



(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 201609805 A

(43)公開日：中華民國 105 (2016) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：103142654

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 12 月 08 日

(51)Int. Cl.：

*C07K16/28 (2006.01)**C07K16/40 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2013/12/23

美國

61/920,097

(71)申請人：美國禮來大藥廠(美國) ELI LILLY AND COMPANY (US)

美國

(72)發明人：艾達斯 海克特 ALDAZ, HECTOR (US)；艾倫 巴瑞特 ALLAN, BARRETT

(US)；劉 陵 LIU, LING (US)；盧 吉讓 LU, JIRONG (US)；唐鷹 TANG, YING

(CN)；詹 紳鴻 藍寶 TSCHANG, SHENG-HUNG RAINBOW (US)；亞奇 皮埃

波林娜 YACHI, PIA PAULIINA (FI)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：43 項 圖式數：7 共 115 頁

(54)名稱

結合 E G F R 及 M E T 之多功能抗體

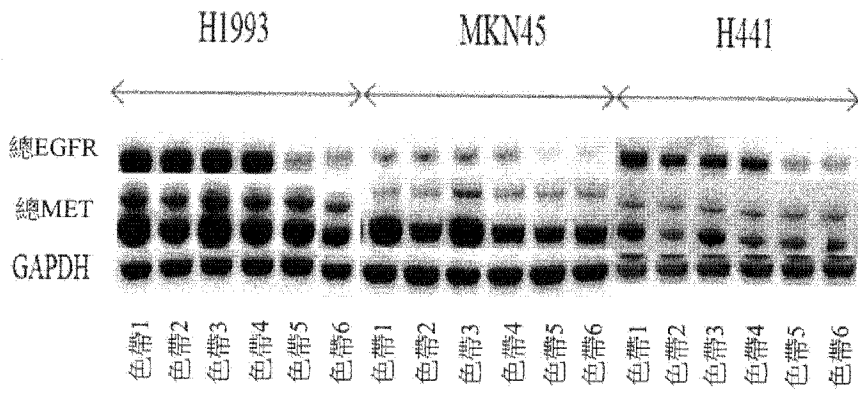
MULTIFUNCTIONAL ANTIBODIES BINDING TO EGFR AND MET

(57)摘要

本發明提供多功能抗體及/或抗原結合片段，其等可結合至人類表皮生長因子受體(epidermal growth factor receptor；EGFR)及 MET，並抑制 EGFR 及 MET 之活性，且可效治療癌症及發病機制由 EGFR 及 MET 介導之其他疾病、病症或病狀。

Provided are multifunctional antibodies, and/or antigen-binding fragments, that bind to, and inhibit the activity of, both human epidermal growth factor receptor (EGFR) and MET, and that are effective in treating cancers and other diseases, disorders, or conditions where pathogenesis is mediated by EGFR and MET.

指定代表圖：



色帶1：hIgG4；色帶2：抗MET Ab；色帶3：西妥昔單抗；
色帶4抗MET Ab +西妥昔單抗；色帶5：NH-YK；色帶6：NH-H9

圖1

發明摘要

※ 申請案號： 103142654

※ 申請日： 103. 12. - 8

※IPC 分類：C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】

結合EGFR及MET之多功能抗體

MULTIFUNCTIONAL ANTIBODIES BINDING TO EGFR AND
MET

【中文】

本發明提供多功能抗體及/或抗原結合片段，其等可結合至人類表皮生長因子受體(epidermal growth factor receptor；EGFR)及MET，並抑制EGFR及MET之活性，且可效治療癌症及發病機制由EGFR及MET介導之其他疾病、病症或病狀。

【英文】

Provided are multifunctional antibodies, and/or antigen-binding fragments, that bind to, and inhibit the activity of, both human epidermal growth factor receptor (EGFR) and MET, and that are effective in treating cancers and other diseases, disorders, or conditions where pathogenesis is mediated by EGFR and MET.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

結合EGFR及MET之多功能抗體

MULTIFUNCTIONAL ANTIBODIES BINDING TO EGFR AND
MET

本發明係關於結合至人類表皮生長因子受體(EGFR)及MET之多功能抗體，其產生方法，含有該等多功能抗體之醫藥組合物及其用途。

EGFR為生長因子受體之1型酪胺酸激酶家族之成員，其在細胞生長、分化及存活中起重要作用。此等受體之活化通常經由特異性配位體結合及隨後酪胺酸激酶域自體磷酸化而發生。此活化觸發參與細胞增生及存活之細胞內信號傳導路徑之級聯。

已確立靶向EGFR及阻斷EGFR信號傳導路徑之癌症療法之各種策略。小分子酪胺酸激酶抑制劑(例如吉非替尼(gefitinib)及埃羅替尼(erlotinib))阻斷細胞內酪胺酸激酶區中之EGFR之自體磷酸化，藉此抑制下游信號傳導事件。面對抗EGFR酪胺酸激酶抑制劑之臨床用途的主要挑戰之一為癌症對此類別療法之固有及後天性抗性。另一方面，某些治療性單株抗體(mAb)靶向EGFR之細胞外部分，其使得阻斷配位體結合且藉此抑制導致細胞增生之抑制的下游事件。已批准嵌合小鼠/人類抗EGFR單株抗體C225 (或西妥昔單抗(cetuximab))及帕尼單抗(panitumumab)，一種完全人類抗EGFR mAb用於治療轉移性結腸直腸及頭頸癌，其靶向EGFR之外部部分。然而，腫瘤含有KRAS突變之患者通常不受益於西妥昔單抗或帕尼單抗療法。KRAS突變藉由不斷傳

送生長信號(即使已阻斷EGFR)來改變腫瘤細胞之信號傳導特性。

MET，酪胺酸激酶超家族之成員，為人類肝細胞生長因子(HGF)之人類受體。HGF與MET之結合導致受體二聚合或多聚合、細胞內區中之多個酪胺酸殘基之磷酸化、催化活化及下游信號傳導。MET亦經由配位體獨立機制，包括受體過度表現、擴增及突變而活化。MET活化增強細胞增生、遷移、形態發生及存活，此等與侵襲性細胞表型及不佳臨床結果相關聯。因此，MET亦為抗癌療法之標靶。舉例而言，已研發奧那組單抗(onartuzumab)，此項技術中亦稱為單臂5D5、OA5D5或MetMAb以用於癌症之潛在治療，且為來源於MET促效單株抗體5D5之人類化、單價、拮抗抗MET抗體(參見例如Spigel, D.R.等人, Randomized Phase II Trial of Onartuzumab in Combination With Erlotinib in Patients With Advanced Non Small-Cell Lung Cancer, *J. Clinical Oncology*, 31(32):4105-4114 (2013年11月)及Xiang H.等人, Onartuzumab (MetMAb): Using Nonclinical Pharmacokinetic and Concentration - Effect Data to Support Clinical Development, *Clin Cancer Res.*, (2013))。奧那組單抗結合至MET且與MET保留在細胞表面上，防止HGF結合及隨後MET磷酸化以及下游信號傳導活性及細胞反應。

WO 2010/059654描述各種MET抗體，包括高親和力拮抗抗體，其結合至MET之 α 鏈內的抗原決定基且在HGF之存在或不存在下且在藉由一般對已知MET拮抗劑具有抗性之功能突變增加表徵的腫瘤中誘導MET內化及/或降解。一種MET抗體揭示於WO 2010/059654中，LY2875358據報導對MET不具有或者具有可忽略之促效劑活性(參見例如Zeng, W.等人, 104rd AACR Annual Meeting, 海報5465號(2013))。

美國專利第7,723,484號描述抑制EGFR活化之人類化及親和力優化EGFR特異性抗體及其抗原結合部分。更特定言之，此專利尤其描

述以如藉由在室溫下進行之Sapidyne KINEXA量測的亞皮可莫耳結合親和力(Kd)結合至人類表皮生長因子受體(EGFR)之全長單株抗體。

MET及EGFR在許多腫瘤中共表現。阻斷一個受體往往會上調另一個，頻繁且通常快速導致對單一藥劑治療之抗性(Engelman, J.A.等人 MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*, 2007;316:1039-43)。相反，持續延長階段暴露於MET抑制劑之MET擴增肺癌細胞經由EGFR路徑產生抗性(McDermott, U.等人, Acquired resistance of non-small cell lung cancer cells to MET kinase inhibition is mediated by a switch to epidermal growth factor receptor dependency, *Cancer Res.*, (2010); 70(4):1625-34)。

共同投與MET抗體及EGFR抗體需要注射兩種單獨產品或單一注射兩種不同抗體之共調配物。兩次注射將准許劑量及時序之靈活性，但就順應性及疼痛而言對於患者將為不便的。共調配物亦可能提供劑量之一些靈活性，但由於兩種不同抗體之不同分子特徵，發現准許兩種抗體之化學及物理穩定性之調配條件通常非常具挑戰性或不可能。

WO 199509917揭示一種使用重組DNA技術藉由產生融合至具有不同特異性之完整抗體的單鏈片段可變(scFv)抗體來產生雙特異性、四價抗體之方法。此基因融合體由產生具有雙特異性之四價抗體的轉染表現。然而，在此項技術中一般認識到當遵循包括WO 199509917之此項技術中之教導內容同時試圖產生適用雙特異性抗體時，熟練技術人員頻繁遇到與所得雙特異性抗體之化學及物理穩定性相關聯之顯著問題。時常，在所得雙特異性抗體中需要胺基酸變化以充分克服此等問題。在此項技術中既未建議對胺基酸變化之需要，亦未建議將克服所產生問題之實際變化。另外，所需變化通常不常規或來源於公共常識。同樣，通常發現自己知抗體產生之雙特異性抗體與親本抗體本

身相比在至少一種重要功能藥物動力學或藥力學特性方面為較不需要的。

PCT國際公開案WO 2010/115551揭示一種三價、雙特異性抗人類EGFR及MET抗體(BsAB01)，其中單鏈Fab片段，亦即單臂5D5，融合至西妥昔單抗之兩條重鏈中之一條的羧基端。據報導與由單特異性、單價親本MET抗體誘導之MET之內化相比，BsAB01降低MET之內化。在OVCAR-8增生分析中，與用西妥昔單抗及奧那組單抗之組合之2%抑制相比，BsAB01引起8%抑制。在HGF之存在下，與用西妥昔單抗及奧那組單抗之組合之10%抑制相比，BsAB01引起15%抑制。

另外，已揭示使用受控Fab臂交換(cFAE)，一種涉及在還原條件下混合兩種親本抗體(在此情況下，對EGFR或MET具有特異性)隨後再氧化之方法，產生靶向EGFR及cMET之雙特異性抗體EM1-mAb (Moores, S.等人, EORTC Annual Meeting, 海報B241號(2013))。尤其報導在至少一種活體外ERK磷酸化分析中，與單價對照抗體之組合相比，EM1-mAb展示優良活性。

美國專利申請公開案US 2014/0302029描述將EGFR及cMET靶向至c-Met之雙特異性抗體的產生，EGFR及cMET藉由將基於西妥昔單抗序列之抗EGFR scFv融合至小鼠抗體(亦即AbF46)之親和力成熟及人類化衍生物之IgG2 Fc之C端而建構。

因此，需要以高親和力結合MET及EGFR，有效中和藉由HGF之MET活化及藉由EGF家族配位體之EGFR活化，及/或相對於單一藥劑之組合提供內化及/或降解MET及EGFR (野生型及突變體)之優良活性的多功能抗體作為某些癌症之有效藥理學干預。特定言之，需要該等抗MET/EGFR抗體：i)可更有效治療藉由具有一或多種KRAS突變表徵之癌症，ii)與單一藥劑之相關組合相比，展現防止或延遲產生對其他MET及/或EGFR抑制劑之抗性之優良活性，該等抑制劑包括(但不限

於) 埃羅替尼、吉非替尼、拉帕替尼 (lapatinib) 及維羅非尼 (vemurafenib)，iii) 引發最小或不引發可量測促效劑活性，及/或iv) 展現活體內穩定性、生理及化學穩定性，包括(但不限於) 熱穩定性、溶解度、低自締合及藥物動力學特徵，其對於產生及/或用於癌症之治療為可接受的。然而，雖然在試圖產生包含WO 2010/059654之某些抗MET抗體及美國專利第7,723,484號之某些抗EGFR抗體之四價、多功能抗MET/EGFR抗體時一般遵循WO 199509917中之教導內容，但本發明人遇到與關於標靶受體MET及EGFR中之一或兩者之化學及物理穩定性及所需結合特性損失相關聯之顯著問題。因此，需要涉及許多胺基酸變化之大量工程改造努力以充分克服此等問題。在此項技術中既未建議變化需要亦未建議實際變化。另外，數種變化不常規或來源於公共常識。同樣，親本抗體本身並不具有此等問題，表明在多功能抗MET/EGFR抗體之情況下重要區域周圍之局域環境不同。

因此，本發明提供結合至EGFR及MET之四價多功能抗體。此等多功能抗體誘導細胞表面上之EGFR及MET之共定位，MET之內化及/或降解，及出人意料地，與具有高MET表現之腫瘤細胞中之西妥昔單抗相比EGFR之甚至較高之內化及降解。此外，與具有低至中等MET表現之腫瘤細胞中之親本抗MET抗體相比，此等抗MET/EGFR多功能抗體展示結合至MET之較高親合力。

因此，本發明提供結合至EGFR及MET之四價多功能抗體。此等多功能抗體誘導細胞表面上之EGFR及MET之共定位，MET之內化及/或降解，及出人意料地，與具有高MET表現之腫瘤細胞中之西妥昔單抗相比EGFR之甚至較高之內化及降解。此外，與具有低至中等MET表現之腫瘤細胞中之親本抗MET抗體相比，此等抗MET/EGFR多功能抗體展示結合至MET之較高親合力。此外，與兩種個別抗體之組合相比，此等多功能抗MET/EGFR抗體展示在細胞培養以及小鼠異種移植

物模型中之腫瘤細胞生長抑制方面的優良活性。與個別MET及EGFR抗體之組合相比，其在HGF及/或EGF之存在下恢復對各種標靶療法(包括埃羅替尼及PLX4032 (亦即B-Raf抑制劑))之腫瘤細胞敏感性方面亦似乎具有優良活性。亦可證明該等抗MET/EGFR抗體更有效針對高EGFR表現腫瘤或對或已變得對一或多種抗EGFR抗體(例如西妥昔單抗、帕尼單抗等)及/或一或多種EGFR小分子抑制劑(例如埃羅替尼)具有抗性之腫瘤，包括(但不限於)有KRAS突變之腫瘤。在本發明之各種實施例中，此等多功能抗體同時結合至MET及EGFR，中和藉由HGF之MET活化及藉由EGF之EGFR活化，抑制表現MET及EGFR之許多類型之癌細胞的配位體依賴性及獨立細胞增生，誘導細胞表面上之EGFR及MET之共定位，誘導MET之內化及/或降解，及出人意料地，與具有高MET表現之腫瘤細胞中之西妥昔單抗相比，誘導EGFR之甚至較高之內化及降解。

本發明之一實施例為包含以下之多功能抗體：

(a) 結合MET且包含以下之抗體：

i) 包含分別由胺基酸序列GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 11)、RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 12)及ARANWLDY (SEQ ID NO: 13)組成之重鏈互補決定區(CDR) HCDR1、HCDR2及HCDR3之重鏈；及

ii) 包含分別由胺基酸序列SVSSSVSSIYLH (SEQ ID NO: 14)、YSTSNLAS (SEQ ID NO: 15)及QVYSGYPLT (SEQ ID NO: 16)組成之輕鏈CDR LCDR1、LCDR2及LCDR3之輕鏈；及

(b) 結合至人類EGFR且包含以下之scFv多肽：

i) 包含分別由胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIX₁SGGNTDYNTFPX₂G (SEQ ID NO: 9) (其中X₁為Y或W且X₂為K或T)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之scFv CDR scFv-

HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域；及

ii) 包含分別由胺基酸序列RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、 $X_1YAX_2X_3SIS$ (SEQ ID NO: 10) (其中 X_1 為R或Y， X_2 為K或S，且 X_3 為E或R)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2及scFv-LCDR3之LCVR域，且其中scFv多肽之C端經由肽連接子融合至MET抗體重鏈之N端。

本發明之另一實施例為包含以下之多功能抗體：

(a) 結合MET且包含以下之抗體：

i) 第一重鏈及第二重鏈，其中重鏈中之每一者包含分別由胺基酸序列GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 11)、RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 12)及ARANWLDY (SEQ ID NO: 13)組成之重鏈CDR HCDR1、HCDR2及HCDR3；及

ii) 第一輕鏈及第二輕鏈，其中輕鏈中之每一者包含分別由胺基酸序列SVSSSVSSIYLH (SEQ ID NO: 14)、YSTSNLAS (SEQ ID NO: 15)及QVYSGYPLT (SEQ ID NO: 16)組成之輕鏈CDR LCDR1、LCDR2及LCDR3；及

(b) 第一scFv多肽及第二scFv多肽，其中scFv多肽中之每一者結合至人類EGFR且其中scFv多肽中之每一者包含：

i) 包含分別由胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、 $VIX_1SGGNTDYNTPFX_2G$ (SEQ ID NO: 9) (其中 X_1 為Y或W且 X_2 為K或T)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域；及

ii) 包含分別由胺基酸序列RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、 $X_1YAX_2X_3SIS$ (SEQ ID NO: 10) (其中 X_1 為R或Y， X_2 為K或S，且 X_3 為E或R)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2及scFv-LCDR3之LCVR域，且其中第一scFv多

肽之C端經由肽連接子融合至第一重鏈之N端且第二scFv多肽之C端經由肽連接子融合至第二重鏈之N端。

本發明之另一實施例為包含兩個第一多肽及兩個第二多肽之多功能抗體，其中兩個第一多肽均包含胺基酸序列SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 52或SEQ ID NO: 53；且兩個第二多肽均包含胺基酸序列SEQ ID NO: 33，且其中該多功能抗體結合至EGFR及MET。

本發明之另一實施例為一種醫藥組合物，其包含前述多功能抗體中之任一者或其MET及EGFR結合片段，及醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。

本發明之另一實施例為前述多功能抗體中之任一者或其MET及EGFR結合片段，其用於療法。

本發明之另一實施例為前述多功能抗體中之任一者或其MET及EGFR結合片段，其用於治療癌症。

本發明之另一實施例為前述多功能抗體中之任一者或其MET及EGFR結合片段，其用於治療MET及EGFR均由患者之腫瘤表現之癌症。

本發明之另一實施例為前述多功能抗體中之任一者或其MET及EGFR結合片段，其用於治療其中MET及/或EGFR以低、中或高水準由患者之腫瘤表現的癌症及/或對或已變得對一或多種抗EGFR抗體(例如西妥昔單抗、帕尼單抗等)及/或一或多種EGFR小分子抑制劑(例如埃羅替尼)具有抗性之腫瘤或腫瘤(包括(但不限於)有KRAS突變之腫瘤)。在本發明之各種實施例中，多功能抗體或其MET及EGFR結合片段用於治療其中MET及/或EGFR以低、中或高水準由患者之腫瘤表現之癌症及/或對或已變得對一或多種抗EGFR抗體(例如西妥昔單抗、帕尼單抗等)及/或一或多種EGFR小分子抑制劑(例如埃羅替尼)具有抗

性之腫瘤(包括(但不限於)有KRAS突變之腫瘤)的用途可進一步包含鑑別需要癌症治療之患者之步驟，隨後向該患者投與本發明之多功能抗體或其MET及EGFR結合片段之步驟。

本發明之另一實施例為前述多功能抗體中之任一者或其MET及EGFR結合片段，其用於治療NSCLC、SCLC、胃癌、結腸直腸癌、膽管癌、食道癌、黑素瘤(包括(但不限於)葡萄膜黑素瘤)、腎癌、肝癌、膀胱癌、子宮頸癌或頭頸癌。

本發明之另一實施例為一種治療癌症之方法，其包含向有需要之人類患者投與有效量之前述多功能抗體中之任一者或其MET及EGFR結合片段。

圖1說明西方墨點法結果，其顯示抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK及NH-H9誘導癌細胞株H1993 (NSCLC)、MKN45 (胃癌)及H441 (NSCLC)中之EGFR及MET之降解。用100 nM抗體NH-YK、抗體NH-H9或對照抗體處理癌細胞株隔夜。藉由細胞溶解物之西方墨點法測定EGFR及MET降解。抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK及NH-H9觸發EGFR之顯著降解而西妥昔單抗或親本抗MET抗體與西妥昔單抗之組合未觸發降解。色帶1：hIgG4；色帶2：抗MET Ab；色帶3：西妥昔單抗；色帶4抗MET Ab +西妥昔單抗；色帶5：NH-YK；色帶6：NH-H9。

圖2為顯示與投與媒劑對照或親本抗Met抗體與西妥昔單抗之組合(T/C%為86.1%)相比，投與抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK引起H1993小鼠異種移植物模型之腫瘤體積明顯較大減少(T/C%為28.5%， $p<0.001$)的圖。

圖3為顯示與投與媒劑對照或親本抗Met抗體與西妥昔單抗之組合相比，投與抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK引起H441小鼠異種移植物模型之腫瘤體積明顯較大減少(T/C%為28.5%， $p<0.001$)的圖。

圖4為顯示與投與媒劑對照相比，投與抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK引起EBC-1 NSCLC小鼠異種移植物模型之腫瘤體積明顯較大減少(T/C%為32.9% ($p<0.001$))的圖。

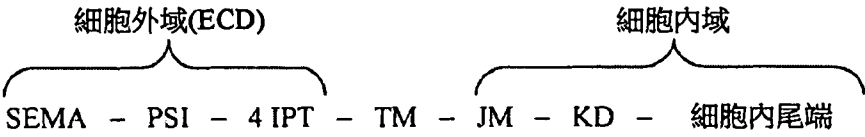
圖5為顯示與投與親本MET抗體與西妥昔單抗之組合或媒劑對照相比，投與抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK在MKN45胃異種移植物模型中產生類似抗腫瘤功效(分別為T/C%=17.4%， $p<0.001$ 及18.6%， $p<0.001$)的圖。

圖6為顯示與任何其他治療相比，投與27 mg/kg之抗MET/EGFR多功能抗體H9在帶有H1993 NSCLC異種移植物之免疫缺陷小鼠中產生明顯較高抗腫瘤功效的圖。每週一次持續五個連續週用媒劑對照、抗MET/EGFR多功能抗體H9 (4 mg/kg及27 mg/kg)、僅抗MET (3 mg/kg及20 mg/kg)、西妥昔單抗(3 mg/kg及20 mg/kg)或抗MET加西妥昔單抗(3 mg/kg及20 mg/kg各抗體)之組合處理小鼠異種移植物。

圖7為顯示與任何其他治療相比，投與27 mg/kg之抗MET/EGFR多功能抗體H9在帶有H441異種移植物之免疫缺陷小鼠中產生明顯較高抗腫瘤功效的圖。每週一次持續五個連續週用媒劑對照、抗MET/EGFR多功能抗體H9 (4 mg/kg及27 mg/kg)、僅抗MET (3 mg/kg及20 mg/kg)、西妥昔單抗(3 mg/kg及20 mg/kg)或抗MET加西妥昔單抗(3 mg/kg及20 mg/kg各抗體)之組合處理小鼠異種移植物。

術語「EGFR」、「ErbB1」及「EGF受體」在本文中可互換用於指EGFR蛋白質(參見例如UniProtKB/Swiss-Prot條目P00533)。本文中，「EGFR細胞外域」或「EGFR ECD」係指在細胞外，錨定至細胞膜或在循環中之EGFR域，包括其片段。在一個實施例中，EGFR之細胞外域可包含四個域：「域I」(約1-158之胺基酸殘基)，「域II」(胺基酸殘基159-336)，「域III」(胺基酸殘基337-470)，及「域IV」(胺基酸殘基471-645)，其中邊界近似，且可變化約1-3個胺基酸。

術語「MET多肽」、「MET受體」、「MET」、「HGF受體」或「HGFR」在本文中可互換使用且，除非另外指示，否則意指人類受體酪胺酸激酶，以及結合人類肝細胞生長因子之其功能活性、突變形式。MET之具體實例包括例如由基因庫(GenBank)寄存編號NM_000245中所提供之核苷酸序列編碼之人類多肽，或由基因庫寄存編號NP_000236中所提供之多肽序列編碼之人類蛋白質。將MET之結構示意性描述為：



- SEMA： 信號蛋白域
- PSI： 叢蛋白、信號蛋白及整合素域
- IPT： 4個免疫球蛋白、叢蛋白及轉錄因子域
- TM： 跨膜區
- JM： 近膜域
- KD： 激酶域

人類MET之細胞外域(本文中MET-ECD)具有例如SEQ ID NO: 35 中所示之胺基酸序列。然而，SEQ ID NO: 35之胺基酸1-24包含信號序列。因此，除非另外說明，否則如本文所用之術語「MET-ECD」意謂分別在SEQ ID NO: 35之胺基酸25及932處開始及結束之成熟蛋白質(亦即SEQ ID NO: 36)。SEMA域由MET之N端處之大約500個胺基酸殘基組成，且含有 α -鏈(SEQ ID NO: 35之胺基酸殘基25-307 (亦即SEQ ID NO: 37))及部分 β -鏈(SEQ ID NO: 35之胺基酸殘基308-519 (亦即SEQ ID NO: 38))。

如本文所用，參考MET或EGFR對腫瘤或細胞株之細胞表面表現的術語「較低」、「中等」及「較高」欲意謂每個細胞分別少於約30萬、大於約30萬及大於約1百萬個受體。

如本文所用，「多功能抗體」係指包含具有一種抗原結合特異性之抗體及具有不同抗原結合特異性之抗原結合片段的分子。較佳地，多功能抗體係指包含以下之分子：i)具有對MET之抗原結合特異性之抗體及ii)具有對EGFR之抗原結合特異性之單鏈可變片段(scFv)。

除非另外指示，否則如本文所用之術語「抗體」意指包含藉由雙硫鍵互連之兩個重鏈(HC)及兩個輕鏈(LC)之免疫球蛋白分子。各鏈之胺基端部分包括主要負責經由其中含有之CDR來識別抗原的約100個至約110個胺基酸之可變區。各鏈之羧基端部分界定主要負責效應功能之恆定區。

除非另外指示，否則如本文所用參考本發明之多功能抗體的術語「NH-YK」意指包含兩個第一多肽及兩個第二多肽之多功能抗體，其中兩個第一多肽均包含胺基酸序列SEQ ID NO: 27；且兩個第二多肽均包含胺基酸序列SEQ ID NO: 33，且其中該多功能抗體結合至EGFR及MET。

除非另外指示，否則如本文所用參考本發明之多功能抗體的術語「NH-H9」意指包含兩個第一多肽及兩個第二多肽之多功能抗體，其中兩個第一多肽均包含胺基酸序列SEQ ID NO: 29；且兩個第二多肽均包含胺基酸序列SEQ ID NO: 33，且其中該多功能抗體結合至EGFR及MET。

除非另外指示，否則如本文所用參考本發明之多功能抗體的術語「H9」意指包含兩個第一多肽及兩個第二多肽之多功能抗體，其中兩個第一多肽均包含胺基酸序列SEQ ID NO: 52；且兩個第二多肽均包含胺基酸序列SEQ ID NO: 33，且其中該多功能抗體結合至EGFR及MET。

除非另外指示，否則如本文所用參考本發明之多功能抗體的術語「YK」意指包含兩個第一多肽及兩個第二多肽之多功能抗體，其

中兩個第一多肽均包含胺基酸序列SEQ ID NO: 31；且兩個第二多肽均包含胺基酸序列SEQ ID NO: 33，且其中該多功能抗體結合至EGFR及MET。

如本文所用之術語「抗原結合片段」欲意謂保留結合至其抗原之能力之任何抗體片段。該等「抗原結合片段」可選自由Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc片段及雙功能抗體組成之群。抗體之抗原結合片段將通常包含至少一個可變區。抗原結合片段較佳包含重鏈可變區(HCVR)及輕鏈可變區(LCVR)。抗原結合片段更佳包含賦予對MET及EGFR之抗原結合特異性之HCVR及LCVR (亦即「MET及EGFR結合片段」)。

如本文所用之術語「互補決定區」及「CDR」欲意謂在抗體或其抗原結合片段之HC及LC多肽之可變區內發現的非鄰近抗原組合位點。此等特定區由他人描述，包括Kabat等人, *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-93 (1971)；Kabat等人, *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616 (1977)；Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH出版物第91-3242 (1991)號；Chothia等人, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)；MacCallum等人, *J. Mol. Biol.*, 262:732-745 (1996)；及North等人, *J. Mol. Biol.*, 406, 228-256 (2011)，其中當相互比較時定義包括胺基酸殘基之重疊或子集。

CDR與稱為構架區(「FR」)之更保守區穿插。各LCVR及HCVR由三個CDR及四個FR組成，其按以下順序自胺基端至羧基端排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。輕鏈之三個CDR稱為「LCDR1、LCDR2及LCDR3」，且重鏈之三個CDR稱為「HCDR1、HCDR2及HCDR3」。CDR含有與抗原形成特異性相互作用之大部分殘基。LCVR及HCVR區內之CDR胺基酸殘基之編號及定位係根據已知

慣例(例如Kabat (1991) Chothia (1987)及/或North (2011))。在本發明之不同實施例中，抗體及/或抗原結合片段(例如scFv)之FR可與人類生殖系序列一致或可經天然或人工修飾。

「單鏈片段可變」或「scFv」或「scFv多肽」係指包含經由連接分子連接之抗體之LCVR域及HCVR域的單摺疊多肽。在此類scFv多肽中，HCVR域及LCVR域可以HCVR-連接子-LCVR或LCVR-連接子-HCVR順序。連接子可為使得HCVR域及LCVR域能夠摺疊成功能性單體單元以識別抗原之可撓肽連接子。本文中scFv之LCVR域之三個CDR稱為「scFv-LCDR1、scFv-LCDR2及scFv-LCDR3」，且本文中scFv之HCVR域之三個CDR稱為「scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3」。

如本文所用之術語「表面電漿子共振(SPR)」係指允許藉由例如使用BIAcore™系統(Biacore Life Sciences Division, GE, Piscataway, NJ)偵測生物感測器基質內之蛋白濃度變化來分析即時相互作用的光學現象。

如本文所用之術語「 K_D 」意指特定抗體-抗原或抗體片段-抗原相互作用之平衡解離常數。

術語「特異性結合」或其類似術語意謂抗體或其抗原結合片段與抗原形成在生理條件下相對穩定之複合物。測定抗體是否特異性結合至抗原之方法在此項技術中為人所熟知且包括例如平衡透析、SPR及其類似方法。舉例而言，如在本發明之情況下使用的「特異性結合」MET或EGFR之抗體包括以如在SPR分析中所量測之少於約10 nM、少於約5 nM、少於約4 nM、少於約3 nM、少於約2 nM、少於約1 nM、少於約0.5 nM、少於約0.3 nM、少於約0.2 nM或少於約0.1 nM之 K_D 結合MET-ECD (或其部分)及/或EGFR-ECD (或其部分)之抗體。(參見例如本文實例1)。本發明之多功能抗體較佳以如在SPR分析中所

量測之介於約10 nM與約0.1 nM之間、介於約5 nM與約0.1 nM之間、介於約2 nM與約0.1 nM之間、介於約1 nM與約0.1 nM之間、介於約0.75 nM與約0.1 nM之間、介於約0.5 nM與約0.1 nM之間的 K_D 特異性結合MET-ECD (或其部分)及EGFR-ECD (或其部分)。

術語「抗原決定基」係指與抗體分子之可變區中的稱為互補位之特異性抗原結合位點相互作用之抗原決定子。單一抗原可具有一個以上的抗原決定基。因此，不同抗體可結合至抗原上之不同區域且可具有不同生物效果。抗原決定基可為構形或線性的。構形抗原決定基由來自線性多肽鏈之不同區段之空間並列胺基酸產生。線性抗原決定基為由多肽鏈中之相鄰胺基酸殘基產生之抗原決定基。在某些情況下，抗原決定基可包括抗原上之醣類、磷醯基或磺醯基部分。

如在本發明內使用之術語「連接分子」或「連接子」較佳表示肽連接子。使用用於本發明之某些實施例之肽連接子將抗體、抗原結合位點及/或包含不同抗原結合位點之抗體片段(例如scFv、全長抗體、 V_H 域及/或 V_L 域)連接在一起以形成根據本發明之多功能抗體。較佳地，肽連接子為具有至少5個胺基酸，較佳至少10個胺基酸，更佳10與50個胺基酸之間的富含甘胺酸之肽。在本發明之一些實施例中，該富含甘胺酸之肽連接子為 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)之 $(G_xS)_n$ 。舉例而言，在本發明之一些實施例中，該富含甘胺酸之肽連接子為 G =甘胺酸， S =絲胺酸， $x=4$ 且 $n=2、3、4$ 或 5 之 $(G_xS)_n$ (亦即分別為GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 47)、GGGGSGGGGS GGGS (SEQ ID NO: 48)、GGGGSGGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 49)或GGGGSGGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 50))。在本發明之某些實施例中，可將額外甘胺酸或蘇胺酸(例如GSTG、TG、GG或GGGT)添加至 $(G_xS)_n$ 格式之富含甘胺酸之肽連接子的任一端。舉例而言，在本發明之一些實施例中，該富含甘胺酸之肽

連接子為GGGSGGGGSGGGGSGSTG (SEQ ID NO: 51)。

術語「C端(C-terminus)」及其語法變體，包括(但不限於)羧基端(carboxyl-terminus/carboxy-terminus)、C端(C-terminal)、C端末端或COOH端，在本文中用於表示可以自由羧基(-COOH)封端之胺基酸鏈(蛋白質或多肽)之末端。當蛋白質自信使RNA轉譯時，其自N端至C端產生。表示肽序列之慣例為在右側描述C端且自N端至C端列出序列。

術語「N端(N-terminus)」及其語法變體，包括(但不限於)胺基端、NH₂端、N端末端或胺端在本文中用於表示以具有自由胺基(-NH₂)之胺基酸封端之胺基酸鏈(蛋白質或多肽)之開端。表示肽序列之慣例為在左側放置N端且自N端至C端列出序列。

片語「人類工程改造抗體」或「人類化抗體」係指本文所揭示之抗體化合物以及具有與本文所揭示之抗體化合物類似之結合及功能特性且具有作為來源於非人類抗體之實質上人類或完全人類包圍CDR的構架區的抗體及其抗原結合片段。「構架區」或「構架序列」係指構架區1至4中之任一者。本發明涵蓋之人類工程改造抗體及抗原結合片段包括構架區1至4中之任何一或多者為實質上或完全人類，亦即存在個別實質上或完全人類構架區1至4之任何可能組合的化合物。舉例而言，此包括構架區1及構架區2，構架區1及構架區3，構架區1、2及3等為實質上或完全人類之抗原結合化合物。實質上人類構架為與已知人類生殖系構架序列具有至少約80%序列一致性之構架。實質上人類構架較佳與已知人類生殖系構架序列具有至少約85%、約90%或約95%序列一致性。

完全人類構架為與已知人類生殖系構架序列一致之構架。人類構架生殖系序列在此項技術中已知，且可自各種來源，包括IMGT®，國際免疫遺傳學資訊系統(參見例如Marie-Paule Lefranc等人, Nucleic Acid Research, 第37卷, Database專刊, D1006-D1012)或自

Marie-Paule Lefranc及Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351之*The Immunoglobulin Facts Book*獲得。舉例而言，生殖系輕鏈構架可選自由以下組成之群：A11、A17、A18、A19、A20、A27、A30、L1、L11、L12、L2、L5、L15、L6、L8、O12、O2及O8；且生殖系重鏈構架區可選自由以下組成之群：VH2-5、VH2-26、VH2-70、VH3-20、VH3-72、VH1-46、VH3-9、VH3-66、VH3-74、VH4-31、VH1-18、VH1-69、VI-13-7、VH3-11、VH3-15、VH3-21、VH3-23、VH3-30、VH3-48、VH4-39、VH4-59及VH5-51。

可使用數種不同方法產生展示與本文所揭示之抗體化合物類似之功能特性的人類工程改造抗體。本文所揭示之特異性抗體化合物可用作模板或親本抗體化合物以製備額外抗體化合物。在一種方法中，將親本抗體化合物CDR移植至與親本抗體化合物構架具有較高序列一致性之人類構架中。新構架之序列一致性將一般為與親本抗體化合物中之對應構架之序列至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%或至少約99%一致。與親本抗體相比，此移植可導致結合親和力降低。若為如此，則構架可在某些位置處基於Queen等人 (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2869揭示之特定準則返回突變成親本構架。描述適用於使小鼠抗體人類化之方法之額外參考文獻包括美國專利第4,816,397號、第5,225,539號及第5,693,761號；如Levitt, J. *Mol. Biol.* 168:595-620 (1983)中所描述之電腦程式ABMOD及ENCAD；及Winter及同事之方法(Jones等人 *Nature* 321:522-525 (1986)；Riechmann等人 *Nature*, 332:323-327 (1988)；及Verhoeyen等人 *Science* 239:1534-1536 (1988)。

應用本發明之教示內容，熟習此項技術者可使用常見技術(例如定點突變誘發)在當前揭示之CDR及構架序列內取代胺基酸且藉此產生來源於本發明序列之其他可變區胺基酸序列。可在特異性取代位點

處引入多至所有19個替代天然存在之胺基酸。本文所揭示之方法可隨後用於篩選此等額外可變區胺基酸序列以鑑別具有所指示之活體內功能之序列。以此方式，可鑑別適用於製備根據本發明之人類工程改造抗體及其抗原結合部分之其他序列。構架內之胺基酸取代較佳限於本文所揭示之三個輕鏈及/或重鏈構架區中之任何一或多者內的一個、兩個或三個位置。CDR內之胺基酸取代較佳限於三個輕鏈及/或重鏈CDR中之任何一或多者內的一個、兩個或三個位置。本文中亦涵蓋上文所述之此等構架區及CDR內之各種變化之組合。

以下表1及2描述本文所揭示的較佳人類工程改造抗體之CDR之胺基酸序列及共同胺基酸序列，及本文所揭示的較佳人類工程改造抗體或其抗原結合片段之HCVR及LCVR多肽之胺基酸序列之SEQ ID NO。

表1

	HCDR1	HCDR2	HCDR3	HCVR
抗EGFR scFv YK	GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)	VIYSGGNTDYNTPF KG (SEQ ID NO: 2)	ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)	17
抗EGFR scFv H9	GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)	VIWSGGNTDYNTPF TG (SEQ ID NO: 7)	ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)	19
抗EGFR scFv 共同	GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)	VIX ₁ SGGNTDYNTPF X ₂ G (SEQ ID NO: 9)	ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)	
抗Met Ab	GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 11)	RVNPNRRGTTYNQK FEG (SEQ ID NO: 12)	ARANWLDY (SEQ ID NO: 13)	21

在以上表1中，X₁為Y或W且X₂為K或T。

表2

	LCDR1	LCDR2	LCDR3	LCVR
抗EGFR scFv YK	RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)	RYAKESIS (SEQ ID NO: 5)	QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)	18
抗EGFR scFv H9	RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)	YYASRSIS (SEQ ID NO: 8)	QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)	20
抗EGFR scFv 共同	RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)	X ₁ YA X ₂ X ₃ SIS (SEQ ID NO: 10)	QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)	
抗MET Ab	SVSSSVSSIYLH (SEQ ID NO: 14)	YSTSNLAS (SEQ ID NO: 15)	QVYSGYPLT (SEQ ID NO: 16)	22

在以上表2中，X₁為R或Y，X₂為K或S，且X₃為E或R。

本發明之一實施例為包含以下之多功能抗體：

(a)結合至MET之 α 鏈內選自由以下組成之群之胺基酸序列處之抗原決定基的抗體：

- i) VVDTTYDDQL (SEQ ID NO: 39) ,
- ii) ISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQS (SEQ ID NO: 40) ,
- iii) ALGAKVLSSVKDRFINF (SEQ ID NO: 41) , 及
- iv) VRRLKETKDGFM (SEQ ID NO: 42) ; 及

(b)結合至EGFR且包含以下之scFv多肽：

i) 包含分別由胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1) 、VIX₁SGGNTDYNTFPX₂G (SEQ ID NO: 9) (其中X₁為Y或W且X₂為K或T)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域；及

ii) 包含分別由胺基酸序列RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4) 、X₁YAX₂X₃SIS (SEQ ID NO: 10) (其中X₁為R或Y，X₂為K或S，且X₃為E或R)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2及scFv-LCDR3之LCVR域，其中多功能抗體誘導細胞表面MET及EGFR之內化及/或降解。

在本發明之各種實施例中，多功能抗體結合至MET之 α 鏈內胺基酸序列 i) VVDTTYDDQL (SEQ ID NO: 39) , ii) ISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQS (SEQ ID NO: 40) , iii) ALGAKVLSSVKDRFINF (SEQ ID NO: 41)及/或iv) VRRLKETKDGFM (SEQ ID NO: 42)處之抗原決定基。在本發明之各種實施例中，多功能抗體可結合至MET之 α 鏈內選自由以下組成之群之胺基酸序列處之抗原決定基：

- i) DTTYDD (SEQ ID NO: 43) ,
- ii) HVFPHNHTADIQS (SEQ ID NO: 44) ,
- iii) FINF (SEQ ID NO: 45) , 及

iv) KETKDGFM (SEQ ID NO: 46)。

在本發明之各種實施例中，多功能抗體可結合藉由所包括之胺基酸序列DTYYDD (SEQ ID NO: 43)、HVFPHNHTADIQS (SEQ ID NO: 44)、FINF (SEQ ID NO: 45)及KETKDGFM (SEQ ID NO: 46)表徵之構形抗原決定基。此外，在本發明之各種實施例中，多功能抗體分別誘導細胞表面MET及EGFR之HGF獨立及EGF獨立內化及/或降解。在本發明之其他實施例中，結合至EGFR之scFv多肽包含：

i)包含分別由胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIYSGGNTDYNTPFKG (SEQ ID NO: 2)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域，及ii)包含分別由胺基酸序列RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、RYAKESIS (SEQ ID NO: 5)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2及scFv-LCDR3之LCVR域。在本發明之其他實施例中，結合至EGFR之scFv多肽包含：i)包含分別由胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIYSGGNTDYNTPFKG (SEQ ID NO: 2)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域；及ii)包含分別由胺基酸序列RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、RYAKESIS (SEQ ID NO: 5)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2及scFv-LCDR3之LCVR域，且其中scFv多肽之C端經由肽連接子融合至MET抗體重鏈之N端。

本發明之一實施例為包含以下之多功能抗體：

(a) 結合MET且包含以下之抗體：

i) 包含分別由胺基酸序列GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 11)、RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 12)及ARANWLDY (SEQ ID NO: 13)組成之重鏈CDR HCDR1、HCDR2及HCDR3之重鏈；及

ii) 包含分別由胺基酸序列SVSSSVSSIYLH (SEQ ID NO: 14)、YSTSNLAS (SEQ ID NO: 15)及QVYSGYPLT (SEQ ID NO: 16)組成之輕鏈CDR LCDR1、LCDR2及LCDR3之輕鏈；及

(b) 結合至EGFR且包含以下之scFv多肽：

i) 包含分別由胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIX₁SGGNTDYNTPF₂X₂G (SEQ ID NO: 9) (其中X₁為Y或W且X₂為K或T)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域；及

ii) 包含分別由胺基酸序列RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、X₁YAX₂X₃SIS (SEQ ID NO: 10) (其中X₁為R或Y，X₂為K或S，且X₃為E或R)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2及scFv-LCDR3之LCVR域。

在本發明之其他實施例中，結合至EGFR之scFv多肽包含：

i) 包含分別由胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIYSGGNTDYNTPFKG (SEQ ID NO: 2)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域；及

ii) 包含分別由胺基酸序列RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、RYAKESIS (SEQ ID NO: 5)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2及scFv-LCDR3之LCVR域。

在本發明之其他實施例中，結合至EGFR之scFv多肽包含HCVR域及LCVR域，該HCVR域包含胺基酸序列SEQ ID NO: 17，該LCVR域包含胺基酸序列SEQ ID NO: 18。在本發明之其他實施例中，結合至EGFR之scFv多肽包含：

i) 包含分別由胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIYSGGNTDYNTPFKG (SEQ ID NO: 2)及ARALDYDYDFAY (SEQ

ID NO: 3)組成之 scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域；及

ii) 包含分別由胺基酸序列 RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、RYAKESIS (SEQ ID NO: 5)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之 scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2及scFv-LCDR3之LCVR域，且其中scFv多肽之C端經由肽連接子融合至MET抗體重鏈之N端。

在本發明之其他實施例中，多功能抗體包含：

i) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 53之重鏈；及

ii) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 33之輕鏈。

本發明之一實施例為包含以下之多功能抗體：

(a) 結合MET且包含以下之抗體：

i) 包含分別由胺基酸序列GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 11)、RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 12)及ARANWLDY (SEQ ID NO: 13)組成之重鏈CDR HCDR1、HCDR2及HCDR3之重鏈；及

ii) 包含分別由胺基酸序列SVSSSVSSIYH (SEQ ID NO: 14)、YSTSNLAS (SEQ ID NO: 15)及QVYSGYPLT (SEQ ID NO: 16)組成之輕鏈CDR LCDR1、LCDR2及LCDR3之輕鏈；及

(b)結合至EGFR且包含以下之scFv多肽：

i) 包含分別由胺基酸序列 GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIX₁SGGNTDYNTDPFX₂G (SEQ ID NO: 9) (其中X₁為Y或W且X₂為K或T)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之 scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域，及

ii) 包含分別由胺基酸序列 RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、X₁YAX₂X₃SIS (SEQ ID NO: 10) (其中X₁為R或Y，X₂為K或S，且X₃為E或R)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之 scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2及scFv-LCDR3之LCVR域。

在本發明之其他實施例中，結合至EGFR之scFv多肽包含：

i) 包含分別由胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIWSGGNTDYNTPTFG (SEQ ID NO: 7)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域；及

ii) 包含分別由胺基酸序列RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、YYASRSIS (SEQ ID NO: 8)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2、scFv-LCDR3之LCVR域。

在本發明之其他實施例中，結合至EGFR之scFv多肽包含：

i) 包含分別由胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIWSGGNTDYNTPTFG (SEQ ID NO: 7)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域；及

ii) 包含分別由胺基酸序列RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、YYASRSIS (SEQ ID NO: 8)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2、scFv-LCDR3之LCVR域，且其中scFv多肽之C端經由肽連接子融合至MET抗體重鏈之N端。

在本發明之其他實施例中，多功能抗體包含：

- i) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 53之重鏈；及
- ii) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 33之輕鏈。

本發明之另一實施例為包含以下之多功能抗體：

(a) 結合MET且包含以下之抗體：

i) 第一重鏈及第二重鏈，其中重鏈中之每一者包含分別由胺基酸序列GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 11)、RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 12)及ARANWLDY (SEQ ID NO: 13)組成之重鏈CDR HCDR1、HCDR2及HCDR3；及

ii) 第一輕鏈及第二輕鏈，其中輕鏈中之每一者包含分別由胺基酸序列SVSSSVSSIYLH (SEQ ID NO: 14)、YSTSNLAS (SEQ ID NO: 15)及QVYSGYPLT (SEQ ID NO: 16)組成之輕鏈CDR LCDR1、LCDR2及LCDR3；及

(b) 第一scFv多肽及第二scFv多肽，其中scFv多肽中之每一者結合至人類EGFR且其中scFv多肽中之每一者包含：

i) 包含分別由胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIX₁SGGNTDYNTPF₂G (SEQ ID NO: 9) (其中X₁為Y或W且X₂為K或T)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域；及

ii) 包含分別由胺基酸序列RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、X₁YAX₂X₃SIS (SEQ ID NO: 10) (其中X₁為R或Y，X₂為K或S，且X₃為E或R)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2及scFv-LCDR3之LCVR域，且其中第一scFv多肽之C端經由肽連接子融合至第一重鏈之N端且第二scFv多肽之C端經由肽連接子融合至第二重鏈之N端。

在本發明之各種實施例中，多功能抗體結合至MET之 α 鏈內選自由以下組成之群之胺基酸序列處之抗原決定基：

- i) VVDITYYDDQL (SEQ ID NO: 39)，
- ii) ISCGSVNRGTCQRHVFPNHTADIQS (SEQ ID NO: 40)，
- iii) ALGAKVLSSVKDRFINF (SEQ ID NO: 41)，及
- iv) VRRLKETKDGFM (SEQ ID NO: 42)。

在本發明之各種實施例中，多功能抗體可結合至MET之 α 鏈內胺基酸序列 i) VVDITYYDDQL (SEQ ID NO: 39)， ii) ISCGSVNRGTCQRHVFPNHTADIQS (SEQ ID NO: 40)， iii) ALGAKVLSSVKDRFINF (SEQ ID NO: 41)及/或iv) VRRLKETKDGFM

(SEQ ID NO: 42)處之抗原決定基。在本發明之各種實施例中，多功能抗體可結合藉由所包括之胺基酸序列DTYYDD (SEQ ID NO: 43)、HVFPHNHTADIQS (SEQ ID NO: 44)、FINF (SEQ ID NO: 45)及KETKDGFM (SEQ ID NO: 46)表徵之構形抗原決定基。在本發明之其他實施例中，多功能抗體包含：

- i) 第一重鏈及第二重鏈，其中兩條重鏈均包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 53；及
- ii) 第一輕鏈及第二輕鏈，其中兩條輕鏈均包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 33。

此外，在本發明之各種實施例中，多功能抗體分別誘導細胞表面MET及EGFR之HGF獨立及EGF獨立內化及/或降解。

本發明之另一實施例為包含以下之多功能抗體：

(a) 結合MET且包含以下之抗體：

- i) 第一重鏈及第二重鏈，其中重鏈中之每一者包含分別由胺基酸序列 GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 11)、RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 12)及ARANWLDY (SEQ ID NO: 13)組成之重鏈CDR HCDR1、HCDR2及HCDR3；及
- ii) 第一輕鏈及第二輕鏈，其中輕鏈中之每一者包含分別由胺基酸序列 SVSSSVSSIYLH (SEQ ID NO: 14)、YSTSNLAS (SEQ ID NO: 15)及QVYSGYPLT (SEQ ID NO: 16)組成之輕鏈CDR LCDR1、LCDR2及LCDR3；及

(b) 第一scFv多肽及第二scFv多肽，其中scFv多肽中之每一者結合至人類EGFR且其中scFv多肽中之每一者包含：

- i) 包含分別由胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIX₁SGGNTDYNTPEFX₂G (SEQ ID NO: 9) (其中X₁為Y或W且X₂為K或T)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之scFv CDR scFv-

HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域；及

ii) 包含分別由胺基酸序列RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、 $X_1YAX_2X_3SIS$ (SEQ ID NO: 10) (其中 X_1 為R或Y， X_2 為K或S，且 X_3 為E或R)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2及scFv-LCDR3之LCVR域，且其中第一scFv多肽之C端經由肽連接子融合至第一重鏈之N端且第二scFv多肽之C端經由肽連接子融合至第二重鏈之N端。

在本發明之其他實施例中，結合至EGFR之第一及第二scFv多肽中之每一者包含：i)包含分別由胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIYSGGNTDYNTPFKG (SEQ ID NO: 2)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域；及ii)包含分別由胺基酸序列RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、RYAKESIS (SEQ ID NO: 5)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2及scFv-LCDR3之LCVR域。或者，結合至EGFR之第一及第二scFv多肽中之每一者包含：i)包含分別由胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIWSGGNTDYNTPF TG (SEQ ID NO: 7)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域；及ii)包含分別由胺基酸序列RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、YYASRSIS (SEQ ID NO: 8)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2及scFv-LCDR3之LCVR域。

本發明之另一實施例為包含以下之多功能抗體：

(a) 結合MET且包含以下之抗體：

i) 第一重鏈及第二重鏈，其中兩條重鏈均包含胺基酸序列SEQ ID NO: 53；及

ii) 第一輕鏈及第二輕鏈，其中兩條輕鏈均包含胺基酸序列

SEQ ID NO: 33 ; 及

(b) 第一 scFv 多肽及第二 scFv 多肽，其中兩個 scFv 多肽均結合至 EGFR 且兩個 scFv 多肽均包含：

i) 包含分別由胺基酸序列 GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIX₁SGGNTDYNTPF₂X₂G (SEQ ID NO: 9) (其中 X₁ 為 Y 或 W 且 X₂ 為 K 或 T) 及 ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3) 組成之 scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2 及 scFv-HCDR3 之 HCVR 域；及

ii) 包含分別由胺基酸序列 RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、X₁YAX₂X₃SIS (SEQ ID NO: 10) (其中 X₁ 為 R 或 Y，X₂ 為 K 或 S，且 X₃ 為 E 或 R) 及 QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6) 組成之 scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2 及 scFv-LCDR3 之 LCVR 域，且其中第一 scFv 多肽之 C 端經由肽連接子融合至第一重鏈之 N 端且第二 scFv 多肽之 C 端經由肽連接子融合至第二重鏈之 N 端。

在本發明之其他實施例中，第一及第二 scFv 多肽包含：i) 包含分別由胺基酸序列 GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIYSGGNTDYNTPFKG (SEQ ID NO: 2) 及 ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3) 組成之 scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2 及 scFv-HCDR3 之 HCVR 域；及 ii) 包含分別由胺基酸序列 RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、RYAKESIS (SEQ ID NO: 5) 及 QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6) 組成之 scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2 及 scFv-LCDR3 之 LCVR 域。或者，兩個 scFv 多肽均包含：i) 包含分別由胺基酸序列 GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIWSGGNTDYNTPF₂TG (SEQ ID NO: 7) 及 ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3) 組成之 scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2 及 scFv-HCDR3 之 HCVR 域；及 ii) 包含分別由胺基酸序列 RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、YYASRSIS (SEQ ID NO: 8) 及 QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6) 組成之 scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-

LCDR2及scFv-LCDR3之LCVR域。

在一個實施例中，本發明提供一種包含以下之多功能四價抗體：

(a)包含兩條重鏈及兩條輕鏈且能夠結合至MET之 α 鏈內選自由以下組成之群之胺基酸序列處之抗原決定基的抗體：

- i) VVDITYYDDQL (SEQ ID NO: 39)，
- ii) ISCGSVNRGTCQRHVFPNHTADIQS (SEQ ID NO: 40)，
- iii) ALGAKVLSSVKDRFINF (SEQ ID NO: 41)，及
- iv) VRRLKETKDGM (SEQ ID NO: 42)；及

(b)能夠結合至EGFR的包含SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 19之重鏈可變區及SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 20之輕鏈可變區之兩個scFv多肽，其中多功能抗體誘導細胞表面MET及EGFR之內化及/或降解。在本發明之各種實施例中，多功能抗體可結合至MET之 α 鏈內胺基酸序列 i) VVDITYYDDQL (SEQ ID NO: 39)， ii) ISCGSVNRGTCQRHVFPNHTADIQS (SEQ ID NO: 40)， iii) ALGAKVLSSVKDRFINF (SEQ ID NO: 41)及/或iv) VRRLKETKDGM (SEQ ID NO: 42)處之抗原決定基。在本發明之各種實施例中，多功能抗體可結合藉由所包括之胺基酸序列DTYYDD (SEQ ID NO: 43)、HVFPHNHTADIQS (SEQ ID NO: 44)、FINF (SEQ ID NO: 45)及KETKDGM (SEQ ID NO: 46)表徵之構形抗原決定基。此外，在本發明之各種實施例中，多功能抗體分別誘導細胞表面MET及EGFR之HGF獨立及EGF獨立內化及/或降解。

在本發明之一個實施例中，提供一種多功能四價抗體，其包含：(a)各能夠結合至EGFR之兩個相同scFv多肽；及(b)特異性結合至由如呈SEQ ID NO: 36形式之胺基酸序列組成之MET-ECD的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：

分別由胺基酸序列 SVSSSVSSIYLH (SEQ ID NO: 14)、YSTSNLAS (SEQ ID NO: 15)及QVYSGYPLT (SEQ ID NO: 16)組成之輕鏈CDR LCDR1、LCDR2及LCDR3，及

分別由胺基酸序列 GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 11)、RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 12)及ARANWLDY (SEQ ID NO: 13)組成之重鏈CDR HCDR1、HCDR2及HCDR3。

在本發明之一個實施例中，提供一種多功能四價抗體，其包含(a)各能夠結合至EGFR之兩個相同scFv多肽；及(b)包含兩條重鏈及兩條輕鏈且能夠結合至MET之MET抗體，其中能夠結合至EGFR之兩個相同scFv多肽經由肽連接子在該全長抗體之各重鏈之C端處C端融合至MET抗體。在本發明之一些實施例中，均來源於抗MET純系C8-H241 (其詳細描述於WO 2010/059654中)之SEQ ID NO: 21之重鏈可變區及SEQ ID NO: 22之輕鏈可變區可用於形成特異性結合至MET之MET抗體之抗原結合位點。

藉由基因合成及重組分子生物學技術，SEQ ID NO: 17之HCVR及SEQ ID NO: 18之LCVR，或SEQ ID NO: 19之HCVR及SEQ ID NO: 20之LCVR藉由式 $(G_xS)_n$ ， $x = 4$ ， $n = 5$ 之富含甘胺酸之連接子連接形成特異性結合至EGFR之scFv。EGFR結合scFv隨後藉由另一富含甘胺酸之連接子附接至抗MET抗體C8-H241 (人類IgG4亞型)之重鏈之N端或C端，產生多功能抗體NH-YK (包含抗EGFR YK_n-scFv及抗Met HC融合體(亦即SEQ ID NO: 27))、NH-H9 (包含抗EGFR H9_n-scFv及抗Met HC融合體(亦即SEQ ID NO: 29))、YK (包含抗Met HC及抗EGFR YK-scFv融合體(亦即SEQ ID NO: 31))及H9 (包含抗Met HC及抗EGFR H9-scFv融合體(亦即SEQ ID NO: 52))。

本發明之另一實施例為結合MET及EGFR之多功能抗體，其包含：(a)兩個第一多肽，其中兩個第一多肽均包含胺基酸序列SEQ ID

NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 52或SEQ ID NO: 53；及(b)兩個第二多肽，其中兩個第二多肽均包含胺基酸序列SEQ ID NO: 33。

本發明之另一實施例為包含結合MET及EGFR之多功能抗體之醫藥組合物，該多功能抗體包含：(a)兩個第一多肽，其中兩個第一多肽均包含胺基酸序列SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 52或SEQ ID NO: 53；及(b)兩個第二多肽，其中兩個第二多肽均包含胺基酸序列SEQ ID NO: 33；及醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。

本發明之另一實施例為一種治療癌症之方法，其包含向有需要之患者投與有效量之結合MET及EGFR之多功能抗體，該多功能抗體包含：(a)兩個第一多肽，其中兩個第一多肽均包含胺基酸序列SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 52或SEQ ID NO: 53；及(b)兩個第二多肽，其中兩個第二多肽均包含胺基酸序列SEQ ID NO: 33。在本發明之一些實施例中，癌症為NSCLC、SCLC、胃癌、結腸直腸癌、膽管癌、食道癌、黑素瘤、葡萄膜黑素瘤、腎癌、肝癌、膀胱癌、子宮頸癌或頭頸癌。在本發明之一些實施例中，癌症患者為人類。在本發明之其他實施例中，患者之腫瘤藉由包含具有一或多種KRAS突變之細胞表徵。在本發明之其他實施例中，提供一種治療癌症之方法，其包括向有需要之患者投與醫藥學上有效量之前述多功能抗體中之一種，或其MET及EGFR結合片段，其中MET及/或EGFR以低、中或高水準下由患者之腫瘤及/或對或已變得對一或多種抗EGFR抗體(例如西妥昔單抗、帕尼單抗等)及/或一或多種EGFR小分子抑制劑(例如埃羅替尼)具有抗性之腫瘤或腫瘤(包括(但不限於)有KRAS突變之腫瘤)表現。在本發明之各種實施例中，治療其中MET及/或EGFR以低、中或高水準由

患者之腫瘤表現及/或其中腫瘤對或已變得對一或多種抗EGFR抗體(例如西妥昔單抗、帕尼單抗等)及/或一或多種EGFR小分子抑制劑(例如埃羅替尼)具有抗性(包括(但不限於)具有KRAS突變之腫瘤)之癌症的方法可在向患者投與多功能抗體或其MET及EGFR結合片段之步驟之前進一步包含藉由量測由患者之腫瘤表現之MET及EGFR之含量及/或評估患者之腫瘤是否包含具有一或多種KRAS突變之細胞來鑑別需要癌症治療之患者之步驟。

以下表3描述本發明之scFv及scFv融合體之胺基酸序列之SEQ ID NO。

表3

	YK-scFv	YK _n -scFv及抗MET HCVR融合體	YK _n -scFv及抗MET HC融合體	抗MET HC及YK-scFv融合體
SEQ ID NO:	23	25	27	31
	H9-scFv	H9 _n -scFv及抗MET HCVR融合體	H9 _n -scFv及抗MET HC融合體	抗MET HC及H9-scFv融合體
SEQ ID NO:	24	26	29	52

當參考scFv (包括以上表3中之scFv)在本文中使用時，下標「n」指示抗EGFR YK scFv或抗EGFR H9 scFv融合至MET抗體重鏈之N端。

本發明之另一實施例為包含兩個相同第一多肽及兩個相同第二多肽之多功能抗體，其中第一多肽之胺基酸序列為SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 29，且第二多肽之胺基酸序列為SEQ ID NO: 33，其中該多功能抗體結合至EGFR及MET。此外，在本發明之各種實施例中，多功能抗體分別誘導細胞表面MET及EGFR之HGF獨立及EGF獨立內化及/或降解。

使用標準分子生物學技術來製備重組表現載體，轉染宿主細胞，選擇轉型體，分離產生本發明之多功能抗體之宿主細胞株，培養此等宿主細胞且自培養基回收抗體。

本發明亦關於表現本發明之多功能抗體之宿主細胞。可使用此項技術中已知之廣泛多種宿主表現系統表現本發明之抗體，包括原核(細菌)及真核表現系統(諸如酵母、桿狀病毒、植物、哺乳動物及其他動物細胞、轉殖基因動物及融合瘤細胞)。

可藉由宿主細胞中之免疫球蛋白之重組表現製備本發明之多功能抗體。為了在宿主細胞中以重組方式表現抗體，用一或多種攜帶編碼多功能抗體之輕鏈及/或scFv重鏈融合體之DNA片段的重組表現載體將宿主細胞轉型、轉導、感染或其類似處理。重鏈及輕鏈可在一個載體中自其可操作地連接之不同啟動子獨立地表現，或者重鏈及輕鏈可在兩個載體(一個表現重鏈且一個表現輕鏈)中自其可操作地連接之不同啟動子獨立地表現。視情況重鏈及輕鏈可在不同宿主細胞中表現。較佳地，將重組抗體分泌至其中培養宿主細胞，可自其回收或純化抗體之培養基中。

編碼HCVR區之經分離DNA可藉由將編碼HCVR之DNA可操作地連接於編碼重鏈恆定區之另一DNA分子來轉化成全長重鏈基因。人類以及其他哺乳動物重鏈恆定區基因之序列在此項技術中已知。可例如藉由標準PCR擴增獲得包涵此等區之DNA片段。重鏈恆定區可為如Kabat (前述)中所描述之任何類型(例如IgG、IgA、IgE、IgM或IgD)、種類(例如IgG₁、IgG₂、IgG₃及IgG₄)或子類恆定區及其任何異型變異體。

編碼LCVR區之經分離DNA可藉由將編碼LCVR之DNA可操作地連接於編碼輕鏈恆定區之另一DNA分子來轉化成全長輕鏈基因(以及Fab輕鏈基因)。人類以及其他哺乳動物輕鏈恆定區基因之序列在此項技術中已知。可藉由標準PCR擴增獲得包涵此等區之DNA片段。輕鏈恆定區可為κ或λ恆定區。

除抗體重鏈及/或輕鏈基因外，本發明之重組表現載體攜帶控制

抗體鏈基因在宿主細胞中之表現之調節序列。術語「調節序列」視需要意欲包括啟動子、強化子及其他表現控制元件(例如，聚腺苷酸化信號)，其控制抗體鏈基因之轉錄或轉譯。表現載體之設計(包括調節序列之選擇)可視諸如待轉型之宿主細胞之選擇、所需蛋白質之表現量的因素而定。用於哺乳動物宿主細胞表現之較佳調節序列包括在哺乳動物細胞中引導高蛋白質表現量之病毒元件，諸如來源於細胞巨大病毒(CMV)、猴病毒40 (SV40)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期啟動子(AdMLP))及/或多瘤病毒之啟動子及/或強化子。

另外，本發明之重組表現載體可攜帶額外序列，諸如調節載體在宿主細胞中之複製之序列(例如複製來源)；及一或多個可選擇標記基因。可選擇標記基因促進已引入載體之宿主細胞之選擇。舉例而言，對於已引入載體之宿主細胞，可選擇標記基因通常賦予對諸如G418、潮黴素或甲胺喋呤之藥物之抗性。較佳可選擇標記基因包括二氫葉酸還原酶(*dhfr*)基因(用於使用甲胺喋呤選擇/擴增之*dhfr*(-)宿主細胞)、*neo*基因(用於G418選擇)及用於選擇/擴增之麩醯胺酸合成酶(GS)陰性細胞株(諸如NS0)中之GS。

為表現輕鏈及/或重鏈，藉由例如電穿孔、磷酸鈣沈澱、DEAE聚葡萄糖轉染、轉導、感染及其類似技術之標準技術將編碼重鏈及/或輕鏈之表現載體引入宿主細胞中。儘管理論上有可能在原核或真核宿主細胞中表現本發明抗體，但真核細胞較佳且最佳為哺乳動物宿主細胞，因為該等細胞更有可能組裝且分泌適當摺疊且具有免疫活性之抗體。用於表現本發明之重組抗體之較佳哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢(CHO細胞) [包括如Urlaub及Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-20, 1980中所述之*dhfr*(-) CHO細胞，其與例如如Kaufman及Sharp, *J. Mol. Biol.*, 159:601-21, 1982中所述之DHFR可選擇標記一起使用]、NS0骨髓瘤細胞、COS細胞及SP2/0細胞。當將編碼抗體基因

之重組表現載體引入哺乳動物宿主細胞中時，藉由持續足以允許抗體在宿主細胞中表現或更佳地，將抗體分泌至在此項技術中已知之適當條件下生長宿主細胞之培養基中之時段培養宿主細胞來產生抗體。可使用標準純化方法自宿主細胞及/或培養基回收抗體。

宿主細胞亦可用於藉由習知技術產生完整抗體之部分或片段，例如Fab片段或scFv分子。舉例而言，可能需要用編碼本發明抗體之輕鏈或重鏈之DNA轉染宿主細胞。亦可使用重組DNA技術移除結合至EGFR及MET不需要的編碼輕鏈及重鏈中之任一者或兩者之一些或所有DNA。本發明抗體亦涵蓋自該等截短之DNA分子表現之分子。

本發明提供包含本發明之核酸分子之宿主細胞。較佳地，本發明之宿主細胞包含一或多種包含本發明之核酸分子的載體或構築體。舉例而言，本發明之宿主細胞為已引入本發明載體之細胞，該載體包含編碼本發明抗體之LCVR之聚核苷酸及/或編碼本發明HCVR之聚核苷酸。本發明亦提供已引入本發明之兩種載體之宿主細胞；一種載體包含編碼本發明抗體之LCVR的聚核苷酸且一種載體包含編碼本發明抗體中存在之HCVR的聚核苷酸，且各載體可操作地連接於強化子/啟動子調節元件(例如，來源於SV40、CMV、腺病毒及其類似物，諸如CMV強化子/AdMLP啟動子調節元件或SV40強化子/AdMLP啟動子調節元件)以驅動高水準之基因轉錄。

一旦經表現，本發明之完整抗體、個別輕鏈及重鏈或其他免疫球蛋白形式可根據此項技術之標準程序來進行純化，該等標準程序包括硫酸銨沈澱、離子交換、親和力(例如蛋白質A)逆相疏水性相互作用管柱層析、羧磷灰石層析、凝膠電泳及其類似程序。就醫藥用途而言，具有至少約90%、約92%、約94%或約96%均質性之實質上純之免疫球蛋白為較佳的，且具有約98至約99%或99%以上均質性之實質上純之免疫球蛋白為最佳的。一旦經純化(視需要部分地或達到均質

性)，無菌抗體隨後可如本文中所指導在治療上使用。

如本文所用之術語「經分離聚核苷酸」應意謂基因組、cDNA或合成來源或其一些組合之聚核苷酸，由於其來源，該經分離聚核苷酸(1)不與天然含有該經分離聚核苷酸之聚核苷酸之所有或部分相關聯，(2)連接至天然不與其連接之聚核苷酸，或(3)天然不作為較大序列之部分存在。

「經分離」多功能抗體為自其天然環境之組分鑑別及分離及/或回收之抗體。其天然環境之污染組分為可干擾抗體之診斷或治療用途之物質，且可包括酶、激素及其他蛋白質或非蛋白質溶質。在較佳實施例中，將抗體(1)純化至如藉由Lowry方法所測定之大於95重量%，且最佳大於99重量%之抗體；(2)純化至足以藉由使用旋杯式定序儀獲得N端或內部胺基酸序列之至少15個殘基之程度；或(3)使用庫馬斯藍(Coomassie blue)，SimplyBlue™ SafeStain (Life Technologies)或較佳銀染料，在還原或非還原性條件下藉由SDS-PAGE純化至均質。經分離抗體包括原位在重組細胞內之抗體，因為抗體之天然環境之至少一個組分將不存在。

如本文所用，「實質上純」或「實質上純化」意謂作為存在之主要物質之化合物或物質(亦即，以莫耳計，其比組合物中之任何其他個別物質均更充足)。在某些實施例中，實質上純化組合物為物質佔所存在之所有巨分子物質之至少約50% (以莫耳計)之組合物。在某些實施例中，實質上純組合物將佔存在於組合物中之所有巨分子物質之約80%、85%、90%、95%或99%以上。在某些實施例中，將物質純化至基本均質性(無法藉由習知偵測方法在組合物中偵測到污染物質)，其中組合物基本上由單一巨分子物質組成。

在另一實施例中，本發明提供一種編碼選自由SEQ ID NO: 27、29及33組成之群之胺基酸序列的經分離聚核苷酸。

在另一實施例中，本發明提供一種重組表現載體，其包含編碼選自由SEQ ID NO: 27、29及33組成之群之胺基酸序列的聚核苷酸。

本發明亦提供前述抗MET/EGFR多功能抗體中之任一者，或其MET及EGFR結合片段，其用於療法。

本發明亦提供前述抗MET/EGFR多功能抗體中之任一者，或其MET及EGFR結合片段，其用於治療癌症。

本發明亦提供前述抗MET/EGFR多功能抗體中之任一者，或其MET及EGFR結合片段，其用於治療MET及EGFR均表現之癌症。

本發明亦提供前述抗MET/EGFR多功能抗體中之任一者，或其MET及EGFR結合片段，其用於治療NSCLC、SCLC、胃癌、結腸直腸癌、膽管癌、食道癌、黑素瘤(包括(但不限於)葡萄膜黑素瘤)、腎癌、肝癌、膀胱癌、子宮頸癌或頭頸癌。

本發明亦提供一種治療癌症之方法，其包含向有需要之人類患者投與有效量之前述多功能抗體中之任一者，或其MET及EGFR結合片段。

術語「治療(treating/treat/treatment)」係指使症狀、病症、病狀或疾病之進展或嚴重程度減緩、中斷、停滯、控制、停止、降低或逆轉，但不必涉及所有疾病相關症狀、病狀或病症之總體消除。

術語「癌症」(或「一種癌症」)係指增生性疾病，諸如肺癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、頭部或頸部癌症、直腸癌、肛門區癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、結腸癌、結腸直腸癌(CRC)、食道癌、黑素瘤(包括(但不限於)葡萄膜黑素瘤)、肝癌、子宮頸癌、膀胱癌、腎癌或尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌，包括以上癌症中之任一者之難治性型式，或以上癌症中之一或多者之組合。

如本文所用之片語「有效量」係指實現所需治療結果所必需之

量(在投與劑量下及持續投與時段且用於投與方式)。多功能抗體之有效量可根據諸如個體之疾病病況、年齡、性別、及體重，及抗體或其MET及EGFR結合片段之能力的因素變化以在個體中引發所需反應。有效量亦為抗體或其MET及EGFR結合片段之治療有利作用超過任何有害作用的量。

有效量為賦予個體治療效益所需之活性劑之至少最小量，但少於總有害量。換言之，本發明之抗體之有效量或治療有效量為在哺乳動物(較佳人類)中減少癌細胞數目；減小腫瘤尺寸；抑制(亦即在一定程度上減慢或停止)癌細胞浸潤至周邊組織器官中；抑制(亦即在一定程度上減慢或停止)腫瘤轉移；在一定程度上抑制腫瘤生長；及/或在一定程度上減輕一或多種與癌症相關聯之症狀的量。有效量之本發明之抗MET/EGFR多功能抗體可以單劑量或多劑量投與。此外，有效量之本發明之抗MET/EGFR多功能抗體可以將少於若投與不超過一次之有效量之量的多劑量投與。

如醫學技術中所熟知，用於任一個體之劑量均視多種因素而定，該等因素包括患者之體型、體表面積、年齡、待投與之特定化合物、性別、投與時間及途徑、一般健康狀況及同時投與之其他藥物。劑量可視疾病之類型及嚴重程度進一步變化。典型劑量可例如在約1 mg至約100 mg、較佳約2 mg至約100 mg、更佳約5 mg至約100 mg、甚至更佳約5 mg至約50 mg、甚至更佳約5 mg至約25 mg、甚至更佳約5 mg至約20 mg、甚至更佳約5 mg至約15 mg之範圍內；然而，亦預見低於或高於此例示性範圍之劑量，尤其在考慮上述因素時如此。每日非經腸給藥方案可為約10 μ g/kg至約10 mg/kg。可藉由週期性評估監控進展，且相應地調整劑量。

在本發明之一些實施例中，可靜脈內投與單劑量之本發明多功能抗體以治療成人患者之癌症。用於靜脈內投與之典型單劑量可例如

在約100 mg至約1250 mg、較佳約200 mg至約1250 mg、更佳約500 mg至約1250 mg、甚至更佳約750 mg至約1250mg、甚至更佳約800 mg至約1250 mg、甚至更佳或最佳約800 mg至約1000 mg範圍內；然而亦預見低於或高於此例示性範圍之劑量，尤其在考慮上述因素時如此。或者，用於靜脈內投與本發明之多功能抗體之典型單劑量可為例如約10 mg/kg至約20 mg/kg體重、更佳約12 mg/kg至約15 mg/kg、或甚至更佳約12 mg/kg至約13 mg/kg。該等劑量可例如每週一次、每兩週一次、每三週一次或每月一次靜脈內投與。可藉由週期性評估監控進展，且相應地調整劑量。

使此等建議量之抗體經受大量治療判斷。選擇適當劑量及時程之關鍵因素為所獲得之結果。在此情形下考慮之因素包括所治療之特定病症、個別患者之臨床病狀、病症起因、抗體遞送部位、抗體之特定類型、投與方法、投與時程及醫學從業者已知之其他因素。

本發明之抗MET/EGFR多功能抗體可用作藉由多種途徑投與之人類藥品中之藥劑。因此，本發明亦提供醫藥組合物，其包含前述多功能抗體中之任一者或其MET及EGFR結合片段，及醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。最佳地，該等組合物用於非經腸投與。如本文所用之術語非經腸包括靜脈內、肌肉內、皮下、直腸、陰道或腹膜內投與。藉由靜脈內或腹膜內或皮下投與之非經腸遞送較佳。靜脈內投與最佳。適用於該投與之媒劑在此項技術中為人所熟知。

醫藥組合物在製造及儲存於所提供之容器中之條件下通常必須為無菌且穩定的，該容器包括例如密封小瓶、針筒或其他遞送裝置，例如筆。因此，在製造調配物之後，可將醫藥組合物無菌過濾，或者使其不含微生物污染物。

本發明之抗體可以單劑量或多劑量單獨或與醫藥學上可接受之載劑及/或稀釋劑一起向人類個體投與。該等醫藥組合物經設計以適

於所選投與模式，且適當時使用醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑及/或賦形劑，諸如分散劑、緩衝液、界面活性劑、防腐劑、增溶劑、等張劑(包括(但不限於)氯化鈉)、穩定劑及其類似物。可根據例如提供如從業者一般已知之調配技術之概要的 **Remington, The Science and Practice of Pharmacy**, 第19版, Gennaro編, Mack Publishing Co., Easton, PA (1995)中所揭示之習知技術來設計該等組合物。適用於醫藥組合物之載劑包括在與本發明抗體組合時保留分子活性且不與個體之免疫系統反應之任何物質。

以下非限制性實例說明本發明多功能抗體之各種特性。

實例

參考實例1

1.1. 多功能抗體NH-YK之表現及純化

基本上如下進行多功能抗體NH-YK表現及純化。使用含有SEQ ID NO: 28 (編碼具有胺基酸序列SEQ ID NO: 27之第一多肽)及SEQ ID NO: 34(編碼輕鏈胺基酸序列SEQ ID NO: 33)之DNA之麩醯胺酸合成酶(GS)表現載體來藉由電穿孔轉染中國倉鼠細胞株，CHOK1SV (Lonza Biologics PLC, Slough, United Kingdom)。該表現載體編碼SV早期(猴病毒40E)啟動子及GS之基因。GS之表現允許生物化學合成麩醯胺酸，此是CHOK1SV細胞所需之胺基酸。在轉染之後，細胞經歷用50 μ M L-甲硫胺酸磺醯亞胺(MSX)混合選擇。利用MSX對GS之抑制增加選擇之嚴格度。對比表現內源性水準之GS的CHOK1SV野生型細胞，把具有表現載體cDNA整合至宿主細胞基因組之轉錄活性區域中之細胞挑選出來。以低密度塗覆轉染池以允許穩定表現細胞之接近純系生長。在主要孔中篩選多功能抗體表現，且隨後視需要在無血清之懸浮培養物中按比例擴大。或者，混合選擇轉染物可經受單細胞選殖程序，諸如螢光活化細胞分類(FACS)或限制稀釋，並在其中篩選多功

能抗體表現。一旦鑑別出適合細胞株，其可視需要在無血清之懸浮培養物中按比例擴大。將多功能抗體分泌至其中之澄清培養基應用至已用相容緩衝液(諸如磷酸鹽緩衝鹽水(pH 7.4)或Tris緩衝液(pH 7.4))平衡之蛋白質A親和力管柱。洗滌管柱以移除非特異性結合組分。例如藉由pH梯度(諸如0.1 M磷酸鈉緩衝液pH 6.8至0.1 M檸檬酸鈉緩衝液pH 2.5-3.0)溶離結合之多功能抗體。諸如藉由在280 nm下之吸光度減少、SDS-PAGE或分析型尺寸排阻來偵測及/或收集多功能抗體溶離份。可藉由常見技術，包括尺寸排阻、疏水性相互作用、離子交換或經磷灰石層析有效移除可溶聚集體及多聚體。可使用常見技術濃縮及/或無菌過濾多功能抗體。在此等層析步驟之後多功能抗體之純度為大於90%，較佳大於98%。多功能抗體可緊接著持續數月在-70℃下冷凍或在4℃下儲存。

1.2. 多功能抗體NH-H9之表現及純化

可基本上如以上在參考實例1.1中所述將多功能抗體NH-H9表現及純化，但其中改為使用含有SEQ ID NO: 30 (編碼具有胺基酸序列SEQ ID NO: 29之第一多肽)及SEQ ID NO: 34 (編碼輕鏈胺基酸序列SEQ ID NO: 33)之DNA之麩醯胺酸合成酶(GS)表現載體藉由電穿孔轉染中國倉鼠細胞株，CHOK1SV (Lonza Biologics PLC, Slough, United Kingdom)。

1.3. 多功能抗體H9之表現及純化

可基本上如以上在參考實例1.1中所述將多功能抗體H9表現及純化，但其中改為使用含有編碼具有胺基酸序列SEQ ID NO: 52之第一多肽之DNA及SEQ ID NO: 34 (編碼輕鏈胺基酸序列SEQ ID NO: 33)之DNA之麩醯胺酸合成酶(GS)表現載體藉由電穿孔轉染中國倉鼠細胞株，CHOK1SV (Lonza Biologics PLC, Slough, United Kingdom)。

1.4. 多功能抗體YK之表現及純化



可基本上如以上在參考實例1.1中所述將多功能抗體H9表現及純化，但其中改為使用含有編碼具有胺基酸序列SEQ ID NO: 31之第一多肽之DNA及SEQ ID NO: 34 (編碼輕鏈胺基酸序列SEQ ID NO: 33)之DNA之麩醯胺酸合成酶(GS)表現載體藉由電穿孔轉染中國倉鼠細胞株，CHOK1SV (Lonza Biologics PLC, Slough, United Kingdom)。

實例1：多功能抗體與MET及EGFR之結合分析

可使用表面電漿子共振生物感測器，諸如BIAcore® 2000、BIAcore® 3000或BIAcore® T100 (Biacore Life Sciences Division, GE Healthcare, Piscataway, NJ)來根據此項技術中已知之方法量測抗體(諸如本文所揭示之抗體)之結合動力學及親和力。除如所指出外，所有試劑及材料均可購自BIAcore® AB (Uppsala, Sweden)，且可在25°C下進行量測。簡要描述，可使樣品溶解於HBS-EP緩衝液(150 mM氯化鈉、3 mM EDTA、0.005% (w/v)界面活性劑P-20及10 mM N-2-羥乙基-哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES)，pH 7.4)中。可使用含有所有四個流動細胞(Fc)上之固定蛋白質A (其可使用標準NHS-EDC胺偶合產生)之CM5晶片以採用捕捉方法。可藉由最初稀釋成操作緩衝液來製備1 mcg/mL之抗體樣品且隨後可在流動速率10 μ l/min下持續30秒測試其捕捉。基於捕捉量，可相應地調整抗體濃度以將捕捉量靶向在約70 RU與90 RU之間。可藉由稀釋成操作緩衝液來製備最終濃度為100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM、3.13 nM、1.56 nM、0.78 nM、0.39 nM及0 (空白) nM之MET-ECD或人類EGFR-ECD。各分析循環可由以下組成：(1)在單獨流動細胞(Fc2、Fc3及Fc4)上捕捉抗體樣品，(2)以50 μ L/min注射250 μ L (300 sec)之MET-ECD或EGFR-ECD總Fc，(3)持續20分鐘返回至緩衝液流以監控解離相，(4)藉由注射25 μ L (30 sec)甘胺酸，pH 1.5再生晶片表面，(5)藉由注射25 μ L (30 sec)之HBS-EP+緩衝液(亦即有0.05%而非0.005% (w/v)界面活性劑P-20

之HBS-EP緩衝液)平衡晶片表面。可使用標準雙參考處理資料且使用Biacore T100評估軟體版本2.0或Biacore T200評估軟體版本1.0擬合為1:1結合模型以測定締合速率(k_{on} ， $M^{-1}s^{-1}$ 單位)、解離速率(k_{off} ， s^{-1} 單位)及 $R_{最大}$ (RU單位)。平衡解離常數(K_D)可如自關係式 $K_D = k_{off}/k_{on}$ 計算。

測試本發明之四種抗MET/EGFR多功能抗體以測定其對基本上如上所述之MET-ECD及EGFR-ECD之結合動力學及結合親和力且結果概括於以下表4及表5中。抗體NH-YK、NH-H9、H9及YK均以較高結合親和力(K_D)結合MET-ECD (表4)及EGFR-ECD (表5)。

表4：多功能抗體對MET-ECD之結合動力學及親和力

多功能抗體	k_{on} $M^{-1}s^{-1} (10^4)$	k_{off} $s^{-1} (10^{-5})$	K_D (nM)
NH-YK	7.5	6.3	0.84
NH-H9	10.5	7.9	0.75
H9	9.5	10.9	1.15
YK	12.6	3.3	0.26

表5：多功能抗體對EGFR-ECD之結合動力學及親和力

多功能抗體	k_{on} $M^{-1}s^{-1} (10^6)$	k_{off} $s^{-1} (10^{-4})$	K_D (nM)
NH-YK	4.0	7.5	0.19
NH-H9	1.8	1.8	0.10
H9	0.57	1.8	0.32
YK	1.3	5.7	0.44

實例2：NH-YK與細胞表面MET及EGFR之結合

NSCLC細胞株H441 (ATCC, Manassas, VA；目錄號HTB-174)在表面上表現MET及EGFR。可將H441細胞(6×10^6)塗至100 mm聚-D-離胺酸塗佈之組織培養皿上且在37°C，5% CO₂下培育2天。隨後可持續20分鐘在4°C下用100 nM對照IgG4、100 nM西妥昔單抗與100 nM抗MET抗體之組合或100 nM NH-YK處理細胞。可用冰冷DPBS洗滌細胞且使用具有HALT蛋白酶及磷酸酶抑制劑之CHAPS溶解緩衝液(Thermo Scientific, Rockford, IL)溶解。可對600 µg各細胞溶解物樣品使用抗

MET瓊脂糖(agarose)或抗EGFR瓊脂糖凝膠(sepharose)進行免疫沈澱反應且在4°C下培育隔夜。可洗滌樹脂且自樹脂溶離結合之蛋白質，隨後裝載至4-20% SDS-PAGE上且吸墨至硝化纖維膜上用於西方墨點。可在膜中探測總MET或總EGFR。

基本上如上所述來進行之免疫沈澱反應實驗展現在用抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK處理之後MET及EGFR共免疫沈澱，但在用抗MET抗體、西妥昔單抗或甚至抗MET抗體與西妥昔單抗之組合處理之後不共免疫沈澱。此等資料指示NH-YK可結合至MET及EGFR(資料未顯示)。

實例3：多功能抗體NH-YK及NH-H9展示增強的結合至細胞表面MET之親合力

NSCLC癌細胞株HCC827具有高水準之MET表現。簡言之，可使用無酶解離緩衝液自細胞培養燒瓶移除HCC827細胞且在96孔板中以每孔大約 5×10^5 個細胞添加。隨後可用未標記抗體(以500 nM開始)與5 nM Alexa488標記之抗MET抗體組合之劑量滴定在4°C下處理細胞1小時以測定未標記抗體與標記之抗MET抗體競爭結合至細胞表面MET之能力。最後，可藉由FACS偵測標記之抗MET抗體之結合。

如藉由基本上如此實例中所描述來進行之分析所展示，與其親本抗MET抗體相比，抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK及NH-H9具有明確較高之親合力結合(表6)。

表6：抗MET/EGFR多功能抗體具有增加的結合至HCC827細胞之親合力

抗體濃度， (nM)	抗EGFR Ab MFI	抗MET Ab MFI	NH- YK MFI	NH- H9 MFI	HGF (ng/mL)
500.00	65.01	3.03	3.05	3.08	25.11
100.00	65.05	4.92	3.49	4.06	43.73
20.00	65.95	13.50	4.88	7.43	53.44
4.00	64.30	35.60	10.03	18.27	57.41
0.80	64.97	51.77	27.35	41.01	57.62

0.16	64.96	59.25	47.81	54.91	60.22
0.03	65.76	59.04	55.62	60.31	61.44
MFI =如藉由與Alexa 488標記之抗MET Ab之競爭所指示之平均螢光強度					

實例4：就細胞表面EGFR之內化及降解而言，與西妥昔單抗相比，抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK及NH-H9展示較好活性

部分A：NSCLC細胞株H441在其細胞表面上表現中等水準之MET及EGFR。可測試抗MET/EGFR多功能抗體使細胞表面MET及EGFR自H441細胞耗盡之能力。簡言之，可在6孔板中每孔塗覆含 1.5×10^5 個細胞之2 mL培養基且在37°C，5% CO₂下培育隔夜。可將抗體NH-YK、NH-H9或對照抗體以50 nM添加至H441細胞。在隔夜處理之後，可用無酶解離緩衝液將細胞自孔移除，洗滌，且隨後持續1小時用標記之EGFR或MET抗體(識別來自多功能抗體或對照抗體處理之不同抗原決定基)染色。洗滌細胞且藉由FACS在其中量測標記抗體染色。

為評估抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK及NH-H9促進活體內MET及EGFR之降解之能力，基本上如此實例之部分A中所描述進行分析。此等研究之結果展現類似於其親本抗MET抗體，抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK及NH-H9能夠使細胞表面MET自H441細胞耗盡。但出人意料地，抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK及NH-H9觸發顯著EGFR降解，而西妥昔單抗或抗MET抗體與西妥昔單抗之組合未觸發(表7)。

部分B：在其細胞表面上，NSCLC細胞株H1993表現高水準之MET及中等水準之EGFR；胃癌細胞株MKN45表現高水準之MET及低水準之EGFR；NSCLC細胞株H441表現中等水準之MET及EGFR。簡言之，可在6孔板中每孔塗覆含 5×10^5 個細胞之2 mL培養基且在37°C，5% CO₂下培育隔夜。可將抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK、NH-H9

或對照抗體以100 nM添加至細胞。在隔夜處理之後，可溶解細胞且可在4-12% BisTris凝膠上操作15 μg之各樣品且隨後將其吸墨至PVDF膜上。可藉由西方墨點法在膜中探測總EGFR、總MET及GAPDH。

為評估抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK及NH-H9促進活體外MET及EGFR之降解之能力，基本上如此實例之部分B中所描述進行分析。此等研究之結果展現類似於親本抗MET抗體，抗體NH-YK及NH-H9使來自H1993、MKN45及H441細胞之MET降解。然而，出人意料地，抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK及NH-H9觸發顯著EGFR降解，但西妥昔單抗或親本抗MET抗體與西妥昔單抗之組合未觸發(圖1)。

表7.對H441細胞上之EGFR，抗MET/EGFR多功能抗體具有增加之內化活性

抗體濃度， (50 nM)	MFI之AVG	hIgG4，MFI 之AVG	剩餘細胞表面 MET%	Std. Err
hIgG4	77.40	77.40	100.00	0.08
西妥昔單抗	76.20		98.45	1.69
抗MET Ab	47.44		61.30	0.32
抗MET Ab + 西妥昔單抗	50.41		65.13	0.10
NH-H9	48.84		63.10	0.07
NH-YK	44.89		57.99	2.71
			剩餘細胞表面 EGFR%	
hIgG4	56.29	56.29	100.00	2.09
西妥昔單抗	47.25		83.95	0.71
抗MET Ab	58.80		104.47	1.42
抗MET Ab + 西妥昔單抗	50.08		88.98	0.85
NH-H9	17.93		31.86	0.34
NH-YK	17.87		31.74	0.51

MFI =平均螢光強度；AVG =平均值；Std. Err =標準誤差

實例5：抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK及NH-H9阻斷MET及EGFR活化

部分A：已顯示NSCLC癌細胞株H596在HGF存在下對EGFR抑制劑之生長抑制作用具有抗性。因此，此細胞株可用於測定抗體是否可

在HGF存在下抑制H596細胞之增生。簡要描述，可在96孔板中每孔塗覆含 3×10^3 個細胞之100 μ L培養基且在37℃，5% CO₂下培育隔夜。抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK及NH-H9或對照抗體可自100 nM (最終)開始在無血清培養基中1:3稀釋且與50 ng/mL HGF (最終)組合以50 μ L以4×濃度之形式添加至H596細胞。在細胞生長額外6天結束時，可持續30分鐘將培養板平衡至室溫且可添加每孔100 μ L之CellTiter-Glo®試劑(Promega Corp., Fitchburg, WI)。可藉由量測發光測定細胞活力。

基本上如此實例中所描述來進行之分析展現，與西妥昔單抗或親本抗MET抗體與西妥昔單抗之組合相比，抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK及NH-H9較好抑制HGF刺激之H596之活體外增生。

表8：在於HGF存在下抑制H596增生方面，與個別抗體之組合相比，抗MET/EGFR多功能抗體展示優良活性

抗體濃度 (nM)	hIgG4		西妥昔單抗		抗MET Ab	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
100	132.3	1.1	129.2	4.0	108.6	3.1
33.3	130.9	0.7	127.4	1.8	112.8	1.4
11.1	138.6	1.9	132.6	0.2	121.0	3.1
3.7	137.0	1.6	129.7	2.7	121.4	1.8
1.2	138.5	2.5	132.0	4.7	128.2	0.0
0.4	138.9	0.9	128.6	2.4	129.8	1.8
0.0	100.0	0.6				

抗體 濃度 (nM)	抗MET Ab + 西妥昔單抗		NH-YK		NH-H9	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
100	98.1	3.1	101.5	0.4	101.6	0.6
33.3	108.0	1.2	101.3	1.7	101.8	1.0
11.1	116.1	2.6	107.1	3.0	104.8	0.8
3.7	116.7	1.6	103.9	1.2	102.6	1.9
1.2	125.0	0.6	108.1	1.3	101.9	1.0
0.4	131.8	1.5	113.4	0.9	106.7	3.1
0.0						



僅抗體， (100 nM)	AVG	Std. Err
hIgG4	102.51	1.06
西妥昔單抗	91.35	0.71
抗MET Ab	92.33	0.98
抗MET Ab +西妥昔單抗	94.03	0.07
NH-YK	94.10	0.38
NH-H9	91.55	0.75
HGF，50 ng/mL	136.66	0.48

縮寫：AVG =平均細胞活力%；Std. Err =標準誤差

部分B：在活體外分析中亦可使用其他腫瘤細胞株測定在抑制腫瘤細胞增生方面，與兩種個別抗體之組合相比，抗MET/EGFR多功能抗體是否具有優良活性。舉例而言，已顯示儘管具有中等水準之MET表現，結腸癌細胞株GEO由EGFR配位體自分泌活化驅動。肺癌細胞株H1666具有EGFR基因擴增且已顯示其增生由EGFR活化驅動。NSCLC細胞株H1993及EBC-1均由於MET基因擴增而表現高水準之MET，且表現中等水準之EGFR。

基本上如此實例中所描述來進行之分析展現，抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK及NH-H9與西妥昔單抗相比較好抑制結腸癌細胞株GEO之活體外增生，且出人意料地，與其親本抗MET抗體與西妥昔單抗之組合相比甚至更有力抑制活體外增生(表9)。

表9：在抑制GEO增生方面，與個別抗體之組合相比，抗MET/EGFR多功能抗體展示優良活性

抗體 (nM)	hIgG4	西妥昔單抗			抗MET Ab	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
100	102.64	0.54	46.39	1.55	101.71	0.39
33.33	102.43	0.33	50.06	0.55	101.48	0.66
11.11	102.43	0.11	57.67	1.27	102.82	0.66
3.70	102.22	1.12	67.23	0.68	103.03	0.58
1.23	103.80	0.45	73.63	2.71	103.42	0.55
0.41	102.56	1.08	77.70	2.46	103.42	0.22
0.14	103.30	1.66	89.99	5.56	104.67	0.33
0.05	103.00	1.40	100.83	0.80	105.67	0.41

	0.02	103.42	1.11	101.64	0.93	103.90	1.28
	0.00	100.00	0.33				
抗體 (nM)	抗MET Ab + 西妥昔單抗		NH-YK		NH-H9		
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	
100	57.93	0.52	46.15	1.67	42.65	0.96	
33.33	61.99	2.02	45.05	1.03	41.33	1.31	
11.11	69.07	2.36	44.44	0.57	43.99	0.44	
3.70	76.49	1.58	47.99	0.79	45.52	1.05	
1.23	77.92	0.99	47.09	0.76	44.21	1.11	
0.41	92.10	4.98	51.33	0.80	47.07	0.65	
0.14	103.72	1.57	61.90	1.74	59.98	1.30	
0.05	104.32	0.41	77.54	1.87	76.05	1.52	
0.02	104.90	0.55	103.62	2.22	102.97	1.04	
0.00							

縮寫：AVG =平均細胞活力%；Std. Err =標準誤差

類似地，表10中所示之結果展現，抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK、NH-H9及H9與西妥昔單抗相比各較好抑制H1666增生，且與親本抗MET抗體與西妥昔單抗之組合相比，更有力地抑制增生。

表 10：在抑制 H1666 增生方面，與個別抗體之組合相比，抗 MET/EGFR 多功能抗體展示優良活性

抗體濃 度，(nM)	hIgG4	西妥昔單抗		抗MET Ab		
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
100	94.45	0.92	30.60	0.36	101.25	1.63
33.33	103.42	2.64	35.13	1.17	102.15	2.90
11.11	104.25	2.50	41.65	0.63	105.58	2.99
3.70	100.34	0.46	49.31	1.96	106.48	1.57
1.23	101.46	2.01	56.26	0.47	103.49	1.48
0.41	103.94	1.53	68.71	1.40	105.72	1.99
0.14	104.85	2.46	84.94	3.16	101.01	1.33
0.05	104.24	1.46	97.56	1.50	105.35	2.11
0.02	108.89	2.07	102.80	1.80	104.50	2.24
0.00	100.00	0.47				

抗體濃 度，(nM)	抗MET Ab + 西妥昔單抗		NH-YK		NH-H9		H9	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
100	36.78	0.73	26.36	0.14	23.11	0.27	28.02	0.25
33.33	42.61	0.66	27.94	0.39	24.12	0.29	31.22	1.43

11.11	48.24	0.59	31.92	0.18	26.58	0.40	34.67	0.66
3.70	53.18	1.57	36.86	0.61	31.64	0.52	41.65	0.14
1.23	63.92	1.76	45.62	0.96	38.65	0.75	49.45	0.40
0.41	70.46	0.34	65.52	2.92	52.90	0.75	58.90	1.11
0.14	81.73	1.58	87.22	3.16	77.78	2.82	79.34	2.48
0.05	96.94	1.74	105.13	3.84	100.45	2.88	96.50	1.02
0.02	103.30	1.02	106.30	2.88	104.51	1.19	99.45	2.59
0.00								

縮寫：AVG =平均細胞活力%；Std. Err =標準誤差

類似地，表11中所示之結果展現，與其親本抗MET抗體與西妥昔單抗之組合相比，抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK及NH-H9各抑制H1993 (表11)及EBC-1 (表12)增生同樣好或較好。

表 11：在抑制 H1993 增生方面，與個別抗體之組合相比，抗MET/EGFR多功能抗體展示優良活性

抗 體 濃 度，(nM)	hIgG4		西妥昔單抗		抗MET Ab	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
100	98.68	2.39	95.77	1.07	53.17	1.11
33.33	101.50	1.91	102.27	2.01	51.66	0.75
11.11	102.77	1.47	101.18	1.95	52.92	0.41
3.70	102.53	1.41	100.52	1.08	57.39	1.31
1.23	99.73	0.63	98.61	0.28	84.82	0.93
0.41	103.23	0.02	97.18	1.78	98.80	1.71
0.14	103.29	0.33	99.45	2.35	99.69	0.98
0.05	102.09	1.01	96.62	1.79	100.67	2.36
0.02	100.28	1.18	97.48	2.79	99.77	0.56
0.00	100.00	0.63				

抗體濃度， (nM)	抗MET Ab + 西妥昔單抗		NH-YK		NH-H9	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
100	47.47	0.76	40.83	0.57	36.90	0.97
33.33	47.95	0.76	42.08	1.18	38.38	0.30
11.11	49.33	0.74	44.42	1.37	40.71	0.97
3.70	53.12	2.03	51.21	0.96	44.22	0.82
1.23	75.00	1.04	84.69	1.33	75.02	0.82
0.41	96.13	2.16	94.11	0.79	94.40	0.45
0.14	99.82	1.74	96.67	1.70	99.09	1.20
0.05	100.80	1.78	98.77	1.20	100.26	0.99
0.02	100.84	0.76	99.43	0.19	100.60	1.43
0.00						

縮寫：AVG =平均細胞活力%；Std. Err =標準誤差

表 12：在抑制 EBC-1 增生方面，與個別抗體之組合相比，抗 MET/EGFR 多功能抗體展示優良活性

抗 體 濃 度，(nM)	hIgG4		西妥昔單抗		抗MET Ab	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
100	105.35	1.61	107.55	1.27	43.38	0.14
33.33	102.82	0.74	105.74	1.31	38.11	0.57
11.11	102.08	0.63	105.58	0.98	37.24	0.55
3.70	103.72	1.19	106.17	1.48	35.75	0.87
1.23	103.53	2.28	106.03	0.80	38.84	0.44
0.41	103.48	0.72	105.02	1.70	80.23	1.47
0.14	100.42	1.09	103.51	0.57	99.04	1.21
0.05	100.00	1.96	100.73	0.95	102.58	0.54
0.02	102.36	0.92	102.02	1.88	102.25	0.77
0.00	100.00	0.38				

抗 體 濃 度，(nM)	抗MET Ab + 西妥昔單抗		NH-YK		NH- H9	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
100	40.73	0.80	34.95	0.22	22.34	0.27
33.33	36.25	1.20	30.65	0.19	21.30	0.42
11.11	34.08	0.42	30.15	0.47	21.15	0.58
3.70	33.54	0.80	33.04	0.90	22.43	0.37
1.23	35.60	0.50	46.98	1.11	24.23	0.43
0.41	73.46	0.64	91.82	0.83	79.44	0.82
0.14	101.37	1.06	97.62	1.29	97.02	1.89
0.05	102.92	0.80	102.14	1.96	100.50	1.21
0.02	101.88	1.16	101.86	1.82	101.03	0.65
0.00						

縮寫：AVG =平均細胞活力%；Std. Err =標準誤差

實例6：抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK及NH-H9誘導細胞凋亡

可使用胃癌細胞株MKN45分析抗體誘導之細胞凋亡。簡言之，可在96孔板中每孔塗覆含3 × 10³個細胞之80 μL培養基且在37℃，5% CO₂下培育隔夜。CellEvent™試劑(Life Technologies, Carlsbad, CA)可在細胞培養基中稀釋且以每孔10 μL添加。為得到100 nM之最終濃度，將NH-YK、NH-H9或對照抗體以10×濃度之形式以10 μL添加至

MKN45細胞。可藉由INCUCYTE™動力學成像系統(Essen Bioscience, Ann Arbor, MI)以3小時時間間隔在37℃，5% CO₂下持續總共120小時即時量測卡斯蛋白酶-3/7陽性細胞。

如由基本上如此實例中所描述來進行分析所測定，與親本MET Ab與西妥昔單抗之組合相比，抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK及NH-H9各誘導MKN45之較高活體外細胞凋亡(表13)。此外，在基本上如此實例中所描述來進行之分析中，與單臂5D5與埃羅替尼之組合相比，NH-YK在較大程度上誘導MKN45細胞凋亡(資料未顯示)。

表13：MKN45細胞凋亡分析

抗體濃度， (100 nM)	24 hr		48 hr		72 hr	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
未處理	100.00	2.92	100.00	10.14	100.00	13.83
hIgG4	83.60	8.92	106.20	3.55	111.25	13.78
西妥昔單抗	73.56	4.69	121.70	26.26	102.24	10.34
抗MET Ab	100.35	7.27	222.81	28.70	275.40	21.16
抗MET Ab + 西妥昔單抗	126.73	22.78	235.60	29.73	292.40	23.35
NH-YK	114.20	9.96	291.31	19.04	393.83	43.63
NH-H9	94.60	10.59	243.82	35.58	361.13	9.04

抗體濃度， (100 nM)	96 hr		120 hr	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
未處理	100.00	13.48	100.00	7.55
hIgG4	91.24	10.61	108.28	12.02
西妥昔單抗	107.11	3.56	127.04	14.16
抗MET Ab	286.63	32.84	353.84	30.08
抗MET Ab + 西妥昔單抗	326.83	32.56	386.84	19.08
NH-YK	446.24	28.10	557.79	32.44
NH-H9	434.42	2.87	515.31	13.63

縮寫：AVG =細胞凋亡之平均增加%；

Std. Err =標準誤差

實例7：抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK在HGF存在下恢復腫瘤細胞

之埃羅替尼敏感性

NSCLC癌細胞株HCC827具有EGFR基因擴增及較高MET表現。HCC827細胞對埃羅替尼處理敏感，但在HGF存在下變得對埃羅替尼處理具有抗性。簡言之，可在96孔板中每孔塗覆含 3×10^3 個細胞之100 μ L培養基且在37°C，5% CO₂下培育隔夜。為得到50 nM抗體、50 ng/mL HGF及1 μ M埃羅替尼之最終濃度，可持續1小時將NH-YK或對照抗體(hIgG4)添加至細胞隨後添加埃羅替尼及/或HGF。在37°C、95%相對濕度及5% (v/v) CO₂下細胞生長額外3天結束時，可持續30分鐘使培養板平衡至室溫且添加每孔100 μ L之CellTiter-Glo®試劑(Promega Corp.)。可將培養板在定軌震盪器上震盪2分鐘以混合內容物且隨後在室溫下培育10分鐘以使發光信號穩定。可藉由量測發光來測定細胞活力。

如藉由基本上如此實例中所描述來進行分析所測定，與親本抗MET抗體與西妥昔單抗組合相比，抗體NH-YK能夠在HGF存在下較好恢復活體外HCC827細胞之埃羅替尼敏感性(表14)。

表14：與個別抗體之組合相比，抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK在HGF存在下恢復HCC827對埃羅替尼之敏感性方面具有優良活性

抗體濃度， (50 nM)	未處理	埃羅替尼， 1 μ M	埃羅替尼+ H 50 ng/mL	埃羅替尼+ H + hIgG4
AVG	101.27	17.98	80.00	85.14
Std. Err	2.26	0.20	3.95	1.39

抗體濃度， (50 nM)	埃羅替尼+ H +西妥昔單抗	埃羅替尼+ H + 抗MET Ab	埃羅替尼+ H +抗METAb +西妥昔單抗	埃羅替尼+ H + NH-YK
AVG	102.76	46.35	61.33	27.25
Std. Err	0.86	0.65	1.59	1.01

縮寫：AVG =平均細胞活力%；Std. Err =標準誤差；H=HGF

實例8：抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK恢復用HGF及EGF處理之HT-29細胞之B-Raf抑制劑PLX4032敏感性

結腸癌細胞株HT-29具有B-Raf突變且對B-Raf抑制劑PLX4032敏感。在HGF及EGF刺激之後HT-29細胞變得對PLX4032或泛Raf抑制劑處理具有抗性。可測試抗MET/EGFR多功能抗體恢復用HGF及EGF處理之HT-29細胞之PLX4032抑制劑敏感性的能力。簡言之，可在96孔板中每孔塗覆含 3×10^3 個細胞之100 μ L培養基且在37°C，5% CO₂下培育隔夜。將抗體NH-YK、PLX4032、HGF、EGF、陽性對照及陰性對照稀釋於無血清培養基中且以50 μ L以4×濃度之形式添加至HT-29細胞。試劑之最終濃度可為：對於抗體50 nM，對於HGF及EGF 50 ng/mL，及以1 μ M開始之PLX4032之1:5稀釋液。在細胞生長額外5天結束時，可持續30分鐘將培養板平衡至室溫且可添加每孔100 μ L之CellTiter-Glo®試劑(Promega Corp.)。可藉由量測發光測定細胞活力。

如藉由基本上如此實例中所描述進行分析來測定，抗體NH-YK能夠恢復用HGF及EGF處理之HT-29細胞之PLX4032敏感性(表15)。此外，抗體NH-YK在恢復FaDu細胞之拉帕替尼(亦即EGFR/HER-2抑制劑)敏感性方面優於親本抗MET抗體與西妥昔單抗之組合(表16)。

表15：與個別抗體之組合相比，抗體NH-YK在HGF及EGF存在下恢復HT-29對B-Raf抑制劑PLX4032之敏感性方面具有優良活性

PLX 濃度， (nM)	PLX		PLX + H + E		PLX + H + E + hIgG4		PLX + H + E +西妥昔單抗	
	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
1000	33.67	0.19	104.02	0.58	108.76	0.64	103.80	2.43
200.00	56.66	0.36	120.67	1.65	124.38	4.18	121.05	1.36
40.00	83.14	0.18	122.51	1.39	124.52	1.61	123.21	1.19
8.00	97.63	1.05	120.42	0.51	125.81	0.31	124.51	0.44
1.60	99.92	0.94	117.09	1.98	116.77	2.15	127.26	0.76
0.32	101.11	1.13	113.02	1.57	120.78	1.56	125.35	2.78
0.00	100.00	1.01						

PLX 濃度， (nM)	PLX + H + E + 抗MET Ab	PLX + H + E +抗MET Ab +西妥昔單抗	PLX + H + E+ NH-YK
--------------------	--------------------------	-----------------------------------	-----------------------

	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err	AVG	Std. Err
1000	110.65	2.28	97.86	1.41	39.98	0.89
200.00	120.52	1.18	116.73	1.20	59.53	0.94
40.00	122.38	0.19	121.34	0.65	85.59	1.03
8.00	123.57	1.94	122.98	0.70	98.74	0.86
1.60	126.02	0.86	125.28	0.50	100.39	0.11
0.32	123.46	3.30	124.17	0.31	101.93	1.59
0.00						

縮寫：PLX = PLX4032；AVG =平均細胞活力%；

Std. Err =標準誤差；H = HGF (50 ng/mL)；E = EGF (50 ng/mL)

所有抗體50 nM

表16：與個別抗體之組合相比，抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK及NH-H9在HGF存在下恢復FaDu對拉帕替尼之敏感性方面具有優良活性

拉帕替尼， μM	細胞活力%						
	僅拉帕替尼	拉帕替尼+ H	拉帕替尼+ H +西妥昔單抗	拉帕替尼+ H +抗MET	拉帕替尼+ H +西妥昔單抗+抗MET	拉帕替尼+ H + NH-H9	拉帕替尼+ H + NH-YK
0	95.99	154.12	139.07	130.33	98.43	59.67	60.33
0.001	99.49	154.06	151.14	128.70	98.47	64.58	62.16
0.003	101.04	165.69	155.31	158.30	111.36	63.61	56.71
0.01	95.77	157.19	146.42	143.19	107.71	53.75	53.64
0.03	68.82	150.88	140.30	127.18	92.73	53.60	53.56
0.1	45.42	142.78	131.75	102.62	73.76	42.42	48.89
0.3	32.49	131.23	120.62	79.03	64.03	38.82	45.47
1	26.85	112.89	104.69	60.76	57.14	33.93	37.68
3	18.52	15.06	12.15	15.37	10.44	20.42	29.46
10	17.07	9.65	6.54	9.05	7.41	20.85	17.59

H= HGF (50 ng/ml)；所有抗體50 nM

拉帕替尼，μM	細胞活力%						
	僅僅拉帕替尼	拉帕替尼+ E	拉帕替尼+ E +西妥昔單抗	拉帕替尼+ E + 抗MET	拉帕替尼+ E +西妥昔單抗+抗MET	拉帕替尼+ E + NH-H9	拉帕替尼+ E + NH-YK
0	102.84	145.35	136.60	144.82	120.07	90.91	110.53
0.001	109.28	149.73	145.86	155.81	132.52	106.86	118.84
0.003	108.81	170.83	156.56	163.50	146.05	108.79	115.48
0.01	78.67	158.71	149.86	147.32	154.82	90.88	109.72
0.03	69.43	160.76	150.95	148.64	122.95	65.99	102.30
0.1	45.64	152.45	101.10	143.07	101.54	42.00	62.87
0.3	32.47	161.37	47.58	137.03	56.25	33.46	40.24
1	26.27	141.20	31.90	128.06	36.16	29.66	27.80
3	18.99	37.11	21.17	18.19	23.48	18.10	19.41



10	19.62	21.39	17.61	15.87	22.55	14.88	7.06
----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	------

E=EGF (50 ng/ml)；所有抗體50 nM

實例9：MET及EGFR在小鼠異種移植植物模型中之降解

抗MET/EGFR多功能抗體促進MET及EGFR活體內降解之能力可根據此項技術中熟知之方法在帶有H441 (NSCLC)及MKN45 (胃癌)異種移植腫瘤之小鼠中評估。

在H441異種移植植物中給藥48小時之後，以兩種不同劑量水準(10 mg/kg及27 mg/kg)投與抗體NH-YK誘導在與親本抗MET抗體與西妥昔單抗(均在20 mg/kg下給藥)之組合類似之水準下的MET降解。相比之下，在相同異種移植植物模型中，當與PBS處理之對照動物相比時，親本抗MET抗體與西妥昔單抗(均在20 mg/kg下給藥)之組合未能誘導EGFR降解。出人意料地，當與PBS處理或親本抗MET抗體及西妥昔單抗處理(均在20 mg/kg下給藥)之小鼠相比時，投與抗體NH-YK觸發顯著EGFR降解。類似地，在帶有MKN45胃異種移植植物之動物中，當與親本抗MET抗體與西妥昔單抗(均在20 mg/kg下給藥)之組合相比時，抗體NH-YK促進相等MET降解但出人意料高得多的EGFR降解。

實例10：抑制小鼠異種移植植物模型之NSCLC (H1993、H441、EBC-1)及胃癌之腫瘤生長

年齡6至7週大之雌性無胸腺裸小鼠市售可得，包括自Harlan Laboratories (Indianapolis, IN)。使小鼠適應新環境一週且任意用可持續研究之持續時間的正常低脂肪(4.5%)飲食餵養。腫瘤細胞可自ATCC購買且可在諸如具有L-麩醯胺酸、補充有10% FBS之25 mM HEPES及1 mM Na丙酮酸鹽之RPMI 1640 (Life Technologies)的細胞培養基中培養。可將細胞分離，用無血清培養基洗滌且隨後以50×10⁶個細胞/毫升之最終濃度再懸浮於無血清RPMI 1640中。可在個體小鼠之背側以無血清生長培養基與基質膠(Becton Dickinson, Bedford, MA)之

1:1混合物形式皮下注射大約 5×10^6 個腫瘤細胞。每週兩次進行腫瘤及體重量測。在處理之前，可基於腫瘤尺寸使用隨機化演算法將小鼠隨機化。當平均腫瘤體積達至 100 mm^3 時可開始處理。將隨機化小鼠分成不同組且一週一次經由尾部靜脈注射用抗體給藥。

在給藥之前在磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中製備所有測試或對照抗體。可藉由測徑規量測來測定腫瘤尺寸。可自式 $A^2 \times B \times 0.536$ 估計腫瘤體積(mm^3)，其中A為垂直直徑中之較小者且B為垂直直徑中之較大者。可將腫瘤體積資料轉化成對數尺度以將時間及處理組之差異等化。可用藉由時間及處理之雙向重複量度ANOVA使用SAS PROC MIXED軟體(SAS Institutes Inc, Cary, NC)分析對數體積資料。在各時間點將處理組與指定對照組相比較。

部分A如以上在此實例中所述產生帶有H1993 NSCLC異種移植物之免疫缺陷小鼠且一週一次持續5個連續週用媒劑對照、抗體NH-YK或親本MET抗體加西妥昔單抗之組合處理。親本MET抗體與西妥昔單抗(均在 20 mg/kg 下給藥)之組合產生86.1%之平均處理腫瘤體積除以平均媒劑對照腫瘤體積值百分比(T/C%)，而等莫耳劑量之抗體NH-YK(27 mg/kg)產生腫瘤體積之明顯較大減少(T/C%為28.5%， $p < 0.001$) (圖2)。當在H441異種移植物中測試時，抗體NH-YK在與媒劑對照或親本MET抗體與西妥昔單抗之組合相比時亦顯示優良功效(圖3)。

部分B：在EBC-1 NSCLC異種移植物模型中，用抗體NH-YK處理(10 mpk)產生32.9%之T/C% ($p < 0.001$) (圖4)。

部分C：胃癌細胞株MKN45具有高水準之MET基因擴增且對MET抑制劑極敏感。在MKN45胃異種移植物模型中，抗體NH-YK顯示與親本MET抗體與西妥昔單抗之組合類似之抗腫瘤功效(分別為 $T/C\% = 17.4\%$ ， $p < 0.001$ 及 18.6% ， $p < 0.001$) (圖5)。

部分D：在H1993 NSCLC異種移植物模型中，一週一次持續五個

連續週用媒劑對照、抗MET/EGFR多功能抗體H9 (4 mg/kg及27 mg/kg)、僅抗MET (3 mg/kg及20 mg/kg)、西妥昔單抗(3 mg/kg及20 mg/kg)或抗MET加西妥昔單抗(3 mg/kg及20 mg/kg各抗體)之組合處理帶有異種移植物之免疫缺陷小鼠。與任何其他處理相比，27 mg/kg之抗MET/EGFR多功能抗體H9產生顯著較大抗腫瘤功效($p<0.001$) (圖6)。

當在H441異種移植物中測試時，抗體H9在與個別處理或親本MET抗體與西妥昔單抗之組合相比時亦顯示優良功效(圖7)。

實例11：抑制源於患者之異種移植物(PDX)模型之結腸直腸癌之腫瘤生長

可取得源於患者之結腸直腸癌樣品且可將來源於個別患者之腫瘤片段植入單個免疫功能不全小鼠中且使其生長直至其達至100-200 mm³之大致體積。可一週一次持續3-4個連續週投與27 mg/kg之抗體NH-YK或媒劑對照。可一週兩次經由電子測徑規量測腫瘤。亦可定期評估體重。可以每週一次之時程持續四個循環用經由腹膜內(i.p.)注射投與之磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)處理媒劑對照組。可使用式： $A^2 \times B \times 0.536$ 計算腫瘤體積，其中A為垂直直徑中之較小者且B為垂直直徑中之較大者。

基本上如以上在此實例11中所述將來自兩名患者之結腸直腸癌腫瘤樣品單獨植入兩個不同免疫功能不全小鼠中。如表17及18中所示，當與有PDX腫瘤之媒劑處理動物相比時，每週投與抗體NH-YK顯著降低PDX腫瘤中之每一者之體積。

表17

PDX (來自1號患者)之絕對腫瘤體積(mm ³)	第0天	第25天
媒劑	192.1	1186.1
NH-YK	195.2	23.6

表18

PDX (來自2號患者)之絕對腫瘤體積(mm ³)	第0天	第21天
媒劑	248.4	1141.1
NH-YK	207.8	46.2

實例12：抑制源於患者之異種移植物(PDX)模型之頭部及頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)之腫瘤生長

可取得源於患者之頭部及頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)樣品且可將來源於個別患者之腫瘤片段植入單個免疫功能不全小鼠中且使其生長直至其達至100-200 mm³之大致體積。可一週兩次持續4個連續週投與27 mg/kg之抗體NH-YK或媒劑對照。可一週兩次經由電子測徑規量測腫瘤。亦可定期評估體重。可以每週一次之時程持續四個循環用經由腹膜內注射投與之PBS及以每日一次之時程持續28個循環用經由經口管飼(p.o.)投與之20% PEG 400/80% [含20%卡布迪索(captisol)之蒸餾去離子水]處理媒劑對照組。可使用式：腫瘤體積(mm³) = 寬度² × 長度 × 0.52計算腫瘤體積。

基本上如以上在此實例12中所述，將來自兩名患者之頭部及頸部鱗狀細胞癌腫瘤樣品單獨植入兩個不同免疫功能不全小鼠中。如表19中所示，當與有PDX腫瘤之媒劑處理動物相比時，每週兩次投與抗體NH-YK顯著降低PDX腫瘤之體積。

表19

PDX (來自1號患者)之絕對腫瘤體積(mm ³)	第0天	第46天
媒劑	200	1221 ± 236 (SEM)
NH-YK	200	222 ± 121 (SEM)

平均值之標準誤差(SEM)

實例13：抑制小鼠異種移植物模型之抗埃羅替尼之NSCLC (抗埃羅替尼之HCC-827)之腫瘤生長

年齡6至7週大之雌性無胸腺裸小鼠市售可得，包括自Harlan

Laboratories。使小鼠適應新環境一週且任意用可持續研究之持續時間的正常低脂肪(4.5%)飲食餵養。HCC-827腫瘤細胞可自ATCC購買且可在諸如具有L-麩醯胺酸、補充有10% FBS之25 mM HEPES及1 mM Na丙酮酸鹽之RPMI 1640的細胞培養基中培養。可將細胞分離，用無血清培養基洗滌且隨後以 50×10^6 個細胞/毫升之最終濃度再懸浮於無血清RPMI 1640中。可在雌性無胸腺裸小鼠之背側以無血清生長培養基與基質膠之1:1混合物形式皮下植入大約 5×10^6 個活腫瘤細胞。一旦產生腫瘤，可用25 mg/kg埃羅替尼之日劑量處理小鼠直至抗性腫瘤甚至在埃羅替尼存在下開始再生長。一旦抗性腫瘤達至大約 1000 mm^3 之平均體積，可將其切除，分成 50 mm^3 片段且再植入個體雌性無胸腺裸小鼠中。為了監控再生長，可每週兩次進行腫瘤及體重量測。一旦平均腫瘤體積達至 100 mm^3 ，使用隨機化演算法將動物隨機化且分成處理組。將抗體稀釋於PBS中且一週一次經由尾部靜脈注射投與。為了確保腫瘤抗埃羅替尼，對照組中之動物接受PBS媒劑及25 mg/kg埃羅替尼。經由電子測徑規測定腫瘤體積(mm^3)且其可自式 $A^2 \times B \times 0.536$ 估計，其中A為垂直直徑中之較小者且B為垂直直徑中之較大者。

如以上在此實例中所述產生帶有抗埃羅替尼HCC-827 NSCLC異種移植物之免疫缺陷小鼠且用以下處理：(A)媒劑加25 mg/kg埃羅替尼(亦即對照組)，(B) 25 mg/kg埃羅替尼與27 mg/kg抗體NH-YK之組合，(C) 25 mg/kg埃羅替尼與20 mg/kg西妥昔單抗之組合，(D)在20 mg/kg下給藥之親本MET抗體與25 mg/kg埃羅替尼之組合，或(E)在20 mg/kg下給藥之親本MET抗體、在20 mg/kg下給藥之西妥昔單抗及25 mg/kg埃羅替尼之組合。與所有其他處理組相比，在相同或較長時段之後，抗體NH-YK與埃羅替尼之組合(亦即處理組(B))使得絕對腫瘤體積顯著減少(表20)。因此，尤其當與用埃羅替尼與PBS媒劑、西妥

昔單抗或親本MET抗體組合處理之動物相比時，在用抗體NH-YK與埃羅替尼組合處理之後，帶有抗埃羅替尼腫瘤之小鼠之腫瘤生長顯著降低。當與埃羅替尼、西妥昔單抗及親本MET抗體之組合(E)相比時，抗體NH-YK與埃羅替尼組合(B)亦顯示優良抗腫瘤功效。

表20

處理組	最終量測之日期	絕對腫瘤體積(mm ³)
A	110	2587
B	152	304
C	126	2312
D	126	1706
E	152	1172

【圖式簡單說明】

圖1說明西方墨點法結果，其顯示抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK及NH-H9誘導癌細胞株H1993 (NSCLC)、MKN45 (胃癌)及H441 (NSCLC)中之EGFR及MET之降解。

圖2為顯示與投與媒劑對照或親本抗Met抗體與西妥昔單抗之組合(T/C%為86.1%)相比，投與抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK引起H1993小鼠異種移植模型之腫瘤體積明顯較大減少(T/C%為28.5%， $p<0.001$)的圖。

圖3為顯示與投與媒劑對照或親本抗Met抗體與西妥昔單抗之組合相比，投與抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK引起H441小鼠異種移植模型之腫瘤體積明顯較大減少(T/C%為28.5%， $p<0.001$)的圖。

圖4為顯示與投與媒劑對照相比，投與抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK引起EBC-1 NSCLC小鼠異種移植模型之腫瘤體積明顯較大減少(T/C%為32.9% ($p<0.001$))的圖。

圖5為顯示與投與親本MET抗體與西妥昔單抗之組合或媒劑對照相比，投與抗MET/EGFR多功能抗體NH-YK在MKN45胃異種移植模型中產生類似抗腫瘤功效(分別為T/C%=17.4%， $p<0.001$ 及18.6%，

p<0.001)的圖。

圖6為顯示與任何其他治療相比，投與27 mg/kg之抗MET/EGFR多功能抗體H9在帶有H1993 NSCLC異種移植物之免疫缺陷小鼠中產生明顯較高抗腫瘤功效的圖。

圖7為顯示與任何其他治療相比，投與27 mg/kg之抗MET/EGFR多功能抗體H9在帶有H441異種移植物之免疫缺陷小鼠中產生明顯較高抗腫瘤功效的圖。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美國禮來大藥廠
<120> 結合EGFR及Met之多功能抗體
<130> X20099
<150> 61/920097
<151> 2013-12-23
<160> 53
<170> PatentIn vcrsion 3.5

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 1
Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Val His
1 5 10

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 2
Val Ile Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Lys Gly
1 5 10 15

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 3
Ala Arg Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Asp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 4
Arg Ala Ser Tyr Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 5
Arg Tyr Ala Lys Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 6
Gln Gln Asn Asn Ala Trp Pro Thr Thr
1 5

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 7
Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Gly
1 5 10 15

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 8
Tyr Tyr Ala Ser Arg Ser Ile Ser
1 5

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 在位置3處之Xaa = Tyr或Trp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> 在位置15處之Xaa = Lys或Thr

<400> 9
Val Ile Xaa Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Xaa Gly
1 5 10 15

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列



<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 在位置1處之Xaa = Arg或Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 在位置4處之Xaa = Lys或Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 在位置5處之Xaa = Glu或Arg

<400> 10
Xaa Tyr Ala Xaa Xaa Ser Ile Ser
1 5

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 11

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

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 12

Arg Val Asn Pro Asn Arg Arg Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 13

Ala Arg Ala Asn Trp Leu Asp Tyr
1 5

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 14

Ser Val Ser Ser Ser Val Ser Ser Ile Tyr Leu His
1 5 10

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 15

Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 16

Gln Val Tyr Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 17

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 17

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 Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

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

Arg Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115



<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 18

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

<210> 19
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 19

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

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 20

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

<210> 21
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 21

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

Val Ser Scr
115

<210> 22
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 22

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 Ser Val Ser Ser Ser Val Ser Ser Ile
20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Ser Gly Tyr Pro
85 90 95

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

<210> 23
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 23

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 Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

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

Arg Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
145 150 155 160

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Tyr Ser Ile Gly Thr Asn
165 170 175

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
180 185 190

Arg Tyr Ala Lys Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
210 215 220

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Ala Trp Pro Thr
225 230 235 240

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
245 250

<210> 24
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 24

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 Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

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

Arg Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
145 150 155 160

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Tyr Ser Ile Gly Thr Asn
165 170 175

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
180 185 190

Tyr Tyr Ala Ser Arg Ser Ile Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
210 215 220

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Ala Trp Pro Thr
225 230 235 240

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
245 250

<210> 25
<211> 384
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 25

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

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

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

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

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

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

Arg Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
145 150 155 160

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Tyr Ser Ile Gly Thr Asn
165 170 175

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
180 185 190

Arg Tyr Ala Lys Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
210 215 220

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Ala Trp Pro Thr
225 230 235 240

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln
260 265 270

Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
275 280 285

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met His
290 295 300

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Val
305 310 315 320

Asn Pro Asn Arg Arg Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly Arg
325 330 335

Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
340 345 350

Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala
355 360 365

Asn Trp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
370 375 380

<210> 26
<211> 384
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 26

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 Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30



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

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

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

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

Arg Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
145 150 155 160

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Tyr Ser Ile Gly Thr Asn
165 170 175

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
180 185 190

Tyr Tyr Ala Ser Arg Ser Ile Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
210 215 220

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Ala Trp Pro Thr
225 230 235 240

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln
260 265 270

Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
275 280 285

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met His
290 295 300

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Val
305 310 315 320

Asn Pro Asn Arg Arg Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly Arg
325 330 335

Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
340 345 350

Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala
355 360 365

Asn Trp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
370 375 380

<210> 27
<211> 710
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 27

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 Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

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

Arg Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
145 150 155 160

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Tyr Ser Ile Gly Thr Asn
165 170 175

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
180 185 190

Arg Tyr Ala Lys Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
210 215 220

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Ala Trp Pro Thr
225 230 235 240

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln
260 265 270

Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
275 280 285

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met His
290 295 300

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Val
305 310 315 320

Asn Pro Asn Arg Arg Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly Arg
325 330 335

Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
340 345 350

Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala
355 360 365

Asn Trp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
370 375 380

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
385 390 395 400

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
405 410 415

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
420 425 430

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
435 440 445

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
450 455 460

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
465 470 475 480

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
485 490 495

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
500 505 510

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
515 520 525

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
530 535 540

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
545 550 555 560

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
565 570 575

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
580 585 590

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
595 600 605

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
610 615 620

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
625 630 635 640

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
645 650 655

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
660 665 670

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
675 680 685

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
690 695 700

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
705 710

<210> 28
<211> 2136
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 28
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcttgcaagg ctcttggttt ctcattaaact aactatggtg tacactgggt ggcacaggcc 120
cctggacaal gtcttgagtg gatgggagtg atataatagt gggaaacac agattataat 180
acacctttca aaggacgcgt caccattacc gcggacgaat ccacgagcac agcctacatg 240
gagctgagca gccigagalc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgagag agccctcgac 300
tactatgatt acgacttlgc ttactggggc caggggcacc tggtcaccgt ctcttcaggc 360
ggcggaggct ctggcggagg tggtagtggg ggcgggtggat cagggggagg cggatctggc 420
ggtggcggca gcgacatcgt gatgaccag tctccagact ccctggctgt gtctctgggc 480
gagagggcca ccatcaactg cagggccagt tatagtattg gcacaacat acactggtac 540
cagcagaaac caggacagcc tcttaagctg ctcattagat atgctaagga gtctatctct 600
ggggicccg accgattcag tggcagcggg tctgggacag atttcacict caccatcagc 660
agccctgcagg ctgaagaatg ggcagtttat tactgtcaac aaaataacgc ttggccaacc 720

acgttcggct gcgggaccaa ggaggagatc aaaggcggag gatctggggg agggggcagc 780
ggaggcgggg gctcgggac cactgggicag gttcagcigg tgcagtcigg tgcagaggig 840
aagaagcctg gtgcctcagt gaaggtctcc tgcaggcctt ctgggttacac attcactgac 900
tactacatgc actgggtgcg tcaggccctt ggtcaaggtc ttgagtggaat gggtcgtgtt 960
aatcctaacc ggaggggtac tacttacaac cagaaattcg agggccgigt caccatgacc 1020
acagacacat ccacgagcac agcctacatg gagctgcgta gcctgcgttc tgacgacacg 1080
gccgtgtatt actgigcgcg tgcgaacigg cltgactact ggggccaggg caccaccgtc 1140
accgtctcct ccgccctcac caagggccca tcggctctcc cgctagcgcc ctgctccagg 1200
agcacctccg agagcacagc cgcctgggc tgcctggta aggactactt cccgaaccg 1260
gtgacggigt cgtggaactc aggcgcctt accagcgcg tgcacacctt cccggctgtc 1320
ctacagtcct caggactcia ctcctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 1380
ggcacgaaga cctacaccig caacgtagt cacaagccca gcaacacca ggtggacaag 1440
agagttgagt ccaaatatgg tccccatgc ccacctgcc cagcacctga ggcgcgggg 1500
ggaccatcag tcttctgtt cccccaaaa cccaaggaca ctctcatgat ctcccgacc 1560
cctgaggica cgtgcgtgtt ggtggacgtg agccaggaag accccgaggt ccagttcaac 1620
tggtacgigg atggcgtgga ggigcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtic 1680
aacagcacgt accgtgtgtt cagcgtccic accgtcctgc accaggactg gctgaacggc 1740
aaggagtaca agtgcaagg tctcaacaaa ggccctccgt cctccatga gaaaaccatc 1800
tccaaagcca aagggcagcc ccgagagcca cagggtgata cctgcccc atcccaggag 1860
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggta aaggcttcta cccagcgac 1920
atcgccgigg agtgggaaag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1980
gigctggact ccgacggcic ctcttcttc tacagcaggc taaccgtgga caagagcagg 2040
tggcaggagg ggaatgtct ctcattctcc gtgatgatg aggcctcga caaccactac 2100
acacagaaga gcctctcct gtctctgggt tgatag 2136

<210> 29
<211> 710
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 29

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

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

Arg Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
145 150 155 160

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Tyr Ser Ile Gly Thr Asn
165 170 175

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
180 185 190

Tyr Tyr Ala Ser Arg Ser Ile Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
210 215 220

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Ala Trp Pro Thr
225 230 235 240

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln
260 265 270

Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
275 280 285

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met His
290 295 300

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Val
305 310 315 320

Asn Pro Asn Arg Arg Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly Arg
325 330 335

Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
340 345 350

Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala
355 360 365

Asn Trp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
370 375 380

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
385 390 395 400

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
405 410 415

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
420 425 430

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
435 440 445

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
450 455 460

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
465 470 475 480

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
485 490 495

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
500 505 510

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
515 520 525

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
530 535 540

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
545 550 555 560

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
565 570 575

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
580 585 590

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
595 600 605

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
610 615 620

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
625 630 635 640

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
645 650 655

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
660 665 670

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
675 680 685

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
690 695 700

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
705 710

<210> 30
<211> 2136
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 30	
cagggtgcagc tgggtgcagc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtccctc ggtgaaggtc	60
tcctgcgaagg ctctcgggtt ctcattaaact aactatgggtg tacactgggt gcgacaggcc	120
ccctggacaat gtccttgagtg gattgggagtg atatggagtg gtggaacac agattataat	180
acaccttca caggacgcgt cacgattacc gcggacgaat ccacgagcac agcclacatg	240
gagctgagca gccctgagatc tgggacacg gccgtgtat acctgtgcgag agccctcgac	300
tactatgatt acgactttgc ttactggggc cagggcaccc tggcaccgt ctcttcaggc	360
ggcggaggct ctggcggagg tggtagtggg ggccgtggat cagggggagg cggatctggc	420
ggtggcggca gcgacatcgt gatgaccag tctccagac cccctggctgt gtcctcgggc	480
gagaggggca ccatcaactg cagggccagt tatagtattg gcacaaacat acactgttac	540
cagcagaaac caggacagcc tccaaagctg ctcatattact atgtctctcg gtctatctct	600
gggttccctg accgattcag tggcagcggg tctgggacag atttcactct caccatcagc	660
agcctgcagg ctgaagatgt ggcagtttat taccgtcaac aaaataacgc ttggccaacc	720
acgttcggct gcggggacca ggtggagatc aaaggcggag gatctggggg agggggcagc	780
ggaggcgggg gctcgggac cactggtcag gtgcagctgg tgcagcttgg tgcctgaggg	840
aagaagccctg gtgcctcagt gaaggcttcc tgcagggtt ctggttacac attcactgac	900
tactacatgc actgggtgctg tcaggccctt ggtcaaggct ttgagtggat gggctgtgtt	960
aatcciaacc ggagggggtac tacctacaac cagaaattcg agggccgtgt caccatgacc	1020
acagacacat ccacgagcac agcctacatg gagctgcgta gccctgcgtt tgacgacacg	1080
gccgtgtatt actgtgcgct tgcgaactgg ctgtactact ggggccaggg caccaccgtc	1140
accgtctcct ccgccctcac caagggccca tgggtcttcc cgttagcgcc ctgcctcagg	1200
agcacctcgg agagcacagc cggccctgggc tgccttggtc aggactactt ccccgaaacc	1260
gtgacgggtg cgtggaactc aggcggcctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc	1320
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgcccct cagcagcttg	1380
ggcacgaaga cctacacctg caacgtagat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag	1440
agagttgagt ccaaatatgg tccccatgc ccacctgcc cagcaccatg ggccgcccgg	1500
ggacctcag tcttccctgt cccccaaaa cccaaggaca ctctcatgat ctcccgacc	1560
cctgagggtc cgtgcgttgt ggtggacgtg agccagggaag accccgaggt ccagttcaac	1620
tggtagctgg atggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagttc	1680
aacagcacgt accgtgttgt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaacggc	1740
aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa ggccctccgt ctctcatcga gaaaaccatc	1800
tccaaagcca aagggcagcc ccgagagcca cagggtgaca ccctgcccc atcccaggag	1860
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tggcgtgca azggcttcta ccccgagcag	1920



atcgccgtgg agtgggaazg caatgggcag cgggagaaca aclacaagac cagccctccc1980

gtgctggact cggacggctc ctctctctc tacagcaggc taaccgtgga caagagcagg2040

tggcaggagg ggaatgtctt ctcattctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac2100

acacagaaga gccctctccct gtctctgggt tgatag2136

<210> 31

<211> 706

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 31

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met45

Gly Arg Val Asn Pro Asn Arg Arg Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe60

Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys95

Ala Arg Ala Asn Trp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro125

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly190

Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys205

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys220

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro240

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

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

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

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

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

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

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
435 440 445

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
450 455 460

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
465 470 475 480

Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro
485 490 495

Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly Val Ile Tyr Ser Gly Gly Asn Thr
500 505 510

Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu
515 520 525

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
530 535 540



Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Asp
545 550 555 560

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
565 570 575

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
580 585 590

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp
595 600 605

Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala
610 615 620

Ser Tyr Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
625 630 635 640

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Arg Tyr Ala Lys Glu Ser Ile Ser Gly
645 650 655

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
660 665 670

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
675 680 685

Gln Asn Asn Ala Trp Pro Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu
690 695 700

Ile Lys
705

<210> 32
<211> 2124
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 32
cagggtcagc tgggtgcagtc tgggtgctgag gtgaagaagc ctgggtgcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg ctctctggta cacattcact gaclactaca tgcactgggt gcgicaggcc 120
ccctggicaag gtcttgagtg gatgggtcgt gtaaatccta accggagggg lactacctac 180
aaccagaaat tggagggccg tgcaccatg accacagaca catccacgag cacagcciac 240
atggagctgc gtagcctgcg ttctgacgac acggccgtgt attactgtgc gcgtgcgaac 300
tggcttgact acitggggcca gggcaccacc gtcaccgtct cctccgcctc caccaagggc 360
ccatcgggtct tcccgttagc gccctgcctc aggagcacct ccgagagcac agccgccctg 420
ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctgaggcgcc 480
ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggt gtcttacagt cctcaggact ctactccctc 540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta 600
gatcacaagc ccagcaacac caaggtagc aagagagtig agtccaaata tggccccca 660
tgcaccacct gccagcacc tgaggccgcc gggggaccat cagtcttctt gtcccccca 720
aaacccaagg acactctcat gatctcccg accctgagg tcacgtgcgt ggtggtagc 780

gtgagccagg aagaccccca ggiccagttc aacitggtagc tggatggcgt ggaggigcat 840
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 900
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtigca ggtctccaac 960
aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagag 1020
ccacagggtg acaccctgcc cccatcccag gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1080
accctgctgg tcaaaggctt ctaccccgag gacatcgccg tggagtggga aagcaatggg 1140
cagccggaga acaactacaa gaccacgctt cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc 1200
ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg aggggaatgt ctctcatgc 1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctctg 1320
ggtagcgag gctccggggg agggggtagc ggaggagggg gatccaggt gcagctggtg 1380
cagctggggg ctgaggtgaa gaagcctggg tccctgggtga aggtctctg caaggcttct 1440
ggcttctcat taactaacta tgggtgacac tgggtgcgac agggccctgg acaatgtctt 1500
gagtggaagg gagtgtatata tagtggtaga aacacagatt ataatacacc ttcaaagga 1560
cgcgtcacga ttaccgcgga cgaatccacg agcacagcct acatggagct gagcagcctg 1620
agatctgagg acacggccgt gtattacigt gcgagagccc tcgactacia tgattacgac 1680
tttgcttact ggggccaggg caccctggtc accgtctcct caggcggcgg aggtcttggc 1740
ggagggtgga gtaggtggcg tggatcaggg ggaggcggat ctggcggtag cggcagcgac 1800
atcgtgatga cccagcttcc agactccctg gctgtgtctc tgggcgagag ggccaccatc 1860
aactgcaggg ccagtatatag tattggcaca aacatacact ggtaccagca gaaaccagga 1920
cagcctccta agcgtctcat tagatatgt aaggagctia tctctggggt cctgaccga 1980
ttcagtgga gcggtgtcgg gacagatttc actctacca tcagcagcct gcaggctgaa 2040
gatgtggcag ttattactg tcaacaaaat aacgttggc caaccagtt cggctgcggg 2100
accaaggtag agatcaata atag 2124

<210> 33
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 33

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 Ser Val Ser Ser Ser Val Ser Ser Ile
20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

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

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



Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Ser Gly Tyr Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile 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
210 215

<210> 34
<211> 651
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 34
gacatccaga tgaccagtc tccatccicc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgca gtgicagcic aagtgtatcc tccatttact tgcactggta tcagcagaaa 120
ccagggaag cccctaagct cctgattat agcacatcca acttggcttc tggagtcca 180
tcaaggitca gtggcagtgg atctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagtctgcaa 240
cctgaagatt ttgcaactta ctactgtcaa gtctacagtg gtlaccgct caggttcggc 300
ggagggaacca aggtggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtcct catcttcccg 360
ccatctgaig agcagltgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtgaag gtggataacg cccccaatc gggttaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagccctcag cagcaccctg 540
acgtctagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgctaata g 651

<210> 35
<211> 932
<212> PRT
<213> 智人

<400> 35
Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
1 5 10 15

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

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys
65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
100 105 110

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
130 135 140

Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
145 150 155 160

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
165 170 175

Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
180 185 190

Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
195 200 205

His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
210 215 220

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
225 230 235 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
245 250 255

Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
260 265 270

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
275 280 285

His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
290 295 300

Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
305 310 315 320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser

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

Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
645 650 655

Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly
660 665 670

Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg
675 680 685

His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
690 695 700

Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
705 710 715 720

Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
725 730 735

Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
740 745 750

Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn
755 760 765

Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg
770 775 780

Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys
785 790 795 800

Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys
805 810 815

Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp
820 825 830

Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val
835 840 845

Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp
850 855 860

Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys
865 870 875 880

Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val
885 890 895

Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys
900 905 910

Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp
915 920 925

Gln Asn Phe Thr
930

<210> 36

S

<211> 908
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36

Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys
1 5 10 15
Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile
20 25 30
Leu His Glu His His Ile Phe Leu Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val
35 40 45
Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro
50 55 60
Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys
65 70 75 80
Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu
85 90 95
Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val
100 105 110
Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His Val Phe Pro His Asn His Thr Ala
115 120 125
Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu
130 135 140
Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val
145 150 155 160
Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr
165 170 175
Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp His Pro Leu His Ser Ile Ser Val
180 185 190
Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln
195 200 205
Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys
210 215 220
Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val
225 230 235 240
Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg
245 250 255
Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu
260 265 270
Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu
275 280 285

Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln
290 295 300

Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly
305 310 315 320

Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser
325 330 335

Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys
340 345 350

Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro
355 360 365

Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly
370 375 380

Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu
385 390 395 400

Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr
405 410 415

Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly
420 425 430

Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro
435 440 445

Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro
450 455 460

Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val
465 470 475 480

Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys
485 490 495

Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val
500 505 510

Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu
515 520 525

Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val
530 535 540

Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys
545 550 555 560

Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys
565 570 575

Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu
580 585 590

Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys
595 600 605

His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln
610 615 620

Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro
625 630 635 640

Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn
645 650 655

Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr
660 665 670

Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro
675 680 685

Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu
690 695 700

Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val
705 710 715 720

Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile
725 730 735

Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val
740 745 750

Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His
755 760 765

Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln
770 775 780

Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp
785 790 795 800

Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val
805 810 815

Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn
820 825 830

Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly
835 840 845

Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His
850 855 860

Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn
865 870 875 880

Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu
885 890 895

Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp Gln Asn Phe Thr
900 905

<210> 37
 <211> 283
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 37

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

Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile
 20 25 30

Leu His Glu His His Ile Phe Leu Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val
 35 40 45

Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro
 50 55 60

Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys
 65 70 75 80

Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu
 85 90 95

Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val
 100 105 110

Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His Val Phe Pro His Asn His Thr Ala
 115 120 125

Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu
 130 135 140

Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val
 145 150 155 160

Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr
 165 170 175

Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp His Pro Leu His Ser Ile Ser Val
 180 185 190

Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln
 195 200 205

Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys
 210 215 220

Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val
 225 230 235 240

Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg
 245 250 255

Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu
 260 265 270

Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg Lys Lys Arg
 275 280

<210> 38
<211> 212
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38

Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala Tyr Val Ser
1 5 10 15
Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp
20 25 30
Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu
35 40 45
Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys Tyr Val Asn
50 55 60
Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg Cys Leu Gln
65 70 75 80
His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg Thr Leu Leu
85 90 95
Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr Arg Thr Glu
100 105 110
Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly Gln Phe Ser
115 120 125
Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly Asp Leu Thr
130 135 140
Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln Val Val Val
145 150 155 160
Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu Leu Asp Ser
165 170 175
His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu Asn Gln Asn
180 185 190
Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile Pro Leu
195 200 205
Asn Gly Leu Gly
210

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39

Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp Gln Leu
1 5 10

<210> 40
<211> 26
<212> PRT

<213> 智人
<400> 40
Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His Val Phe
1 5 10 15
Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser
20 25

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人
<400> 41
Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe Ile Asn
1 5 10 15
Phe

<210> 42
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人
<400> 42
Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp Gly Phe Met
1 5 10

<210> 43
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人
<400> 43
Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
1 5

<210> 44
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人
<400> 44
His Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser
1 5 10

<210> 45
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人
<400> 45
Phe Ile Asn Phe
1

<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人
<400> 46

Lys Glu Thr Lys Asp Gly Phe Met
1 5

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 47

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 48
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 48

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 49
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 50
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 50

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 51
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 51

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser
1 5 10 15

Thr Gly

<210> 52
<211> 706
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 52

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

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

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

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

Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

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

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

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

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
210 215 220

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



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

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

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

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

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

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

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
435 440 445

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
450 455 460

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
465 470 475 480

Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro
485 490 495

Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr
500 505 510

Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu
515 520 525

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
530 535 540

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Asp
545 550 555 560

Phc Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
565 570 575

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
580 585 590

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp
595 600 605

Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala
610 615 620

Ser Tyr Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
625 630 635 640

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Arg Ser Ile Ser Gly
645 650 655

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
660 665 670

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
675 680 685

Gln Asn Asn Ala Trp Pro Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu
690 695 700

Ile Lys
705

<210> 53
<211> 441
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 53

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

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

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

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

Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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



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

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

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

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

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

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
210 215 220

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

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

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

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

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

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

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

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
340 345 350

• Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440



申請專利範圍

1. 一種多功能抗體，其包含：

(a) 結合MET且包含以下之抗體：

i) 包含分別由胺基酸序列GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 11)、RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 12)及ARANWLDY (SEQ ID NO: 13)組成之重鏈CDR HCDR1、HCDR2及HCDR3之重鏈；及

ii) 包含分別由胺基酸序列SVSSSVSSIYLH (SEQ ID NO: 14)、YSTSNLAS (SEQ ID NO: 15)及QVYSGYPLT (SEQ ID NO: 16)組成之輕鏈CDR LCDR1、LCDR2及LCDR3之輕鏈；及

(b) 結合至EGFR且包含以下之scFv多肽：

i) 包含分別由胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIX₁SGGNTDYNTPF₂X₂G (SEQ ID NO: 9) (其中X₁為Y或W，且X₂為K或T)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域；及

ii) 包含分別由胺基酸序列RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、X₁YAX₂X₃SIS (SEQ ID NO: 10) (其中X₁為R或Y，X₂為K或S，且X₃為E或R)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2及scFv-LCDR3之LCVR域。

2. 如請求項1之多功能抗體，其中結合至EGFR之該scFv包含：

i) 包含分別由胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIYSGGNTDYNTPFKG (SEQ ID NO: 2)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域；及

- ii) 包含分別由胺基酸序列RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、RYAKESIS (SEQ ID NO: 5)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2及scFv-LCDR3之LCVR域。
3. 如請求項1或2之多功能抗體，其中該scFv多肽包含：
 - (a) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 17之HCVR域；及
 - (b) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 18之LCVR域。
4. 如請求項1或2之多功能抗體，其中該重鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO: 53，且該輕鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO: 33。
5. 如請求項1或2之多功能抗體，其中該scFv多肽之C端經由肽連接子融合至該MET抗體重鏈之N端。
6. 如請求項1或2之多功能抗體，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 25。
7. 如請求項1或2之多功能抗體，其中該重鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO: 27，且該輕鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO: 33。
8. 如請求項1或2之多功能抗體，其中結合MET之該抗體包含：
 - (a) 第一重鏈及第二重鏈，其中該等重鏈中之每一者包含分別由該等胺基酸序列GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 11)、RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 12)及ARANWLDY (SEQ ID NO: 13)組成之重鏈CDR HCDR1、HCDR2及HCDR3；及
 - (b) 第一輕鏈及第二輕鏈，其中該等輕鏈中之每一者包含分別由該等胺基酸序列SVSSSVSSIYLH (SEQ ID NO: 14)、YSTSNLAS (SEQ ID NO: 15)及QVYSGYPLT (SEQ ID NO: 16)組成之輕鏈CDR LCDR1、LCDR2及LCDR3。
9. 如請求項8之多功能抗體，其中該第一scFv多肽及該第二scFv多肽各包含：

- i) 包含分別由該等胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIYSGGNTDYNTPFKG (SEQ ID NO: 2)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域；及
 - ii) 包含由該等胺基酸序列RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、RYAKESIS (SEQ ID NO: 5)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2及scFv-LCDR3之LCVR域。
10. 如請求項9之多功能抗體，其中該第一scFv多肽及該第二scFv多肽各包含：
- (a) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 17之HCVR域；及
 - (b) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 18之LCVR域。
11. 如請求項10之多功能抗體，其中該第一及該第二scFv多肽各包含胺基酸序列SEQ ID NO: 23。
12. 如請求項11之多功能抗體，其中結合至MET之該抗體包含：
- i) 第一重鏈及第二重鏈，其中該等重鏈中之每一者包含胺基酸序列SEQ ID NO: 53；及
 - ii) 第一輕鏈及第二輕鏈，其中該等輕鏈中之每一者包含胺基酸序列SEQ ID NO: 33。
13. 如請求項12之多功能抗體，其中該第一scFv多肽之C端經由肽連接子融合至該第一重鏈之N端，且該第二scFv多肽之C端經由肽連接子融合至該第二重鏈之N端。
14. 如請求項13之多功能抗體，其包含兩個第一多肽及兩個第二多肽，其中兩個第一多肽之胺基酸序列均為SEQ ID NO: 27，且兩個第二多肽之胺基酸序列均為SEQ ID NO: 33。
15. 如請求項1或2之多功能抗體，其中該多功能抗體誘導細胞表面

MET及EGFR之內化及/或降解。

16. 如請求項1之多功能抗體，其中結合至EGFR之該scFv包含：
 - i) 包含分別由胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIWSGGNTDYNTPTG (SEQ ID NO: 7)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域；及
 - ii) 包含分別由胺基酸序列RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、YYASRSIS (SEQ ID NO: 8)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2、scFv-LCDR3之LCVR域。
17. 如請求項16之多功能抗體，其中該scFv多肽包含：
 - (a) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 19之HCVR域；及
 - (b) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 20之LCVR域。
18. 如請求項16至17中任一項之多功能抗體，其中結合MET之該抗體包含：
 - i) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 53之重鏈；及
 - ii) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 33之輕鏈。
19. 如請求項16或17之多功能抗體，其中該scFv多肽之C端經由肽連接子融合至該MET抗體重鏈之N端。
20. 如請求項16或17之多功能抗體，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 26。
21. 如請求項16或17之多功能抗體，其包含：
 - i) 胺基酸序列SEQ ID NO: 29；及
 - ii) 胺基酸序列SEQ ID NO: 33。
22. 如請求項21之多功能抗體，其中結合MET之該抗體包含：
 - (a) 第一重鏈及第二重鏈，其中兩條重鏈均包含分別由該等

胺基酸序列 GYTFTDYMH (SEQ ID NO: 11) 、RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEQ ID NO: 12)及ARANWLDY (SEQ ID NO: 13)組成之重鏈CDR HCDR1、HCDR2及HCDR3；及

(b) 第一輕鏈及第二輕鏈，其中兩條輕鏈均包含分別由該等胺基酸序列SVSSSVSSIYLH (SEQ ID NO: 14)、YSTSNLAS (SEQ ID NO: 15)及QVYSGYPLT (SEQ ID NO: 16)組成之輕鏈CDR LCDR1、LCDR2及LCDR3。

23. 如請求項22之多功能抗體，其中該第一scFv多肽及該第二scFv多肽各包含：

i) 包含分別由該等胺基酸序列GFSLTNYGVH (SEQ ID NO: 1)、VIWGGNTDYNTPTFG (SEQ ID NO: 7)及ARALDYDYDFAY (SEQ ID NO: 3)組成之scFv CDR scFv-HCDR1、scFv-HCDR2及scFv-HCDR3之HCVR域；及

ii) 包含分別由該等胺基酸序列RASYSIGTNIH (SEQ ID NO: 4)、YYASRSIS (SEQ ID NO: 8)及QQNNAWPTT (SEQ ID NO: 6)組成之scFv CDR scFv-LCDR1、scFv-LCDR2、scFv-LCDR3之LCVR域。

24. 如請求項23之多功能抗體，其中該第一scFv多肽及該第二scFv多肽各包含：

i) 包含該胺基酸序列SEQ ID NO: 19之HCVR域；及

ii) 包含該胺基酸序列SEQ ID NO: 20之LCVR域。

25. 如請求項24之多功能抗體，其中該第一及該第二scFv多肽各包含胺基酸序列SEQ ID NO: 24。

26. 如請求項25之多功能抗體，其中結合至MET之該抗體包含：

i) 第一重鏈及第二重鏈，其中兩條重鏈均包含胺基酸序列SEQ ID NO: 53；及

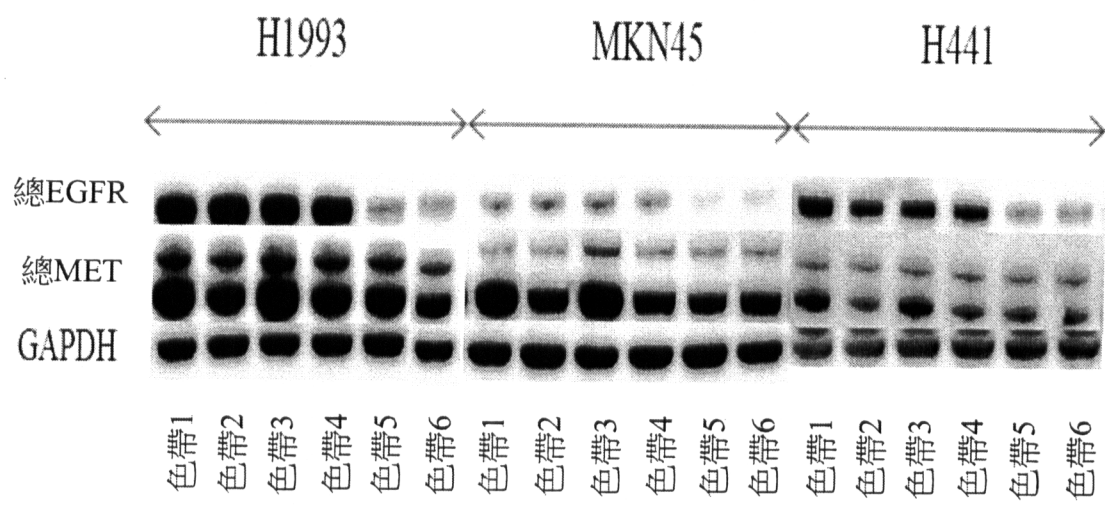
ii) 第一輕鏈及第二輕鏈，其中兩條輕鏈均包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 33。

27. 如請求項26之多功能抗體，其中該第一scFv多肽之C端經由肽連接子融合至該第一重鏈之N端，且該第二scFv多肽之C端經由肽連接子融合至該第二重鏈之N端。
28. 如請求項27之多功能抗體，其包含兩個第一多肽及兩個第二多肽，其中兩個第一多肽之胺基酸序列均為SEQ ID NO: 29，且兩個第二多肽之胺基酸序列均為SEQ ID NO: 33。
29. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至28中任一項之多功能抗體或其MET及EGFR結合片段，及醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。
30. 如請求項1、2、16及17中任一項之多功能抗體，其用於療法。
31. 如請求項1、2、16及17中任一項之多功能抗體，其用於治療癌症。
32. 如請求項1、2、16及17中任一項之多功能抗體，其用於治療NSCLC、SCLC、胃癌、結腸直腸癌、膽管癌、食道癌、黑素瘤、葡萄膜黑素瘤、腎癌、肝癌、膀胱癌、子宮頸癌或頭頸癌。
33. 如請求項1、2、16及17中任一項之多功能抗體，其用於治療NSCLC、SCLC、胃癌、結腸直腸癌、膽管癌、食道癌、黑素瘤、葡萄膜黑素瘤、腎癌、肝癌、膀胱癌、子宮頸癌或頭頸癌，其中該癌症藉由包含具有一或多種KRAS突變之細胞表徵。
34. 一種如請求項1至28中任一項之多功能抗體之用途，其用於製造治療癌症之藥物。
35. 如請求項34之用途，其中該癌症為人類之NSCLC、SCLC、胃癌、結腸直腸癌、膽管癌、食道癌、黑素瘤、葡萄膜黑素瘤、

腎癌、肝癌、膀胱癌、子宮頸癌或頭頸癌。

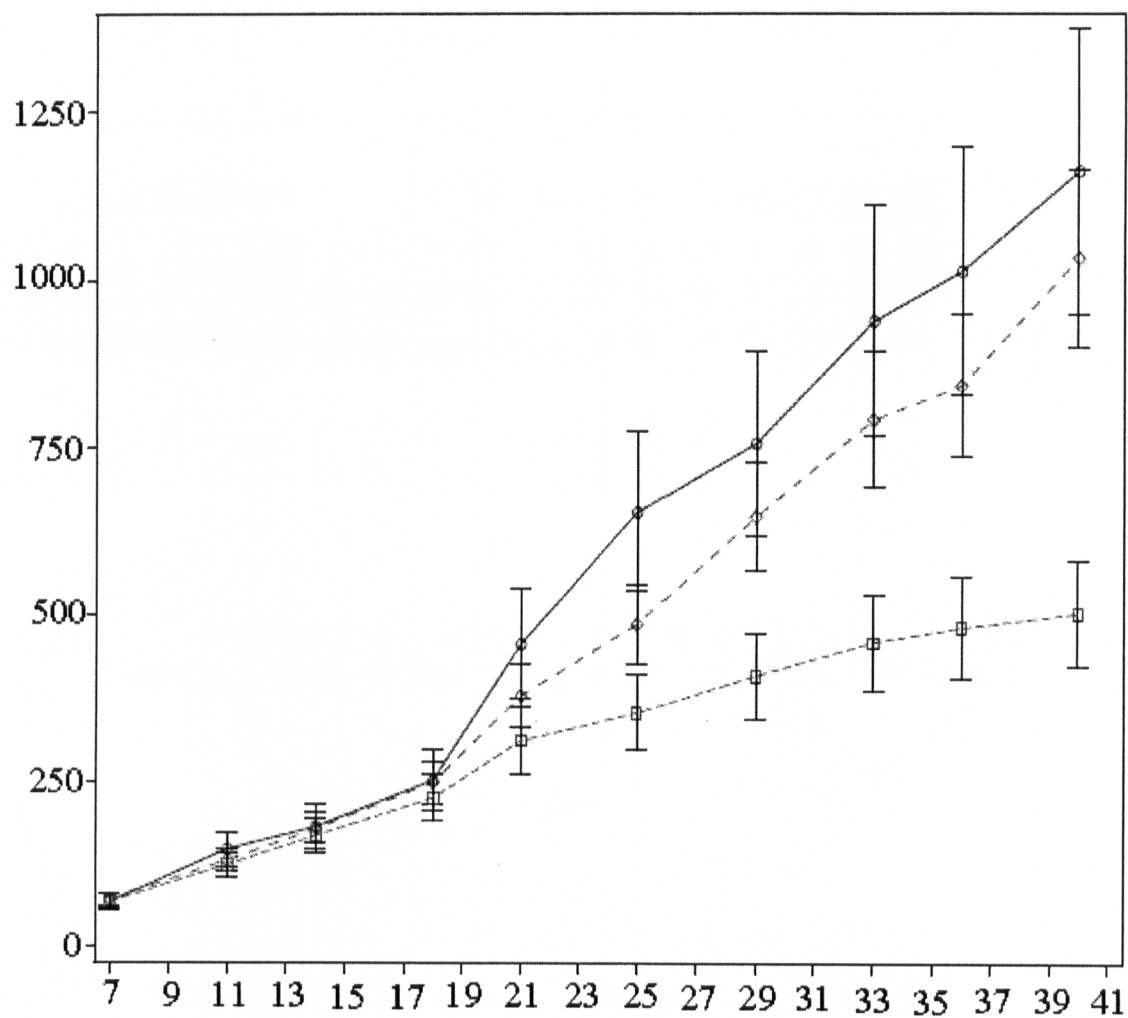
36. 如請求項34或35之用途，其中該腫瘤藉由包含具有一或多種KRAS突變之細胞表徵。
37. 一種DNA分子，其包含編碼具有胺基酸序列SEQ ID NO: 27之多肽的聚核苷酸。
38. 一種DNA分子，其包含編碼具有胺基酸序列SEQ ID NO: 23之多肽的聚核苷酸。
39. 一種DNA分子，其包含：
 - (a) 編碼具有胺基酸序列SEQ ID NO: 27之多肽的聚核苷酸；
 - 及
 - (b) 編碼具有胺基酸序列SEQ ID NO: 33之多肽的聚核苷酸。
40. 一種用如請求項37至39中任一項之DNA分子轉型的哺乳動物細胞，該細胞能夠表現包含具有胺基酸序列SEQ ID NO: 27之第一多肽及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 33之第二多肽的多功能抗體。
41. 如請求項40之哺乳動物細胞，其中該哺乳動物細胞為CHO。
42. 一種產生包含胺基酸序列為SEQ ID NO: 27之第一多肽及胺基酸序列為SEQ ID NO: 33之第二多肽之多功能抗體的方法，其包含：(1)在表現該多功能抗體之條件下培養如請求項40或41之哺乳動物細胞，及(2)回收該表現之多功能抗體。
43. 一種結合MET及EGFR之多功能抗體，其藉由如請求項42之方法產生。

圖式



色帶1：hIgG4；色帶2：抗MET Ab；色帶3：西妥昔單抗；
色帶4抗MET Ab +西妥昔單抗；色帶5：NH-YK；色帶6：NH-H9

圖1

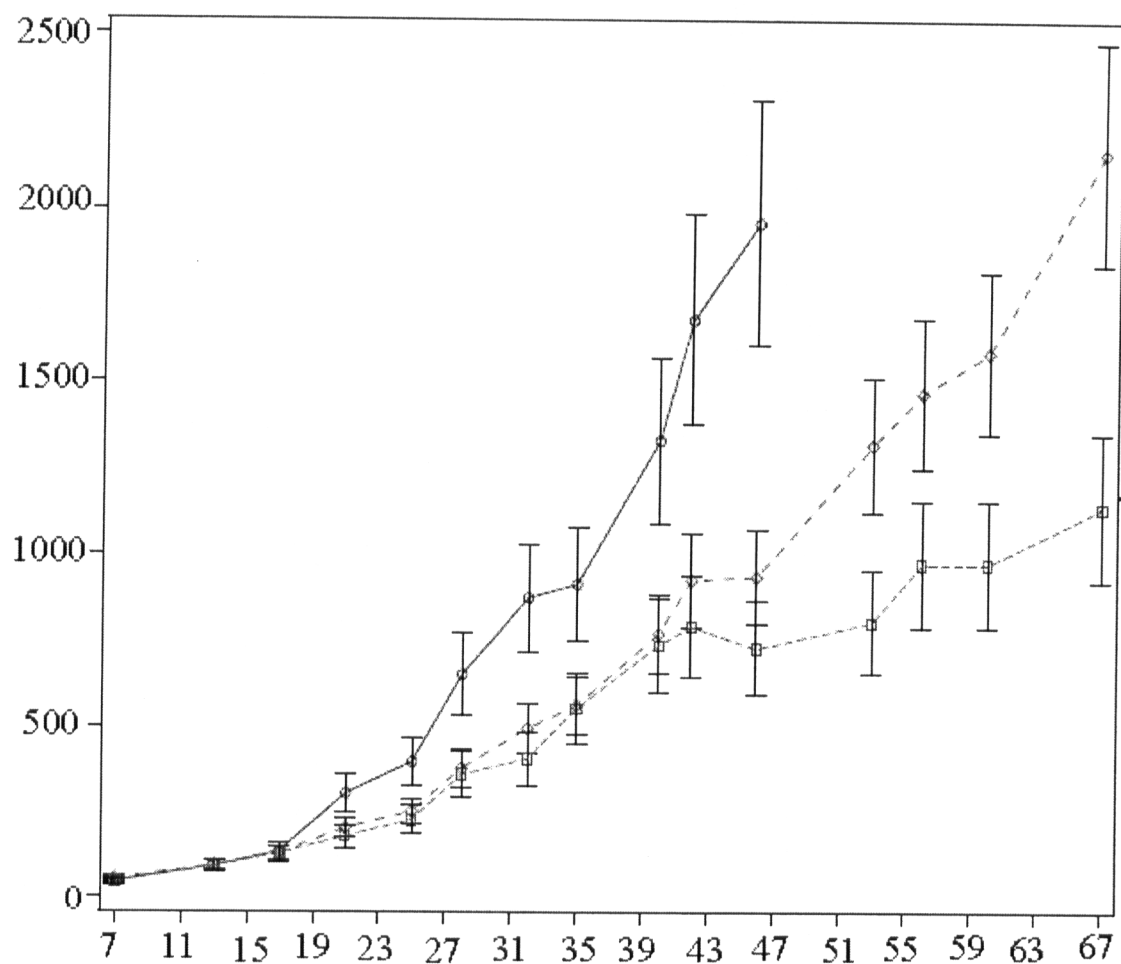


圖之Y軸=腫瘤體積(mm³)，平均值±標準誤差
圖之X軸=植入之後的天數

圖例：

- 媒劑對照
- 20 mpk西妥昔單抗+ 20 mpk抗MET Ab
- 27 mpk NH-YK

圖2

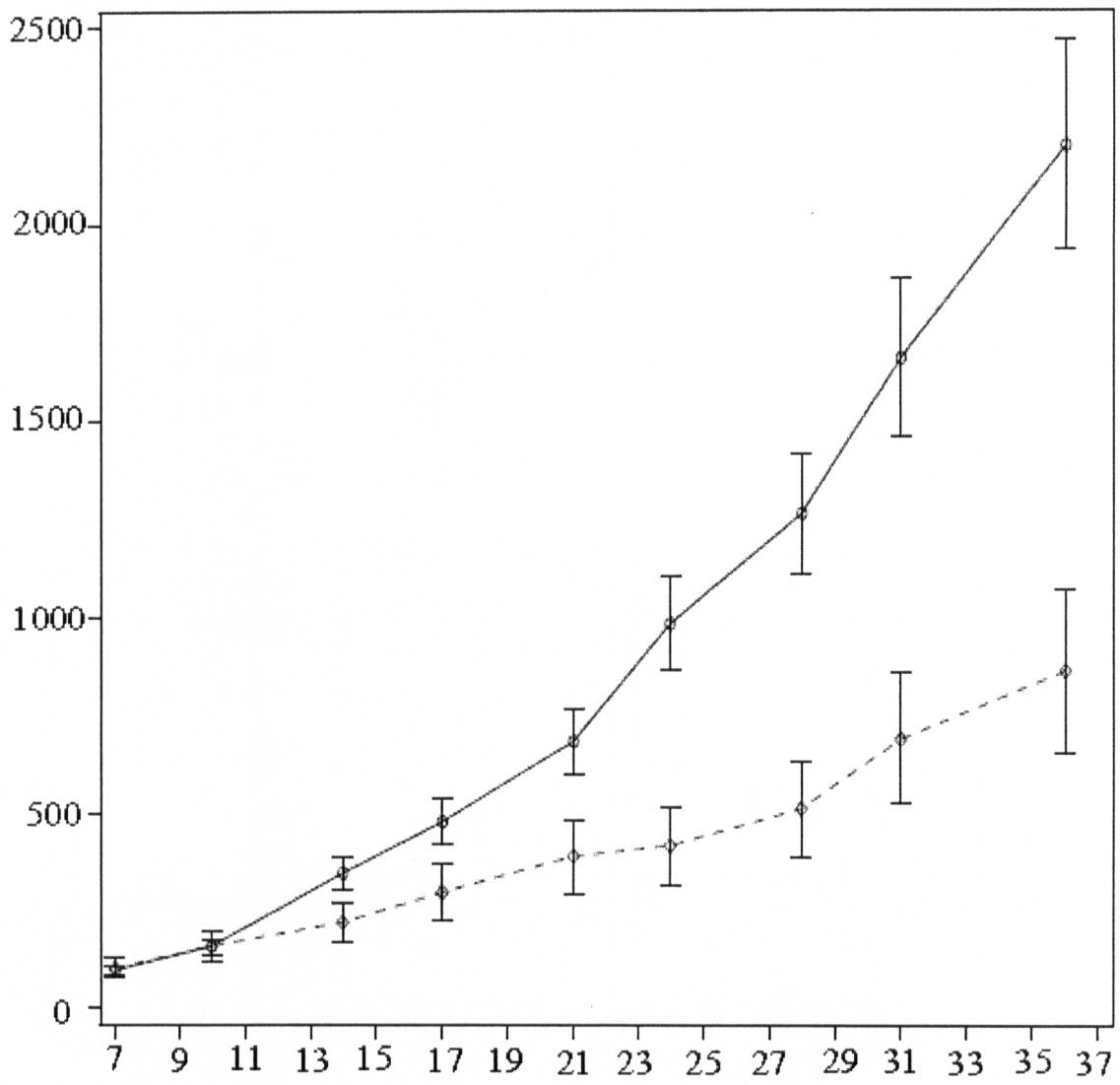


圖之Y軸=腫瘤體積(mm³)，平均值±標準誤差
圖之X軸=植入之後的天數

圖例：

- 媒劑對照
- 20 mpk西妥昔單抗+ 20 mpk抗MET Ab
- 27 mpk NH-YK

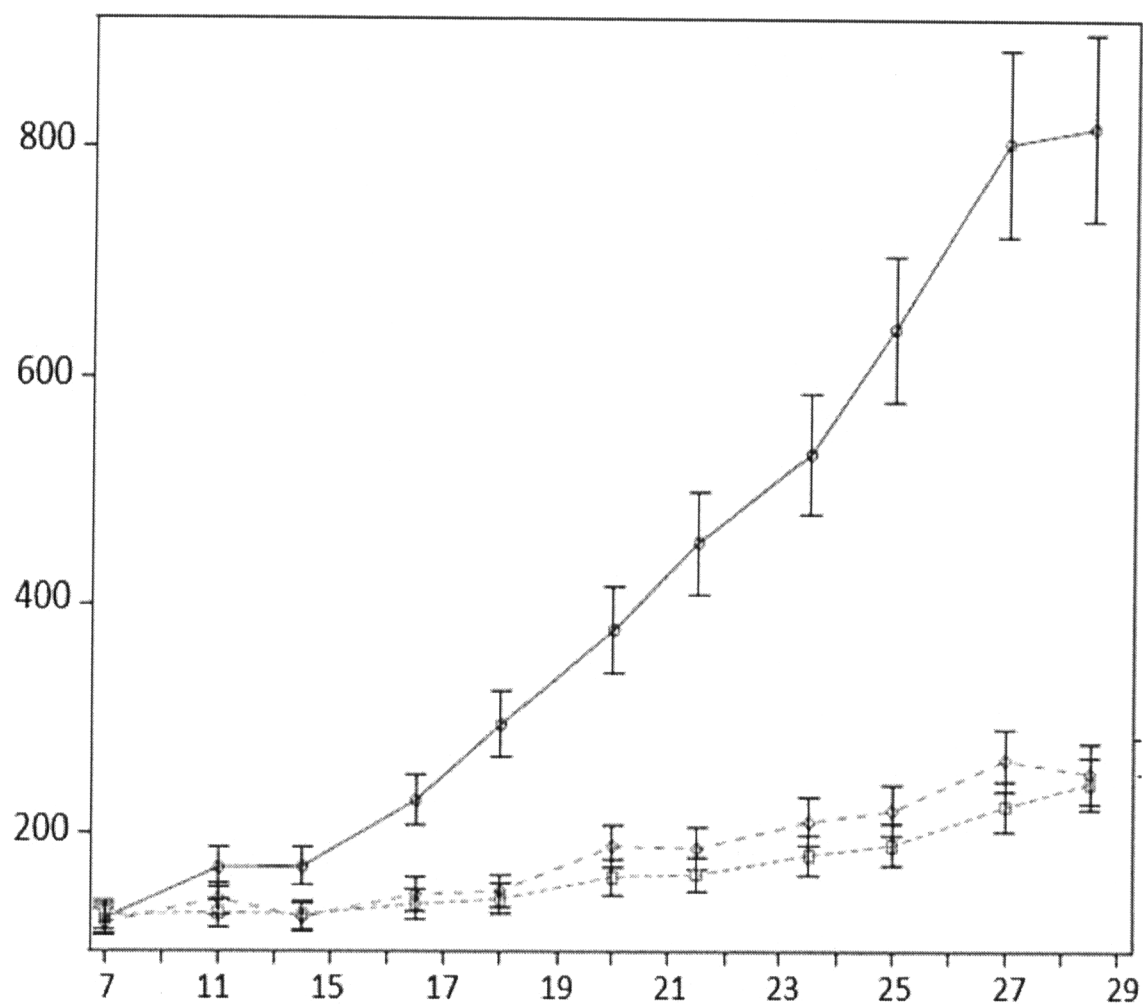
圖3



圖之Y軸=腫瘤體積(mm³)，平均值±標準誤差
圖之X軸=植入之後的天數

圖例：
—— 媒劑對照
----- 10 mpk NH-YK

圖4

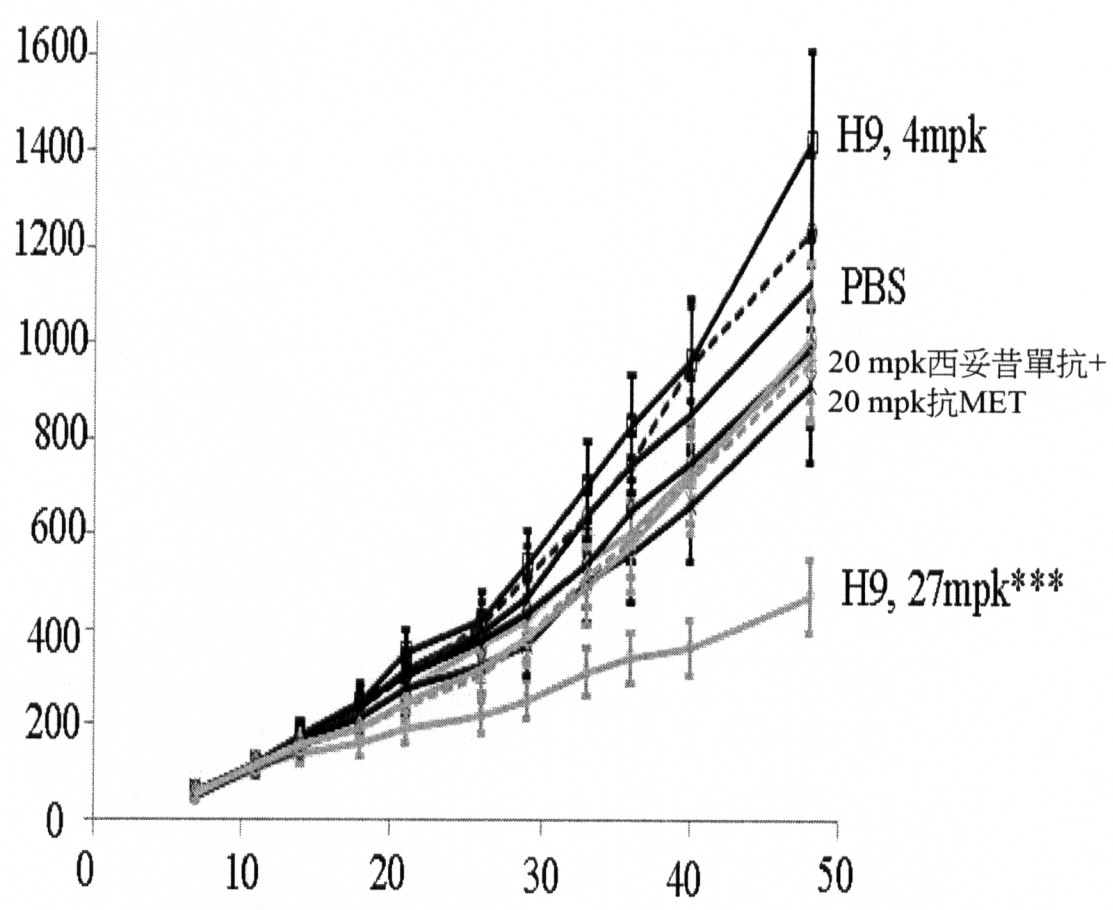


圖之Y軸=腫瘤體積(mm³)，平均值±標準誤差
圖之X軸=植入之後的天數

圖例：

- 媒劑對照
- 20 mpk西妥昔單抗+ 20 mpk抗MET Ab
- 27 mpk NH-YK

圖5

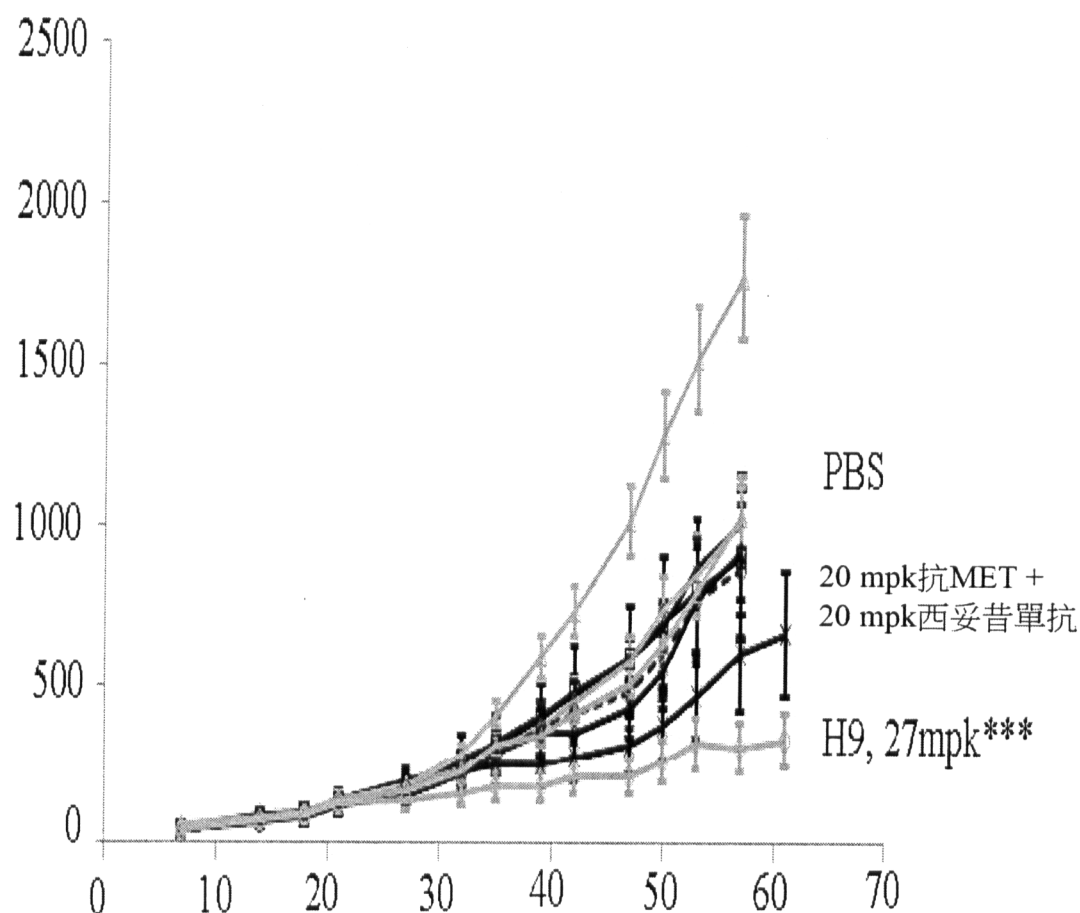


圖之Y軸=腫瘤體積(mm³)，平均值±標準誤差，方法= (LogVol,sp)
圖之X軸=植入之後的天數

圖例：

- PBS, 0.2 ml, IV, q7d x 5
- H9, 4 mg/kg, IV, q7d x 5
- △— H9, 27 mg/kg, IV, q7d x 5
- ◇— 抗MET, 3 mg/kg, IV, q7d×5
- 西妥昔單抗, 3 mg/kg, IV, q7d×5
- ◇— < n西妥昔單抗, 3 mg/kg, IV, q7d×5
- ×— 抗MET, 3 mg/kg, IV, q7d×5/西妥昔單抗, 3 mg/kg, IV, q7d×5
- ◇— 抗MET, 20 mg/kg, IV, q7d×5
- △— 西妥昔單抗, 20 mg/kg, IV, q7d×5
- ◇— < n西妥昔單抗, 20 mg/kg, IV, q7d×5
- ◇— 抗MET, 20 mg/kg, IV, q7d×5/西妥昔單抗, 20 mg/kg, IV, q7d×5

圖6



圖之Y軸=腫瘤體積(mm³)，平均值±標準誤差，方法=(LogVol,sp)
圖之X軸=植入之後的天數

圖例：

- PBS, 0.2 ml, IV, q7d x 5
- 抗MET, 0.6 mg/kg, IV, q7d×5/西妥昔單抗, 0.6 mg/kg, IV, q7d×5
- ◇— 抗MET, 3 mg/kg, IV, q7d×5
- △— 西妥昔單抗, 3 mg/kg, IV, q7d×5
- 抗MET, 3 mg/kg, IV, q7d×5/西妥昔單抗, 3 mg/kg, IV, q7d×5
- < n抗MET, 3 mg/kg, IV, q7d×5/西妥昔單抗, 3 mg/kg, IV, q7d×5
- ×— 抗MET, 20 mg/kg, IV, q7d×5/西妥昔單抗, 20 mg/kg, IV, q7d×5
- ◆— H9, 0.8 mg/kg, IV, q7d x 5
- H9, 4 mg/kg, IV, q7d x 5
- ▲— H9, 27 mg/kg, IV, q7d x 5

圖7