相同單鏈Fab片段(較佳為VL-CL-連接子-VH-CH1)，其均與a)中之該全長抗體兩條重鏈之兩個C末端或兩條輕鏈之兩個C末端融合。該融合產生兩個相同融合肽(i)重鏈及單鏈Fab片段，或ii)輕鏈及單鏈Fab片段)，其與i)全長抗體之輕鏈或重鏈共表現以產生本發明之雙重專一性抗體(參見圖12、13及14)。

在另一實施例中，該四價雙重專一性抗體之特徵在於a)中之該全長抗體部分與EGFR結合，且b)中之該兩個單鏈Fab片段與IGF-1R結合。

在另一實施例中，該四價雙重專一性抗體之特徵在於a)中之該全長抗體部分與IGF-1R結合，且b)中之該兩個單鏈Fab片段與EGFR結合。

在另一實施例中，該雙重專一性抗體之特徵在於恆定區

源自人類來源。

在另一實施例中，該雙重專一性抗體之特徵在於本發明雙重專一性抗體之恆定區為人類IgG1亞類，或具有突變L234A及L235A之人類IgG1亞類。

在另一實施例中，該雙重專一性抗體之特徵在於本發明雙重專一性抗體之恆定區為人類IgG2亞類。

在另一實施例中，該雙重專一性抗體之特徵在於本發明雙重專一性抗體之恆定區為人類IgG3亞類。

在另一實施例中，該雙重專一性抗體之特徵在於本發明雙重專一性抗體之恆定區為人類IgG4亞類，或具有額外突變S228P之IgG4亞類。

現已發現本發明之雙重專一性抗體具有改良之特徵。其與僅使用一個抗體或組合使用兩個個別抗體相比或與Lu, D.等人，Biochemical and Biophysical Research Communications 318 (2004) 507-513；J. Biol. Chem., 279 (2004) 2856-2865；及J. Biol Chem. 280 (2005) 19665-72之雙重專一性抗體相比展示至少相同或增加之活體外及活體內抗腫瘤活性/功效。其與Lu, D.等人，Biochemical and Biophysical Research Communications 318 (2004) 507-513；J. Biol. Chem., 279 (2004) 2856-2865；及J. Biol Chem. 280 (2005) 19665-72之雙重專一性抗體相比展示改良之活體內藥代動力學穩定性。此外，本發明之雙重專一性抗體與僅使用一個抗體或組合使用兩個個別抗體相比展示經調節之受體下調/內化。此外，本發明之雙重專一性抗體可提供以下益處，諸如降低之投藥劑

量及/或投藥頻率及伴隨之成本節約。

如本申請案所用之術語「恆定區」表示抗體中除可變區以外的域的總和。恆定區不直接參與抗原結合，但展現多種效應功能。視抗體重鏈恆定區之胺基酸序列而定，其分為以下類別：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且其中數種可進一步分成以下亞類，諸如IgG1、IgG2、IgG3及IgG4、IgA1及IgA2。對應於不同抗體類別之重鏈恆定區分別稱作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。可存在於所有五個抗體類別中之輕鏈恆定區稱作 κ 及 λ 。

如本申請案所用之術語「源自人類來源之恆定區」表示IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亞類之人類抗體的恆定重鏈區及/或恆定輕鏈 κ 或 λ 區。該等恆定區為現有技術中所熟知的且例如由Kabat, E.A.(參見例如Johnson, G. and Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 2785-2788)描述。雖然IgG4亞類之抗體展示減弱之Fc受體(Fc γ RIIIa)結合，但其他IgG亞類之抗體展示強結合。然而，Pro238、Asp265、Asp270、Asn297(喪失Fc碳水化合物)、Pro329、Leu234、Leu235、Gly236、Gly237、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434及His435為若改變則亦提供減弱之Fc受體結合的殘基(Shields, R., L.等人, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J.等人, FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A.等人, Immunology 86 (1995) 319-324; EP 0 307 434)。在一實施例中，本發明之

抗體與IgG1抗體相比具有減弱之FcR結合，且就FcR結合而言，單專一性二價(全長)母抗體為IgG4亞類或S228、L234、L235及/或D265具有突變之IgG1或IgG2亞類及/或含有PVA236突變。在一實施例中，單專一性二價(全長)母抗體中之突變為S228P、L234A、L235A、L235E及/或PVA236。在另一實施例中，單專一性二價(全長)母抗體中之突變為S228P(在IgG4中)及L234A及L235A(在IgG1中)。恆定重鏈區以SEQ ID NO:27及28展示。在一實施例中，單專一性二價(全長)母抗體之恆定重鏈區為具有突變L234A及L235A之SEQ ID NO:27。在另一實施例中，單專一性二價(全長)母抗體之恆定重鏈區為具有突變S228P之SEQ ID NO:28。在另一實施例中，單專一性二價(全長)母抗體之恆定輕鏈區為SEQ ID NO:29。

抗體之恆定區直接參與ADCC(抗體依賴性細胞介導之細胞毒性)及CDC(互補依賴性細胞毒性)。補體活化(CDC)係藉由補體因子C1q與大多數IgG抗體亞類之恆定區結合而引發。C1q與抗體之結合係由所謂結合位點處之確定蛋白質-蛋白質相互作用引起。該等恆定區結合位點為現有技術中已知的且例如由Lukas, T.J.等人, J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R.及Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R.等人, Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E.等人, Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E.等人, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M.等人, J. Virol. 75 (2001) 12161-

12168 ; Morgan, A. 等人 , Immunology 86 (1995) 319-324 ; 及 EP 0 307 434描述。該等恆定區結合位點例如由胺基酸 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331及P329表徵(根據Kabat之EU索引編號)。

術語「抗體依賴性細胞毒性(ADCC)」係指在效應細胞存在下，由本發明抗體引起之人類標靶細胞溶解。ADCC較佳藉由在效應細胞(諸如新分離之PBMC)或來自白血球層之經純化效應細胞(如單核細胞或自然殺傷(NK)細胞或永生NK細胞株(permanently growing NK cell line))存在下用本發明之抗體處理CCR5表現細胞之製劑來量測。

術語「補體依賴性細胞毒性(CDC)」表示由補體因子C1q與大多數IgG抗體亞類之Fc部分結合而引發的過程。C1q與抗體之結合係由所謂結合位點處之確定蛋白質-蛋白質相互作用引起。該等Fc部分結合位點為現有技術中所已知的(參見上文)。該等Fc部分結合位點例如由胺基酸L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331及P329表徵(根據Kabat之EU索引編號)。亞類IgG1、IgG2及IgG3之抗體通常展示補體活化，包括C1q及C3結合，而IgG4不活化補體系統且不結合C1q及/或C3。

單株抗體之細胞介導效應功能可如Umana, P. 等人，Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180及US 6,602,684所述，藉由工程改造其寡糖組份來增強。IgG1型抗體(最常用之治療性抗體)為在各CH2域之Asn297處具有保守N-連接糖基化位點的糖蛋白。與Asn297連接之兩個複合雙觸寡

醣嵌於CH₂域之間，與多肽骨架形成廣泛接觸，且其存在為抗體介導效應功能(諸如抗體依賴性細胞毒性(ADCC))所必需(Lifely, M.R.等人，Glycobiology 5 (1995) 813-822；Jefferis, R.等人，Immunol. Rev. 163 (1998) 59-76；Wright, A.及Morrison, S.L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32)。Umana, P.等人，Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180及WO 99/54342展示在中國倉鼠卵巢(CHO)細胞中， $\beta(1,4)$ -N-乙酰基葡糖胺基轉移酶III(「GnTIII」)(一種催化對分寡醣形成之糖基轉移酶)之過度表現顯著增加抗體之活體外ADCC活性。Asn297碳水化合物之組成變化或其去除亦影響與Fc γ R及C1q之結合(Umana, P.等人，Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180；Davies, J.等人，Biotechnol. Bioeng. 74 (2001) 288-294；Mimura, Y.等人，J. Biol. Chem. 276 (2001) 45539-45547；Radaev, S.等人，J. Biol. Chem. 276 (2001) 16478-16483；Shields, R.L.等人，J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604；Shields, R.L.等人，J. Biol. Chem. 277 (2002) 26733-26740；Simmons, L.C.等人，J. Immunol. Methods 263 (2002) 133-147)。

增強單株抗體之細胞介導之效應功能的方法例如報導於WO 2005/044859，WO 2004/065540，WO2007/031875，Umana, P.等人，Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999)，WO 99/154342，WO 2005/018572，WO 2006/116260，WO 2006/114700，WO 2004/065540，WO 2005/011735，WO 2005/027966，WO 1997/028267，US 2006/0134709，US

2005/0054048, US 2005/0152894, WO 2003/035835及WO 2000/061739或例如Niwa, R.等人, J. Immunol. Methods 306 (2005) 151-160; Shinkawa, T.等人, J Biol Chem, 278 (2003) 3466-3473; WO 03/055993及US2005/0249722中。

因此, 在本發明之一實施例中, 在Asn297處用糖鏈使雙重專一性抗體糖基化(若其包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亞類, 較佳IgG1或IgG3亞類之Fc部分), 其中該糖鏈內海藻糖之量為65%或65%以下(根據Kabat編號)。在另一實施例中, 該糖鏈內海藻糖之量在5%與65%之間, 較佳在20%與40%之間。本發明之「Asn297」意謂位於Fc區約297位之胺基酸天冬醯胺。基於抗體之少量序列變異, Asn297亦可位於297位上游或下游數個胺基酸(通常不超過±3個胺基酸)處, 亦即在294位與300位之間。在本發明糖基化抗體之一實施例中, IgG亞類為人類IgG1亞類, 具有突變L234A及L235A之人類IgG1亞類或IgG3亞類。在另一實施例中, 該糖鏈內N-羥乙醯基神經胺糖酸(NGNA)之量為1%或1%以下, 且/或N末端 α -1,3-半乳糖之量為1%或1%以下。糖鏈較佳展示與CHO細胞中重組表現之抗體之Asn297連接的N連接聚糖的特徵。

術語「糖鏈展示與CHO細胞中重組表現之抗體之Asn297連接的N連接聚糖的特徵」表示本發明雙重專一性抗體恆定區Asn297處之糖鏈的結構及糖殘基序列除海藻糖殘基以外皆與未修飾CHO細胞中表現之相同抗體相同, 例如如WO 2006/103100中所報導。

本申請案所用之術語「NGNA」表示糖殘基N-羥乙醯基神經胺糖酸。

人類IgG1或IgG3之糖基化在Asn297處作為用最多2個Gal殘基終止之核心海藻糖基化雙觸複合寡醣糖基化進行。Kabat, E.A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版。Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)及Brüggemann, M.等人, J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361; Love, T.W.等人, Methods Enzymol. 178 (1989) 515-527詳細報導IgG1或IgG3亞類之人類恆定重鏈區。視末端Gal殘基之量而定, 此等結構表示為G0、G1(α -1,6-或 α -1,3-)或G2聚糖殘基(Raju, T.S., BioProcess Int. 1 (2003) 44-53)。抗體Fc部分之CHO型糖基化例如由Routier, F.H., Glycoconjugate J. 14 (1997) 201-207描述。非糖基修飾CHO宿主細胞中重組表現之抗體通常以至少85%之量在Asn297處經海藻糖基化。本發明雙重專一性抗體恆定區之經修飾寡醣可為雜合物或複合物。對分、低海藻糖基化/未海藻糖基化寡醣較佳為雜合物。在另一實施例中, 對分、低海藻糖基化/未海藻糖基化寡醣為複合物。

根據本發明, 「海藻糖之量」意謂Asn297處糖鏈內該糖之量, 其與由MALDI-TOF質譜法所量測之與Asn 297連接之所有糖結構(例如, 複合、雜合及高甘露糖結構)的總和有關, 且計算為平均值。海藻糖之相對量為含海藻糖結構關於N-糖苷酶F處理樣品中由MALDI-TOF鑑別之所有糖結

構(例如分別為複合、雜合及寡及高甘露糖結構)的百分比。

對於本發明之所有雙重專一性抗體，「GE」意謂糖基工程改造。

在本發明之另一態樣中，本發明之雙重專一性抗體為具有ADCC及/或CDC之抗體，且具有來自人類來源之IgG1或IgG3(較佳IgG1)亞類的恆定區，該抗體能夠結合Fc γ 受體及/或補體因子C1q。能夠結合Fc受體及/或補體因子C1q之該抗體能夠引發抗體依賴性細胞毒性(ADCC)及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)。

本發明之抗體係由重組方法產生。因此，本發明之一態樣為編碼本發明抗體之核酸，且另一態樣為包含該編碼本發明抗體之核酸的細胞。重組產生方法為現有技術中所廣泛已知的，且包含在原核及真核細胞中表現蛋白質，隨後分離抗體及通常純化至醫藥學上可接受之純度。為在宿主細胞中表現上述抗體，藉由標準方法將編碼各別經修飾輕鏈及重鏈的核酸插入表現載體中。在適當原核或真核宿主細胞(如CHO細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、HEK293細胞、COS細胞、PER.C6細胞、酵母或大腸桿菌細胞)中執行表現，且自細胞(上清液或溶解之後的細胞)中回收抗體。重組產生抗體之通用方法為現有技術中所熟知的，且例如描述於Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S.等人, Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-160;

Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880之評論文章中。

合適地藉由習知免疫球蛋白純化程序(諸如蛋白A-瓊脂糖(Sepharose)羥磷灰石層析、凝膠電泳、透析或親和層析)使雙重專一性抗體與培養基分離。易於使用習知程序分離編碼單株抗體之DNA及RNA且進行測序。融合瘤細胞可用作該DNA及RNA之來源。分離之後，可將DNA插入表現載體中，隨後將其轉染至宿主細胞(諸如HEK 293細胞、CHO細胞或骨髓瘤細胞，其不另外產生免疫球蛋白)中以在宿主細胞中合成重組單株抗體。

藉由在抗體DNA中引入適當核苷酸變化或藉由核苷酸合成來製備雙重專一性抗體之胺基酸序列變異體(或突變體)。然而，該等修飾可僅在極有限範圍內(例如，如上所述)執行。舉例而言，該等修飾並不改變上述抗體特徵，諸如IgG同型及抗原結合，但可改良重組產生之產量、蛋白質穩定性或有利於純化。

本發明之與EGFR及IGF-1R結合的雙重專一性抗體下調EGFR。在一實施例中，在A549細胞中EGFR下調至少約30%，在另一實施例中至少約35%，且在另一實施例中至少約40%。

本發明之與EGFR及IGF-1R結合的雙重專一性抗體下調IGF-1R。在一實施例中，在H322M細胞中雙重專一性Cross-Mab (VH/VL)或Cross-Mab (CH/CL)使IGF-1R下調最多約15%，在另一實施例中最多約20%，且在另一實施例中最多40%(在75微克蛋白質/毫升下)。

如本申請案所用之術語「宿主細胞」表示可經工程改造以產生本發明之抗體的各種細胞系統。在一實施例中，HEK293細胞及CHO細胞用作宿主細胞。如本文所使用之表述「細胞」、「細胞株」及「細胞培養物」可互換使用，且所有該等名稱均包括子代。因此，詞語「轉型體」及「轉型細胞」包括初級受試細胞(subject cell)及源自其之培養物而不考慮轉移次數。亦應瞭解，由於有意或無意的突變，所有子代之DNA含量可能並不精確一致。包括功能或生物活性與在最初轉型細胞中所篩選相同的變異體子代。

NS0細胞中之表現由例如 Barnes, L.M. 等人，Cytotechnology 32 (2000) 109-123；Barnes, L.M. 等人，Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270描述。短暫表現由例如 Durocher, Y. 等人，Nucl. Acids. Res. 30 E9 (2002)描述。可變域之選殖由 Orlandi, R. 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837；Carter, P. 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289；及 Norderhaug, L. 等人，J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87描述。較佳短暫表現系統 (HEK 293) 由 Schlaeger, E.-J. 及 Christensen, K., Cytotechnology 30 (1999) 71-83 及 Schlaeger, E.-J., J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199描述。

適合於原核生物之控制序列例如包括啟動子，視情況存在之操縱序列及核糖體結合位點。已知真核細胞使用啟動子、增強子及聚腺苷酸化信號。

當使一核酸與另一核酸序列呈功能關係時，其經「可操作地連接」。舉例而言，若前序列或分泌性前導序列之DNA表現為參與多肽分泌之前蛋白，則其與該多肽之DNA可操作地連接；若啟動子或增強子影響編碼序列之轉錄，則其與該序列可操作地連接；或若核糖體結合位點經定位以有利於轉譯，則其與編碼序列可操作地連接。一般而言，「可操作地連接」意謂所連接之DNA序列為鄰近的，且在分泌性前導序列的情況下其為鄰近的且在閱讀框架中。然而，增強子不必為鄰近的。連接係藉由在適當限制性位點處接合而實現。若不存在該等位點，則根據習知規範使用合成寡核苷酸接附子或連接子。

本發明之具有減少量之海藻糖的抗體可於經工程改造以表現至少一編碼具有GnTIII活性之多肽及具有ManII活性之多肽的核酸的經糖基修飾之宿主細胞中以一定量表現以根據本發明使Fc區中之寡糖海藻糖基化。在一實施例中，具有GnTIII活性之多肽為融合多肽。或者，宿主細胞之 $\alpha 1,6$ -海藻糖基轉移酶活性可根據US 6,946,292降低或去除以產生經糖基修飾之宿主細胞。抗體海藻糖基化之量可例如由醱酵條件或由至少兩種具有不同海藻糖基化量之抗體之組合預定。

本發明之具有減少量之海藻糖的抗體可藉由包含以下步驟之方法在宿主細胞中產生：(a)在允許產生該抗體且允許該抗體Fc區上所存在之寡糖以本發明之量海藻糖基化的條件下培養經工程改造以表現至少一編碼具有GnTIII活性及/

或ManII活性之融合多肽的聚核苷酸的宿主細胞；及(b)分離該抗體。在一實施例中，該具有GnTIII活性之多肽為融合多肽，其較佳包含GnTIII催化域及異源高基體(Golgi)駐留多肽之高基體定位域，該高基體定位域係選自由以下組成之群：甘露糖苷酶II定位域、 $\beta(1,2)$ -N-乙醯基葡糖胺基轉移酶I(「GnTI」)定位域、甘露糖苷酶I定位域、 $\beta(1,2)$ -N-乙醯基葡糖胺基轉移酶II(「GnTII」)定位域及 α -1,6核心海藻糖基轉移酶定位域。高基體定位域較佳來自甘露糖苷酶II或GnTI。

如本文所用之「具有GnTIII活性之多肽」係指能夠催化N-乙醯基葡糖胺(GlcNAc)殘基以 β -1,4連接添加至N連接寡糖之三甘露糖基(trimannosyl)核心之 β -連接甘露糖苷中的多肽。其包括在特定生物檢定中所量測，在存在或不存在劑量依賴性的情況下，展現類似於但不必等同於 β -1,4-N-乙醯基葡糖胺基轉移酶III(亦稱作 β -1,4-甘露糖基-糖蛋白4- β -N-乙醯基葡糖胺基-轉移酶(EC 2.4.1.144)，根據國際生物化學與分子生物學聯盟之命名委員會(Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, NC-IUBMB))之活性的酶活性的融合多肽。在存在劑量依賴性的情況下，與GnTIII相比，其不必等同於GnTIII之劑量依賴性，但實質上類似於既定活性之劑量依賴性(亦即，候選多肽相對於GnTIII將展現較大活性或約1/25以上且較佳約1/10以上之活性，且最佳約1/3以上之活性)。如本文所用之術語「高基體定位域」係指高基

體駐留多肽之胺基酸序列，其負責將多肽錨定於高基複合體內之位置中。一般而言，定位域包含酶之胺基末端「尾部」。

為產生本發明之具有減少量之海藻糖的抗體，亦可使用能夠且經工程改造以允許產生具有經修飾糖型之抗體的宿主細胞。該宿主細胞已經進一步操作以表現增加量之一或多種具有GnTIII活性的多肽。CHO細胞較佳作為該等宿主細胞。US 6,946,292中亦報導產生具有增強ADCC之抗體組合物的細胞。

藉由標準技術(包括鹼/SDS處理、CsCl分帶法(CsCl banding)、管柱層析、瓊脂糖凝膠電泳及此項技術中熟知之其他技術)執行抗體之純化以去除細胞組份或其他污染物，例如其他細胞核酸或蛋白質。參見Ausubel, F.等人編, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing 及 Wiley Interscience, New York (1987)。已充分確立且廣泛使用不同方法進行蛋白質純化，諸如微生物蛋白之親和層析(例如，蛋白A或蛋白G親和層析)、離子交換層析(例如，陽離子交換(羧甲基樹脂)、陰離子交換(胺基乙基樹脂)及混合模式交換)、嗜硫吸附(例如，用 β -巰基乙醇及其他SH配位體)、疏水相互作用或芳族吸附層析(例如，用苯基-瓊脂糖、氮雜親砂性(arenophilic)樹脂或間胺基苯基酮酸)、金屬螯合劑親和層析(例如，用Ni(II)-及Cu(II)-親和材料)、尺寸排阻層析及電泳法(諸如凝膠電泳、毛細電泳)(Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75(1998)93-102)。

本發明之一態樣為包含本發明抗體之醫藥組合物。本發明之另一態樣為本發明抗體於製造醫藥組合物之用途。本發明之另一態樣為一種製造包含本發明抗體之醫藥組合物的方法。在另一態樣中，本發明提供一種含有本發明抗體與醫藥載劑一起調配之組合物，例如醫藥組合物。

已意外地發現，本發明之針對EGFR且針對IGF-1R之雙重專一性抗體在與以下相比時具有改良之針對癌細胞之抗增殖特性：單專一性母抗EGFR抗體及抗IGF-1R抗體或與自 Lu, D. 等人，Biochemical and Biophysical Research Communications 318 (2004) 507-513；J. Biol. Chem., 279 (2004) 2856-2865；及J. Biol Chem. 280 (2005) 19665-72獲知之針對EGFR且針對IGF-1R之雙重專一性抗體(因為此等雙重專一性抗體與各別母抗體之組合相比在表現EGFR/IGF-1R之腫瘤細胞中僅展示降低之功效)。

本發明之另一態樣為該用於治療癌症之醫藥組合物。

本發明之另一態樣為本發明抗體於製造治療癌症之藥物的用途。

本發明之另一態樣為治療患有癌症之患者的方法，其係藉由向需要該治療之患者投與本發明之抗體而達成。

如本文所用之「醫藥載劑」包括任何及所有生理學上相容之溶劑、分散介質、塗料、抗細菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收延遲劑及其類似物。較佳地，載劑適合於靜脈內、肌肉內、皮下、非經腸、脊椎或表皮投藥(例如藉由注射或輸注)。

可由此項技術中已知之多種方法投與本發明之組合物。如熟習此項技術者所瞭解，投藥途徑及/或模式應視所需結果而變化。為藉由特定投藥途徑投與本發明之化合物，可能需要用防止化合物失活之材料塗布該化合物，或共投與化合物以及防止該化合物失活之材料。舉例而言，化合物可在例如脂質體之適當載劑或稀釋劑中向個體投與。醫藥學上可接受之稀釋劑包括生理食鹽水及緩衝水溶液。醫藥載劑包括無菌水溶液或分散液，及用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末。該等介質及試劑於醫藥活性物質之用途為此項技術中已知的。

如本文所用之短語「非經腸投藥」意謂除腸內及局部投藥以外的通常藉由注射進行的投藥模式，且包括(但不限於)靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、囊內、眼眶內、心臟內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、角質層下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊柱內、硬膜外及胸骨內注射及輸注。

如本文所用之術語癌症係指增生性疾病，諸如淋巴瘤、淋巴細胞白血病、肺癌、非小細胞肺(NSCL)癌、細支氣管肺泡細胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭部或頸部癌症、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門區癌症、胃癌、結腸癌、乳癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、陰門癌、霍奇金氏症(Hodgkin's Disease)、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌症、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿

道癌、陰莖癌、前列腺癌、膀胱癌、腎癌或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、間皮瘤、肝細胞癌、膽管癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、脊椎軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、神經鞘瘤(schwannoma)、室管膜瘤、神經管母細胞瘤、脊膜瘤、鱗狀細胞癌、垂體腺瘤及尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)，包括任何上述癌症之難治癒形式或一或多種上述癌症之組合。

此等組合物亦可含有佐劑，諸如防腐劑、濕潤劑、乳化劑及分散劑。可藉由滅菌程序(前述)及藉由包括各種抗細菌劑及抗真菌劑(例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸及其類似物)來確保防止微生物存在。亦可能需要在組合物中包括等張劑，諸如糖、氯化鈉及其類似物。另外，可藉由包括延遲吸收之試劑(諸如單硬脂酸鋁及明膠)來實現可注射醫藥形式之延長吸收。

無論選擇何種投藥途徑，均可藉由熟習此項技術者已知之習知方法，將可以合適水合形式使用之本發明化合物及/或本發明之醫藥組合物調配成醫藥學上可接受之劑型。

可改變本發明醫藥組合物中活性成份之實際劑量以獲得對特定患者、組合物及投藥模式有效達成所需治療反應而對患者無毒的量之活性成份。所選劑量應取決於多種藥代動力學因素，包括所用本發明特定組合物之活性；投藥途徑；投藥時間；所用特定化合物之排泄速率；治療之持續時間；與所用特定組合物組合使用之其他藥物、化合物及/或物質；所治療患者之年齡、性別、體重、病狀、一般健

康情況及先前病史；及醫學技術中熟知之類似因素。

組合物必須為無菌的且在一定程度上為流體以便可經由注射器傳遞組合物。除水以外，載劑較佳為等張緩衝生理食鹽水溶液。

可例如藉由使用塗層(諸如卵磷脂)，藉由在分散液情況下維持所需粒子尺寸及藉由使用界面活性劑來保持適當流動性。在許多情況下，組合物中較佳包括等張劑，例如糖、多元醇(諸如甘露糖醇或山梨糖醇)及氯化鈉。

如本文所使用之表述「細胞」、「細胞株」及「細胞培養物」可互換使用，且所有此等名稱均包括子代。因此，詞語「轉型體」及「轉型細胞」包括初級受試細胞及源自其之培養物而不考慮轉移次數。亦應瞭解，由於有意或無意突變，所有子代之DNA含量可能並不精確一致。包括功能或生物活性與在最初轉型細胞細胞中所篩選相同的變異體子代。在意欲使用不同名稱時，此應由上下文而顯而易見。

如本文所用之術語「轉型」係指將載體/核酸轉移至宿主細胞中之過程。若使用無強大細胞壁障壁之細胞作為宿主細胞，則例如藉由如Graham, F.L.及Van der Eb, A.J., *Virology* 52 (1973) 456-467所述之磷酸鈣沈澱法進行轉染。然而，亦可使用其他方法將DNA引入細胞中，諸如藉由細胞核注射或藉由原生質體融合。若使用原核細胞或含有實質性細胞壁構造之細胞，則例如一種轉染方法為使用氯化鈣進行鈣處理，如Cohen, S.N.等人，*PNAS*. 69 (1972) 2110-2114所述。

如本文所用之「表現」係指將核酸轉錄為mRNA之過程及/或隨後將經轉錄之mRNA(亦稱作轉錄物)轉譯為肽、多肽或蛋白質之過程。轉錄物及所編碼之多肽統稱為基因產物。若聚核苷酸源自基因組DNA，則真核細胞中之表現可包括mRNA之拼接。

「載體」為核酸分子，詳言之為自我複製之核酸分子，其將所插入之核酸分子轉移至宿主細胞中及/或宿主細胞之間。該術語包括主要用於將DNA或RNA插入細胞中(例如染色體整合)之載體、主要用於DNA或RNA複製之複製載體及用於DNA或RNA轉錄及/或轉譯之表現載體。亦包括提供一種以上所述功能之載體。

「表現載體」為一種聚核苷酸，其在引入適當宿主細胞中時可轉錄且轉譯為多肽。「表現系統」通常係指包含可用於產生所需表現產物之表現載體的合適宿主細胞。

胺基酸序列之說明

SEQ ID NO:1	重鏈CDR3，人類化<EGFR>ICR62
SEQ ID NO:2	重鏈CDR2，人類化<EGFR>ICR62
SEQ ID NO:3	重鏈CDR1，人類化<EGFR>ICR62
SEQ ID NO:4	輕鏈CDR3，人類化<EGFR>ICR62
SEQ ID NO:5	輕鏈CDR2，人類化<EGFR>ICR62
SEQ ID NO:6	輕鏈CDR1，人類化<EGFR>ICR62
SEQ ID NO:7	重鏈可變域，人類化<EGFR>ICR62-I-HHB
SEQ ID NO:8	重鏈可變域，人類化<EGFR>ICR62-I-HHD
SEQ ID NO:9	輕鏈可變域，人類化<EGFR>ICR62-I-KA

SEQ ID NO:10	輕鏈可變域，人類化<EGFR>ICR62-I-KC
SEQ ID NO:11	重鏈CDR3，<IGF-1R> HUMAB純系 18
SEQ ID NO:12	重鏈CDR2，<IGF-1R> HUMAB純系 18
SEQ ID NO:13	重鏈CDR1，<IGF-1R> HUMAB純系 18
SEQ ID NO:14	輕鏈CDR3，<IGF-1R> HUMAB純系 18
SEQ ID NO:15	輕鏈CDR2，<IGF-1R> HUMAB純系 18
SEQ ID NO:16	輕鏈CDR1，<IGF-1R> HUMAB純系 18
SEQ ID NO:17	重鏈CDR3，<IGF-1R> HUMAB純系 22
SEQ ID NO:18	重鏈CDR2，<IGF-1R> HUMAB純系 22
SEQ ID NO:19	重鏈CDR1，<IGF-1R> HUMAB純系 22
SEQ ID NO:20	輕鏈CDR3，<IGF-1R> HUMAB純系 22
SEQ ID NO:21	輕鏈CDR2，<IGF-1R> HUMAB純系 22
SEQ ID NO:22	輕鏈CDR1，<IGF-1R> HUMAB純系 22
SEQ ID NO:23	重鏈可變域，<IGF-1R> HUMAB純系 18
SEQ ID NO:24	重鏈可變域，<IGF-1R> HUMAB純系 22
SEQ ID NO:25	輕鏈可變域，<IGF-1R> HUMAB純系 18
SEQ ID NO:26	輕鏈可變域，<IGF-1R> HUMAB純系 22
SEQ ID NO:27	源自IgG1之人類重鏈恆定區
SEQ ID NO:28	源自IgG4之人類重鏈恆定區
SEQ ID NO:29	κ輕鏈恆定區
SEQ ID NO:30	雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (VH/VL)之重鏈1
SEQ ID NO:31	雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (VH/VL)之重鏈2

- SEQ ID NO:32 雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (VH/VL)之輕鏈1
- SEQ ID NO:33 雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (VH/VL)之輕鏈2
- SEQ ID NO:34 雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (CH/CL)之重鏈1
- SEQ ID NO:35 雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (CH/CL)之重鏈2
- SEQ ID NO:36 雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (CH/CL)之輕鏈1
- SEQ ID NO:37 雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (CH/CL)之輕鏈2
- SEQ ID NO:38 雙重專一性二價scFab-Fc融合<EGFR-IGF1R>抗體分子scFab-Fc之重鏈1
- SEQ ID NO:39 雙重專一性二價scFab-Fc融合<EGFR-IGF1R>抗體分子scFab-Fc之重鏈2。

提供以下實例、序列表及圖以輔助理解本發明，本發明之真實範疇係闡述於隨附申請專利範圍中。應瞭解，在不背離本發明之精神的情況下可對所述程序進行修改。

實驗程序

實例

雙重專一性<EGFR-IGF-1R>抗體之設計

本發明之結合EGFR及IGF-1R之雙重專一性抗體包含結合EGFR之第一抗原結合位點及結合IGF-1R之第二抗原結

合位點。可使用SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8之重鏈可變域及SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10之輕鏈可變域作為結合EGFR之第一抗原結合位點，該等域均源自詳細描述於WO 2006/082515中之人類化大鼠抗EGFR抗體ICR62。

可使用SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24之重鏈可變域及SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:26之輕鏈可變域作為結合IGF-1R之第二抗原結合位點，該等域均源自詳細描述於WO 2005/005635中之人類抗IGF-1R抗體<IGF 1R> HUMAB純系 18(DSM ACC 2587)或<IGF-1R> HUMAB純系 22(DSM ACC 2594)。

在所有下述實例1至20中，雙重專一性<EGFR-IGF-1R>抗體係基於SEQ ID NO:8之重鏈可變域及SEQ ID NO:10之輕鏈可變域(源自人類化<EGFR>ICR62)作為結合EGFR之第一抗原結合位點，且基於SEQ ID NO:23之重鏈可變域及SEQ ID NO:25之輕鏈可變域(源自人類抗IGF-1R抗體<IGF-1R> HUMAB純系 18(DSM ACC 2587))作為結合IGF-1R之第二抗原結合位點。

A)連接有scFv之雙重專一性<EGFR-IGF-1R>抗體(命名為XGFR1及XGFR2，其係指scFv-XGFR分子)的設計

為產生組合兩種抗體之特徵的藥劑，建構產生四價雙重專一性抗體之多種新穎蛋白質實體。在此等分子中，經由重組蛋白質融合技術使一抗體之重組單鏈結合分子與保留全長IgG1形式之另一抗體連接。此第二抗體具有所需第二結合專一性。

所設計形式之概要展示於圖1中且列於表1及表2中，該等形式係基於人類抗IGF-1R抗體<IGF-1R> HUMAB純系18(DSM ACC 2587)及結合EGFR的源自SEQ ID NO:8之重鏈可變域(VH)及SEQ ID NO:10之輕鏈可變域(VL)的單鏈Fv(scFv)。

藉由基因合成及重組分子生物學技術，SEQ ID NO:8之重鏈可變域(VH)及SEQ ID NO:10之輕鏈可變域(VL)經甘胺酸絲胺酸(G4S)_n單鏈連接子連接以產生結合EGFR之單鏈Fv(scFv)，該scFv與抗IGF-1R抗體<IGF-1R> HUMAB純系18(DSM ACC 2587)輕鏈或重鏈之N末端或C末端的不同位置連接。另外，如前述(例如WO 94/029350；Reiter, Y.等人，Nature biotechnology 14 (1996) 1239-1245；Young, N., M.等人，FEBS Letters, 第377卷(1995) 135-139；或Rajagopal, V.等人，Protein Engineering Vol. 10 1453-59 (1997))，將半胱胺酸殘基在不同位置處引入結合EGFR之scFv域的VH(包括Kabat 44位)及VL(包括Kabat 100位)中。隨後評估蛋白質表現、穩定性及生物活性。此外，<IGF1R>抗體重鏈或輕鏈之C末端與結合EGFR之scFv之間的含(甘胺酸4-絲胺酸)_n肽連接子的長度可變。作為結合EGFR之單鏈Fv模組之組成部分的甘胺酸4-絲胺酸(G₄S)單鏈連接子之長度亦可變。所有該等分子經重組產生、純化且表徵。表1及表2中給出用於產生四價雙重專一性<EGFR-IGF1R>抗體之所有雙重專一性抗體設計之概要。為進行此研究，吾等使用術語『XGFR』描述同時識別

EGFR以及IGF1R且包含專一性結合EGFR或IGF1R中之一者的全長抗體及專一性結合EGFR或IGF1R中之另一者的兩個scFv片段的各種蛋白質實體。

表1 - N及C末端連接有scFv之不同雙重專一性<EGFR-IGF1R>抗體形式及相應XGFR1名稱及XGFR2名稱。

XGFR1形式係基於a)人類抗IGF-1R抗體<IGF-1R> HUMAB純系18(DSM ACC 2587)及b)源自SEQ ID NO:8之重鏈可變域(VH)及SEQ ID NO:10之輕鏈可變域(VL)的結合EGFR的兩個單鏈Fv(scFv)，該兩個單鏈Fv與抗IGF-1R抗體<IGF-1R> HUMAB純系18之重鏈(HC)或輕鏈(LC)之相同末端(C或N末端)連接。

XGFR2形式係基於a)人類化大鼠抗EGFR抗體ICR62之可變區VH(SEQ ID NO:8)及VL(SEQ ID NO:10)及b)結合人類抗IGF-1R抗體<IGF-1R> HUMAB純系18(DSM ACC 2587)VH(SEQ ID NO:23)及抗IGF-1R抗體<IGF-1R> HUMAB純系18之VL(SEQ ID NO:25)的兩個單鏈Fv(scFv)。

表中之「-」意謂「不存在」

分子名稱 XGFR名稱	scFv與全長 抗體之連接 位置	單鏈連接子 (G4S) _n n=	肽連接子 (G4S) _n n=	二硫鍵穩定之 scFv中之半胱 胺酸位置
抗IGF-1R抗體 <IGF-1R> HUMAB純系18	-	-	-	-
具有SEQ ID NO:8之VH及 SEQ ID NO:10 之VL的人類化 大鼠抗EGFR抗 體ICR62	-	-	-	-

分子名稱 XGFR名稱	scFv與全長 抗體之連接 位置	單鏈連接子 (G4S) _n n=	肽連接子 (G4S) _n n=	二硫鍵穩定之 scFv中之半胱 胺酸位置
XGFR1-2320	C-末端HC	3	2	-
XGFR1-3320	N-末端HC	3	2	-
XGFR1-4320	C-末端LC	3	2	-
XGFR1-5320	N-末端LC	3	2	-
XGFR1-2321	C-末端 HC	3	2	VH44/VL100
XGFR1-3321	N-末端 HC	3	2	VH44/VL100
XGFR1-4321	C-末端 LC	3	2	VH44/VL100
XGFR1-5321	N-末端 LC	3	2	VH44/VL100
XGFR2-2420	C-末端 HC	4	2	-
XGFR2-2421	C-末端 HC	4	2	VH44/VL100
XGFR2-3421	N-末端 HC	4	2	VH44/VL100
XGFR2-4421	C-末端 LC	4	2	VH44/VL100
XGFR2-5421	N-末端 LC	4	2	VH44/VL100

表 2 - 具有可變單鏈連接子及肽連接子長度之 XGFR1 雙重專一性抗體。表中之「-」意謂「不存在」。

分子名稱 XGFR名稱	scFv與全長 抗體之連接 位置	單鏈連接子 (G4S) _n n=	單鏈連接子 (G3S) _n n=	肽連接子 (G4S) _n n=	肽連接子 (G3S) _n n=	二硫鍵穩定之 scFv中之半胱 胺酸位置
XGFR1-2421	C-末端 HC	4	-	2	-	VH44/VL100
XGFR1-3421	N-末端 HC	4	-	2	-	VH44/VL100
XGFR1-4421	C-末端 LC	4	-	2	-	VH44/VL100
XGFR1-5421	N-末端 LC	4	-	2	-	VH44/VL100
XGFR1-2451	C-末端 HC	4	-	5	-	VH44/VL100
XGFR1-4451	C-末端 HC	4	-	5	-	VH44/VL100
XGFR1-2421C	C-末端 HC	-	5	-	3	VH44/VL100

實例 1 至 8 係關於連接有 scFv 之四價 XGFR1 及 XGFR2 分子

B) 連接有單鏈Fab(scFab)之四價雙重專一性<EGFR-IGF-1R>抗體(命名為scFab-XGFR1及scFab-XGFR2)的設計

使用術語scFab-XGFR描述同時識別EGFR以及IGF1R且包含專一性結合EGFR或IGF1R中之一者的全長抗體及專一性結合EGFR或IGF1R中之另一者的兩個scFab片段的各種蛋白質實體。

在下文中，作為本發明之一實施例，例示了包含以下之四價雙重專一性抗體：結合第一抗原(IGF-1R或EGFR)之全長抗體以及結合第二不同抗原(IGF-1R或EGFR中之另一者)之兩個單鏈Fab片段，該兩個單鏈Fab片段經由肽連接子與全長抗體連接(兩個單鏈Fab片段均連接在重鏈之兩個C末端或輕鏈之兩個C末端)。該單鏈Fab片段中之抗體域及連接子沿N末端至C末端方向具有以下次序：VL-CL-連接子-VH-CH1。

使用SEQ ID NO:23作為<IGF-1R>抗原結合位點之重鏈可變域VH。使用SEQ ID NO:25作為<IGF-1R>抗原結合位點之輕鏈可變域VL。

使用SEQ ID NO:8作為<EGFR>抗原結合位點之重鏈可變域VH。使用SEQ ID NO:10作為<EGFR>抗原結合位點之輕鏈可變域VL。

藉由基因合成及重組分子生物學技術，包含各別抗原結合位點之VH及VL的VL-CL及VH-CH1由甘胺酸絲胺酸(G4S)_nGm連接子連接產生單鏈Fab片段VL-CL-連接子-VH-CH1，其使用(G4S)_n肽連接子與抗體重鏈或輕鏈之C末端連接。

視情況，根據前述技術(例如WO 94/029350；Reiter, Y.等

人，Nature biotechnology (1996) 1239-1245；Young, N.M.等人，FEBS Letters (1995) 135-139；或Rajagopal, V.等人，Protein Engineering (1997) 1453-59)將半胱氨酸殘基引入單鏈Fab片段之VH(包括Kabat 44位)及VL(包括Kabat domain位)域中。

所有該等分子均經重組產生，純化且表徵且評估蛋白質表現、穩定性及生物活性。

表3中給出用於產生四價雙重專一性scFab <EGFR-IGF-1R>、<IGF-1R-EGFR>抗體之抗體設計的概要。為進行此研究，吾等使用術語『scFab-Ab』描述各種四價蛋白質實體。設計形式之陳述展示於圖13及14中且列於表3中。

表3 - C末端連接有單鏈Fab片段的不同雙重專一性抗IGF1R及抗EGFR scFab四價抗體形式及相應scFab-Ab名稱。

分子名稱 (雙重專一性抗體之ScFab-Ab名稱)	全長抗體 骨架之 來源	單鏈Fab 片段之 來源	可變域 VH及VL： SEQ ID NO:	單鏈Fab 與抗體 之連接 位置	連接子	肽連 接子	scFab 二硫鍵 VH44/ VL100 穩定
scFab-XGFR1_2720	<IGF1R>	<EGFR>	8,10,23,25	C末端， H鏈	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	否
scFab-XGFR1_2721	<IGF1R>	<EGFR>	8,10,23,25	C末端， H鏈	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	是
scFab-XGFR1_4720	<IGF1R>	<EGFR>	8,10,23,25	C末端， L鏈	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	否
scFab-XGFR1_4721	<IGF1R>	<EGFR>	8,10,23,25	C末端， L鏈	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	是
scFab-XGFR2_2720	<EGFR>	<IGF1R>	8,10,23,25	C末端， H鏈	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	否
scFab-XGFR2_2721	<EGFR>	<IGF1R>	8,10,23,25	C末端， H鏈	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	是
scFab-XGFR2_4720	<EGFR>	<IGF1R>	8,10,23,25	C末端， L鏈	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	否
scFab-XGFR2_4721	<EGFR>	<IGF1R>	8,10,23,25	C末端， L鏈	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	是

(實例9至13係關於連接有單鏈Fab之四價scFab-XGFR1及scFab-XGFR2分子)

材料及通用方法

Kabat, E.A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中給出關於人類免疫球蛋白輕鏈及重鏈核苷酸序列的通用資訊。抗體鏈之胺基酸係根據EU編號(Edelman, G.M.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991))編號且提及。

重組DNA技術

如 Sambrook, J. 等人, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989所述, 使用標準方法操作DNA。根據製造商之說明使用分子生物學試劑。

基因合成

由化學合成所製備之寡核苷酸製備所需基因片段。藉由黏接及寡核苷酸接合(包括PCR擴增)組裝側接有單限制性核酸內切酶裂解位點的長度為600-1800 bp的基因片段, 且隨後經由指定限制位點(例如BamHI/BstEII、BamHI/BsiWI、BstEII/NotI或BsiWI/NotI)選殖至基於pUC選殖載體的pcDNA 3.1/Zeo(+)(Invitrogen)中。次選殖基因片段之DNA序列係

藉由DNA測序確證。根據Geneart (Regensburg, Germany)所給之說明書定購基因合成片段。

DNA序列測定

藉由Sequiserve GmbH(Vaterstetten, Germany)執行之雙股測序法測定DNA序列。

DNA及蛋白質序列分析及序列數據處理

使用GCG(Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin)軟體套件第10.2版及Invitrogens Vector NT1 Advance套裝第9.1版進行序列產生、繪製、分析、註解及說明。

細胞培養技術

如Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J., S., Dasso, M., Harford, J., B., Lippincott-Schwartz, J. 及 Yamada, K., M. (編), John Wiley & Sons, Inc所述使用標準細胞培養技術。

免疫球蛋白變異體在HEK293F細胞中之短暫表現

藉由根據製造商之說明(Invitrogen, USA)使用FreeStyle™ 293表現系統短暫轉染人類胚腎293-F細胞來表現雙重專一性抗體。簡言之，在37°C /8% CO₂下，於FreeStyle™ 293表現培養基中培養FreeStyle™ 293-F細胞懸浮液，且在轉染當日，以 $1-2 \times 10^6$ 個活細胞/毫升之密度在新鮮培養基中接種細胞。在Opti-MEM® I培養基(Invitrogen, USA)中使用333 µl 293fectin™(Invitrogen, Germany)及250 µg 1:1莫耳比之重鏈及輕鏈質體DNA製備DNA-293fectin™複合物，最終轉染體積為250 ml。轉染後

7日藉由在14000 g下離心30分鐘且經由無菌過濾器(0.22 μm)過濾使含雙重專一性抗體之細胞培養物上清液澄清。

將上清液儲存在 -20°C 下直至純化。

蛋白質測定

藉由根據 Pace, C.N. 等人, Protein Science, 4 (1995) 2411-1423, 測定280 nm下之光學密度(OD), 用320 nm下之OD作為背景校正值, 使用基於胺基酸序列計算之莫耳消光係數來測定經純化抗體及衍生物之蛋白質濃度。

上清液中抗體濃度之測定

藉由親和HPLC層析量測細胞培養物上清液中抗體及衍生物之濃度。簡言之, 將含有結合蛋白A之抗體及衍生物的細胞培養物上清液在200 mM KH_2PO_4 、100 mM檸檬酸鈉(pH 7.4)中施加於Applied Biosystems Poros A/20管柱上, 且用200 mM NaCl 、100 mM檸檬酸(pH 2.5)在UltiMate 3000 HPLC系統(Dionex)上自基質溶離。由UV吸光度及峰面積積分定量溶離之蛋白質。經純化之標準IgG1抗體用作標準物。

蛋白質純化

藉由使用蛋白A-Sepharose™(GE Healthcare, Sweden)之親和層析及Superdex200尺寸排阻層析以兩個步驟自上清液純化所分泌抗體。簡言之, 將含雙重專一性及三重專一性抗體之澄清培養物上清液施加於用PBS緩衝液(10 mM Na_2HPO_4 、1 mM KH_2PO_4 、137 mM NaCl 及2.7 mM KCl , pH 7.4)平衡之HiTrap蛋白A HP(5 ml)管柱上。用平衡緩衝

液洗離未結合之蛋白質。用 0.1 M 檸檬酸鹽緩衝液 (pH 2.8) 溶離雙重專一性抗體，且用 0.1 ml 1 M Tris (pH 8.5) 中和含蛋白質之溶離份。隨後，彙集所溶離之蛋白質溶離份，用 Amicon 超離心過濾裝置 (MWCO : 30 K, Millipore) 濃縮至 3 ml 之體積，且裝載於用 20 mM 組胺酸、140 mM NaCl (pH 6.0) 平衡之 Superdex200 HiLoad 120 ml 16/60 凝膠過濾管柱 (GE Healthcare, Sweden) 上。彙集單體抗體溶離份，速凍且儲存在 -80°C 下。提供部分樣品用於後續蛋白質分析及表徵。

純化蛋白質之分析

藉由量測 280 nm 下之光學密度 (OD)，使用基於胺基酸序列計算之莫耳消光係數來測定經純化蛋白質樣品之蛋白質濃度。藉由 SDS-PAGE 在還原劑 (5 mM 1,4-二硫蘇糖醇) 存在及不存在下且用庫馬斯亮藍 (Coomassie brilliant blue) 染色分析雙重專一性抗體之純度。根據製造商之說明使用 NuPAGE[®] 預製凝膠系統 (Invitrogen, USA) (4-20% Tris-甘胺酸凝膠)。藉由於 UltiMate 3000 HPLC 系統 (Dionex) 上使用 Superdex 200 分析型尺寸排阻管柱 (GE Healthcare, Sweden) 於 200 mM KH_2PO_4 、250 mM KCl (pH 7.0 操作緩衝液) 中在 25°C 下進行高效 SEC 來分析雙重專一性抗體樣品之凝集物含量。以 0.5 ml/min 之流速在管柱上注射 25 μg 蛋白質且經 50 分鐘等度溶離。為進行穩定性分析，製備 0.1 mg/ml、1 mg/ml 及 3 mg/ml 濃度之經純化蛋白質，且在 4°C 、 37°C 下培育 7 日，且隨後藉由高效 SEC 評估。藉由 NanoElectrospray

Q-TOF質譜法在用肽-N-糖苷酶F(Roche Molecular Biochemicals)酶法處理移除N-聚糖之後確證經還原雙重專一性抗體輕鏈及重鏈之胺基酸骨架的完整性。

實例 1

雙重專一性<EGFR-IGF1R>抗體XGFR1分子之表現及純化

在帶有原核及真核選擇標記之表現載體中建構相應雙重專一性抗體之輕鏈及重鏈。在大腸桿菌中擴增此等質體，純化，隨後轉染以在HEK293F細胞中短暫表現重組蛋白(使用Invitrogen之freestyle系統)。7日之後，收集HEK 293細胞上清液，藉由蛋白A及尺寸排阻層析純化。藉由SDS-PAGE在非還原及還原條件下確證所有雙重專一性抗體構築體之均質性。在還原條件下(圖2a)，帶有C及N端scFv融合體之多肽鏈在SDS-PAGE上展示類似於所計算分子量之表觀分子大小。藉由蛋白A HPLC分析所有構築體之表現量，其類似於『標準』IgGs之表現產量，或在一些情況下略低。在該等非最佳化短暫表現實驗中，平均蛋白質產量為每公升細胞培養物上清液在1 mg與36 mg之間經純化蛋白質(圖3)。與N端連接scFv(XGFR1-3320及XGFR1-5320)相比，在輕鏈(XGFR-4320)或在重鏈(XGFR-2320)具有C端融合scFv之未經二硫鍵穩定之構築體在蛋白A純化後展示較多量之所需大小之回收蛋白質。

經純化蛋白質之HP-尺寸排阻層析分析展示(與『正常』IgGs相比)，含有scFv在VH與VL之間未經鏈間二硫鍵穩定之分子有一些凝集趨勢。為解決該等雙重專一性抗體之凝

集問題，對scFv部分進行二硫鍵穩定。為此，吾等在scFv之VH及VL內限定位置(根據Kabat編號方案之位置VH44/VL100)引入單半胱氨酸置換。此等突變可使VH與VL之間形成穩定鏈間二硫鍵，進而穩定所得二硫鍵穩定之scFv模組。在scFvs中在Fv之N端及C端引入VH44/VL100二硫鍵導致所有構築體之蛋白質表現量改良(參見圖4)。

藉由根據製造商之說明(Invitrogen, USA)使用FreeStyle™ 293表現系統短暫轉染人類胚腎293-F細胞來表現雙重專一性抗體。簡言之，在37°C/8% CO₂下，於FreeStyle™ 293表現培養基中培養FreeStyle™ 293-F細胞懸浮液，且在轉染當日，以 $1-2 \times 10^6$ 個活細胞/毫升之密度在新鮮培養基中接種細胞。在Opti-MEM® I培養基(Invitrogen, USA)中使用333 µl 293fectin™(Invitrogen, Germany)及250 µg 1:1莫耳比之重鏈及輕鏈質體DNA製備DNA-293fectin™複合物，最終轉染體積為250 ml。轉染後7日藉由在14000 g下離心30分鐘且經由無菌過濾器(0.22 µm)過濾使含雙重專一性抗體之細胞培養物上清液澄清。將上清液儲存在-20°C下直至純化。

藉由使用蛋白A-Sepharose™(GE Healthcare, Sweden)之親和層析及Superdex200尺寸排阻層析以兩個步驟自上清液純化所分泌抗體。簡言之，將含雙重專一性及三重專一性抗體之澄清培養物上清液施加於用PBS緩衝液(10 mM Na₂HPO₄、1 mM KH₂PO₄、137 mM NaCl及2.7 mM KCl，pH 7.4)平衡之HiTrap蛋白A HP(5 ml)管柱上。用平衡緩衝

液洗離未結合之蛋白質。用0.1 M檸檬酸鹽緩衝液(pH 2.8)溶離雙重專一性抗體，且用0.1 ml 1 M Tris(pH 8.5)中和含蛋白質之溶離份。隨後，彙集所溶離之蛋白質溶離份，用Amicon超離心過濾裝置(MWCO: 30 K, Millipore)濃縮至3 ml之體積，且裝載於用20 mM組胺酸、140 mM NaCl(pH 6.0)平衡之Superdex200 HiLoad 120 ml 16/60凝膠過濾管柱(GE Healthcare, Sweden)上。彙集單體抗體溶離份，速凍且儲存在-80°C下。提供部分樣品用於後續蛋白質分析及表徵。

在純化之後XGFR1-2320具有0.27 mg之最終產量，而XGFR1-2321具有13.8 mg之最終產量。

雙重專一性抗體之例示性SDS-PAGE及HP-尺寸排阻層析(SEC)純化及分析展示於圖3及圖4中。

實例2

雙重專一性<EGFR-IGF1R>抗體XGFR1分子之活體外穩定性

執行HP-尺寸排阻層析分析。

藉由於UltiMate 3000 HPLC系統(Dionex)上使用Superdex 200分析型尺寸排阻管柱(GE Healthcare, Sweden)於200 mM KH₂PO₄、250 mM KCl(pH 7.0操作緩衝液)中在25°C下進行高效SEC來分析雙重專一性抗體樣品之凝集物含量。以0.5 ml/min之流速在管柱上注射25 µg蛋白質且經50分鐘等度溶離。為進行穩定性分析，製備0.1 mg/ml、1 mg/ml及5 mg/ml濃度之經純化蛋白質，且在4°C、37°C及40°C下培育7日或28日，且隨後藉由高效SEC評估。藉

由 NanoElectrospray Q-TOF 質譜法在用肽-N-糖苷酶 F(Roche Molecular Biochemicals)酶法處理移除N-聚糖之後確證經還原雙重專一性抗體輕鏈及重鏈之胺基酸骨架的完整性。

不同條件(不同濃度及時間)下經純化蛋白質之HP-尺寸排阻層析分析展示，與正常IgG相比，含有scFv之分子之凝集趨勢大大增加。

對於此研究而言，吾等定義所需『單體』分子由2個重鏈及輕鏈雜二聚物組成，其中scFv與兩者中之任一者連接。

與含有未經修飾scFv之實體的強凝集趨勢相比，VH44/VL100二硫鍵穩定之構築體之HP尺寸排阻分析展示凝集趨勢小得多。

雙重專一性抗體之例示性HP-尺寸排阻層析(SEC)純化及分析展示於圖4中。

實例3

雙重專一性<EGFR-IGF1R>抗體XGFR1分子與RTK EGFR及IGF1R之同時結合

將scFv模組及不同雙重專一性抗體形式之IgG模組中保留之Fv的結合與產生結合模組及雙重專一性抗體之『野生型』IgG之結合對比。藉由使用表面電漿共振(Biacore)以及細胞-ELISA進行此等分析。

藉由表面電漿共振(SPR)技術使用Biacore T100儀器(Biacore AB, Uppsala)分析雙重專一性抗IGF-1R/抗EGFR抗

體之結合特性。此系統已經充分確立用於研究分子相互作用。其允許連續即時監測配位體/分析物結合且因此允許在各種檢定配置中測定締合速率常數(k_a)、解離速率常數(k_d)及平衡常數(KD)。SPR技術係基於量測塗布金之生物感應器晶片表面附近的折射率。折射率之變化指示表面上由經固定配位體與以溶液形式注射之分析物之相互作用所引起的質量變化。若分子結合表面上之經固定配位體，則質量增加，在解離情況下，質量減小。

使用胺偶合化學法將捕捉性抗人類IgG抗體固定在CM5生物感應器晶片之表面上。用5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 流速之0.1 M N-羥基丁二醯亞胺與0.1 M 3-(N,N-二甲基胺基)丙基-N-乙基碳化二亞胺之1:1混合物啟動流槽。注射於乙酸钠(pH 5.0)中之10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗人類IgG抗體，此產生約12000 RU之表面密度。以相同方式處理參考對照流槽，但用單獨媒劑緩衝液替代捕捉抗體。藉由注射1 M乙醇胺/HCl(pH 8.5)阻斷表面。用HBS-P稀釋雙重專一性抗體，且以5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流速注射。對於濃度在1 nM與5 nM之間(EGFR-ECD結合)及20 nM(IGF-1R相互作用)的抗體，接觸時間(締合期)為1分鐘。以3.125、6.25、12.5、25、50及100 nM之漸增濃度注射EGFR-ECD，以0.21、0.62、1.85、5.6、16.7及50 nM之濃度注射IGF-1R。對於流速為30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之兩種分子，接觸時間(締合期)為3 min，解離時間(用操作緩衝液洗滌)為5 min。在25°C(標準溫度)下執行所有相互作用。以5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流速注射3 M氯化鎂之再生溶液60秒以移除各結合循環之後任

何未共價結合之蛋白質。以每秒一個信號的速率偵測信號。以漸增濃度注射樣品。

圖5展示雙重專一性抗體與EGFR及IGF1R之例示性同時結合。

表4 - 雙重專一性抗體(XGFR名稱)與EGFR及IGF-1R
之親和力(KD)

分子	KD值(與EGFR之親和力)	KD值(與IGF-1R之親和力)
XGFR1-2321	4 nM	n.d
XGFR1-2421	6 nM	6 nM
XGFR1-3321	6 nM	4 nM
XGFR1-3421	3 nM	2 nM
XGFR1-4321	5 nM	n.d.
XGFR1-4421	3 nM	5 nM
XGFR1-5321	4 nM	n.d.
XGFR1-5421	3 nM	2 nM
<EGFR> ICR62	3 nM	n.d
<IGF-1R> HUMAB 純系18	n.d.	5 nM

實例4

雙重專一性<EGFR-IGF1R>抗體XGFR1分子對EGFR以及IGF1R之下調

人類抗IGF-1R抗體<IGF-1R> HUMAB純系18(DSM ACC 2587)抑制IGFR1信號傳導，且人類化大鼠抗EGFR抗體<EGFR>ICR62抑制EGFR信號傳導。為評估不同XGFR1變異體之潛在抑制活性，分析兩種信號傳導之受體的下調程度。

為偵測本發明抗體對腫瘤細胞中IGF-I受體(IGF-IR)之量的影響，對IGF-IR及EGFR專一性抗體執行時程實驗及後續ELISA分析。

將一6孔板中補充有1% PenStrep的RPMI-VM培養基(PAA, 目錄號E15-039)中的人類腫瘤細胞(A549, 2×10^5 個細胞/毫升)以4 ml細胞於各實驗之各別培養基中接種, 且在37°C及5% CO₂下培養24小時。

小心地移除培養基, 且替換為2 ml 0.01 mg/ml用RPMI-VM培養基稀釋之XGFR抗體。在三個對照孔中, 將培養基替換為無抗體之培養基、含有對照抗體(<IGF-1R> HUMAB純系18及<EGFR>ICR62, 最終濃度為0.01 mg/ml)之培養基, 且一孔僅含緩衝液。在37°C及5% CO₂下培育細胞, 且24小時之後取出個別培養板作進一步處理。

藉由抽吸小心移除培養基, 且用1 ml PBS洗滌細胞。每孔添加300 µl冷MES-溶解緩衝液(MES、10 mM Na₃VO₄及Complete[®]蛋白酶抑制劑)。使用細胞刮棒(Corning, 目錄號3010)使細胞分離, 且將孔內容物轉移至Eppendorf反應管中。藉由在13000 rpm及4°C下離心10分鐘移除細胞碎片。

EGFR偵測

根據方案(人類EGFR之DuoSet ELISA, RnD系統, 目錄號DY231)製備96孔抗生蛋白鏈菌素微量滴定板(MTP)。用PBS 1:180稀釋144 µg/ml人類EGFR山羊抗體之PBS溶液, 且向MTP中每孔添加100 µl。在4°C下, 於攪拌下培育MTP隔夜。用補充有0.1% Tween[®]20之PBS洗滌培養板3次, 且在室溫(RT)下, 於攪拌下, 用每孔300 µl PBS、3% BSA及0.1% Tween[®]20溶液阻斷1小時(h)。用補充有0.1% Tween[®]20

之PBS洗滌培養板3次。

使用BCA蛋白質檢定套組(Pierce)測定細胞溶解物中蛋白質之量，隨後用補充有100 mM Na_3VO_4 (1:100)及Complete®蛋白酶抑制劑(1:20)之MES-溶解緩衝液調整細胞溶解物至0.1 mg/ml之蛋白質濃度，且向預先製備之MTP中每孔添加100 μl 溶解物。

使用0.05 mg/ml之第二細胞溶解物濃度(將溶解物1:2稀釋)，且向預先製備之MTP中每孔添加100 μl 。在室溫下於攪拌下再培育MTP 2小時，且隨後用含有0.1% Tween®20溶液之PBS洗滌3次。

EGFR之偵測抗體為36 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度之用PBS、3% BSA及0.2% Tween®20 1:180稀釋之人類EGFR山羊生物素標記抗體。每孔添加100 μl ，且在室溫下於攪拌下培育2小時。隨後每孔用200 μl 含有0.1% Tween®20溶液之PBS洗滌MTP三次。隨後添加第二抗體，即用PBS、3% BSA及0.2% Tween®20 1:200稀釋之抗生蛋白鏈菌素-HRP，每孔添加100 μl ，且在室溫下於攪拌下培育20分鐘。隨後用含有0.1% Tween®20溶液之PBS洗滌培養板六次。每孔添加100 μl 3,3'-5,5'-四甲基聯苯胺(Roche, BM-Blue ID號：11484581)，且在室溫下於攪拌下培育20分鐘。藉由每孔添加25 μl 1 M H_2SO_4 且在室溫下再培育5分鐘中止顏色反應。在450 nm下量測吸光度。

IGF-1R偵測

藉由每孔添加100 μl 用PBS、3% BSA及0.2% Tween®20

1:200稀釋之生物素標記抗體AK1a(Genmab, Denmark)來製備抗生蛋白鏈菌素-MTP(Roche ID號: 11965891001)。在室溫下於攪拌下培育抗生蛋白鏈菌素-MTP 1小時，且隨後每孔用200 μ l含有0.1% Tween[®]20溶液之PBS洗滌三次。

使用BCA蛋白質檢定套組(Pierce)測定細胞溶解物中蛋白質之量，隨後用50 mM Tris(pH 7.4)、100 mM Na₃VO₄(1:100)及Complete[®]蛋白酶抑制劑(1:20)調整細胞溶解物至0.04 mg/ml之蛋白質濃度，且向預先製備之抗生蛋白鏈菌素-MTP中每孔添加100 μ l溶解物。

使用0.02 mg/ml之第二細胞溶解物濃度(將溶解物稀釋)，且向預先製備之抗生蛋白鏈菌素-MTP中每孔添加100 μ l。用補充有50 mM Tris(pH 7.4)、100 mM Na₃VO₄(1:100)及Complete[®]蛋白酶抑制劑(1:20)之溶解緩衝液稀釋含未受刺激細胞之陽性對照至1:4000，且向預先製備之抗生蛋白鏈菌素-MTP中每孔添加100 μ l溶解物。對於陰性對照，將100 μ l溶解緩衝液添加至抗生蛋白鏈菌素-MTP中之孔中。

在室溫下於攪拌下再培育MTP 1小時，且隨後用含有0.1% Tween[®]20溶液之PBS洗滌3次。

IGF-1R之偵測抗體為用PBS、3% BSA及0.2% Tween[®]20 1:750稀釋之人類IGF-1R β 兔抗體(Santa Cruz Biotechnology, 目錄號sc-713)。每孔添加100 μ l且在室溫下於攪拌下培育1小時。隨後每孔用200 μ l含有0.1% Tween[®]20溶液之PBS洗滌MTP三次。隨後添加第二抗體，即用PBS、3% BSA及0.2% Tween[®]20 1:4000稀釋之兔IgG-POD(Cell signaling目

錄號 7074)，每孔添加 100 μ l，且在室溫下於攪拌下培育 1 小時。隨後用含有 0.1% Tween[®]20 溶液之 PBS 洗滌培養板六次。每孔添加 100 μ l 3,3'-5,5'-四甲基聯苯胺 (Roche, BM-Blue ID 號：11484581)，且在室溫下於攪拌下培育 20 分鐘。藉由每孔添加 25 μ l 1 M H₂SO₄ 且在室溫下再培育 5 分鐘中止顏色反應。在 450 nm 下量測吸光度。

圖 12 展示 A549 細胞中雙重專一性抗體 XGFR 與母單專一性抗體 <EGFR>ICR62 及 <IGF-1R> HUMAB 純系 18 相比之受體下調偵測結果。雙重專一性抗體 XGFR 下調 EGFR 以及 IGF1R。意外地，與母 <EGFR>ICR62 抗體相比，雙重專一性抗體 XGFR 展示改良之 EGFR 下調。

實例 5

雙重專一性 <EGFR-IGF1R> 抗體 XGFR1 分子對 EGFR 以及 IGF1R 信號傳導路徑的抑制

人類抗 IGF-1R 抗體 <IGF-1R> HUMAB 純系 18 (DSM ACC 2587) 抑制 IGF1R 信號傳導，且人類化大鼠抗 EGFR 抗體 ICR62 抑制 EGFR 信號傳導。為評估不同 XGFR1 變異體之潛在抑制活性，分析沿兩條路徑信號傳導之抑制程度。

將一 6 孔板中補充有 1% PenStrep 的 RPMI 培養基 (PAA，目錄號 E15-039) 中的人類腫瘤細胞 (H322M， 2×10^5 個細胞/毫升) 以 4 ml 細胞於各實驗之各別培養基中接種，且在 37°C 及 5% CO₂ 下培養 24 小時。

小心地移除培養基，且替換為 2 ml 0.01 mg/ml 用 RPMI-VM 培養基稀釋之 XGFR 抗體。在三個對照孔中，將培養基

替換為無抗體之培養基、含有對照抗體(<IGF-1R> HUMAB純系18及<EGFR>ICR62，最終濃度為0.01 mg/ml)之培養基，且一孔僅含有緩衝液。在37℃及5% CO₂下培育細胞，且24小時之後取出個別培養板作進一步處理。

EGFR磷酸化偵測

使用 DuoSet[®] IC人類磷酸化EGF R(RnD systems目錄號DYC1095-5)。藉由稀釋磷酸化EGF R捕捉抗體(目錄號841402)至0.8 µg/ml之濃度來製備培養板。向MTP中每孔添加100 µl，密封培養板且在室溫下培育隔夜。

隨後抽吸捕捉抗體，且用400 µl洗滌緩衝液(0.05% Tween[®]20，於PBS中，pH 7.2-7.4，目錄號WA126)洗滌各孔五次，最後一次洗滌之後，將培養板在潔淨紙巾上吸乾。

藉由添加300 µl阻斷緩衝液(1% BSA，0.05% NaN₃，於PBS中，pH 7.2-7.4)且在室溫下培育2小時阻斷培養板。隨後抽吸溶液，且用400 µl洗滌緩衝液(0.05% Tween[®]20，於PBS中，pH 7.2-7.4，目錄號WA126)洗滌各孔五次，最後一次洗滌之後，將培養板在潔淨紙巾上吸乾。

用PBS沖洗細胞，且使用溶解緩衝液9(1% NP-40、20 mM Tris(pH 8.0)、137 mM NaCl、10%甘油、2 mM EDTA、1 mM 活性原鈳酸鈉、10 µg/ml抗蛋白酶及10 µg/ml亮抑蛋白酶肽)以1×10⁷個細胞/毫升之細胞密度溶解，且在4℃下於輕柔攪拌下培育30分鐘。隨後將樣品在14,000 g下離心5分鐘。隨後轉移樣品至潔淨試管中。

使用BCA蛋白質檢定套組(Pierce)測定細胞溶解物中蛋

白質之量，隨後用IC稀釋劑12(1% NP-40、20 mM Tris(pH 8.0)、137 mM NaCl、10%甘油、2 mM EDTA、1 mM活性原鈳酸鈉)調整細胞溶解物至0.1 mg/ml及0.05 mg/ml之蛋白質濃度。向預先製備之MTP中每孔添加100 μ l溶解物，密封培養板，且在室溫下培育2小時。

臨用前用IC稀釋劑14(20 mM Tris、137 mM NaCl、0.05% Tween[®]20、0.1% BSA，pH 7.2-7.4)稀釋偵測抗體至小瓶上指定之工作濃度。每孔添加100 μ l偵測抗體，密封培養板，且在室溫下在黑暗中培育2小時。隨後抽吸偵測抗體，且用400 μ l洗滌緩衝液(0.05% Tween[®]20，於PBS中，pH 7.2-7.4，目錄號WA126)洗滌各孔五次，最後一次洗滌之後將培養板在潔淨紙巾上吸乾。

每孔添加100 μ l受質溶液(目錄號DY999)，且在黑暗中再培育培養板20分鐘。藉由添加50 μ l中止溶液2N H₂SO₄(目錄號DY994)且充分混合中止反應。

量測450 nm下之吸光度。

IGF-1R磷酸化偵測

藉由每孔添加100 μ l用PBS、3% BSA及0.2% Tween[®]20 1:200稀釋之生物素標記抗體AK1a(Genmab, Denmark)來製備抗生蛋白鏈菌素-MTP(Roche ID號：11965891001)。在室溫下於攪拌下培育抗生蛋白鏈菌素-MTP 1小時，且隨後每孔用200 μ l含有0.1% Tween[®]20溶液之PBS洗滌三次。

使用BCA蛋白質檢定套組(Pierce)測定細胞溶解物中蛋白質之量，隨後用50 mM Tris(pH 7.4)、100 mM Na₃VO₄(1:100)

及 Complete[®]蛋白酶抑制劑(1:20)調整細胞溶解物至1 μ M之蛋白質濃度，且向預先製備之抗生蛋白鏈菌素-MTP中每孔添加100 μ l溶解物。

用補充有50 mM Tris(pH 7.4)、100 mM Na₃VO₄(1:100)及 Complete[®]蛋白酶抑制劑(1:20)之溶解緩衝液稀釋含未受刺激細胞之陽性對照至1:4000，且向預先製備之抗生蛋白鏈菌素-MTP中每孔添加100 μ l溶解物。對於陰性對照，將100 μ l溶解緩衝液添加至抗生蛋白鏈菌素-MTP中之孔中。

在室溫下於攪拌下再培育MTP 1小時，且隨後用含有0.1% Tween[®]20溶液之PBS洗滌3次。

IGF-1R之偵測抗體為用PBS、3% BSA及0.2% Tween[®]20 1:500稀釋之人類IGF-1R(Tyr1135/1136)/胰島素受體 β (Tyr1150/1151)(19H7)抗體(Cell signalling，目錄號3024L)。每孔添加100 μ l且在室溫下於攪拌下培育1小時。隨後每孔用200 μ l含有0.1% Tween[®]20溶液之PBS洗滌MTP三次。隨後添加第二抗體，即用PBS、3% BSA及0.2% Tween[®]20 1:4000稀釋之兔IgG-POD(Cell signaling目錄號7074)，每孔添加100 μ l，且在室溫下於攪拌下培育1小時。隨後用含有0.1% Tween[®]20溶液之PBS洗滌培養板六次。每孔添加100 μ l 3,3'-5,5'-四甲基聯苯胺(Roche, BM-Blue ID號：11484581)，且在室溫下於攪拌下培育20分鐘。藉由每孔添加25 μ l 1 M H₂SO₄且在室溫下再培育5分鐘中止顏色反應。在450 nm下量測吸光度。

圖7a及7b展示使用<IGF-1R> HUMAB純系18大大減弱

IGFR1信號傳導檢定中之特定磷酸化信號，但在量測EGFR信號傳導之相應檢定中無影響。反之亦然，使用<EGFR>ICR62減弱EGFR信號傳導檢定中之特定磷酸化信號，但在量測IGF1R信號傳導之相應檢定中展示無影響。XGFR1變異體#2421、3421及4421在以相同莫耳濃度用於相同檢定時在兩個檢定中均展示與野生型抗體相比相同或較佳之活性。因此，XGFR1分子能夠干擾兩條信號傳導路徑。

實例 6

XGFR1介導之活體外腫瘤細胞株生長抑制

人類抗IGF-1R抗體<IGF-1R> HUMAB純系18(DSM ACC 2587)抑制表現IGF1R之腫瘤細胞株生長(WO 2005/005635)。以類似方式，人類化大鼠抗EGFR抗體<EGFR>ICR62展示抑制表現EGFR之腫瘤細胞株生長(WO 2006/082515)。為評估不同XGFR1變異體在腫瘤細胞株生長檢定中之潛在抑制活性，分析表現EGFR以及IGF1R之H322M細胞中的抑制程度。

在塗布poly-HEMA(聚(甲基丙烯酸2-羥基乙酯))以防止黏附至塑膠表面之培養皿上在補充有0.5% FCS培養基之RPMI 1640中培養H322M細胞。在此等條件下，H322M細胞形成以三維方式生長(稱作固著非依賴性之特性)之緻密球形。此等球形極類似於原位實體腫瘤之三維組織架構及組織。在50 nM或100 nM之漸增量之抗體存在下培育球形培養物5日。使用WST轉化檢定量測生長抑制。當用<IGF-

1R> HUMAB純系18處理H322M球形培養物時，可觀察到生長抑制。

圖8展示使用50 nM <IGF-1R> HUMAB純系18使細胞生長減少53%，且在相同檢定中使用50 nM <EGFR>ICR62使細胞生長減少53%。

同時使用兩種抗體(相同濃度)使細胞存活率進一步減少至26%(74%抑制)。此表明同時干擾兩條RTK路徑與僅干擾一條路徑相比對腫瘤細胞株具有較大影響。

使用50 nM莫耳濃度之各種XGFR1變異體產生較高生長抑制，該生長抑制比僅用50 nM濃度之單一分子所觀察到之生長抑制顯著。

實際上，與100 nM雙倍抗體濃度之原始<EGFR>與<IGF1R>抗體之組合(50 nM <IGF-1R> HUMAB純系18與50 nM <EGFR>ICR62)相比，50 nM抗體濃度之各種XGFR1變異體展示改良之抗增殖活性。

吾等推斷，與干擾EGFR信號傳導或IGF1R信號傳導之IgG相比，XGFR1分子具有大大增強之生長抑制活性。此外，若吾人對比XGFR1分子之活性與<IGF-1R> HUMAB純系18與<EGFR>ICR62抗體之混合物之活性，可以明顯低於混合物之濃度(莫耳濃度及質量濃度)達成相等或較佳活性。

表5 - 雙重專一性抗體(XGFR名稱)針對H322M腫瘤細胞之抗增殖活性(存活及抑制)。

抗體(濃度)	RLU	存活%	抑制%
培養基	32177	100	0
緩衝液	32995	103	-3
IgG	32847	102	-2
<IGF-1R> HUMAB純系 18(50 nM)	15015	47	53
<EGFR> ICR62(50 nM)	15163	47	53
<IGF-1R> HUMAB純系 18(50 nM) + <EGFR> ICR62(50 nM) (=100 nM抗體濃度)	8381	26	74
XGFR1-2321(50 nM)	8283	26	74
XGFR1-2421(50 nM)	7356	23	77
XGFR1-3321(50 nM)	8268	26	74
XGFR1-3421(50 nM)	7989	25	75
XGFR1-4321(50 nM)	16158	50	50
XGFR1-4421(50 nM)	10668	33	67
XGFR1-5321(50 nM)	14213	44	56
XGFR1-5421(50 nM)	9506	30	70

實例 7

XGFR1-2421、XGFR1-3421、XGFR1-4421及XGFR1-5421之糖基工程改造衍生物(XGFR1-2421-GE、XGFR1-3421-GE、XGFR1-4421-GE及XGFR1-5421-GE)的製備

在MPSV啟動子控制下且在合成polyA位點上游將所得完整抗體重鏈及輕鏈DNA序列次選殖於哺乳動物表現載體中(一者用於輕鏈且一者用於重鏈)，各載體帶有EBV OriP序列。

藉由用哺乳動物抗體重鏈及輕鏈表現載體使用磷酸鈣轉染法共轉染HEK293-EBNA細胞來產生抗體。藉由磷酸鈣法轉染指數式生長之HEK293-EBNA細胞。為產生未經修飾之抗體，僅用比率為1:1之抗體重鏈及輕鏈表現載體轉染該等細胞。為產生經糖基工程改造抗體，使用相應比率為4:4:1:1之四種質體(兩種用於抗體表現、一種用於融合

GnTIII多肽表現且一種用於甘露糖苷酶II表現)共轉染該等細胞。使用補充有10% FCS之DMEM培養基使細胞於T燒瓶中生長為黏附性單層培養物且當其達成50%至80%匯合時進行轉染。為轉染T75燒瓶，在轉染前24小時將8百萬個細胞接種於14 ml補充有FCS(最終達10% V/V)、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 新黴素(neomycin)之DMEM培養基中，且將細胞置於具有5% CO_2 氛圍之培育箱中37°C下隔夜。對於欲轉染之各T75燒瓶，藉由混合在輕鏈與重鏈表現載體之間均分之47 μg 總質體載體DNA、235 μl 1 M CaCl_2 溶液且添加水至469 μl 之最終體積來製備DNA、 CaCl_2 及水之溶液。向此溶液中添加469 μl 50 mM HEPES、280 mM NaCl、1.5 mM Na_2HPO_4 溶液(pH 7.05)，立即混合10秒且在室溫下靜置20秒。用12 ml補充有2% FCS之DMEM稀釋懸浮液，且添加至T75中替代現有培養基。在37°C、5% CO_2 下培育細胞約17至20小時，隨後用12 ml DMEM、10% FCS替換培養基。轉染後5至7天收集改良性培養基，在1200 rpm下離心5分鐘，繼而在4000 rpm下第二次離心10分鐘且保持在4°C下。

藉由蛋白A親和層析，繼而陽離子交換層析及於Superdex 200管柱(Amersham Pharmacia)上之最終尺寸排阻層析步驟，將緩衝液更換為磷酸鹽緩衝生理食鹽水且收集純單體IgG1抗體來純化所分泌之抗體。使用分光光度計自280 nm下之吸光度估算抗體濃度。在pH值為6.7之25 mM磷酸鉀、125 mM氯化鈉、100 mM甘胺酸溶液中調配抗體。

藉由使抗體表現載體與 GnT-III 糖基轉移酶表現載體一起或與 GnT-III 表現載體加上高基體甘露糖苷酶 II 表現載體一起共轉染來產生人類化抗體之糖基工程改造變異體。如以上對於非糖基工程改造抗體所述純化且調配糖基工程改造抗體。藉由下述 MALDI/TOF-MS 分析與抗體 Fc 區連接之寡糖。

寡糖係藉由 PNGaseF 消化自抗體中酶促式釋放，其中該等抗體固定於 PVDF 膜上或呈溶液形式。

所得含所釋放寡糖之消化溶液直接製備進行 MALDI/TOF-MS 分析或用 EndoH 糖苷酶進一步消化隨後製備樣品以進行 MALDI/TOF-MS 分析。

對於本發明之所有雙重專一性抗體，「GE」意謂糖基工程改造。

實例 8

XGFR1 分子與 FcγRIIIa 之結合及其 ADCC 能力

非糖基修飾人類化大鼠抗 EGFR 抗體 ICR62(WO 2006/082515)不僅藉由干擾 RTK 介導之生長刺激信號而且在顯著程度上藉由誘發對腫瘤細胞之 ADCC 來介導其抗腫瘤活性。以類似方式，其他抗體(諸如抗 IGF-1R 抗體 <IGF-1R> HUMAB 純系 18)亦能夠誘發 ADCC。既定抗體之 ADCC 介導程度不僅取決於所結合之抗原，而且取決於恆定區與 FcγRIIIa(稱作 Fc 受體，其觸發 ADCC 反應)之親和力。因為 ADCC 為 XGFR1 分子之所需機制，故此等分子可以與『正常』抗體相同之方式結合 FcγRIIIa 且此等分子具有良好

ADCC能力很重要。為分析各種XGFR1分子與bFcγRIIIa之結合，吾等使用先前確立之Biacore技術(參考文獻)。藉由此技術評定XGFR1分子與重組產生之FcγRIIIa域的結合。

在25°C下在BIAcore 3000儀器(GE Healthcare Biosciences AB, Sweden)上執行所有表面電漿共振量測。操作及稀釋緩衝液為PBS(1 mM KH₂PO₄、10 mM Na₂HPO₄、137 mM NaCl、2.7 mM KCl)(pH6.0)，0.005% (v/v)Tween20。用10 mM 乙酸钠(pH 5.0)稀釋可溶性人類FcγRIIIa，且使用標準胺偶合套組(GE Healthcare Biosciences AB, Sweden)固定在CM5生物感應器晶片上以獲得約1000 RU之FcγRIIIa表面密度。使用HBS-P(10 mM HEPES(pH 7.4)、150 mM NaCl、0.005%界面活性劑P20；GE Healthcare Biosciences AB, Sweden)作為固定期間的操作緩衝液。用PBS、0.005% (v/v)Tween20(pH 6.0)稀釋XGFR雙重專一性抗體至450 nM之濃度，且以30 µl/min之流速經3分鐘注射。隨後用PBS(pH 8.0)、0.005% (v/v)Tween20使感應器晶片再生歷時1分鐘。用BIAevaluation軟體(BIAcore, Sweden)執行數據分析。

表7中概述此等實驗之結果。

表6-雙重專一性抗體(XGFR名稱)與FcγRIIIa及FcRn之結合親和力

分子	與FcγRIIIa之親和力	與FcRn之親和力
XGFR1-2321	有	有
XGFR1-2421	有	有
XGFR1-3321	有	有
XGFR1-3421	有	有

XGFR1-4321	有	有
XGFR1-4421	有	有
XGFR1-5321	有	有
XGFR1-5421	有	有
<EGFR> ICR62	有	n.d
<IGF-1R> HUMAB純系18	n.d.	n.d.

此等分析揭示無抗原結合之XGFR1分子對FcγRIIIa之結合與野生型IgG1分子之結合無差別。因此，此等生物化學檢定表明無抗原結合之XGFR1-2421及XGFR1-4421完全能夠結合介導ADCC之受體FcγRIIIa。

在抗原存在下使用XGFR1分子重複此等實驗揭示對可溶性FcγRIIIa之結合能力無影響。

藉由前述技術(Umana, P.等人 Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180及WO 99/54342)用經糖基修飾之XGFR1分子(參見實例7)執行另一組該等Biacore實驗。此糖基修飾增強Fc區與FcγRIIIa之親和力，且由此增強對標靶細胞之ADCC。無抗原結合之經糖基修飾之XGFR1分子與無抗原結合之經糖基修飾之野生型IgG之FcγRIIIa結合能力的對比展示無抗原結合之經糖基修飾之XGFR1分子與野生型抗體相比具有增強之結合親和力。

表7-雙重專一性抗體(XGFR名稱)與FcγRIIIa及FcRn之結合親和力

分子	與FcγRIIIa之親和力	與FcRn之親和力
XGFR1-2421-GE	有	有
XGFR1-3421-GE	有	有
XGFR1-4421-GE	有	有
XGFR1-5421-GE	有	有

為分析 XGFR1 分子與 FcγRIIIa 結合能力亦轉化為活體外對腫瘤細胞之 ADCC 活性的程度，吾等測定細胞檢定中之 ADCC 能力。為進行此等檢定，製備 XGFR1-2421、XGFR1-3421、XGFR1-4421 及 XGFR1-5421 之經糖基修飾之衍生物 (XGFR1-2421-GE、XGFR1-3421-GE、XGFR1-4421-GE 及 XGFR1-5421-GE) (參見實例 6) 且在前述 BIAcore ADCC 能力檢定形式中以及下述活體外 ADCC 檢定中測試。

使用人類周邊血液單核細胞 (PBMC) 作為效應細胞且使用 Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO 63178 USA) 基本上遵循製造商之說明來製備。簡言之，用肝素化注射器採集健康志願者之靜脈血。將血液用 PBS (不含 Ca^{++} 或 Mg^{++}) 1:0.75-1.3 稀釋且在 Histopaque-1077 上分層。在室溫 (RT) 下在 $400\times g$ 下不間斷地離心該梯度液 30 分鐘。收集含有 PBMC 之中間相且用 PBS (對於來自兩種梯度液之細胞各 50 ml) 洗滌且藉由在室溫下在 $300\times g$ 下離心 10 分鐘收集。用 PBS 使離心塊再懸浮之後，對 PBMC 進行計數且藉由在室溫下在 $200\times g$ 下離心 10 分鐘來洗滌第二次。隨後將細胞再懸浮於適當培養基中以用於後續程序。

對於 PBMC，用於 ADCC 檢定之效應子與標靶之比率為 25:1。在 AIM-V 培養基中以適當濃度製備效應細胞以向圓底 96 孔板中每孔添加 50 μl 。標靶細胞為在含 10% FCS 之 DMEM 中生長之人類 EGFR/IGFR 表現細胞 (例如 H322M、A549 或 MCF-7)。用 PBS 洗滌標靶細胞，計數且以每毫升 300000 個細胞再懸浮於 AIM-V 中以按每微孔 100 μl 添加

30,000個細胞。用 AIM-V 稀釋抗體，以 50 μ l 添加至預先塗布之標靶細胞中且使其在室溫下與標靶結合 10 分鐘。隨後添加效應細胞且在 37°C 下將該培養板在含 5% CO₂ 之濕潤氛圍下培育 4 小時。藉由使用細胞毒性偵測套組 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) 量測受損細胞之乳酸脫氫酶 (LDH) 釋放來評定標靶細胞之殺滅情況。培育 4 小時之後，在 800×g 下離心培養板。將各孔之 100 μ l 上清液轉移至新透明平底 96 孔板中。每孔添加 100 μ l 來自該套組之顏色受質緩衝液。使用 SOFTmax PRO 軟體 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, USA) 於 ELISA 讀取器中在 490 nm 下歷時至少 10 分鐘測定顏色反應之 Vmax 值。量測僅含標靶及效應細胞而無抗體之孔中之自發性 LDH 釋放。測定僅含標靶細胞及 1% Triton X-100 之孔中之最大釋放。如下計算專一性抗體介導之殺滅百分率： $((x-SR)/(MR-SR)*100$ ，其中 x 為在特定抗體濃度下之 Vmax 平均值，SR 為自發性釋放之 Vmax 平均值且 MR 為最大釋放之 Vmax 平均值。

在此等檢定中，亦將 ADCC 能力與經糖基修飾之野生型抗體對比。此等檢定之結果展示經糖基修飾之 XGFR1-3421-GE/XGFR1-4421-GE/XGFR1-5421-GE 之極佳 ADCC 能力 (參見圖 9)。

實例 9

雙重專一性 <EGFR-IGF1R> 抗體 scFab-XGFR1 分子之表現及純化

在帶有原核及真核選擇標記之表現載體中建構相應雙重

專一性抗體之輕鏈及重鏈。在大腸桿菌中擴增此等質體，純化且隨後轉染以在HEK293F細胞中短暫表現重組蛋白(使用Invitrogen之freestyle系統)。7日之後，收集HEK 293細胞上清液，且藉由蛋白A及尺寸排阻層析純化。藉由SDS-PAGE在非還原及還原條件下確證所有雙重專一性抗體構築體之均質性。在還原條件(圖15)下，依據SDS-PAGE，帶有C及N末端scFv融合體之多肽鏈展示類似於所計算分子量之表觀分子尺寸。藉由蛋白A HPLC分析所有構築體之表現量，且其類似於『標準』IgG之表現產量，或在一些情況下略低。在該等未最佳化短暫表現實驗中，平均蛋白質產量在每公升細胞培養物上清液1.5 mg與10 mg蛋白質之間(圖13及14)。

經純化蛋白質之HP-尺寸排阻層析分析展示重組分子之一定程度的凝集趨勢。為解決該等雙重專一性抗體之凝集問題，對額外結合部分之VH與VL之間進行二硫鍵穩定。為此，吾等在scFab之VH及VL內在規定位置(根據Kabat編號方案之位置VH44/VL100)處引入單半胱氨酸置換。此等突變使得VH與VL之間能夠形成穩定鏈間二硫鍵，此轉而穩定所得二硫鍵穩定之scFab模組。在scFab中引入VH44/VL100二硫鍵不會顯著干擾蛋白質表現量且在一些情況下甚至改良表現產量(參見圖13及14)。

藉由根據製造商之說明(Invitrogen, USA)使用FreeStyle™ 293表現系統短暫轉染人類胚腎293-F細胞來表現雙重專一性抗體。簡言之，在37°C /8% CO₂下，於FreeStyle™ 293表

現培養基中培養FreeStyle™ 293-F細胞懸浮液，且在轉染當日，以 $1-2 \times 10^6$ 個活細胞/毫升之密度在新鮮培養基中接種細胞。在Opti-MEM®I培養基(Invitrogen, USA)中使用333 μ l 293fectin™(Invitrogen, Germany)及250 μ g 1:1莫耳比之重鏈及輕鏈質體DNA製備DNA-293fectin™複合物，最終轉染體積為250 ml。轉染後7日藉由在14000 g下離心30分鐘且經由無菌過濾器(0.22 μ m)過濾使含重組抗體衍生物之細胞培養物上清液澄清。將上清液儲存在-20°C下直至純化。

藉由使用蛋白A-Sepharose™(GE Healthcare, Sweden)之親和層析及Superdex200尺寸排阻層析以兩個步驟自上清液純化所分泌之抗體衍生物。簡言之，將含雙重專一性及三重專一性抗體之澄清培養物上清液施加於用PBS緩衝液(10 mM Na₂HPO₄、1 mM KH₂PO₄、137 mM NaCl及2.7 mM KCl, pH 7.4)平衡之HiTrap蛋白A HP(5 ml)管柱上。用平衡緩衝液洗離未結合之蛋白質。用0.1 M檸檬酸鹽緩衝液(pH 2.8)溶離抗體衍生物，且用0.1 ml 1 M Tris(pH 8.5)中和含蛋白質之溶離份。隨後，彙集所溶離之蛋白質溶離份，用Amicon超離心過濾裝置(MWCO: 30 K, Millipore)濃縮至3 ml之體積，且裝載於用20 mM組胺酸、140 mM NaCl(pH 6.0)平衡之Superdex200 HiLoad 120 ml 16/60凝膠過濾管柱(GE Healthcare, Sweden)上。彙集單體抗體溶離份，速凍且儲存在-80°C下。提供部分樣品用於後續蛋白質分析及表徵。圖15及16展示經純化蛋白質之例示性SDS-

PAGE分析及雙重專一性抗體衍生物之HP-尺寸排阻層析(SEC)之概況。

圖13及14列出短暫表現系統中所觀察到之表現產量：所設計之所有抗體衍生物可以足以進一步分析之量表現及純化。每公升上清液之表現產量在小於1 mg至> 30 mg之範圍內。舉例而言，scFab-XGFR1-2720純化之後之最終產量為小於1 mg，而scFab-XGFR1-2721之最終產量為13.8 mg。此差異亦展示VH44-VL100二硫鍵穩定對吾等對於一些蛋白質所觀察到之表現產量的正面影響。

實例10

雙重專一性<EGFR-IGF1R>抗體scFab-XGFR1分子之活體外穩定性

雙重專一性<EGFR-IGF1R>抗體scFab分子之穩定性及凝集趨勢

執行HP尺寸排阻層析分析以測定重組抗體衍生物製劑中所存在之凝集物的量。為此，藉由在UltiMate 3000 HPLC系統(Dionex)上使用Superdex 200分析型尺寸排阻管柱(GE Healthcare, Sweden)進行高效SEC來分析雙重專一性抗體樣品。圖16展示此等分析之一實例。凝集物在含單體抗體衍生物之溶離份之前以獨立峰或肩峰形式出現。對於此研究而言，吾等定義所需『單體』分子由2個重鏈及輕鏈雜二聚物組成，其中scFab與兩者中之任一者連接。藉由NanoElectrospray Q-TOF質譜法在用肽-N-糖苷酶F(Roche Molecular Biochemicals)酶法處理移除N-聚糖之後

確證經還原雙重專一性抗體輕鏈及重鏈及融合蛋白之胺基酸骨架的完整性。不同條件(不同濃度及時間)下經純化蛋白質之HP-尺寸排阻層析分析展示，與正常IgG相比，含有scFab之分子之凝集趨勢略有增加。吾等對於一些分子所觀察到之此凝集趨勢可藉由在scFab模組中引入VH44/VL100鏈間二硫鍵而改善。

實例 11

雙重專一性<EGFR-IGF1R>抗體scFab分子與RTK EGFR及IGF1R之結合

將scFab模組及不同雙重專一性抗體形式scFab-XGFR之全長IgG模組中保留的抗原結合位點的結合與產生結合模組及雙重專一性抗體之『野生型』IgG之結合對比。藉由使用表面電漿共振(Biacore)以及細胞-ELISA進行此等分析。

藉由表面電漿共振(SPR)技術使用Biacore T100儀器(GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala)分析雙重專一性<IGF-1R-EGFR>抗體之結合特性。此系統已經充分確立用於研究分子相互作用。其允許連續即時監測配位體/分析物結合且因此允許在各種檢定配置中測定締合速率常數(k_a)、解離速率常數(k_d)及平衡常數(K_D)。SPR技術係基於量測塗布金之生物感應器晶片表面附近的折射率。折射率之變化指示表面上由經固定配位體與以溶液形式注射之分析物之相互作用所引起的質量變化。若分子結合表面上之經固定配位體，則質量增加，在解離情況下，質量減小。

使用胺偶合化學法將捕捉性抗人類IgG抗體固定在C1生物感應器晶片之表面上。用5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 流速之0.1 M N-羥基丁二醯亞胺與0.1 M 3-(N,N-二甲基胺基)丙基-N-乙基碳化二亞胺之1:1混合物啟動流槽。注射於乙酸鈉(pH 5.0)中之5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗人類IgG抗體，此產生約200 RU之表面密度。以相同方式處理參考對照流槽，但用單獨媒劑緩衝液替代捕捉抗體。藉由注射1 M乙醇胺/HCl(pH 8.5)阻斷表面。用HBS-P稀釋雙重專一性抗體，且以5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流速注射。對於濃度在1 nM與5 nM之間的抗體，接觸時間(締合期)為1分鐘。以1.2、3.7、11.1、33.3、100及300 nM之漸增濃度注射EGFR-ECD，以0.37、1.11、3.33、10、30及90 nM之濃度注射IGF-1R。對於流速為30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之兩種分子，接觸時間(締合期)為3分鐘，解離時間(用操作緩衝液洗滌)為5分鐘。在25°C(標準溫度)下執行所有相互作用。以5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流速各注射0.85%磷酸及5 mM氫氧化鈉之再生溶液60秒以移除各結合循環之後任何未共價結合之蛋白質。以每秒一個信號的速率偵測信號。以漸增濃度注射樣品。

圖 17a-d 展示雙重專一性抗體<IGF-1R-EGFR>抗體與EGFR及IGF1R之例示性同時結合。

表 8：雙重專一性抗體(scFab-XGFR1_2720及scFab-XGFR2_2720)與EGFR及IGF-1R之親和力(KD)

分子	KD值(與EGFR之親和力)	KD值(與IGF-1R之親和力)
scFab-XGFR1_2720	2 nM	2 nM
scFab-XGFR2_2720	0.5 nM	11 nM
<IGF-1R>純系18	n.a.	2 nM
<EGFR> ICR62	0.5 nM	n.a.

亦可使用針對培養細胞的基於FACS之結合及競爭分析評定雙重專一性抗體衍生物與暴露於細胞表面上之RTK的結合能力。圖18展示吾等用於測試含scFab之雙重專一性XGFR衍生物對A549癌細胞之結合能力的實驗設置。為進行此等細胞競爭檢定，分離表現抗原EGFR以及IGF1R之A549細胞且對其進行計數。在錐形96孔板之每孔中接種 1.5×10^5 個細胞。將細胞離心(1500 rpm, 4°C , 5分鐘)，且於冰上在含有1 $\mu\text{g/mL}$ Alexa647標記IGF1R專一性抗體的50 μL 各別雙重專一性抗體於含有2% FCS(胎牛血清)之PBS中的稀釋系列中培育45分鐘。將細胞再次離心且用200 μL 含2% FCS之PBS洗滌兩次。最後，將細胞再懸浮於BD CellFix溶液(BD Biosciences)中且於冰上培育至少10分鐘。藉由流式細胞計量儀(FACS Canto)測定細胞之平均螢光強度(mfi)。對兩次獨立染色至少重複兩次測定Mfi。使用FlowJo軟體(TreeStar)進一步處理流式細胞計量譜。使用XLFit 4.0(IDBS)及劑量反應單位點模型205測定半數最大結合。

此等檢定之結果(展示於圖19a-c中)展示雙重專一性含scFab抗體衍生物對腫瘤細胞表面之結合功能。舉例而言，競爭實驗中雙重專一性抗體衍生物scFab-XGFR1_2721之 IC_{50} 值為0.11 $\mu\text{g/mL}$ ，而單專一性抗體之 IC_{50} 值高50%以上(0.18 $\mu\text{g/mL}$)。競爭檢定中雙重專一性scFab-XGFR_2721衍生物與母抗體相比之此活性增強表明，與單專一性抗體相比，雙重專一性分子與細胞表面之結合較佳。

實例 12

雙重專一性<EGFR-IGF-1R>抗體 scFab-XGFR 分子對 EGFR 以及 IGF-1R 之下調

人類抗 IGF-1R 抗體 <IGF-1R> HUMAB 純系 18(DSM ACC 2587)抑制 IGFR1 信號傳導，且人類化大鼠抗 EGFR 抗體 <EGFR>ICR62 抑制 EGFR 信號傳導。為評估不同 scFab-XGFR1 變異體之潛在抑制活性，分析兩種信號傳導之受體的下調程度。

為偵測本發明抗體對腫瘤細胞中 IGF-I 受體 (IGF-IR) 之量的影響，對 IGF-IR 及 EGFR 專一性抗體執行時程實驗及後續 ELISA 分析。

用每孔 1 ml 於補充有 10% FCS(PAA，目錄號 E15-039)及 1% PenStrep 之 RPMI 1640 中的人類腫瘤細胞 (H322M，每毫升 5×10^5 個細胞)接種 6 孔板。將 3 ml 培養基添加至各孔中，且在 37°C 及 5% CO₂ 下培養細胞 24 小時。

小心地移除培養基，且替換為 2 ml 100 nM 用 RPMI-VM 培養基稀釋之 XGFR 抗體。在對照孔中，將培養基替換為無抗體之培養基及緩衝液及含有對照抗體 (<IGF-1R> HUMAB 純系 18 及 <EGFR>ICR62，最終濃度為 100 nM) 之培養基。在 37°C 及 5% CO₂ 下培育細胞，且 24 小時之後取出個別培養板作進一步處理。

藉由抽吸小心地移除培養基，且用 1 ml PBS 洗滌細胞。每孔添加 300 μ l 冷 MES-溶解緩衝液 (MES、10 mM Na₃VO₄ 及 Complete[®] 蛋白酶抑制劑)。1 小時之後，於冰上使用細

胞刮棒(Corning, 目錄號3010)使細胞分離, 且將孔內容物轉移至Eppendorf反應管中。藉由在13000 rpm及4°C下離心10分鐘移除細胞碎片。

EGFR偵測

根據方案(人類EGFR之DuoSet ELISA, RnD系統, 目錄號DY231)製備96孔微量滴定板(MTP)。用PBS 1:180稀釋144 µg/ml人類EGFR山羊抗體之PBS溶液, 且向MTP中每孔添加100 µl。在室溫下, 於攪拌下培育MTP隔夜。用補充有0.1% Tween[®]20之PBS洗滌培養板3次, 且在室溫(RT)下, 於攪拌下, 用每孔300 µl PBS、3% BSA及0.1% Tween[®]20溶液阻斷1小時(h)。用補充有0.1% Tween[®]20之PBS洗滌培養板3次。

使用BCA蛋白質檢定套組(Pierce)測定細胞溶解物中蛋白質之量, 隨後用補充有100 mM Na₃VO₄(1:100)及Complete[®]蛋白酶抑制劑(1:20)之MES-溶解緩衝液調整細胞溶解物至0.04 mg/ml之蛋白質濃度, 且向預先製備之MTP中每孔添加100 µl溶解物。為進行背景量測, 將100 µl溶解緩衝液添加至MTP之孔中。

使用0.025 mg/ml之第二細胞溶解物濃度(將溶解物1:2稀釋), 且向預先製備之MTP中每孔添加100 µl。在室溫下於攪拌下再培育MTP 2小時, 且隨後用0.1% Tween[®]20溶液洗滌3次。

EGFR之偵測抗體為用PBS、3% BSA及0.2% Tween[®]20 1:180稀釋之36 µg/ml濃度之人類EGFR山羊生物素標記抗

體。每孔添加100 μ l，且在室溫下於攪拌下培育2小時。隨後每孔用200 μ l含有0.1% Tween[®]20溶液之PBS洗滌MTP三次。隨後每孔添加100 μ l用PBS、3% BSA及0.2% Tween[®]20 1:200稀釋之抗生蛋白鏈菌素-HRP，且在室溫下於攪拌下培育20分鐘。隨後用含有0.1% Tween[®]20溶液之PBS洗滌培養板六次。每孔添加100 μ l 3,3'-5,5'-四甲基聯苯胺(Roche, BM-Blue ID號：11484581)，且在室溫下於攪拌下培育20分鐘。藉由每孔添加25 μ l 1 M H₂SO₄且在室溫下再培育5分鐘中止顏色反應。在450 nm下量測吸光度。

IGF-1R偵測

藉由每孔添加100 μ l用PBS、3% BSA及0.2% Tween[®]20 1:200稀釋之生物素標記抗體AK1a(Genmab, Denmark)來製備抗生蛋白鏈菌素-MTP(Roche ID號：11965891001)。在室溫下於攪拌下培育抗生蛋白鏈菌素-MTP 1小時，且隨後每孔用200 μ l含有0.1% Tween[®]20溶液之PBS洗滌三次。

使用BCA蛋白質檢定套組(Pierce)測定細胞溶解物中蛋白質之量，隨後用50 mM Tris(pH 7.4)、100 mM Na₃VO₄(1:100)及Complete[®]蛋白酶抑制劑(1:20)調整細胞溶解物至0.3 mg/ml之蛋白質濃度，且向預先製備之抗生蛋白鏈菌素-MTP中每孔添加100 μ l溶解物。

使用0.15 mg/ml之第二細胞溶解物濃度(將溶解物稀釋)，且向預先製備之抗生蛋白鏈菌素-MTP中每孔添加100 μ l。為進行背景量測，將100 μ l溶解緩衝液添加至抗生蛋白鏈菌素-MTP之孔中。

在室溫下於攪拌下再培育 MTP 1 小時，且隨後用含有 0.1% Tween[®]20 溶液之 PBS 洗滌 3 次。

IGF-1R 之偵測抗體為用 PBS、3% BSA 及 0.2% Tween[®] 1:750 稀釋之人類 IGF-1R β 兔抗體 (Santa Cruz Biotechnology, 目錄號 sc-713)。每孔添加 100 μ l 且在室溫下於攪拌下培育 1 小時。隨後每孔用 200 μ l 含有 0.1% Tween[®]20 溶液之 PBS 洗滌 MTP 三次。隨後添加第二抗體，即用 PBS、3% BSA 及 0.2% Tween[®]20 1:4000 稀釋之兔 IgG-POD (Cell signaling 目錄號 7074)，每孔添加 100 μ l，且在室溫下於攪拌下培育 1 小時。隨後用含有 0.1% Tween[®]20 溶液之 PBS 洗滌培養板六次。每孔添加 100 μ l 3,3'-5,5'-四甲基聯苯胺 (Roche, BM-Blue ID 號：11484581)，且在室溫下於攪拌下培育 20 分鐘。藉由每孔添加 25 μ l 1 M H₂SO₄ 且在室溫下再培育 5 分鐘中止顏色反應。在 450 nm 下量測吸光度。

圖 20 及 21 展示 H322M 細胞中雙重專一性含 scFab XGFR 分子與母單專一性抗體 <EGFR>ICR62 及 <IGF-1R> HUMAB 純系 18 相比之受體下調偵測結果。雙重專一性抗體 scFab-XGFR 下調 EGFR 以及 IGF1R。此表明結合模組的全部功能 (生物學功能) 及表型介導得以保留。圖 21 亦表明，雙重專一性抗體 scFab-XGFR_2720 意外地展示與單獨母 <EGFR>ICR62 抗體相比改良之 EGFR 下調。

當以相同莫耳濃度用於相同檢定時，與野生型抗體相比含 scFab XGFR1 變異體展示相同或較佳活性，由此表明 scFab-XGFR1 分子能夠干擾兩條信號路徑。

實例 13**scFab-XGFR1及scFab-XGFR2介導之活體外腫瘤細胞株生長抑制**

人類抗IGF-1R抗體<IGF-1R> HUMAB純系18(DSM ACC 2587)抑制表現IGF1R之腫瘤細胞株生長(WO 2005/005635)。以類似方式，人類化大鼠抗EGFR抗體<EGFR>ICR62展示抑制表現EGFR之腫瘤細胞株生長(WO 2006/082515)。為評估不同scFab-XGFR1變異體在腫瘤細胞株生長檢定中之潛在抑制活性，分析表現EGFR以及IGF1R之H322M細胞中的抑制程度。

在塗布poly-HEMA(聚(甲基丙烯酸2-羥基乙酯))以防止黏附至塑膠表面之培養皿上在補充有10% FCS培養基之RPMI 1640培養基中培養H322M細胞(每孔5000個細胞)。在此等條件下，H322M細胞形成以三維方式生長(稱作固著非依賴性之特性)之緻密球形。此等球形極類似於原位實體腫瘤之三維組織架構及組織。將球形培養物在100 nM抗體存在下培育7日。使用Celltiter Glow發光檢定量測生長抑制。當用<IGF-1R> HUMAB純系18處理H322M球形培養物時，可觀察到生長抑制。

圖22展示使用100 nM <IGF-1R> HUMAB純系18使細胞生長減少72%，且在相同檢定中使用100 nM <EGFR>ICR62使細胞生長減少77%。同時使用兩種抗體(均以100 nM之相同濃度)使細胞存活率完全減少(100%抑制)。此表明同時干擾兩條RTK路徑與僅干擾一條路徑相比對腫瘤細胞株具

有較大影響。使用100 nM莫耳濃度之各種scFab-XGFR1變異體產生較高生長抑制，該生長抑制比僅用單一分子所觀察到之生長抑制顯著。實際上，在100 nM之抗體濃度下，各種scFab-XGFR1變異體展示完全(100%)抑制細胞生長，而使用單一模組僅產生部分抑制。

吾等推斷，與僅干擾EGFR信號傳導或IGF1R信號傳導之IgG相比，scFab-XGFR1分子具有大大增強之生長抑制活性。

實例 14

雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (VH/VL)(VH/VL域交換)或Cross-Mab (CH/CL)(CH/CL域交換)的表現及純化

類似於實例1及9中所述之程序表現及純化雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (VH/VL)(如WO 2009/080252所述，VH/VL交換)及Cross-Mab (CH/CL)(如WO 2009/080253所述，CH/CL交換)。兩種雙重專一性<EGFR-IGF-1R>抗體均基於SEQ ID NO:8之重鏈可變域及SEQ ID NO:10之輕鏈可變域(源自人類化<EGFR>ICR62)作為結合EGFR之第一抗原結合位點，且基於SEQ ID NO:23之重鏈可變域及SEQ ID NO:25之輕鏈可變域(源自人類抗IGF-1R抗體<IGF-1R> HUMAB純系18(DSM ACC 2587))作為結合IGF-1R之第二抗原結合位點。

藉由使用蛋白A-Sepharose™(GE Healthcare, Sweden)之親和層析及Superdex200尺寸排阻層析純化之後，Cross-Mab

(VH/VL)之表現產量為 29.6 mg/L 且 Cross-Mab (CH/CL)之表現產量為 28.2 mg/L。

相應雙重專一性抗體之相關完整(部分經修飾)輕鏈及重鏈胺基酸序列以 SEQ ID NO:30-33(Cross-Mab (VH/VL))及 SEQ ID NO:34-37(Cross-Mab (CH/CL))給出。

實例 15

雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子 Cross-Mab (VH/VL)或 Cross-Mab (CH/CL)對 EGFR 以及 IGF-1R 之下調

類似於實例 12，測定實例 14 之雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子 Cross-Mab (VH/VL)(VH/VL 交換)及 Cross-Mab (CH/CL)(CH/CL 交換)對 H322M 腫瘤細胞上 EGFR 以及 IGF-1R 之下調。

雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體 Cross-Mab (VH/VL)及 Cross-Mab (CH/CL)對 EGFR 之下調在與單專一性<EGFR>ICR62 之下調(約 41%；在 9.38 微克蛋白質/毫升下)相比時類似(Cross-Mab (VH/VL)約 41%)或略高(Cross-Mab (VH/VL)約 49%)。

雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體 Cross-Mab (VH/VL)及 Cross-Mab (CH/CL)對 IGF-1R 之下調在與單專一性<IGF-1R> HUMAB 純系 18 之下調(約 85%；在 75 微克蛋白質/毫升下)相比時意外地顯著較低(Cross-Mab (VH/VL)約 17%)(Cross-Mab (VH/VL)約 20%)。

實例 16

雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子 Cross-Mab

**(VH/VL)或Cross-Mab (CH/CL)對H322M腫瘤細胞株之活體外
腫瘤生長抑制**

類似於實例13，測定實例14之雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (VH/VL)(VH/VL交換)及Cross-Mab (CH/CL)(CH/CL交換)對H322M腫瘤細胞之腫瘤生長抑制。

在100 nM下，單專一性抗體<IGF-1R> HUMAB純系18使細胞生長減少75%，且使用100 nM <EGFR>ICR62使細胞生長減少89%。

同時使用兩種抗體(均以100 nM之相同濃度，此使得抗體濃度總共為200 nM)使細胞存活率完全減少(≥100%抑制)。

雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (VH/VL)及Cross-Mab (CH/CL)(以僅100 nM之濃度)各展示亦分別完全(≥100%)抑制細胞生長。

此表明本發明之雙重專一性抗體可以低於相應單專一性母抗體之組合的抗體濃度完全抑制腫瘤細胞生長，而單獨單專一性母抗體僅產生部分抑制。

實例17

**雙重專一性二價ScFab-Fc融合<EGFR-IGF1R>抗體分子
scFab-Fc的表現及純化**

類似於實例1及9中所述之程序表現及純化雙重專一性二價ScFab-Fc融合<EGFR-IGF1R>抗體scFab-Fc。此雙重專一性<EGFR-IGF-1R>抗體亦基於SEQ ID NO:8之重鏈可變域

及SEQ ID NO:10之輕鏈可變域(源自人類化<EGFR>ICR62)作為結合EGFR之第一抗原結合位點，且基於SEQ ID NO:23之重鏈可變域及SEQ ID NO:25之輕鏈可變域(源自人類抗IGF-1R抗體<IGF-1R> HUMAB純系18(DSM ACC 2587))作為結合IGF-1R之第二抗原結合位點。

藉由使用蛋白A-Sepharose™(GE Healthcare, Sweden)之親和層析及Superdex200尺寸排阻層析純化之後，scFab-Fc之表現產量為29.7 mg/L。

表10：表現及純化之後雙重專一性二價ScFab-Fc融合<EGFR-IGF1R>抗體分子scFab-Fc的產量

上清液	蛋白A		SEC	
	產量	Mono.	產量	Mono.
1.0 L	32.5 mg	88%	29.7 mg	100%

雙重專一性抗體scFab-Fc之完整(經修飾)重鏈胺基酸序列以SEQ ID NO:38-39給出。

實例18

雙重專一性二價ScFab-Fc融合<EGFR-IGF1R>抗體分子的表現及純化

類似於實例12，測定實例17之雙重專一性二價ScFab-Fc融合<EGFR-IGF1R>抗體所產生的對H322M腫瘤細胞上的EGFR以及IGF-1R的下調。

實例19

雙重專一性二價ScFab-Fc融合<EGFR-IGF1R>抗體分子對腫瘤細胞株之活體外腫瘤生長抑制

類似於實例13測定實例17之雙重專一性二價ScFab-Fc融合 <EGFR-IGF1R> 抗體對H322M腫瘤細胞之腫瘤生長抑制。

實例20

正位A549異種移植模型中的存活分析

細胞培養

最初自ATCC獲得A549腺癌細胞(NSCLC)，且在擴增之後存放於內部細胞庫中。將腫瘤細胞株在37°C下於水飽和氛圍中在5% CO₂下於補充有10%胎牛血清(Invitrogen, Switzerland)及2 mM L-麩胺醯胺(GIBCO, Switzerland)之DMEM培養基(GIBCO, Switzerland)中常規培養。每隔三日用胰蛋白酶/EDTA 1×(GIBCO, Switzerland)裂解執行培養物繼代。使用第10代進行注射。

動物

將SCID米色雌性小鼠(實驗開始時8-9週齡)(購自Charles River, Sulzfeld, Germany)飼養於無特定病原體之條件下，根據指定準則(GV-Solas; Felasa; TierschG)每日進行12小時光照/12小時黑暗之循環。實驗研究方案經地方政府審查且批准(P 2005086)。動物到達後，將其飼養1週以習慣於新環境且進行觀察。常規進行連續健康監視。

腫瘤細胞注射

在注射當日，使用胰蛋白酶-EDTA(Gibco, Switzerland)自培養燒瓶(Greiner Bio-One)收集A549腫瘤細胞，且轉移至50 ml培養基中，洗滌一次，且再懸浮於AIM V(Gibco,

Switzerland)中。再用 AIM V 洗滌之後，使用細胞計數器測定細胞濃度。為注射 A549 細胞，調整最終力價為 5.0×10^6 個細胞/毫升。隨後使用 1.0 ml 結核菌素注射器(BD Biosciences, Germany)將 200 μ l 此混合物注入小鼠之側尾靜脈中。

處理

在腫瘤細胞接種之後兩週開始動物處理，每組 10 個動物。每週一次以指定劑量經由靜脈內注射投與雙重專一性抗 EGFR/抗 IGF1R 抗體 XGFR1-4421 GE、XGFR1-2421 GE、XGFR1-3421 GE、<EGFR>ICR62 GE、<IGF-1R> HUMAB 純系 18 及相應媒劑。投與月劑量直至實驗結束。使用前自儲備液新鮮製備抗體稀釋液。

表 11：正位 A549 異種移植模型中存活分析之研究設計

組	動物數	化合物	劑量 mg/kg	投藥途徑/模式	處理次數
1	10	媒劑(+兩種探測物 (2 scouts))	-	靜脈內注射	3
2	10	<EGFR>ICR62 GE 及<IGF-1R> HUMAB純系18	10 mg/kg + 10 mg/kg	靜脈內注射	3
3	10	XGFR1-4421 GE	13.6 mg/kg	靜脈內注射	3
4	10	XGFR1-2421 GE	13.6 mg/kg	靜脈內注射	3
5	10	XGFR1-3421 GE	13.6 mg/kg	靜脈內注射	3
6	6	<EGFR>ICR62 GE	25 mg/kg	靜脈內注射	3

GE=糖基工程改造

監視

每日控制動物之臨床症狀且偵測副作用，亦即呼吸窘迫、運動障礙及毛皮受損(scruffy fur)。研究之動物排除標準在相應方案特許證中描述且批准。

鑑別/分期

在分期時隨機分布小鼠。將動物安置於M3尺寸籠中。

剖檢

根據終止準則(毛皮受損、弓背、運動障礙)處死小鼠。收集所有動物之肺腫瘤進行後續組織病理學分析(PFA，冷凍)。

存活分析

存活數據含有直至特定事件發生的持續時間，且有時稱作事件發生時間數據。事件可例如為患者死亡。若事件在觀察結果之研究結束之前未發生或在研究對象在事件發生之前脫離研究時，觀察結果稱為設限(censored)結果。精確存活時間未知，但已知其大於規定值。

存活數據需要用特定方法分析，因為其具有特定非常態分布，如指數或韋伯(Weibull)分布。此外，在不偏離分析的情況下，不能忽略設限觀察結果。

卡普蘭-梅兒曲線(Kaplan-Meier curves)提供一或多組右設限數據之存活函數之估算。

表 12：分位數匯總：中值存活

組	中值存活時間
媒劑	68
<EGFR>ICR62 GE	136
<EGFR>ICR62 GE及<IGF-1R> HUMAB純系18	207
XGFR1-4421 GE	212
XGFR1-2421 GE	207
XGFR1-3421 GE	212

GE=糖基工程改造

分位數表展示中值存活時間。由表Y可見，用雙重專一

性 <EGFR-IGF1R> 抗體 XGFR1-4421 GE、XGFR1-2421 GE、XGFR1-3421 GE處理之中值存活時間(以天計)在與用單專一性 <EGFR>ICR62 GE處理相比時較長，且在與用 <EGFR>ICR62 GE與 <IGF-1R> HUMAB純系18之組合處理相比時較長或至少相同。

【圖式簡單說明】

圖 1 本發明之結合 EGFR 及 IGF-1R 之雙重專一性抗體的一四價實施例的示意性結構，其中抗原 A 或 B 中之一者為 EGFR，而另一者為 IGF-1R。該結構係基於結合抗原 A 之全長抗體與結合抗原 B 之兩個(視情況經二硫鍵穩定)單鏈 Fv 經由肽連接子連接。

圖 2 本發明之結合 EGFR 及 IGF-2R 之雙重專一性抗體的四個可能四價實施例 A 至 D 的示意性結構，其中抗原 A 或 B 中之一者為 EGFR，而另一者為 IGF-1R。該結構係基於結合抗原 A 之全長抗體與結合抗原 B 之兩個(視情況經二硫鍵穩定)單鏈 Fv 經由肽連接子在以下位置連接：

A：全長抗體重鏈之 C 末端

B：全長抗體重鏈之 N 末端

C：全長抗體輕鏈之 C 末端

D：全長抗體輕鏈之 C 末端。

圖 3 3a：經純化雙重專一性抗體 XGFR1-2421 之 SDS-PAGE；

3b：經純化雙重專一性抗體 XGFR1-2421(3 mg/ml)

之HP-尺寸排阻層析(SEC)分析；

3c：經純化雙重專一性抗體XGFR1-2421(1 mg/ml)之HP-尺寸排阻層析(SEC)分析。

圖 4 **4a**：雙重專一性抗體XGFR1-2320(未經二硫鍵穩定)之HP-尺寸排阻層析(SEC)純化(8.7%凝集物)；

4b：雙重專一性抗體XGFR1-2321(經二硫鍵穩定)之HP-尺寸排阻層析(SEC)純化(0%凝集物)。

圖 5 雙重專一性抗EGFR/抗IGF-1R抗體(XGFR1-2320)在使用經固定XGFR1-2320之Biacore檢定中與EGFR及IGF1R的同時結合。

圖 6 雙重專一性抗體對A549 NSCLC腫瘤細胞株中IGFR(**6a**)及EGFR(**6b**)之下調。

圖 7 雙重專一性抗EGFR/抗IGF-1R抗體分子(XGFR)對H322M NSCLC腫瘤細胞株中IGF-1R磷酸化(**7a**)及EGFR磷酸化(**7b**)之抑制。

7a：H322M NSCLC腫瘤細胞中用各種雙重專一性抗體XGFR分子及其母抗體抑制之後的磷酸化IGF-1R-ELISA，抗體濃度係關於培育，在用IGF1/EGF刺激的情況下，抗體濃度稀釋至原始濃度之一半；

7b：H322M NSCLC腫瘤細胞中用各種雙重專一性抗體XGFR分子及其母抗體抑制之後的磷酸化EGF-R-ELISA，抗體濃度係關於培育，在用IGF1/EGF刺激的情況下，抗體濃度稀釋至原始

濃度之一半。

圖 8 雙重專一性抗 EGFR/抗 IGF-1R 抗體分子 (XGFR) 及其母抗體對表現 EGFR 及 IGF-1R 之 H322M NSCLC 腫瘤細胞株之抗腫瘤生長抑制。

圖 9 雙重專一性抗 EGFR/抗 IGF-1R 抗體分子 (XGFR) 之活體外 ADCC 活性。

圖 10 無 CH4 域，專一性結合 EGFR 或 IGF1-R，具有包含典型次序之可變域及恆定域的兩個重鏈及輕鏈對的全長抗體的示意性結構。

圖 11 專一性結合例如 EGFR 或 IGF1-R 之四種可能單鏈 Fab 片段之示意性結構。

圖 12 本發明四價雙重專一性抗體 (scFab-XGFR 分子) 之示意性結構，其包含專一性結合兩種抗原 EGFR 或 IGF1-R 中之一者的全長抗體及專一性結合兩種抗原 EGFR 或 IGF1-R 中之另一者的兩個單鏈 Fab。

圖 13 本發明之包含專一性結合 IGF-1R 之全長抗體及專一性結合 EGFR 之兩個相同單鏈 Fab 的雙重專一性抗體 **ScFab-XGFR1** 分子 A、B、C 及 D 及純化之後的表現量

A：scFab(VH-CH1-連接子-VL-CL)與重鏈之 C 末端融合

B：scFab(VH-CH1-連接子-VL-CL，具有額外 VH44-VL100 二硫橋)與重鏈之 C 末端融合融合

C：scFab(VH-CH1-連接子-VL-CL)與輕鏈之 C 末

端融合

D：scFab(VH-CH1-連接子-VL-CL，具有額外VH44-VL100二硫橋)與輕鏈之C末端融合。

圖 14 本發明之包含專一性結合EGFR之全長抗體及專一性結合IGF-1R之兩個相同單鏈Fab的雙重專一性抗體 **ScFab-XGFR2** 分子 A、B、C及D

A：scFab(VH-CH1-連接子-VL-CL)與重鏈之C末端融合

B：scFab(VH-CH1-連接子-VL-CL，具有額外VH44-VL100二硫橋)與重鏈之C末端融合

C：scFab(VH-CH1-連接子-VL-CL)與輕鏈之C末端融合

D：scFab(VH-CH1-連接子-VL-CL，具有額外VH44-VL100二硫橋)與輕鏈之C末端融合。

圖 15 含單鏈 Fab 之雙重專一性抗體衍生物 scFab-XGFR1 的 SDS-PAGE 分析

1：scFab-XGFR1_4720(未經還原)

2：scFab-XGFR1_4721(未經還原)

3：scFab-XGFR1_4720(經還原)

4：scFab-XGFR1_4721(經還原)。

圖 16 含scFab之雙重專一性抗體衍生物 scFab-XGFR1 的 HP-SEC 分析

圖 16a：scFab-XGFR1-4720；7.7%凝集物(標記於方框內)

圖 16b : scFab-XGFR1-4721 ; 3.5%凝集物(標記於方框內)。

圖 17 scFab-XGFR1 及 scFab-XGFR2 與 EGFR 及 IGF1R 之結合

圖 17a : Biacore 圖 : scFab-XGFR1_2720 與 EGFR 之結合 , KD=2 nM

圖 17b : Biacore圖 : scFab-XGFR1_2720 與 IGF-1R 之結合 , KD=2 nM

圖 17c : Biacore 圖 : scFab-XGFR2_2720 與 EGFR 之結合 , KD=0.5 nM

圖 17d : Biacore圖 : scFab-XGFR2_2720 與 IGF-1R 之結合 , KD=11 nM。

圖 18 圖解 - 由 FACS 競爭檢定用以下通用程序分析之 scFab-XGFR 與細胞之結合 :

-- 同時添加用 Alexa647(1 $\mu\text{g/mL}$) 標記之 <IGF1R> Mab+ 未標記之 scFab-XGFR(100 $\mu\text{g/mL}$ -0.001 $\mu\text{g/mL}$)

-- 於冰上培育45分鐘，洗滌且移除未結合之抗體

-- 用 1% HCHO 固定，隨後進行 FACS。

圖 19 由 FACS 競爭檢定分析之 scFab-XGFR_2721 及母 <IGF1R> 純系 18 與細胞之結合

圖 19a : <IGF-1R> 純系 18(0.18 $\mu\text{g/ml}$) 及 scFab-XGFR_2721(0.15 $\mu\text{g/ml}$) 之 IC₅₀ 值對比

圖 19b : <IGF-1R> 純系 18 之結合曲線(拐點為 0.11

$\mu\text{g/ml}$)，y軸=RLU；x軸為抗體濃度($\mu\text{g/ml}$)

圖 19c：scFab-XGFR_2721之結合曲線(拐點為0.10 $\mu\text{g/ml}$)，y軸=RLU；x軸為抗體濃度($\mu\text{g/ml}$)。

圖 20 與不同雙重專一性抗EGFR/抗IGF-1R抗體分子(scFab-XGFR；100 nM)一起培育24小時之後，H322M細胞上IGF1-R之下調。

圖 21 與不同雙重專一性抗EGFR/抗IGF-1R抗體分子(scFab-XGFR；100 nM)一起培育24小時之後，H322M細胞上EGFR之下調。

圖 22 不同雙重專一性抗EGFR/抗IGF-1R抗體分子(scFab-XGFR；100 nM)對H322M細胞增殖之抑制。

序列表

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司
<120> 雙重專一性抗EGFR/抗IGF-1R抗體
<130> 25393
<140> 098132098
<141> 2009/09/23
<150> EP 08016952.7
<151> 2008-09-26
<150> EP 09004908.1
<151> 2009-04-02
<160> 39
<170> PatentIn version 3.2
<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR3，人類化<EGFR>ICR62
<400> 1

Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala
1 5 10

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR2，人類化<EGFR>ICR62

<400> 2

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR1，人類化<EGFR>ICR62

<400> 3

Asp Tyr Lys Ile His
1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR3，人類化<EGFR>ICR62

<400> 4

Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR2，人類化<EGFR>ICR62

<400> 5

Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr
1 5

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR1，人類化<EGFR>ICR62

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈可變域，人類化<EGFR>ICR62-I-HHB

<400> 7

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈可變域，人類化<EGFR>ICR62-I-HHD

<400> 8

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈可變域，人類化<EGFR>ICR62-I-KA

<400> 9

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 Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈可變域，人類化<EGFR>ICR62-I-KC

<400> 10

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	Gln	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr
			20					25					30		

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

Tyr	Asn	Thr	Asn	Asn	Leu	Gln	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

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

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

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr
			100					105			

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR3，<IGF-1R> HUMAB純系18

<400> 11

Glu	Leu	Gly	Arg	Arg	Tyr	Phe	Asp	Leu
1				5				

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR2，<IGF-1R> HUMAB純系18

<400> 12

Ile	Ile	Trp	Phe	Asp	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Arg
1				5					10					15	

Gly

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈CDR1，<IGF-1R> HUMAB純系18

<400> 13

Ser Tyr Gly Met His
 1 5

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR3，<IGF-1R> HUMAB純系18

<400> 14

Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro Trp Thr
 1 5 10

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR2，<IGF-1R> HUMAB純系18

<400> 15

Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr
 1 5

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR1，<IGF-1R> HUMAB純系18

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR3，<IGF-1R> HUMAB純系22
<400> 17

Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu
1 5

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR2，<IGF-1R> HUMAB純系22
<400> 18

Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR1，<IGF-1R> HUMAB純系22
<400> 19

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈CDR3，<IGF-1R> HUMAB純系22
<400> 20

Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro Trp Thr
1 5 10

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈CDR2, <IGF-1R> HUMAB純系22

<400> 21

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈CDR1, <IGF-1R> HUMAB純系22

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 23
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 23

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

Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
100 105 110

Leu Val Ser Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

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

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
20 25 30

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

Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

201019960

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys
100 105

<210>	26
<211>	108
<212>	PRT
<213>	智人

<400> 26

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 27
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 27

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 210 215 220		
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu 225 230 235 240		
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 245 250 255		
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn 260 265 270		
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe 275 280 285		
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn 290 295 300		
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 305 310 315 320		
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 325 330		
<210> 28		
<211> 327		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 28		
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg 1 5 10 15		
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr 20 25 30		
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser 35 40 45		
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 50 55 60		
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr		

201019960

65	70	75	80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	85	90	95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro	100	105	110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	115	120	125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	130	135	140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp	145	150	155
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe	165	170	175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	180	185	190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu	195	200	205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	210	215	220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys	225	230	235
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	245	250	255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys	260	265	270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser	275	280	285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser	290	295	300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 29
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 29

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 30
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (VH/VL)之重鏈1

<400> 30

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

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

20

25

30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 31
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (VH/VL)之重鏈2

<400> 31

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys Ser Ser Ala Ser
100 105 110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
115 120 125

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
180 185 190

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
305 310 315 320

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
385 390 395 400

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 32

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (VH/VL)之輕鏈1

<400> 32

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 Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 33
<211> 225
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> 雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (VH/VL)之輕鏈2

<400> 33

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

Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
100 105 110

Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
115 120 125

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
130 135 140

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
145 150 155 160

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
165 170 175

201019960

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
180 185 190

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
195 200 205

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
210 215 220

Cys
225

<210> 34
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (CH/CL)之重鏈1

<400> 34

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala		
130						135					140						
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser		
145					150					155					160		
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val		
				165					170					175			
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro		
			180					185					190				
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys		
		195					200					205					
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp		
	210					215					220						
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly		
225					230					235					240		
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile		
				245					250					255			
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu		
			260					265						270			
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His		
		275					280					285					
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg		
	290					295					300						
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys		
305					310					315					320		
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu		
				325					330					335			
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr		
			340					345					350				
Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu		

355

360

365

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 35
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (CH/CL)之重鏈2

<400> 35

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

Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

85

90

95

Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
 115 120 125

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
 130 135 140

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
 145 150 155 160

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 165 170 175

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 180 185 190

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
 195 200 205

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 36

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (CH/CL)之輕鏈1

<400> 36

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 Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 37

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 雙重專一性二價域交換<EGFR-IGF1R>抗體分子Cross-Mab (CH/CL)之輕鏈2

<400> 37

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

201019960

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys Ser Ser Ala Ser
100 105 110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
115 120 125

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
180 185 190

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 38

<211> 695

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 雙重專一性二價scFab-Fc融合<EGFR-IGF1R>抗體分子scFab-Fc之重鏈1

<400> 38

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 Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 210 215 220

201019960

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
245 250 255

Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe
260 265 270

Thr Phe Thr Asp Tyr Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
275 280 285

Cys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr
290 295 300

Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser
305 310 315 320

Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
325 330 335

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met
340 345 350

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
355 360 365

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
370 375 380

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
385 390 395 400

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
405 410 415

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
420 425 430

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
435 440 445

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
450 455 460

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
465 470 475 480

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
485 490 495

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
500 505 510

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
515 520 525

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
530 535 540

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
545 550 555 560

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
565 570 575

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
580 585 590

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys
595 600 605

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
610 615 620

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
625 630 635 640

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
645 650 655

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
660 665 670

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
675 680 685

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

690

695

<210> 39
 <211> 695
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 雙重專一性二價scFab-Fc融合<EGFR-IGF1R>抗體分子scFab-Fc之重鏈2

<400> 39

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

180					185					190					
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys
		195					200					205			
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
	210					215					220				
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
225					230					235					240
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gln	Val	Glu	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly
				245					250					255	
Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Gln	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser
			260					265					270		
Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro
		275					280					285			
Gly	Lys	Cys	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Ile	Ile	Trp	Phe	Asp	Gly	Ser	Ser
	290					295					300				
Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Arg	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp
305					310					315					320
Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu
				325					330					335	
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Glu	Leu	Gly	Arg	Arg	Tyr	Phe
			340					345					350		
Asp	Leu	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
		355					360					365			
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser
	370					375					380				
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu
385					390					395					400
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
				405					410					415	

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 420 425 430

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 435 440 445

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 450 455 460

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 465 470 475 480

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 485 490 495

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 500 505 510

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 515 520 525

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 530 535 540

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 545 550 555 560

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 565 570 575

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 580 585 590

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 595 600 605

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 610 615 620

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 625 630 635 640

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
 645 650 655

201019960

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
660 665 670

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
675 680 685

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695

...

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 98132098

※申請日： 98.9.23

※IPC 分類：~~C12N~~ A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

雙重專一性之抗-EGFR/抗-IGF-1R抗體

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

BISPECIFIC ANTI-EGFR/ANTI-IGF-1R ANTIBODIES

二、中文發明摘要：

本發明係關於針對EGFR且針對IGF-1R之雙重專一性抗體、其產生方法、含有該等抗體之醫藥組合物及其用途。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to bispecific antibodies against EGFR and against IGF-1R, methods for their production, pharmaceutical compositions containing said antibodies, and uses thereof.

七、申請專利範圍：

1. 一種與EGFR及IGF-1R結合之雙重專一性抗體，其包含與EGFR結合之第一抗原結合位點及與IGF-1R結合之第二抗原結合位點，特徵在於
 - i) 該等抗原結合位點各為一對抗體重鏈可變域與抗體輕鏈可變域；
 - ii) 該第一抗原結合位點包含SEQ ID NO:1之CDR3區、SEQ ID NO:2之CDR2區及SEQ ID NO:3之CDR1區在該重鏈可變域中，及SEQ ID NO:4之CDR3區、SEQ ID NO:5之CDR2區及SEQ ID NO:6之CDR1區在該輕鏈可變域中；及
 - iii) 該第二抗原結合位點包含SEQ ID NO:11之CDR3區、SEQ ID NO:12之CDR2區及SEQ ID NO:13之CDR1區在該重鏈可變域中，及SEQ ID NO:14之CDR3區、SEQ ID NO:15之CDR2區及SEQ ID NO:16之CDR1區在該輕鏈可變域中；
或該第二抗原結合位點包含SEQ ID NO:17之CDR3區、SEQ ID NO:18之CDR2區及SEQ ID NO:19之CDR1區在該重鏈可變域中，及SEQ ID NO:20之CDR3區、SEQ ID NO:21之CDR2區及SEQ ID NO:22之CDR1區在該輕鏈可變域中。
2. 如請求項1之雙重專一性抗體，其特徵在於
 - i) 該第一抗原結合位點包含SEQ ID NO:1之CDR3區、SEQ ID NO:2之CDR2區及SEQ ID NO:3之CDR1區在

該重鏈可變域中，及SEQ ID NO:4之CDR3區、SEQ ID NO:5之CDR2區及SEQ ID NO:6之CDR1區在該輕鏈可變域中；及

- ii) 該第二抗原結合位點包含SEQ ID NO:11之CDR3區、SEQ ID NO:12之CDR2區及SEQ ID NO:13之CDR1區在該重鏈可變域中，及SEQ ID NO:14之CDR3區、SEQ ID NO:15之CDR2區及SEQ ID NO:16之CDR1區在該輕鏈可變域中。

3. 如請求項1之雙重專一性抗體，其特徵在於

- i) 該第一抗原結合位點包含SEQ ID NO:1之CDR3區、SEQ ID NO:2之CDR2區及SEQ ID NO:3之CDR1區在該重鏈可變域中，及SEQ ID NO:4之CDR3區、SEQ ID NO:5之CDR2區及SEQ ID NO:6之CDR1區在該輕鏈可變域中；及
- ii) 該第二抗原結合位點包含SEQ ID NO:17之CDR3區、SEQ ID NO:18之CDR2區及SEQ ID NO:19之CDR1區在該重鏈可變域中，及SEQ ID NO:20之CDR3區、SEQ ID NO:21之CDR2區及SEQ ID NO:22之CDR1區在該輕鏈可變域中。

4. 如請求項1之雙重專一性抗體，其特徵在於

- i) 該第一抗原結合位點包含SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8為重鏈可變域，及包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10為輕鏈可變域，
- ii) 該第二抗原結合位點包含SEQ ID NO:23或SEQ ID

NO:24為重鏈可變域，及包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:26為輕鏈可變域。

5. 如請求項1之雙重專一性抗體，其特徵在於
 - i) 該第一抗原結合位點包含SEQ ID NO:8為重鏈可變域及包含SEQ ID NO:10為輕鏈可變域，
 - ii) 該第二抗原結合位點包含SEQ ID NO:23為重鏈可變域及包含SEQ ID NO:25為輕鏈可變域。
6. 如請求項1至5中任一項之雙重專一性抗體，其特徵在於該抗體為二價、三價或四價。
7. 如請求項1至5中任一項之雙重專一性抗體，其特徵在於該抗體在Asn297經一個糖鏈糖基化，其中該糖鏈內海藻糖之量為65%或65%以下。
8. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至7中任一項之雙重專一性抗體。
9. 如請求項8之醫藥組合物，其係用於治療癌症。
10. 如請求項1至5中任一項之雙重專一性抗體，其係用於治療癌症。
11. 一種如請求項1至7中任一項之雙重專一性抗體之用途，其係用於製造治療癌症之藥物。

八、圖式：

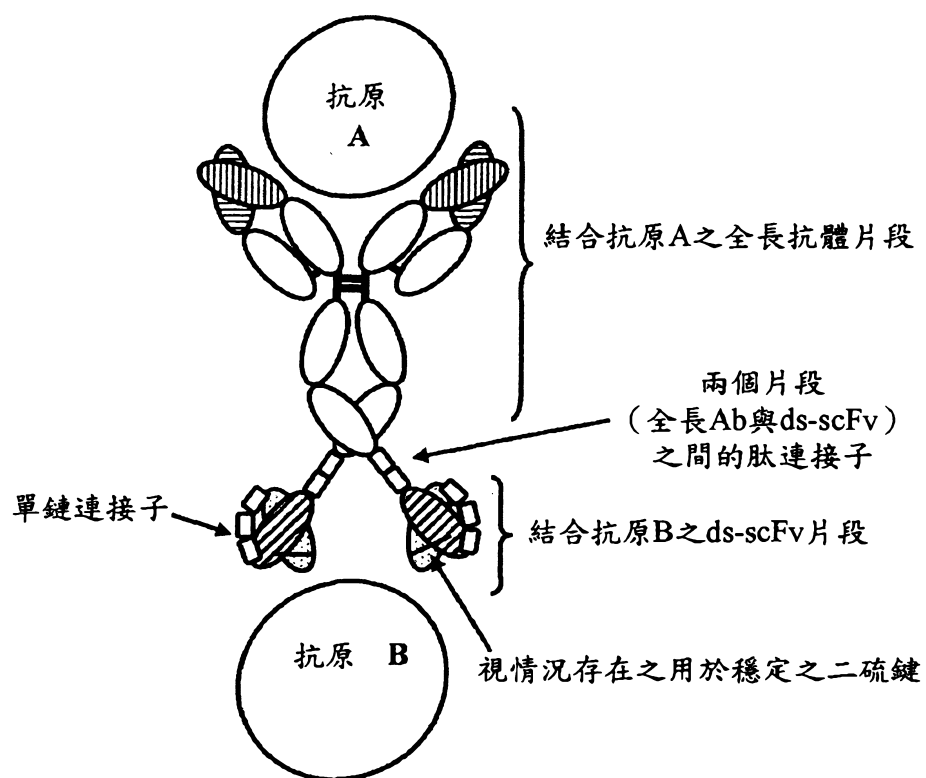


圖1

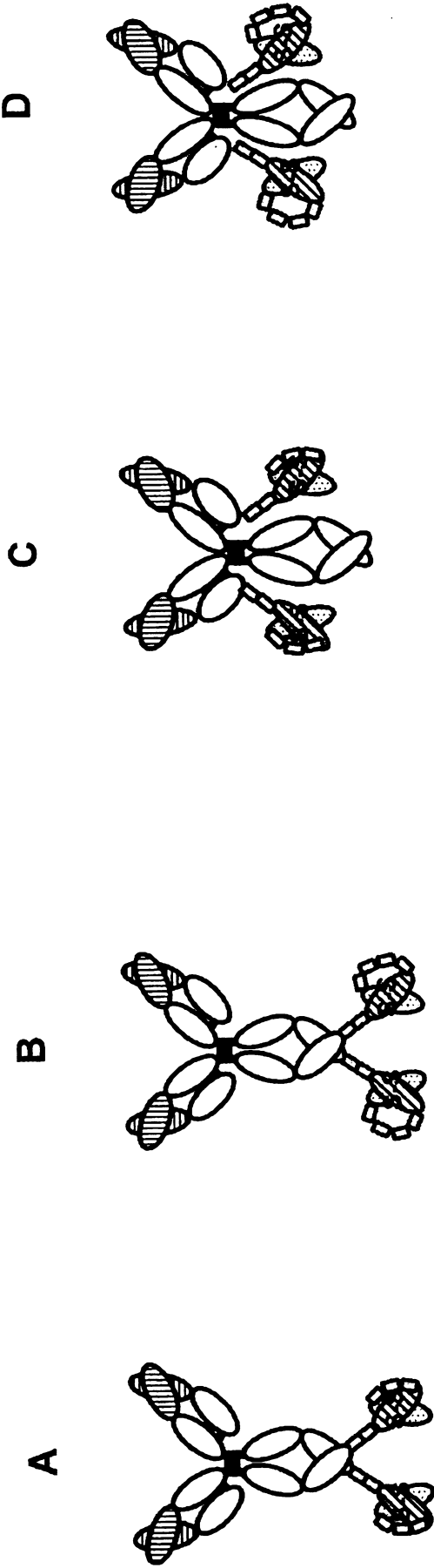
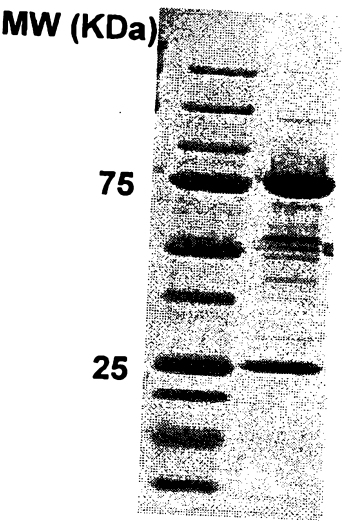
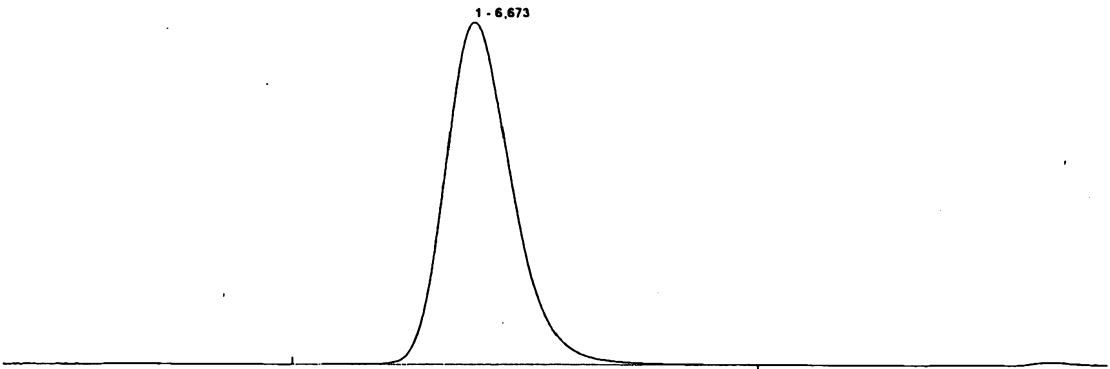


圖2

a)



b)



c)

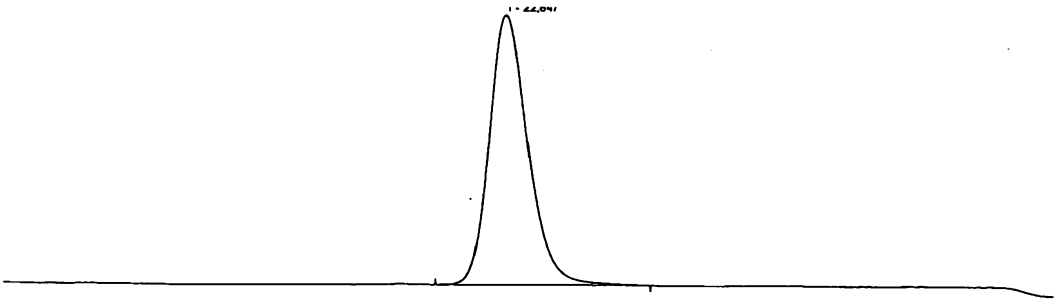
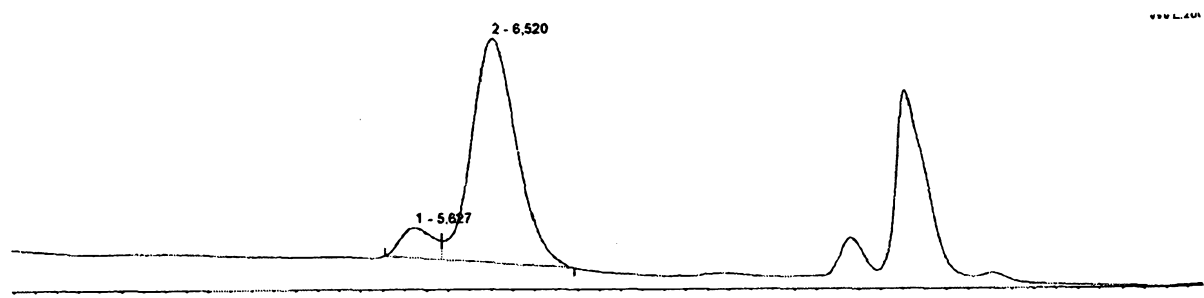


圖3

a)



b)

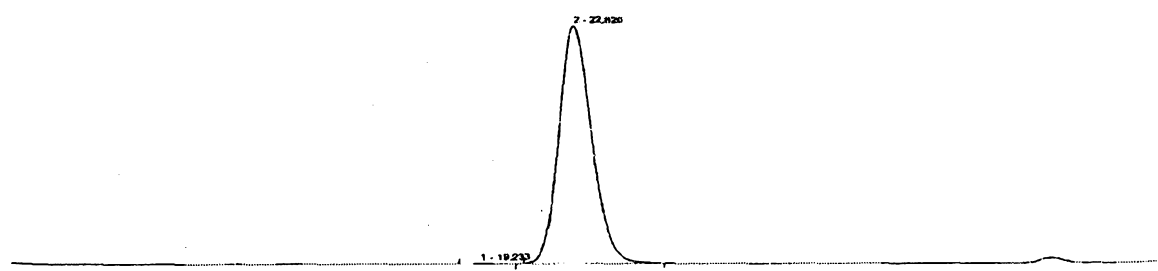


圖4

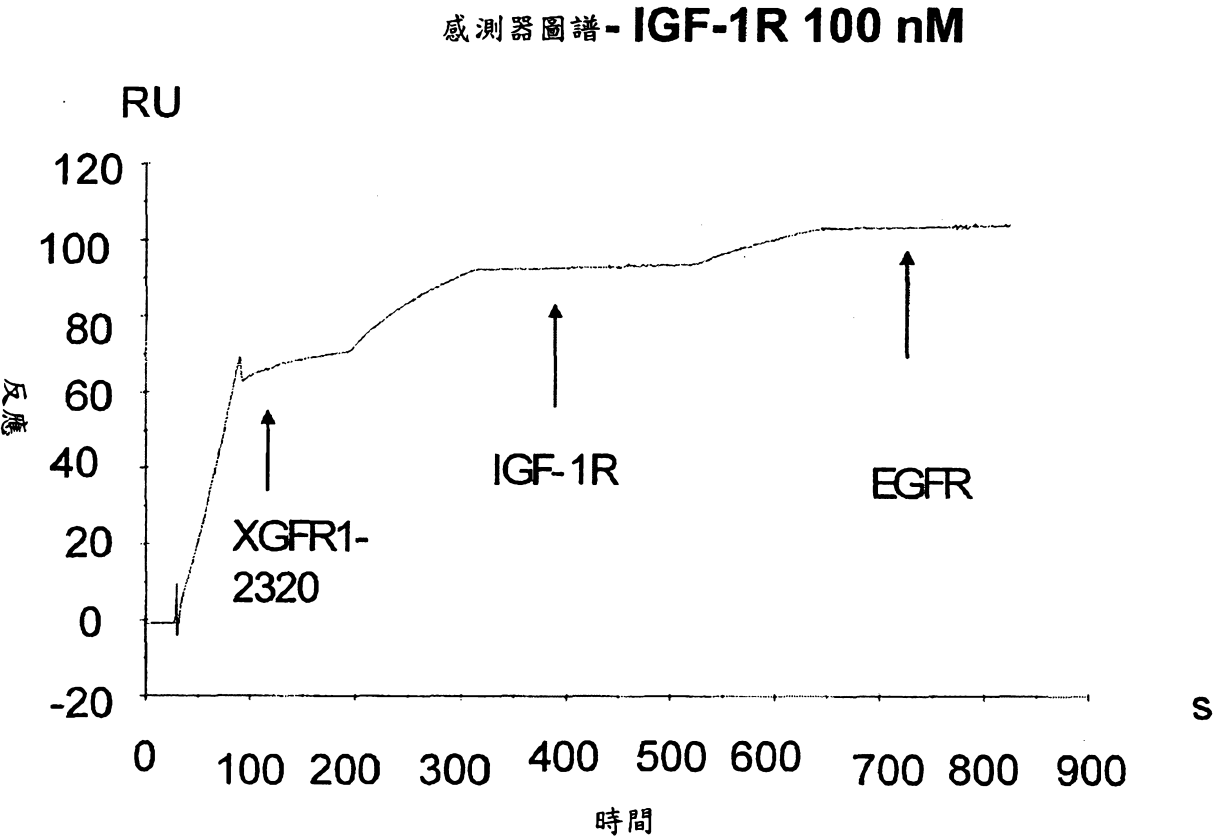
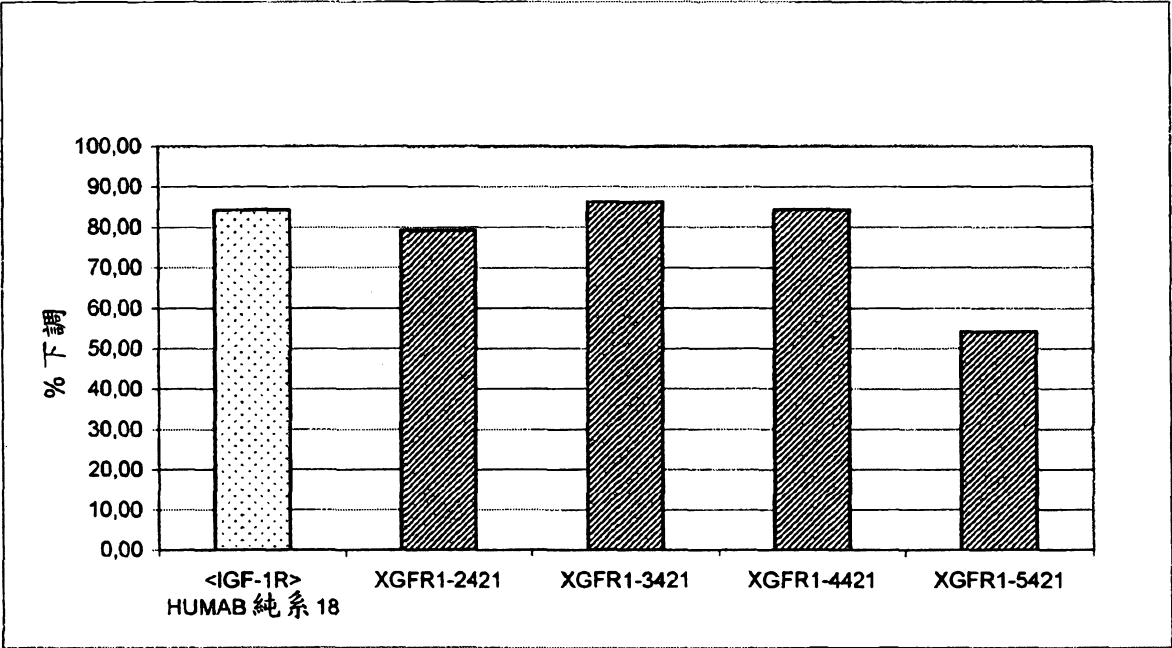


圖5

a)



b)

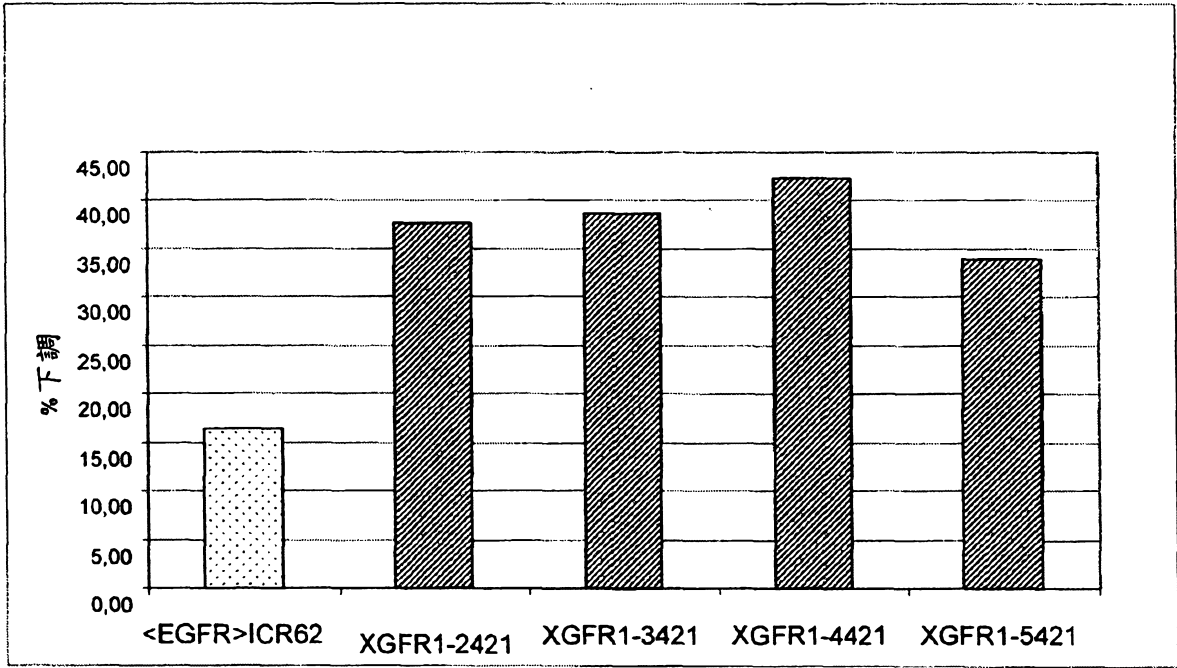
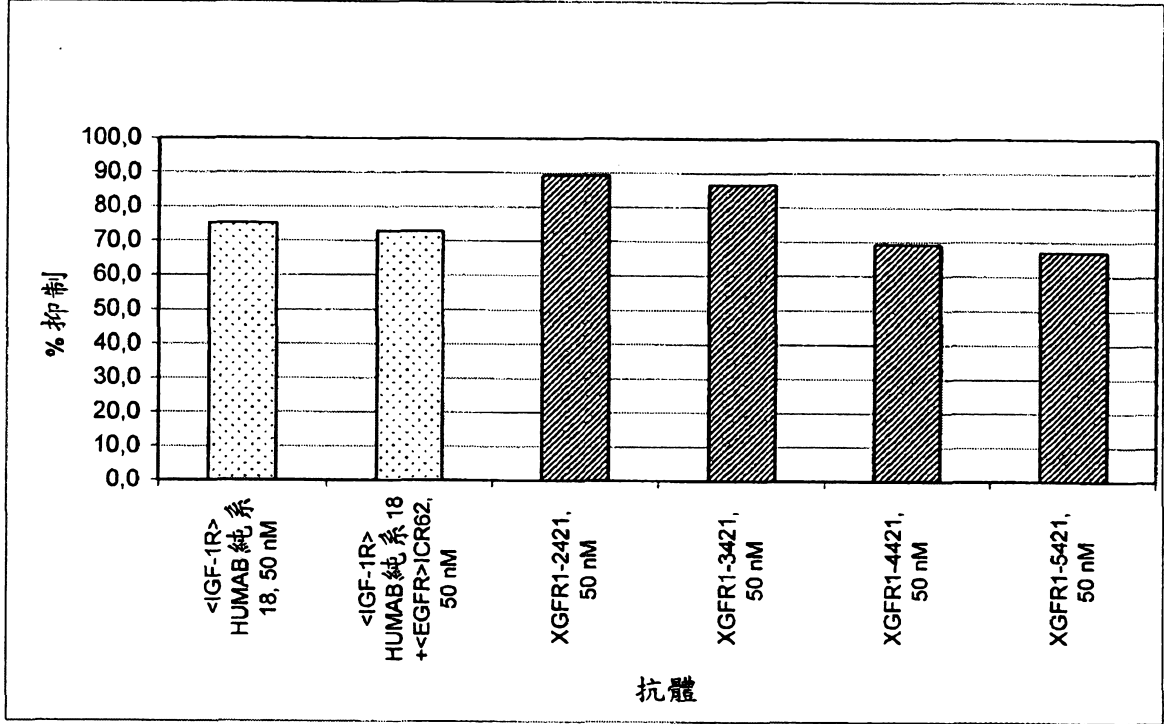


圖6

a)



b)

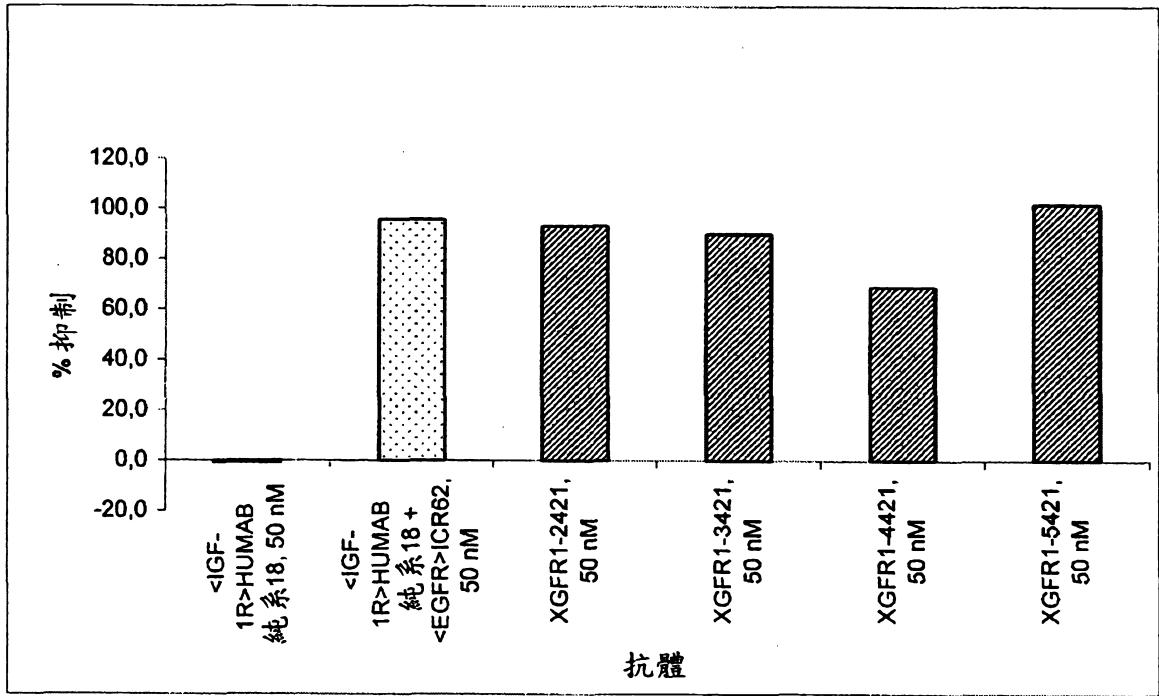


圖 7

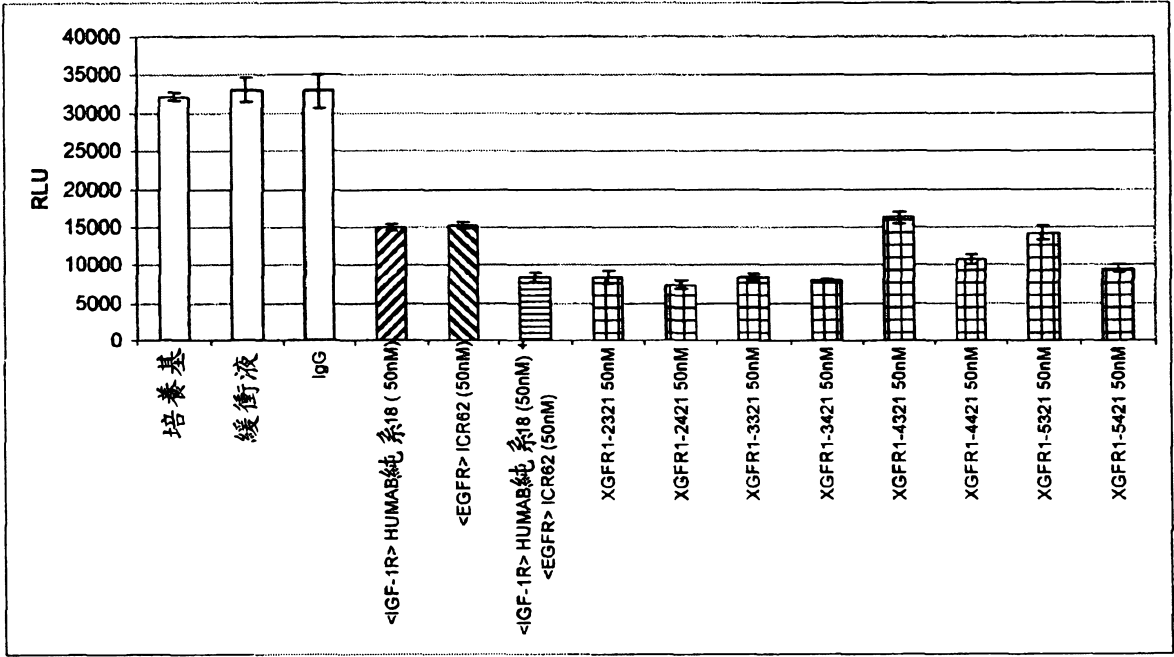


圖8

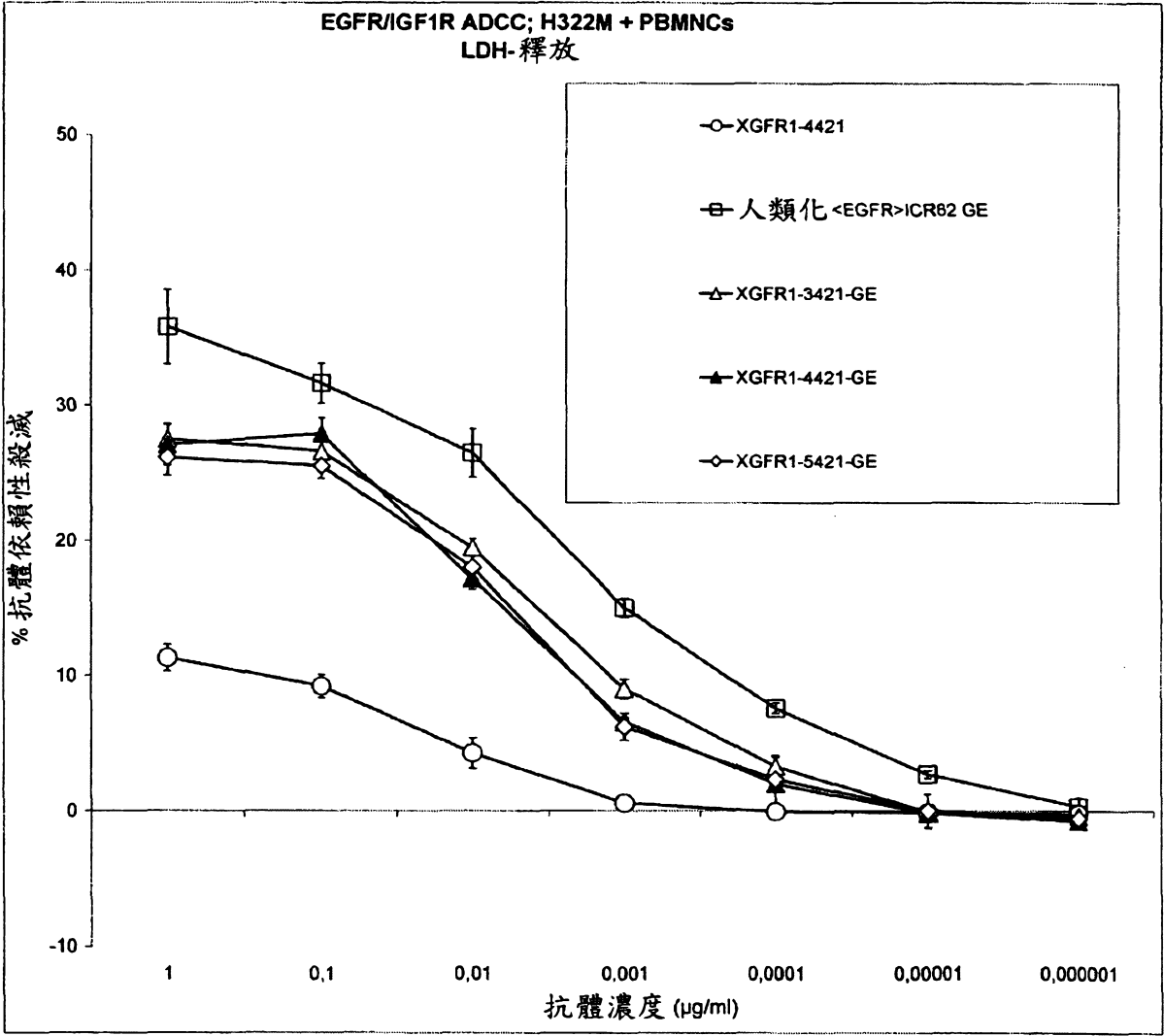


圖9

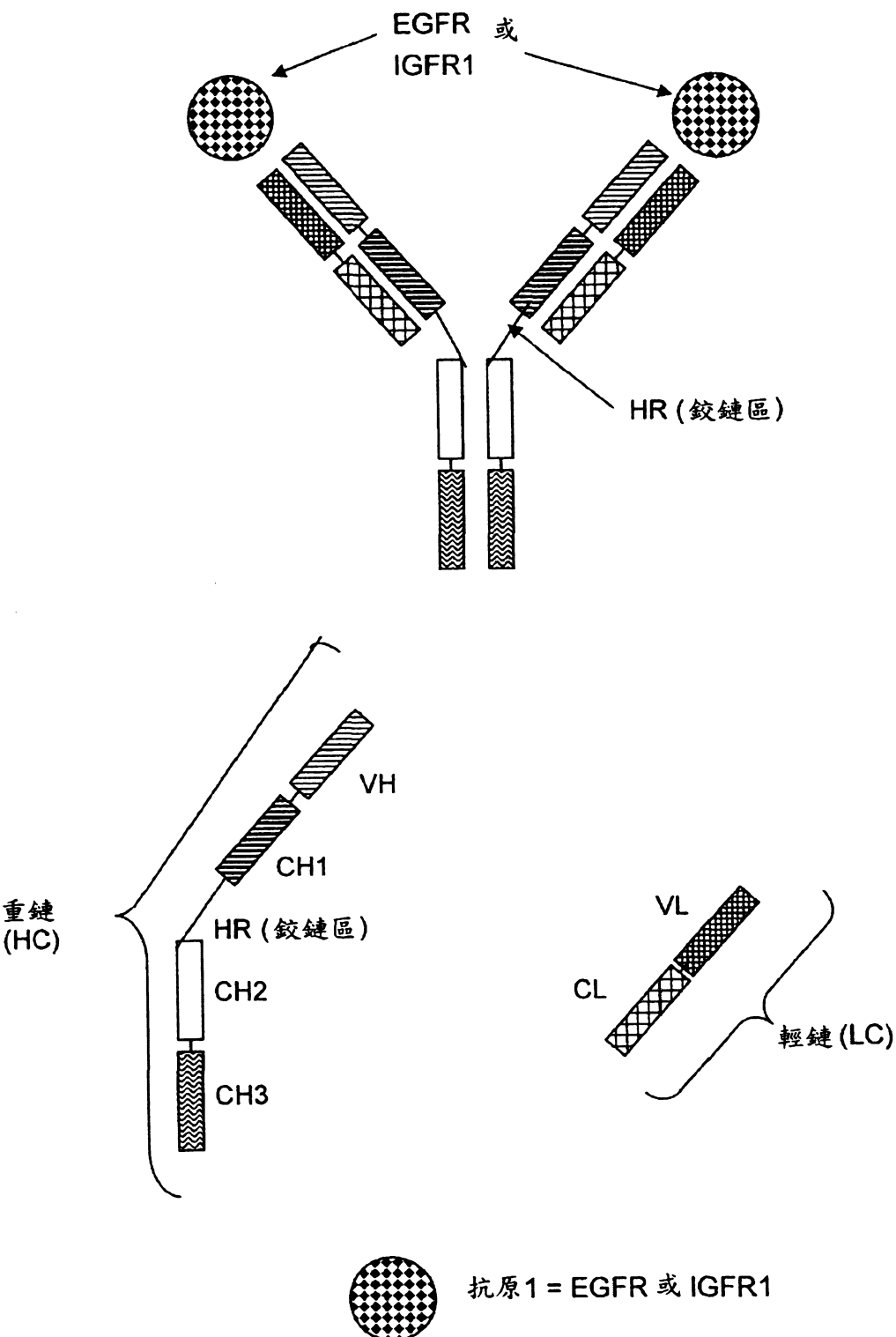


圖 10



•

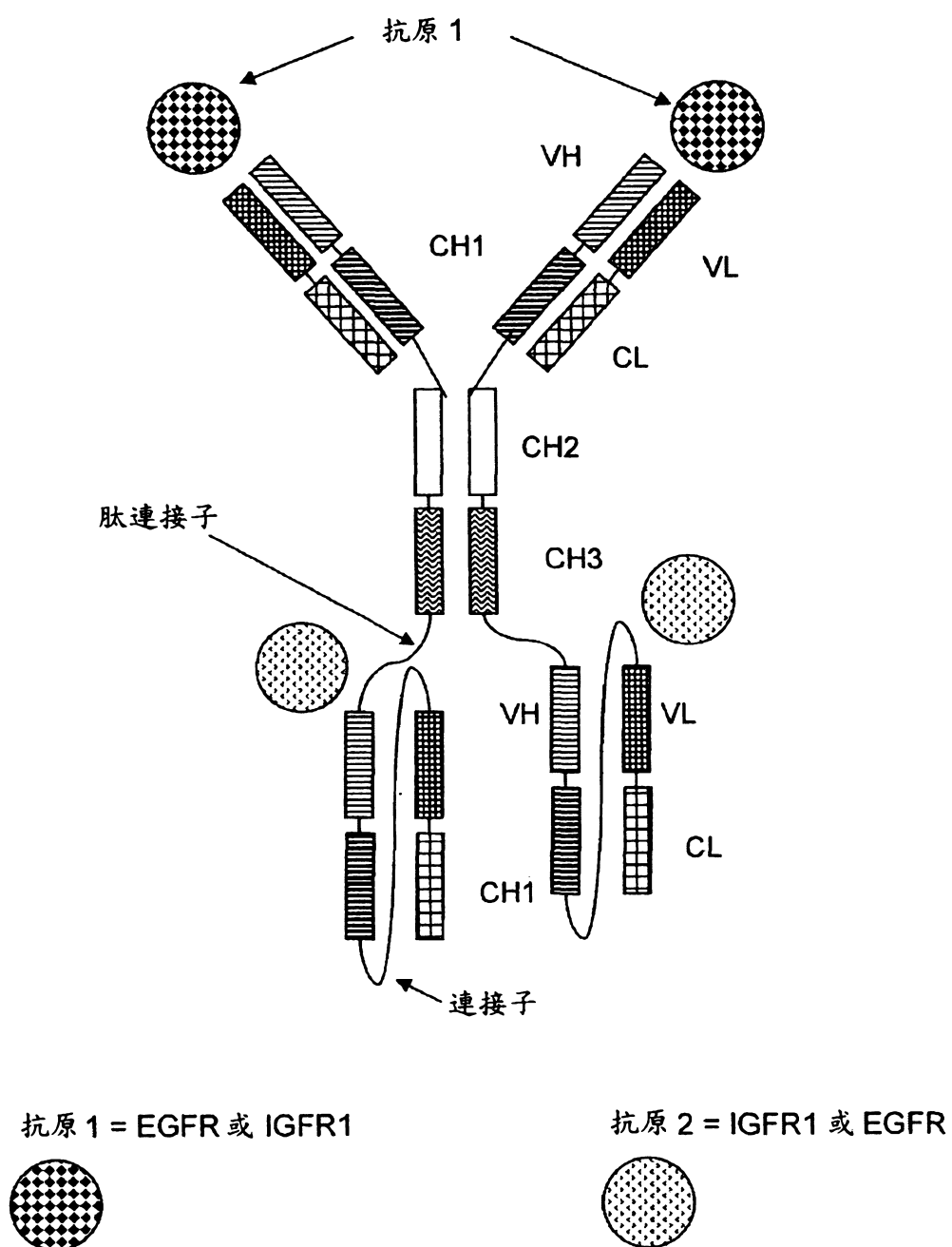
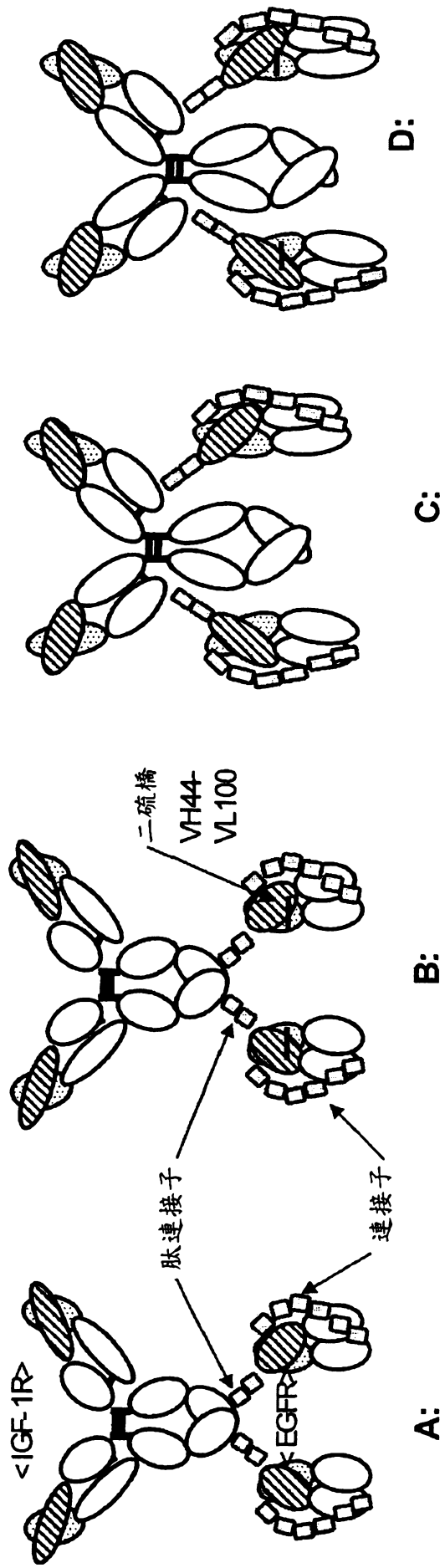
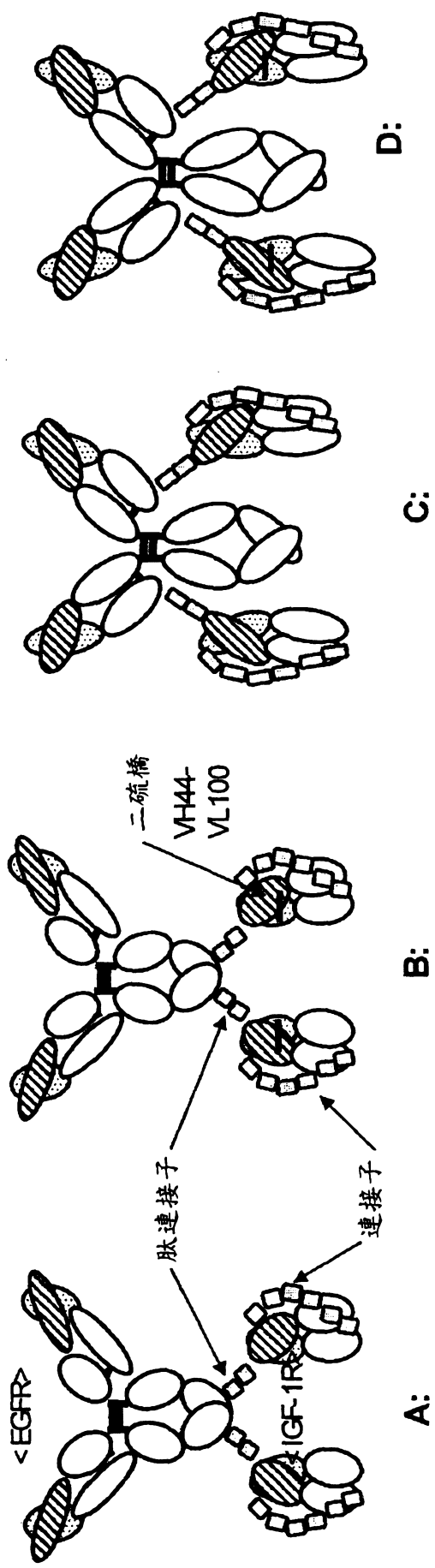


圖12



形式	分子名稱	平均產量 (mg/L)	1 mg/ml 下 SEC 之後的凝集 (%)
A	scFab-XGFR1_2720	6.8	4.3
B	scFab-XGFR1_2721	7.5	1.7
C	scFab-XGFR1_4720	5.2	7.7
D	scFab-XGFR1_4721	9.5	3.5

圖13



形式	分子名稱	平均產量 (mg/L)	1 mg/ml 下 SEC 之後的凝集 (%)
A	scFab-XGFR2_2720	4.4	0
B	scFab-XGFR2_2721	1.2	2.2
C	scFab-XGFR2_4720		
D	scFab-XGFR2_4721		

圖14

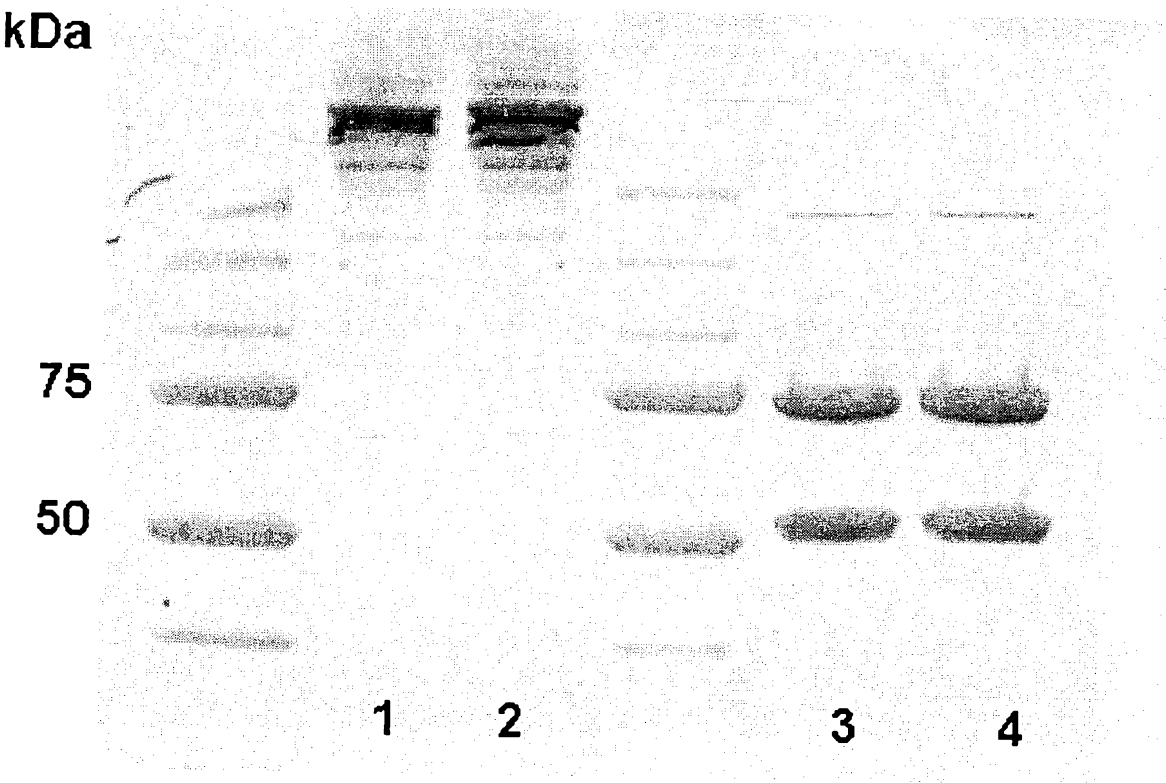


圖15

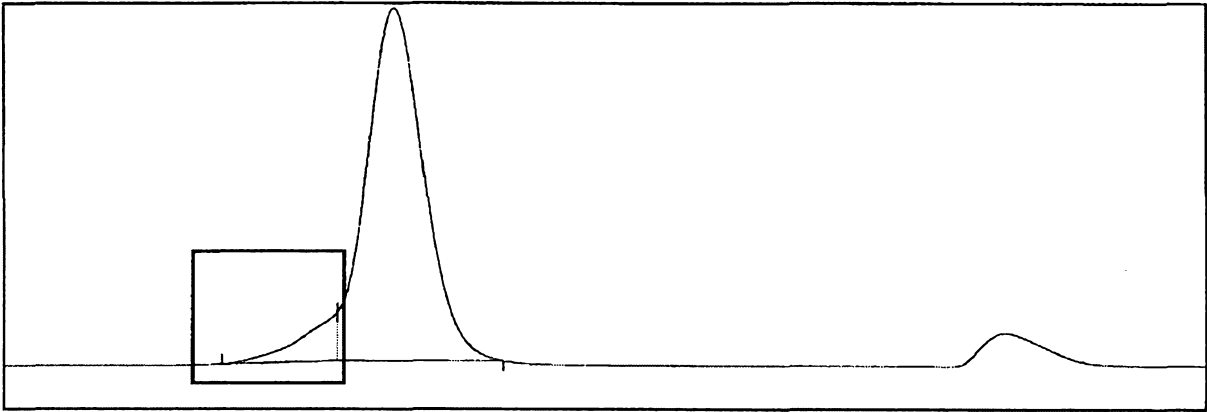


圖 16a

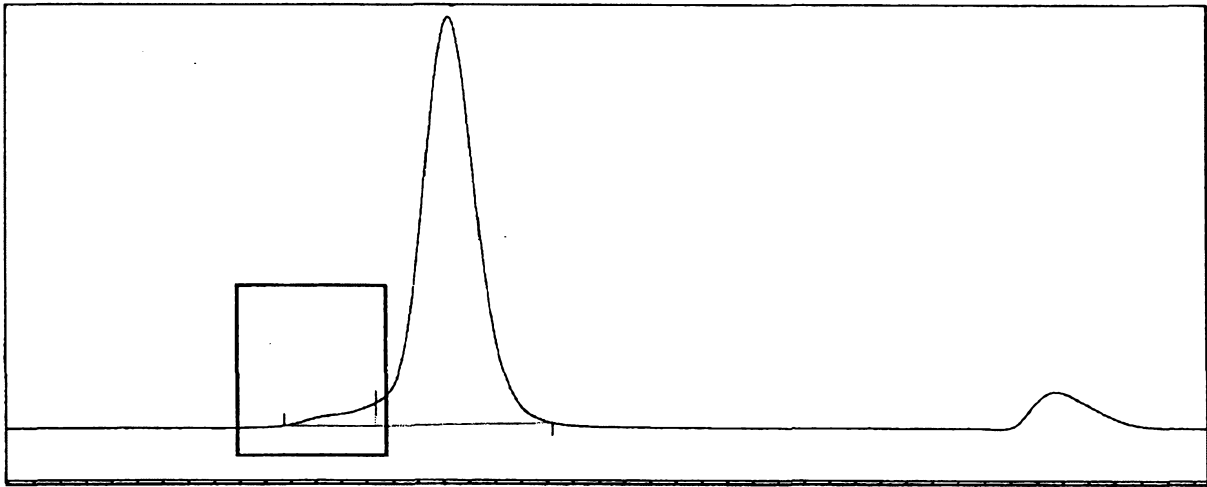


圖 16b

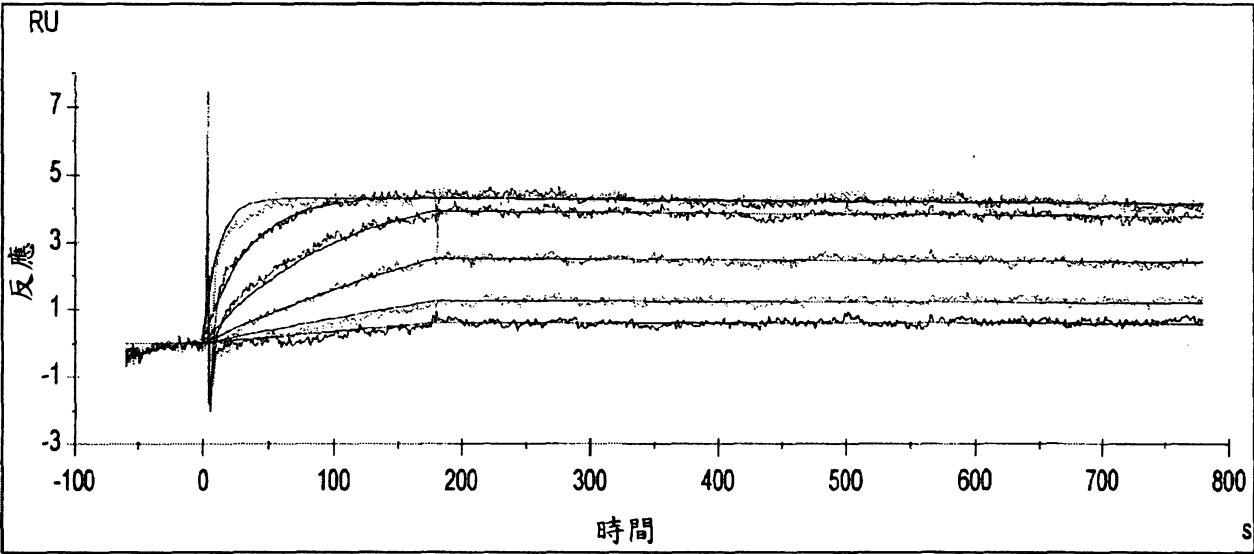


圖17a

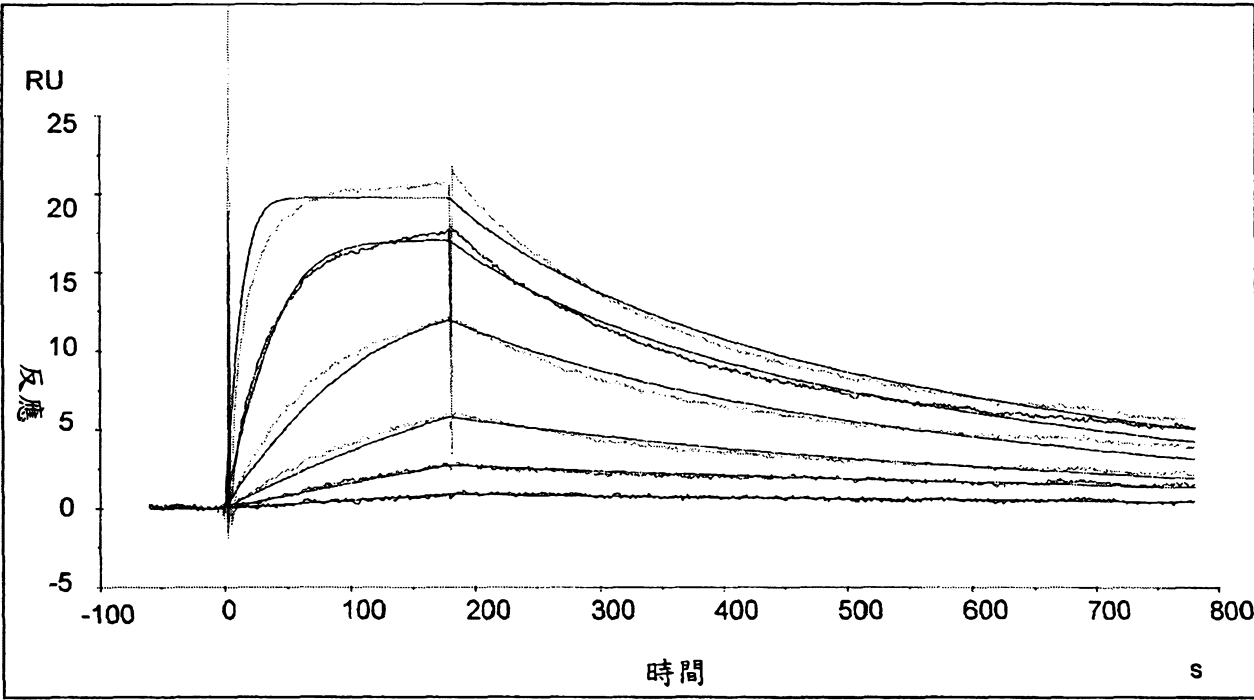


圖17b

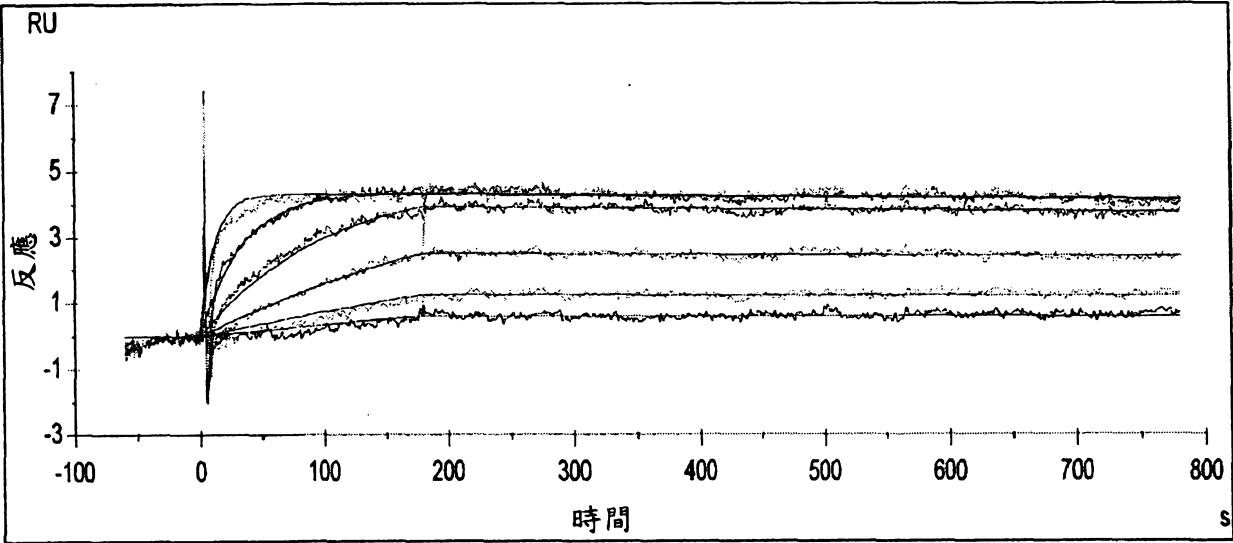


圖17c

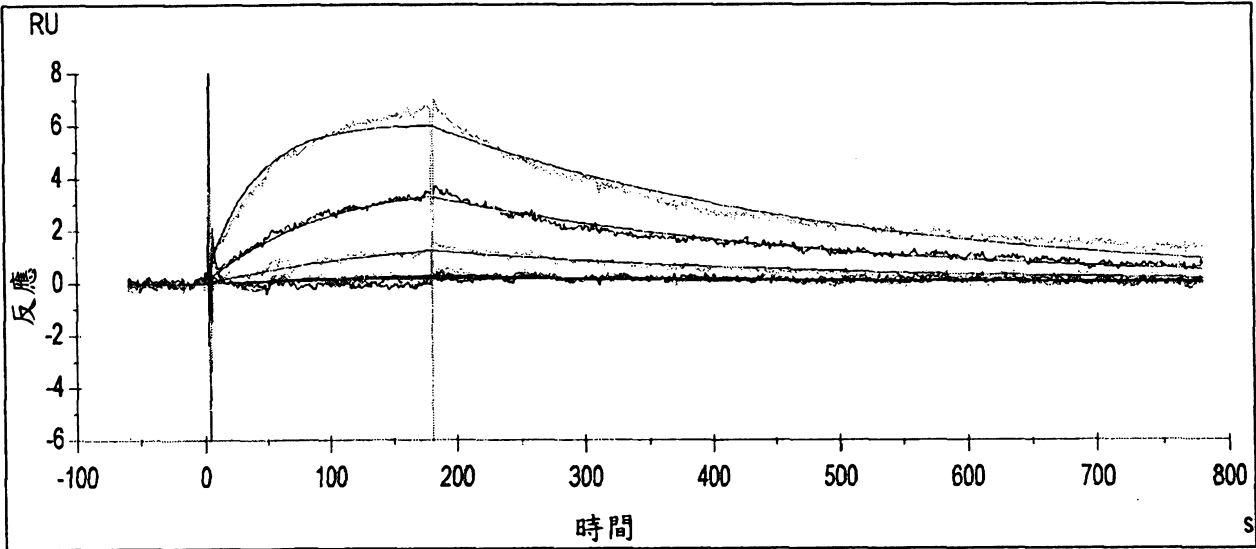


圖17d

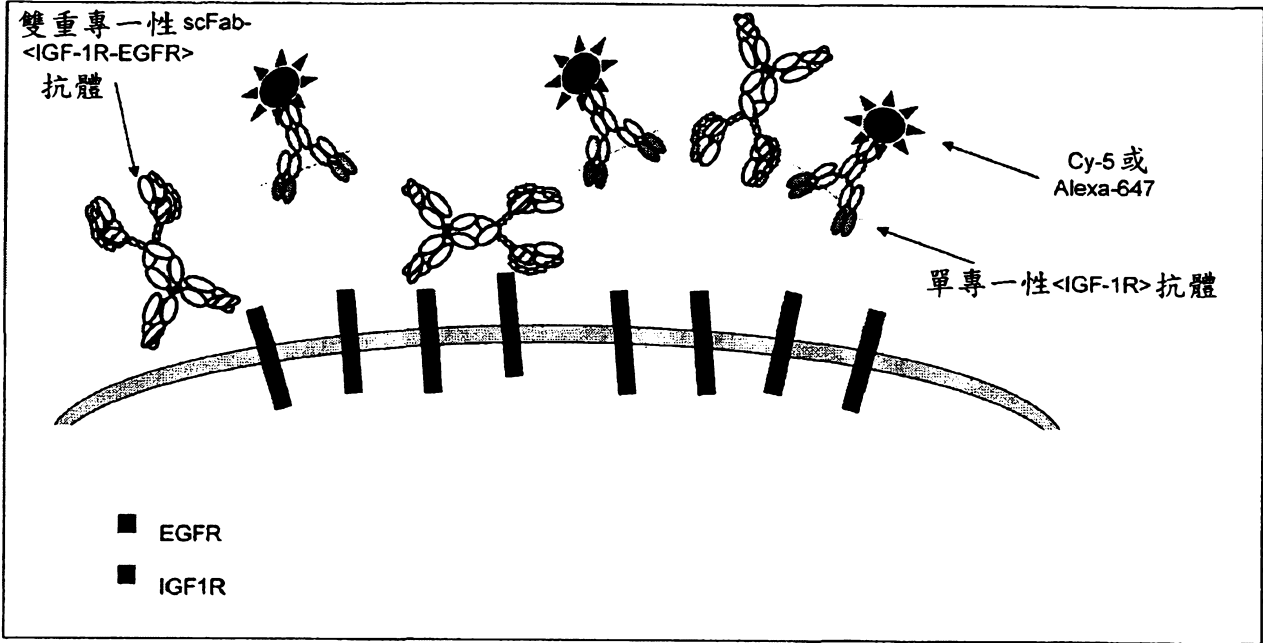


圖 18

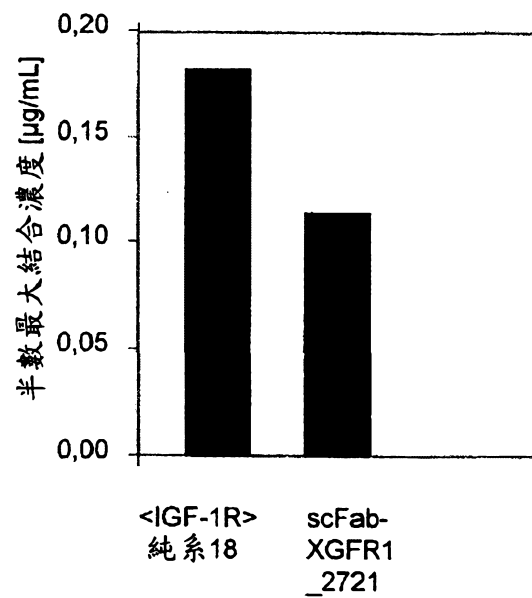


圖 19a

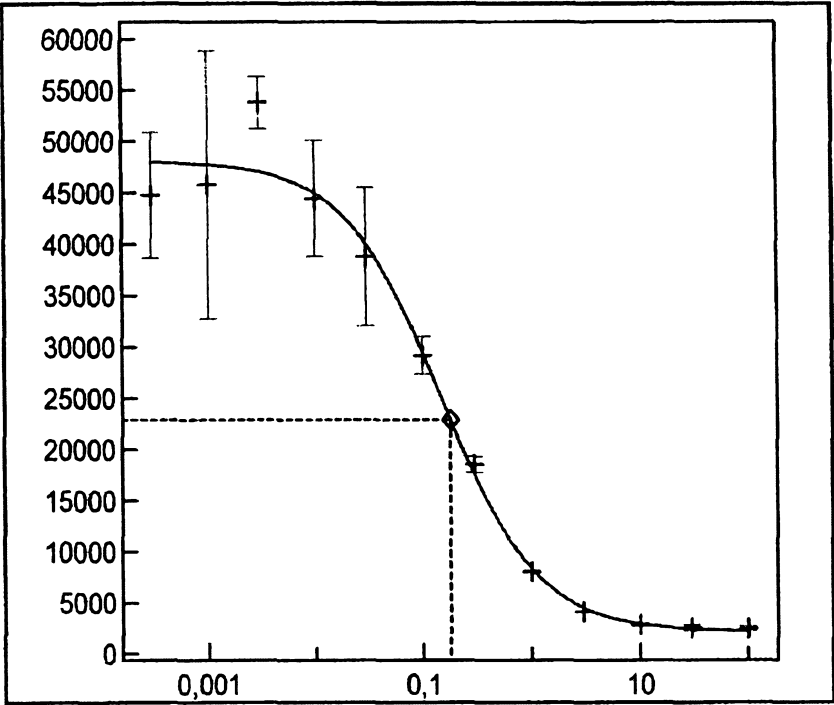


圖 19b

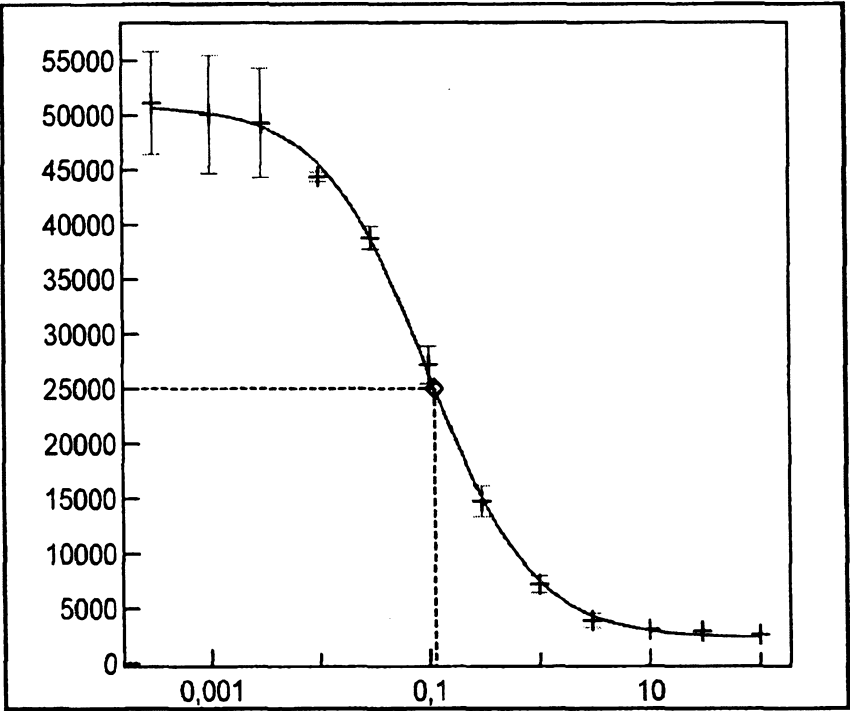


圖 19c



圖 20

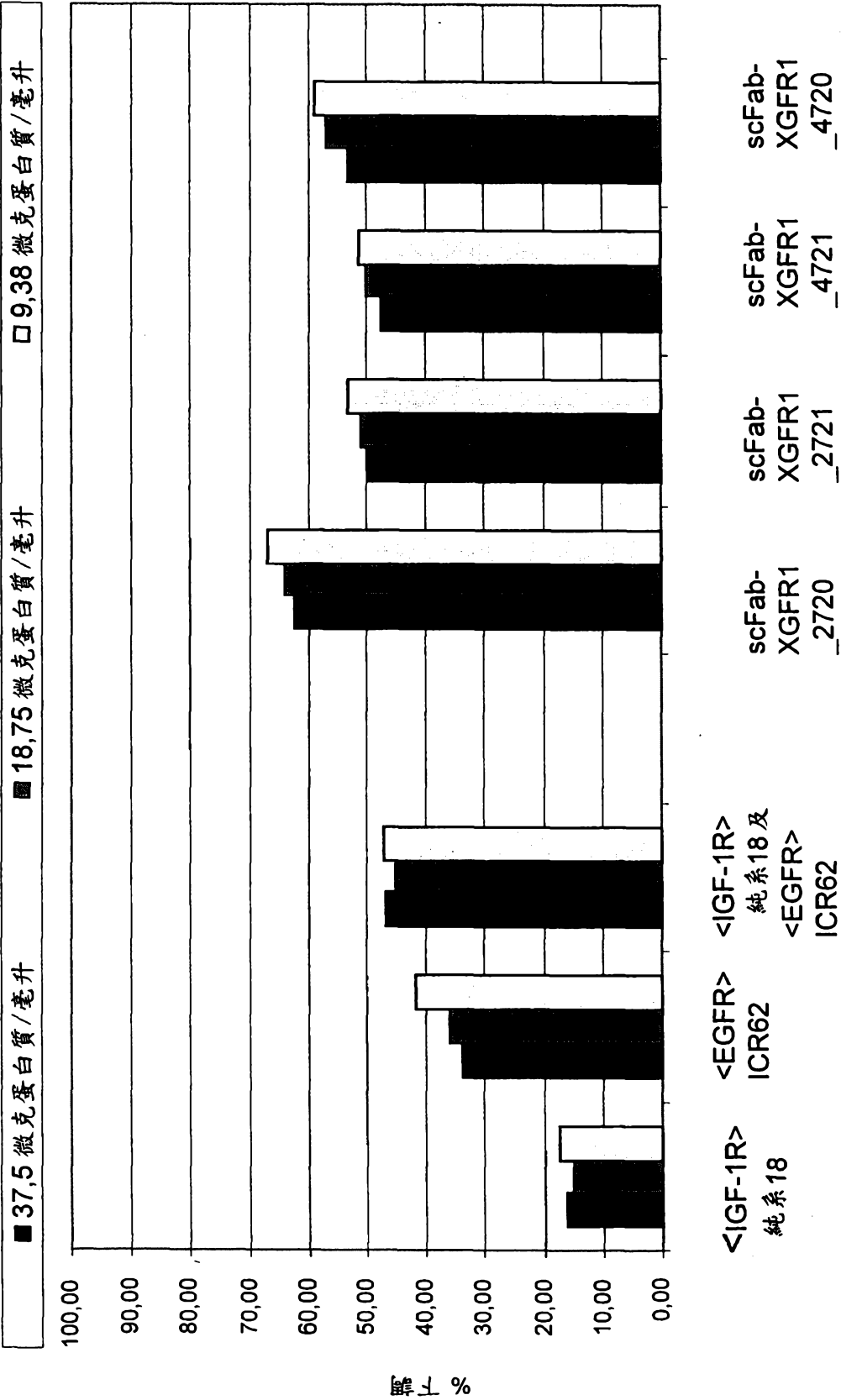


圖21

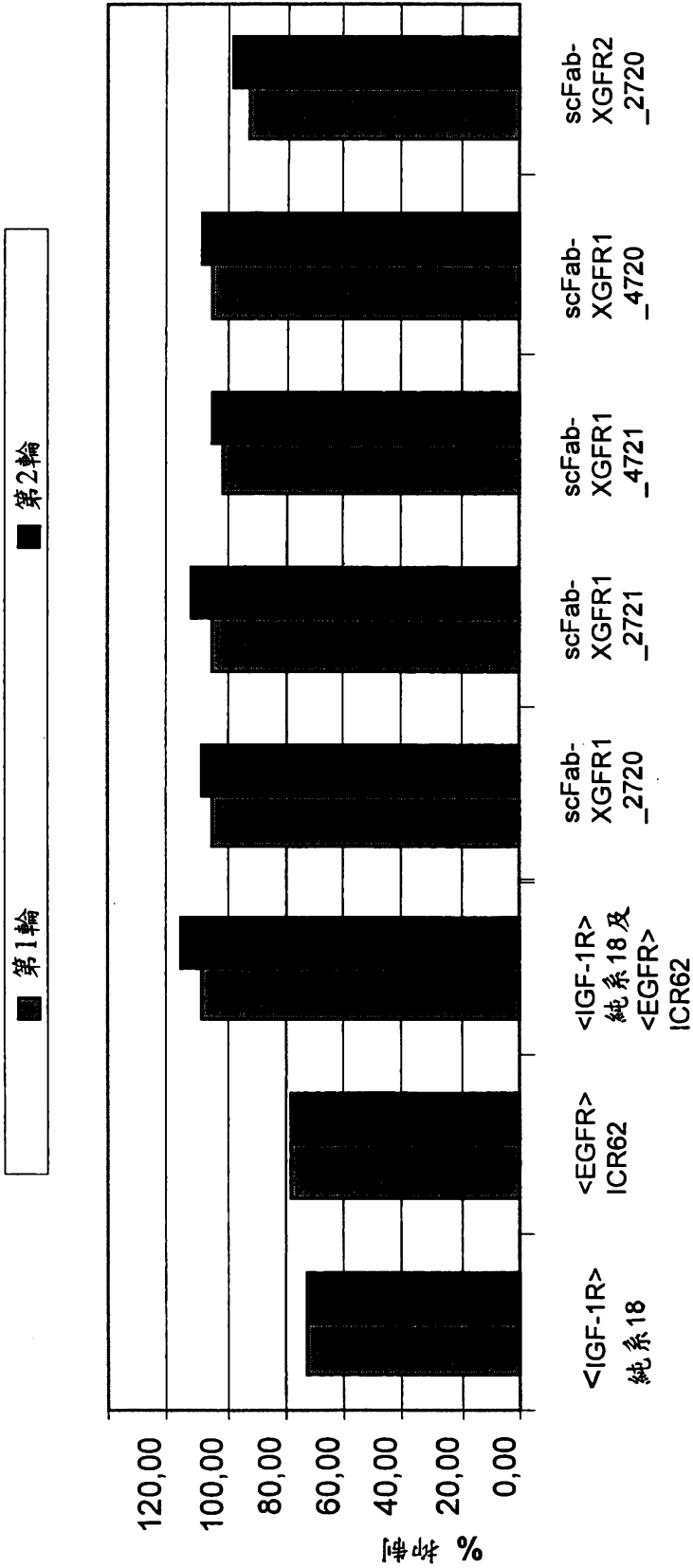


圖22

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)