



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I600760 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：099138260

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 11 月 05 日

(51)Int. Cl. : C12N15/12 (2006.01)

C12N15/63 (2006.01)

C12P21/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/11/05 美國

61/258,565

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

美國

(72)發明人：梅立其 馬修 MARRICHI, MATTHEW (US) ; 萊利 朵拉西亞 E REILLY,
DOROTHEA E. (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 96/27016A1

WO 2005/038031A1

WO 2005/063816A2

審查人員：莊智惠

申請專利範圍項數：57 項 圖式數：8 共 211 頁

(54)名稱

分泌異源多肽之方法及組合物

METHODS AND COMPOSITION FOR SECRETION OF HETEROLOGOUS POLYPEPTIDES

(57)摘要

本發明大體上係關於分子生物學及蛋白質技術領域。更特定言之，本發明係關於一種使細菌分泌異源多肽之信號序列。本發明亦係關於重組多肽及其用途。

The present invention relates generally to the fields of molecular biology and protein technology. More specifically, the invention concerns signal sequences for the secretion of heterologous polypeptide from bacteria. The invention also concerns recombinant polypeptides and uses thereof.

指定代表圖：

符號簡單說明：
(無元件符號說明)

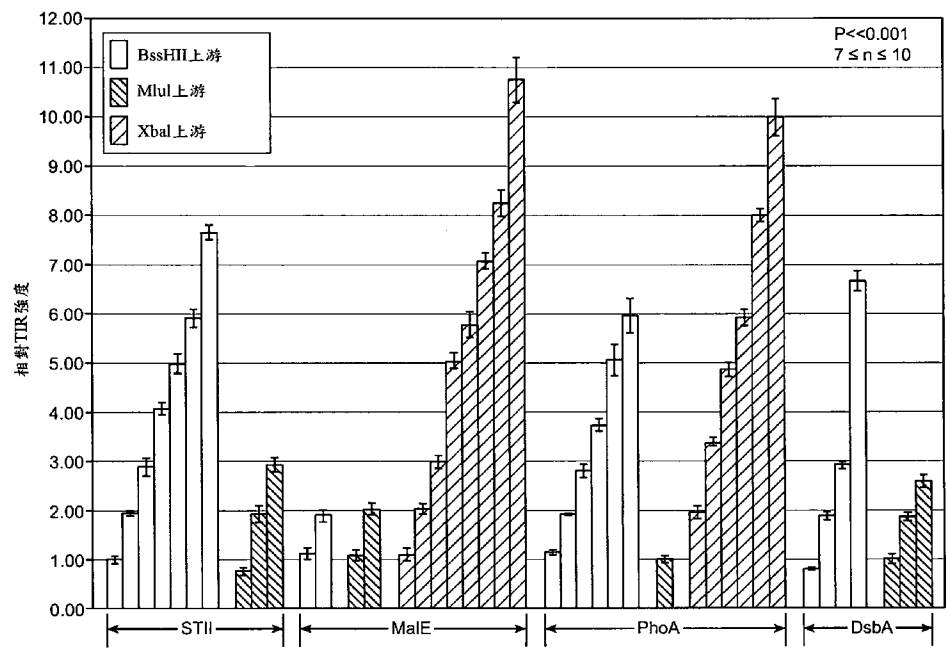


圖2

發明專利說明書

公告本

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99138260

※申請日：99. 11. -5

※IPC 分類：C07K; A61P

一、發明名稱：(中文/英文)

分泌異源多肽之方法及組合物

METHODS AND COMPOSITION FOR SECRETION OF
HETEROLOGOUS POLYPEPTIDES

C12N15/12

(2005.01)

C12N15/63

(2005.01)

C12P21/00

(2006.01)

二、中文發明摘要：

本發明大體上係關於分子生物學及蛋白質技術領域。更特定言之，本發明係關於一種使細菌分泌異源多肽之信號序列。本發明亦係關於重組多肽及其用途。

三、英文發明摘要：

The present invention relates generally to the fields of molecular biology and protein technology. More specifically, the invention concerns signal sequences for the secretion of heterologous polypeptide from bacteria. The invention also concerns recombinant polypeptides and uses thereof.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (2) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明大體上係關於分子生物學及蛋白質技術領域。更特定言之，本發明係關於用於自細菌分泌異源多肽之信號序列。本發明亦係關於原核生物產生之重組多肽及其用途。

本申請案主張2009年11月5日申請之美國專利申請案第61/258,565號之優先權，該申請案之內容係以引用的方式併入本文中。

【先前技術】

向大腸桿菌及其他原核生物之細胞周質空間中或向其培養基中分泌異源多肽受多種參數影響。通常，對分泌相關多肽之載體進行工程改造以使編碼分泌信號序列之DNA定位至編碼相關多肽之DNA的5'端。

近年來已發現日漸增多地有望使用異源多肽(例如抗體)作為多種病症及疾病的診斷劑及治療劑。許多研究及臨床應用需要大量功能多肽，因而需要可按比例擴大但經濟的多肽產生系統。使用諸如大腸桿菌(*E. coli*)或枯草桿菌(*B. subtilis*)之原核生物至酵母、植物、昆蟲細胞及哺乳動物細胞範圍內的各種表現宿主重組產生抗體尤其適用。Kipriyanov及Little (1999) *Mol. Biotech.* 12:173-201。

與其他多肽產生系統相比，細菌，尤其大腸桿菌，具有許多獨特優勢。所使用之原料(亦即細菌細胞)便宜且易於培養，因此降低產物之成本。原核生物宿主比例如哺乳動

物細胞生長得快，因而允許更快地分析基因操作。細菌醱酵由於產生時間較短且易於按比例擴大而成為更具吸引力的大量產生蛋白質之方式。已充分研究許多菌種(包括大腸桿菌)之基因體結構及生物活性且可利用多種適合載體，使得所要抗體之表現更為方便。與真核生物相比，該產生方法所涉及的步驟較少，包括操作重組基因、將多個複本穩定轉型至宿主中、誘導表現及表徵產物。Pluckthun及Pack (1997) *Immunotech* 3:83-105。

已使用多種方法在細菌中產生重組多肽。可自細菌藉由使於細胞質中表現之包涵體再摺疊或藉由表現後分泌至細菌細胞周質來獲得重組蛋白質。一般根據若干考慮在分泌與再摺疊之間作出選擇。分泌通常為更快且更常用的產生抗體之策略。Kipriyanov及Little (1999), 同上文。

原核生物系統中之抗體表現可以不同規模進行。搖瓶培養(在2-5公升範圍內)通常產生少於5毫克/公升之產物。Carter等人(1992) *Bio/Technology* 10:12-16研發出一種高細胞密度醱酵系統，在該系統中獲得抗體片段之高表現量(多達2公克/公升)。Carter等人所獲得之Fab'之公克/公升效價主要歸因於由於醱酵罐與簡單搖瓶相比更精確控制之環境而產生之較高細胞密度。該系統含有設計用於共表現輕鏈及重鏈片段之雙順反子操縱子。雙順反子操縱子受單一大腸桿菌phoA啟動子控制，該啟動子可由磷酸鹽缺乏誘導。各抗體鏈之前為大腸桿菌熱穩定腸毒素II(stII)信號序列，以便指導分泌至細胞周質空間。

關於在大腸桿菌中產生抗體之一般性綜述，參看 Pluckthun及Pack (1997) *Immunotech* 3:83-105；Pluckthun 等人(1996), *Antibody Engineering: A Practical Approach*, 第 203-252 頁 (Oxford Press)；Pluckthun (1994), *Handbook of Exp Pharmacol* 第 3 卷：The Pharmacol of Monoclonal Antibodies, 第 269-315 頁 (M. Rosenberg 及 G.P. Moore 編；Springer-Verlag, Berlin)。

許多生物檢定(諸如 X 射線結晶學)及臨床應用(諸如蛋白質療法)需要大量蛋白質。因此，需要高產但簡單之系統來產生正確組裝、可溶且具功能性之異源多肽，諸如抗體。

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

【發明內容】

本發明提供一種增加異源蛋白質之產生的新穎方法，該方法包含使用新穎轉譯起始區(TIR)變異體，包括包含共轉譯分泌信號肽(指導以共轉譯方式移位之信號肽)之TIR變異體及包含轉譯後分泌信號肽(指導以轉譯後方式移位之信號肽)之TIR變異體。另外，本文中顯示使用載體增加抗體產生，該等載體包含抗體輕鏈以操作方式連接於包含共轉譯分泌信號肽或轉譯後分泌信號肽之TIR及抗體重鏈以操作方式連接於包含共轉譯分泌信號肽之TIR以達成峰值表現。

在一態樣中，本發明提供變異轉譯起始區。在一些實施

例中，變異體包含變異轉譯起始區(在一些實施例中為原核生物轉譯後分泌信號序列或原核生物共轉譯分泌信號序列)。在一些實施例中，變異體包含諸如PhoA、MalE、DsbA或STII之分泌信號序列之核酸變異體。在一些實施例中，變異體另外包含*MlaI*、*BssHII*或*XbaI*限制位點。在一些實施例中，變異體包含有含表3中所示之序列的轉譯起始區變異體。

在一態樣中，本發明提供變異分泌信號序列。在一些實施例中，分泌信號序列為原核生物轉譯後分泌信號序列或原核生物共轉譯分泌信號序列。在一些實施例中，分泌信號序列為真核生物轉譯後分泌信號序列或真核生物共轉譯分泌信號序列。在一些實施例中，變異體為PhoA、MalE、DsbA或STII分泌信號序列之核酸變異體。在一些實施例中，變異體包含表3中所示之分泌信號序列。

在另一態樣中，本發明提供包含本發明之轉譯起始區之聚核苷酸。在一些實施例中，轉譯起始區包含表3中所示之序列(例如SEQ ID NO 1-42中之一者)。在一些實施例中，轉譯起始區包含SEQ ID NO 1-14、16-24、26-39、41-42中之一者。

在另一態樣中，本發明提供包含本發明之分泌信號序列之聚核苷酸。在一些實施例中，分泌信號序列包含表3中所示之序列(例如SEQ ID NO 1-42中之一者)。在一些實施例中，轉譯起始區包含SEQ ID NO 1-14、16-24、26-39、41-42中之一者。

在另一態樣中，本發明提供一種聚核苷酸，其包含本發明之轉譯起始區以操作方式連接於編碼異源多肽之聚核苷酸，藉此在該異源多肽於宿主細胞(例如原核生物宿主細胞，例如大腸桿菌宿主細胞)中表現後，該異源多肽摺疊並組裝以形成生物活性異源多肽。本文中進一步揭示異源多肽之實例。在一些實施例中，異源多肽為抗體重鏈。在一些實施例中，異源多肽為抗體輕鏈。在一些實施例中，異源多肽為Fc多肽。在一些實施例中，轉譯起始區為本文中所揭示之任何轉譯起始區，例如包含表3中所示序列之轉譯起始區。在一些實施例中，轉譯起始區包含SEQ ID NO 1-42中之一者之序列。在一些實施例中，轉譯起始區包含SEQ ID NO 1-14、36-39、41-42中之一者之序列。在一些實施例中，轉譯起始區包含變異STII、DsbI、PhoA或MalE信號序列。

在另一態樣中，本發明提供編碼抗體之聚核苷酸，該聚核苷酸包含(1)本發明之第一轉譯起始區以操作方式連接於編碼抗體重鏈之聚核苷酸及(2)第二轉譯起始區以操作方式連接於編碼抗體輕鏈之聚核苷酸，藉此在該抗體於宿主細胞(例如原核生物宿主細胞，例如大腸桿菌宿主細胞)中表現後，重鏈及輕鏈摺疊並組裝以形成生物活性抗體。

在一些實施例中，第一轉譯起始區包含共轉譯原核生物分泌信號序列(例如指導經由信號識別肽轉譯之信號序列)。在一些實施例中，第一轉譯起始區包含STII或DsbA信號序列。在一些實施例中，第一轉譯起始區包含DsbA

信號序列。在一些實施例中，第一轉譯起始區包含PhoA或MalE信號序列。在一些實施例中，第一轉譯起始區包含SEQ ID NO:1-10及36-42中之一者之序列。在一些實施例中，第一轉譯起始區包含SEQ ID NO:1-10及36-29以及41及42中之一者之序列。在一些實施例中，第一轉譯起始區包含SEQ ID NO 1-42中之一者之序列。在一些實施例中，第一轉譯起始區包含SEQ ID NO 1-14、16-24、26-39、41-42中之一者之序列。

在一些實施例中，第二轉譯起始區域包含(i)共轉譯原核生物分泌信號序列或轉譯後原核生物分泌信號序列(例如指導經由sec路徑轉譯之信號序列)。在一些實施例中，第二轉譯起始區包含STII、DsbA、MalE或PhoA信號序列。在一些實施例中，第二轉譯起始區包含PhoA或MalE信號序列。在一些實施例中，第二轉譯起始區包含SEQ ID NO 1-42中之一者之序列。在一些實施例中，第二轉譯起始區包含SEQ ID NO 1-14、16-24、26-39、41-42中之一者之序列。

在一些實施例中，編碼抗體之聚核苷酸進一步包含(3)第三轉譯起始區以操作方式連接於編碼Fc多肽之聚核苷酸。在一些實施例中，第三轉譯起始區包含STII、PhoA或DsbA信號序列。在一些實施例中，第三轉譯起始區包含DsbA信號序列。在一些實施例中，第三轉譯起始區包含PhoA信號序列。

在另一態樣中，本發明提供編碼抗體片段(諸如單價抗

體片段)之聚核苷酸，該聚核苷酸包含(1)本發明之第一轉譯起始區以操作方式連接於編碼抗體重鏈之聚核苷酸；(2)第二轉譯起始區以操作方式連接於編碼抗體輕鏈之聚核苷酸；及(3)第三轉譯起始區以操作方式連接於編碼Fc多肽之聚核苷酸，藉此在該抗體於宿主細胞(例如原核生物宿主細胞)中表現後，重鏈、輕鏈及Fc多肽摺疊並組裝以形成生物活性抗體(諸如單臂抗體)。在一些實施例中，第三轉譯起始區包含共轉譯原核生物分泌信號序列或轉譯後原核生物分泌信號序列。在一些實施例中，第三轉譯起始區包含STII、PhoA、MalE或DsbA信號序列。在一些實施例中，第三轉譯起始區包含DsbA信號序列。在一些實施例中，第三轉譯起始區包含PhoA信號序列。在一些實施例中，第三轉譯起始區包含SEQ ID NO 1-42中之一者之序列。在一些實施例中，第三轉譯起始區包含SEQ ID NO 1-14、16-24、26-39、41-42中之一者之序列。

在另一態樣中，本發明提供編碼抗體之聚核苷酸，該聚核苷酸包含(1)本發明之第一轉譯起始區以操作方式連接於編碼抗體重鏈之聚核苷酸，其中該第一轉譯起始區包含STII或DsbA信號序列；及(2)第二轉譯起始區以操作方式連接於編碼抗體輕鏈之聚核苷酸，其中該第二轉譯起始區包含STII、DsbA、MalE或PhoA信號序列，藉此在該抗體於宿主細胞(例如原核生物宿主細胞)中表現後，輕鏈及重鏈摺疊並組裝以形成生物活性抗體。在一些實施例中，第一轉譯起始區包含DsbA信號序列且第二轉譯起始區包含

MalE或PhoA信號序列。在一些實施例中，編碼抗體之聚核苷酸進一步包含(3)第三轉譯起始區以操作方式連接於編碼Fc多肽之聚核苷酸。在一些實施例中，第三轉譯起始區包含STII、PhoA或DsbA信號序列。在一些實施例中，第三轉譯起始區包含PhoA信號序列。在一些實施例中，第三轉譯起始區包含DsbA信號序列。

在一些實施例中，該變異轉譯起始區之轉譯強度小於野生型轉譯起始區之轉譯強度。在一些實施例中，該變異轉譯起始區之轉譯強度大於野生型轉譯起始區之轉譯強度。在一些實施例中，轉譯起始變異體之胺基酸序列相對於野生型胺基酸序列不變。在一些實施例中，轉譯起始變異體之胺基酸序列相對於野生型胺基酸序列改變。在一些實施例中，轉譯起始區包括原核生物分泌信號序列。在一些實施例中，第一轉譯起始區及第二轉譯起始區(及在一些實施例中第三轉譯起始區)提供大致相等之轉譯強度。在一些實施例中，相對轉譯強度為約1或2。在一些實施例中，相對轉譯強度為約1。在一些實施例中，相對轉譯強度為約2。在一些實施例中，相對轉譯強度為1及/或2。在一些實施例中，相對轉譯強度為約3或約4。在一些實施例中，相對轉譯強度係選自1、2、3、4、5或5以上(諸如6或7或7以上)中之一或多者。

在一些實施例中，本發明之聚核苷酸進一步包含啟動子以操作方式連接於異源多肽。在一些實施例中，該啟動子為選自由phoA、tac、lpp、lac-lpp、lac、ara、trp及T7啟

動子組成之群的原核生物啟動子。在一些實施例中，啟動子為phoA啟動子。在涉及抗體重鏈及輕鏈之表現的一些實施例中，該聚核苷酸進一步包含(a)第一啟動子，其中該第一啟動子以操作方式連接於輕鏈；及(b)第二啟動子，其中該第二啟動子以操作方式連接於重鏈。在一些實施例中，第一啟動子及第二啟動子均為phoA啟動子。在涉及抗體重鏈及輕鏈及Fc多肽之表現的一些實施例中，該聚核苷酸進一步包含(c)第三啟動子，其中該第三啟動子以操作方式連接於Fc多肽。在一些實施例中，第三啟動子為Fc多肽。

當表現包含一個以上多肽(例如包含重鏈及輕鏈之抗體)之多肽時，表現該多肽之聚核苷酸可能為多順反子聚核苷酸(即含有多個順反子並在單一啟動子之調節控制下表現該等順反子的單一聚核苷酸)。多順反子載體之常見實例為含有兩個不同多肽並在一個啟動子控制下表現該兩個多肽的「雙順反子」載體。雙順反子或多順反子載體表現後，多個編碼區(例如基因)首先轉錄為單一轉錄單元，接著分別轉譯。順反子係指廣義上與包含編碼多肽鏈及相鄰控制區(包括例如TIR)之核苷酸序列之轉譯單元相等的遺傳元件。在其他實施例中，聚核苷酸可包含獨立順反子，其係指包含至少兩個獨立啟動子-順反子對之單一聚核苷酸，其中各順反子受其自身啟動子控制。獨立順反子表現載體表現後，不同基因之轉錄及轉譯過程獨立且無關。在另一實施例中，聚核苷酸可包含多順反子部分及獨立順反子部分。

在又一態樣中，本發明提供包含本發明聚核苷酸之載體。在一些實施例中，載體為表現載體。

在另一態樣中，本發明提供包含一或多種本發明聚核苷酸及載劑之組合物。在一實施例中，該載劑在醫藥學上可接受。

在一態樣中，本發明提供包含本發明之聚核苷酸或載體的宿主細胞。在一些實施例中，宿主細胞包含編碼抗體(在一些實施例中為雙特異性抗體或單臂抗體)之本發明聚核苷酸。宿主細胞可包含共同編碼該抗體之一或多種聚核苷酸。載體可為任何類型，例如重組載體，諸如表現載體。可使用各種宿主細胞中之任一者。在一實施例中，宿主細胞為原核生物細胞，例如大腸桿菌。在一些實施例中，大腸桿菌為缺乏內源蛋白酶活性之菌株。在一些實施例中，大腸桿菌之基因型缺乏 *degP* 及 *prc* 基因且含有突變 *spr* 基因。

在一些實施例中，宿主細胞進一步包含編碼伴隨蛋白(諸如 Dsb 蛋白 DsbA、DsbB、DsbC、DsbD 及 / 或 DsbG) 之聚核苷酸。在一些實施例中，伴隨蛋白於宿主細胞中過度表現。在一些實施例中，伴隨蛋白為 DsbA 及 / 或 DsbC。

在一態樣中，宿主細胞包含共同編碼單臂抗體之一或多種聚核苷酸。在一實施例中，單一聚核苷酸編碼(a)該單臂抗體之輕鏈及重鏈組分及(b)Fc多肽。在一實施例中，單一聚核苷酸編碼該單臂抗體之輕鏈及 Fc 多肽組分，且獨立聚核苷酸編碼重鏈多肽。在一實施例中，單一聚核苷酸編碼

該單臂抗體之重鏈及Fc多肽組分，且獨立聚核苷酸編碼該單臂抗體之輕鏈組分。在一實施例中，獨立聚核苷酸分別編碼該單臂抗體之輕鏈組分、該單臂抗體之重鏈組分及Fc多肽。

本文中描述異源多肽。在一些實施例中，異源多肽為抗體。在一些實施例中，抗體為單株抗體。在其他實施例中，抗體為多株抗體。在一些實施例中，抗體係選自由嵌合抗體、親和力成熟抗體、人類化抗體及人類抗體組成之群。在某些實施例中，抗體為雙特異性抗體。在某些實施例中，抗體為抗體片段。在一些實施例中，抗體為單價抗體。在一些實施例中，抗體為Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂或scFv。在一些實施例中，抗體為包含Fc區之單臂抗體(亦即重鏈可變域及輕鏈可變域形成單一抗原結合臂)，其中該Fc區包含第一Fc多肽及第二Fc多肽，其中該第一Fc多肽及該第二Fc多肽以複合物形式存在且形成使該抗體片段之穩定性與包含該抗原結合臂之Fab分子相比有所增加的Fc區。

在一些實施例中，抗體結合(在一些實施例中特異性結合)c-met。在一些實施例中，抗c-met抗體包含(a)包含具有序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQ
APGKGLEWVG MIDPSNSDTRFNP NFKDRFTISADTSKNTA
YLQMNSLR AEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGTLVTVS
S(SEQ ID NO:43)之重鏈可變域、CH1序列及第一Fc多肽的

第一多肽；(b)包含具有序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKSSQSLLYTSSQKNYLAW
YQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIKR(SEQ ID NO:44)

之輕鏈可變域及CL1序列的第二多肽；及(c)包含第二Fc多肽之第三多肽，其中該重鏈可變域及該輕鏈可變域係以複合物形式存在且形成單一抗原結合臂，其中該第一Fc多肽及該第二Fc多肽係以複合物形式存在且形成使該抗體片段之穩定性與包含該抗原結合臂之Fab分子相比有所增加的Fc區。在一些實施例中，第一多肽包含圖7中所述之Fc序列(SEQ ID NO: 68)，第二多肽包含圖8中所述之Fc序列(SEQ ID NO: 47)。在一些實施例中，第一多肽包含圖8中所述之Fc序列(SEQ ID NO: 47)，第二多肽包含圖7中所述之Fc序列(SEQ ID NO: 68)。

在一些實施例中，抗c-met抗體包含：(a)包含重鏈可變域之第一多肽，該多肽包含序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQ
APGKGLEWVG MIDPSNSDTRFNP NFKDRFTISADTSKNTA
YLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY

VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK(SEQ ID NO: 45); (b) 包含輕鏈可變域之第
二多肽，該多肽包含序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAW
YQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:46); 及包含Fc多肽
之第三多肽，該多肽包含序列

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:
47)，其中該重鏈可變域及該輕鏈可變域係以複合物形式
存在且形成單一抗原結合臂，其中該第一Fc多肽及該第二
Fc多肽係以複合物形式存在且形成使該抗體片段之穩定性
與包含該抗原結合臂之Fab分子相比有所增加的Fc區。

在一實施例中，抗c-met抗體包含重鏈可變域，該重鏈

可變域包含圖7中所述之CDR1-HC、CDR2-HC及CDR3-HC序列(SEQ ID NO:52-53及66)中之一或多者。在一些實施例中，抗體包含輕鏈可變域，該輕鏈可變域包含圖7中所述之CDR1-LC、CDR2-LC及CDR3-LC序列(SEQ ID NO: 49-51)中之一或多者。在一些實施例中，重鏈可變域包含圖7中所述之FR1-HC、FR2-HC、FR3-HC及FR4-HC序列(SEQ ID NO: 62-65)。在一些實施例中，輕鏈可變域包含圖7中所述之FR1-LC、FR2-LC、FR3-LC及FR4-LC序列(SEQ ID NO: 57-60)。

在一態樣中，本發明提供一種抗體片段，其包含至少一個促進該抗體片段內之Fc序列異源二聚同時使同源二聚減至最少的特徵。該(等)特徵改良可藉由如本文所述之本發明方法獲得之免疫球蛋白群體的產率及/或純度及/或均質性。在一實施例中，第一Fc多肽及第二Fc多肽在界面處接合/相互作用。在第一Fc多肽與第二Fc多肽於界面處接合的一些實施例中，第二Fc多肽(序列)之界面包含隆凸(亦稱為「杵」)，其可定位於第一Fc多肽(序列)之界面中的空穴(亦稱為「臼」)中。在一實施例中，抗體包含如WO2005/063816中所述構成「杵」及「臼」之Fc突變。舉例而言，Fc多肽中之臼狀突變可為T366A、L368A及/或Y407V中之一或多者，且杵狀突變可為T366W。

在另一態樣中，本發明提供製造本發明之異源多肽的方法。舉例而言，本發明提供製造異源多肽(例如抗體，如本文中所定義其包括全長抗體及其片段)的方法，該方法

包含培養包含本發明聚核苷酸(例如包含轉譯起始區之聚核苷酸)之宿主細胞以表現該聚核苷酸，藉此在該聚核苷酸於宿主細胞(例如原核生物宿主細胞)中表現後，異源多肽摺疊以形成生物活性異源多肽。在涉及抗體表現之實施例中，在該聚核苷酸於宿主細胞中表現後，輕鏈及重鏈摺疊並組裝以形成生物活性抗體。在一些實施例中，該方法進一步包含自宿主細胞培養物回收異源多肽(例如抗體)。在一些實施例中，異源多肽係自宿主細胞培養基回收。在一些實施例中，該方法進一步包含組合所回收之異源多肽(例如抗體)與醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或載體以製備包含該異源多肽(例如抗體)之醫藥調配物。

在一態樣中，本發明提供自細胞分泌相關異源多肽的方法，該方法包含培養包含本發明聚核苷酸之宿主細胞以表現該聚核苷酸並分泌異源多肽。

在一態樣中，本發明提供使相關異源多肽自細胞移位的方法，該方法包含培養包含本發明聚核苷酸之宿主細胞以表現該聚核苷酸並使該異源多肽移位。

在另一態樣中，本發明提供優化細胞中相關異源多肽之分泌的方法，該方法包含比較在轉譯起始區之一組聚核苷酸變異體之控制下該多肽的表現量，其中該組變異體呈現一定範圍之轉譯強度；及確定產生成熟多肽之最佳轉譯強度。在一些實施例中，最佳轉譯強度小於野生型轉譯起始區之轉譯強度。在一些實施例中，最佳轉譯強度大於野生型轉譯起始區之轉譯強度。在一些實施例中，該等變異體

包含分泌信號序列之聚核苷酸變異體。在一些實施例中，變異分泌信號序列為sec路徑信號序列及/或SRP路徑信號序列。在一些實施例中，變異分泌信號序列為PhoA、MalE、DsbA或STII變異信號序列。在一些實施例中，變異體為表3中所示之一或多種變異體。在一些實施例中，變異體包含SEQ ID NO 1-14、36-39、41-42中之一者之序列。

在一態樣中，本發明提供一種藉由如本文所述之本發明方法獲得的異源多肽。在一些實施例中，異源多肽為抗體。

在一態樣中，本發明提供使用本發明方法產生之異源多肽的用途，其係用於製備供治療性及/或預防性治療諸如以下疾病用的藥物：癌症、腫瘤、細胞增殖性病症及/或免疫(諸如自體免疫)病症。異源多肽可為本文所述之任何形式，包括抗體、抗體片段、多肽(例如寡肽)或其組合。

在一態樣中，本發明提供本發明聚核苷酸的用途，其係用於製備供治療性及/或預防性治療諸如以下疾病用的藥物：癌症、腫瘤、細胞增殖性病症及/或免疫(諸如自體免疫)病症。

在一態樣中，本發明提供本發明表現載體之用途，其係用於製備供治療性及/或預防性治療諸如以下疾病用的藥物：癌症、腫瘤、細胞增殖性病症及/或免疫(諸如自體免疫)病症。

在一態樣中，本發明提供本發明宿主細胞的用途，其係

用於製備供治療性及/或預防性治療諸如以下疾病用的藥物：癌症、腫瘤、細胞增殖性病症及/或免疫(諸如自體免疫)病症。

在一態樣中，本發明提供本發明製品的用途，其係用於製備供治療性及/或預防性治療諸如以下疾病用的藥物：癌症、腫瘤、細胞增殖性病症、免疫(諸如自體免疫)病症及/或血管生成相關病症(創傷癒合)。

在一態樣中，本發明提供本發明套組的用途，其係用於製備供治療性及/或預防性治療諸如以下疾病用的藥物：癌症、腫瘤、細胞增殖性病症及/或免疫(諸如自體免疫)病症。

【實施方式】

通用技術

熟習此項技術者一般已充分理解並通常使用習知方法採用本文所描述或參考之技術及程序，諸如以下文獻中所述之廣泛利用之方法：Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第3版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y；CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel等人編(2003))；METHODS IN ENZYMOLOGY 系列(Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH(M. J. MacPherson, B. D. Hames及G. R. Taylor編(1995))；ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL (Harlow及Lane編(1988))；及ANIMAL CELL CULTURE(R.

I. Freshney編(1987))。

定義

如本文所使用之術語「載體」意指能夠轉運其已連接之另一核酸的核酸分子。一種類型之載體為「質體」，其係指其他DNA區段可連接至其中的環狀雙股DNA環。另一類型之載體為噬菌體載體。另一類型之載體為病毒載體，其中其他DNA區段可連接於該病毒基因體中。某些載體能夠在其所引入之宿主細胞中自主複製(例如具有細菌複製起點之細菌載體及游離型哺乳動物載體)。其他載體(例如非游離型哺乳動物載體)可在引入宿主細胞中之後併入該宿主細胞之基因體中，且藉此與該宿主基因體一起複製。此外，某些載體能夠指導其以操作方式連接之基因的表現。該等載體在本文中稱為「重組表現載體」(或簡稱為「重組載體」)。一般而言，用於重組DNA技術中之表現載體通常呈質體形式。在本說明書中，「質體」及「載體」可互換使用，因為質體為最常用之載體形式。

如本文所使用之術語「順反子」意指廣義上與包含編碼多肽鏈及相鄰控制區之核苷酸序列之轉譯單元相等的遺傳元件。「相鄰控制區」包括例如轉譯起始區(TIR；如本文之下文中所定義)及終止區。

「多順反子」表現載體係指含有多個順反子並在一個單一啟動子之調節控制下表現該等順反子的單一載體。多順反子載體之常見實例為含有兩個不同多肽並在一個啟動子之控制下表現該等多肽的「雙順反子」載體。雙順反子或

多順反子載體表現後，多個基因首先轉錄為單一轉錄單元，接著分別轉譯。

本發明之「獨立順反子」表現載體係指包含至少兩個獨立啟動子-順反子對之單一載體，其中各順反子受其自身啟動子控制。獨立順反子表現載體表現後，不同基因之轉錄及轉譯過程獨立且無關。

如本文所使用之「轉譯起始區」或TIR或轉譯起始序列係指提供相關基因之轉譯起始之功效的核酸區域。一般而言，特定順反子內之TIR涵蓋核糖體結合位點(RBS)及RBS之5'及3'序列。RBS定義為最少含有Shine-Dalgarno區及起始密碼子(AUG)。因此，TIR亦包括至少一部分待轉譯核酸序列。本發明TIR較佳包括在編碼順反子內之輕鏈或重鏈的序列之前編碼信號肽之分泌信號序列。TIR變異體在TIR區內含有改變TIR之性質(諸如其轉譯強度，如本文之下文中所定義)的序列變異體(尤其取代)。本發明之TIR變異體較佳在編碼順反子內之輕鏈或重鏈之序列之前的分泌信號序列的前2至約14個、較佳約4至12個、更佳約6個密碼子內含有序列取代。

如本文所使用之術語「轉譯強度」係指量測使用一或多個TIR變異體指導多肽之分泌的控制系統中之分泌多肽，且將結果與相同培養及檢定條件下之野生型TIR或其他對照相比較。不受任一理論限制，如本文所使用之「轉譯強度」可包括例如mRNA穩定性、核糖體結合至核糖體結合位點之效率及通過膜移位之模式的量度。

「分泌信號序列」或「信號序列」係指編碼短信號肽之核酸序列，該短信號肽可用於指導新合成之相關蛋白質通過細胞膜，通常為原核生物之內膜或內膜與外膜。因而，諸如免疫球蛋白輕鏈或重鏈多肽之相關蛋白質分泌至原核生物宿主細胞之細胞周質或培養基中。分泌信號序列所編碼之信號肽對於宿主細胞而言可能為內源性的，或其可能為外源性的，包括待表現之多肽的原生信號肽。分泌信號序列通常存在於待表現之多肽之胺基末端，且通常在多肽之生物合成與自細胞質分泌之間由酶移除。因而，信號肽通常不存在於成熟蛋白質產物中。

「以操作方式連接」係指兩個或兩個以上組分拼接，其中如此描述之組分的關係允許其以其預定方式起作用。舉例而言，若啟動子以順式方式起作用以控制或調節所連接之序列的轉錄，則該啟動子以操作方式連接於編碼序列。一般但並非必需，「以操作方式連接」之DNA序列為相連的且在必要時接合兩個蛋白質編碼區，或在分泌前導序列之情況下，為相連的且處於閱讀框架中。然而，雖然以操作方式連接之啟動子一般位於編碼序列之上游，但其不必與其相連。以操作方式連接之強化子可位於編碼序列之上游、內部或下游，且距離啟動子有相當長之距離。連接係藉由此項技術中已知之重組方法實現，例如，使用PCR法、藉由黏接或藉由在適宜限制位點連接。若不存在適宜限制位點，則根據習知實務使用合成寡聚核苷酸接附子或連接子。

如本文所使用之「調節元件」係指將編碼異源多肽之聚核苷酸轉錄並轉譯成多肽所必需的呈順式之核苷酸序列。轉錄調節元件通常包含待表現之基因序列之5'啟動子、轉錄起始位點及終止位點，及聚腺苷酸化信號序列。術語「轉錄起始位點」係指構築體中對應於併入初級轉錄物（亦即，mRNA前驅物）中之第一核酸的核酸；轉錄起始位點可與啟動子序列重疊。

「啟動子」係指控制其以操作方式連接之基因或序列之轉錄的聚核苷酸序列。啟動子包括RNA聚合酶結合及轉錄起始信號。所使用之啟動子在預期表現所選序列之宿主細胞之細胞類型中將具功能性。此項技術中熟知（且在諸如GenBank之資料庫中鑑別）大量啟動子，包括來自各種不同來源之組成性、誘導性及可抑制性啟動子，且可以選殖之聚核苷酸形式或處於選殖之聚核苷酸內的形式獲得（例如，得自諸如ATCC之寄存處以及其他商業或個人來源）。在誘導性啟動子情況下，啟動子之活性回應於信號而增加或降低。

如本文所使用之術語「宿主細胞」（或「重組宿主細胞」）意指已經遺傳改變或能夠藉由引入外源性聚核苷酸（諸如重組質體或載體）進行遺傳改變的細胞。應瞭解，該等術語不僅意指特定個體細胞，而且指該種細胞之子代。由於在後續世代中可能因突變或環境影響而存在某些修飾，因此該子代實際上可能不與母細胞相同，但仍包括在如本文所使用之術語「宿主細胞」之範疇內。

「經分離」多肽(例如抗體)為已自其自然環境之組分中鑑別並分離及/或回收的多肽。其自然環境之污染組分為會干擾抗體之診斷或治療用途的物質且可包括酶、激素及其他蛋白或非蛋白溶質。在較佳實施例中，多肽將經純化至(1)如藉由Lowry法所測定，大於95重量%多肽，且最佳超過99重量%；(2)足以藉由使用旋轉杯測序儀獲得N末端或內部胺基酸序列之至少15個殘基的程度；或(3)藉由SDS-PAGE(十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳)在還原或非還原條件下使用考馬斯藍(Coomassie blue)或較佳銀染色的均質性。經分離多肽包括重組細胞內之原位多肽，因為該多肽之自然環境之至少一個組分將不存在。然而，經分離多肽一般將藉由至少一個純化步驟來製備。

「經分離」核酸分子為自該核酸之天然源中一般與其締合之至少一個污染核酸分子鑑別並分離的核酸分子。經分離核酸分子不同於其在自然界中發現之形式或狀態(setting)。因此，經分離核酸分子不同於存在於天然細胞中之核酸分子。然而，經分離核酸分子包括一般表現該該核酸(例如編碼抗體之核酸)之細胞中所含有之核酸分子，舉例而言，該核酸分子在該等細胞中所處之染色體位置不同於天然細胞。

如本文中可互換使用之「聚核苷酸」或「核酸」係指具有任何長度之核苷酸聚合物，且包括DNA及RNA。核苷酸可為脫氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾之核苷酸或鹼基，及/或其類似物，或可由DNA或RNA聚合酶或藉由合

成反應併入聚合物中之任何受質。聚核苷酸可包含經修飾之核苷酸，諸如甲基化核苷酸及其類似物。若存在，則可在聚合物組裝之前或之後對核苷酸結構加以修飾。核苷酸序列可間雜有非核苷酸組分。聚核苷酸可在合成後，諸如藉由與標記結合而進一步修飾。其他修飾類型包括例如一或多個天然存在之核苷酸經類似物「帽」取代；核苷酸間修飾，諸如具有不帶電鍵(例如甲基膦酸酯、磷酸三酯、磷醯胺酸酯、胺基甲酸酯等)及具有帶電鍵(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)之修飾、含有諸如蛋白質(例如核酸酶、毒素、抗體、信號肽、ply-L-離胺酸等)之附掛部分之修飾、具有嵌入劑(例如吡啶、補骨脂素等)之修飾、含有螯合劑(例如金屬、放射性金屬、硼、氧化金屬等)之修飾、含有烷化劑之修飾、具有經修飾鍵(例如 α 變旋異構核酸等)之修飾，以及聚核苷酸之未經修飾之形式。此外，一般存在於糖中之任何羥基均可例如經膦酸基、磷酸基置換，經標準保護基保護，或經活化以製備與其他核苷酸之其他鍵，或可結合至固體或半固體支撐物。5'及3'末端OH可經磷酸化或經胺或具有1至20個碳原子之有機封端基團部分取代。其他羥基亦可衍生為標準保護基。聚核苷酸亦可含有此項技術中一般已知之核糖或脫氧核糖之類似形式，包括例如2'-O-甲基-核糖、2'-O-烯丙基-核糖、2'-氟-核糖或2'-疊氮基-核糖、碳環糖類似物、 α -變旋異構糖、差向異構糖，諸如阿拉伯糖、木糖或來蘇糖(lyxose)、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、非環狀類似物及鹼性核苷類

似物，諸如甲基核糖苷。一或多個磷酸二酯鍵可經替代性連接基團置換。此等替代性連接基團包括但不限於磷酸酯經 $P(O)S$ (「硫代酯」)、 $P(S)S$ (「二硫代酯」)、 $(O)NR_2$ (「胺酸酯」)、 $P(O)R$ 、 $P(O)OR'$ 、 CO 或 CH_2 (「甲縮醛」) 置換的實施例，其中各 R 或 R' 獨立地為 H 或者經取代或未經取代之烷基 (1-20C)，視情況含有醚 (-O-) 鍵、芳基、烯基、環烷基、環烯基或芳烷基 (araldyl)。聚核苷酸中並非所有鍵均需要相同。以上描述適用於本文中所提及之所有聚核苷酸，包括 RNA 及 DNA。

如本文所使用之「寡核苷酸」一般係指一般為單股、一般為合成之短聚核苷酸，其長度一般但並非必需小於約 200 個核苷酸。術語「寡核苷酸」及「聚核苷酸」並不相互排斥。上文關於聚核苷酸之描述同樣且完全適用於寡核苷酸。

如本文所使用之「多肽」一般係指來自任何細胞來源且具有約 10 個以上胺基酸之肽及蛋白質。「異源」多肽為所利用之宿主細胞之外來多肽，諸如大腸桿菌所產生之人類蛋白質。雖然異源多肽可為原核生物或真核生物多肽，但其較佳為真核生物多肽，更佳為哺乳動物多肽且最佳為人類多肽。其較佳為重組產生之多肽或重組多肽。「異源」多肽為所利用之宿主細胞之外來多肽，諸如大腸桿菌所產生之人類蛋白質。雖然異源多肽可為原核生物或真核生物多肽，但其較佳為真核生物多肽，更佳為哺乳動物多肽且最佳為人類多肽。其較佳為重組產生之多肽或重組多肽。

哺乳動物多肽之實例包括諸如腎素之分子；生長激素，包括人類生長激素、牛生長激素；生長激素釋放因子；副甲狀腺激素；促甲狀腺激素；脂蛋白；1-抗胰蛋白酶；胰島素A鏈；胰島素B鏈；胰島素原；血小板生成素；促濾泡激素；降鈣素；黃體化激素；升糖素；凝血因子，諸如因子VIII、因子IX、組織因子及von Willebrands因子；抗凝血因子，諸如蛋白質C；心房利尿鈉因子；肺表面活性物質；纖維蛋白溶酶元活化因子，諸如尿激酶或者人類尿或組織類型纖維蛋白溶酶元活化因子(t-PA)及其變異體，諸如RETEVASE™及TNKASE™；鈣蟾素；凝血酶；造血生長因子；腫瘤壞死因子 α 及腫瘤壞死因子 β ；ErbB2域抗體，諸如2C4(WO 01/00245；融合瘤ATCC HB-12697)，其結合至ErbB2細胞外域中之區域(例如ErbB2之約殘基22至約殘基584之區域中之任一或多個殘基，兩端點包括在內)、腦啡肽酶；血清白蛋白，諸如人血清白蛋白；Muellerian抑制物；鬆弛素A鏈；鬆弛素B鏈；鬆弛素原；小鼠促性腺激素相關肽；微生物蛋白質，諸如 β -內醯胺酶；DNase；抑制素；活化素；血管內皮生長因子(VEGF)；激素或生長因子受體；整合素；蛋白質A或D；類風濕因子；神經營養因子，諸如來源於腦之神經營養因子(BDNF)、神經營養素-3、神經營養素-4、神經營養素-5或神經營養素-6(NT-3、NT-4、NT-5或NT-6)或神經生長因子，諸如NGF；心營養素(心臟肥大因子)，諸如心營養素-1(CT-1)；血小板源性生長因子(PDGF)；纖維母細胞生長

因子，諸如 aFGF 及 bFGF；表皮生長因子(EGF)；轉型生長因子(TGF)，諸如 TGF- α 及 TGF- β ，包括 TGF-1、TGF-2、TGF-3、TGF-4 或 TGF-5；胰島素樣生長因子-I 及胰島素樣生長因子-II(IGF-I 及 IGF-II)；des(I-3)-IGF-I(腦 IGF-I)；胰島素樣生長因子結合蛋白質；CD 蛋白質，諸如 CD-3、CD-4、CD-8 及 CD-19；紅血球生成素；骨生成誘導因子；免疫毒素；骨形態發生蛋白(BMP)；干擾素，諸如干擾素- α 、干擾素- β 及干擾素- γ ；血清白蛋白，諸如人血清白蛋白(HSA)或牛血清白蛋白(BSA)；群落刺激因子(CSF)，例如 M-CSF、GM-CSF 及 G-CSF；介白素(IL)，例如 IL-1 至 IL-10；抗-HER-2 抗體；Apo2 配位體；超氧化物歧化酶；T 細胞受體；表面膜蛋白；衰變加速因子；病毒抗原，諸如 AIDS 包膜之一部分；轉運蛋白；歸巢受體；地址素(addressin)；調節蛋白；抗體；及任何上文所列多肽之片段。

本文中之較佳多肽包括人血清白蛋白(HSA)、2C4、組織因子、抗組織因子、抗 CD20、抗-HER-2、神經調節素、抗 IgE、抗 CD11a、抗 CD18、VEGF 及其受體及抗體(諸如 rhuFab V2 及 AVASTIN™)、生長激素及其變異體(諸如 hGH)、生長激素受體、生長激素釋放蛋白(GHRP)、LIV-1(EP 1,263,780)、TRAIL、腫瘤壞死因子(TNF)及其抗體、TNF 受體及相關抗體、TNF 受體 IgG、TNF 受體相關因子(TRAF)及其抑制劑、因子 VIII、因子 VIII B 域、干擾素(諸如干擾素- γ)、轉型生長因子(TGF)(諸如 TGF- β)、抗

TGF(諸如抗TGF- β)、活化素、抑制素、抗活化素、抗抑制素、組織纖維蛋白溶酶元活化因子及其變異體(諸如t-PA、RETEPLASE™及TNKase)、抗Fas抗體、Apo-2配位體、Apo-2配位體抑制劑、Apo-2受體、Apo-3、細胞凋亡因子、Ced-4、DcR3、死亡受體及激動劑抗體(DR4、DR5)、淋巴細胞毒素(LT)、促乳素、促乳素受體、SOB蛋白、WISP(wnt誘導分泌之蛋白質)、神經毒素-3(NT-3)、神經生長因子(NGF)及抗NGF、DNase、肝炎抗原、單純性疱疹抗原、瘦素、胰島素樣生長因子(IGF)(諸如IGF-1及IGF-2)及其結合蛋白質及受體(諸如IGFBP-1-IGFBP-6)、胰島素、纖維母細胞生長因子(FGF)(諸如FGF-17)、Toll樣蛋白、TIE配位體、CD40及抗CD40、免疫黏附素、枯草菌蛋白酶、肝細胞生長因子(HGF)、血小板生成素(TPO)、介白素(諸如IL-2、IL-12、IL-17、IL-22、IL-8、IL-9)及其抗體，及前列腺特異性癌症抗原(PSCA)。

尤佳多肽為重組多肽，更佳為抗體，其包括單株抗體及人類化抗體。該等抗體可為全長抗體或抗體片段。此等抗體更佳為人類抗體或人類化抗體。抗體更佳為抗c-met、抗IgE、抗CD18、抗VEGF、抗組織因子、2C4、抗Her-2、抗CD20、抗CD40或抗CD11a抗體。多肽定義內所涵蓋之抗體片段較佳包含輕鏈，更佳包含 κ 輕鏈。該等較佳片段包括例如Fab、Fab'、F(ab')₂或F(ab')₂-白胺酸拉鏈(LZ)融合體及單臂抗體。

蛋白質「表現」係指使基因中編碼之資訊轉化至信使

RNA(mRNA)中接著轉化為蛋白質。

「免疫結合物」(可互換地稱為「抗體-藥物結合物」或「ADC」)意謂抗體結合至一或多種細胞毒性劑，諸如化療劑、藥物、生長抑制劑、毒素(例如蛋白質毒素，細菌、真菌、植物或動物來源之酶活性毒素，或其片段)，或放射性同位素(亦即放射結合物)。

「阻斷型」抗體或「拮抗型」抗體為抑制或降低抗體所結合之抗原之生物活性的抗體。在一些實施例中，阻斷型抗體或拮抗型抗體完全抑制抗原之生物活性。

如本文所使用之「促效型抗體」為模擬相關多肽(例如HGF)之至少一種功能活性的抗體。

「結合親和力」一般係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間的非共價相互作用總和之強度。除非另外指出，否則如本文所使用之「結合親和力」係指固有結合親和力，其反映結合對成員(例如抗體與抗原)間的1:1相互作用。分子X對其搭配物Y之親和力一般可由解離常數(Kd)表示。Kd理想地為 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 5×10^{-8} 、 1×10^{-9} 、 3×10^{-9} 、 5×10^{-9} ，或甚至 1×10^{-10} 或更強。親和力可藉由此項技術中已知之常用方法量測，包括本文所述之方法。低親和力抗體一般緩慢結合抗原且易於解離，而高親和力抗體一般較快結合抗原且較長時間保持結合。此項技術中為已知量測結合親和力之各種方法，其中任一者可用於本發明之目的。下文描述具體說明性實施例。

在一實施例中，藉由使用Fab型式之相關抗體及其抗原根據以下檢定所描述進行放射性標記抗原結合檢定(RIA)來量測本發明之「Kd」或「Kd值」：藉由用最小濃度之經(^{125}I)標記之抗原在滴定系列之未標記抗原存在下平衡Fab，接著用經抗Fab抗體塗佈之板捕捉已結合之抗原來量測Fab對抗原之溶液結合親和力(Chen等人，(1999) J. Mol. Biol. 293:865-881)。為了建立檢定條件，微量板(Dynex)用含於50 mM碳酸鈉(pH 9.6)中之5 $\mu\text{g/ml}$ 捕捉抗Fab抗體(Cappel Labs)塗佈隔夜，隨後在室溫(約23°C)下用含於PBS中之2%(w/v)牛血清白蛋白阻斷2至5小時。在非吸附型板(Nunc #269620)中，將100 pM或26 pM [^{125}I]-抗原與相關Fab之連續稀釋物混合(例如，與Presta等人，(1997) Cancer Res. 57:4593-4599中對抗VEGF抗體Fab-12之評估一致)。接著培育相關Fab隔夜；然而，該培育可持續更長時段(例如65小時)以確保達到平衡。此後，將混合物轉移至捕捉板以便在室溫下培育(例如1小時)。接著移除溶液，並用含於PBS中之0.1% Tween-20洗滌板8次。當板已乾燥時，每孔添加150 μl 閃爍劑(MicroScint-20；Packard)，並在Topcount γ 計數器(Packard)上對板計數10分鐘。選擇獲得小於或等於20%最大結合之各Fab濃度以用於競爭性結合檢定。根據另一實施例，藉由使用表面電漿子共振檢定，使用BIAcoreTM-2000或BIAcoreTM-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)，在25°C下用經固定之抗原CM5晶片以約10個反應單位(RU)量測Kd或Kd值。簡言之，根據

供應商說明書，用鹽酸N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亞胺(EDC)及N-羥基丁二醯亞胺(NHS)活化羧甲基化聚葡萄糖生物感應器晶片(CM5, BIAcore Inc.)。用10 mM乙酸鈉(pH 4.8)將抗原稀釋成5 $\mu\text{g/ml}$ (約0.2 μM)，隨後以5 $\mu\text{l/min}$ 之流動速率注射以便達成約10個反應單位(RU)之偶合蛋白。注射抗原後，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應之基團。為進行動力學量測，在25°C下以約25 $\mu\text{l/min}$ 之流動速率注射Fab於含0.05% Tween 20之PBS(PBST)中之兩倍連續稀釋物(0.78 nM至500 nM)。在一些實施例中，對於表面電漿子共振檢定法使用以下改進：將抗體固定至CM5生物感應器晶片上以達成約400 RU，且為進行動力學量測，在25°C下以約30 $\mu\text{l/min}$ 之流動速率注射靶蛋白於PBST緩衝液中之兩倍連續稀釋物。使用簡單一對一朗繆爾(Langmuir)結合模型(BIAcor評價軟體3.2版)藉由同時擬合締合及解離感應器圖譜來計算締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。按 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 比計算平衡解離常數(Kd)。參看例如Chen, Y.等人，(1999) J. Mol. Biol. 293:865-881。若藉由以上表面電漿子共振檢定測定之締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ，則可使用螢光淬滅技術測定該締合速率：在25°C下，量測含於PBS(pH 7.2)中之20 nM抗抗原抗體(Fab形式)在濃度遞增之抗原存在下的螢光發射強度(激發=295 nm；發射=340 nm，16 nm帶通)之增加或降低，如以諸如裝備有停流裝置之分光光度計(Aviv Instruments)或具有紅色攪拌透光管之8000系列SLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic)之光

譜儀所量測。

亦可用上文所述之相同表面電漿子共振技術，使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)，在 25°C 下用經固定之抗原 CM5 晶片以約 10 個反應單位 (RU) 測定本發明之「締合速率」或「 k_{on} 」。簡言之，根據供應商說明書，用鹽酸 N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺 (EDC) 及 N-羥基丁二醯亞胺 (NHS) 活化羧甲基化聚葡萄糖生物感應器晶片 (CM5, BIAcore Inc.)。用 10 mM 乙酸鈉 (pH 4.8) 將抗原稀釋成 5 $\mu\text{g/ml}$ (約 0.2 μM)，隨後以 5 $\mu\text{l/min}$ 之流動速率注射以便達成約 10 個反應單位 (RU) 之偶合蛋白。注射抗原後，注射 1 M 乙醇胺以阻斷未反應之基團。為進行動力學量測，在 25°C 下以約 25 $\mu\text{l/min}$ 之流動速率注射 Fab 於含 0.05% Tween 20 之 PBS (PBST) 中之兩倍連續稀釋物 (0.78 nM 至 500 nM)。在一些實施例中，對於表面電漿子共振檢定法使用以下改進：將抗體固定至 CM5 生物感應器晶片上以達成約 400 RU，且為進行動力學量測，在 25°C 下以約 30 $\mu\text{l/min}$ 之流動速率注射靶蛋白於 PBST 緩衝液中之兩倍連續稀釋物。使用簡單一對一朗繆爾結合模型 (BIAcore 評估軟體 3.2 版) 藉由同時擬合締合及解離感應器圖譜來計算締合速率 (k_{on}) 及解離速率 (k_{off})。按 k_{off}/k_{on} 比計算平衡解離常數 (K_d)。參看例如 Chen, Y. 等人, (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881。然而，若藉由以上表面電漿子共振檢定測定之締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ，則較佳使用螢光淬滅技術測定該締合速率：在 25°C 下，量測

含於PBS(pH 7.2)中之20 nM抗抗原抗體(Fab形式)在濃度遞增之抗原存在下的螢光發射強度(激發=295 nm；發射=340 nm，16 nm帶通)之增加或降低，如以諸如裝備有停流裝置之分光光度計(Aviv Instruments)或具有紅色攪拌透光管之8000系列SLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic)之光譜儀所量測。

「裸抗體」為未結合至異源分子(諸如細胞毒性部分或放射性標記)的抗體。

具有指定抗體之「生物學特徵」的抗體為具有該抗體之使其有別於結合同一抗原之其他抗體之一或多個生物學特徵的抗體。

為了篩選結合至相關抗體所結合之抗原上之抗原決定基的抗體，可執行常規交叉阻斷檢定，諸如Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow及David Lane編(1988)中所述。

為了延長含有本發明胺基酸序列之抗體或多肽的半衰期，可使救助受體結合抗原決定基連接至抗體(尤其抗體片段)，例如，如美國專利5,739,277中所述。舉例而言，編碼救助受體結合抗原決定基之核酸分子可同框連接至編碼本發明多肽序列之核酸以使經工程改造之核酸分子所表現之融合蛋白包含救助受體結合抗原決定基及本發明多肽序列。如本文所使用之術語「救助受體結合抗原決定基」係指IgG分子(例如IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄)之Fc區中負責延長IgG分子之活體內血清半衰期之抗原決定基(例如

Ghetie 等人, *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766 (2000), 表 1)。在 Fc 區中具有取代且血清半衰期延長之抗體亦描述於以下文獻中：WO00/42072、WO 02/060919；Shields 等人, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001)；Hinton, *J. Biol. Chem.* 279:6213-6216 (2004)。在另一實施例中，亦可例如藉由連接其他多肽序列來延長血清半衰期。舉例而言，適用於本發明方法中之抗體或其他多肽可連接於血清白蛋白或結合至 FcRn 受體之血清白蛋白部分或血清白蛋白結合肽，以使血清白蛋白結合至該抗體或多肽，例如該等多肽序列揭示於 WO 01/45746 中。在一較佳實施例中，欲連接之血清白蛋白肽包含胺基酸序列 DICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 48)。在另一實施例中，藉由此等方法延長 Fab 之半衰期。關於血清白蛋白結合肽序列，亦參看 Dennis 等人 *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002)。

「片段」意謂較佳含有所提及之核酸分子或多肽之整個長度的至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 95% 以上的多肽部分或核酸分子部分。片段可含有 10、20、30、40、50、60、70、80、90 或 100、200、300、400、500、600 或 600 個以上核苷酸，或 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、190、200 或 200 個以上胺基酸。

術語「抗體」及「免疫球蛋白」在廣義上可互換使用，且包括單株抗體(例如全長或完整單株抗體)、多株抗體、多價抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體，只要其展

現所要生物活性即可)，且亦可包括某些抗體片段(如本文中更詳細描述)。抗體可為人類抗體、人類化抗體及/或親和力成熟抗體。

術語「可變」係指抗體間某些可變域部分的序列大不相同，且用於各特定抗體對其特定抗原之結合及特異性。然而，在整個抗體可變域中可變性並非均勻分佈。在輕鏈及重鏈可變域中，可變性均集中於稱為互補決定區(CDR)或高變區的3個區段中。可變域之較為高度保守之部分稱為構架(FR)。原生重鏈及輕鏈之可變域各包含主要採用 β 片構形且由3個CDR連接的4個FR區，該3個CDR形成連接 β 片結構且在一些情況下形成 β 片結構之一部分的環。各鏈中之CDR經由FR區緊密結合在一起，且與來自另一鏈之CDR一起促使形成抗體之抗原結合位點(參看Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，National Institute of Health, Bethesda, MD (1991))。恆定域不直接涉及於抗體與抗原之結合，但展現各種效應功能，諸如抗體參與抗體依賴性細胞毒性。

抗體經木瓜蛋白酶消化產生兩個一致的抗原結合片段，稱為「Fab」片段，各具有單一抗原結合位點，及殘餘「Fc」片段，其名稱反映其易於結晶的能力。胃蛋白酶處理產生具有兩個抗原組合位點且仍能夠交聯抗原之 $F(ab')_2$ 片段。

「Fv」為含有完全抗原識別及結合位點的最小抗體片段。在雙鏈Fv物種中，此區域由一個重鏈可變域與一個輕

鏈可變域緊密非共價締合之二聚物組成。在單鏈Fv物種中，一個重鏈可變域與一個輕鏈可變域可由可撓性肽連接子共價連接，使得該輕鏈及該重鏈可以類似於雙鏈Fv物種之「二聚」結構締合。在此構形中，各可變域之3個CDR相互作用以界定VH-VL二聚體表面上之抗原結合位點。6個CDR共同賦予抗體以抗原結合特異性。然而，即使單一可變域(或僅包含對抗原具有特異性之3個CDR之一半Fv)亦能夠識別並結合抗原，但親和力比整個結合位點低。

Fab片段亦含有輕鏈之恆定域及重鏈之第一恆定域(CH1)。Fab'片段與Fab片段的不同之處在於重鏈CH1域之羧基末端添加數個殘基，包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸。本文中，Fab'-SH為恆定域之半胱胺酸殘基帶有游離硫醇基(thiol group)之Fab'的名稱。F(ab')₂抗體片段最初以中間具有鉸鏈半胱胺酸之Fab'片段對的形式產生。抗體片段之其他化學偶合亦為已知的。

來自任何脊椎動物物種之抗體(免疫球蛋白)之「輕鏈」可基於其恆定域之胺基酸序列而歸為稱為 κ 及 λ 之兩個截然不同類型之一。

視免疫球蛋白重鏈恆定域之胺基酸序列，其可歸為不同類別。存在5種主要類別之免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且此等類別中有幾者可進一步分成亞類(同型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於不同類別免疫球蛋白之重鏈恆定域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。不同類別免疫球蛋白之亞單位結構及三維構型為熟知

的。「抗體片段」僅包含完整抗體之一部分，其中該部分較佳保留至少一種、較佳保留大部分或所有當存在於完整抗體中時通常與該部分相關之功能。抗體片段之實例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段；雙功能抗體；線抗體；單鏈抗體分子；及由抗體片段形成之多特異性抗體。在一實施例中，抗體片段包含完整抗體之抗原結合位點，且因而保留結合抗原之能力。在另一實施例中，抗體片段，例如包含Fc區之抗體片段保留至少一種當存在於完整抗體中時通常與該Fc區相關之生物功能，諸如FcRn結合、抗體半衰期調節、ADCC功能及補體結合。在一實施例中，抗體片段為具有實質上類似於完整抗體之活體內半衰期的單價抗體。舉例而言，該抗體片段可包含一個抗原結合臂連接至能夠賦予該片段以活體內穩定性之Fc序列。

術語「高變區」、「HVR」或「HV」在用於本文中時係指抗體可變域中序列具高變性及/或形成結構確定之環的區域。一般而言，抗體包含6個高變區；3個處於VH(H1、H2、H3)中且3個處於VL(L1、L2、L3)中。本文中使用且涵蓋多種高變區描繪。Kabat互補決定區(CDR)係基於序列可變性且最常用(Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。替代地，Chothia指出結構環之位置(Chothia及Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM高變區表示Kabat CDR與Chothia結構環之間的折衷，且為Oxford Molecular's AbM

抗體建模軟體所使用。「contact」高變區係基於對可用複晶體結構之分析。此等高變區中之每一者的殘基記錄如下。

環	Kabat	AbM	Chothia	Contact
----	-----	---	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B

(Kabat編號)

H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
----	---------	---------	---------	---------

(Chothia編號)

H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

高變區可包含如下「延長高變區」：VL中之24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)及89-97(L3)及VH中之26-35(H1)、50-65或49-65(H2)及93-102、94-102或95-102(H3)。根據Kabat等人，同上文針對此等定義中之每一者對可變域殘基進行編號。

「架構」或「FR」殘基為除本文中所定義之高變區殘基以外的彼等可變域殘基。

非人類(例如，鼠類)抗體之「人類化」形式為含有源自非人類免疫球蛋白之最小序列的嵌合抗體。人類化抗體大部分為人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中接受者之高變

區殘基經具有所要特異性、親和力及能力之非人種(諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物)(供者抗體)之高變區殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之構架區(FR)殘基經相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含接受者抗體或供者抗體中未發現之殘基。進行此等修飾以進一步改進抗體效能。一般而言，人類化抗體應包含實質上所有至少一個且通常兩個可變域，其中所有或實質上所有高變環對應於非人類免疫球蛋白之高變環且所有或實質上所有FR為人類免疫球蛋白序列之FR。人類化抗體視情況亦將至少包含免疫球蛋白恆定區(Fc)之一部分，通常為人類免疫球蛋白恆定區之一部分。關於進一步詳情，參看Jones等人，*Nature* 321:522-525 (1986)；Riechmann等人，*Nature* 332:323-329 (1988)；及Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。亦參看以下綜述文章及其中所引用之參考文獻：Vaswani及Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998)；Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995)；Hurle及Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)。

「嵌合」抗體(免疫球蛋白)之重鏈及/或輕鏈之一部分與源自特定物種或屬於特定抗體類別或亞類之抗體中之相應序列一致或同源，同時該(等)鏈之其餘部分與源自另一物種或屬於另一抗體類別或亞類之抗體以及該等抗體之片段中的相應序列一致或同源，只要其展現所要生物活性即可(美國專利第4,816,567號；及Morrison等人，*Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984))。如本文所使用之人類化抗體為嵌合抗體之子集。

「單鏈Fv」或「scFv」抗體片段包含抗體之VH及VL域，其中此等域存在於單一多肽鏈中。一般而言，scFv多肽在VH域與VL域之間進一步包含使scFv能夠形成所要結構以供抗原結合的多肽連接子。關於scFv之綜述，參看 Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第113卷，Rosenburg及Moore編，Springer-Verlag, New York, 第269-315頁(1994)。

「抗原」為抗體可選擇性地結合之預定抗原。靶抗原可為多肽、碳水化合物、核酸、脂質、半抗原或其他天然存在或合成之化合物。靶抗原較佳為多肽。

術語「雙功能抗體」係指具有兩個抗原結合位點之小抗體片段，該等片段包含連接於同一多肽鏈中之重鏈可變域(VH)及輕鏈可變域(VL)(VH-VL)。由於使用過短而不能使同一鏈上之兩個域配對的連接子，迫使該等域與另一鏈之互補域配對並產生兩個抗原結合位點。雙功能抗體更充分描述於例如EP 404,097；WO 93/11161；及Hollinger等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)中。

「人類抗體」為所具有之胺基酸序列對應於由人類產生及/或使用如本文所揭示之用於產生人類抗體之任何技術產生之抗體的胺基酸序列的抗體。人類抗體之此定義特別排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

「親和力成熟」抗體為在其一或多個CDR中具有一或多

處改變的抗體，該等改變使得抗體對抗原之親和力與不具有彼等改變之親本抗體相比有所改良。較佳親和力成熟抗體將對靶抗原具有奈莫耳或甚至皮莫耳之親和力。親和力成熟抗體係藉由此項技術中已知之程序產生。Marks等人 *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)描述藉由VH及VL域改組實現親和力成熟。Barbas等人，*Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994)；Schier等人，*Gene* 169:147-155 (1995)；Yelton等人，*J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995)；Jackson等人，*J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995)；及Hawkins等人，*J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)描述CDR及/或構架殘基之隨機突變誘發。

「Fc受體」或「FcR」描述結合至抗體之Fc區的受體。較佳FcR為原生序列人類FcR。此外，較佳FcR為結合IgG抗體(γ 受體)之FcR，且包括Fc γ RI、Fc γ RII及Fc γ RIII亞類之受體，包括對偶基因變異體及此等受體之替代性拼接形式。Fc γ RII受體包括Fc γ RIIA(「活化受體」)及Fc γ RIIB(「抑制受體」)，其具有主要在其細胞質域方面有所不同的類似胺基酸序列。活化受體Fc γ RIIA在其細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之活化基元(ITAM)。抑制受體Fc γ RIIB在其細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之抑制基元(ITIM)。(參看綜述M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997))。FcR在以下文獻中綜述：Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)；Capel等人，*Immunomethods* 4:25-34 (1994)；及de Haas等人，*J. Lab.*

Clin. Med. 126:330-41 (1995)。本文中之術語「FcR」涵蓋其他FcR，包括有待將來鑑別之FcR。該術語亦包括新生兒受體FcRn，其負責將母本IgG轉移至胎兒(Guyer等人，*J. Immunol.* 117:587 (1976)及Kim等人，*J. Immunol.* 24:249 (1994))並調節免疫球蛋白穩衡。WO 00/42072(Presta)描述與FcR之結合得以改良或減弱之抗體變異體。該專利公開案之內容特別以引用的方式併入本文中。亦參看Shields等人，*J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)。

量測與FcRn之結合的方法為已知的(參看例如 Ghetie 1997, Hinton 2004)。可例如在轉殖基因小鼠或表現人類FcRn之經轉染之人類細胞株中，或在投與Fc變異多肽之靈長類動物中檢定人類FcRn高親和力結合多肽在活體內與人類FcRn之結合及血清半衰期。

Fc區胺基酸序列經改變且C1q結合能力增加或降低之多肽變異體描述於美國專利第6,194,551B1號及WO 99/51642中。彼等專利公開案之內容特別以引用的方式併入本文中。亦參看 Idusogie 等人，*J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000)。

如本文所使用之術語「Fc區」一般係指包含免疫球蛋白重鏈之C末端多肽序列的二聚複合物，其中C末端多肽序列可藉由完整抗體經木瓜蛋白酶消化而獲得。Fc區可包含原生或變異Fc序列。雖然免疫球蛋白重鏈Fc序列之邊界可變化，但人類IgG重鏈Fc序列通常界定為自約位置Cys226或自約位置Pro230處之胺基酸殘基延伸至Fc序列之羧基末

端。免疫球蛋白之Fc序列一般包含兩個恆定域，CH2域及CH3域，且視情況包含CH4域。本文中「Fc多肽」意謂構成Fc區之多肽之一。Fc多肽可獲自任何適合免疫球蛋白，諸如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亞型、IgA、IgE、IgD或IgM。在一些實施例中，Fc多肽包含部分或所有野生型鉸鏈序列(一般在其N末端)。在一些實施例中，Fc多肽不包含功能或野生型鉸鏈序列。

如本文所使用之「抗體突變體」或「抗體變異體」係指其中物種依賴性抗體之一或多個胺基酸殘基已經修飾的抗體胺基酸序列變異體。該等突變體必需與物種依賴性抗體具有小於100%序列一致性或相似性。在一實施例中，抗體突變體之胺基酸序列將與物種依賴性抗體之重鏈或輕鏈可變域之胺基酸序列具有至少75%胺基酸序列一致性或相似性，更佳為至少80%，更佳為至少85%，更佳為至少90%，且最佳為至少95%。關於此序列之一致性或相似性在本文中定義為在序列比對並引入間隙(若有必要時)以達成最大百分比序列一致性後，候選序列中與物種依賴性抗體殘基一致(亦即相同殘基)或相似(亦即基於常見側鏈性質來自同一群組之胺基酸殘基，參看下文)之胺基酸殘基的百分比。應理解，N末端、C末端或內部延伸、缺失或插入抗體序列中可變域以外均不影響序列一致性或相似性。

「病症」或「疾病」為將受益於本發明物質/分子或方法之治療的任何病狀。此術語包括慢性及急性病症或疾病，包括使哺乳動物易感染所述病症之病理學病狀。本文

中將治療之病症之非限制性實例包括惡性及良性腫瘤；癌瘤、母細胞瘤及肉瘤。

「治療」係指治療性治療及預防性措施。需要治療者包括已患有良性腫瘤、癌前腫瘤或非轉移性腫瘤者，以及需要預防癌症發生或復發者。

術語「治療有效量」係指治療或預防哺乳動物之疾病或病症的治療劑之量。在癌症之情況下，治療劑之治療有效量可減少癌細胞數目；減小原發性腫瘤尺寸；抑制(亦即在一定程度上減緩且較佳終止)癌細胞滲入周圍器官中；抑制(亦即在一定程度上減緩且較佳終止)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該病症相關之症狀。就藥物可防止現有癌細胞生長及/或將其殺死而言，其可具有細胞抑制性及/或細胞毒性。對於癌症療法，可例如藉由評估存活持續時間、疾病進展時間(TTP)、反應速率(RR)、反應持續時間及/或生活品質來量測活體內功效。

本文中之「自體免疫疾病」為由個體自身組織所產生且針對個體自身組織之非惡性疾病或病症。本文中之自體免疫疾病特別排除惡性或癌性疾病或病狀，尤其排除B細胞淋巴瘤、急性淋巴母細胞白血病(ALL)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)、毛細胞白血病及慢性骨髓母細胞白血病。自體免疫疾病或病症之實例包括但不限於發炎性反應，諸如發炎性皮膚病，包括銀屑病及皮炎(例如異位性皮膚炎)；全身性硬皮病及硬化症；與發炎性腸病(諸如克羅恩氏病

及潰瘍性結腸炎)相關之反應；呼吸窘迫症候群(包括成人呼吸窘迫症候群；ARDS)；皮炎；腦膜炎；腦炎；葡萄膜炎；結腸炎；腎小球腎炎；過敏性病狀，諸如濕疹及哮喘及涉及T細胞滲入及慢性發炎性反應之其他病狀；動脈粥樣硬化；白血球黏附不足；類風濕性關節炎；全身性紅斑狼瘡(SLE)；糖尿病(例如I型糖尿病或胰島素依賴性糖尿病)；多發性硬化；瑞諾氏症候群(Reynaud's syndrome)；自體免疫甲狀腺炎；變態反應性腦脊髓炎；修格連氏症候群(Sjorgen's syndrome)；青少年發作型糖尿病；及與細胞激素及T-淋巴細胞所介導之急性及延遲性過敏相關之免疫反應，通常見於肺結核、類肉瘤病、多發性肌炎、肉芽腫病及血管炎中；惡性貧血(艾迪森氏病(Addison's disease))；涉及白血球滲出之疾病；中樞神經系統(CNS)發炎性病症；多器官損傷症候群；溶血性貧血(包括但不限於冷凝球蛋白血症或庫氏試驗陽性貧血(Coombs positive anemia))；重症肌無力；抗原-抗體複合介導之疾病；抗腎小球基底膜病；抗磷脂症候群；過敏性神經炎；葛瑞夫氏病(Graves' disease)；蘭伯特-伊頓肌無力症候群(Lambert-Eaton myasthenic syndrome)；大皰性類天疱瘡；天疱瘡；自體免疫多內分泌病；萊特氏病(Reiter's disease)；僵體症候群；貝切特氏病(Behcet disease)；巨細胞動脈炎；免疫複合物腎炎；IgA腎病；IgM多發性神經病；免疫性血小板減少性紫癜(ITP)或自體免疫性血小板減少等。

術語「癌症」及「癌性」係指或描述哺乳動物中通常以不受調控之細胞生長為特徵的生理病狀。此定義包括良性及惡性癌症。「早期癌症」或「早期腫瘤」意謂非侵襲性或非轉移性或分類為0、I或II期癌症的癌症。癌症之實例包括但不限於癌瘤、淋巴瘤、母細胞瘤(包括神經管母細胞瘤及視網膜母細胞瘤)、肉瘤(包括脂肪肉瘤及滑膜細胞肉瘤)、神經內分泌腫瘤(包括類癌腫瘤、胃泌素瘤及胰島細胞癌)、間皮瘤、神經鞘瘤(包括聽神經瘤)、脊膜瘤、腺癌、黑素瘤及白血病或淋巴惡性疾病。該等癌症之更特定實例包括鱗狀細胞癌(例如上皮鱗狀細胞癌)、肺癌(包括小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺腺癌及肺鱗狀細胞癌)、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌(包括胃腸癌)、胰腺癌、膠質母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌(包括轉移性乳癌)、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌或子宮癌、唾液腺癌、腎癌、前列腺癌、陰門癌、甲狀腺癌、肝癌瘤、肛門癌瘤、陰莖癌瘤、睪丸癌、食管癌、膽道腫瘤以及頭頸部癌及多發性骨髓瘤。

術語「癌前」係指通常在癌症之前或發展成為癌症之病狀或生長。「癌前」生長將具有以異常之細胞週期調節、增殖或分化為特徵的細胞，其可由細胞週期調節、細胞增殖或分化之標記物來測定。

「發育不良」意謂組織、器官或細胞之任何異常生長或發育。發育不良較佳為高等級或癌前。

「轉移」意謂癌症在體內自其原發部位擴散至其他部位。癌細胞可脫離原發性腫瘤，滲透至淋巴及血管中，經由血流循環，並在體內別處正常組織中之遠處病灶中生長(轉移)。轉移可為局部轉移或遠距離轉移。轉移為循序過程，視腫瘤細胞脫離原發性腫瘤、經由血流行進並停在遠端部位而定。該等細胞在新部位建立血液供應且可生長成形成危及生命之塊體。

腫瘤細胞內之刺激性及抑制性分子路徑均調節此行為，且腫瘤細胞與宿主細胞之間的相互作用在遠處部位中亦較顯著。

「非轉移性」意謂良性或保持留在原發部位且尚未滲透至淋巴或血管系統中或至除原發部位以外之組織的癌症。一般而言，非轉移性癌症為任何0、I或II期癌症，偶爾為III期癌症。

「原發性腫瘤」或「原發性癌症」意謂原始癌症而非位於該個體體內之另一組織、器官或位置中的轉移性病變。

「良性腫瘤」或「良性癌症」意謂保持位於起始部位且不能滲入、侵襲或轉移至遠處部位的腫瘤。

「腫瘤負荷」意謂體內之癌細胞數目、腫瘤尺寸或癌症量。腫瘤負荷亦稱為腫瘤負載。

「腫瘤數目」意謂腫瘤之數目。

「個體」意謂哺乳動物，包括但不限於人類或非人類哺乳動物，諸如牛、馬、狗、綿羊或貓。個體較佳為人類。

術語「抗癌療法」係指適用於治療癌症之療法。抗癌治

療劑之實例包括但不限於例如化療劑、生長抑制劑、細胞毒性劑、用於放射療法之藥劑、抗血管生成劑、細胞凋亡劑、抗微管蛋白劑及用於治療癌症之其他藥劑、抗CD20抗體、血小板源性生長因子抑制劑(例如Gleevec™(甲磺酸伊馬替尼(Imatinib Mesylate)))、COX-2抑制劑(例如塞內昔布(celecoxib))、干擾素、細胞激素、結合一或多種以下標靶 ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR- β 、BlyS、APRIL、BCMA或VEGF受體、TRAIL/Apo2之拮抗劑(例如中和抗體)，及其他生物活性劑及有機化學藥劑等。本發明亦包括其組合。

如本文所使用之術語「細胞毒性劑」係指抑制或阻止細胞功能及/或引起細胞破壞之物質。該術語意欲包括放射性同位素(例如 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 及 Re^{186})、化療劑及毒素，諸如細菌、真菌、植物或動物來源之酶活性毒素，或其片段。

「化療劑」為適用於治療癌症之化合物。化療劑之實例包括適用於治療癌症之化合物。化療劑之實例包括烷化劑，諸如塞替派(thiotepa)及CYTOXAN®環磷醯胺；烷基磺酸酯，諸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶，諸如苯唑多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米特多巴(meturedopa)及尤利多巴(uredopa)；乙烯亞胺及甲基三聚氰胺，包括六甲密胺、三亞乙基三聚氰胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三羥甲基三聚氰胺；多聚乙醯(尤其布拉他

辛(bullatacin)及布拉他辛酮)；喜樹鹼(包括合成類似物拓朴替康(topotecan))；苔蘚蟲素；海綿多聚乙醯(callystatin)；CC-1065(包括其合成類似物阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin))；念珠藻環肽(尤其念珠藻環肽1及念珠藻環肽8)；海兔毒素；多卡米辛(duocarmycin)(包括合成類似物KW-2189及CB1-TM1)；艾榴素(eleutherobin)；水鬼蕉鹼(pancratistatin)；沙考的汀(sarcodictyin)；海綿抑素；氮芥，諸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷醯胺、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺、二氯甲二乙胺、鹽酸氧化二氯甲二乙胺、美法侖(melphalan)、新恩比興(novembichin)、苯司汀(phenesterine)、潑尼莫司汀(prednimustine)、曲洛磷胺(trofوسفamide)、烏拉莫司汀(uracil mustard)；硝基脲，諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲黴素、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及拉甯司汀(ranimustine)；抗生素，諸如炔類抗生素(例如卡奇黴素(calicheamicin)，尤其卡奇黴素 γ 1I及卡奇黴素 Ω 1I(參看例如 Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)))；達米辛(dynemicin)，包括達米辛A；雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)；艾斯帕米辛(esperamicin)；以及新抑癌蛋白發色團及相關色蛋白炔類抗生素發色團、克拉斯米辛(aclacinomycin)、放線菌素(actinomycin)、奧斯拉米辛(authramycin)、氮雜絲胺酸、博萊黴素

(bleomycin)、放線菌素 C(cactinomycin)、卡拉比星(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、克羅米辛(chromomycinis)、放線菌素 D(dactinomycin)、多柔比星(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-側氧基-L-正白胺酸、ADRIAMYCIN®小紅莓(doxorubicin)(包括 N-嗎啉基-小紅莓、氰基嗎啉并-小紅莓、2-吡咯啉并-小紅莓及脫氧多柔比星)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊達比星(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycin)(諸如絲裂黴素 C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycin)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素、奎那黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑菌素(streptonigrin)、鏈佐星(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、左諾他汀(zinostatin)、左柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤及 5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如迪諾特寧(denopterin)、甲胺喋呤、蝶羅呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉濱(fludarabine)、6-巰基嘌呤、噻咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、阿紫胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙脫氧尿苷(dideoxyuridine)、脫氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷

(floxuridine)；雄激素，諸如卡普甾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、甾內酯；抗腎上腺素，諸如胺魯米特(aminogluthethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如夫羅林酸(frolinic acid)；醋葡醛內酯；醛磷醯胺糖苷；胺基乙醯丙酸；伊利盧拉(eniluracil)；安吖啶；倍思塔布(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；艾達曲克(edatraxate)；得弗伐胺(defofamine)；秋水仙胺；地吖醯(diaziquone)；艾弗利散(elfornithine)；依利醋鉍(elliptinium acetate)；埃坡黴素(epothilone)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎔；羥基脲；香菇多糖；羅尼達寧(lonidainine)；類美登醇(maytansinoid)，諸如美登素(maytansine)及胺沙托辛(ansamitocin)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蒽醯(mitoxantrone)；莫比達摩(mopidanmol)；硝拉維林(nitraerine)；噴司他汀(pentostatin)；凡那明(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醯(losoxantrone)；足葉草酸；2-乙醯肼；丙卡巴肼；PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；根瘤菌素(rhizoxin)；西佐喃(sizofiran)；鍺螺胺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醯；2,2',2''-三氯三乙胺；單端孢黴烯(尤其T-2毒素、弗納庫林A(verracurin A)、桿孢菌素A及胺哌啶(anguidine))；烏拉坦(urethan)；長春地辛

(vindesine) ; 達卡巴嗪 (dacarbazine) ; 甘露莫司汀 (mannomustine) ; 二溴甘露醇 (mitobronitol) ; 二溴衛矛醇 (mitolactol) ; 哌泊溴烷 (pipobroman) ; 甲托辛 (gacytosine) ; 阿拉伯糖苷「Ara-C」) ; 環磷醯胺 ; 塞替派 ; 紫杉醇 , 例如 TAXOL® 太平洋紫杉醇 (paclitaxel)(Bristol-Myers Squibb Oncology , Princeton , N.J.)、ABRAXANETMTM不含Cremophor且經白蛋白工程改造之太平洋紫杉醇奈米粒子調配物 (American Pharmaceutical Partners , Schaumburg , Illinois) 及 TAXOTERE® 多西他賽 (doxetaxel)(Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France) ; 苯丁酸氮芥 ; GEMZAR® 吉西他濱 (gemcitabine) ; 6-硫鳥嘌呤 ; 巯基嘌呤 ; 甲胺喋呤 ; 鉑類似物 , 諸如順鉑及卡鉑 ; 長春鹼 ; 鉑 ; 依託泊苷 (etoposide)(VP-16) ; 異環磷醯胺 ; 米托蒽醌 ; 長春新鹼 (vincristine) ; NAVELBINE® 長春瑞賓 (vinorelbine) ; 諾凡特龍 (novantrone) ; 替尼泊苷 (teniposide) ; 依達曲沙 (edatrexate) ; 道諾黴素 (daunomycin) ; 胺基蝶呤 (aminopterin) ; 希羅達 (xeloda) ; 伊班膦酸鹽 (ibandronate) ; 伊立替康 (irinotecan)(Camptosar , CPT-11)(包括伊立替康與5-FU及甲醯四氫葉酸之治療方案) ; 拓撲異構酶抑制劑 RFS 2000 ; 二氟甲基鳥胺酸 (DMFO) ; 視黃素 , 諸如視黃酸 ; 卡培他濱 (capecitabine) ; 康柏斯達汀 (combretastatin) ; VELCADE 硼替佐米 (bortezomib) ; REVLIMID 來那度胺 (lenalidomide) ; 甲醯四氫葉酸 (LV) ;

奧克賽鉑 (oxaliplatin)，包括奧克賽鉑治療方案 (FOLFOX)；減少細胞增殖之 PKC- α 、Raf、H-Ras、EGFR 抑制劑 (例如埃羅替尼 (TarcevaTM)) 及 VEGF-A 抑制劑，及任何上述物質之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

此定義中亦包括用於調節或抑制激素對腫瘤之作用的抗激素劑，諸如抗雌激素劑及選擇性雌激素受體調節劑 (SERM)，包括例如他莫昔芬 (tamoxifen) (包括 NOLVADEX® 他莫昔芬)、拉洛昔芬 (raloxifene)、曲洛昔芬 (droloxifene)、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬 (trioxifene)、雷洛昔芬 (keoxifene)、LY117018、奧那司酮 (onapristone) 及 FARESTON、托瑞米芬 (toremifene)；抑制調節腎上腺中雌激素產生之芳香酶的芳香酶抑制劑，諸如 4(5)-咪唑、胺魯米特、MEGASE® 乙酸甲地孕酮 (megestrol acetate)、AROMASIN® 依西美坦 (exemestane)、弗米斯坦 (formestane)、法屈唑 (fadrozole)、RIVISOR® 伏氣唑 (vorozole)、FEMARA® 來曲唑 (letrozole) 及 ARIMIDEX® 阿那曲唑 (anastrozole)；及抗雄激素，諸如氟他胺、尼魯胺 (nilutamide)、比卡魯胺 (bicalutamide)、亮丙立德 (leuprolide) 及戈舍瑞林 (goserelin)；以及曲沙他濱 (troxacitabine) (1,3-二氧戊烷核苷胞嘧啶類似物)；反義寡核苷酸，尤其抑制異常細胞增殖所牽涉之信號傳導路徑中基因之表現的反義寡核苷酸，諸如 PKC- α 、Raf 及 H-Ras；核糖核酸酶，諸如 VEGF 表現抑制劑 (例如 ANGIOZYME® 核糖核酸酶) 及 HER2 表現抑制劑；疫苗，諸如基因療法疫

苗，例如，ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗及VAXID®疫苗；PROLEUKIN® rIL-2；LURTOTECAN®拓撲異構酶1抑制劑；ABARELIX® rmRH；長春瑞賓及艾斯帕米辛(參看美國專利第4,675,187號)，及任何上述物質之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

如本申請案中所使用之術語「前藥」係指醫藥學活性物質之前驅物或衍生物形式，其與母體藥物相比對腫瘤細胞之細胞毒性較弱且能夠經酶活化或轉化成更具活性之母體形式。參看例如 Wilman, 「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」, *Biochemical Society Transactions*, 14, 第375-382頁, 615th Meeting Belfast (1986); 及 Stella等人, 「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery」, *Directed Drug Delivery*, Borchardt等人(編), 第247-267頁, Humana Press (1985)。本發明之前藥包括但不限於含磷酸酯之前藥、含硫代磷酸鹽之前藥、含硫酸鹽之前藥、含肽之前藥、經D-胺基酸修飾之前藥、糖基化前藥、含 β -內醯胺之前藥、含視情況經取代之苯氧基乙醯胺之前藥或含視情況經取代之苯乙醯胺之前藥、5-氟胞嘧啶及其他5-氟尿苷前藥，該等前藥可轉化成更具活性及細胞毒性之游離藥物。可衍生成用於本發明之前藥形式的細胞毒性藥物之實例包括但不限於上述化療劑。

「放射療法」意謂使用定向 γ 射線或 β 射線對細胞誘導足以限制其正常起作用之能力或完全破壞該細胞的損害。應瞭解，此項技術中已知許多方式用於確定治療劑量及持續

時間。典型治療係以一次投藥形式投與，且典型劑量範圍為10至200個單位(Grays)/天。

「生物活性」或「功能性」多肽(諸如異源多肽)為能夠在結構、調節、生物化學或生物物理學事件中發揮一或多種天然活性的多肽。

「生物活性」或「功能性」抗體為能夠在結構、調節、生物化學或生物物理學事件中發揮一或多種天然活性的抗體。舉例而言，生物活性抗體能夠特異性結合抗原，且該結合轉而引發或改變細胞或分子事件，諸如信號轉導或酶活性。生物活性抗體亦可阻斷受體之配位體活化或充當促效型抗體。抗體發揮一或多種天然活性的能力取決於若干因素，包括多肽鏈之正確摺疊及組裝。如本文所使用，由所揭示之方法產生之生物活性抗體通常包含具有兩條相同L鏈及兩條相同H鏈之異源四聚體，該等鏈係由多個二硫鍵連接並正確摺疊。

本發明之組合物及其使用方法

在一態樣中，本發明提供TIR變異體。因而，對於指定TIR，可產生具有一定範圍之轉譯強度的一系列胺基酸或核酸序列變異體，從而提供可用於調整此因子以達成多種不同多肽之最佳分泌的適宜方式。使用在此等變異體(諸如PhoA)控制下表現之報導基因提供定量不同轉譯起始區之相對轉譯強度的方法。可在質體載體背景中提供變異或突變TIR，從而提供一組其中可插入相關基因之質體並量測其表現，以便建立達成成熟多肽之最大表現的最佳轉譯

強度範圍。

藉由產生可改變胺基酸序列之密碼子變化的習知技術進行TIR之突變誘發，但在核苷酸序列中沉默變化較佳。TIR中之改變可包括例如 Shine-Dalgarno 序列之數目或間隔改變以及信號序列改變。用於產生突變信號序列之一種方法為在編碼序列開始處產生「密碼子庫」，其不改變信號序列之胺基酸序列(亦即變化為沉默變化)。此舉可藉由改變各密碼子之第三核苷酸位置來實現，另外，一些胺基酸，諸如白胺酸、絲胺酸及精胺酸，具有多個第一位置及第二位置，此會可增加產生該庫之複雜性。此突變誘發方法詳細描述於 Yansura 等人 (METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.4:151-158 (1992))中。基本上，合成編碼信號序列及成熟多肽起始部分的DNA片段以改變前6至12個密碼子中之每一者的第三(及可能如上所述之第一及第二)位置。此等密碼子下游之其他核苷酸提供用於產生下游股(bottom strand)之互補引子之結合位點。用DNA聚合酶I(Klenow)處理上游編碼股(top coding strand)及下游股引子將產生一組含有隨機化密碼子之雙螺旋DNA片段。引子經設計成含有可用選殖位點，該等選殖位點接著可用於在適當載體中插入DNA片段，從而使密碼子庫擴增。替代方法包括例如用隨機核苷酸置換整個rbs(Wilson等人，BioTechniques17:944-952 (1994))，及使用噬菌體呈現庫(參看例如 Barbas 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.89:4457-4461 (1992)；Garrard 等人，Gene128:103-

109 (1993))。

細菌 Sec 移位酶促進原核生物之蛋白質輸出。分泌蛋白可藉由兩種不同機制靶向 Sec 移位酶，亦即共轉譯靶向及轉譯後靶向。在後者中，含有分泌蛋白之信號序列以其合成完成狀態自核糖體釋放並被引導至 Sec 移位酶。在各種革蘭氏陰性細菌 (Gram-negative bacteria) 中，分泌蛋白由分泌特異性伴隨蛋白 SecB 引導至 Sec 移位酶，該分泌特異性伴隨蛋白 SecB 維持此等蛋白質處於勝任移位之展開狀態。在共轉譯靶向期間，信號識別粒子 (SRP) 在其自核糖體釋出的同時結合至分泌蛋白之信號序列，且整個 SRP/核糖體/新生分泌蛋白鏈三元複合物靶向 Sec 移位酶。

舉例而言，麥芽糖結合細胞周質蛋白 (MalE) 及鹼性磷酸酶 (PhoA) 信號肽藉助於分子馬達 SecA 指導以轉譯後方式自細胞質移位至細胞周質。指導以轉譯後方式移位的其他例示性信號肽為 dsbC、lolA、ompA、lamb 及 lpp。熱穩定腸毒素 II (stII) 及硫醇基:二硫鍵交換蛋白 (dsbA) 信號肽藉助於信號識別粒子 (SRP) 指導以共轉譯方式移位。指導以共轉譯方式移位的其他例示性信號肽為 yraI、tort、tolB、sfmC、nikA 及 sfmC。關於 Sec 及 Tat 介導之蛋白質通過細菌細胞質膜分泌的綜述，亦參看 Natale 等人 (Natale 等人 (2008) *Biochimica et Biophysica Acta* 1778:1735-56)。

針對表示用於通過大腸桿菌中之內膜轉運的兩個主要分泌路徑之信號肽：sec (PhoA、MalE) 及 SRP (DsbA、STII)，吾等已研發出新穎變異轉譯起始區 (TIR) 信號肽庫 (圖 2、表

2)。各集合庫包含一組包含具有不同轉譯強度之變異TIR的載體，從而提供一種可容易地調節指定相關蛋白質之轉譯量的方式。

通常，TIR變異體將提供於具有表現相關基因之適當元件的質體載體中。舉例而言，典型構築體將含有信號序列之5'啟動子、信號序列之3'限制酶識別位點用於插入相關基因或報導基因，及可選擇標記物，諸如抗藥性標記物，用於選擇及/或維持經所產生質體轉型之細菌。本文中進一步論述並例示質體載體。適合為原核生物宿主使用之啟動子在此項技術中為已知的，且一些例示並描述於本文中。

可使用可以某種方式定量的任何報導基因。因而，舉例而言，鹼性磷酸酶產量可定量為phoA基因產物之分泌量的量度。其他實例包括例如 β -內醯胺酶基因。

一般而言，可產生一組載體，對於其中載體之各順反子具有一定範圍之TIR強度。此限制組提供在各種TIR強度組合下各鏈之表現量以及全長產物之產率的比較。可藉由定量報導基因之表現量來測定TIR強度，如Simmons等人之美國專利第5,840,523號中詳細描述。出於本發明之目的，載體內特定TIR對之轉譯強度組合係由(N-輕鏈，M-重鏈)表示，其中N為輕鏈之相對TIR強度且M為重鏈之相對TIR強度。舉例而言，(3-輕鏈，7-重鏈)意謂載體之輕鏈表現之相對TIR強度為約3且重鏈表現之相對TIR強度為約7。基於轉譯強度比較，選擇所要個別TIR以便在本發明之表現

載體構築體中組合。如此構築之載體可用於轉型適當宿主。宿主較佳為原核生物宿主。宿主更佳為大腸桿菌。

可例如藉由針對相關多肽之功能檢定(若可用，放射免疫檢定(RIA)、酶聯免疫檢定(ELISA))或藉由PAGE及觀測相關多肽之確切分子量來測定多肽之分泌量。測定分泌多肽之量的方法在此項技術中為熟知的且一些例示於本文中。

抗體

本發明抗體較佳為單株抗體。本發明範疇內亦涵蓋本文所提供抗體的Fab、Fab'、Fab'-SH及F(ab')₂片段。此等抗體片段可藉由傳統方式產生，諸如酶消化，或可藉由重組技術產生。該等抗體片段可為嵌合片段或人類化片段。此等片段適用於下文所述之診斷及治療性目的。

因此，在一些實施例中，抗c-met抗體為包含Fc區之單臂抗體(亦即，重鏈可變域及輕鏈可變域形成單一抗原結合臂)，其中該Fc區包含第一Fc多肽及第二Fc多肽，其中該第一Fc多肽及該第二Fc多肽以複合物形式存在且形成使該抗體片段之穩定性與包含該抗原結合臂之Fab分子相比有所增加的Fc區。對於治療需要拮抗功能之病理學病狀，且在該治療中抗體之二價將產生不合需要之激動作用，單臂抗體(亦即包含單一抗原結合臂之抗體)之單價特性可在抗體結合至靶分子後產生及/或確保拮抗功能。此外，包含Fc區之單臂抗體的特徵在於與具有類似/實質上相同之抗原結合特徵的Fab形式相比優良的藥物動力學屬性(諸如

活體內半衰期延長及/或清除率降低)，因而克服使用習知單價 Fab 抗體之主要缺點。單臂抗體揭示於例如 WO2005/063816；Martens 等人，Clin Cancer Res (2006), 12: 6144 中。在一些實施例中，單臂抗體為單價抗體片段，其中該抗體片段包含有含輕鏈可變域之第一多肽、含重鏈可變域及該第一 Fc 多肽之第二多肽，及含該第二 Fc 多肽之第三多肽，其中該重鏈可變域與該輕鏈可變域形成單一抗原結合臂，且藉此該第一 Fc 多肽及該第二 Fc 多肽以複合物形式存在且形成使該抗體片段之穩定性與包含該抗原結合臂之 Fab 分子相比有所增加的 Fc 區。

在一些實施例中，抗體結合(在一些實施例中特異性結合)c-met。在一些實施例中，抗 c-met 抗體包含(a)包含具有序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQ
APGKGLEWVGMIDPSNSDTRFNP NFKDRFTISADTSKNTA
YLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGTLVTVS
S(SEQ ID NO: 43)之重鏈可變域、CH1 序列及第一 Fc 多肽
的第一多肽；(b)包含具有序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAW
YQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIKR(SEQ ID NO:
44)之輕鏈可變域及 CL1 序列的第二多肽；及(c)包含第二 Fc
多肽之第三多肽，其中該重鏈可變域及該輕鏈可變域以複
合物形式存在且形成單一抗原結合臂，其中該第一 Fc 多肽

及該第二Fc多肽以複合物形式存在且形成使該抗體片段之穩定性與包含該抗原結合臂之Fab分子相比有所增加的Fc區。在一些實施例中，第一多肽包含圖7中所述之Fc序列(SEQ ID NO: 68)且第二多肽包含圖8中所述之Fc序列(SEQ ID NO: 47)。在一些實施例中，第一多肽包含圖8中所述之Fc序列(SEQ ID NO: 47)且第二多肽包含圖7中所述之Fc序列(SEQ ID NO: 68)。

在一些實施例中，抗c-met抗體包含(a)包含重鏈可變域之第一多肽，該多肽包含序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQ
APGKGLEWVGMIDPSNSDTRFNPNFKDRFTISADTSKNTA
YLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK(SEQ ID NO: 45)；(b)包含輕鏈可變域之第

二多肽，該多肽包含序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAW
YQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS

SLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGKVEIKRTVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
 GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO: 46)；及包含Fc序
 列之第三多肽，該多肽包含序列

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO: 47)，

其中該重鏈可變域及該輕鏈可變域以複合物形式存在且形
 成單一抗原結合臂，其中該第一Fc多肽及該第二Fc多肽以
 複合物形式存在且形成使該抗體片段之穩定性與包含該抗
 原結合臂之Fab分子相比有所增加的Fc區。

在一態樣中，抗c-met抗體包含：

(a)至少一個、兩個、三個、四個或五個選自由以下組成
 之群的高變區(CDR)序列：

(i) 包含序列 A1-A17 之 CDR-L1，其中 A1-A17 為
 KSSQSLLYTSSQKNYLA(SEQ ID NO:49)；

(ii) 包含序列 B1-B7 之 CDR-L2，其中 B1-B7 為
 WASTRES(SEQ ID NO:50)；

(iii) 包含序列 C1-C9 之 CDR-L3，其中 C1-C9 為
 QQYYAYPWT(SEQ ID NO:51)；

(iv) 包含序列 D1-D10 之 CDR-H1，其中 D1-D10 為 GYTFTSYWLH(SEQ ID NO:52)；

(v) 包含序列 E1-E18 之 CDR-H2，其中 E1-E18 為 GMIDPSNSDTRFNPNFKD(SEQ ID NO:53)；及

(vi) 包含序列 F1-F11 之 CDR-H3，其中 F1-F11 為 T/SYGSYVSPLDY(SEQ ID NO:54)；

及 (b) 至少一個變異 CDR，其中該變異 CDR 序列包含 (i)-(vi) 中所述序列之至少一個殘基之修飾。在一實施例中，CDR-H3 包含 TYGSYVSPLDY(SEQ ID NO: 55)。在一實施例中，CDR-H3 包含 SYGSYVSPLDY(SEQ ID NO: 56)。在一實施例中，包含此等序列(呈如本文所述之組合形式)之本發明抗體為人類化抗體或人類抗體。

在一實施例中，抗 c-met 抗體包含重鏈可變域，該重鏈可變域包含圖 7 中所述之 CDR1-HC、CDR2-HC 及 CDR3-HC 序列(SEQ ID NO:52-53 及 66)中之一或多者。在一些實施例中，抗體包含輕鏈可變域，該輕鏈可變域包含圖 7 中所述之 CDR1-LC、CDR2-LC 及 CDR3-LC 序列(SEQ ID NO: 49-51)中之一或多者。在一些實施例中，該重鏈可變域包含圖 7 中所述之 FR1-HC、FR2-HC、FR3-HC 及 FR4-HC 序列(SEQ ID NO: 62-65)。在一些實施例中，該輕鏈可變域包含圖 7 中所述之 FR1-LC、FR2-LC、FR3-LC 及 FR4-LC 序列(SEQ ID NO: 57-60)。

本發明抗 c-met 抗體中之變異 HVR 可具有 HVR 內一或多個殘基之修飾。在一實施例中，HVR-L2 變異體包含下列

位置之任何組合的 1-5(1、2、3、4 或 5)個取代：B1(M 或 L)、B2(P、T、G 或 S)、B3(N、G、R 或 T)、B4(I、N 或 F)、B5(P、I、L 或 G)、B6(A、D、T 或 V)及 B7(R、I、M 或 G)。

在一實施例中，HVR-H1 變異體包含下列位置之任何組合的 1-5(1、2、3、4 或 5)個取代：D3(N、P、L、S、A、I)、D5(I、S 或 Y)、D6(G、D、T、K、R)、D7(F、H、R、S、T 或 V)及 D9(M 或 V)。

在一實施例中，HVR-H2 變異體包含下列位置之任何組合的 1-4(1、2、3 或 4)個取代：E7(Y)、E9(I)、E10(I)、E14(T 或 Q)、E15(D、K、S、T 或 V)、E16(L)、E17(E、H、N 或 D)及 E18(Y、E 或 H)。

在一實施例中，HVR-H3 變異體包含下列位置之任何組合的 1-5(1、2、3、4 或 5)個取代：F1(T、S)、F3(R、S、H、T、A、K)、F4(G)、F6(R、F、M、T、E、K、A、L、W)、F7(L、I、T、R、K、V)、F8(S、A)、F10(Y、N)及 F11(Q、S、H、F)。

各位置後之圓括號中的字母表示說明性取代(亦即置換)胺基酸；如熟習此項技術者顯而易知，其他胺基酸在本文所述情境下用作取代胺基酸之適用性通常可使用此項技術中已知及/或本文所述之技術來評估。

在一實施例中，HVR-L1 包含 SEQ ID NO:49 之序列。

在一實施例中，變異 HVR-H3 中之 F1 為 T。

在一實施例中，變異 HVR-H3 中之 F1 為 S。

在一實施例中，變異 HVR-H3 中之 F3 為 R。

在一實施例中，變異 HVR-H3 中之 F3 為 S。

在一實施例中，變異 HVR-H3 中之 F7 為 T。

在一實施例中，本發明抗體包含變異 HVR-H3，其中 F1 為 T 或 S，F3 為 R 或 S，且 F7 為 T。

在一實施例中，本發明之抗 c-met 抗體包含變異 HVR-H3，其中 F1 為 T，F3 為 R，且 F7 為 T。在一實施例中，本發明抗體包含變異 HVR-H3，其中 F1 為 S。在一實施例中，本發明抗體包含變異 HVR-H3，其中 F1 為 T，且 F3 為 R。在一實施例中，本發明抗體包含變異 HVR-H3，其中 F1 為 S，F3 為 R，且 F7 為 T。在一實施例中，本發明抗體包含變異 HVR-H3，其中 F1 為 T，F3 為 S，F7 為 T，且 F8 為 S。在一實施例中，本發明抗體包含變異 HVR-H3，其中 F1 為 T，F3 為 S，F7 為 T，且 F8 為 A。在一些實施例中，該變異 HVR-H3 抗體進一步包含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1 及 HVR-H2，其中按順序各自包含 SEQ ID NO:49、50、51、52 及 53 所述之序列。在一些實施例中，此等抗體進一步包含人類亞群 III 重鏈構架共同序列。在此等抗體之一實施例中，構架共同序列在位置 71、73 及 / 或 78 處包含取代。在此等抗體之一些實施例中，位置 71 為 A，73 為 T 及 / 或 78 為 A。在此等抗體之一實施例中，此等抗體進一步包含人類 κ I 輕鏈構架共同序列。

在一實施例中，本發明之抗 c-met 抗體包含變異 HVR-L2，其中 B6 為 V。在一些實施例中，該變異 HVR-L2 抗體進一步包含 HVR-L1、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2 及 HVR-H3，其中按順序各自包含 SEQ ID NO:49、51、52、53、54 所述之序列。在一些實施例中，該變異 HVR-L2 抗體進一步包含 HVR-L1、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2 及 HVR-H3，其中按順序各自包含 SEQ ID NO:49、51、52、

53、55所述之序列。在一些實施例中，該變異HVR-L2抗體進一步包含HVR-L1、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3，其中按順序各自包含SEQ ID NO:49、51、52、53、56所述之序列。在一些實施例中，此等抗體進一步包含人類亞群III重鏈構架共同序列。在此等抗體之一實施例中，構架共同序列在位置71、73及/或78處包含取代。在此等抗體之一些實施例中，位置71為A，73為T及/或78為A。在此等抗體之一實施例中，此等抗體進一步包含人類κI輕鏈構架共同序列。

在一實施例中，本發明之抗cmet抗體包含變異HVR-H2，其中E14為T，E15為K，且E17為E。在一實施例中，本發明抗體包含變異HVR-H2，其中E17為E。在一些實施例中，該變異HVR-H3抗體進一步包含HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1及HVR-H3，其中按順序各自包含SEQ ID NO:49、50、51、52、54所述之序列。在一些實施例中，該變異HVR-H2抗體進一步包含HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1及HVR-H3，其中按順序各自包含SEQ ID NO:49、50、51、52、55所述之序列。在一些實施例中，該變異HVR-H2抗體進一步包含HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1及HVR-H3，其中按順序各自包含SEQ ID NO:49、50、51、52、55所述之序列。在一些實施例中，此等抗體進一步包含人類亞群III重鏈構架共同序列。在此等抗體之一個實施例中，構架共同序列在位置71、73及/或78處包含取代。在此等抗體之一些實施例

中，位置71為A，73為T及/或78為A。在此等抗體之一個實施例中，此等抗體進一步包含人類κI輕鏈構架共同序列。

適合用於本發明方法中之其他抗c-met抗體為此項技術中已知的。

在一態樣中，抗c-met抗體包含至少一個促進該抗體片段內之Fc序列異源二聚同時使同源二聚減至最少的特徵。該(等)特徵改良免疫球蛋白群體之產率及/或純度及/或均質性。在一實施例中，抗體包含如WO2005/063816中所述構成「杵」及「白」之Fc突變。舉例而言，Fc多肽中之白狀突變可為T366A、L368A及/或Y407V中之一或多者，且杵狀突變可為T366W。本文中進一步描述杵狀及白狀Fc突變。

單株抗體係獲自實質上均質之抗體群體，亦即，構成該群體之個別抗體除可少量存在之可能的天然存在突變外相同。因而，修飾語「單株」指示抗體不為個別抗體之混合物的特徵。

本發明之單株抗體可使用Kohler等人，*Nature*, 256:495 (1975)首先描述之融合瘤法產生，或可藉由重組DNA法(美國專利第4,816,567號)產生。

在融合瘤法中，對小鼠或諸如倉鼠之其他適當宿主動物進行免疫以激發產生或能夠產生將特異性結合至免疫用蛋白質之抗體的淋巴細胞。可藉由多次皮下(sc)或腹膜內(ip)注射抗原及佐劑在動物中產生針對抗原之抗體。可使用此

項技術中熟知之方法製備抗原，其中一些在本文中進一步加以描述。舉例而言，在下文中描述人類及小鼠抗原之重組產生。在一實施例中，用融合至免疫球蛋白重鏈之Fc部分的抗原對動物進行免疫。在一較佳實施例中，用抗原-IgG1融合蛋白對動物進行免疫。動物一般經抗原與單磷醯脂質 A(MPL)/海藻糖二氫基黴菌酸酯 (TDM)(Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT)之免疫原性結合物或衍生物免疫，且在多個部位皮內注射該溶液。兩週後，對動物加強免疫。7至14天後，對動物採血且檢定血清之抗體效價。對動物加強免疫直至效價平穩。

或者，可將淋巴細胞在活體外免疫。接著使用諸如聚乙二醇之適合融合劑使淋巴細胞與骨髓瘤細胞融合，形成融合瘤細胞(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第59-103頁(Academic Press, 1986))。

將由此製備之融合瘤細胞接種並培養於較佳含有一或多種可抑制未融合親本骨髓瘤細胞之生長或存活之物質的適合培養基中。舉例而言，若親本骨髓瘤細胞缺乏次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶(HGPRT或HPRT)，則融合瘤之培養基通常將包括次黃嘌呤、胺基蝶呤及胸苷(HAT培養基)，該等物質防止缺乏HGPRT之細胞生長。

較佳骨髓瘤細胞為有效融合、支持所選抗體產生細胞穩定高產量產生抗體且對諸如HAT培養基之培養基敏感的骨髓瘤細胞。其中，較佳骨髓瘤細胞株為鼠類骨髓瘤細胞株，諸如可獲自Salk Institute Cell Distribution Center(San

Diego, California USA)之源自MOPC-21及MPC-11小鼠腫瘤之細胞株及可獲自美國菌種保存中心(Rockville, Maryland USA)之SP-2或X63-Ag8-653細胞。亦已描述用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類雜骨髓瘤細胞株(Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

檢定融合瘤細胞生長之培養基中針對抗原之單株抗體之產生。較佳藉由免疫沈澱法或藉由諸如放射免疫檢定(RIA)或酶聯免疫吸附檢定(ELISA)之活體外結合檢定來測定融合瘤細胞所產生之單株抗體之結合特異性。

可例如藉由Munson等人, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)之Scatchard分析來測定單株抗體之結合親和力。

鑑別產生具有所要特異性、親和力及/或活性之抗體的融合瘤細胞後,可藉由限制稀釋程序次選殖純系且藉由標準方法培養(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第59-103頁(Academic Press, 1986))。用於此目的之適合培養基包括例如D-MEM或RPMI-1640培養基。另外,融合瘤細胞可作為動物體內之腹水腫瘤活體內培養。

藉由諸如蛋白質A-瓊脂糖、氫氧磷灰石層析、凝膠電泳、透析或親和層析之習知免疫球蛋白純化程序適當地自培養基、腹水流體或血清分離將次純系所分泌之單株抗

體。

可藉由使用組合庫篩選具有所要活性之合成抗體純系來產生本發明抗體。原則上，藉由篩選含有呈現融合至噬菌體鞘蛋白之抗體可變區(Fv)之各種片段之噬菌體的噬菌體庫來選擇合成抗體純系。藉由親和層析針對所要抗原淘選該等噬菌體庫。能夠結合至所要抗原的表現Fv片段之純系吸附至抗原，且因而與該集合庫中之未結合純系分離。接著，自抗原溶離結合純系，且可藉由另外吸附/溶離循環進一步增濃。可藉由設計選擇相關噬菌體純系之適合抗原篩選程序，接著使用來自相關噬菌體純系的Fv序列及Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991)，第1-3卷中所述之適合恆定區(Fc)序列構築抗體純系來獲得本發明之任何抗體。產生抗體之例示性方法揭示於實例中。

抗體之抗原結合域係由具有約110個胺基酸之兩個可變(V)區形成，一個區來自輕鏈(VL)且另一個區來自重鏈(VH)，兩個區均存在三個高變環或互補決定區(CDR)。可變域可以如下形式功能性地呈現於噬菌體上：單鏈Fv(scFv)片段，其中VH及VL經由可撓性短肽共價連接；或Fab片段，其中VH及VL各融合至恆定域且以非共價方式相互作用，如Winter等人，*Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)中所述。如本文所使用，scFv編碼噬菌體純系及Fab編碼噬菌體純系統稱為「Fv噬菌體純系」或「Fv純系」。

可藉由聚合酶鏈反應(PCR)分別選殖VH及VL基因之譜系，並在噬菌體庫中隨機重組，接著可尋找抗原結合純系，如 Winter 等人，*Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)所述。來自免疫來源之集合庫提供針對免疫原之高親和力抗體，而不需要構築融合瘤。或者，可選殖未經處理之譜系以便提供針對多種非自身以及自體抗原之人類抗體的單一來源而不進行任何免疫，如 Griffiths 等人，*EMBO J*, 12: 725-734 (1993)所述。最後，亦可藉由自幹細胞選殖未重排之V基因區段並使用含有用於編碼高變CDR3區且實現活體外重排之隨機序列的PCR引子來合成產生未經處理之集合庫，如 Hoogenboom及 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)所述。

絲狀噬菌體用於藉由融合至次要鞘蛋白pIII來呈現抗體片段。抗體片段可以如下形式呈現：單鏈Fv片段，其中VH及VL域由可撓性多肽間隔子連接於同一多肽鏈上，例如，如 Marks 等人，*J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)所述；或Fab片段，其中一條鏈融合至pIII且另一條鏈分泌至細菌宿主細胞細胞周質中，在細胞周質中藉由置換一些野生型鞘蛋白使Fab-鞘蛋白結構之組裝體呈現於噬菌體表面上，例如，如 Hoogenboom 等人，*Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991)中所述。

一般而言，編碼抗體基因片段之核酸係由自人類或動物收集之免疫細胞獲得。若需要偏向於靶向特定抗原之純系的集合庫，則用抗原對個體進行免疫以產生抗體反應，並

回收脾細胞及/或循環B細胞及其他周圍血淋巴細胞(PBL)以便構築集合庫。在一較佳實施例中，藉由在帶有功能性人類免疫球蛋白基因陣列(且缺乏功能性內源性抗體產生系統)之轉殖基因小鼠中產生抗體反應來獲得偏向於抗原反應性純系之人類抗體基因片段庫，以使抗原免疫得到產生針對抗原之人類抗體的B細胞。下文描述產生人類抗體之轉殖基因小鼠的產生。

可藉由使用適合篩選程序分離表現抗原特異性膜結合抗體之B細胞，例如藉由用抗原親和層析分離細胞或使細胞吸附至螢光染料標記之抗原接著進行流式活化細胞分選(FACS)來另外增濃抗原反應性細胞群體。

或者，使用來自未經免疫之供體的脾細胞及/或B細胞或其他PBL可更佳呈現可能之抗體譜系，且亦可使用抗原不具抗原性之任何動物(人類或非人類)物種來構築抗體庫。對於併有活體外抗體基因構築之集合庫，自個體收集幹細胞以獲得編碼未重排之抗體基因區段的核酸。相關免疫細胞可獲自多種動物物種，諸如人類、小鼠、大鼠、兔、狼、狗、貓、豬、牛、馬及禽類物種等。

自相關細胞回收編碼抗體可變基因區段(包括VH及VL區段)之核酸並擴增。在重排VH及VL基因庫情況下，可藉由自淋巴細胞分離基因體DNA或mRNA，接著用如Orlandi等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989)中所述匹配重排VH及VL基因之5'及3'末端的引子進行聚合酶鏈反應(PCR)來獲得所要DNA，從而產生互異V基因譜系

以供表現。V基因可自cDNA及基因體DNA擴增，其中反向引子處於編碼成熟V域之外顯子的5'末端，而正向引子基於J區段內，如Orlandi等人(1989)及Ward等人，*Nature*, 341: 544-546 (1989)所述。然而，對於自cDNA擴增，反向引子亦可基於前導外顯子中，如Jones等人，*Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991)所述，而正向引子處於恆定區內，如Sastry等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989)所述。為了使互補性最大，可在引子中併入簡併性，如Orlandi等人(1989)或Sastry等人(1989)所述。較佳藉由使用靶向各V基因家族之PCR引子來使集合庫多樣性最大，以便擴增免疫細胞核酸樣本中所存在之所有可用VH及VL排列，例如，如Marks等人，*J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)之方法中所述或如Orum等人，*Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993)之方法中所述。為了將經擴增之DNA選殖至表現載體中，可在PCR引子一端引入稀有限制位點作為標記，如Orlandi等人(1989)所述，或用經標記之引子進一步PCR擴增，如Clackson等人，*Nature*, 352: 624-628 (1991)所述。

合成重排V基因之譜系可在活體外自V基因區段衍生。大部分人類VH基因區段已經選殖及定序(Tomlinson等人，*J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)中報導)，及定位(Matsuda等人，*Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993)中報導)；此等經選殖之區段(包括H1及H2環之所有主要構形)可用於使用編碼具有互異序列及長度之H3環的PCR引子產生互異

VH基因譜系，如Hoogenboom及Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)所述。亦可產生所有序列多樣性集中於單一長度之長H3環的VH譜系，如Barbas等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992)所述。人類V κ 及V λ 區段已經選殖及定序(Williams及Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461(1993)報導)且可用於產生合成輕鏈譜系。基於一定範圍之VH及VL摺疊及L3及H3長度之合成V基因譜系將編碼具有相當結構多樣性的抗體。編碼DNA之V基因擴增後，可根據Hoogenboom及Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)之方法使生殖系V基因區段在活體外重排。

可藉由以若干方式將VH及VL基因譜系組合在一起來構築抗體片段之譜系。各譜系可在不同載體中產生，且在活體外重組載體，例如，如Hogrefe等人，*Gene*, 128:119-126 (1993)所述，或在活體內藉由組合感染重組載體，例如，Waterhouse等人，*Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)中所述之loxP系統。活體內重組法利用Fab片段之雙鏈性質克服大腸桿菌轉型效率所施加之對集合庫大小之限制。分別選殖未經處理之VH及VL譜系，一者選殖至噬菌粒中，另一者選殖至噬菌體載體中。接著藉由含噬菌粒之細菌之噬菌體感染組合兩個集合庫以使各細胞含有不同組合且集合庫大小僅受所存在之細胞數目(約 10^{12} 個純系)限制。兩種載體均含有活體內重組信號，以使VH及VL基因重組至單一複製子上並共同封裝至噬菌體病毒粒子中。此等大集合庫提供大量具有良好親和力之互異抗體(K_d^{-1} 約 10^{-8} M)。

或者，可將該等譜系依次選殖至同一載體中，例如，如 Barbas 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978-7982 (1991)所述，或藉由PCR組裝在一起接著進行選殖，例如，如 Clackson 等人，*Nature*, 352: 624-628 (1991)所述。PCR組裝亦可用於用編碼可撓性肽間隔子之DNA接合VH及VL DNA以形成單鏈Fv(scFv)譜系。在又一項技術中，使用「細胞內PCR組裝」藉由PCR在淋巴細胞內組合VH及VL基因，接著選殖連接基因譜系，如 Embleton 等人，*Nucl. Acids Res.*, 20:3831-3837 (1992)所述。

未經處理之集合庫(天然或合成)所產生之抗體可具有中等親和力(K_d^{-1} 約 10^6 至 10^7 M^{-1})，但亦可在活體外藉由構築並自二級集合庫中再選擇來模擬親和力成熟，如 Winter 等人(1994)，同上文所述。舉例而言，可藉由使用易出錯聚合酶(Leung 等人，*Technique*, 1:11-15 (1989)報導)，以 Hawkins 等人*J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992)之方法或以 Gram 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992)之方法在活體外隨機引入突變。另外，可藉由隨機突變一或多個CDR，例如用帶有包涵相關CDR之隨機序列的引子在所選個別Fv純系中進行PCR並篩選較高親和力純系來執行親和力成熟。WO 96/07754(1996年3月14日公開)描述在免疫球蛋白輕鏈之互補決定區中誘導突變誘發以產生輕鏈基因庫之方法。另一有效方法為將藉由噬菌體呈現選擇之VH或VL域與獲自未免疫供者之天然存在之V域變異體譜系重組，並以若干輪鏈改組篩選較高親和力，如

Marks 等人，*Biotechnol.*, 10:779-783 (1992)所述。此技術可產生親和力在 10^{-9} M範圍內的抗體及抗體片段。

可使用所要抗原區域之胺基酸序列設計編碼所要靶抗原之核酸序列。

編碼靶抗原之核酸可藉由此項技術中已知之多種方法製備。此等方法包括但不限於藉由Engels等人，*Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28: 716-734 (1989)中所述之任何方法進行化學合成，諸如三酯、亞磷酸酯、亞磷醯胺及H膦酸酯法。在一實施例中，由表現宿主細胞優選之密碼子用於設計抗原編碼DNA。或者，編碼抗原之DNA可自基因體庫或cDNA庫分離。

構築編碼抗原之DNA分子後，DNA分子以操作方式連接於表現載體(諸如質體)中之表現控制序列，其中該控制序列由經該載體轉型之宿主細胞識別。一般而言，質體載體含有複製及控制序列，該等序列源自與該宿主細胞相容之物種。載體一般帶有複製位點，以及編碼能夠在轉型細胞中提供表型選擇之蛋白質的序列。達成於原核生物及真核生物宿主細胞中表現之適合載體為此項技術中已知的，且一些於本文中進一步加以描述。可使用真核生物(諸如酵母)或源自多細胞生物體(諸如哺乳動物)之細胞。

編碼抗原之DNA視情況以操作方式連接於分泌前導序列，從而使表現產物由宿主細胞分泌至培養基中。分泌前導序列之實例包括stII、大腸桿菌素(ecotin)、lamB、疱疹GD、lpp、鹼性磷酸酶、轉化酶及 α 因子。蛋白質A之36胺

基酸前導序列亦適用於本文中(Abrahmsen等人, *EMBO J.*, 4: 3901 (1985))。

用本發明之上述表現或選殖載體轉染且較佳轉型宿主細胞，並在適當時經修飾之習知營養培養基中培養以便誘導啟動子、選擇轉型體或擴增編碼所要序列之基因。

轉染係指宿主細胞接受表現載體，無論任何編碼序列實際上表現與否。一般熟習此項技術者已知許多轉染方法，例如 CaPO_4 沈澱及電穿孔。當宿主細胞內出現此載體運作之任何指示時，一般識別為成功轉染。轉染方法在此項技術中為熟知的，且一些於本文中進一步加以描述。

轉型意謂在生物體中引入DNA以使DNA可複製為染色體外元件或由染色體要素複製。視所使用之宿主細胞，使用適合於該等細胞之標準技術進行轉型。轉型方法在此項技術中為熟知的，且一些於本文中進一步加以描述。

可如 Sambrook 等人，同上文大體所述，培養用於產生抗原之原核生物宿主細胞。

可在多種培養基中培養用於產生抗原之哺乳動物宿主細胞，該等培養基在此項技術中為熟知的，且其中一些於本文中加以描述。

本發明揭示案中所提及之宿主細胞涵蓋活體外培養物中之細胞以及宿主動物內之細胞。

可使用技術公認之方法實現抗原純化，其中一些方法於本文中加以描述。

經純化之抗原可連接於適合基質，諸如用於噬菌體呈現

純系之親和力層析分離的瓊脂糖珠粒、丙烯醯胺珠粒、玻璃珠粒、纖維素、各種丙烯酸系共聚物、羥基甲基丙烯酸酯凝膠、聚丙烯酸系及聚甲基丙烯酸系共聚物、耐綸(nylon)、中性載體及離子載劑及其類似物。抗原蛋白連接至基質可藉由 *Methods in Enzymology*, 第44卷(1976)所述之方法實現。將蛋白質配位體連接至多醣基質(例如瓊脂糖、聚葡萄糖或纖維素)的一種常用技術涉及用鹵化氫活化載體，隨後使肽配位體之一級脂族或芳族胺偶合至該經活化之基質。

或者，可使用抗原塗佈吸附板之孔，使其於附著至吸附板或用於細胞分選之宿主細胞上表現，或結合至生物素以便為經抗生蛋白鏈菌素塗佈之珠粒捕捉，或用於任何其他技術已知方法中淘選噬菌體呈現庫。

使噬菌體庫樣本與經固定之抗原在適合於噬菌體粒子之至少一部分與吸附劑結合的條件下接觸。通常，選擇包括pH值、離子強度、溫度及其類似物之條件來模擬生理條件。洗滌結合至固相之噬菌體，接著用酸溶離，例如，如Barbas等人，*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991)所述，或用鹼金屬溶離，例如，如Marks等人，*J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)所述，或藉由抗原抗原競爭來溶離，例如以與Clackson等人，*Nature*, 352: 624-628 (1991)之抗原競爭法類似之程序。噬菌體可在單輪選擇中增濃20-1,000倍。此外，經增濃之噬菌體可在細菌培養物中培養並再經受數輪選擇。

選擇效率視許多因素而定，包括洗滌期間之解離動力學，及單一噬菌體上之多個抗體片段是否會同時與抗原接合。可使用短時間洗滌、多價噬菌體呈現及抗原於固相中之高塗佈密度來保留具有快解離動力學(及弱結合親和力)之抗體。高密度不僅經由多價相互作用穩定噬菌體，而且亦有利於已解離之噬菌體再結合。藉由使用如 Bass 等人，*Proteins*, 8: 309-314 (1990)及 WO 92/09690 所述之長時間洗滌及單價噬菌體呈現以及如 Marks 等人，*Biotechnol.*, 10: 779-783(1992)所述之低抗原塗佈密度，可有助於選擇具有慢解離動力學(及良好結合親和力)之抗體。

可在對抗原之親和力不同、甚至親和力略有不同的噬菌體抗體之間作出選擇。然而，所選抗體之隨機突變(例如以上述一些親和力成熟技術執行)很可能產生許多突變體，大部分結合至抗原，且少數具有較高親和力。在限制抗原的情況下，極少高親和力噬菌體可競爭勝出。為了保留所有較高親和力突變體，可將噬菌體與過量經生物素標記之抗原一起培育，但經生物素標記之抗原的莫耳濃度低於標靶對抗原之莫耳親和力常數。接著，高親和力結合噬菌體可由經抗生蛋白鏈菌素塗佈之順磁珠粒捕捉。該「平衡捕捉」允許根據抗體之結合親和力來選擇抗體，其敏感度允許親和力僅達兩倍之突變體純系與大量過量之較低親和力之噬菌體分離。亦可控制用於洗滌結合至固相之噬菌體的條件以基於解離動力學加以區分。

可基於活性選擇抗原純系。可藉由以下步驟選擇對應於

該等抗原抗體之Fv純系：自如上所述之噬菌體庫分離抗原純系，且視情況藉由使分離之噬菌體純系群體在適合細菌宿主中生長來擴增該群體；(2)選擇抗原及第二蛋白質，分別需要針對其之阻斷及非阻斷活性；(3)使該抗原結合噬菌體純系吸附至經固定之抗原；(4)使用過量第二蛋白質溶離任何識別與第二蛋白質之結合決定子重疊或共用之抗原結合決定子之不理想純系；及(5)按照步驟(4)溶離仍保持吸附之純系。視情況，可藉由重複本文所述之選擇程序一或多次進一步增濃具有所要阻斷/非阻斷性質之純系。

藉由使用習知程序(例如藉由使用經設計以自融合瘤或噬菌體DNA模板特異性擴增相關重鏈及輕鏈編碼區的寡核苷酸引子)，易於分離並定序編碼本發明之來源於融合瘤之單株抗體或噬菌體呈現Fv純系的DNA。一經分離，即可將DNA置於表現載體中，接著將其轉染至諸如大腸桿菌細胞、猿猴COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞之不另外產生免疫球蛋白之宿主細胞中，以便在重組宿主細胞中合成所要單株抗體。關於編碼抗體之DNA在細菌中之重組表現的綜述文章包括Skerra等人，*Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993)及Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151 (1992)。

編碼本發明Fv純系之DNA可與編碼重鏈及/或輕鏈恆定區之已知DNA序列(例如，適當DNA序列可獲自Kabat等人，同上)組合，形成編碼完全或部分長度重鏈及/或輕鏈之純系。應瞭解，可使用任何同型之恆定區達成此目的，

包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恆定區，且該等恆定區可獲自任何人類或動物物種。自一動物(諸如人類)物種之可變域DNA獲得Fv純系，接著使其融合至另一動物物種之恆定區DNA，形成「雜合體」之編碼序列，如本文所使用之定義「嵌合」及「雜合」抗體中包括全長重鏈及/或輕鏈。在一較佳實施例中，將來源於人類可變DNA之Fv純系融合至人類恆定區DNA，形成所有人類全長或部分長度重鏈及/或輕鏈的編碼序列。

編碼本發明之來源於融合瘤之抗體的DNA亦可經修飾，例如，藉由用人類重鏈及輕鏈恆定域之編碼序列取代來源於融合瘤純系之同源鼠類序列(例如，如在Morrison等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)之方法中)。可藉由使非免疫球蛋白多肽之所有或部分編碼序列共價結合至免疫球蛋白編碼序列來進一步修飾編碼來源於融合瘤或Fv純系之抗體或片段的DNA。以此方式製備具有本發明之來源於Fv純系或融合瘤純系之抗體之結合特異性的「嵌合」或「雜合」抗體。

抗原特異性

本發明適用於具有任何適當抗原結合特異性之抗體。本發明抗體較佳對作為生物學上重要之多肽之抗原具有特異性。本發明抗體更佳適用於治療或診斷哺乳動物之疾病或病症。治療性抗體之非限制性實例包括抗VEGF、抗c-met、抗IgE、抗CD11、抗CD18、抗CD40、抗組織因子(TF)、抗HER2及抗TrkC抗體。亦涵蓋針對非多肽抗原(諸

如腫瘤相關糖脂質抗原)之抗體。

若抗原為多肽，則其可能為跨膜分子(例如受體，諸如受體酪胺酸激酶)或配位體(諸如生長因子)。例示性抗原包括諸如腎素之分子；生長激素，包括人類生長激素及牛生長激素；生長激素釋放因子；副甲狀腺激素；促甲狀腺激素；脂蛋白； α -1-抗胰蛋白酶；胰島素A鏈；胰島素B鏈；胰島素原；促濾泡激素；降鈣素；黃體化激素；升糖素；凝血因子，諸如因子VIII、因子IX、組織因子(TF)及 von Willebrands 因子；抗凝血因子，諸如蛋白質C；心房利尿鈉因子；肺表面活性物質；纖維蛋白溶酶元活化因子，諸如尿激酶或者人類尿或組織類型纖維蛋白溶酶元活化因子(t-PA)；鈣蟾素；凝血酶；造血生長因子；腫瘤壞死因子 α 及腫瘤壞死因子 β ；腦啡肽酶；RANTES(活化後調節正常T細胞表現及分泌因子)；人類巨噬細胞發炎蛋白(MIP-1- α)；血清白蛋白，諸如人血清白蛋白；Muellerian抑制物質；鬆弛素A鏈；鬆弛素B鏈；鬆弛素原；小鼠促性腺激素相關肽；微生物蛋白質，諸如 β -內醯胺酶；DNase；IgE；細胞毒性T-淋巴細胞相關抗原(CTLA)，諸如CTLA-4；抑制素；活化素；血管內皮生長因子(VEGF)；激素或生長因子之受體；蛋白質A或D；類風濕因子；神經營養因子，諸如來源於骨之神經營養因子(BDNF)、神經營養素-3、神經營養素-4、神經營養素-5或神經營養素-6(NT-3、NT-4、NT-5或NT-6)或神經生長因子，諸如NGF- β ；血小板源性生長因子(PDGF)；纖維母細胞生長因子，諸如

aFGF 及 bFGF；表皮生長因子(EGF)；轉型生長因子(TGF)，諸如 TGF- α 及 TGF- β ，包括 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4 或 TGF- β 5；胰島素樣生長因子 I 及 II(IGF-I 及 IGF-II)；des(1-3)-IGF-I(腦 IGF-I)、胰島素樣生長因子結合蛋白質；CD 蛋白質，諸如 CD3、CD4、CD8、CD19、CD20 及 CD40；紅血球生成素；骨生成誘導因子；免疫毒素；骨形態發生蛋白(BMP)；干擾素，諸如干擾素 α 、干擾素 β 及干擾素 γ ；菌落刺激因子(CSF)，例如，M-CSF、GM-CSF 及 G-CSF；介白素(IL)，例如 IL-1 至 IL-10；超氧化物歧化酶；T 細胞受體；表面膜蛋白；衰變加速因子；病毒抗原，諸如一部分 AIDS 包膜；轉運蛋白；歸巢受體；地址素；調節蛋白；整合素，諸如 CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4 及 VCAM；腫瘤相關抗原，諸如 HER2、HER3 或 HER4 受體；及任何上文所列多肽之片段。

針對本發明所涵蓋之抗體的例示性抗原包括 CD 蛋白質，諸如 CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD34 及 CD46；ErbB 受體家族成員，諸如 EGF 受體、HER2、HER3 或 HER4 受體；細胞黏附分子，諸如 LFA-1、Mac1、p150.95、VLA-4、ICAM-1、VCAM、 α 4/ β 7 整合素及 α v/ β 3 整合素，包括其 α 或 β 亞單位(例如抗 CD11a、抗 CD18 或抗 CD11b 抗體)；生長因子，諸如 VEGF；組織因子(TF)；TGF- α 干擾素(α -IFN)；介白素，諸如 IL-8；IgE；血型抗原 Apo2、死亡受體；flk2/flt3 受體；肥胖症(OB)受體；*mpl* 受

體；CTLA-4；蛋白質C等。在一些實施例中，本發明抗體結合(在一些實施例中特異性結合)c-met。

抗體片段

本發明涵蓋抗體片段。在某些情形下，使用抗體片段而非完整抗體具有優勢。片段之粒徑較小允許快速清除，且可改良到達實體腫瘤。

已研發各種技術用於產生抗體片段。此等片段傳統上係經由完整抗體之蛋白水解消化獲得(參看例如 Morimoto 等人，Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992)；及 Brennan 等人，Science, 229: 81 (1985))。然而，現可直接藉由重組宿主細胞產生此等片段。Fab、Fv及ScFv抗體片段均可表現於大腸桿菌中並由其分泌，因而易於產生大量此等片段。可自上文所論述之抗體噬菌體庫分離抗體片段。或者，可直接自大腸桿菌回收Fab'-SH片段且進行化學偶合，形成F(ab')₂片段(Carter等人，Bio/Technology 10: 163-167 (1992))。根據另一方法，可直接自重組宿主細胞培養物分離F(ab')₂片段。包含救助受體結合抗原決定基殘基之活體內半衰期延長之Fab及F(ab')₂片段描述於美國專利第5,869,046號中。產生抗體片段之其他技術對熟習此項技術者而言將顯而易見。在其他實施例中，首選抗體為單鏈Fv片段(scFv)(參看例如 WO 93/16185；美國專利第5,571,894號及第5,587,458號)。Fv及sFv為具有缺乏恆定區之完整組合位點之僅有物質；因而，其適用於在活體內使用期間減少非特異性結合。可構

築 sFv 融合蛋白以便在 sFv 之胺基或羧基末端產生效應蛋白之融合體。參看 Antibody Engineering, Borrebaeck 編，同上。抗體片段亦可為「線抗體」，例如如美國專利第 5,641,870 號中所述。該等線抗體片段可具單特異性或雙特異性。

因此，在一些實施例中，抗 c-met 抗體為包含 Fc 區之單臂抗體(亦即，重鏈可變域及輕鏈可變域形成單一抗原結合臂)，其中該 Fc 區包含第一 Fc 多肽及第二 Fc 多肽，其中該第一 Fc 多肽及該第二 Fc 多肽以複合物形式存在且形成的 Fc 區可以使該抗體片段之穩定性比包含該抗原結合臂之 Fab 分子提高。本文中進一步描述單臂抗體。

人類化抗體

本發明涵蓋人類化抗體。此項技術中已知使非人類抗體人類化的各種方法。舉例而言，人類化抗體可具有一或多個來自非人類來源之胺基酸殘基引入其中。此等非人類胺基酸殘基通常稱為「輸入」殘基，其通常取自「輸入」可變域。可基本上按照 Winter 及同事之方法(Jones 等人(1986) *Nature* 321: 522-525; Riechmann 等人(1988) *Nature* 332: 323-327; Verhoeyen 等人(1988) *Science* 239: 1534-1536)，藉由用高變區序列取代人類抗體之相應序列來執行人類化。因此，該等「人類化」抗體為嵌合抗體(美國專利第 4,816,567 號)，其中實質上小於完整之人類可變域已被來自非人類物種之相應序列取代。操作上，人類化抗體通常為人類抗體中一些高變區殘基且可能一些 FR 殘基已被來自

齧齒動物抗體之類似位點之殘基取代。

用於產生人類化抗體之人類可變域(輕鏈及重鏈)的選擇對降低抗原性非常重要。根據所謂「最佳匹配」方法，針對已知人類可變域序列之整個集合庫篩選齧齒動物抗體之可變域序列。接著，將最接近齧齒動物序列之人類序列用作人類化抗體之人類構架(Sims等人(1993) *J. Immunol.* 151: 2296; Chothia等人(1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901)。另一方法使用來源於具有特定亞群之輕鏈或重鏈之所有人類抗體之共同序列的特定構架。同一構架可用於若干不同人類化抗體(Carter等人(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285; Presta等人(1993) *J. Immunol.*, 151: 2623)。

使抗體在保留對抗原之高親和力及其他有利生物性質的情況下人類化更重要。為達成此目標，根據一種方法，藉由使用親本序列及人類化序列之三維模型分析親本序列及各種概念上之人類化產物的方法來製備人類化抗體。三維免疫球蛋白模型通常可利用且為熟習此項技術者所熟知。可利用說明及呈現所選候選免疫球蛋白序列之可能三維構型結構的電腦程式。檢視此等呈現允許分析殘基在候選免疫球蛋白序列發揮功能中之可能作用，亦即，分析影響候選免疫球蛋白結合其抗原之能力的殘基。以此方式，可自受者及輸入序列選擇FR殘基且加以組合，以便達成所要抗體特徵，諸如對靶抗原之親和力增加。一般而言，高變區殘基直接且最實質性地牽涉於影響抗原結合中。

人類抗體

可藉由組合選自來源於人類之噬菌體呈現庫的Fv純系可變域序列與如上所述之已知人類恆定域序列來構築本發明之人類抗體。或者，可藉由融合瘤法產生本發明之人類單株抗體。例如，Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984)；Brodeur等人，*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；及Boerner等人，*J. Immunol.*, 147: 86 (1991)已描述用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤細胞株及小鼠-人類雜骨髓瘤細胞株。

現在可產生能夠在免疫後在不產生內源性免疫球蛋白之情況下產生完整人類抗體譜系的轉殖基因動物(例如，小鼠)。舉例而言，已描述嵌合及生殖系突變小鼠中之抗體重鏈結合區(JH)基因之同型接合子缺失完全抑制內源抗體產生。將人類生殖系免疫球蛋白基因陣列轉移至該等生殖系突變小鼠中將在抗原激發後產生人類抗體。參看例如Jakobovits等人，*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90: 2551 (1993)；Jakobovits等人，*Nature*, 362: 255 (1993)；Bruggermann等人，*Year in Immunol.*, 7: 33 (1993)。

亦可使用基因改組自非人類(例如齧齒動物)抗體獲得人類抗體，其中該人類抗體之親和力及特異性與起始非人類抗體相似。根據此亦稱為「抗原決定基印記」的方法，用人類V域基因譜系置換藉由如上所述之噬菌體呈現技術獲得之非人類抗體片段之重鏈或輕鏈可變區，產生非人類鏈/人類鏈scFv或Fab嵌合體群體。用抗原選擇使非人類鏈/人

類鏈嵌合 scFv 或 Fab 分離，其中人類鏈恢復在移除初級噬菌體呈現純系中之相應非人類鏈後遭破壞之抗原結合位點，亦即，抗原決定基控制(印製)人類鏈搭配物之選擇。當重複該過程以替換剩餘非人類鏈時，獲得人類抗體(參看 1993 年 4 月 1 日公開之 PCT WO 93/06213)。不同於藉由 CDR 接枝進行之傳統非人類抗體人類化，此技術提供完全人類抗體，其不具有非人類起源之 FR 或 CDR 殘基。

雙特異性抗體

雙特異性抗體為對至少兩個不同抗原具有結合特異性的單株抗體，較佳為人類抗體或人類化抗體。在本發明情況下，一結合特異性係針對抗原而另一結合特異性係針對任何另一抗原。例示性雙特異性抗體可結合至抗原之兩個不同抗原決定基。亦可使用雙特異性抗體將細胞毒性劑定位於表現抗原之細胞中。此等抗體具有抗原結合臂及結合細胞毒性劑(例如沙泊寧(saporin)、抗干擾素- α 、長春花生物鹼、蓖麻毒素 A 鏈、甲胺喋呤或放射性同位素半抗原)之臂。雙特異性抗體可製備成全長抗體或抗體片段(例如 $F(ab')_2$ 雙特異性抗體)。

此項技術已知產生雙特異性抗體之方法。傳統上，雙特異性抗體之重組產生係基於兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對的共表現，其中兩個重鏈具有不同特異性(Milstein 及 Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983))。由於免疫球蛋白重鏈及輕鏈隨機組合，此等融合瘤(四融合瘤(quadromas))產生 10 種不同抗體分子之可能混合物，其中僅一種具有正確雙特

異性結構。通常藉由親和層析步驟進行之正確分子之純化相當繁瑣，且產物產率低。類似程序揭示於1993年5月13日公開之WO 93/08829及Traunecker等人，*EMBO J.*, 10: 3655 (1991)中。

根據一不同且更佳之方法，使具有所要結合特異性之抗體可變域(抗體-抗原組合位點)融合至免疫球蛋白恆定域序列。較佳與包含至少部分鉸鏈、CH2及CH3區之免疫球蛋白重鏈恆定域融合。較佳在至少一種融合體中存在第一重鏈恆定區(CH1)，該恆定區含有輕鏈結合所必需之位點。將編碼免疫球蛋白重鏈融合體及必要時編碼免疫球蛋白輕鏈之DNA插入各別表現載體中，且共轉染於適合宿主生物體中。此為在構築過程中所使用之不相等比率之3條多肽鏈獲得最佳產率的實施例中調整3個多肽片段之相互比例提供較高靈活性。然而，當至少兩條比率相等之多肽鏈之表現產生高產率時或當比率不特別重要時，可將兩條或所有三條多肽鏈之編碼序列插入一表現載體中。

在此方法之較佳實施例中，雙特異性抗體在一個臂中包含具有第一結合特異性之雜合免疫球蛋白重鏈而在另一臂中包含雜合免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(提供第二結合特異性)。已發現此不對稱結構有利於將所要雙特異性化合物與不合需要之免疫球蛋白鏈組合分離，因為僅一半雙特異性分子中存在免疫球蛋白輕鏈提供容易的分離方法。此方法揭示於WO 94/04690中。關於產生雙特異性抗體之其他細節，參看例如Suresh等人，*Methods in Enzymology*, 121:

210 (1986)。

根據另一方法，可將一對抗體分子之間的界面工程改造以使自重組細胞培養物回收之異源二聚體的百分比最大。較佳界面包含抗體恆定域之CH₃域之至少一部分。在此方法中，用較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)(杵或突出物)替代來自第一抗體分子之界面的一或多個小胺基酸側鏈。藉由用較小側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)替代大胺基酸側鏈在第二抗體分子之界面上產生尺寸與大側鏈相同或相似之互補「空穴」(臼)。此舉提供使異源二聚體之產率增加超過諸如同源二聚體之不合需要之最終產物的機制。本文中進一步描述杵及臼。

雙特異性抗體包括交聯或「異源結合」抗體。舉例而言，異源結合物中之一個抗體可偶合至抗生物素蛋白，另一個抗體偶合至生物素。例如已提出該等抗體使免疫系統細胞靶向不合需要之細胞(美國專利第4,676,980號)，且用於治療HIV感染(WO 91/00360、WO 92/00373及EP 03089)。可使用任何適宜交聯方法產生異源接合抗體。適合交聯劑以及許多交聯技術在此項技術中為熟知的且揭示於美國專利第4,676,980號中。

文獻中亦已描述由抗體片段產生雙特異性抗體之技術。舉例而言，可使用化學鍵製備雙特異性抗體。Brennan等人，*Science*, 229: 81(1985)描述使完整抗體蛋白水解裂解以產生F(ab')₂片段的程序。使此等片段在二硫醇錯合劑亞砷酸鈉存在下還原以穩定鄰位二硫醇基且阻止分子間二硫

鍵形成。接著，使所產生之Fab'片段轉化為硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。接著，藉由用巯基乙胺還原使一種Fab'-TNB衍生物再轉化為Fab'-硫醇，且將其與等莫耳量之另一Fab'-TNB衍生物混合，形成雙特異性抗體。所產生之雙特異性抗體可用作選擇性固定酶之試劑。

最近進展推動直接自大腸桿菌回收Fab'-SH片段，可使該等片段化學偶合以形成雙特異性抗體。Shalaby等人，*J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)描述完全人類化雙特異性抗體F(ab')₂分子之產生。各Fab'片段分別由大腸桿菌分泌且在活體外進行定向化學偶合以形成雙特異性抗體。所形成之雙特異性抗體能夠與過度表現HER2受體之細胞及正常人類T細胞結合，以及觸發人類細胞毒性淋巴細胞對人類乳房腫瘤標靶之溶解活性。

亦已描述各種直接自重組細胞培養物製備及分離雙特異性抗體片段的技術。舉例而言，使用白胺酸拉鏈產生雙特異性抗體。Kostelny等人，*J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)。藉由基因融合使Fos蛋白及Jun蛋白之白胺酸拉鏈肽連接於兩個不同抗體之Fab'部分。使抗體同源二聚體在鉸鏈區還原以形成單體，接著再氧化以形成抗體異源二聚體。亦可利用此方法產生抗體同源二聚體。Hollinger等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993)所描述之「雙功能抗體」技術已提供產生雙特異性抗體片段之替代機制。該等片段包含經由連接子連接之輕鏈可變域(VL)與重鏈可變域(VH)，該連接子過短而不能使同一鏈上

之兩個域配對。因此，一片段之VH域及VL域被迫與另一片段之互補VL域及VH域配對，從而形成兩個抗原結合位點。亦已報導利用單鏈Fv(sFv)二聚體製備雙特異性抗體片段之另一策略。參看Gruber等人，*J. Immunol.*, 152:5368 (1994)。

涵蓋具有超過兩價之抗體。舉例而言，可製備三特異性抗體。Tutt等人*J. Immunol.* 147: 60 (1991)。

多價抗體

多價抗體可比二價抗體更快地由表現該抗體所結合之抗原的細胞內化(及/或分解代謝)。本發明抗體可為具有三個或三個以上抗原結合位點的多價抗體(除IgM類以外)(例如四價抗體)，其可容易地藉由重組表現編碼該抗體之多肽鏈之核酸而產生。多價抗體可包含二聚域及三個或三個以上抗原結合位點。較佳二聚域包含Fc區或鉸鏈區(或由Fc區或鉸鏈區組成)。在此情形下，抗體將包含Fc區，及Fc區胺基末端之三個或三個以上抗原結合位點。本文之較佳多價抗體包含三至約八個、但較佳四個抗原結合位點，或由該等抗原結合位點組成。多價抗體包含至少一條多肽鏈(且較佳兩條多肽鏈)，其中該(等)多肽鏈包含兩個或兩個以上可變域。舉例而言，多肽鏈可包含VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc，其中VD1為第一可變域，VD2為第二可變域，Fc為Fc區之一條多肽鏈，X1及X2表示胺基酸或多肽，且n為0或1。舉例而言，多肽鏈可包含：VH-CH1-可撓性連接子-VH-CH1-Fc區鏈；或VH-CH1-VH-CH1-Fc區鏈。本文之

多價抗體較佳進一步包含至少兩個(且較佳四個)輕鏈可變域多肽。本文之多價抗體可例如包含約兩個至約八個輕鏈可變域多肽。本文所涵蓋之輕鏈可變域多肽包含輕鏈可變域，且視情況進一步包含CL域。

抗體變異體

在一些實施例中，涵蓋本文所述之抗體之胺基酸序列修飾。舉例而言，可能需要改良抗體之結合親和力及/或其他生物性質。藉由在抗體核酸中引入適當核苷酸變化或藉由肽合成來製備抗體之胺基酸序列變異體。該等修飾包括例如抗體胺基酸序列內之殘基缺失及/或插入及/或取代。可進行缺失、插入及取代之任何組合以獲得最終構築體，其限制條件為最終構築體具有所要特徵。可在製備個體抗體胺基酸序列時在該序列中引入胺基酸變化。

鑑別抗體中作為較佳突變誘發位置之某些殘基或區域的適用方法稱為「丙胺酸掃描突變誘發」，如Cunningham及Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所述。此處，鑑別殘基或靶殘基群(例如，帶電殘基，諸如arg、asp、his、lys及glu)且用中性或帶負電胺基酸(最佳為丙胺酸或聚丙胺酸)置換以影響胺基酸與抗原之相互作用。接著，藉由在取代位點處或針對取代位點引入進一步或其他變異體來改進對取代顯示功能敏感性的彼等胺基酸位置。因此，雖然引入胺基酸序列變化之位點經預定，但突變本身之性質不必預定。舉例而言，為分析指定位點處之突變效能，在靶密碼子或靶區域進行丙胺酸掃描或隨機突變誘發，並針對

所要活性篩選所表現之免疫球蛋白。

胺基酸序列插入包括長度在1個殘基至含有100個或100以上殘基之多肽範圍內的胺基及/或羧基末端融合以及單一或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有N-末端甲硫胺醯基殘基之抗體或與細胞毒性多肽融合之抗體。抗體分子之其他插入變異體包括抗體之N-末端或C-末端融合至酶(例如，對於ADEPT而言)或延長抗體之血清半衰期的多肽。

多肽之醣基化通常為N-連接或O-連接。N-連接係指碳水化合物部分連接至天冬醯胺殘基之側鏈。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-蘇胺酸(其中X為除脯胺酸以外之任何胺基酸)為碳水化合物部分與天冬醯胺側鏈酶連接之識別序列。因此，多肽中存在此等三肽序列中之任一者均產生潛在醣基化位點。O-連接醣基化係指糖N-乙醯基半乳糖、半乳糖或木糖中之一者連接至羥基胺基酸(最常見為絲胺酸或蘇胺酸)，但亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸。

抗體中添加醣基化位點宜藉由改變胺基酸序列以使其含有一或多種上述三肽序列來實現(就N-連接醣基化位點而言)。該變化亦可藉由在原始抗體序列中添加一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基或用一或多處絲胺酸或蘇胺酸殘基取代來實現(就O-連接醣基化位點而言)。

若抗體包含Fc區，則可改變其所連接之碳水化合物。舉例而言，具有缺乏連接於抗體Fc區之海藻糖之成熟碳水化

合物結構的抗體描述於美國專利申請案第2003/0157108號 (Presta, L.) 中。亦參看 US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。Jean-Mairet 等人之 WO 2003/011878 及 Umana 等人之美國專利第6,602,684號中提及在連接於抗體 Fc區之碳水化合物中具有等分N-乙酰基葡糖胺 (GlcNAc) 之抗體。在連接於抗體 Fc區之寡糖中具有至少一個半乳糖殘基之抗體報導於 Patel 等人之 WO 1997/30087 中。亦參看 WO 1998/58964 (Raju, S.) 及 WO 1999/22764 (Raju, S.)，其關於 Fc區連接有經改變碳水化合物的抗體。關於具有經修飾之糖基化的抗原結合分子，亦參看 US 2005/0123546 (Umana 等人)。

本文之較佳糖基化變異體包含 Fc區，其中連接於 Fc區之碳水化合物結構缺乏海藻糖。該等變異體具有改良之 ADCC 功能。Fc區視情況進一步包含一或多處胺基酸取代，該等取代進一步改良 ADCC，例如，處於 Fc區之位置 298、333 及 / 或 334 之取代 (殘基之 Eu 編號)。與「脫海藻糖基化」抗體或「缺乏海藻糖」之抗體相關之公開案的實例包括：US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO2005/053742；Okazaki 等人 *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki 等人 *Biotech. Bioeng.* 87: 614

(2004)。產生脫海藻糖基化抗體之細胞株的實例包括缺乏蛋白質海藻糖基化之 Lec13 CHO 細胞 (Ripka 等人 *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)；美國專利申請案第 US 2003/0157108 A1 號，Presta, L；及 WO 2004/056312 A1, Adams 等人，尤其實例 11)，及敲除細胞株，諸如 α -1,6-海藻糖基轉移酶基因 FUT8 敲除 CHO 細胞 (Yamane-Ohnuki 等人 *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004))。

在一態樣中，本發明提供一種抗體片段，其包含至少一個促進該抗體片段內之 Fc 序列異源二聚同時使同源二聚減至最少的特徵。該(等)特徵改良可藉由如本文所述之本發明方法獲得之免疫球蛋白群體的產率及/或純度及/或均質性。在一實施例中，第一 Fc 多肽及第二 Fc 多肽在界面處接合/相互作用。在第一 Fc 多肽與第二 Fc 多肽於界面處接合的一些實施例中，第二 Fc 多肽(序列)之界面包含突出物(亦稱為「杵」)，其可位於第一 Fc 多肽(序列)之界面中的空穴(亦稱為「臼」)中。在一實施例中，第一 Fc 多肽已相對於模板/原始多肽發生改變以便編碼空穴，或第二 Fc 多肽已相對於模板/原始多肽發生改變以編碼突出物，或兩種情況均存在。在一實施例中，第一 Fc 多肽已相對於模板/原始多肽發生改變以編碼空穴，且第二 Fc 多肽已相對於模板/原始多肽發生改變以編碼突出物。在一實施例中，第二 Fc 多肽之界面包含突出物，其可位於第一 Fc 多肽之界面中的空穴中，其中該空穴或突出物或兩者已分別引入第一 Fc 多肽及第二 Fc 多肽之界面中。在第一 Fc 多肽與第二 Fc 多肽於

界面處接合的一些實施例中，第一Fc多肽(序列)之界面包含突出物，其可位於第二Fc多肽(序列)之界面中的空穴中。在一實施例中，第二Fc多肽已相對於模板/原始多肽發生改變以編碼空穴，或第一Fc多肽已相對於模板/原始多肽發生改變以編碼突出物，或兩種情況均存在。在一實施例中，第二Fc多肽已相對於模板/原始多肽發生改變以編碼空穴，且第一Fc多肽已相對於模板/原始多肽發生改變以編碼突出物。在一實施例中，第一Fc多肽之界面包含突出物，其可位於第二Fc多肽之界面中的空穴中，其中該突出物或空穴或兩者已分別引入第一Fc多肽及第二Fc多肽之界面中。

在一實施例中，突出物及空穴各包含天然存在之胺基酸殘基。在一實施例中，包含突出物之Fc多肽係藉由用側鏈體積比原始殘基大的輸入殘基置換來自模板/原始多肽界面之原始殘基而產生。在一實施例中，包含突出物之Fc多肽係藉由包含以下步驟之方法產生：用編碼側鏈體積比原始殘基大的輸入殘基的聚核苷酸置換編碼來自該多肽界面之原始殘基的聚核苷酸。在一實施例中，原始殘基為蘇胺酸。在一實施例中，原始殘基為T366。在一實施例中，輸入殘基為精胺酸(R)。在一實施例中，輸入殘基為苯丙胺酸(F)。在一實施例中，輸入殘基為酪胺酸(Y)。在一實施例中，輸入殘基為色胺酸(W)。在一實施例中，輸入殘基為R、F、Y或W。在一實施例中，突出物係藉由置換模板/原始多肽中之兩個或兩個以上殘基而產生。在一實施例

中，包含突出物之Fc多肽包含用色胺酸置換位置366處之蘇胺酸，胺基酸編號係根據Kabat等人之EU編號方案(第688-696頁，Sequences of proteins of immunological interest, 第5版，第1卷(1991；NIH, Bethesda, MD))。

在一些實施例中，包含空穴之Fc多肽係藉由用側鏈體積比原始殘基小的輸入殘基置換模板/原始多肽界面中之原始殘基而產生。舉例而言，包含空穴之Fc多肽可藉由包含以下步驟之方法產生：用編碼側鏈體積比原始殘基小的輸入殘基的聚核苷酸置換編碼來自該多肽界面之原始殘基的聚核苷酸。在一實施例中，原始殘基為蘇胺酸。在一實施例中，原始殘基為白胺酸。在一實施例中，原始殘基為酪胺酸。在一實施例中，輸入殘基不為半胱胺酸(C)。在一實施例中，輸入殘基為丙胺酸(A)。在一實施例中，輸入殘基為絲胺酸(S)。在一實施例中，輸入殘基為蘇胺酸(T)。在一實施例中，輸入殘基為纈胺酸(V)。可藉由置換模板/原始多肽之一或多個原始殘基來產生空穴。舉例而言，在一實施例中，包含空穴之Fc多肽包含置換選自由蘇胺酸、白胺酸及酪胺酸組成之群的兩個或兩個以上原始胺基酸。在一實施例中，包含空穴之Fc多肽包含兩個或兩個以上選自由丙胺酸、絲胺酸、蘇胺酸及纈胺酸組成之群的輸入殘基。在一些實施例中，包含空穴之Fc多肽包含置換選自由蘇胺酸、白胺酸及酪胺酸組成之群的兩個或兩個以上原始胺基酸，且其中該等原始胺基酸係用選自由丙胺酸、絲胺酸、蘇胺酸及纈胺酸組成之群的輸入殘基置換。

在一些實施例中，經置換之原始胺基酸為T366、L368及/或Y407。在一實施例中，包含空穴之Fc多肽包含用絲胺酸置換位置366處之蘇胺酸，胺基酸編號係根據Kabat等人(同上)之EU編號方案。在一實施例中，包含空穴之Fc多肽包含用丙胺酸置換位置368處之白胺酸，胺基酸編號係根據Kabat等人(同上)之EU編號方案。在一實施例中，包含空穴之Fc多肽包含用纈胺酸置換位置407處之酪胺酸，胺基酸編號係根據Kabat等人(同上)之EU編號方案。在一實施例中，包含空穴之Fc多肽包含選自由T366S、L368A及Y407V組成之群的兩個或兩個以上胺基酸置換，胺基酸編號係根據Kabat等人(同上)之EU編號方案。在此等抗體片段之一些實施例中，包含突出物之Fc多肽包含用色胺酸置換位置366處之蘇胺酸，胺基酸編號係根據Kabat等人(同上)之EU編號方案。

在一實施例中，抗體包含如WO2005/063816中所述構成「杵」及「白」之Fc突變。舉例而言，Fc多肽中之白狀突變可為T366A、L368A及/或Y407V中之一或多者，且杵狀突變可為T366W。

另一類型之變異體為胺基酸取代變異體。此等變異體在抗體分子中有至少一個胺基酸(至少兩個、至少三個、至少四個或四個以上)殘基經不同殘基置換。最受關注之取代突變誘發位點包括高變區，但亦涵蓋FR變化。表A中「較佳取代」標題下顯示保守性取代。若該等取代引起生物活性變化，則可引入更實質性之變化，在表A中命名為

「例示性取代」或如下文關於胺基酸類別進一步描述，並篩選產物。

表 A

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

抗體生物性質之實質性修飾係藉由選擇對維持以下各者之作用顯著不同之取代來實現：(a)取代區域內多肽骨架的

結構，例如呈片狀構形或螺旋構形；(b)靶位點處分子的電荷或疏水性；或(c)側鏈之大小。可基於常見側鏈性質將天然存在之殘基分為以下各組：

- (1) 疏水性殘基：正白胺酸、met、ala、val、leu、ile；
- (2) 中性親水性殘基：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性殘基：asp、glu；
- (4) 鹼性殘基：his、lys、arg；
- (5) 影響鏈取向之殘基：gly、pro；及
- (6) 芳族殘基：trp、tyr、phe。

非保守性取代將需要將此等類別中之一者之成員換成另一類別。

一類取代變異體涉及取代親本抗體(例如人類化抗體或人類抗體)之一或多個高變區殘基。一般而言，選擇用於進一步開發之所產生變異體相對於產生其之親本抗體將具有改良之生物性質。產生該等取代變異體之適宜方法涉及使用噬菌體呈現進行親和力成熟。簡言之，使若干高變區位點(例如6-7個位點)突變以在各位點處產生所有可能之胺基酸取代。由此產生之抗體由絲狀噬菌體粒子呈現為與封裝於各粒子內之M13之基因III產物的融合體。接著，如本文中所揭示針對生物活性(例如結合親和力)篩選噬菌體呈現之變異體。為了鑑別供修飾之候選高變區位點，可執行丙胺酸掃描突變誘發以鑑別顯著達成抗原結合之高變區殘

基。其他或另外，分析抗原-抗體複合物之晶體結構以鑑別抗體與抗原之間的接觸點可能有益。根據本文中詳細描述之技術，該等接觸殘基及相鄰殘基為取代候選物。一旦產生該等變異體，即可如本文所述對該組變異體進行篩選，且可在一或多個相關檢定中選擇具有優良性質之抗體以作進一步開發。

編碼抗體之胺基酸序列變異體的核酸分子係藉由此項技術已知之多種方法製備。此等方法包括但不限於自天然源分離(在天然存在之胺基酸序列變異體情況下)，或藉由對早期製備之抗體變異體或非變異型式進行寡核苷酸介導(或定位)之突變誘發、PCR突變誘發及匣式突變誘發來製備。

可能需要在本發明免疫球蛋白多肽之Fc區中引入一或多處胺基酸修飾，從而產生Fc區變異體。Fc區變異體可包含在一或多個胺基酸位置(包括鉸鏈半胱胺酸位置)包含胺基酸修飾(例如取代)的人類Fc區序列(例如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)。

根據此描述及此項技術之教示，預期在一些實施例中，本發明方法中所用之抗體與野生型對應抗體相比可包含一或多處改變，例如在Fc區中。但此等抗體仍保留與其野生型對應物相比實質上相同之治療應用所需特徵。舉例而言，認為可在Fc區中建立會改變(亦即改良或減弱)C1q結合及/或補體依賴細胞毒性(CDC)之某些改變，例如，如WO 99/51642所述。亦參看 Duncan 及 Winter *Nature*

322:738-40 (1988)；美國專利第5,648,260號；美國專利第5,624,821號；及WO 94/29351關於Fc區變異體之其他實例。WO 00/42072(Presta)及WO 2004/056312(Lowman)描述與FcR之結合經改良或減弱的抗體變異體。此等專利公開案之內容特別以引用的方式併入本文中。亦參看Shields等人 *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)。US2005/0014934A1(Hinton等人)中描述半衰期延長且與新生兒Fc受體(FcRn)之結合改良的抗體，新生兒Fc受體負責將母本IgG轉移至胎兒(Guyer等人，*J. Immunol.* 117:587 (1976)及Kim等人，*J. Immunol.* 24:249 (1994))。此等抗體包含具有一或多處可改良Fc區與FcRn之結合之取代的Fc區。Fc區胺基酸序列改變且C1q結合能力增加或降低的多肽變異體描述於美國專利第6,194,551B1號、WO 99/51642中。該等專利公開案之內容特別以引用的方式併入本文中。亦參看Idusogie等人，*J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)。

抗體衍生物

本發明抗體可經進一步修飾以含有此項技術中已知且易於獲得之其他非蛋白部分。適合於衍生化抗體之部分較佳為水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括但不限於聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、聚葡萄糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧雜環戊烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)，及聚葡萄糖或聚(n-乙基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化

乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛可能因其在水中之穩定性而在製造中具有優勢。聚合物可具有任何分子量，且可為分枝狀或非分枝狀。連接至抗體之聚合物數目可變化，且若連接超過一種聚合物，則其可為相同或不同分子。一般而言，可基於包括但不限於以下之考慮確定用於衍生化之聚合物數目及/或類型：有待改良之抗體的特定性質或功能，抗體衍生物是否將用於規定條件下之療法中等。

篩選具有所要性質之抗體

可藉由此項技術中已知之各種檢定(其中一些揭示於本文中)針對抗體之物理/化學性質及生物功能來表徵本發明抗體。舉例而言，該等抗體可藉由一系列檢定來進一步表徵，該等檢定包括但不限於N-末端定序、胺基酸分析、非變性尺寸排除高壓液相層析(HPLC)、質譜、離子交換層析及木瓜蛋白酶消化。

在本發明之某些實施例中，分析本文中所產生之抗體的生物活性。在一些實施例中，測試本發明抗體之抗原結合活性。此項技術中已知且可用於本文之抗原結合檢定包括但不限於使用諸如西方墨點法、放射免疫檢定、ELISA(酶聯免疫吸附檢定)、「夾層」免疫檢定、免疫沈澱檢定、螢光免疫檢定及蛋白質A免疫檢定之技術的任何直接或競爭性結合檢定。下文在實例部分中提供說明性檢定。

載體、宿主細胞及重組方法

為了重組產生異源多肽(例如抗體)，分離其編碼核酸並

插入可複製載體中以供進一步選殖(擴增DNA)或表現。使用習知程序(例如藉由使用能夠特異性結合至編碼抗體重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)容易地分離編碼該多肽之DNA並進行定序。可利用多種載體。載體之選擇部分取決於所使用之宿主細胞。一般而言，較佳宿主細胞來源於原核生物。應瞭解，可使用任何同型之恆定區達成此目的，包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恆定區，且該等恆定區可獲自任何人類或動物物種。

a. 使用原核生物宿主細胞產生抗體：

i. 構築載體

可使用標準重組技術獲得編碼本發明多肽(例如抗體)之多肽組分的聚核苷酸序列。可自諸如融合瘤細胞之抗體產生細胞分離所要聚核苷酸序列並進行定序。或者，可使用核苷酸合成儀或PCR技術合成聚核苷酸。一旦獲得編碼多肽之序列，即可將其插入能夠在原核生物宿主中複製並表現異源聚核苷酸的重組載體中。此項技術中可用且已知之許多載體可用於本發明之目的。適當載體之選擇主要將取決於欲插入載體中之核酸的尺寸及欲用該載體轉型之特定宿主細胞。各載體含有各種組分，視其功能(擴增或表現異源聚核苷酸，或兩者)及其與其所駐留之特定宿主細胞的相容性而定。載體組分一般包括但不限於複製起點、選擇標記基因、啟動子、核糖體結合位點(RBS)、信號序列、異源核酸插入物及轉錄終止序列。

一般而言，與此等宿主關聯使用含有源自與該宿主細胞

相容之物種之複製子及控制序列的質體載體。載體一般帶有複製位點，以及能夠在轉型細胞中提供表型選擇之標記序列。舉例而言，通常使用源自大腸桿菌物種之質體 pBR322 轉型大腸桿菌。pBR322 含有編碼安比西林 (ampicillin, Amp) 及四環素 (tetracycline, Tet) 抗性之基因，且因而提供易於鑑別轉型細胞之方式。pBR322、其衍生物或其他微生物質體或噬菌體亦可含有或經修飾以含有可由微生物使用以表現內源性蛋白質的啟動子。用於表現特定抗體之 pBR322 衍生物之實例詳細描述於 Carter 等人之美國專利第 5,648,237 號中。

另外，含有與宿主微生物相容之複製子及控制序列的噬菌體載體可用作與此等宿主關聯之轉型載體。舉例而言，諸如 λ GEM.TM.-11 之噬菌體可用於製造重組載體，該重組載體可用於轉型諸如大腸桿菌 LE392 之敏感宿主細胞。

本發明之表現載體可包含兩個或兩個以上編碼各多肽組分之啟動子-順反子對。啟動子為位於調節其表現之順反子上游 (5') 的未轉譯調節序列。原核生物啟動子通常分成兩種類型，誘導性及組成性。誘導性啟動子為引發在其控制下順反子轉錄量回應於培養條件之變化 (例如是否存在營養素，或溫度變化) 而增加的啟動子。

熟知許多可由各種潛在宿主細胞識別之啟動子。可藉由經由限制酶消化自源 DNA 移除啟動子並將經分離啟動子序列插入本發明載體中來使所選啟動子以操作方式連接於編碼輕鏈或重鏈之順反子 DNA。原生啟動子序列及許多異源

啟動子均可用於直接擴增及/或表現靶基因。在一些實施例中，利用異源啟動子，因為與原生靶多肽啟動子相比，其一般允許所表現靶基因之轉錄程度更高且產率更高。

適合為原核生物宿主使用之啟動子包括PhoA啟動子、 β -內醯胺酶及乳糖啟動子系統、色胺酸(trp)啟動子系統及雜合啟動子，諸如tac或trc啟動子。然而，在細菌中具功能性之其他啟動子(諸如其他已知細菌或噬菌體啟動子)亦適合。已公開其核苷酸序列，從而使得熟習此項技術者能夠使用連接子或接附子將其與編碼靶輕鏈及重鏈之順反子連接(Siebenlist等人, (1980) Cell 20: 269)以供應任何所需限制位點。

在本發明之一態樣中，重組載體內之各順反子包含指導所表現多肽通過膜移位的分泌信號序列組分。一般而言，信號序列可為載體之組分，或可為插入載體中之靶多肽DNA的一部分。出於本發明目的選擇之信號序列應為由宿主細胞識別並加工(亦即，由信號肽酶裂解)的信號序列。對於不識別並加工異源多肽之原生信號序列的原核生物宿主細胞，信號序列經選自例如本發明之信號多肽的原核生物信號序列取代。另外，載體可包含選自由鹼性磷酸酶、青黴素酶、Lpp或熱穩定腸毒素II(STII)前導序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA及MBP組成之群的信號序列。

在本發明之一態樣中，一或多個聚核苷酸(例如表現載體)共同編碼單臂抗體。在一實施例中，單一聚核苷酸編碼(a)該單臂抗體之輕鏈及重鏈組分及(b)Fc多肽。在一實

施例中，單一聚核苷酸編碼該單臂抗體之輕鏈及重鏈組分，且獨立聚核苷酸編碼Fc多肽。在一實施例中，獨立聚核苷酸分別編碼該單臂抗體之輕鏈組分、該單臂抗體之重鏈組分及Fc多肽。單臂抗體之產生描述於例如WO2005063816中。

適合表現本發明抗體之原核生物宿主細胞包括古細菌 (Archaeobacteria) 及真細菌 (Eubacteria)，諸如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物體。適用細菌之實例包括埃希氏菌屬 (*Escherichia*) (例如大腸桿菌)、芽胞桿菌屬 (*Bacilli*) (例如枯草桿菌、腸細菌屬 (*Enterobacteria*)、假單胞桿菌屬 (*Pseudomonas species*) (例如綠膿桿菌 (*P. aeruginosa*))、鼠傷寒沙門菌 (*Salmonella typhimurium*)、黏質沙雷菌 (*Serratia marcescans*)、克雷伯氏菌屬 (*Klebsiella*)、變形桿菌屬 (*Proteus*)、志賀氏菌屬 (*Shigella*)、根瘤菌屬 (*Rhizobia*)、透明顫菌屬 (*Vitreoscilla*) 或副球菌屬 (*Paracoccus*)。在一實施例中，使用革蘭氏陰性細胞。在一實施例中，大腸桿菌細胞用作本發明之宿主。大腸桿菌菌株之實例包括菌株 W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, 第2卷 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 第1190-1219頁；ATCC 寄存號 27,325) 及其衍生物，包括具有基因型 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR 之菌株 33D3 (美國專利第 5,639,635 號) 及菌株 63C1 及 64B4。其他菌株及其衍生物，諸如大腸桿菌 294 (ATCC

31,446)、大腸桿菌B、大腸桿菌 λ 1776(ATCC 31,537)及大腸桿菌RV308(ATCC 31,608)亦適合。此等實例為說明性的而非限制性的。構築具有規定基因型的任何上述細菌之方法為此項技術中已知的，且例如描述於Bass等人，Proteins, 8:309-314 (1990)中。選擇適當細菌一般必需考慮到複製子在細菌細胞中之複製性。舉例而言，當使用諸如pBR322、pBR325、pACYC177或pKN410之熟知質體供應複製子時，大腸桿菌、沙雷氏菌屬或沙門氏菌屬可適合用作宿主。通常宿主細胞應分泌最少量之蛋白水解酶，且可理想地在細胞培養物中併入其他蛋白酶抑制劑。

ii. 產生抗體

用上述表現載體轉型宿主細胞，並在適當時經修飾之習知營養培養基中培養以便誘導啟動子、選擇轉型體或擴增編碼所要序列之基因。

轉型意謂在原核生物宿主中引入DNA以使DNA可複製為染色體外元件或由染色體要素複製。視所使用之宿主細胞，使用適合該等細胞之標準技術進行轉型。採用氯化鈣之鈣處理一般用於含有實質性細胞壁障壁的細菌細胞。另一轉型方法採用聚乙二醇/DMSO。所使用之又一技術為電穿孔。

用於產生本發明多肽之原核生物細胞在此項技術中已知且適合培養所選宿主細胞之培養基中生長。適合培養基之實例包括Luria培養液(LB)加必需營養補充物。在一些實施例中，培養基亦含有基於表現載體之構築而選擇之選擇

劑，以選擇性地允許含有表現載體之原核生物細胞生長。舉例而言，向培養基中添加安比西林以使表現安比西林抗性基因之細胞生長。

亦可包括適當濃度之除碳、氮及無機磷酸鹽源以外之任何必需補充物，單獨或以與諸如複合氮源之另一補充物或培養基之混合物形式引入。培養基可視情況含有一或多種選自由麩胱甘肽、半胱胺酸、胱胺、巰乙酸鹽、二硫赤藻糖醇及二硫蘇糖醇組成之群的還原劑。

在適合溫度下培養原核生物宿主細胞。對於大腸桿菌生長，舉例而言，較佳溫度在約20°C至約39°C範圍內，更佳為約25°C至約37°C，甚至更佳為約30°C。培養基之pH值可為約5至約9範圍內之任何pH值，主要視宿主生物體而定。對於大腸桿菌，pH值較佳為約6.8至約7.4，且更佳為約7.0。

若本發明表現載體中使用誘導性啟動子，則在適合活化該啟動子之條件下誘導蛋白質表現。在本發明之一態樣中，使用PhoA啟動子來控制多肽轉錄。因此，在磷酸鹽限制培養基中培養經轉型之宿主細胞以供誘導。磷酸鹽限制培養基較佳為C.R.A.P培養基(參看例如Simmons等人，J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147)或WO2002/061090中所述之培養基。根據所採用之載體構築體，可使用如此項技術中已知之多種其他誘導劑。

在一實施例中，本發明之經表現多肽分泌至宿主細胞之細胞周質中並自其中回收。蛋白質回收通常涉及破壞微生

物，一般藉由諸如滲透休克、音波處理或細胞溶解之方式。細胞一經破壞，即可藉由離心或過濾移除細胞碎片或完整細胞。可例如藉由親和力樹脂層析進一步純化蛋白質。或者，可將蛋白質轉運至培養基並在其中分離。可自培養物移除細胞，且過濾並濃縮培養物上清液以便進一步純化所產生之蛋白質。可進一步分離經表現之多肽並使用通常已知之方法進行鑑別，諸如聚丙烯醯胺凝膠電泳(PAGE)及西方墨點檢定。

在本發明之一態樣中，藉由醱酵過程產生大量抗體。各種大規模分批饋料醱酵程序可用於產生重組蛋白質。大規模醱酵具有至少1000公升之容量，較佳具有約1,000至100,000公升之容量。此等醱酵罐使用攪拌葉輪來分配氧氣及營養素，尤其葡萄糖(較佳碳/能量源)。小規模醱酵一般係指在容量不超過約100公升且可介於約1公升至約100公升範圍內之醱酵罐中醱酵。

在醱酵過程中，通常在細胞已於適合條件下生長至所要密度(例如約180-220之 OD_{550})(在該階段細胞處於早期停滯期)後啟始蛋白質表現之誘導。根據所採用之載體構築體，可使用如此項技術中已知及上文所述之多種誘導劑。細胞在誘導前可生長較短時段。通常誘導細胞約12至50小時，但可使用更長或更短之誘導時間。

為了提高本發明多肽之產率及品質，可改變各種醱酵條件。舉例而言，為了改良所分泌抗體多肽的正確組裝及摺疊，可使用過度表現諸如Dsb蛋白(DsbA、DsbB、DsbC、

DsbD及/或DsbG)或FkpA(具有伴隨蛋白活性之肽基脯胺醯基順,反-異構酶)之伴隨蛋白的其他載體來共轉型宿主原核生物細胞。伴隨蛋白已顯示有利於細菌宿主細胞中所產生之異源蛋白質的正確摺疊及溶解。Chen等人, (1999) J. Biol. Chem. 274:19601-19605; Georgiou等人, 美國專利第6,083,715號; Georgiou等人, 美國專利第6,027,888號; Bothmann及Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm及Pluckthun, (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie等人, (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210。在一些實施例中, DsbA及DsbC表現於細菌宿主細胞中。

為了將經表現之異源蛋白質(尤其對蛋白水解敏感之蛋白質)之蛋白水解減至最少, 某些缺乏蛋白水解酶之宿主菌株可用於本發明。舉例而言, 宿主細胞菌株可經修飾以在編碼已知細菌蛋白酶(諸如蛋白酶III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶I、蛋白酶Mi、蛋白酶V、蛋白酶VI及其組合)之基因中實現基因突變。一些大腸桿菌蛋白酶缺乏菌株可利用且描述於例如以下文獻中: Joly等人, (1998), 同上; Georgiou等人, 美國專利第5,264,365號; Georgiou等人, 美國專利第5,508,192號; Hara等人, Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)。

在一實施例中, 在本發明表現系統中使用缺乏蛋白水解酶且經過度表現一或多種伴隨蛋白之質體轉型的大腸桿菌菌株作為宿主細胞。

iii. 純化抗體

可採用此項技術中已知之標準蛋白質純化法。以下程序為例示性適合純化程序：在免疫親和力或離子交換柱上份化；乙醇沈澱；逆相HPLC；在二氧化矽或諸如DEAE之陽離子交換樹脂上層析；層析聚焦；SDS-PAGE；硫酸銨沈澱；及使用例如Sephadex G-75進行凝膠過濾。

在一態樣中，使用固定於固相上之蛋白質A進行本發明抗體產物之免疫親和力純化。蛋白質A為來自金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 之41kD細胞壁蛋白質，其以高親和力結合至抗體Fc區。Lindmark等人，(1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13。蛋白質A所固定之固相較佳為包含玻璃或二氧化矽表面之管柱，更佳為孔度可控之玻璃管柱或矽酸管柱。在一些應用中，管柱已塗有諸如甘油之試劑以防污染物非特異性黏附。

作為純化之第一步，將源自於如上所述之細胞培養物的製劑施加於蛋白質A固定之固相上，以允許相關抗體特異性結合至蛋白質A。接著洗滌固相以移除非特異性結合至固相之污染物。最後，藉由溶離自固相回收相關抗體。

免疫結合物

本發明亦提供免疫結合物(可互換稱為「抗體-藥物結合物」或「ADC」)，其包含本文所述之任何抗體結合至細胞毒性劑，諸如化療劑、藥物、生長抑制劑、毒素(例如細菌、真菌、植物或動物來源之酶活性毒素，或其片段)，或放射性同位素(亦即放射結合物)。

使用局部遞送細胞毒性劑或細胞生長抑制劑(亦即在癌症治療中殺死或抑制腫瘤細胞之藥物)之抗體-藥物結合物(Syrigos及Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz及Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151-172; 美國專利第4,975,278號)允許將藥物部分靶向遞送至腫瘤並在其中細胞內積聚,其中此等未結合藥劑之全身性投藥可能會對正常細胞以及設法消除之腫瘤細胞產生不可接受水準的毒性(Baldwin等人, (1986) *Lancet* (1986年3月15日)第603-05頁; Thorpe, (1985) 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」, *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera等人(編), 第475-506頁)。藉此尋求最小毒性下之最大功效。已報導多株抗體及單株抗體均適用於此等策略中(Rowland等人, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87)。此等方法中使用之藥物包括道諾黴素、小紅莓、甲胺喋呤及長春地辛(Rowland等人, (1986)同上文)。抗體-毒素結合物中使用之毒素包括細菌毒素, 諸如白喉毒素; 植物毒素, 諸如蓖麻毒素; 小分子毒素, 諸如格爾德黴素(geldanamycin)(Mandler等人(2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler等人, (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler等人, (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)、類美登醇(EP 1391213; Liu等人, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

93:8618-8623)及卡奇黴素(Lode等人, (1998) *Cancer Res.* 58:2928 ; Hinman 等人, (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342)。該等毒素可藉由包括微管蛋白結合、DNA結合或拓撲異構酶抑制之機制來實現其細胞毒性及細胞生長抑制效應。一些細胞毒性藥物在結合至大抗體或蛋白質受體配位體時可能不具活性或具有較弱活性。

ZEVALIN®(替伊莫單抗 (ibritumomab tiuxetan), Biogen/Idex)為一種抗體-放射性同位素結合物, 其包含針對正常及惡性B淋巴細胞表面上所發現之CD20抗原之鼠類IgG₁ κ單株抗體及由硫脲連接子螯合劑結合之¹¹¹In或⁹⁰Y放射性同位素(Wiseman等人, (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman等人, (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig 等人, (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig等人, (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69)。雖然ZEVALIN具有針對B細胞非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's Lymphoma, NHL)之活性, 但投藥會在大部分患者中造成嚴重且長期的血球減少。MYLOTARG™(吉妥珠單抗奧唑米星(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals), 一種包含hu CD33抗體連接至卡奇黴素之抗體藥物結合物, 其在2000年獲准用於藉由注射來治療急性骨髓白血病(*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; 美國專利第4,970,198號; 第5,079,233號; 第5,585,089號; 第5,606,040號; 第5,693,762號; 第5,739,116號; 第5,767,285號; 第5,773,001號)。康圖單抗美坦辛

(Cantuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.)，一種包含 huC242 抗體經由二硫鍵連接子 SPP 連接至類美登醇藥物部分 DM1 的抗體藥物結合物，正進行治療表現 CanAg 之癌症 (諸如結腸癌、胰腺癌、胃癌及其他癌症) 的 II 期試驗。正在研發可能治療前列腺腫瘤之 MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)，一種包含抗前列腺特異性膜抗原 (PSMA) 單株抗體連接至類美登醇藥物部分 DM1 之抗體藥物結合物。海兔毒素之合成類似物阿瑞他汀 (auristatin) 肽、阿瑞他汀 E (AE) 及單甲基阿瑞他汀 (MMAE) 結合至嵌合單株抗體 cBR96 (對腫瘤上之 Lewis Y 具有特異性) 及 cAC10 (對血液惡性疾病上之 CD30 具有特異性) (Doronina 等人，(2003) *Nature Biotechnology* 21(7): 778-784)，且正在治療性研發中。

本文中描述適用於產生免疫結合物之化療劑 (例如上文)。可使用之酶活性毒素及其片段包括白喉 A 鏈、白喉毒素之非結合性活性片段、外毒素 A 鏈 (來自綠膿桿菌)、蓖麻毒素 A 鏈、相思子鹼 A 鏈、莫迪素 A 鏈 (modeccin A chain)、 α -帚麴菌素 (alpha-sarcin)、油桐 (*Aleurites fordii*) 蛋白質、康乃馨蛋白質、洋商陸 (*Phytolaca americana*) 蛋白質 (PAPI、PAPII 及 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制劑、麻風樹毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草 (*Saponaaria officinalis*) 抑制劑、天堂果蛋白、有絲分裂素、侷限麴菌素、酚黴素 (phenomycin)、伊諾黴素 (enomycin) 及單端孢黴烯。參看例如 1993 年 10 月 28 日公開之 WO 93/21232。多

種放射性核素可用於產生放射結合抗體。實例包括²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y及¹⁸⁶Re。抗體與細胞毒性劑之結合物係使用諸如以下之多種雙功能蛋白質偶合劑製得：N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙功能衍生物(諸如鹽酸二亞胺代己二酸二甲酯)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛(諸如戊二醛)、雙-疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮衍生物(諸如雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)，及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，可如Vitetta等人，Science, 238: 1098 (1987)中所述製備蓖麻毒素免疫毒素。碳14標記之1-異硫氰基苯甲基-3-甲基二伸乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)為一種用於使放射性核苷酸結合至抗體的例示性螯合劑。參看WO94/11026。

本文中亦涵蓋抗體與一或多種諸如以下之小分子毒素之結合物：卡奇黴素、類美登醇、海兔毒素、阿洛他汀(aurostatin)、單端孢黴烯及CC1065，及此等毒素之具有毒素活性的衍生物。

i. 美登素及類美登醇

在一些實施例中，免疫結合物包含本發明抗體(全長或片段)結合至一或多個類美登醇分子。

類美登醇為藉由抑制微管蛋白聚合而起作用之有絲分裂抑制劑。最先自東非灌木鋸葉美登木(*Maytenus serrata*)分離美登素(美國專利第3,896,111號)。隨後，發現某些微生

物亦產生類美登醇，諸如美登木醇及C-3美登木醇酯(美國專利第4,151,042號)。合成美登木醇及其衍生物及類似物揭示於例如美國專利第4,137,230號；第4,248,870號；第4,256,746號；第4,260,608號；第4,265,814號；第4,294,757號；第4,307,016號；第4,308,268號；第4,308,269號；第4,309,428號；第4,313,946號；第4,315,929號；第4,317,821號；第4,322,348號；第4,331,598號；第4,361,650號；第4,364,866號；第4,424,219號；第4,450,254號；第4,362,663號；及第4,371,533號中。

類美登醇藥物部分在抗體藥物結合物中為有吸引力的藥物部分，因為其：(i)相對易於藉由醃酵或醃酵產物之化學修飾、衍生化來製備；(ii)可用適合經由非二硫鍵連接子結合至抗體之官能基進行衍生化；(iii)在血漿中穩定；及(iv)有效對抗多種腫瘤細胞株。

含有類美登醇之免疫結合物、其製造方法及其治療用途揭示於例如美國專利第5,208,020號、第5,416,064號及歐洲專利EP 0 425 235 B1中，該等專利之揭示內容係以引用的方式明確併入本文中。Liu等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)描述包含稱為DM1之類美登醇連接至針對人類結腸直腸癌之單株抗體C242的免疫結合物。發現該結合物對培養之結腸癌細胞具有高細胞毒性，且在活體內腫瘤生長檢定中顯示抗腫瘤活性。Chari等人，Cancer Research 52:127-131 (1992)描述免疫結合物，其中

類美登醇係經由二硫鍵連接子結合至鼠類抗體A7(其結合至人類結腸癌細胞株上之抗原)或結合至另一鼠類單株抗體TA.1(其結合HER-2/neu致癌基因)。在活體外測試TA.1-類美登醇結合物對人類乳癌細胞株SK-BR-3之細胞毒性，該細胞株表現 3×10^5 HER-2表面抗原/細胞。該藥物結合物達到類似於游離類美登醇藥物之細胞毒性程度，其可藉由增加每個抗體分子之類美登醇分子數目來增加。A7-類美登醇結合物在小鼠中顯示低全身性細胞毒性。

抗體-類美登醇結合物係藉由使抗體化學連接至類美登醇分子而不顯著降低抗體或類美登醇分子之生物活性來製備。參看例如美國專利第5,208,020號(該專利之揭示內容係以引用的方式明確併入本文中)。平均每個抗體分子結合3-4個類美登醇分子已顯示在增強靶細胞之細胞毒性而不負面影響抗體之功能或溶解度方面之功效，但預期即使每個抗體分子1個毒素分子與使用裸抗體相比亦可增強細胞毒性。類美登醇在此項技術中為熟知的，且可藉由已知技術合成或自天然源分離。適合類美登醇例如揭示於美國專利第5,208,020號及上文提及之其他專利及非專利公開案中。較佳類美登醇為美登木醇及在美登木醇分子之芳族環或其他位置經修飾的美登木醇類似物，諸如各種美登木醇酯。

此項技術中已知許多用於製造抗體-類美登醇結合物之連接基團，包括例如美國專利第5,208,020號或EP專利0 425 235 B1、Chari等人，Cancer Research 52:127-131

(1992)，及 2004 年 10 月 8 日申請之美國專利申請案第 10/960,602 號中所揭示之連接基團，該等文獻係以引用的方式明確併入本文中。可如 2004 年 10 月 8 日申請之美國專利申請案第 10/960,602 號中所揭示製備包含連接子組分 SMCC 的抗體-類美登醇結合物。連接基團包括如上述專利中所揭示之二硫基、硫醚基、酸不穩定基團、光不穩定基團、肽酶不穩定基團或酯酶不穩定基團，二硫基及硫醚基較佳。本文中描述並例示其他連接基團。

抗體與類美登醇之結合物可使用諸如以下之多種雙功能蛋白質偶合劑製得：N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯 (SPDP)、丁二醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯 (SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷 (IT)、醯亞胺酯之雙功能衍生物(諸如鹽酸二亞胺代己二酸二甲酯)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮衍生物(諸如雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯 2,6-二異氰酸酯)，及雙活性氟化合物(諸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。尤佳偶合劑包括 N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯 (SPDP)(Carlsson 等人，Biochem. J. 173:723-737 (1978))及 N-丁二醯亞胺基-4-(2-吡啶基硫)戊酸酯 (SPP) 以提供二硫鍵。

連接子可在各種位置連接於類美登醇分子，視連接類型而定。舉例而言，可藉由使用習知偶合技術與羥基反應來形成習知酯鍵。反應可發生於具有羥基之 C-3 位置、經羥

甲基修飾之C-14位置、經羥基修飾之C-15位置及具有羥基之C-20位置。在一較佳實施例中，在美登木醇或美登木醇類似物之C-3位置形成鍵。

ii. 阿瑞他汀及海兔毒素

在一些實施例中，免疫結合物包含本發明抗體結合至海兔毒素或海兔毒素肽類似物及衍生物阿瑞他汀(美國專利第5,635,483號及第5,780,588號)。已顯示海兔毒素及阿瑞他汀干擾微管動力學、GTP水解，以及細胞核及細胞分裂(Woyke等人(2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584)，且具有抗癌活性(美國專利第5,663,149號)及抗真菌活性(Pettit等人，(1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965)。海兔毒素或阿瑞他汀藥物部分可經由肽藥物部分之N(胺基)末端或C(羧基)末端連接至抗體(WO 02/088172)。

例示性阿瑞他汀實施例包括N末端連接之單甲基阿瑞他汀藥物部分DE及DF，揭示於2004年11月5日申請之美國申請案第10/983,340號「Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands」中，該申請案之揭示內容係以全文引用的方式明確併入本文中。

基於肽之藥物部分通常可藉由在兩個或兩個以上胺基酸及/或肽片段之間形成肽鍵來製備。該等肽鍵可例如根據肽化學領域中熟知之液相合成法(參看E. Schröder及K. Lübke, 「The Peptides」，第1卷，第76-136頁，1965, Academic Press)來製備。可根據以下文獻之方法製備阿瑞

他汀/海兔毒素藥物部分：美國專利第5,635,483號及第5,780,588號；Pettit等人，(1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465；Pettit等人，(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277；Pettit, G.R.等人，Synthesis, 1996, 719-725；及Pettit等人，(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863。亦參看Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784；2004年11月5日申請之美國申請案第10/983,340號「Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands」，其係以全文引用的方式併入本文中(揭示例如製備結合至連接子之諸如MMAE及MMAF之單甲基纈胺酸化合物的連接子及方法)。

iii. 卡奇黴素

在其他實施例中，免疫結合物包含本發明抗體結合至一或多個卡奇黴素分子。卡奇黴素家族之抗生素能夠在次皮莫耳濃度下產生雙股DNA碎片。關於卡奇黴素家族之結合物的製備，參看美國專利第5,712,374號、第5,714,586號、第5,739,116號、第5,767,285號、第5,770,701號、第5,770,710號、第5,773,001號及第5,877,296號(均屬於American Cyanamid Company)。可使用之卡奇黴素結構類似物包括但不限於 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙酰基 $1-\gamma_1^I$ 、PSAG及 θ_1^I (Hinman等人，Cancer Research 53:3336-3342 (1993)、Lode等人，Cancer Research 58:2925-2928 (1998)及屬於American Cyanamid之上述美國專利)。抗體可結合之另一抗腫瘤藥物為QFA，其為抗葉酸物。卡奇黴素及QFA均具

有細胞內作用位點且不容易通過質膜。因此，經由抗體介導之內化實現此等藥劑之細胞攝取大大增強其細胞毒性效應。

iv. 其他細胞毒性劑

可結合至本發明抗體之其他抗腫瘤劑包括BCNU、鏈佐星(streptozocin)、長春新鹼及5-氟尿嘧啶、美國專利第5,053,394號及第5,770,710號中所描述之統稱為LL-E33288複合物之藥劑家族，以及艾斯帕米辛(美國專利第5,877,296號)。

可使用之酶活性毒素及其片段包括白喉A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌)、蓖麻毒素A鏈、相思子鹼A鏈、莫迪素A鏈、 α -帶麴菌素、油桐蛋白質、康乃馨蛋白質、洋商陸蛋白質(PAPI、PAPII及PA對S)、苦瓜抑制劑、麻風樹毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草抑制劑、天堂果蛋白、有絲分裂素、侷限麴菌素、酚黴素、伊諾黴素及單端孢黴烯。參看例如1993年10月28日公開之WO 93/21232。

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

為了選擇性破壞腫瘤，抗體可包含高放射性原子。多種放射性同位素可用於產生放射結合抗體。實例包括At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²及Lu之放射性同位素。當結合物用於偵測時，其可包含放

射性原子用於閃爍掃描研究，例如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} ，或包含自旋標記用於核磁共振(NMR)成像(亦稱為磁共振成像，mri)，諸如碘-123(又)、碘-131、銦-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、鋁、錳或鐵。

放射性標記或其他標記可以已知方式併入結合物中。舉例而言，肽可經生物合成或可藉由化學胺基酸合成使用適合胺基酸前驅物來合成，涉及例如氟-19置換氫。諸如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 及 In^{111} 之標記可經由肽中之半胱胺酸殘基連接。釷-90可經由離胺酸殘基連接。IODOGEN 法(Fraker等人(1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57)可用於將碘-123併入。「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)詳細描述其他方法。

抗體與細胞毒性劑之結合物可使用諸如以下之多種雙功能蛋白質偶合劑製得：N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(SPDP)、丁二醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺基酯之雙功能衍生物(諸如鹽酸二亞胺代己二酸二甲酯)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮衍生物(諸如雙-(p-重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)，及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，可如 Vitetta 等人，*Science* 238:1098 (1987)中所述製備蓖麻毒素免疫

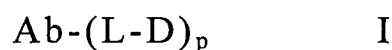
毒素。碳14標記之1-異硫氰基苯甲基-3-甲基二伸乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)為一種用於使放射性核苷酸結合至抗體的例示性螯合劑。參看WO94/11026。連接子可為有利於細胞中釋放細胞毒性藥物的「可裂解連接子」。舉例而言，可使用酸不穩定連接子、肽酶敏感連接子、光不穩定連接子、二甲基連接子或含二硫鍵之連接子(Chari等人，Cancer Research 52:127-131 (1992)；美國專利第5,208,020號)。

本發明化合物明確涵蓋但不限於用以下交聯試劑製備之ADC：BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC，及磺基-SMPB，及SVSB(丁二醯亞胺基-(4-乙烯磺)苯甲酸酯)，該等試劑可購得(例如購自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。參看2003-2004 Applications Handbook and Catalog第467-498頁。

v. 製備抗體藥物結合物

在本發明抗體藥物結合物(ADC)中，抗體(Ab)經由連接子(L)結合至一或多個藥物部分(D)，例如約1至約20個藥物部分/抗體。式I之ADC可藉由若干途徑，採用熟習此項技術者已知之有機化學反應、條件及試劑製備，包括：(1)使抗體之親核基團與二價連接子試劑反應，經由共價鍵形成Ab-L，接著與藥物部分D反應；及(2)使藥物部分之親核基

團與二價連接子試劑反應，經由共價鍵形成D-L，接著與抗體之親核基團反應。本文中描述製備ADC之其他方法。



連接子可包含一或多個連接子組分。例示性連接子組分包括6-順丁烯二醯亞胺己醯基(「MC」)、順丁烯二醯亞胺丙醯基(「MP」)、纈胺酸-瓜胺酸(「val-cit」)、丙胺酸-苯丙胺酸(「ala-phe」)、對胺基苯甲氧基羰基(「PAB」)、4-(2-吡啶基硫)戊酸N-丁二醯亞胺酯(「SPP」)、4-(N-順丁烯二醯亞胺甲基)環己烷-1-甲酸N-丁二醯亞胺酯(「SMCC」)及(4-碘基-乙醯基)胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(「SIAB」)。其他連接子組分為此項技術中已知的且一些於本文中加以描述。亦參看2004年11月5日申請之美國申請案第10/983,340號「Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands」，該申請案之內容係以全文引用的方式併入本文中。

在一些實施例中，連接子可包含胺基酸殘基。例示性胺基酸連接子組分包括二肽、三肽、四肽或五肽。例示性二肽包括：纈胺酸-瓜胺酸(vc或val-cit)、丙胺酸-苯丙胺酸(af或ala-phe)。例示性三肽包括：甘胺酸-纈胺酸-瓜胺酸(gly-val-cit)及甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸(gly-gly-gly)。包含胺基酸連接子組分之胺基酸殘基包括天然存在之胺基酸殘基以及次要胺基酸及非天然存在之胺基酸類似物，諸如瓜胺酸。可設計胺基酸連接子組分並在其對經例如以下特定酶發生酶促裂解之選擇性方面對其加以優化：腫瘤相關蛋

白酶、組織蛋白酶B、C及D，或纖維蛋白溶酶蛋白酶。

抗體上之親核基團包括但不限於：(i)N-末端胺基；(ii)側鏈胺基，例如離胺酸；(iii)側鏈硫醇基，例如半胱胺酸；及(iv)糖羥基或胺基(若抗體經糖基化)。胺基、硫醇基及羥基為親核基團且能夠與連接子部分及連接子試劑上之親電子基團反應形成共價鍵，包括：(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵代甲酸酯及酸鹵化物；(ii)烷基及苯甲基鹵化物，諸如鹵代乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及順丁烯二醯亞胺基。某些抗體具有可還原的鏈間二硫鍵，亦即半胱胺酸橋。可藉由用諸如DTT(二硫蘇糖醇)之還原劑處理使抗體具有反應性以便與連接子試劑結合。因而各半胱胺酸橋理論上將形成兩個反應性硫醇親核體。可藉由離胺酸與2-亞胺基硫雜環戊烷(Traut's試劑)之反應將其他親核基團引入抗體中，從而將胺轉化成硫醇。可藉由引入一、二、三、四或四個以上半胱胺酸殘基在抗體中引入反應性硫醇基(例如，製備包含一或多個非原生半胱胺酸胺基酸殘基之突變抗體)。

亦可藉由修飾抗體以引入親電子部分來產生本發明之抗體藥物結合物，親電子部分可與連接子試劑或藥物上之親核取代基反應。糖基化抗體之糖可例如經過碘酸鹽氧化試劑氧化以形成可與連接子試劑或藥物部分之胺基反應的醛或酮基。所得亞胺希夫鹼基(Schiff base group)可形成穩定鍵，或可例如經氫硼化物試劑還原以形成穩定胺鍵。在一實施例中，糖基化抗體之碳水化合物部分與半乳糖氧化酶

或偏過碘酸鈉反應可在蛋白質中產生羰基(醛及酮基)，該等基團可與藥物上之適當基團反應(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一實施例中，含有N-末端絲胺酸或蘇胺酸殘基之蛋白質可與偏過碘酸鈉反應，產生醛以置換第一胺基酸(Geoghegan 及 Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146；美國專利第 5,362,852 號)。該醛可與藥物部分或連接子親核體反應。

同樣，藥物部分上之親核基團包括但不限於：胺基、硫氫基、羥基、醯肼基、肟基、肼基、縮胺基硫脲基、甲酸肼基及芳基醯肼基，其能夠與連接子部分及連接子試劑上之親電子基團反應形成共價鍵，親電子基團包括：(i)活性酯，諸如 NHS 酯、HOBt 酯、鹵代甲酸酯及酸鹵化物；(ii)烷基及苯甲基鹵化物，諸如鹵代乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及順丁烯二醯亞胺基。

或者，可例如藉由重組技術或肽合成製造包含抗體及細胞毒性劑之融合蛋白。DNA 長度可包含編碼結合物中彼此相鄰或由編碼連接子肽之區域(其不破壞結合物之所要性質)隔開之兩個部分的各別區域。

在另一實施例中，抗體可結合至「受體」(諸如抗生蛋白鏈菌素)以用於腫瘤預靶向，其中將抗體-受體結合物投與個體，接著使用清除劑自循環中移除未結合之結合物，接著投與可結合至細胞毒性劑(例如放射性核苷酸)之「配位體」(例如抗生物素蛋白)。

醫藥調配物

藉由混合具有所要純度之異源多肽與視情況選用之生理學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑 (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 第16版, Osol, A.編(1980))來製備呈水溶液、凍乾或其他乾燥調配物形式之異源多肽之治療性調配物以供儲存。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所採用之劑量及濃度下對接受者無毒,且包括緩衝液,諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽、組胺酸及其他有機酸;抗氧化劑,包括抗壞血酸及甲硫胺酸;防腐劑(諸如氯化十八烷基二甲基苯甲基銨;六甲氯銨;氯化苯甲烴銨、苯甲氯銨;苯酚、丁醇或苯甲醇;對羥基苯甲酸烷酯,諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯;兒茶酚;間苯二酚;環己醇;3-戊醇;及間甲酚);低分子量(小於約10個殘基)多肽;蛋白質,諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白;親水性聚合物,諸如聚乙烯吡咯啉酮;胺基酸,諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸;單糖、二糖及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合劑,諸如EDTA;糖,諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成鹽抗衡離子,諸如鈉;金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物);及/或非離子型界面活性劑,諸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

本文之調配物亦可含有一種以上對於所治療之特定適應症所必需之活性化合物,較佳為彼此間無不利影響之具有互補活性的活性化合物。該等分子適當地以有效達成預定目標之量組合存在。

活性成分亦可包埋於以下各者中：例如藉由凝聚技術或界面聚合製備之微膠囊，分別例如羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊；膠體藥物遞送系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳劑、奈米粒子及奈米膠囊)或巨乳液。該等技術揭示於 *Remington's Pharmaceutical Sciences* 第16版，Osol, A.編(1980)中。

用於活體內投藥之調配物必須為無菌的。此易於藉由經無菌過濾膜過濾而實現。

可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適合實例包括含有抗體之固體疏水性聚合物之半透性基質，該等基質呈成形物品形式，例如薄膜或微膠囊。持續釋放基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如聚(甲基丙烯酸2-羥乙酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與 γ L-麩胺酸乙酯之共聚物、不可降解之乙烯-乙酸乙烯酯、可降解之乳酸-乙醇酸共聚物，諸如LUPRON DEPOT™(包含乳酸-乙醇酸共聚物及乙酸亮丙立德之可注射微球體)及聚-D-(-)-3-羥丁酸。雖然諸如乙烯-乙酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸之聚合物能夠釋放分子持續100天以上，但某些水凝膠釋放蛋白質之時段較短。當囊封之抗體保持於體內較長時間時，其可能因在37°C下暴露於水分而變性或聚集，從而導致生物活性損失且免疫原性可能變化。可視所涉及之機制設計合理策略以達成穩定。舉例而言，若發現聚集機制為經由硫氫基-二硫鍵互換形成分子間S-S鍵，則可藉由修飾巰基殘基、自酸性溶液凍乾、控制水分含量、使用適當添

加劑及研發特定聚合物基質組合物來達成穩定。

用途

本發明之異源多肽可例如用於純化、偵測及靶向其識別之特定多肽，包括活體外及活體內診斷方法及治療方法。

在一態樣中，本發明之抗體可於免疫檢定中用於定性及定量地量測生物樣本中之特定抗原。偵測抗原-抗體結合之習知方法包括例如酶聯免疫吸附檢定(ELISA)、放射免疫檢定(RIA)或組織免疫組織化學。出於偵測目的，許多方法可使用結合至抗體之標記。與抗體一起使用之標記具有不干擾其與抗體結合的任何可偵測官能基。已知許多標記，包括放射性同位素 ^{32}P 、 ^{32}S 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 及 ^{131}I ；螢光團，諸如稀土螯合物或螢光素及其衍生物、若丹明(rhodamine)及其衍生物、丹醯基、繖酮；螢光素酶，例如螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶(美國專利第4,737,456號)；螢光素；2,3-二氫酞嗪二酮；辣根過氧化酶(HRP)；鹼性磷酸酶； β -半乳糖苷酶；葡糖澱粉酶；溶菌酶；醣氧化酶，例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶；雜環氧化酶，諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶；乳過氧化酶；生物素/抗生物素蛋白；自旋標記；噬菌體標記；穩定自由基；成像放射性核素(諸如鎔)及其類似物。

習知方法可用於使此等標記共價結合至異源多肽。舉例而言，諸如二醛、碳化二亞胺、二順丁烯二醯亞胺、雙醯亞胺酯、雙偶氮聯苯胺及其類似物之偶合劑可用於用上述螢光標記、化學發光標記及酶標記標記抗體。參看例如美

國專利第3,940,475號(螢光測定法)及美國專利第3,645,090號(酶); Hunter等人*Nature* 144: 945 (1962); David等人*Biochemistry* 13:1014-1021 (1974); Pain等人*J. Immunol. Methods* 40:219-230(1981); 及 Nygren *Histochem. and Cytochem* 30:407-412(1982)。本文之較佳標記為酶, 諸如辣根過氧化酶及鹼性磷酸酶。標記(包括酶)結合至抗體多肽對於一般熟習免疫檢定技術者而言為標準操縱程序。參看例如 O'Sullivan等人, 「Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay」, *Methods in Enzymology*, J. J. Langone及H. Van Vunakis編, 第73卷(Academic Press, New York, N.Y., 1981), 第147-166頁。該等結合方法適合與本發明之異源多肽一起使用。

替代以標記異源多肽, 可藉由競爭免疫檢定利用經可偵測物質標記之競爭性抗原標準物及未標記之異源多肽來檢定生物體液中之抗原。在此檢定中, 組合生物樣本、經標記之抗原標準物及異源多肽, 並測定結合至未標記之異源多肽的經標記之抗原標準物的量。生物樣本中測試抗原之量與結合至異源多肽的經標記之抗原標準物之量成反比。

在一態樣中, 本發明之異源多肽(諸如抗體)尤其適用於偵測及描繪特定表面抗原在活體外或活體內之表現。如上文所述, 一般而言, 去糖基化抗體不發揮效應功能(亦即ADCC或CDC活性)。因此, 當抗體結合至細胞表面抗原時, 其不會引發不需要之細胞毒性事件。表面抗原可對特

定細胞或組織類型具有特異性，因此充當該細胞或組織類型之標記物。表面抗原標記物較佳在特定細胞或組織類型之不同分化階段差異性表現。因而，針對該表面抗原之抗體可用於篩選表現該標記物之細胞或組織群體。舉例而言，本發明抗體可用於篩選及分離幹細胞，諸如胚胎幹細胞、造血幹細胞及間充質幹細胞。本發明抗體亦可用於偵測表現諸如 c-met、HER2、HER3 或 HER4 受體之腫瘤相關表面抗原之腫瘤細胞。

本發明之抗體或其他異源多肽可用作親和力純化劑。在此過程中，使用此項技術熟知之方法將多肽固定於諸如 Sephadex 樹脂或濾紙之固相上。使經固定之多肽與含有待純化抗原之樣本接觸，此後用將移除樣品中除待純化抗原(其與經固定之多肽結合)以外之實質上所有物質的適合溶劑洗滌支撐物。最後，用將使抗原自多肽釋放之諸如甘胺酸緩衝液(pH 5.0)之另一適合溶劑洗滌支撐物。

在一態樣中，本發明提供使用本發明方法產生之異源多肽的用途，其係用於製備供治療性及/或預防性治療諸如下疾病用的藥物：癌症、腫瘤、細胞增殖性病症及/或免疫(諸如自體免疫)病症。異源多肽可為本文所述之任何形式，包括抗體、抗體片段、多肽(例如寡肽)或其組合。在一些實施例中，抗原為人類蛋白質分子且個體為人類個體。

本發明之異源多肽可用於診斷、治療、抑制或預防與一或多個抗原分子之異常表現及/或活性相關的疾病、病症

或病狀，包括但不限於惡性及良性腫瘤；非白血病及淋巴惡性疾病；神經元、神經膠質、星形細胞、下丘腦及其他腺體、巨噬細胞、上皮細胞、基質及囊胚腔病症；及發炎性、血管生成及免疫病症。

在某些實施例中，向個體投與包含抗體之免疫結合物。較佳，免疫結合物及/或其所結合之抗原由細胞內化。

本發明之異源多肽可單獨或與其他組合物組合用於療法中。舉例而言，異源多肽可與抗體、化療劑(包括化療劑混合物)、其他細胞毒性劑、抗血管生成劑、細胞激素及/或生長抑制劑共同投藥。若異源多肽抑制腫瘤生長，則可能尤其需要組合該異源多肽與一或多種亦抑制腫瘤生長之其他治療劑。其他或另外，患者可接受組合放射療法(例如，外部射束照射或使用經放射性標記之藥劑(諸如抗體)的療法)。上文所述之該等組合療法包括組合投藥(其中兩種或兩種以上藥劑包括於相同或獨立調配物中)及分別投藥，在此情況下，可在投與佐劑療法之前及/或之後投與抗體。

異源多肽(及視情況採用之輔佐治療劑)係藉由包括非經腸、皮下、腹膜內、肺內及鼻內之任何適合方式投與，且必要時用於局部治療、病變內投藥。非經腸輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投藥。另外，適當地藉由脈衝輸注，尤其以遞減之抗體劑量投與抗體。較佳藉由注射，最佳靜脈內或皮下注射來給藥，其部分視投藥為短期抑或長期而定。

本發明之異源多肽組合物將以符合良好醫學規範之方式調配、給藥及投藥。此情況下考慮之因素包括所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床病狀、病症之起因、藥劑遞送位點、投藥方法、投藥時程及醫師已知之其他因素。抗體無需但視情況與一或多種當前用於預防或治療所述病症之藥劑一起調配。該等其他藥劑之有效量視調配物中所存在之抗體量、病症或治療類型，及上文所論述之其他因素而定。此等藥劑一般以與上文所使用相同之劑量及投藥途徑使用或以此前所採用之劑量的約1%至99%使用。

為預防或治療疾病，抗體之適當劑量(當單獨使用或與諸如化療劑之其他藥劑組合使用時)應視待治療之疾病類型、抗體類型、疾病之嚴重程度及病程、抗體係出於預防性目的抑或治療性目的而投與、先前療法、患者之臨床病史及對抗體之反應，及主治醫師之判斷而定。抗體可一次性或經一系列治療適當地投與患者。視疾病之類型及嚴重程度，約1 $\mu\text{g/kg}$ 至15 mg/kg (例如0.1 mg/kg -10 mg/kg)抗體為投與患者之初始候選劑量，無論例如藉由一或多次分別投藥抑或藉由連續輸注。對於經數天或更長時間重複投藥而言，視病狀而定，持續治療直至出現疾病症狀之所要抑制。抗體之較佳劑量應在約0.05 mg/kg 至約10 mg/kg 範圍內。可投與初始較高負載劑量，接著投與一或多個較低劑量。然而，其他給藥方案可能適用。此療法之進展易於藉由習知技術及檢定來監測。

製品

在本發明之另一實施例中，提供一種含有適用於治療上述病症之物質的製品。該製品包含容器及於該容器上或與該容器相關聯之標籤或藥品說明書。適合容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可由諸如玻璃或塑膠之各種材料形成。該容器容納有效治療病狀之組合物，且可具有無菌存取口（例如，該容器可為靜脈內溶液袋或具有可由皮下注射針刺穿之塞子的小瓶）。組合物中至少一種活性劑為本發明抗體。標籤或藥品說明書指示該組合物用於治療諸如癌症之所選病狀。此外，該製品可包含(a)含有組合物之第一容器，其中該組合物包含抗體；及(b)含有組合物之第二容器，其中該組合物包含另一細胞毒性劑。本發明之此實施例中之製品可進一步包含指示第一抗體及第二抗體組合物可用於治療癌症之藥品說明書。其他或另外，該製品可進一步包含第二(或第三)容器，該容器包含醫藥學上可接受之緩衝液，諸如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液。其可進一步包括自商業及使用者之觀點而言所需的其他物質，包括其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

以下實例僅意欲說明本發明之實施且並非以限制之方式提供。本文中所引用之所有專利及科學文獻之揭示內容係以全文引用的方式明確併入本文中。

實例

材料及方法

細菌菌株及培養基-本研究中所用之菌株及質體列於表1中。對於搖瓶培養，使所有菌株均在Lauria-Bertani(LB)或C.R.A.P.磷酸鹽限制培養基(1)中，於30°C或37°C下(依指示)生長。醱酵罐培養基基本上如參考文獻1所述。添加以下濃度之抗生素：50 µg/mL卡本西林(carbenicillin)、50 µg/mL卡那黴素(kanamycin)、12.5 µg/mL氯黴素(chloramphenicol)或20 µg/mL四環素。

構築並評估相關TIR庫-使熱穩定腸毒素II(*stII*)、麥芽糖結合細胞周質蛋白(*malE*)、鹼性磷酸酶(*phoA*)或硫氫基:二硫鍵交換蛋白(*dsbA*)信號肽進行PCR擴增並使用簡併引子融合至*phoA*基因之成熟域，以便在親本基因起始密碼子之後的前6個胺基酸中引入基於擺動之沉默密碼子突變(2)，其中*BssHII*、*MluI*或*XbaI*限制位點在該起始密碼子上游9個鹼基對(bps)處(參看表2)。亦產生編碼各信號序列之野生型密碼子的DNA。接著，將此等插入物依常規選殖於pPho41(3)質體之*SpeI/NotI*(New England Biolabs)位點中，並轉型至勝任JM109細胞(Promega)中，回收1小時，並在補充有卡本西林之200 mL LB中在37°C下繼代培養16小時，隨後大量製備(Qiagen)。將自各集合庫回收之細胞的等分試樣塗於選擇性LB瓊脂板上以測定集合庫尺寸；所有集合庫之尺寸均為理論集合庫尺寸的約10至100倍。接著，將經純化之DNA轉型至勝任27C7細胞中並塗於補充有卡本西林及100 µg/mL磷酸5-溴-4-氯-3-吡啶酯(BCIP；

Sigma)之LB瓊脂板上，且在37°C下生長16小時。可推定呈現淡藍色之菌落表示其含有呈現至少低度PhoA活性之TIR變異體，而深藍色菌落表示細胞含有強TIR變異體(4)，且白色菌落暗示細胞帶有具有極少PhoA表現甚至無PhoA表現之TIR變異體；各集合庫在指定瓊脂板上之藍色菌落百分比在約2%-70%範圍內。少量製備呈現不同色調之藍色之個別菌落的DNA(Qiagen)，藉由SRS分析定序(Genentech, Inc.)，再轉型於勝任27C7細胞中，接著如先前所述測試其基本PhoA活性(3)。簡言之，使菌落在選擇性LB中於30°C下生長16小時，並1:100稀釋於新鮮培養基中且在30°C下再生長4小時。接著，基於光學密度(OD₅₅₀)校正培養物，並再懸浮於嚴格AP培養基中(3)，接著儲存於-20°C下隔夜。接著將細胞解凍，藉由甲苯(Sigma)處理部分滲透(5)並在37°C下暴露於空氣1小時。將40 µL各培養物添加至含有1 mM六水合4-硝基苯基磷酸二鈉(PNPP；Promega)於1 M Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)中之溶液中，並在室溫下於暗處培育1小時。藉由添加100 µL磷酸鈉緩衝液(pH 6.5)終止反應，並在20分鐘內讀取410 nm下之吸光度(A₄₁₀)。如下計算相對TIR強度：首先將各樣本之A₄₁₀減去含有空載體(pBR322)之培養物的背景吸光度，接著除以帶有pPho41質體之培養物的經修正之吸光度。所報導之所有TIR值均為至少4次重複實驗之結果。

構築抗體表現載體-將信號肽按常規選殖於先前描述之雙順反子系統中(1)。藉由使相關信號肽經由拼接重疊延

伸-(SOE)PCR融合至相關重鏈並選殖於 *BssHII/HpaI*(New England Biolabs)位點中來產生重鏈信號肽變異體。使用 SOE-PCR類似地製造輕鏈信號肽變異體並如個別 TIR變異核苷酸序列(表2)指定選殖於 *MluI/PacI*(New England Biolabs)或 *XbaI/PacI*(New England Biolabs)位點中。藉由 SRS分析(Genentech, Inc)確證所有構築體序列。

小規模誘導及分析-使細胞在補充有 5 mM磷酸鈉(pH 7.0)之 5 mL選擇性LB中於30°C下生長16小時。接著，使用 500 μ L細胞等分試樣接種 25 mL選擇性C.R.A.P.磷酸鹽限制培養基，並在30°C下生長24小時。若指示，則當細胞達到約 2.0之OD₆₀₀時，用異丙基 β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)誘導帶有質體pJJ247之細胞至最終濃度為1.0 mM。獲取終點全培養液樣本，且在溶解緩衝液(10 mM Tris pH 6.8、5 mM EDTA、0.2 mg/mL溶菌酶(Sigma)、5 mM碘乙酸(Sigma))中稀釋至約3.0之OD₆₀₀並在冰上培育10分鐘。對樣本進行微波處理，離心以移除細胞碎片，接著使用SDS-PAGE分析(10% Bis-Tris, Invitrogen)分析。將全細胞溶解產物樣本校正至相等光學密度，用0.2 M二硫蘇糖醇(DTT, Sigma)還原，並使用SDS-PAGE分析法分析。所有泳道均裝載相等體積之樣本且使用以1:200,000稀釋之人類抗Fc(Southern Biotech)抗體或使用以1:200,000稀釋之小鼠抗 κ Lc(Southern Biotech)抗體進行探測。使所有抗體結合HRP，且使用Western Lightning-ECL(PerkinElmer)觀察免疫墨點並將膜曝露於Biomax XAR膠片(Kodak)。亦經由考

馬斯藍染色按照標準技術分析蛋白質樣本。

大規模誘導-如先前所述執行醱酵(1)。簡言之，使用獲自 5 mL 選擇性 LB 培養物之 500 μ L 冷藏細胞等分試樣接種 500 mL 選擇性 LB 並在 30°C 下生長 16 小時。接著接種 10 L 醱酵罐(基本上如參考文獻 1 所述)，並使細胞生長達到高密度，基於醱酵需要，使用基於電腦之算法饋入濃葡萄糖溶液。若指示，則誘導帶有質體 pJJ247 之細胞。若指示，則當細胞達到約 200 之 OD₅₅₀ 時，用異丙基 β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 誘導帶有質體 pJJ247 之細胞至最終濃度為 1.0 mM。以規定時間間隔獲取全培養液樣本及經校正之 OD₅₅₀ 樣本，且在 2-3 天後終止所有醱酵。使用線上及離線量測參數常規監測培養適合度。使用如上所述之 SDS-PAGE 分析法分析樣本。

HPLC 分析樣本-藉由先前開發之逆相 HPLC 分析技術 (Lisa Wong, personal communication) 分析獲自小規模或大規模誘導試驗之樣本的總(不可溶及可溶性)重鏈或輕鏈濃度。藉由雙管柱蛋白質-L 逆相基 HPLC 檢定 (Analytical Operations, Genentech, Inc.) 分析樣本中含輕鏈之抗體物種。藉由將層析圖峰面積與藉由含已知量相關分子之空白試樣獲取峰形所產生之標準曲線的峰面積比較來獲得抗體效價。

表 1：本研究中所使用之菌株及質體

菌株或質體	相關基因型/表型	參考文獻或來源
大腸桿菌菌株		
27C7	$\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) $phoA\Delta E15$ $\Delta(argF-lac)169$ $ptr3$ $degP41$ kan^R $ompT\Delta(nmpc-fepE)$	(3)
64B4	W3110 $\Delta fhuA$ $\Delta phoA$ $ilvG+\Delta prc$ $spr43H1$ $\Delta degP$ $\Delta manA$ $lacI^f$ $\Delta ompT$	實驗室儲備
JM109	$e14^-(McrA^-)$ $recA1$ $endA1$ $gyrA96$ $thi-1$ $hsdR17$ ($r_K^-m_K^+$) $supE44$ $relA1$ $\Delta(lac-proAB)$ [F' $traD36$ $proAB$ $lacI^f$ $\Delta M15$]	Promega
質體		
pPho41	Cb^r	(3)
pBR322	Cb^r 、 Tc^r	實驗室儲備
ph5D5	選殖於pBR322中之人類化5D5抗體（可互換稱作5D5.v2抗體）	實驗室儲備
pJJ247	在pACYC源性載體中在tac啟動子控制下之大腸桿菌 $dsbA$ 及 $dsbC$ ， Km^r	實驗室儲備
pBR-STIIHc1.0-PhoA	大腸桿菌 $BssHIII$ -ssSTII TIRv.1融合至pPho41中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-STIIHc2.41-PhoA	大腸桿菌 $BssHIII$ -ssSTII TIRv.2融合至pPho41中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-STIIHc3.38-PhoA	大腸桿菌 $BssHIII$ -ssSTII TIRv.3融合至pPho41中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-STIIHc4.60-PhoA	大腸桿菌 $BssHIII$ -ssSTII TIRv.4融合至pPho41中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-STIIHc5.34-PhoA	大腸桿菌 $BssHIII$ -ssSTII TIRv.5融合至pPho41中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-STIIHc6.52-PhoA	大腸桿菌 $BssHIII$ -ssSTII TIRv.6融合至pPho41中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-STIIHc8.36-PhoA	大腸桿菌 $BssHIII$ -ssSTII TIRv.8融合至pPho41中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-STIILc1.0-PhoA	大腸桿菌 $MluI$ -ssSTII TIRv.1融合至pPho41中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-STIILc2.74-PhoA	大腸桿菌 $MluI$ -ssSTII TIRv.2融合至pPho41中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-STIILc3.72-PhoA	大腸桿菌 $MluI$ -ssSTII TIRv.3融合至pPho41中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-DsbAHc1.48-PhoA	大腸桿菌 $BssHIII$ -ssDsbA TIRv.1融合至pPho41中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-DsbAHc2.WT-PhoA	大腸桿菌 $BssHIII$ -ssDsbA TIRv.2融合至pPho41中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究

pBR-DsbAHc3.79-PhoA	大腸桿菌 <i>BssHIII</i> -ssDsbA TIRv.3 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-DsbAHc7.72-PhoA	大腸桿菌 <i>BssHIII</i> -ssDsbA TIRv.7 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-DsbALc1.WT-PhoA	大腸桿菌 <i>MluI</i> -ssDsbA TIRv.1 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-DsbALc2.3-PhoA	大腸桿菌 <i>MluI</i> -ssDsbA TIRv.2 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-DsbALc3.37-PhoA	大腸桿菌 <i>MluI</i> -ssDsbA TIRv.3 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-PhoAHc1.70-PhoA	大腸桿菌 <i>BssHIII</i> -ssPhoA TIRv.1 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-PhoAHc2.64-PhoA	大腸桿菌 <i>BssHIII</i> -ssPhoA TIRv.2 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-PhoAHc3.WT-PhoA	大腸桿菌 <i>BssHIII</i> -ssPhoA TIRv.3 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-PhoAHc4.67-PhoA	大腸桿菌 <i>BssHIII</i> -ssPhoA TIRv.4 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-PhoAHc5.71-PhoA	大腸桿菌 <i>BssHIII</i> -ssPhoA TIRv.5 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-PhoAHc6.77-PhoA	大腸桿菌 <i>BssHIII</i> -ssPhoA TIRv.6 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-PhoALc1.104-PhoA	大腸桿菌 <i>MluI</i> -ssPhoA TIRv.1 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-PhoAXb2.41-PhoA	大腸桿菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.2 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-PhoAXb3.WT-PhoA	大腸桿菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.3 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-PhoAXb5.53-PhoA	大腸桿菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.5 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-PhoAXb6.15-PhoA	大腸桿菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.6 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-PhoAXb7.1-PhoA	大腸桿菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.7 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-PhoAXb8.24-PhoA	大腸桿菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.8 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-PhoAXb10.23-PhoA	大腸桿菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.10 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-MalEHc1.92-PhoA	大腸桿菌 <i>BssHIII</i> -ssMalE TIRv.1 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-MalEHc2.100-PhoA	大腸桿菌 <i>BssHIII</i> -ssMalE TIRv.2 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-MalELc1.97-PhoA	大腸桿菌 <i>MluI</i> -ssMalE TIRv.1 融合至 pPho41 中之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究

pBR-MalELc2.123-PhoA	之 $\Delta(1-22)$ PhoA 大腸桿菌 <i>MluI</i> -ssMalE TIRv.2 融合至 pPho41 中	本研究
pBR-MalEXb1.WT-PhoA	之 $\Delta(1-22)$ PhoA 大腸桿菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.1 融合至 pPho41 中	本研究
pBR-MalEXb2.15-PhoA	之 $\Delta(1-22)$ PhoA 大腸桿菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.2 融合至 pPho41 中	本研究
pBR-MalEXb3.12-PhoA	之 $\Delta(1-22)$ PhoA 大腸桿菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.3 融合至 pPho41 中	本研究
pBR-MalEXb5.37-PhoA	大腸桿菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.5 融合至 pPho41 中 之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-MalEXb6.4-PhoA	大腸桿菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.6 融合至 pPho41 中 之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-MalEXb7.25-PhoA	大腸桿菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.7 融合至 pPho41 中 之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-MalEXb8.13-PhoA	大腸桿菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.8 融合至 pPho41 中 之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-MalEXb11.34-PhoA	大腸桿菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.11 融合至 pPho41 中 之 $\Delta(1-22)$ PhoA	本研究
pBR-SS-5D5-1.1	STII TIRv.1 融合至 5D5 Hc、STII TIRv.1 融合至 5D5 Lc	本研究
pBR-SS-5D5-1.2	STII TIRv.1 融合至 5D5 Hc、STII TIRv.2 融合至 5D5 Lc	本研究
pBR-SS-5D5-2.1	STII TIRv.2 融合至 5D5 Hc、STII TIRv.1 融合至 5D5 Lc	本研究
pBR-SS-5D5-2.2	STII TIRv.2 融合至 5D5 Hc、STII TIRv.2 融合至 5D5 Lc	本研究
pBR-SM-5D5-1.1	STII TIRv.1 融合至 5D5 Hc、MalE TIRv.1 融合至 5D5 Lc	本研究
pBR-SM-5D5-1.2	STII TIRv.1 融合至 5D5 Hc、MalE TIRv.2 融合至 5D5 Lc	本研究
pBR-SM-5D5-2.1	STII TIRv.2 融合至 5D5 Hc, MalE TIRv.1 融合至 5D5 Lc	本研究
pBR-SM-5D5-2.2	STII TIRv.2 融合至 5D5 Hc、MalE TIRv.2 融合至 5D5 Lc	本研究
pBR-SD-5D5-1.1	STII TIRv.1 融合至 5D5 Hc、DsbA TIRv.1 融合至 5D5 Lc	本研究
pBR-SD-5D5-1.2	STII TIRv.1 融合至 5D5 Hc、DsbA TIRv.2 融合至 5D5 Lc	本研究
pBR-SD-5D5-2.1	STII TIRv.2 融合至 5D5 Hc、DsbA TIRv.1 融合至 5D5 Lc	本研究
pBR-SD-5D5-2.2	STII TIRv.2 融合至 5D5 Hc、DsbA TIRv.2 融合	本研究

	至5D5 Lc	
pBR-SP-5D5-1.1	STII TIRv.1融合至5D5 Hc、PhoA TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-SP-5D5-1.2	STII TIRv.1融合至5D5 Hc、PhoA TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-SP-5D5-2.1	STII TIRv.2融合至5D5 Hc、PhoA TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-SP-5D5-2.2	STII TIRv.2融合至5D5 Hc、PhoA TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-MS-5D5-1.1	MalE TIRv.1融合至5D5 Hc、STII TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-MS-5D5-1.2	MalE TIRv.1融合至5D5 Hc、STII TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-MS-5D5-2.1	MalE TIRv.2融合至5D5 Hc、STII TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-MS-5D5-2.2	MalE TIRv.2融合至5D5 Hc、STII TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-MM-5D5-1.1	MalE TIRv.1融合至5D5 Hc、MalE TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-MM-5D5-1.2	MalE TIRv.1融合至5D5 Hc、MalE TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-MM-5D5-2.1	MalE TIRv.2融合至5D5 Hc、MalE TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-MM-5D5-2.2	MalE TIRv.2融合至5D5 Hc、MalE TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-MD-5D5-1.1	MalE TIRv.1融合至5D5 Hc、DsbA TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-MD-5D5-1.2	MalE TIRv.1融合至5D5 Hc、DsbA TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-MD-5D5-2.1	MalE TIRv.2融合至5D5 Hc、DsbA TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-MD-5D5-2.2	MalE TIRv.2融合至5D5 Hc、DsbA TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-MP-5D5-1.1	MalE TIRv.1融合至5D5 Hc、PhoA TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-MP-5D5-1.2	MalE TIRv.1融合至5D5 Hc、PhoA TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-MP-5D5-2.1	MalE TIRv.2融合至5D5 Hc、PhoA TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-MP-5D5-2.2	MalE TIRv.2融合至5D5 Hc、PhoA TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-DS-5D5-1.1	DsbA TIRv.1融合至5D5 Hc、STII TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-DS-5D5-1.2	DsbA TIRv.1融合至5D5 Hc、STII TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究

pBR-DS-5D5-2.1	DsbA TIRv.2融合至5D5 Hc、STII TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-DS-5D5-2.2	DsbA TIRv.2融合至5D5 Hc、STII TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-DM-5D5-1.1	DsbA TIRv.1融合至5D5 Hc、MalE TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-DM-5D5-1.2	DsbA TIRv.1融合至5D5 Hc、MalE TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-DM-5D5-2.1	DsbA TIRv.2融合至5D5 Hc、MalE TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-DM-5D5-2.2	DsbA TIRv.2融合至5D5 Hc、MalE TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-DD-5D5-1.1	DsbA TIRv.1融合至5D5 Hc、DsbA TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-DD-5D5-1.2	DsbA TIRv.1融合至5D5 Hc、DsbA TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-DD-5D5-2.1	DsbA TIRv.2融合至5D5 Hc、DsbA TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-DD-5D5-2.2	DsbA TIRv.2融合至5D5 Hc、DsbA TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-DP-5D5-1.1	DsbA TIRv.1融合至5D5 Hc、PhoA TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-DP-5D5-1.2	DsbA TIRv.1融合至5D5 Hc、PhoA TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-DP-5D5-2.1	DsbA TIRv.2融合至5D5 Hc、PhoA TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-DP-5D5-2.2	DsbA TIRv.2融合至5D5 Hc、PhoA TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-PS-5D5-1.1	PhoA TIRv.1融合至5D5 Hc、STII TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-PS-5D5-1.2	PhoA TIRv.1融合至5D5 Hc、STII TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-PS-5D5-2.1	PhoA TIRv.2融合至5D5 Hc、STII TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-PS-5D5-2.2	PhoA TIRv.2融合至5D5 Hc、STII TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-PM-5D5-1.1	PhoA TIRv.1融合至5D5 Hc、MalE TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-PM-5D5-1.2	PhoA TIRv.1融合至5D5 Hc、MalE TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-PM-5D5-2.1	PhoA TIRv.2融合至5D5 Hc、MalE TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-PM-5D5-2.2	PhoA TIRv.2融合至5D5 Hc、MalE TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究

pBR-PD-5D5-1.1	PhoA TIRv.1融合至5D5 Hc、DsbA TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-PD-5D5-1.2	PhoA TIRv.1融合至5D5 Hc、DsbA TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-PD-5D5-2.1	PhoA TIRv.2融合至5D5 Hc、DsbA TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-PD-5D5-2.2	PhoA TIRv.2融合至5D5 Hc、DsbA TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-PP-5D5-1.1	PhoA TIRv.1融合至5D5 Hc、PhoA TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-PP-5D5-1.2	PhoA TIRv.1融合至5D5 Hc、PhoA TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究
pBR-PP-5D5-2.1	PhoA TIRv.2融合至5D5 Hc、PhoA TIRv.1融合至5D5 Lc	本研究
pBR-PP-5D5-2.2	PhoA TIRv.2融合至5D5 Hc、PhoA TIRv.2融合至5D5 Lc	本研究

Hc=重鏈

Lc=輕鏈

5D5=抗 c-met單株抗體純系 5D5.v2。5D5.v2重鏈及輕鏈序列示於圖 7 中，且亦描述於例如 WO2006/015371；Jin 等人，Cancer Res (2008) 68:4360 中。

表 2：信號序列變異體

粗斜體=已變化之序列(亦即，起始密碼子之後的前 6 個胺基酸)

斜體=*Bss*HII、*Mlu*I或*Xba*I限制位點

親本基因	純系ID	相關基因型/表型	相對TIR強度	SEQ ID NO:
<i>stII</i>	SH1.2	<i>GCGCGCATTATGAAGAAAAACATCGCTT</i> <i>TT</i> CTTCTTGCACTCTATGTTTCGTTTTTCTAT T GCTACAAACGCTTACGCT	0.99 ± 0.07	1

	SH2.41	<i>GCGCGCATTATGAAAAAAATATAGCGT T TCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTTCTA TTGCTACAAACGCTTACGCT</i>	1.94 ± 0.05	2
	SH3.38	<i>GCGCGCATTATGAAAAAAACATTGCCT TTC TTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTTCTATT GC TACAAACGCTTACGCT</i>	2.9 ± 0.2	3
	SH4.60	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGAATATTGCCT TT CTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTTCTAT T GCTACAAACGCTTACGCT</i>	4.1 ± 0.1	4
	SH5.34	<i>GCGCGCATTATGAAGAAAAATATTGCAT TC CTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTTCTA TTGCTACAAACGCTTACGCT</i>	5.0 ± 0.2	5
	SH6.52	<i>GCGCGCATTATGAAAAAAATATTGCAT TTCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT</i>	5.9 ± 0.2	6
	SH8.36	<i>GCGCGCATTATGAAAAAAATATTGCTT TTCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT</i>	7.7 ± 0.1	7
	SL1.2	<i>ACGCGTATTATGAAGAAAAACATCGCTT TTCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT</i>	0.75 ± 0.07	8
	SL2.74	<i>ACGCGTATTATGAAAAAGAATATCGCCT TTCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT</i>	1.9 ± 0.2	9
	SL3.72	<i>ACGCGTATTATGAAAAAAATATTGCTTT TCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTTCTA TTGCTACAAACGCTTACGCT</i>	2.9 ± 0.2	10
<i>malE</i>	MH1.92	<i>GCGCGCATTATGAAAATTAAGACTGGAG CACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	1.1 ± 0.1	11
	MH2.100	<i>GCGCGCATTATGAAGATTAAAACCGGAG CCCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	1.9 ± 0.1	12
	ML1.97	<i>ACGCGTATTATGAAGATCAAGACAGGCG CGCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	1.1 ± 0.1	13
	ML2.123	<i>ACGCGTATTATGAAGATCAAGACAGGGG CCCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	2.0 ± 0.1	14

	MX1.wt	<i>TCTAGAATTATGAAAATAAAAAACAGGTG CACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	1.1 ± 0.1	15
	MX2.15	<i>TCTAGAATTATGAAAATTAAGACGGGGG CGCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	2.0 ± 0.1	16
	MX3.12	<i>TCTAGAATTATGAAAATCAAAACCGGCG CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	3.01 ± 0.09	17
	MX5.37	<i>TCTAGAATTATGAAGATCAAGACTGGAG CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	5.0 ± 0.2	18
	MX6.4	<i>TCTAGAATTATGAAAATAAAGACGGGAG CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	5.8 ± 0.3	19
	MX7.25	<i>TCTAGAATTATGAAGATAAAGACTGGTG CGCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	7.1 ± 0.2	20
	MX8.13	<i>TCTAGAATTATGAAAATTAAGACGGGAG CACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	8.2 ± 0.3	21
	MX11.34	<i>TCTAGAATTATGAAGATTAAAGACGGGCG CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	10.8 ± 0.5	22
<i>phoA</i>	PH1.70	<i>GCGCGCATTATGAAACAATCCACGATTG CCCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC</i>	1.14 ± 0.05	23
	PH2.64	<i>GCGCGCATTATGAAACAGTCGACGATC GCACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTA CCCCTGTGACAAAAGCC</i>	1.93 ± 0.03	24
	PH3.wt	<i>GCGCGCATTATGAAACAAGCACTATTG CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC</i>	2.8 ± 0.1	25
	PH4.67	<i>GCGCGCATTATGAAGCAATCTACTATCG CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC</i>	3.7 ± 0.1	26
	PH5.71	<i>GCGCGCATTATGAAGCAATCAACTATCG CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC</i>	5.1 ± 0.3	27
	PH6.77	<i>GCGCGCATTATGAAACAATCTACTATTG CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC</i>	6.0 ± 0.4	28

	PL1.104	<i>ACGCGTATTATGAAACAGTCTACTATCG CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC</i>	1.00 ± 0.07	29
	PX2.41	<i>TCTAGAATTATGAAGCAGAGTACGATTG CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC</i>	2.0 ± 0.1	30
	PX3.wt	<i>TCTAGAATTATGAAACAAGCACTATTGC ACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACC CCTGTGACAAAAGCC</i>	3.39 ± 0.09	31
	PX5.53	<i>TCTAGAATTATGAAGCAATCCACAATAGC TCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACC CCTGTGACAAAAGCC</i>	4.9 ± 0.1	32
	PX6.15	<i>TCTAGAATTATGAAACAATCCACCATTGC CCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACC CCTGTGACAAAAGCC</i>	5.9 ± 0.2	33
	PX8.24	<i>TCTAGAATTATGAAACAGTCTACTATCGC GCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACC CCTGTGACAAAAGCC</i>	8.0 ± 0.1	34
	PX10.23	<i>TCTAGAATTATGAAACAATCCACAATCGC ACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACC CCTGTGACAAAAGCC</i>	10.0 ± 0.4	35
<i>dsbA</i>	DH1.48	<i>GCGCGCATTATGAAAAAATTTGGCTCG CCCTGGCTGGTTTAGTTTACGCTTTAG CGCATCGGCG</i>	0.80 ± 0.03	36
	DH2.wt	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGATTTGGCTGG CGCTGGCTGGTTTAGTTTACGCTTTAG CGCATCGGCG</i>	1.89 ± 0.09	37
	DH3.79	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGATATGGCTGG CTCTGGCTGGTTTAGTTTACGCTTTAG CGCATCGGCG</i>	2.92 ± 0.08	38
	DH7.72	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGATATGGTTGG CTCTGGCTGGTTTAGTTTACGCTTTAG CGCATCGGCG</i>	6.7 ± 0.2	39
	DL1.wt	<i>ACGCGTATTATGAAAAAGATTTGGCTGG CGCTGGCTGGTTTAGTTTACGCTTTAG CGCATCGGCG</i>	1.0 ± 0.1	40
	DL2.3	<i>ACGCGTATTATGAAGAAAATTTGGTTGG CTCTGGCTGGTTTAGTTTACGCTTTAG CGCATCGGCG</i>	1.87 ± 0.09	41
	DL3.37	<i>ACGCGTATTATGAAGAAGATTTGGTTA GCACTGGCTGGTTTAGTTTACGCTTTA GCGCATCGGCG</i>	2.6 ± 0.1	42

wt=野生型

表 3：最終時間點醱酵效價

體積已 DsbA/DsbC 指定至其表現。

重鏈信號序列 (TIR) / 輕鏈信號序列 (TIR)	DsbA/C (+/-)	相對全長Ab效價*
STII (1)/STII (1)	-	1.0
STII (1)/STII (1)	+	4.9
STII (1)/PhoA (1)	-	0.6
STII (1)/PhoA (1)	+	5.6
STII (2)/STII (2)	+	0.8
MalE (1)/STII (1)	-	0.4
MalE (1)/PhoA (1)	-	0.4
MalE (1)/PhoA (1)	+	1.5
DsbA (1)/STII (1)	-	1.4
DsbA (1)/STII (1)	+	3.3
DsbA (1)/STII (2)	+	3.6
DsbA (2)/STII (1)	-	0.9
DsbA (1)/MalE (1)	-	1.7
DsbA (1)/MalE (1)	+	10.1
DsbA (1)/DsbA (1)	-	1.9
DsbA (1)/DsbA (1)	+	12.7
DsbA (2)/DsbA (2)	+	10.6
DsbA (1)/PhoA (1)	-	1.9
DsbA (1)/PhoA (1)	+	10.0
DsbA (2)/PhoA (1)	-	1.5
DsbA (2)/PhoA (1)	+	6.7
PhoA (1)/STII (1)	-	0.3

*所有樣本均相對於STII (1)/STII (1)樣本之效價校正，其包含在不存在伴隨蛋白DsbA及DsbC下表現之全長抗體。

結果/討論

對於表示用於通過大腸桿菌中之內膜轉運的兩個主要分泌路徑之信號肽：sec(PhoA、MalE)及SRP(DsbA、STII)，吾等已開發出新穎變異轉譯起始區(TIR)信號肽庫(圖2、表2)。各集合庫包含一組包含具有不同轉譯強度之變異TIR的載體，從而提供一種容易地調節指定相關蛋白質之轉譯量的方式。麥芽糖結合細胞周質蛋白(MalE)及鹼性磷酸酶(PhoA)信號肽藉助於分子馬達SecA指導以轉譯後方式自細胞質移位至細胞周質。熱穩定腸毒素II(stII)及硫氫基:二硫鍵互換蛋白(dsbA)信號肽藉助於信號識別粒子(SRP)指導以共轉譯方式移位(圖1)。

在構築集合庫期間，將*BssHII*、*MluI*或*XbaI*限制位點插入親本基因起始密碼子上游之9個鹼基對(bps)處。視所存在之限制位點類型而定，觀察到不同範圍之TIR強度(圖2)。一般而言，帶有*MluI*位點之序列呈現最小範圍之TIR強度(約1-3)，而上游之*BssHII*位點允許中等範圍之TIR強度(約1-8)，*XbaI*位點之範圍最大(約1-11)。未轉譯區中所存在之此等限制位點涵蓋於TIR中(3)。雖然不能排除所檢查之任何信號肽/限制位點組合均可能存在更高TIR變異體的可能性，但此等結果似乎表示所檢查之各信號肽庫的平均TIR強度。

構築一系列質體以說明轉譯量及信號肽對分泌之影響。在各狀況下，將相關基因插入phoA啟動子、trp Shine-Dalgarno及具有不同相對TIR強度之信號序列的下游。以搖瓶規模轉型並誘導phoA啟動子後，藉由SDS-PAGE分析

來自表現異源蛋白質抗c-met抗體純系5D5.v2之完整細胞的溶解產物。在此等實驗中，改變重鏈或輕鏈TIR，而相應輕鏈或重鏈分別保持不變。

圖3顯示重鏈信號肽操作之結果。當用 α -Fc特異性抗體探測時，與其他信號肽變異體相比，ssDsbA-重鏈TIR 1變異體在全長抗體(FL-Ab)以及重鏈-輕鏈(HL)二聚物及重鏈-重鏈-輕鏈(HHL)物質方面顯著增加(圖3A，頂部印跡)。檢查獲自此等樣本之總重鏈顯示在所檢查之所有信號肽融合體之間含量相對類似(圖3A，底部印跡)。當用 α - κ Lc抗體觀察輕鏈時，獲得類似結果，其中ssDsbA-重鏈TIR 1變異體再次呈現最高含量之FL-Ab(圖3B，頂部印跡)。令人驚訝的是，DsbA TIR 1重鏈融合體樣本缺乏其他樣本中所見之低質量物質(預測之輕鏈-輕鏈(LL)二聚物及游離輕鏈)。一般而言，在轉譯後信號(MalE、PhoA)融合至重鏈的情況下，所表現之總輕鏈似乎比在共轉譯(STII、DsbA)信號肽融合體之情況下多(圖3B，底部印跡)。一般而言，對於融合至重鏈及全長抗體產生之信號肽觀察到以下次序：DsbA>STII>MalE>PhoA。值得注意的是，DsbA變異體TIR與STII變異體TIR相比致使表現增加(例如全長抗體之表現)，儘管相對TIR強度並不變化(亦即兩個TIR均為強度1)。

圖4顯示輕鏈信號肽操作之結果。將獲自STII TIR 1變異體之輕鏈信號肽變成PhoA TIR 1或2變異體使得FL-Ab效價顯著增加(圖4，頂部印跡)。融合至輕鏈之信號肽之修飾似

乎不影響所表現之重鏈總量(圖4，中部印跡)，但確實顯著改變所存在之輕鏈的總量，在STII或DsbA TIR變異體2融合至輕鏈的樣本中出現經加工之輕鏈的最大累積(圖4，底部印跡)。當融合至轉譯後信號肽時，在總輕鏈樣本中觀察到兩個帶，指示未經加工之輕鏈。一般而言，對於融合至輕鏈及全長抗體產生之信號肽觀察到以下次序： $\text{PhoA} \geq \text{MalE} > \text{STII} > \text{DsbA}$ 。

監測來自10 L醱酵之抗體物質隨時間之組裝顯示與圖3及圖4中所示之搖瓶實驗相似的結果。在來源於DsbA之TIR變異體融合至重鏈及來源於DsbA或PhoA之信號肽融合至輕鏈的樣本中觀察到最高量之FL-Ab(圖5，頂部印跡)。此等樣本所呈現之HHL及HL二聚物亦多於STII TIR 1重鏈融合體。另外，在PhoA TIR 1信號肽融合至輕鏈之樣本中容易看見LL二聚物及游離輕鏈。檢查經還原總蛋白樣本顯示在醱酵之表現誘導條件下DsbA信號肽融合體比STII融合體產生更多總重鏈(圖5，中部印跡)。類似於輕鏈信號肽融合體，對於DsbA TIR 1信號肽融合體比STII TIR 1觀察到更高輕鏈累積(圖5，底部印跡)。然而，對於PhoA TIR 1信號肽融合體可見最高輕鏈累積。在取自搖瓶之總輕鏈樣本中可見的兩個帶在醱酵樣本中僅呈現為一個帶，表明輕鏈在10 L醱酵期間經更有效地處理。

使不同信號肽融合至大腸桿菌 *phoA* 基因之成熟域(mPhoA)以進一步檢查在融合至來源於STII或DsbA之TIR變異體及在誘導條件下於搖瓶培養物中表現時總輕鏈或總

重鏈表現量之差異。觀察到對總輕鏈及總重鏈表現量之影響相似(圖6)。當誘導蛋白質表現時，mPhoA之表現顯示伴隨DsbA信號肽融合體之TIR強度增加而增加，直至TIR強度7(本研究中所使用之最高TIR強度)。對於STII信號肽融合體，觀察到mPhoA表現類似地隨TIR強度增加而增加，直至TIR強度6或8，其中mPhoA之量與STII TIR 3樣本中所存在之mPhoA相比似乎有所降低。令人驚奇的是，使用DsbA強度1 TIR比使用STII強度1 TIR產生更多重鏈及輕鏈，且STII驅動之PhoA移位與DsbA驅動之PhoA移位相比較低的總蛋白質濃度下達到最大量。此外，將TIR序列由STII變成DsbA使TIR效應之動態範圍增加。

使用基於蛋白質-L之HPLC檢定分析獲自10 L醱酵之樣本的抗體效價(表3)。HPLC數據與西方墨點分析所顯示之定性效價水準高度一致(圖3、圖4)。當重鏈信號序列由來源於STII之TIR變異體變成來源於Dsb之TIR變異體時，FL-Ab效價增加約40-90%。當DsbA 1重鏈融合體與融合至DsbA、MalE或PhoA TIR 1信號肽之輕鏈配對時產生最高效價。當輕鏈融合至MalE或PhoA TIR信號肽時，產生最高效價。

相反，當轉譯後信號肽融合至重鏈時FL-Ab效價下降，PhoA TIR 1及MalE TIR 1信號肽融合體分別顯示效價下降70%及60%。吾等推斷當共轉譯信號肽(例如DsbA)用於驅動轉譯時重鏈表現得以優化。

吾等測試伴隨蛋白過度表現之效應。伴隨蛋白DsbA及

DsbC(本文中有時稱為DsbA/C)之過度表現增強DsbA信號肽融合至重鏈及DsbA、PhoA或MalE信號融合至輕鏈的益處。當與由STII TIR 1信號融合至重鏈及輕鏈(SS1.1 +伴隨蛋白)達成之FL-Ab表現相比時，對於DsbA TIR 1-重鏈融合體與MalE、PhoA或DsbA TIR 1輕鏈融合體偶合可見FL-Ab效價增加約2至2.5倍。

吾等檢查信號肽融合至抗體之輕鏈及重鏈與最終抗體效價之間的關係。當共轉譯(例如DsbA或STII)信號肽融合至重鏈之N-末端時，完全組裝之抗體(FL-Ab)效價最高，而來源於DsbA之TIR變異體產生最大觀察FL-Ab產率。因而，在誘導條件下，DsbA TIR變異體可允許過渡蛋白質之轉譯量比STII TIR變異體高，從而使經加工之過渡蛋白質之表現量較高。相反，當轉譯後信號肽(亦即MalE或PhoA)融合至重鏈時抗體效價顯著下降。此效應可歸因於蛋白水解或可歸因於重鏈所遵循的不同摺疊路徑(6)。檢查表現PhoA或MalE TIR 1信號肽融合至重鏈之樣本的總重鏈含量顯示表觀質量略有變化，可能歸因於存在未經加工之重鏈(圖3A，底部印跡)。

來源於轉譯後信號肽MalE或來源於轉譯後信號肽PhoA之TIR變異體融合至輕鏈使得10 L醱酵期間隨STII所介導之移位經加工之輕鏈大量累積，且抗體效價增加(圖5，底部印跡)。當DsbA TIR變異體使輕鏈移位時亦觀察到輕鏈以及FL-Ab之產率與STII TIR變異體使輕鏈移位相比增加。然而，DsbA TIR 1變異體所表現之總輕鏈之量不如

PhoA或MalE TIR 1變異體般大。有趣的是，分析隨時間取自10 L醱酵之樣本表明，用融合至MalE、DsbA或PhoA TIR變異體之輕鏈操作之FL-Ab效價不斷隨時間增加，而與STII TIR變異體融合不僅達到較低最大效價，而且更早達到此效價水準(圖5，頂部印跡)。因而，此等數據表明輕鏈可有效地以共轉譯或轉譯後方式移位，而重鏈需要共轉譯移位以達成峰值表現。

單臂抗c-met抗體之表現：吾等評估融合至單臂抗體之輕鏈、重鏈及Fc之信號肽與最終抗體效價之間的關係。使用TIR為1的STII信號序列融合至輕鏈、重鏈及Fc多肽；使用TIR為1的PhoA信號序列(SEQ ID NO: 29)融合至輕鏈及TIR為1的DsbA信號序列(SEQ ID NO: 40)融合至重鏈及Fc片段；且使用TIR為1的PhoA信號序列融合至輕鏈及Fc片段，及TIR為1的DsbA信號序列融合至HC來構築質體。自最終操作樣本獲得相對效價數，並使用上述蛋白質L-逆相HPLC檢定進行量測。相對於表4第一列情況(TIR=1之STII信號序列融合至LC、HC及Fc，不共表現DsbA/C)下之效價校正相對效價值。

結果示於表4中。當共轉譯(例如DsbA)信號肽融合至重鏈之N末端時，轉譯後(例如PhoA)信號肽融合至輕鏈之N末端時及轉譯後(例如PhoA)信號肽融合至Fc區時單臂抗體之相對效價最高，且在DsbA/C存在下表現。一般而言，關於信號肽融合至輕鏈、重鏈及Fc片段且單臂抗體在DsbA/C存在下表現觀察到以下次序：P.D.D>P.D.P.>S.S.S。在所有

測試樣本中，不存在 DsbA/C 時之表現量相似，其中分泌至細胞周質中之大部分抗體聚集。二硫鍵伴隨蛋白之共表現增加所產生之摺疊抗體，因而顯示藉由 TIR 優化實現抗體表現增加。

表 4：單價單臂抗 c-met 抗體 (MetMAb) 之表現

質體	LC、HC、Fc	DsbA/C	相對效價
pxCM11H.v2.H.Fc.1.K.2192	STII TIR 1 融合至 Lc、Hc 及 Fc	-	1.0
pxCM11H.v2.H.Fc.1.K.2192	STII TIR 1 融合至 Lc、Hc 及 Fc	+	1.7
pPDD.111.MetMAb	PhoA TIR 1 融合至 Lc；DsbA TIR 1 融合至 Hc 及 Fc	-	1.0
pPDD.111.MetMAb	PhoA TIR 1 融合至 Lc；DsbA TIR 1 融合至 Hc 及 Fc	+	3.8
pPDP.111.MetMAb	PhoA TIR 1 融合至 Lc；DsbA TIR 1 融合至 Hc；PhoA TIR 融合至 Fc	-	0.7
pPDP.111.MetMAb	PhoA TIR 1 融合至 Lc；DsbA TIR 1 融合至 Hc；PhoA TIR 融合至 Fc	+	2.5

縮寫：D=信號序列 DsbA；P=信號序列 PhoA。
XXX#.#.#(例如 PDP.111)係指實驗中所使用之輕鏈信號序列、重鏈信號序列、Fc 信號序列、輕鏈 TIR、重鏈 TIR、Fc TIR。

總之，此技術提供經由自 TIR 變異體之新陣列中選擇操作輕鏈及重鏈表現，且進一步藉由針對輕鏈使用共轉譯或轉譯後信號序列且針對重鏈使用共轉譯信號序列來增加例如在大腸桿菌中摺疊抗體產率之新穎方式。亦使用本文中所示之新穎 TIR 變異體，且進一步藉由針對輕鏈使用共轉譯或轉譯後信號序列、針對重鏈使用共轉譯信號序列及

針對所產生之Fc多肽使用共轉譯或轉譯後信號序列來改良包含重鏈、輕鏈及Fc區之單臂抗體的表現。總體而言，此方法之效用似乎廣泛適用於多種抗體(例如包含杵狀及臼狀突變之雙特異性抗體)、抗體衍生物及基於細菌之重組蛋白質生產。

部分參考文獻列表

1. Simmons, L. C., Reilly, D., Klimowski, L., Raju, T. S., Meng, G., Sims, P., Hong, K., Shields, R. L., Damico, L. A., Rancatore, P., 及 Yansura, D. G. (2002) Journal of immunological methods 263(1-2), 133-147

2. Stemmer, W. P., Morris, S. K., Kautzer, C. R., 及 Wilson, B. S. (1993) Gene 123(1), 1-7

3. Simmons, L. C., 及 Yansura, D. G. (1996) Nature biotechnology 14(5), 629-634

4. Le Calvez, H., Green, J. M., 及 Baty, D. (1996) Gene 170(1), 51-55

5. Jackson, R. W., 及 DeMoss, J. A. (1965) Journal of bacteriology 90(5), 1420-1425

6. Kadokura, H., 及 Beckwith, J. (2009) Cell 138(6), 1164-1173

雖然上文提及特定實施例，但應瞭解本發明並不侷限於此。一般熟習此項技術者應瞭解，可在不偏離本發明之總體概念下對所揭示之實施例作出各種修改。所有該等修改均意欲處於本發明範疇內。

【圖式簡單說明】

圖 1：所指示之信號肽通過細菌內膜移位。麥芽糖結合細胞周質蛋白(MalE)及鹼性磷酸酶(PhoA)信號肽藉助於分子馬達SecA指導以轉譯後方式自細胞質移位至細胞周質。熱穩定腸毒素II(stII)及巯基:二硫鍵交換蛋白(DsbA)信號肽藉助於信號識別粒子(SRP)指導以共轉譯方式移位。

圖 2：信號肽變異體之相對移位起始區強度。帶有含STII、MalE、PhoA或DsbA信號肽與大腸桿菌鹼性磷酸酶(BAP)基因成熟域之間的融合體之載體之27C7細胞的經校正基本鹼性磷酸酶活性。各條柱表示用發色受質PNPP培育之個別培養物，且按照該培養物在410 nm下之吸光度減去帶有空載體(pBR322)之培養物的吸光度來測定酶活性。相對於帶有質體pPho41之27C7細胞的基本活性校正活性。白色條柱表示*Bss*HII限制位點相對於起始密碼子之第一個鹼基對處於-9位置處的信號肽變異體。灰色或帶條紋條柱分別表示*Mlu*I或*Xba*I位點處於-9位置處。所有活性為7至10次重複實驗之平均值。誤差條柱報導為具有95%置信界限之平均值的不確定性。相鄰條柱之間的相對TIR強度差異均具統計顯著性($P < 0.001$)。

圖 3：監測重鏈信號肽操作下之抗體物質組裝。使64B4細胞在25 mL C.R.A.P.磷酸鹽限制培養基中生長24小時，且製備由光密度(OD)校正之可溶部分以及總蛋白離心塊以進行SDS-PAGE分析。(A)藉由SDS-PAGE凝膠電泳分離獲自帶有質體pBR-SS-5D5-1.1(SS1.1)、pBR-MS-5D5-

1.1(MS1.1) 、 pBR-DS-5D5-1.1(DS1.1) 或 pBR-PS-5D5-1.1(PS1.1)之細胞的樣本(質量(kDa)示於左側)，轉移至硝化纖維素，並用 α -Fc特異性抗體探測含重鏈物質之存在。可溶性樣本(頂部印跡)由對應於以下各物之推定鑑別帶(自上而下)組成：全長抗體、重鏈-重鏈-輕鏈(HHL)、重鏈-輕鏈(HL)或游離重鏈(重鏈單體)。用0.2 M DTT還原經校正之總蛋白樣本(底部印跡)以破壞二硫鍵結構，且各個別泳道遷移至表觀質量為約49 kDa之單一帶中。(B)使獲自(A)之樣本在另一SDS-PAGE凝膠上跑膠(質量(kDa)示於右側)，轉移至硝化纖維素並用 α - κ Lc特異性抗體探測含有輕鏈之複合物。可溶性樣本(頂部印跡)由對應於以下各物之推定鑑別帶(自上而下)組成：全長抗體、HL、輕鏈-輕鏈(LL)二聚物或游離輕鏈(輕鏈單體)。用0.2 M DTT還原經校正之總蛋白樣本(底部印跡)，且各個別泳道遷移至表觀質量為約25 kDa之單一帶中。縮寫：S=信號序列STII；M=信號序列MalE；D=信號序列DsbA；P=信號序列PhoA。XX#.#(例如DS1.1)係指實驗中所使用之重鏈信號序列、輕鏈信號序列、重鏈TIR、輕鏈TIR。

圖4：監測輕鏈信號肽操作下之抗體物質組裝。使64B4細胞在25 mL C.R.A.P.磷酸鹽限制培養基中生長24小時，且製備由光密度(OD)校正之可溶部分以及總蛋白離心塊以進行SDS-PAGE分析。藉由SDS-PAGE凝膠電泳分離獲自帶有質體 pBR-DS-5D5-1.1(DS1.1) 、 pBR-DS-5D5-1.2(DS1.2) 、 pBR-DM-5D5-1.1(DM1.1) 、 pBR-DM-5D5-

1.2(DM1.2) 、 pBR-DD-5D5-1.1(DD1.1) 、 pBR-DD-5D5-1.2(DD1.2)、 pBR-DP-5D5-1.1(DP1.1)或 pBR-DP-5D5-1.2之細胞的樣本(質量(kDa)示於左側)，轉移至硝化纖維素，並分別用 α -Fc或 α - κ Lc特異性抗體探測含重鏈或輕鏈之物質的存在，如沿影像右側所示。可溶性樣本(頂部印跡)由對應於以下各物之推定鑑別帶(自上而下)組成：全長抗體、重鏈-重鏈-輕鏈(HHL)、重鏈-輕鏈(HL)二聚物或游離重鏈(重鏈單體)。用0.2 M DTT還原經校正之總蛋白樣本(中部印跡，底部)以破壞二硫鍵結構，且在用 α -Fc抗體探測時各個別泳道遷移至表觀質量為約49 kDa之單一帶中。當用 α - κ Lc特異性抗體探測時，所有泳道均遷移至表觀質量為約25 kDa或約27 kDa及約25 kDa之單一帶或雙重帶中。縮寫：S=信號序列STII；M=信號序列Male；D=信號序列DsbA；P=信號序列PhoA。XX#.#(例如DS1.1)係指實驗中所使用之重鏈信號序列、輕鏈信號序列、重鏈TIR、輕鏈TIR。

圖5：監測獲自10 L醱酵之抗體物質隨時間之組裝。使64B4細胞在10 L醱酵罐中生長至高細胞密度歷經3天，以規定時間間隔獲取樣本(在接種後數小時內獲取時間樣本於各泳道上)，由其製備由光密度(OD)校正之可溶部分以及總蛋白離心塊以進行SDS-PAGE分析。藉由SDS-PAGE凝膠電泳分離獲自帶有共表現帶有伴隨蛋白之質體pJJ247之質體pBR-SS-5D5-1.1(SS1.1+伴隨蛋白)、pBR-DD-5D5-1.1與pJJ247(DD1.1+伴隨蛋白)、pBR-DS-5D5-1.1與

pJJ247(DM1.1+ 伴 隨 蛋 白) 或 pBR-DP-5D5-1.1 與 pJJ247(DP1.1+伴隨蛋白)之細胞的樣本(質量(kDa)示於左側), 轉移至硝化纖維素, 並分別用 α -Fc或 α - κ Lc特異性抗體探測含重鏈或輕鏈之物質的存在, 如沿影像之右側所示。可溶性樣本(頂部印跡)由對應於以下各物之推定鑑別帶(自上而下)組成: 全長抗體、重鏈-重鏈-輕鏈(HHL)、重鏈-輕鏈(HL)二聚物、輕鏈-輕鏈(LL)二聚物或游離輕鏈(輕鏈單體)。用0.2 mM DTT還原經校正之總蛋白樣本(中部印跡, 底部)以破壞二硫鍵結構, 且在用 α -Fc抗體探測時各個別泳道遷移至表觀質量為約49 kDa之單一帶中。當用 α - κ Lc特異性抗體探測時, 所有泳道均遷移至表觀質量為約25 kDa之單一帶中。縮寫: S=信號序列STII; M=信號序列MalE; D=信號序列DsbA; P=信號序列PhoA。XX#.#(例如DS1.1)係指實驗中所使用之重鏈信號序列、輕鏈信號序列、重鏈TIR、輕鏈TIR。

圖6: 成熟PhoA在誘導條件下之累積。使27C7細胞在25 mL C.R.A.P.磷酸鹽限制培養基中生長24小時, 且由光密度(OD)校正可溶部分且準備進行SDS-PAGE分析。使大腸桿菌phoA基因之成熟域融合至所指示之DsbA或STII(底部)TIR變異體(頂部)。藉由考馬斯藍染色檢視凝膠中蛋白質之存在。對應於PhoA成熟域之推定鑑別帶(右)呈現約47 kDa之質量(質量示於左側)。

圖7: 描繪MetMAb(OA5D5v2)之構架(FR)、CDR、第一恆定域(CL或CH1)及Fc區(Fc)的胺基酸序列。該圖揭示輕

鏈序列按呈現順序分別為SEQ ID NO 57-60、49-51及61；
且重鏈序列按呈現順序分別為SEQ ID NO 62-65、52-53及
66-68。所述Fc序列包含「白」狀(空穴)突變T366S、
L368A及Y407V，如WO 2005/063816所述。

圖8：描繪Fc多肽(SEQ ID NO: 47)之序列，其包含
「杵」狀(突出物)突變T366W，如WO 2005/063816所述。
在一實施例中，包含此序列之Fc多肽與包含圖7之Fc序列
的Fc多肽一起形成複合物，以產生Fc區。

序列表

<110> 美商建南德克公司

<120> 分泌異源多肽之方法及組合物

<130> P4386R1 WO

<140> 099138260

<141> 2010-11-05

<150> 61/258,565

<151> 2009-11-05

<160> 68

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 1

gcgcgcatta tgaagaaaaa catcgctttt cttcttgcac ctatgttctg tttttctatt 60

gctacaaacg cttacgct 78

<210> 2

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 2
gcgcgcatta tgaaaaaaa tatagcgttt cttcttgcat ctatgttcgt tttttctatt 60

gctacaaacg cttacgct 78

<210> 3
<211> 78
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 3
gcgcgcatta tgaaaaaaa cattgccttt cttcttgcat ctatgttcgt tttttctatt 60

gctacaaacg cttacgct 78

<210> 4
<211> 78
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 4
gcgcgcatta tgaaaaagaa tattgccttt cttcttgcat ctatgttcgt tttttctatt 60

gctacaaacg cttacgct 78

<210> 5
<211> 78
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 5
gcgcgcatta tgaagaaaaa tattgcattc cttcttgcac ctatgttcgt tttttctatt 60

gctacaaacg cttacgct 78

<210> 6
<211> 78
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 6
gcgcgcatta tgaaaaaaa tattgcattt cttcttgcac ctatgttcgt tttttctatt 60

gctacaaacg cttacgct 78

<210> 7
<211> 78
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 7
gcgcgcatta tgaaaaaaa tattgcattt cttcttgcac ctatgttcgt tttttctatt 60

gctacaaacg cttacgct 78

<210> 8

<211> 78
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 8
acgcgtatta tgaagaaaaa catcgctttt cttcttgcac ctatgttcgt tttttctatt 60

gctacaaacg cttacgct 78

<210> 9
<211> 78
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 9
acgcgtatta tgaaaaagaa tatcgctttt cttcttgcac ctatgttcgt tttttctatt 60

gctacaaacg cttacgct 78

<210> 10
<211> 78
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 10
acgcgtatta tgaaaaaaaa tattgctttt cttcttgcac ctatgttcgt tttttctatt 60

gctacaaacg cttacgct	78
<210> 11	
<211> 87	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”	
<400> 11	
gcgcgcatta tgaagattaa gactggagca cgcctcctcg cattatccgc attaacgacg	60
atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc	87
<210> 12	
<211> 87	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”	
<400> 12	
gcgcgcatta tgaagattaa aaccggagcc cgcctcctcg cattatccgc attaacgacg	60
atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc	87
<210> 13	
<211> 87	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”	

<400> 13
acgcgtatta tgaagatcaa gacaggcgcg cgcctcctcg cattatccgc attaacgacg 60

atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc 87

<210> 14
<211> 87
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 14
acgcgtatta tgaagatcaa gacaggggcc cgcctcctcg cattatccgc attaacgacg 60

atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc 87

<210> 15
<211> 87
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 15
tctagaatta tgaaaataaa aacagggtgca cgcctcctcg cattatccgc attaacgacg 60

atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc 87

<210> 16
<211> 87
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 16
 tctagaatta tgaaaattaa gacgggggcg cgcctcctcg cattatccgc attaacgacg 60
 atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc 87

<210> 17
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 17
 tctagaatta tgaaaatcaa aaccggcgct cgcctcctcg cattatccgc attaacgacg 60
 atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc 87

<210> 18
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 18
 tctagaatta tgaagatcaa gactggagct cgcctcctcg cattatccgc attaacgacg 60
 atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc 87

<210> 19

<211> 87
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 19
tctagaatta tgaaaataaa gacgggagct cgcatcctcg cattatccgc attaacgacg 60

atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc 87

<210> 20
<211> 87
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 20
tctagaatta tgaagataaa gactgggtgcg cgcatcctcg cattatccgc attaacgacg 60

atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc 87

<210> 21
<211> 87
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 21
tctagaatta tgaaaattaa gacgggagca cgcatcctcg cattatccgc attaacgacg 60

atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc	87
<210> 22	
<211> 87	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”	
<400> 22	
tctagaatta tgaagattaa gacgggcgct cgcctcctcg cattatccgc attaacgacg	60
atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc	87
<210> 23	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”	
<400> 23	
gcgcgcatta tgaaacaatc cagcattgcc ctggcactct taccgttact gtttaccct	60
gtgacaaaag cc	72
<210> 24	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”	

<400> 24
gcgcgcatta tgaacagtc gacgatcgca ctggcactct taccgttact gtttaccct 60

gtgacaaaag cc 72

<210> 25
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 25
gcgcgcatta tgaacaaaag cactattgca ctggcactct taccgttact gtttaccct 60

gtgacaaaag cc 72

<210> 26
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 26
gcgcgcatta tgaagcaatc tactatcgct ctggcactct taccgttact gtttaccct 60

gtgacaaaag cc 72

<210> 27
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 27
 gcgcgcatta tgaagcaatc aactatcgca ctggcactct taccgttact gtttaccct 60
 gtgacaaaag cc 72

<210> 28
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 28
 gcgcgcatta tgaacaatc tactattgca ctggcactct taccgttact gtttaccct 60
 gtgacaaaag cc 72

<210> 29
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 29
 acgcgtatta tgaacagtc tactatcgt ctggcactct taccgttact gtttaccct 60
 gtgacaaaag cc 72

<210> 30

<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 30
tctagaatta tgaagcagag tacgattgct ctggcactct taccgttact gtttaccct 60

gtgacaaaag cc 72

<210> 31
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 31
tctagaatta tgaacaaaag cactattgca ctggcactct taccgttact gtttaccct 60

gtgacaaaag cc 72

<210> 32
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 32
tctagaatta tgaagcaatc cacaatagct ctggcactct taccgttact gtttaccct 60

gtgacaaaag cc 72

<210> 33

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 33

tctagaatta tgaacaatc caccattgcc ctggcactct taccgttact gtttaccct 60

gtgacaaaag cc 72

<210> 34

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 34

tctagaatta tgaacagtc tactatcgcg ctggcactct taccgttact gtttaccct 60

gtgacaaaag cc 72

<210> 35

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 35
tctagaatta tgaacaacac cacaatcgca ctggcactct taccgttact gtttaccct 60

gtgacaaaag cc 72

<210> 36
<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 36
gcgcgcatta tgaaaaaat ttggctcgcc ctggctggtt tagtttttagc gtttagcgca 60

tcggcg 66

<210> 37
<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 37
gcgcgcatta tgaaaaagat ttggctggcg ctggctggtt tagtttttagc gtttagcgca 60

tcggcg 66

<210> 38
<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 38
gcgcgcatta tgaaaaagat atggctggct ctggctggtt tagtttttagc gtttagcgca 60

tcggcg 66

<210> 39
<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 39
gcgcgcatta tgaaaaagat atggctggct ctggctggtt tagtttttagc gtttagcgca 60

tcggcg 66

<210> 40
<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 40
acgcgtatta tgaaaaagat ttggctggcg ctggctggtt tagtttttagc gtttagcgca 60

tcggcg 66

<210> 41

<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 41
acgcgtatta tgaagaaat ttggttgct ctggctggtt tagtttttagc gtttagcgca 60

tcggcg 66

<210> 42
<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成寡核苷酸”

<400> 42
acgcgtatta tgaagaagat ttggttagca ctggctggtt tagtttttagc gtttagcgca 60

tcggcg 66

<210> 43
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 43
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 44

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 44

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 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg

- <210> 45
- <211> 449
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <221> source
- <223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 45
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 46

<211> 220

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 46

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 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

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

210

215

220

<210> 47

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 47

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

- <210> 48
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <221> source
- <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 48
Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10

<210> 49
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 49
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 50
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 51

Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 52

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His

1 5 10

<210> 53

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 53

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe

1 5 10 15

Lys Asp

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /置換= “Ser”

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> /注意= “序列中提供之殘基相對於該位置之註釋中的殘基無優選性”

<400> 54
Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 55
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 55
Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Ser Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 56
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 56

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

<210> 57

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 57

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
20

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 58

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 59

<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 59
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 60
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 61
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 61

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

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

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

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

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

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

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

<210> 62

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意=“人工序列之描述：合成肽”

<400> 62

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 63
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 63
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 64
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 64
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 65
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 65
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 66
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 66
Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 67
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 67
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 68

<211> 222

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /注意= “人工序列之描述：合成多肽”

<400> 68

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
130 135 140

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

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

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

七、申請專利範圍：

1. 一種變異轉譯起始區(TIR)，其包含PhoA、MalE、DsbA或STII分泌信號區之核酸變異體，其中該變異TIR包含SEQ ID NO 1-42中之一者之序列。
2. 如請求項1之變異TIR，其中該變異轉譯起始區包含SEQ ID NO 36-42中之一者之序列。
3. 如請求項1之變異TIR，其中該變異TIR包含SEQ ID NO. 1-14、16-24、26-39、41-42中之一者之序列。
4. 如請求項1之變異TIR，其中該變異轉譯起始區之轉譯強度小於野生型轉譯起始區之轉譯強度。
5. 如請求項1之變異TIR，其中該變異轉譯起始區之轉譯強度大於野生型轉譯起始區之轉譯強度。
6. 一種聚核苷酸，其包含如請求項1至5中任一項之變異TIR。
7. 一種聚核苷酸，其包含如請求項1至5中任一項之變異TIR以操作方式連接於編碼異源多肽之聚核苷酸，藉此當該異源多肽於宿主細胞中表現後，該異源多肽摺疊並組裝形成生物活性異源多肽。
8. 如請求項7之聚核苷酸，其中該異源多肽係選自抗體重鏈及抗體輕鏈。
9. 如請求項8之聚核苷酸，其中該異源多肽為抗體輕鏈。
10. 如請求項8之聚核苷酸，其中該異源多肽為抗體重鏈。
11. 如請求項7之聚核苷酸，其進一步包含啟動子。
12. 如請求項11之聚核苷酸，其中該啟動子為選自由phoA、

tac、lpp、lac-lpp、lac、ara及T7啟動子組成之群的原核生物啟動子。

13. 如請求項7之聚核苷酸，其中該異源多肽為蛋白酶、免疫黏附素、受體之細胞外域，或抗體。
14. 一種編碼抗體之聚核苷酸，該聚核苷酸包含(1)第一TIR以操作方式連接於編碼抗體重鏈之聚核苷酸，其中該TIR包含DsbA變異體共轉譯原核生物分泌信號序列，其中該第一TIR包含SEQ ID NO 36-42中之一者之序列；及(2)第二TIR以操作方式連接於編碼抗體輕鏈之聚核苷酸，其中該第二TIR包含共轉譯或轉譯後原核生物分泌信號序列，藉此在該抗體於宿主細胞中表現後，該重鏈及該輕鏈摺疊並組裝形成生物活性抗體。
15. 如請求項14之聚核苷酸，其中該第二轉譯起始區包含STII、DsbA、MalE或PhoA變異信號序列。
16. 如請求項15之聚核苷酸，其中該第二轉譯起始區包含PhoA或MalE變異信號序列。
17. 如請求項15之聚核苷酸，其中該第二轉譯起始區包含SEQ ID NO 1-42中之一者之序列。
18. 如請求項17之聚核苷酸，其中該第二轉譯起始區包含SEQ ID NO.1、2、8、9、11、13、29、36、37及40中之一者之序列。
19. 如請求項14之聚核苷酸，其中該宿主細胞進一步包含(3)第三轉譯起始區以操作方式連接於編碼Fc多肽之聚核苷酸。

20. 如請求項19之聚核苷酸，其中該第三轉譯起始區包含STII、PhoA、MalE或DsbA變異信號序列。
21. 如請求項20之聚核苷酸，其中該第三轉譯起始區包含PhoA或DsbA變異信號序列。
22. 如請求項20之聚核苷酸，其中該第三TIR包含SEQ ID NO 1-42中之一者之序列。
23. 如請求項14之聚核苷酸，其中該第一轉譯起始區及該第二轉譯起始區提供相等之轉譯強度。
24. 如請求項23之聚核苷酸，其中該相對轉譯強度為1或2。
25. 如請求項19之聚核苷酸，其中該第一、第二及第三轉譯起始區提供相等之轉譯強度。
26. 如請求項25之聚核苷酸，其中該相對轉譯強度為1或2。
27. 如請求項14之聚核苷酸，進一步包含啟動子。
28. 如請求項27之聚核苷酸，其中該啟動子為選自由phoA、tac、lpp、lac-lpp、lac、ara及T7啟動子組成之群的原核生物啟動子。。
29. 如請求項14之聚核苷酸，其中該宿主細胞為原核生物細胞。
30. 如請求項29之聚核苷酸，其中該原核生物細胞為大腸桿菌(*E. coli*)。
31. 如請求項30之聚核苷酸，其中該大腸桿菌為缺乏內源蛋白酶活性之菌株。
32. 如請求項30之聚核苷酸，其中該大腸桿菌之基因型缺乏degP及prc基因且含有突變spr基因。

33. 如請求項14之聚核苷酸，其中該宿主細胞進一步包含編碼至少一個選自由下列所組成之群的原核生物多肽的聚核苷酸：DsbA、DsbC、DsbG及FkpA。
34. 如請求項33之聚核苷酸，其中該聚核苷酸同時編碼DsbA及DsbC。
35. 如請求項14之聚核苷酸，其中該抗體為單株抗體。
36. 如請求項35之聚核苷酸，其中該抗體為嵌合抗體、親和力成熟抗體、雙特異性抗體、人類化抗體、抗體片段或人類抗體。
37. 如請求項36之聚核苷酸，其中該抗體片段為單臂抗體。
38. 如請求項37之聚核苷酸，其中該抗體結合c-met。
39. 如請求項36之聚核苷酸，其中該抗體為雙特異性抗體。
40. 如請求項38之聚核苷酸，其中該抗c-met抗體包含(a)包含具有序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVR
QAPGKGLEWVGMIDPSNSDTRFNP NFKDRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGTLV
TVSS(SEQ ID NO:43)之重鏈可變域、CH1序列及第一Fc
多肽的第一多肽；(b)包含具有序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLA
WYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFT
LTISLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIKR(SEQ
ID NO:44)之輕鏈可變域及CL1序列的第二多肽；及(c)包
含第二Fc多肽之第三多肽，其中該重鏈可變域及該輕鏈

可變域係以複合物形式存在，且形成單一抗原結合臂，其中該第一Fc多肽及該第二Fc多肽係以複合物形式存在，且形成的Fc區可以使該抗體片段之穩定性比包含該抗原結合臂之Fab分子提高。

41. 一種載體，其包含如請求項6至40中任一項之聚核苷酸。
42. 如請求項41之載體，其中該載體為表現載體。
43. 一種組合物，其包含如請求項6至40中任一項之聚核苷酸。
44. 一種宿主細胞，其包含如請求項6至40中任一項之聚核苷酸。
45. 如請求項44之宿主細胞，其中該宿主細胞為原核生物細胞。
46. 如請求項45之宿主細胞，其中該原核生物細胞為大腸桿菌。
47. 如請求項46之宿主細胞，其中該大腸桿菌為缺乏內源蛋白酶活性之菌株。
48. 如請求項46或47之宿主細胞，其中該大腸桿菌之基因型缺乏*degP*及*prc*基因且含有突變*spr*基因。
49. 如請求項44至47中任一項之宿主細胞，其中該宿主細胞進一步包含編碼原核生物伴隨蛋白之聚核苷酸。
50. 如請求項49之宿主細胞，其中該原核生物伴隨蛋白為DsbA及/或DsbC。
51. 如請求項49之宿主細胞，其中該宿主細胞過度表現原核

生物伴隨蛋白。

52. 一種產生異源多肽之方法，該方法包含培養如請求項44至51中任一項之宿主細胞，以便表現該核酸，藉此當該聚核苷酸於宿主細胞中表現後，該異源多肽摺疊形成生物活性異源多肽。
53. 如請求項52之方法，其中該方法進一步包含自該宿主細胞培養物回收該異源多肽。
54. 如請求項53之方法，其中該異源多肽係自該宿主細胞培養基回收。
55. 如請求項53或54之方法，其中該方法進一步包含組合所回收之異源多肽與醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑，以製備包含該異源多肽之醫藥調配物。
56. 一種自細胞分泌異源多肽之方法，該方法包含培養如請求項44至51中任一項之宿主細胞，以便表現該核酸，並分泌該異源多肽。
57. 如請求項52或56之方法，其中所形成之免疫球蛋白多肽複合物中至少50%為抗體。

八、圖式：

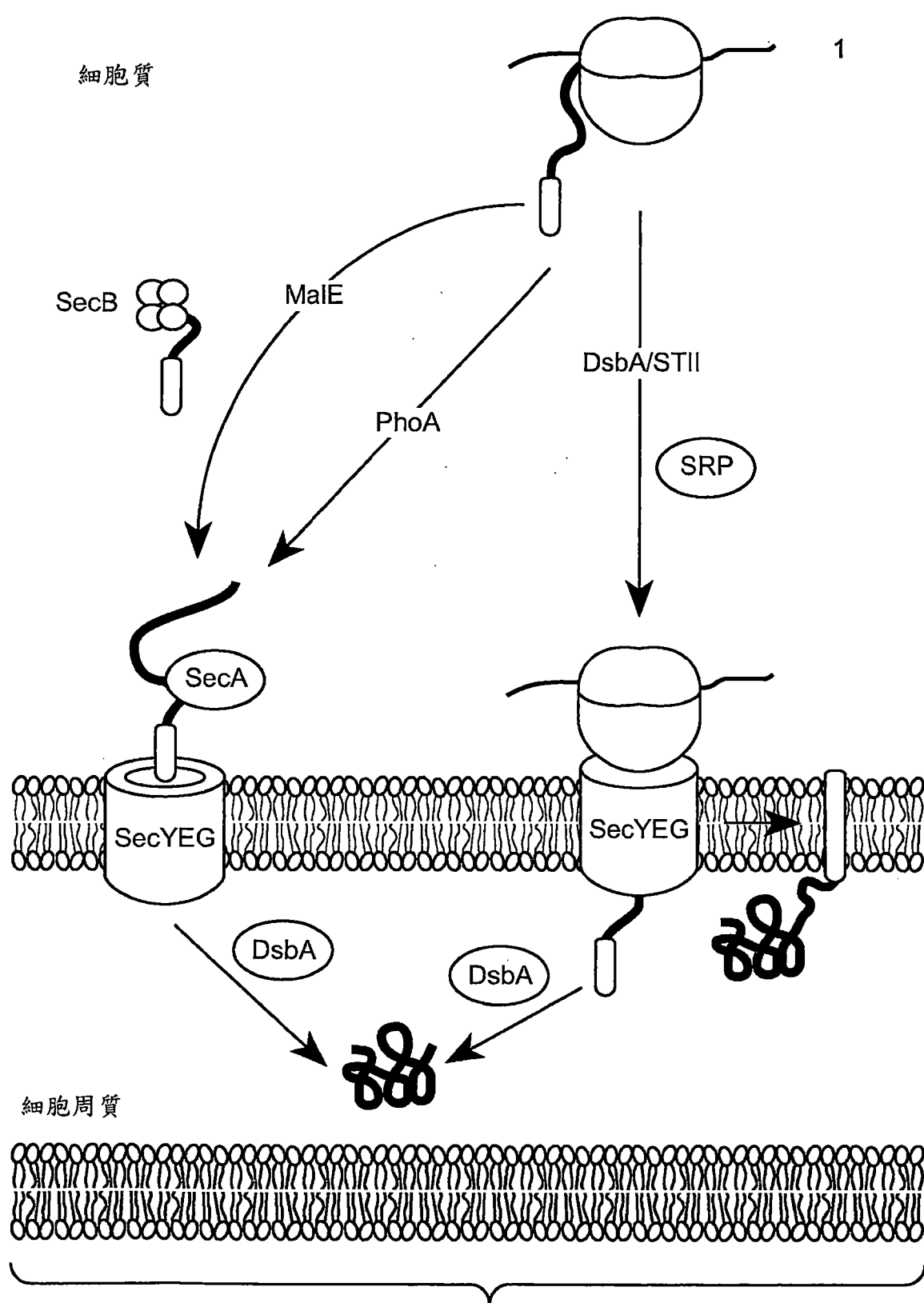


圖 1

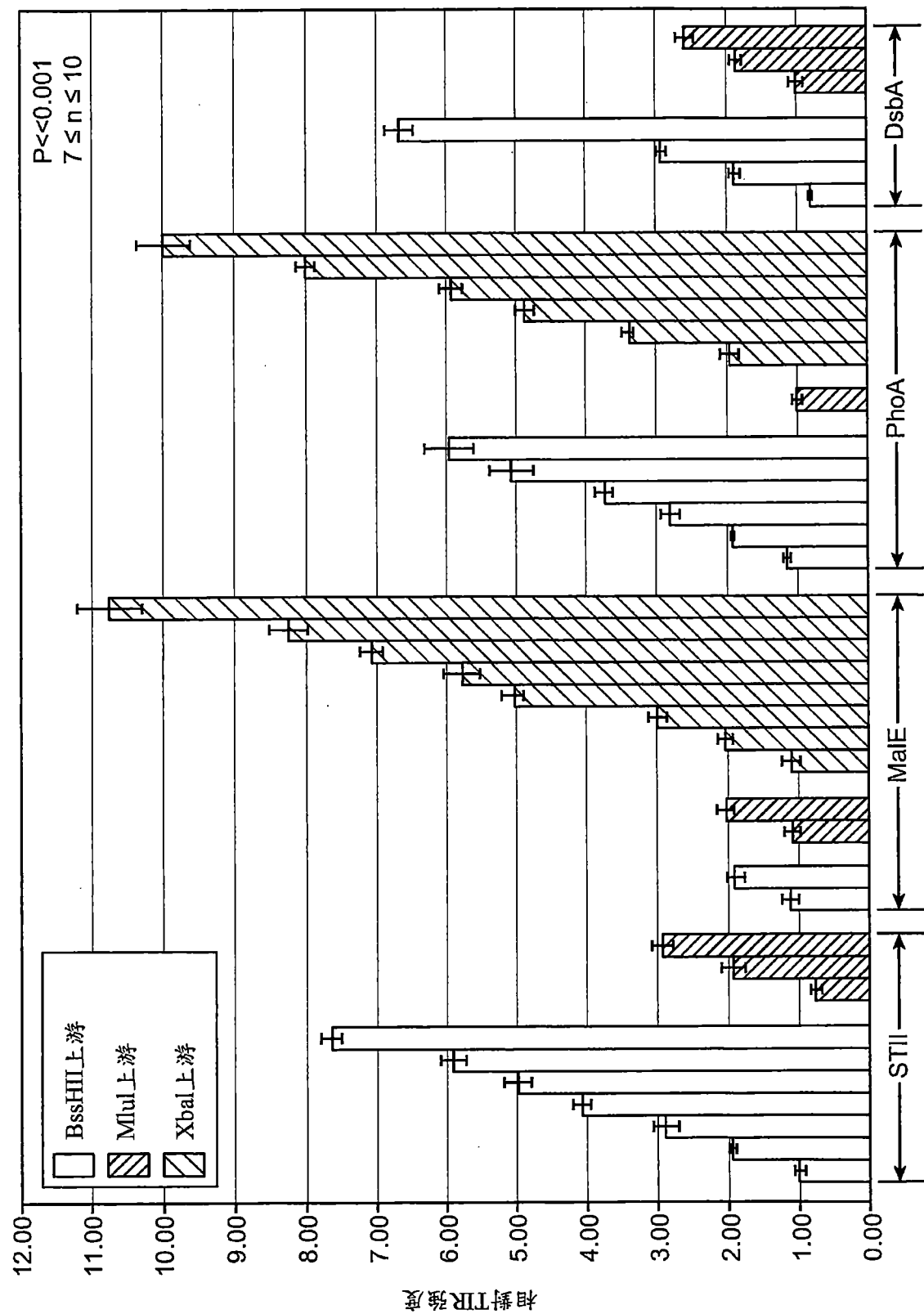


圖2