



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102361883 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 22

(21) 申请号 201080013459. 5

(22) 申请日 2010. 03. 30

(30) 优先权数据

09005109. 5 2009. 04. 07 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 09. 23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2010/002003 2010. 03. 30

(87) PCT申请的公布数据

W02010/115551 EN 2010. 10. 14

(71) 申请人 罗氏格黎卡特股份公司

地址 瑞士施利伦 - 苏黎士

(72) 发明人 比吉特·博森梅尔

乌尔里希·布林克曼

克里斯蒂安·克莱因

格哈德·尼德费尔纳

沃尔夫冈·谢弗

于尔根·迈克尔·尚策

克劳迪奥·祖斯特曼

巴勃罗·乌马纳

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

代理人 程金山

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006. 01)

C07K 16/46 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

C07K 14/71 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 43 页

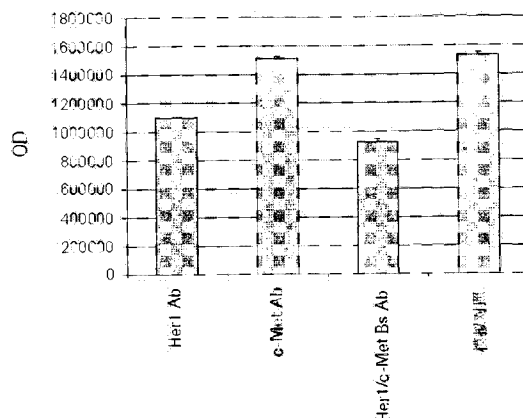
序列表 33 页 附图 16 页

(54) 发明名称

双特异性抗 -ErbB-1/ 抗 -c-Met 抗体

(57) 摘要

本发明涉及针对人 ErbB-1 和针对人 c-Met 的双特异性抗体, 制备它们的方法, 含有所述抗体的药物组合物, 及其用途。



1. 特异性结合人 ErbB-1 和人 c-Met 的双特异性抗体,其包含特异性结合人 ErbB-1 的第一抗原结合位点和特异性结合人 c-Met 的第二抗原结合位点,其特征在于,当在流式细胞术测定中在 OVCAR-8 细胞上 2 小时后测量时,与不存在所述双特异性抗体时 c-Met 的内在化相比较,所述双特异性抗体显示不超过 15% 的 c-Met 的内在化。

2. 根据权利要求 1 的双特异性抗体,其特征于是二价的或三价的,其包含特异性结合人 ErbB-1 的一个或两个抗原结合位点和特异性结合人 c-Met 的第三抗原结合位点。

3. 根据权利要求 2 的抗体,其特征在于包含

- a) 特异性结合 ErbB-1 并且由两条抗体重链和两条抗体轻链组成的全长抗体 ;和
- b) 特异性结合人 c-Met 的一个单链 Fab 片段,

其中 b) 中所述单链 Fab 片段通过肽连接体在所述全长抗体的重链或轻链的 C- 或 N- 末端融合到 a) 中所述全长抗体。

4. 特异性结合人 ErbB-1 和人 c-Met 的双特异性抗体,其包含特异性结合人 ErbB-1 的第一抗原结合位点和特异性结合人 c-Met 的第二抗原结合位点,其特征在于

i) 所述第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO :17 的 CDR3H 区,SEQ ID NO :18 的 CDR2H 区和 SEQ ID NO :19 的 CDR1H 区,和在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO :20 的 CDR3L 区,SEQ ID NO :21 的 CDR2L 区和 SEQ ID NO :58 的 CDR1L 区或 SEQ ID NO :22 的 CDR1L 区 ;和

所述第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO :30 的 CDR3H 区,SEQ ID NO :31 的 CDR2H 区和 SEQ ID NO :32 的 CDR1H 区,和在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO :33 的 CDR3L 区,SEQ ID NO :34 的 CDR2L 区和 SEQ ID NO :35 的 CDR1L 区 ;

ii) 所述第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO :23 的 CDR3H 区,SEQ ID NO :24 的 CDR2H 区和 SEQ ID NO :25 的 CDR1H 区,和在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO :26 的 CDR3L 区,SEQ ID NO :27 的 CDR2L 区和 SEQ ID NO :28 的 CDR1L 区或 SEQ ID NO :29 的 CDR1L 区 ;和

所述第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO :30 的 CDR3H 区,SEQ ID NO :31 的 CDR2H 区和 SEQ ID NO :32 的 CDR1H 区,和在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO :33 的 CDR3L 区,SEQ ID NO :34 的 CDR2L 区和 SEQ ID NO :35 的 CDR1L 区。

5. 根据权利要求 4 的双特异性抗体,其特征在于

i) 所述特异性结合 ErbB-1 的第一抗原结合位点包含作为重链可变结构域的序列 SEQ ID NO :1 和作为轻链可变结构域的序列 SEQ ID NO :2 ;和

所述特异性结合 c-Met 的第二抗原结合位点包含作为重链可变结构域的序列 SEQ ID NO :5 和作为轻链可变结构域的序列 SEQ ID NO :6 ;或

ii) 所述特异性结合 ErbB-1 的第一抗原结合位点包含作为重链可变结构域的序列 SEQ ID NO :3 和作为轻链可变结构域的序列 SEQ ID NO :4 ;和

所述特异性结合 c-Met 的第二抗原结合位点包含作为重链可变结构域的序列 SEQ ID NO :5 和作为轻链可变结构域的序列 SEQ ID NO :6。

6. 根据权利要求 1 至 5 的双特异性抗体,其特征在于包含 IgG1 或 IgG3 亚类的恒定区。

7. 根据权利要求 1 至 6 的双特异性抗体,其特征在于所述抗体在 Asn297 用糖链糖基化,其中所述糖链内岩藻糖的量为 65% 以下。

8. 编码根据权利要求 1 至 7 的双特异性抗体的核酸。
9. 药物组合物,其包含根据权利要求 1 至 7 的双特异性抗体。
10. 根据权利要求 9 的药物组合物,其用于治疗癌症。
11. 根据权利要求 1 至 7 的双特异性抗体,其用于治疗癌症。
12. 根据权利要求 1 至 7 的双特异性抗体在制备用于治疗癌症的药物中的用途。
13. 治疗患有癌症的患者的方法,其通过向需要这样的治疗的患者施用根据权利要求 1 至 7 的双特异性抗体进行。

双特异性抗 -ErbB-1/ 抗 -c-Met 抗体

[0001] 本发明涉及针对人 ErbB-1 和针对人 c-Met 的双特异性抗体,制备它们的方法,包含所述抗体的药物组合物,及其用途。

[0002] 发明背景

[0003] ErbB 家族蛋白质

[0004] ErbB 蛋白质家族由 4 个成员组成:ErbB-1,也称为表皮生长因子受体 (EGFR), ErbB-2,在人中也称为 HER2 和在啮齿动物中也称为 neu, ErbB-3,也称为 HER3,和 ErbB-4,也称为 HER4。ErbB 家族蛋白质是受体酪氨酸激酶,代表细胞生长、分化和存活的重要调控剂。

[0005] ErbB-1 和抗 -ErbB-1 抗体

[0006] ErbB-1 (也已知为 ERBB1,人表皮生长因子受体,EGFR,HER-1 或禽类成红细胞白血病病毒 (v-erb-b) 癌基因同系物;SEQ ID NO:16),是由 c-erbB 原癌基因编码的 170kDa 的跨膜受体,并且显示固有的酪氨酸激酶活性 (Modjtahedi, H., 等,英国癌症杂志 (Br. J. Cancer) 73(1996)228-235;Herbst, R. S. 和 Shin, D. M., 癌症 (Cancer) 94(2002)1593-1611)。还存在 EGFR 的同种型和变体 (例如,可变 RNA 转录物,截短形式,多态性等),包括但不限于 Swissprot 数据库登录号 P00533-1, P00533-2, P00533-3, 和 P00533-4 确定的那些。已知 EGFR 结合包括以下各项的配体:表皮生长因子 (EGF),转化生长 α),双调蛋白 (amphiregulin),肝素结合 EGF (hb-EGF), β 细胞素 (betacellulin),因子 α (TGF- 和表皮调节素 (epiregulin) (Herbst, R. S. 和 Shin, D. M., 癌症 (Cancer) 94(2002)1593-1611;Mendelsohn, J., 和 Baselga, J., 癌基因 (Oncogene) 19(2000)6550-6565)。EGFR 经由酪氨酸激酶介导的信号转导途径调节许多细胞过程,包括但不限于激活控制细胞增殖、分化、细胞存活、程序性细胞死亡、血管发生、有丝分裂发生和转移的信号转导途径 (Atalay, G., 等,肿瘤学年刊 (Ann. Oncology) 14(2003)1346-1363;Tsao, A. S. 和 Herbst, R. S. 信号 (Signal) 4(2003)4-9; Herbst, R. S., 和 Shin, D. M., 癌症 (Cancer) 94(2002)1593-1611;Modjtahedi, H., 等,英国癌症杂志 (Br. J. Cancer) 73(1996)228-235)。

[0007] 抗 -ErbB-1 抗体靶向 EGFR 的胞外部分,导致阻断配体结合并由此抑制下游事件如细胞增殖 (Tsao, A. S., 和 Herbst, R. S., 信号 (Signal) 4(2003)4-9)。已经开发了嵌合抗 -ErbB-1 抗体,其包含来自两种或多种不同物种 (例如,小鼠和人类) 的抗体的部分。参见例如 US 5,891,996 (小鼠/人嵌合抗体, R3), 或 US 5,558,864 (嵌合和人源化形式的鼠抗 -EGFR MAb 425)。此外,IMC-C225 (西妥昔单抗 (cetuximab), **Erbbitux®**; ImClone) 是嵌合小鼠/人抗 -EGFR 单克隆抗体 (基于小鼠 M225 单克隆抗体,其在人临床试验中导致 HAMA 应答),其已经报道在各种人异种移植模型中显示抗肿瘤功效。(Herbst, R. S., 和 Shin, D. M., 癌症 (Cancer) 94(2002)1593-1611)。IMC-C225 的功效已经归因于几种机制,包括抑制通过 EGFR 信号转导途径、和可能通过增加的抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC) 活性调节的细胞事件 (Herbst, R. S., 和 Shin, D. M., 癌症 (Cancer) 94(2002)1593-1611)。IMC-C225 也用于临床试验中,包括与放射疗法和化学疗法联合 (Herbst, R. S., 和 Shin, D. M., 癌症

(Cancer) 94(2002) 1593-1611)。最近, Abgenix 公司 (Abgenix, Inc.) (Fremont, CA) 开发了用于癌症治疗的 ABX-EGF。ABX-EGF 是一种完全的人抗 -EGFR 单克隆抗体。(Yang, X. D., 等, 肿瘤学 / 血液学评论综述 (Crit. Rev. Oncol. / Hematol.) 38(2001) 17-23)。

[0008] WO 2006/082515 涉及源自大鼠单克隆抗体 ICR62 的人源化的抗 -EGFR 单克隆抗体并且涉及它们用于癌症治疗的糖改造形式。

[0009] c-Met 和抗 -c-Met 抗体

[0010] MET(间充质-上皮转变因子)是一种原癌基因,其编码蛋白质 MET, (也已知为 c-Met; 肝细胞生长因子受体 HGFR; HGF 受体; 分散因子受体; SF 受体; SEQ ID NO: 15) (Dean, M., 等, 自然 (Nature) 318(1985) 385-8; Chan, A. M., 等, 癌基因 (Oncogene) 1(1987) 229-33; Bottaro, D. P., 等, 科学 (Science) 251(1991) 802-4; Naldini, L., 等, EMBO 杂志 (EMBO J.) 10(1991) 2867-78; Maulik, G., 等, 细胞因子生长因子综述 (Cytokine Growth Factor Rev.) 13(2002) 41-59)。MET 是胚胎发育和伤口愈合必需的膜受体。肝细胞生长因子 (HGF) 是 MET 受体仅有的已知配体。MET 被上皮来源的细胞正常表达, 而 HGF 的表达局限于间充质来源的细胞。经 HGF 刺激, MET 诱导数种生物学反应, 它们共同产生已知为侵袭性生长的程序。癌症中异常的 MET 活化与差的预后相关, 在此异常活性的 MET 引发肿瘤生长, 形成向肿瘤供应营养素的新血管 (血管生成), 以及癌症扩散到其它器官 (转移)。MET 在许多类型的人恶性肿瘤中下调, 所述人恶性肿瘤包括肾癌、肝癌、胃癌、乳腺癌和脑癌。通常, 仅有干细胞和祖细胞表达 MET, 其允许这些细胞侵袭性生长以便在胚胎中产生新组织或在成人中再生受损伤的组织。然而, 认为癌症干细胞劫持了正常干细胞表达 MET 的能力, 因此成为癌症持续和扩散到身体中的其它部位的原因。

[0011] 原癌基因 MET 产物是肝细胞生长因子受体并且编码酪氨酸-激酶活性。初级单链前体蛋白质被翻译后分解以产生 α 和 β 亚基, 其被二硫键连接以形成成熟的受体。MET 基因的多种突变与乳头状肾癌相关。

[0012] 抗 -c-Met 抗体是已知的, 例如, 从 US 5, 686, 292, US 7, 476, 724, WO2004/072117, WO 2004/108766, WO 2005/016382, WO 2005/063816, WO2006/015371, WO 2006/104911, WO 2007/126799 或 WO 2009/007427 中得知。

[0013] C-Met 结合肽是已知的, 例如, 从 Matzke, A., 等, 癌症研究 (Cancer Res) 65(14) (2005) 6105-10. 和 Tam, Eric, M., 等, 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 385(2009) 79-90 中得知。

[0014] 多特异性抗体

[0015] 最近已经开发了广泛多样的重组抗体形式, 例如通过融合例如 IgG 抗体形式和单链结构域的四价双特异性抗体 (参见例如 Coloma, M. J., 等, 自然生物技术 (Nature Biotech) 15(1997) 159-163; WO 2001/077342 和 Morrison, S. L. 等, 自然生物技术 (Nature Biotech) 25(2007) 1233-1234)。

[0016] 此外, 开发了能够结合两种以上抗原的若干其他新型形式, 其中抗体核心结构 (IgA, IgD, IgE, IgG 或 IgM) 不再保持诸如双抗体 (diabodies)、三链抗体或四链抗体 (tetraabodies)、微型抗体 (minibodies)、若干单链形式 (scFv, 双-scFv) (Holliger P., 等, 自然生物技术 (Nature Biotech) 23(2005) 1126-1136; Fischer, N., 和 Léger, O., 病理学 (Pathobiology) 74(2007) 3-14; Shen J., 等, 免疫学方法杂志 (Journal

of Immunological Methods)318(2007)65-74;Wu, C. 等, 自然生物技术 (Nature Biotech.)25(2007)1290-1297)。

[0017] 所有这样的形式使用接头将抗体核心 (IgA, IgD, IgE, IgG 或 IgM) 与其他结合蛋白 (例如 scFv) 融合或融合例如两个 Fab 片段或 scFv (Fischer N., Léger O., 病理学 (Pathobiology)74(2007)3-14)。人们一直希望可以通过保持与天然存在的抗体的高度相似性而保持效应子功能, 诸如例如通过 Fc 受体结合介导的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 或抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。

[0018] 在 WO 2007/024715 中, 报道了双重可变的结构域免疫球蛋白作为改造的多价和多特异性结合蛋白。在 US 6, 897, 044 中报道了用于生物活性的抗体二聚体的制备方法。在 US 7, 129, 330 中报道了具有至少四个彼此通过肽接头连接的可变结构域的多价 F_v 抗体构建体。在 US 2005/0079170 中报道了二聚体和多聚体抗原结合结构。在 US 6, 511, 663 中报道了三价或四价单特异性抗原结合蛋白, 其包含通过连接结构彼此共价结合的三个或四个 Fab 片段, 所述蛋白不是天然免疫球蛋白。在 WO 2006/020258 中报道了这样的四价双特异性抗体, 其可以在原核细胞和真核细胞中有效表达, 并且用于治疗 and 诊断方法中。在 US 2005/0163782 中报道了在包含两种类型的多肽二聚体的混合物中, 将通过至少一个链间二硫键连接的二聚体与不通过至少一个链间二硫键连接的二聚体分离或优先合成通过至少一个链间二硫键连接的二聚体的方法。在 US 5, 959, 083 中报道了双特异性四价受体。在 WO 2001/077342 中报道了具有三个或多个功能性抗原结合位点的改造的抗体。

[0019] 在 WO 1997/001580 中报道了多特异性和多价抗原结合多肽。WO 1992/004053 报道了均缀合物 (homoconjugate), 其典型地由结合相同抗原决定簇的 IgG 类的单克隆抗体制备, 其通过合成交联共价连接。在 WO 1991/06305 中报道了对于抗原具有高抗体亲抗原性的低聚单克隆抗体, 其中分泌典型地是 IgG 类的低聚物, 其具有缔合在一起的两种以上的免疫球蛋白单体, 以形成四价或六价 IgG 分子。在 US 6, 350, 860 中报道了绵羊来源的抗体和改造的抗体构建体, 其可以用于治疗其中 γ 干扰素活性是致病性的疾病。在 US 2005/0100543 中, 报道了可靶向的构建体, 所述构建体是双特异性抗体的多价载体, 即可靶向的构建体的每个分子可以作为两种以上双特异性抗体的载体。在 WO 1995/009917 中报道遗传改造的双特异性四价抗体。在 WO 2007/109254 中, 报道了由稳定的 scFv 组成或包含稳定的 scFv 的稳定的结合分子。US 2007/0274985 涉及包含单链 Fab (scFab) 片段的抗体形式。

[0020] WO 2008/140493 涉及抗 -ErbB 家族成员抗体和双特异性抗体, 其包含一个或多个抗 -ErbB 家族成员抗体。US 2004/0071696 涉及结合 ErbB 蛋白质家族的成员的双特异性抗体分子。

[0021] WO2009111707 (A1) 涉及使用 Met 和 HER 拮抗剂的联合疗法。WO2009111691 (A2A3) 涉及使用 Met 和 EGFR 拮抗剂的联合疗法。

[0022] WO2004072117 涉及诱导 c-Met 下调 / 内在化的 c-Met 抗体, 以及它们特别与 ErbB-1 作为第二抗原在双特异性抗体中的潜在用途。

[0023] 发明概述

[0024] 本发明第一方面是特异性结合人 ErbB-1 和人 c-Met 的双特异性抗体, 其包含特异性结合人 ErbB-1 的第一抗原结合位点和特异性结合人 c-Met 的第二抗原结合位点, 其特征

在于,当在流式细胞术测定中在 OVCAR-8 细胞上 2 小时后测量时,与不存在所述双特异性抗体时 c-Met 的内在化相比较,所述双特异性抗体显示不超过 15% 的 c-Met 的内在化。

[0025] 在本发明的一个实施方案中,所述抗体是特异性结合人 ErbB-1 和人 c-Met 的二价或三价、双特异性抗体,其包含特异性结合人 ErbB-1 的一个或两个抗原结合位点和特异性结合人 c-Met 的一个抗原结合位点。

[0026] 在本发明的一个实施方案中,所述抗体是特异性结合人 ErbB-1 和人 c-Met 的三价、双特异性抗体,其包含特异性结合人 ErbB-1 的两个抗原结合位点和特异性结合人 c-Met 的第三抗原结合位点。

[0027] 在本发明的一个实施方案中,所述抗体是特异性结合人 ErbB-1 和人 c-Met 的二价、双特异性抗体,其包含特异性结合人 ErbB-1 的一个抗原结合位点和特异性结合人 c-Met 的一个抗原结合位点。

[0028] 本发明的一个方面是特异性结合人 ErbB-1 和人 c-Met 的双特异性抗体,其包含特异性结合人 ErbB-1 的第一抗原结合位点和特异性结合人 c-Met 的第二抗原结合位点,其特征在于,

[0029] i) 所述第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:17 的 CDR3H 区, SEQ ID NO:18 的 CDR2H 区和 SEQ ID NO:19 的 CDR1H 区,和在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:20 的 CDR3L 区, SEQ ID NO:21 的 CDR2L 区和 SEQ ID NO:22 的 CDR1L 区;和

[0030] 所述第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:29 的 CDR3H 区, SEQ ID NO:30 的 CDR2H 区和 SEQ ID NO:31 的 CDR1H 区,和在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:32 的 CDR3L 区, SEQ ID NO:33 的 CDR2L 区和 SEQ ID NO:34 的 CDR1L 区;

[0031] ii) 所述第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:23 的 CDR3H 区, SEQ ID NO:24 的 CDR2H 区和 SEQ ID NO:25 的 CDR1H 区,和在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:26 的 CDR3L 区, SEQ ID NO:27 的 CDR2L 区和 SEQ ID NO:28 的 CDR1L 区;和

[0032] 所述第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:29 的 CDR3H 区, SEQ ID NO:30 的 CDR2H 区和 SEQ ID NO:31 的 CDR1H 区,和在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:32 的 CDR3L 区, SEQ ID NO:33 的 CDR2L 区和 SEQ ID NO:34 的 CDR1L 区。

[0033] 所述双特异性抗体优选地特征在于,

[0034] i) 所述特异性结合 ErbB-1 的第一抗原结合位点包含作为重链可变结构域的序列 SEQ ID NO:1 和作为轻链可变结构域的序列 SEQ ID NO:2;和

[0035] 所述特异性结合 c-Met 的第二抗原结合位点包含作为重链可变结构域的序列 SEQ ID NO:5 和作为轻链可变结构域的序列 SEQ ID NO:6;或

[0036] ii) 所述特异性结合 ErbB-1 的第一抗原结合位点包含作为重链可变结构域的序列 SEQ ID NO:3 和作为轻链可变结构域的序列 SEQ ID NO:4;和

[0037] 所述特异性结合 c-Met 的第二抗原结合位点包含作为重链可变结构域的序列 SEQ ID NO:5 和作为轻链可变结构域的序列 SEQ ID NO:6。

[0038] 本发明另一方面是特征在于包含 IgG1 或 IgG3 亚类的恒定区的本发明所述的双特异性抗体。

[0039] 在一个实施方案中,本发明所述的双特异性抗体特征在于所述抗体在 Asn297 用糖链糖基化,其中所述糖链内岩藻糖的量为 65% 以下。

[0040] 本发明另一方面是编码所述双特异性抗体的链的核酸分子。

[0041] 本发明的其它方面是包含所述双特异性抗体的药物组合物,所述组合物用于治疗癌症,所述双特异性抗体用于制备用于治疗癌症的药物的应用,治疗患有癌症的患者的方法,所述方法通过给需要所述治疗的患者施用所述双特异性抗体而进行。

[0042] 由于 EGFR 和 c-Met 是导致磷酸化和激活下游信号传导级联的受体交叉对话 (cross-talk) 的一部分,并且由于肿瘤组织细胞表面上的这些受体的上调 (Bachleitner-Hofmann 等,分子癌症治疗 (Mol. Canc. Ther.) (2009) 3499-3508),本发明所述的双特异性 <ErbB-1-c-Met> 抗体具有有价值的特性,如抗肿瘤功效和癌细胞抑制。

[0043] 本发明所述的抗体表现出高度有价值的特性,如例如,尤其是表达这两种受体 ErbB1 和 c-Met 的癌细胞的生长抑制,给患有癌症的患者带来益处的抗肿瘤功效。本发明所述的双特异性 <ErbB1-c-Met> 抗体在与它们的亲本单特异性、二价 <c-Met> 抗体相比较时,在表达这两种受体 ErbB1 和 c-Met 的癌细胞上,其表现出减少的 c-Met 受体的内在化。

[0044] 发明详述

[0045] 本发明的第一方面是特异性结合人 ErbB-1 和人 c-Met 的双特异性抗体,其包含特异性结合人 ErbB-1 的第一抗原结合位点和特异性结合人 c-Met 的第二抗原结合位点,其特征在于,当在流式细胞术测定中在 OVCAR-8 细胞上 2 小时后测量时,与不存在所述双特异性抗体时 c-Met 的内在化相比较,所述双特异性抗体显示不超过 15% 的 c-Met 的内在化。

[0046] 因此,本发明涉及特异性结合人 ErbB-1 和人 c-Met 的双特异性抗体,其包含特异性结合人 ErbB-1 的第一抗原结合位点和特异性结合人 c-Met 的第二抗原结合位点,其中通过流式细胞术测定法测量,在 OVCAR-8 细胞-抗体温育 1 小时后测量时,与不存在抗体时在 OVCAR-8 细胞上 c-Met 的内在化相比,所述双特异性抗体引起不超过 15% 的 OVCAR-8 细胞上 c-Met 的内在化的增加。

[0047] 在一个实施方案中,所述特异性结合人 ErbB-1 和人 c-Met 的双特异性抗体包含特异性结合人 ErbB-1 的第一抗原结合位点和特异性结合人 c-Met 的第二抗原结合位点,其特征在于,当在流式细胞术测定中在 OVCAR-8 细胞上 2 小时后测量时,与不存在所述双特异性抗体时 c-Met 的内在化相比较,所述双特异性抗体显示不超过 10% 的 c-Met 的内在化。

[0048] 在一个实施方案中,所述特异性结合人 ErbB-1 和人 c-Met 的双特异性抗体包含特异性结合人 ErbB-1 的第一抗原结合位点和特异性结合人 c-Met 的第二抗原结合位点,其特征在于,当在流式细胞术测定中在 OVCAR-8 细胞上 2 小时后测量时,与不存在所述双特异性抗体时 c-Met 的内在化相比较,所述双特异性抗体显示不超过 7% 的 c-Met 的内在化。

[0049] 在一个实施方案中,所述特异性结合人 ErbB-1 和人 c-Met 的双特异性抗体包含特异性结合人 ErbB-1 的第一抗原结合位点和特异性结合人 c-Met 的第二抗原结合位点,其特征在于,当在流式细胞术测定中在 OVCAR-8 细胞上 2 小时后测量时,与不存在所述双特异性抗体时 c-Met 的内在化相比较,所述双特异性抗体显示不超过 5% 的 c-Met 的内在化。

[0050] 术语“c-Met 的内在化”指与不存在抗体时 c-Met 的内在化相比较,在 OVCAR-8 细胞 (NCI 细胞系命名;购自 NCI (国家癌症研究所 (National Cancer Institute)) OVCAR-8-NCI;Schilder, R. J. 等,国际癌症杂志 (Int. J. Cancer) 45(1990) 416-422; Ikediobi, O. N. 等,分子癌症治疗 (Mol. Cancer. Ther.) 5(2006) 2606-2012;Lorenzi, P. L., 等,分子癌症治疗 (Mol. Cancer Ther.) 8(2009) 713-724) 上的抗体-诱导的 c-Met 受体内

在化。c-Met 受体的这种内在化由本发明所述的双特异性抗体诱导,并且如在实施例 9 中所述,在流式细胞术测定法 (FACS) 中 2 小时后测量。与不存在抗体时 c-Met 的内在化相比较,本发明所述的双特异性抗体在抗体暴露 2 小时后表现出在 OVCAR-8 细胞上不超过 15% 的 c-Met 内在化。在一个实施方案中,所述抗体表现出不超过 10% 的 c-Met 内在化。在一个实施方案中,所述抗体表现出不超过 7% 的 c-Met 内在化。在一个实施方案中,所述抗体表现出不超过 5% 的 c-Met 内在化。

[0051] 本发明的另一方面是特异性结合人 ErbB-1 和人 c-Met 的双特异性抗体,其包含特异性结合人 ErbB-1 的第一抗原结合位点和特异性结合人 c-Met 的第二抗原结合位点,其特征在于,与由 (相对应的) 单特异性、二价亲本 c-Met 抗体诱导的 c-Met 内在化相比,当在流式细胞术测定中在 OVCAR-8 细胞上 2 小时后测量时,所述双特异性抗体将 c-Met 内在化减少 50% 以上 (在一个实施方案中,减少 60% 以上;在另一个实施方案中,减少 70% 以上,在一个实施方案中,减少 80% 以上)。c-Met 内在化的减少计算如下 (使用在流式细胞术测定中在 OVCAR-8 细胞上 2 小时后测量的 % 内在化值,而将低于 0 的 % 内在化值设定为 0% 内在化,例如,对于 BsAB01 (将 -14% 内在化设定为 0%)) : $100 \times (\text{由单特异性、二价亲本 c-Met 抗体诱导的 \% c-Met 内在化} - \text{由双特异性 ErbB-1/cMet 抗体诱导的 \% c-Met 内在化}) / \text{由单特异性、二价亲本 c-Met 抗体诱导的 \% c-Met 内在化}$ 。例如:双特异性 ErbB-1/cMet 抗体 BsAB01 表现出 -14% 的 c-Met 内在化,将其设定为 0%,并且单特异性、二价亲本 c-Met 抗体 Mab 5D5 表现出 44% 的 c-Met 内在化。因此,双特异性 ErbB-1/cMet 抗体 BsAB01 表现出 $100 \times (40 - 0) / 40\% = 100\%$ 的 c-Met 内在化减少 (参见在实施例 9 中在流式细胞术测定中在 OVCAR-8 细胞上 2 小时后测量的内在化值)。

[0052] 用于本文时,“抗体”指包含抗原结合位点的结合蛋白。术语“结合位点”或“抗原结合位点”用于本文时,指配体实际上结合的抗体分子的区域,所述位点源自抗体。术语“抗原结合位点”包含抗体重链可变结构域 (VH) 和 / 或抗体轻链可变结构域 (VL) 或 VH/VL 配对,并可源自完整抗体或抗体片段如单链 Fv、VH 结构域和 / 或 VL 结构域、Fab 或 (Fab)₂。在本发明的一个实施方案中,每个抗原结合位点包含抗体重链可变结构域 (VH) 和 / 或抗体轻链可变结构域 (VL),和优选地由抗体轻链可变结构域 (VL) 和抗体重链可变结构域 (VH) 组成的配对形成。

[0053] 对抗体来源的抗原结合位点进一步看来,例如,Matzke, A., 等,癌症研究 (Cancer Res.) 65(14) (2005) 6105-10 中所述的结合肽也可以特异性结合抗原 (例如, c-Met)。因此,本发明的另一方面是特异性结合人 ErbB-1 和人 c-Met 的双特异性结合分子,其包含特异性结合人 ErbB-1 的抗原结合位点和特异性结合人 c-Met 的结合肽。因此,本发明的另一方面是特异性结合人 ErbB-1 和人 c-Met 的双特异性结合分子,其包含特异性结合人 c-Met 的抗原结合位点和特异性结合人 ErbB-1 的结合肽。

[0054] Erb-B1 (也已知为 ERBB1, 人表皮生长因子受体, EGFR, HER-1 或禽类成红细胞白血病病毒 (v-erb-b) 癌基因同系物; SEQ ID NO:16), 是由 c-erbB 原癌基因编码的 170kDa 的跨膜受体,并且显示固有的酪氨酸激酶活性 (Modjtahedi, H., 等, 英国癌症杂志 (Br. J. Cancer) 73(1996) 228-235; Herbst, R. S. 和 Shin, D. M., 癌症 (Cancer) 94(2002) 1593-1611)。还存在 EGFR 的同种型和变体 (例如, 可变 RNA 转录物, 截短形式, 多态性等), 包括但不限于 Swissprot 数据库登录号 P00533-1, P00533-2,

P00533-3, 和 P00533-4 确定的那些。已知 EGFR 结合包括以下各项的配体:表皮生长因子(EGF), 转化生长 α), 双调蛋白, 肝素结合 EGF(hb-EGF), β 细胞素, 因子 α (TGF- 和表皮调节素 (Herbst, R. S. 和 Shin, D. M., 癌症 (Cancer) 94(2002) 1593-1611; Mendelsohn, J., 和 Baselga, J., 癌基因 (Oncogene) 19(2000) 6550-6565)。EGFR 经由酪氨酸激酶介导的信号转导途径调节许多细胞过程, 包括但不限于激活控制细胞增殖、分化、细胞存活、程序性细胞死亡、血管发生、有丝分裂发生和转移的信号转导途径 (Atalay, G., 等, 肿瘤学年刊 (Ann. Oncology) 14(2003) 1346-1363; Tsao, A. S. 和 Herbst, R. S. 信号 (Signal) 4(2003) 4-9; Herbst, R. S., 和 Shin, D. M., 癌症 (Cancer) 94(2002) 1593-1611; Modjtahedi, H., 等, 英国癌症杂志 (Br. J. Cancer) 73(1996) 228-235)。

[0055] 特异性结合人 ErbB-1 的抗原结合位点, 且特别是重链可变结构域 (VH) 和 / 或抗体轻链可变结构域 (VL) 可以来源于: a) 已知的抗 -ErbB-1 抗体, 如例如 IMC-C225 (西妥昔单抗, **Erbbitux®**; ImClone) (Herbst, R. S., 和 Shin, D. M., 癌症 (Cancer) 94(2002) 1593-1611), ABX-EGF (Abgenix) (Yang, X. D., 等, 肿瘤学 / 血液学评论综述 (Crit. Rev. Oncol. / Hematol.) 38(2001) 17-23), 人源化 ICR62 (WO 2006/082515) 或如例如在 US 5, 891, 996, US 5, 558, 864 中所述的其它抗体; 或 b) 通过使用特别是人 ErbB-1 蛋白或核酸或其片段的从头 (de novo) 免疫法或通过噬菌体展示获得的新的抗 -ErbB-1 抗体。

[0056] MET (间充质 - 上皮转变因子) 是一种原癌基因, 其编码蛋白质 MET, (也已知为 c-Met; 肝细胞生长因子受体 HGFR; HGF 受体; 分散因子受体; SF 受体; SEQ ID NO: 15) (Dean, M., 等, 自然 (Nature) 318(1985) 385-8; Chan, A. M., 等, 癌基因 (Oncogene) 1(1987) 229-33; Bottaro, D. P., 等, 科学 (Science) 251(1991) 802-4; Naldini, L., 等, EMBO 杂志 (EMBO J.) 10(1991) 2867-78; Maulik, G., 等, 细胞因子生长因子综述 (Cytokine Growth Factor Rev.) 13(2002) 41-59)。MET 是胚胎发育和伤口愈合必需的膜受体。肝细胞生长因子 (HGF) 是 MET 受体仅有的已知配体。MET 被上皮来源的细胞正常表达, 而 HGF 的表达局限于间充质来源的细胞。经 HGF 刺激, MET 诱导数种生物学反应, 它们共同产生已知为侵袭性生长的程序。癌症中异常的 MET 活化与差的预后相关, 在此异常活性的 MET 引发肿瘤生长, 形成向肿瘤供应营养素的新血管 (血管生成), 以及癌症扩散到其它器官 (转移)。MET 在许多类型的人恶性肿瘤中下调, 所述人恶性肿瘤包括肾癌、肝癌、胃癌、乳腺癌和脑癌。通常, 仅有干细胞和祖细胞表达 MET, 其允许这些细胞侵袭性生长以便在胚胎中产生新组织或在成人中再生受损伤的组织。然而, 认为癌症干细胞劫持了正常干细胞表达 MET 的能力, 因此成为癌症持续和扩散到身体中的其它部位的原因。

[0057] 特异性结合人 c-Met 的抗原结合位点, 且特别是重链可变结构域 (VH) 和 / 或抗体轻链可变结构域 (VL), 可以来源于: a) 已知的抗 -c-Met 抗体, 如例如在 US 5, 686, 292, US 7, 476, 724, WO 2004/072117, WO 2004/108766, WO 2005/016382, WO 2005/063816, WO 2006/015371, WO 2006/104911, WO 2007/126799, 或 WO 2009/007427 中所述的抗体, b) 通过使用特别是人抗 -c-Met 蛋白或核酸或其片段的从头免疫法或通过噬菌体展示获得的新的抗 -c-Met 抗体。

[0058] 本发明的另一方面是特异性结合人 ErbB-1 和人 c-Met 的双特异性抗体, 其包含特异性结合人 ErbB-1 的第一抗原结合位点和特异性结合人 c-Met 的第二抗原结合位点, 其特征在于,

[0059] i) 所述特异性结合 ErbB-1 的第一抗原结合位点包含作为重链可变结构域的序列 SEQ ID NO :1 和作为轻链可变结构域的序列 SEQ ID NO :2 ;和

[0060] 所述特异性结合 c-Met 的第二抗原结合位点包含作为重链可变结构域的序列 SEQ ID NO :5 和作为轻链可变结构域的序列 SEQ ID NO :6 ;或

[0061] ii) 所述特异性结合 ErbB-1 的第一抗原结合位点包含作为重链可变结构域的序列 SEQ ID NO :3 和作为轻链可变结构域的序列 SEQ ID NO :4 ;和

[0062] 所述特异性结合 c-Met 的第二抗原结合位点包含作为重链可变结构域的序列 SEQ ID NO :5 和作为轻链可变结构域的序列 SEQ ID NO :6。

[0063] 抗体特异性指抗体对于抗原特定表位的选择性识别。例如,天然抗体是单特异性的。根据本发明所述的“双特异性抗体”是具有两种不同的抗原结合特异性的抗体。如果抗体具有超过一种的特异性,识别的表位可以与单抗原或一种以上的抗原相关。本发明的抗体特异于两种不同的抗原,即作为第一抗原的 ErbB-1 和作为第二抗原的 c-Met。

[0064] 用于本文时,术语“单特异性”抗体指具有一个或多个分别结合于相同抗原的相同表位的结合位点的抗体。

[0065] 术语“价”在本申请中使用指在抗体分子上存在的结合位点的具体数量。因此,术语“二价”、“四价”、和“六价”分别指在抗体分子上存在两个结合位点、四个结合位点、和六个结合位点。本发明所述的双特异性抗体是至少“二价的”,并且可以是“三价”或“多价”的(例如(“四价”或六价)的)。

[0066] 本发明的抗体的抗原结合位点可包含六个互补性决定区(CDRs),其在不同程度上有助于结合位点对于抗原的亲和力。存在三个重链可变结构域 CDRs(CDRH1, CDRH2 和 CDRH3) 和三个轻链可变结构域 CDRs(CDRL1, CDRL2 和 CDRL3)。CDR 和构架区(FRs)的程度通过与氨基酸序列的汇编数据库进行比较来确定,所述氨基酸序列中那些区域根据序列之间的可变性来确定。此外,还包括在本发明范围内的是包含更少 CDRs 的功能性抗原结合位点(即,在结合特异性由三个、四个或五个 CDRs 决定的情形中)。例如,少于 6 个 CDRs 的完整组对于结合可能是足够的。在一些情形中,VH 或 VL 结构域是足够的。

[0067] 在优选的实施方案中,本发明的抗体还包含一个或多个个人来源的免疫球蛋白种类的免疫球蛋白恒定区。免疫球蛋白种类包括 IgG, IgM, IgA, IgD, 和 IgE 同种型,并且在 IgG 和 IgA 的情形中,包括它们的亚型。在优选的实施方案中,本发明的抗体具有 IgG 型抗体的恒定结构域结构,但是具有四个抗原结合位点。这是通过下述来实现,例如通过将一个(或两个)特异性结合 c-Met 的完整抗原结合位点(例如,单链 Fab 片段或单链 Fv)与特异性结合 ErbB-1 的完整抗体的 N-端或 C-端重链或轻链进行连接,产生三价双特异性抗体(或四价双特异性抗体)。备选地,如例如,在 EP 07024867.9, EP 07024864.6, EP 07024865.3 或 Ridgway, J. B., 蛋白质工程(Protein Eng.)9(1996)617-621;WO 96/027011;Merchant, A. M., 等,自然生物技术(Nature Biotech)16(1998)677-681;Atwell, S., 等,分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)270(1997)26-35 和 EP 1870459A1 中所述,可以使用针对人 ErbB-1 和人 c-Met 的包含免疫球蛋白恒定区的 IgG 样双特异性、二价抗体。

[0068] 术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”用于本文中时,指单一氨基酸组成的抗体分子制剂。

[0069] 术语“嵌合抗体”指这样的抗体,其包括来自一种来源或物种的可变区,即结合区,

以及源自不同来源或物种的恒定区的至少一部分,其通常通过重组 DNA 技术进行制备。优选包括鼠可变区和人恒定区的嵌合抗体。本发明涵盖的“嵌合抗体”的其它优选形式是这样的那些,其中恒定区已经被从初始抗体的恒定区开始进行修饰或改变以产生本发明所述的特性,特别是关于 C1q 结合和 / 或 Fc 受体 (FcR) 结合的特性。也将这种“嵌合”抗体称作“类别转换抗体”。嵌合抗体是被表达的免疫球蛋白基因的产物,该基因包括编码免疫球蛋白可变区的 DNA 区段和编码免疫球蛋白恒定区的 DNA 区段。制备嵌合抗体的方法包括目前在本领域众所周知的常规重组 DNA 和基因转染技术。见,例如, Morrison, S. L., 等, 美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 81 (1984) 6851-6855 ;US 5, 202, 238 和 US5, 204, 244。

[0070] 术语“人源化抗体”指这样的抗体,其中的构架或“互补性决定区”(CDR) 已经被修饰为包括与亲本免疫球蛋白相比特异性不同的免疫球蛋白的 CDR。在一个优选实施方案中,将鼠 CDR 移植到人抗体的构架区以制备“人源化抗体”。见,例如, Riechmann, L., 等, 自然 (Nature) 332 (1988) 323-327 ;和 Neuberger, M. S., 等, 自然 (Nature) 314 (1985) 268-270。特别优选的 CDRs 对应于识别以上指出的关于嵌合抗体的抗原的那些代表性序列。本发明涵盖的“人源化抗体”的其它形式是这样的那些,其中恒定区已经另外被从初始抗体的恒定区开始进行修饰或改变以产生本发明所述的特性,特别是关于 C1q 结合和 / 或 Fc 受体 (FcR) 结合的特性。

[0071] 用于本文时,术语“人抗体”意欲包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。人抗体是现有技术中公知的 (van Dijk, M. A., 和 van de Winkel, J. G., 当前化学生物学观点 (Curr. Opin. Chem. Biol.) 5 (2001) 368-374)。人抗体还可以在转基因动物 (例如小鼠) 中产生,所述转基因动物在免疫时能够在缺乏内源免疫球蛋白生成的条件下产生人抗体的全部所有组成成分或选择部分 (selection)。在所述种系突变小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将导致在抗原攻击时产生人抗体 (见,例如 Jakobovits, A., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国国家科学院学报) 90 (1993) 2551-2555 ;Jakobovits, A., 等, Nature (自然) 362 (1993) 255-258 ;Brüggemann, M., 等, Year Immunol. (免疫学年度) 7 (1993) 33-40)。人抗体还可以在噬菌体展示文库中产生 (Hoogenboom, H. R., 和 Winter, G. J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 227 (1992) 381-388 ;Marks, J. D., 等, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 222 (1991) 581-597)。Cole, S. P. C., 等和 Boerner, P., 等的技术也可以用于制备人单克隆抗体 (Cole, S. P. C., 等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (单克隆抗体和癌症治疗), Liss, A. L., (1985) 77-96 ;和 Boerner, P., 等, J. Immunol. (免疫学杂志) 147 (1991) 86-95)。如已经对本发明所述的嵌合和人源化抗体所提及地,术语“人抗体”用于本文中时还包括这样的抗体,其在恒定区内进行修饰以产生本发明所述的特性,特别是关于 C1q 结合和 / 或 FcR 结合的特性,例如通过“类别转换”即改变或突变 Fc 部分 (例如由 IgG1 到 IgG4 和 / 或 IgG1/IgG4 突变) 进行。

[0072] 用于本文时,术语“重组人抗体”意欲包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有人抗体,诸如分离自宿主细胞,诸如 NS0 或 CHO 细胞的抗体或分离自人免疫球蛋白基因的转基因动物 (例如小鼠) 的抗体,或利用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体。这种重组人抗体具有处于重排形式的可变区和恒定区。按照本发明的重组人抗体已经经历了体内体细胞高变。因此,重组抗体的 VH 和 VL 区域的氨基酸序列是这样的序列,所述序列尽管源自并涉及人种系 VH 和 VL 序列,但在体内可能不天然存在于人抗体种系所有组成成

分中。

[0073] “可变结构域”(轻链的可变结构域(VL),重链的可变区(VH))用于本文中时,表示直接参与抗体与抗原结合的每对轻链和重链对。可变人轻链和重链的结构域具有相同的一般结构且每个结构域包括4个构架(FR)区,所述构架区的序列普遍保守,其通过3个“高变区”(或互补性决定区,CDRs)相连接。构架区采用 β -折叠构象且CDRs可以形成连接 β -折叠结构的环。每条链中的CDRs通过构架区以其三维结构保持并与来自另一条链的CDRs一起形成抗原结合位点。抗体重链和轻链CDR3区在本发明所述的抗体的结合特异性/亲和力方面发挥特别重要的作用并因此提供本发明的另一个目的。

[0074] 用于本文时,术语“高变区”或“抗体的抗原结合部分或抗原结合位点”指抗体负责抗原结合的氨基酸残基。高变区包括来自“互补性决定区”或“CDRs”的氨基酸残基。“构架”或“FR”区是除本文中定义的高变区残基之外的那些可变结构域区域。因此,抗体的轻链和重链从N端到C端包括结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。各条链上的CDRs通过所述构架氨基酸分开。特别地,重链的CDR3是最有助于抗原结合的区域。按照Kabat等,免疫目的的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第5版,公众健康服务,全国卫生研究所(Public Health Service, National Institutes of Health), Bethesda, MD(1991))的标准定义确定CDR和FR区域。

[0075] 用于本文时,术语“结合”或“特异性结合”指在体外测定法中,优选地在使用纯化的野生型抗原的等离子共振测定(BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, 瑞典)中,抗体与抗原(人ErbB-1或人c-Met)的表位的结合。结合的亲和力由术语 k_a (来自抗体/抗原复合物的抗体的缔合的速率常数), k_d (解离常数)和 $K_D(k_d/k_a)$ 定义。结合或特异性结合意为 10^{-8}mol/l 以下,优选地 10^{-9}M 到 10^{-13}mol/l 的结合亲和力(K_D)。因此,本发明所述的双特异性<ErbB1-c-Met>抗体特异性结合每种抗原,对于每种抗原其是特异性的,具有 10^{-8}mol/l 以下,优选地 10^{-9}M 到 10^{-13}mol/l 的结合亲和力(K_D)。

[0076] 抗体与Fc γ RIII的结合可以通过BIAcore测定法(GE-Healthcare, Uppsala, 瑞典)进行研究。结合的亲和力由术语 k_a (来自抗体/抗原复合物的抗体的缔合的速率常数), k_d (解离常数)和 $K_D(k_d/k_a)$ 定义。

[0077] 术语“表位”包括能够特异性结合抗体的任何多肽决定簇。在某些实施方案中,表位决定簇包括分子的化学活性表面分组(groupings),诸如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基,在某些实施方案中,可以具有特定的三维结构特征,和或特定的带电特征。表位是被抗体结合的抗原区域。

[0078] 在某些实施方案中,当抗体在蛋白和/或大分子的复杂混合物中优选识别其靶抗原时,将该抗体称为与抗原特异性结合。

[0079] 术语“恒定区”用于本申请时指除了可变区之外的抗体的结构域的总和。恒定区不直接参与抗原的结合,但是显示不同的效应子功能。取决于它们重链的恒定区的氨基酸序列,抗体被分为下述类别:IgA, IgD, IgE, IgG和IgM,并且这些中的一些可以被进一步分为亚类,如IgG1, IgG2, IgG3,和IgG4, IgA1和IgA2。对应于不同种类的抗体的重链恒定区分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。可以在所有5种抗体种类中发现的轻链恒定区被称为 κ (kappa)和 λ (lambda)。恒定区优选地来自人来源。

[0080] 术语“来自人来源的恒定区”在本申请中使用时,指亚类IgG1, IgG2, IgG3,或IgG4

的人抗体的恒定重链区和 / 或恒定轻链 κ 或 λ 区域。这样的恒定区是现有技术中公知的并且例如由 Kabat, E. A., 描述 (见, 例如 Johnson, G. 和 Wu, T. T., 核酸研究 (Nucleic Acids Res.) 28 (2000) 214-218 ;Kabat, E. A., 等, 美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 72 (1975) 2785-2788) 。

[0081] 在一个实施方案中, 本发明所述的双特异性抗体包含 IgG1 或 IgG3 亚类 (优选 IgG1 亚类) 的恒定区, 其优选地来自人来源。在一个实施方案中, 本发明所述的双特异性抗体包含 IgG1 或 IgG3 亚类 (优选 IgG1 亚类) 的 Fc 部分, 其优选地来自人来源。

[0082] 当 IgG4 亚类的抗体显示减少的 Fc 受体 (Fc γ RIIa) 结合时, 其它 IgG 亚类的抗体显示强烈的结合。然而, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (失去 Fc 糖), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434, 和 His435 是这样的残基, 其如果改变的话, 还提供减少的 Fc 受体结合 (Shields, R. L., 等, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 276 (2001) 6591-6604 ;Lund, J., 等, FASEB J. 9 (1995) 115-119 ;Morgan, A., 等, 免疫学 (Immunology) 86 (1995) 319-324 ;EP 0 307 434) 。

[0083] 在一个实施方案中, 本发明所述的抗体与 IgG1 抗体比较具有减少的 FcR 结合, 并且所述全长亲本抗体涉及 IgG4 亚类的 FcR 结合或具有突变 S228, L234, L235 和 / 或 D265 的 IgG1 或 IgG2 亚类的 FcR 结合, 和 / 或包含 PVA236 突变。在一个实施方案中, 在全长亲本抗体中的突变是 S228P, L234A, L235A, L235E 和 / 或 PVA236。在另一个实施方案中, 在全长亲本抗体中的突变在 IgG4 中是 S228P, 在 IgG1 中是 L234A 和 L235A。

[0084] 抗体的恒定区直接参与 ADCC (抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用) 和 CDC (补体依赖的细胞毒性)。补体激活 (CDC) 由补体因子 C1q 与大多数 IgG 抗体亚类的恒定区结合而起始。C1q 与抗体的结合由在所谓的结合位点的定义的蛋白 - 蛋白相互作用所导致。这样的恒定区结合位点在现有技术中是已知的, 并且例如由 Lukas, T., J., 等, 免疫学杂志 (J. Immunol.) 127 (1981) 2555-2560 ;Brunhouse, R., 和 Cebra, J., J., 分子免疫学 (Mol. Immunol.) 16 (1979) 907-917 ;Burton, D., R., 等, 自然 (Nature) 288 (1980) 338-344 ;Thommesen, J., E., 等, 分子免疫学 (Mol. Immunol.) 37 (2000) 995-1004 ;Idusogie, E., E., 等, 免疫学杂志 (J. Immunol.) 164 (2000) 4178-4184 ;Hezareh, M., 等, 病毒学杂志 (J. Virol.) 75 (2001) 12161-12168 ;Morgan, A., 等, 免疫学 (Immunology) 86 (1995) 319-324 ;和 EP 0 307 434 所描述。例如, 所述恒定区结合位点特征在于氨基酸 L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, 和 P329 (根据 Kabat 的 EU 索引编号)。

[0085] 术语“抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC)”指在存在效应细胞时, 由本发明所述的抗体裂解人靶细胞。ADCC 优选地通过用本发明所述的抗体在存在效应细胞时处理表达 ErbB-1 和 c-Met 的细胞的制备物进行测量, 所述效应细胞如新鲜分离的 PBMC 或来自暗黄覆盖层的纯化的效应细胞, 如单核细胞或天然杀伤 (NK) 细胞或永久生长的 NK 细胞系。

[0086] 术语“补体依赖的细胞毒性 (CDC)”指由补体因子 C1q 与大多数 IgG 抗体亚类的 Fc 部分结合而起始的过程。C1q 与抗体的结合由在所谓的结合位点的限定的蛋白 - 蛋白相互作用所导致。这些 Fc 部分结合位点是现有技术已知的 (见上)。例如, 这些 Fc 部分结合位点特征在于氨基酸 L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, 和 P329 (根据 Kabat 的 EU 索引编号)。亚类 IgG1, IgG2, 和 IgG3 的抗体通常显示包括 C1q 和 C3 结合的补体激活, 而 IgG4 不激活补体系统并且不结合 C1q 和 / 或 C3。

[0087] 单克隆抗体的细胞介导的效应子功能可以通过改造它们的寡糖成分而得以增强,如在 Umana, P., 等, 自然生物技术 (Nature Biotechnol.) 17(1999) 176-180, 和 US 6,602,684 中所述。IgG1 型抗体是最常用的治疗性抗体,其是在每个 CH2 结构域的 Asn297 处具有保守的 N-连接的糖基化位点的糖蛋白。与 Asn297 附着的两个复合双分支 (biantennary) 寡糖包埋在 CH2 结构域之间,形成了与多肽主链的广泛接触,并且它们的存在对于抗体介导效应子功能诸如抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC) 是必要的 (Lifely, M.R., 等, 糖生物学 (Glycobiology) 5(1995) 813-822; Jefferis, R., 等, 免疫学综述 (Immunol Rev.) 163(1998) 59-76; Wright, A. 和 Morrison, S.L., 生物技术趋势 (Trends Biotechnol.) 15(1997) 26-32)。Umana, P., 等, 自然生物技术 (Nature Biotechnol.) 17(1999) 176-180 和 WO 99/54342 显示, β (1,4)-N-乙酰葡萄糖胺转移酶 III (“GnTIII”), 一种催化平分型 (bisected) 寡糖形成的糖基转移酶, 在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中的过量表达, 显著增加了抗体的体外 ADCC 活性。在 Asn297 糖的组成上的改变或其消除也影响 Fc γ R 和 C1q 的结合 (Umana, P., 等, 自然生物技术 (Nature Biotechnol.) 17(1999) 176-180; Davies, J., 等, 生物技术生物工程 (Biotechnol. Bioeng.) 74(2001) 288-294; Mimura, Y., 等, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 276(2001) 45539-45547; Radaev, S., 等, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 276(2001) 16478-16483; Shields, R.L., 等, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 276(2001) 6591-6604; Shields, R.L., 等, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 277(2002) 26733-26740; Simmons, L.C., 等, 免疫学方法杂志 (J. Immunol. Methods) 263(2002) 133-147)。

[0088] 通过降低岩藻糖的量增强单克隆抗体的细胞介导的效应子功能的方法例如记述在 WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO 2004/065540, WO 2005/011735, WO 2005/027966, WO 1997/028267, US 2006/0134709, US 2005/0054048, US 2005/0152894, WO 2003/035835, WO 2000/061739, Niwa, R., 等, 免疫方法杂志 (J. Immunol. Methods) 306(2005) 151-160; Shinkawa, T., 等, 生物化学杂志 (J Biol Chem), 278(2003) 3466-3473; WO 03/055993 或 US 2005/0249722 中。

[0089] 在本发明的一个实施方案中, 本发明所述的双特异性抗体是在 Asn297 处用糖链糖基化的 (IgG1 或 IgG3 亚类), 其中在所述糖链中的岩藻糖的量是 65% 以下 (根据 Kabat 的编号)。在另一个实施方案中, 岩藻糖在所述糖链中的量在 5% -65%, 优选地 20% -40%。根据本发明所述的“Asn297”意为在 Fc 区域中位于约位置 297 的氨基酸天冬酰胺。基于抗体的微小序列变化, Asn297 也可以在定位在位置 297 上游或下游的一些氨基酸上 (通常不超过 ± 3 个氨基酸), 即在位置 294-300 之间。

[0090] 人 IgG1 或 IgG3 在 Asn297 发生糖基化, 该糖基化作为核心岩藻糖基化的双分支复合寡糖糖基化, 末端为多至两个 Gal 残基。IgG1 或 IgG3 亚类的人恒定重链区由 Kabat, E.A., 等, 免疫目的蛋白序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第 5 版. 公众健康服务 (Public Health Service), 全国卫生研究所 (National Institutes of Health), Bethesda, MD. (1991), 和由 Brüggemann, M., 等, 实验医学杂志 (J. Exp. Med.) 166(1987) 1351-1361; Love, T.W., 等, 酶学方法 (Methods Enzymol.) 178(1989) 515-527 中详细报道。根据末端 Gal 残基的量, 将这些结构称为 G0,

G1 (α -1,6- 或 α -1,3-), 或 G2 聚糖残基 (Raju, T. S., *Bioprocess Int.* 1 (2003) 44-53)。例如, 抗体 Fc 部分的 CHO 型糖基化由 Routier, F.H., 糖缀合物杂志 (*Glycoconjugate J.*) 14 (1997) 201-207 描述。在未进行糖修饰的 CHO 宿主细胞中重组表达的抗体通常以至少 85% 的量在 Asn297 进行岩藻糖基化。全长亲本抗体的修饰的寡糖可以是杂合型的或复合型的。优选地, 所述平分型的、减少的 / 未 - 岩藻糖基化的寡糖是杂合型的。在另一个实施方案中, 所述平分型的、减少的 / 未 - 岩藻糖基化的寡糖是复合型的。

[0091] 根据本发明, “岩藻糖的量” 意为与在 Asn297 附着的所有糖结构的总和 (例如, 复合型、杂合型和高甘露糖型结构) 相比的在 Asn297 的糖链中所述糖的量, 所述糖的量通过 MALDI-TOF 质谱测量并且计算为平均值。岩藻糖的相对量是包含岩藻糖的结构相对于在 N-糖苷酶 F 处理的样品中由 MALDI-TOF 鉴定的所有糖结构 (例如, 分别为复合型、杂合型和低聚 - 与高甘露糖型结构) 的百分比。(参见, 例如 WO 2008/077546 (A1))。

[0092] 一个实施方案是制备 IgG1 或 IgG3 亚类的双特异性抗体的方法, 所述抗体在 Asn297 用糖链糖基化, 其中所述糖链中的岩藻糖的量为 65% 以下, 该方法使用在 WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO2007/031875, Umana, P., 等, 自然生物技术 (*Nature Biotechnol.*) 17 (1999) 176-180, WO99/154342, WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO2005/011735, WO 2005/027966, WO 97/028267, US 2006/0134709, US2005/0054048, US 2005/0152894, WO 2003/035835 或 WO 2000/061739 中描述的程序。

[0093] 一个实施方案是制备 IgG1 或 IgG3 亚类的双特异性抗体的方法, 所述抗体在 Asn297 用糖链糖基化, 其中所述糖链中的岩藻糖的量为 65% 以下, 该方法使用在 Niwa, R., 等, 免疫学方法杂志 (*J. Immunol. Methods*) 306 (2005) 151-160; Shinkawa, T. 等, 生物化学杂志 (*J Biol Chem*), 278 (2003) 3466-3473; WO 03/055993 或 US 2005/0249722 中描述的程序。

[0094] 双特异性抗体形式

[0095] 本发明的抗体具有两个以上的结合位点, 并且是多特异性的, 优选是双特异性的。即, 即使是在存在两个以上结合位点 (即, 抗体是三价或多价的) 的情形中, 所述抗体可以是双特异性的。本发明的双特异性抗体包括, 例如多价单链抗体、双抗体和三链抗体, 以及具有全长抗体的恒定结构域结构的抗体, 另外的抗原结合位点 (例如单链 Fv、VH 结构域和 / 或 VL 结构域, Fab, 或 (Fab)₂) 通过一个或多个肽接头连接所述全长抗体的恒定结构域结构。所述抗体可以是来自单一物种的全长抗体, 或可以是嵌合化或人源化的。对于具有超过两个抗原结合位点的抗体, 一些结合位点可以是相同的, 只要所述蛋白具有对于两个不同抗原的结合位点。即, 当第一结合位点特异于 ErbB-1 时, 第二结合位点特异于 c-Met, 反之亦然。

[0096] 在一个优选的实施方案中, 根据本发明的特异性结合人 ErbB-1 和人 c-Met 的双特异性抗体包含抗体 (优选 IgG1 或 IgG3 亚类) 的 Fc 区。

[0097] 二价双特异性形式

[0098] 针对人 ErbB-1 和人 c-Met 的包含免疫球蛋白恒定区的双特异性、二价抗体可如, 例如 WO2009/080251, WO2009/080252, WO2009/080253 或 Ridgway, J.B., 蛋白质工程 (*Protein Eng.*) 9 (1996) 617-621; WO 96/027011; Merchant, A.M., 等, 自然生物技术 (*Nature Biotech*) 16 (1998) 677-681; Atwell, S., 等, 分子生物学杂志 (*J. Mol.*

Biol.) 270(1997) 26-35 和 EP 1870459A1 中的描述进行使用。

[0099] 因此在本发明的一个实施方案中,本发明所述的双特异性 <ErbB-1-c-Met> 抗体是二价、双特异性抗体,其包含:

[0100] a) 特异性结合 ErbB-1 的全长抗体的轻链和重链;和

[0101] b) 特异性结合人 c-Met 的全长抗体的轻链和重链,

[0102] 其中恒定结构域 CL 和 CH1 和 / 或可变结构域 VL 和 VH 被相互替换。

[0103] 在本发明的另一个实施方案中,本发明所述的双特异性 <ErbB-1-c-Met> 抗体是二价、双特异性抗体,其包含:

[0104] a) 特异性结合人 c-Met 的全长抗体的轻链和重链;和

[0105] b) 特异性结合 ErbB-1 的全长抗体的轻链和重链,

[0106] 其中恒定结构域 CL 和 CH1 和 / 或可变结构域 VL 和 VH 被相互替换。

[0107] 对于如下所述的“凸起-进入-孔洞(knob-into-holes)”技术的示例性图解结构,参见图 2a-c。

[0108] 为了提高这种异二聚体的二价的、双特异性的抗 -ErbB-1/ 抗 -c-Met 抗体的产量,所述全长抗体的 CH3 结构域可以通过“凸起-进入-孔洞”技术改变,该技术用例如 WO 96/027011, Ridgway J., B., 等, Protein Eng(蛋白质工程) 9(1996) 617-621; 和 Merchant, A., M., 等, Nat Biotechnol(自然生物技术) 16(1998) 677-681 中的若干实例详细记述。在该方法中,改变两个 CH3 结构域的相互作用表面,以增加包含这两个 CH3 结构域的两条重链的异二聚化。(两条重链的) 两个 CH3 结构域之一可以是“凸起”,而另一个是“孔洞”。二硫键的引入稳定该异二聚体 (Merchant, A., M., 等, Nature Biotech(自然生物技术) 16(1998) 677-681; Atwell, S., 等., J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 270(1997) 26-35) 并增加产率。

[0109] 因此,在本发明的一个方面,所述二价双特异性抗体进一步特征在于:

[0110] 一条重链的 CH3 结构域和另一条重链的 CH3 结构域分别在包括抗体 CH3 结构域之间的初始界面的界面处相接;

[0111] 其中改变所述界面以促进二价双特异性抗体的形成,其中所述改变的特征在于:

[0112] a) 改变一条重链的 CH3 结构域,

[0113] 由此,在与二价双特异性抗体内的另一条重链的 CH3 结构域的初始界面相接的一条重链的 CH3 结构域的初始界面内,

[0114] 氨基酸残基被替换为具有较大侧链体积的氨基酸残基,由此在一条重链的 CH3 结构域的界面内生成突起,该突起可以定位在另一条重链的 CH3 结构域的界面内的凹洞中;

[0115] 并且

[0116] b) 改变另一条重链的 CH3 结构域,

[0117] 由此,在与二价双特异性抗体内的第一 CH3 结构域的初始界面相接的第二 CH3 结构域的初始界面内,

[0118] 氨基酸残基被替换为具有较小侧链体积的氨基酸残基,由此在第二 CH3 结构域的界面内生成凹洞,第一 CH3 结构域的界面内的突起可以定位在该凹洞中。

[0119] 优选地,所述具有较大侧链体积的氨基酸残基选自由精氨酸(R), 苯丙氨酸(F), 酪氨酸(Y), 色氨酸(W) 组成的组。

[0120] 优选地,所述具有较小侧链体积的氨基酸残基选自丙氨酸(A),丝氨酸(S),苏氨酸(T),缬氨酸(V)组成的组。

[0121] 在本发明的一个方面中,通过引入半胱氨酸(C)作为每个CH3结构域相应位置处的氨基酸,进一步改变这两个CH3结构域,从而可以形成两个CH3结构域之间的二硫键。

[0122] 在优选实施方案中,所述二价双特异性抗体包含在“凸起链”CH3结构域中的T366W突变和在“孔洞链”CH3结构域中的T366S, L368A, Y407V突变。还可以使用在CH3结构域之间的另外的链间二硫键(Merchant, A.M, 等, 自然生物技术(Nature Biotech) 16(1998)677-681),例如,通过向“凸起链”CH3结构域中引入Y349C突变和向“孔洞链”CH3结构域中引入E356C突变或S354C突变。因此,在另一个优选的实施方案中,所述二价双特异性抗体在两个CH3结构域中的一个中包含Y349C, T366W突变,在这两个CH3结构域中的另一个中包含E356C, T366S, L368A, Y407V突变,或所述二价双特异性抗体包含在两个CH3结构域中的一个中的Y349C, T366W突变和在这两个CH3结构域中的另一个中的S354C, T366S, L368A, Y407V突变(在一个CH3结构域中的另外的Y349C突变与在另一个CH3结构域中的另外的E356C或S354C突变形成链间二硫键)(根据Kabat的EU索引编号)。但是,也可以备选或者另外地使用EP 1870459A1所述的其它凸起-入-孔洞技术。所述二价、双特异性抗体的优选实例是在“凸起链”CH3结构域中的R409D ;K370E突变和在“孔洞链”CH3结构域中的D399K ;E357K突变(根据Kabat的EU索引编号)。

[0123] 在另一个优选的实施方案中,所述二价、双特异性抗体包含在“凸起链”CH3结构域中的T366W突变和在“孔洞链”CH3结构域中的T366S, L368A, Y407V突变,并且额外地,包含在“凸起链”CH3结构域中的R409D ;K370E突变和在“孔洞链”CH3结构域中的D399K ;E357K突变。

[0124] 在另一个优选的实施方案中,所述二价、双特异性抗体包含在两个CH3结构域中的一个中的Y349C, T366W突变和在这两个CH3结构域中的另一个中的S354C, T366S, L368A, Y407V突变,或者所述二价、双特异性抗体包含在两个CH3结构域中的一个中的Y349C, T366W突变和在这两个CH3结构域中的另一个中的S354C, T366S, L368A, Y407V突变,并且额外地,包含在“凸起链”CH3结构域中的R409D ;K370E突变和在“孔洞链”CH3结构域中的D399K ;E357K突变。

[0125] 三价双特异性形式

[0126] 本发明的另一个优选方面是三价、双特异性抗体,其包含:

[0127] a) 特异性结合人ErbB-1并且由两个抗体重链和两个抗体轻链组成的全长抗体;
和

[0128] b) 特异性结合人c-Met的一个单链Fab片段,

[0129] 其中b)中所述单链Fab片段通过肽连接体在a)中所述全长抗体的重链或轻链的C-或N-末端融合到所述全长抗体。

[0130] 对于如下所述的“凸起-进入-孔洞”技术的示例性图解结构,参见图5a。

[0131] 本发明的另一个优选方面是三价、双特异性抗体,其包含:

[0132] a) 特异性结合人ErbB-1并且由两个抗体重链和两个抗体轻链组成的全长抗体;
和

[0133] b) 特异性结合人c-Met的一个单链Fv片段,

[0134] 其中 b) 中所述单链 Fv 片段通过肽连接体在 a) 中所述全长抗体的重链或轻链的 C- 或 N- 末端融合到所述全长抗体。

[0135] 对于如下所述的“凸起 - 进入 - 孔洞”技术的示例性图解结构, 参见图 5b。

[0136] 在一个优选的实施方案中, 所述结合人 c-Met 的单链 Fab 或 Fv 片段通过肽连接体在所述全长抗体的重链的 C- 末端融合到所述全长抗体。

[0137] 本发明的另一个优选方面是三价、双特异性抗体, 其包含:

[0138] a) 特异性结合人 ErbB-1 并且由两个抗体重链和两个抗体轻链组成的全长抗体; 和

[0139] b) 由下述组成的多肽:

[0140] ba) 抗体重链可变结构域 (VH); 或

[0141] bb) 抗体重链可变结构域 (VH) 和抗体恒定结构域 1 (CH1),

[0142] 其中所述多肽的 VH 结构域 N 端通过肽连接体融合到所述全长抗体的两条重链中的一条重链的 C 端;

[0143] c) 由下述组成的多肽:

[0144] ca) 抗体轻链可变结构域 (VL), 或

[0145] cb) 抗体轻链可变结构域 (VL) 和抗体轻链恒定结构域 (CL);

[0146] 其中所述多肽的 VL 结构域 N 端通过肽连接体融合到所述全长抗体的两条重链中的另一条重链的 C 端;

[0147] 并且其中 b) 中所述多肽的抗体重链可变结构域 (VH) 和 c) 中所述多肽的抗体轻链可变结构域 (VL) 一起形成特异性结合人 c-Met 的抗原结合位点。

[0148] 优选地, b) 和 c) 中所述的肽连接体是相同的, 并且是至少 25 个氨基酸的肽, 优选在 30 和 50 个氨基酸之间的肽。

[0149] 对于示例性图解结构参见图 3a-c。

[0150] 任选地, b) 中所述多肽的抗体重链可变结构域 (VH) 和 c) 中所述多肽的抗体轻链可变结构域 (VL) 通过链间二硫键连接并得以稳定, 所述链间二硫键通过在下述位置之间引入二硫键形成:

[0151] i) 重链可变结构域位置 44 到轻链可变结构域位置 100,

[0152] ii) 重链可变结构域位置 105 到轻链可变结构域位置 43, 或

[0153] iii) 重链可变结构域位置 101 到轻链可变结构域位置 100 (总是根据 Kabat 的 EU 索引编号)。

[0154] 例如, 引入用于稳定的非天然二硫键的技术记述在 W0 94/029350, Rajagopal, 等, 蛋白质工程 (Prot. Engin.) 10 (1997) 1453-59; Kobayashi, H., 等, 核医学和生物学 (Nuclear Medicine & Biology) 25 (1998) 387-393; 或 Schmidt, M., 等, 癌基因 (Oncogene) 18 (1999) 1711-1721 中。在一个实施方案中, 在 b) 和 c) 中所述多肽的可变结构域之间的任选的二硫键在重链可变结构域位置 44 和轻链可变结构域位置 100 之间。在一个实施方案中, 在 b) 和 c) 中所述多肽的可变结构域之间的任选的二硫键在重链可变结构域位置 105 和轻链可变结构域位置 43 之间。(总是根据 Kabat 的 EU 索引编号) 在一个实施方案中, 优选在单链 Fab 片段的可变结构域 VH 和 VL 之间没有所述任选的二硫化物稳定的三价、双特异性抗体。

[0155] 通过将单链 Fab、Fv 片段融合到一条重链上（图 5a 或 5b）或通过不同多肽融合到全长抗体的两条重链上（图 3a-c），产生异二聚化的、三价双特异性抗体。为了提高这种异二聚体的三价的、双特异性的抗 -ErbB-1/ 抗 -c-Met 抗体的产量，所述全长抗体的 CH3 结构域可以通过“凸起-进入-孔洞”技术改变，该技术用例如 WO 96/027011, Ridgway J., B., 等, Protein Eng (蛋白质工程) 9 (1996) 617-621 ; 和 Merchant, A. M., 等, Nat Biotechnol (自然生物技术) 16 (1998) 677-681 中的若干实例详细记述。在该方法中，改变两个 CH3 结构域的相互作用表面，以增加包含这两个 CH3 结构域的两条重链的异二聚化。（两条重链的）两个 CH3 结构域之一可以是“凸起”，而另一个是“孔洞”。二硫键的引入稳定该异二聚体 (Merchant, A. M., 等, Nature Biotech (自然生物技术) 16 (1998) 677-681 ; Atwell, S., 等., J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 270 (1997) 26-35) 并增加产率。

[0156] 因此，在本发明的一个方面，所述三价双特异性抗体进一步特征在于：

[0157] 全长抗体的一条重链的 CH3 结构域和该全长抗体的另一条重链的 CH3 结构域分别在包括抗体 CH3 结构域之间的初始界面的界面处相接；

[0158] 其中改变所述界面以促进二价双特异性抗体的形成，其中所述改变的特征在于：

[0159] a) 改变一条重链的 CH3 结构域，

[0160] 由此，在与二价双特异性抗体内的另一条重链的 CH3 结构域的初始界面相接的一条重链的 CH3 结构域的初始界面内，

[0161] 氨基酸残基被替换为具有较大侧链体积的氨基酸残基，由此在一条重链的 CH3 结构域的界面内生成突起，该突起可以定位在另一条重链的 CH3 结构域的界面内的凹洞中；

[0162] 并且

[0163] b) 改变另一条重链的 CH3 结构域，

[0164] 由此，在与三价双特异性抗体内的第一 CH3 结构域的初始界面相接的第二 CH3 结构域的初始界面内，

[0165] 氨基酸残基被替换为具有较小侧链体积的氨基酸残基，由此在第二 CH3 结构域的界面内生成凹洞，第一 CH3 结构域的界面内的突起可以定位在该凹洞中。

[0166] 优选地，所述具有较大侧链体积的氨基酸残基选自由精氨酸 (R)，苯丙氨酸 (F)，酪氨酸 (Y)，色氨酸 (W) 组成的组。

[0167] 优选地，所述具有较小侧链体积的氨基酸残基选自由丙氨酸 (A)，丝氨酸 (S)，苏氨酸 (T)，缬氨酸 (V) 组成的组。

[0168] 在本发明的一个方面中，通过引入半胱氨酸 (C) 作为每个 CH3 结构域相应位置处的氨基酸，进一步改变这两个 CH3 结构域，从而可以形成两个 CH3 结构域之间的二硫键。

[0169] 在优选实施方案中，所述三价双特异性抗体包含在“凸起链”CH3 结构域中的 T366W 突变和在“孔洞链”CH3 结构域中的 T366S, L368A, Y407V 突变。还可以使用在 CH3 结构域之间的另外的链间二硫键 (Merchant, A. M., 等, 自然生物技术 (Nature Biotech) 16 (1998) 677-681)，例如，通过向“凸起链”CH3 结构域中引入 Y349C 突变和向“孔洞链”CH3 结构域中引入 E356C 突变或 S354C 突变。因此，在另一个优选的实施方案中，所述三价双特异性抗体包含在两个 CH3 结构域中的一个中的 Y349C, T366W 突变和在这两个 CH3 结构域中的另一个中的 E356C, T366S, L368A, Y407V 突变，或所述三价双特异性抗体包含在两个 CH3 结构域中的一个中的 Y349C, T366W 突变和在这两个 CH3 结构域中的另一个中

的 S354C, T366S, L368A, Y407V 突变 (在一个 CH3 结构域中的另外的 Y349C 突变与在另一个 CH3 结构域中的另外的 E356C 或 S354C 突变形成链间二硫键) (总是根据 Kabat 的 EU 索引编号)。但是,也可以备选或者另外地使用 EP 1870459A1 所述的其它凸起-入-孔洞技术。所述三价、双特异性抗体的优选实例是在“凸起链”CH3 结构域中的 R409D ;K370E 突变和在“孔洞链”CH3 结构域中的 D399K ;E357K 突变 (总是根据 Kabat 的 EU 索引编号)。

[0170] 在另一个优选的实施方案中,所述三价、双特异性抗体包含在“凸起链”CH3 结构域中的 T366W 突变和在“孔洞链”CH3 结构域中的 T366S, L368A, Y407V 突变,并且额外地,包含在“凸起链”CH3 结构域中的 R409D ;K370E 突变和在“孔洞链”CH3 结构域中的 D399K ;E357K 突变。

[0171] 在另一个优选的实施方案中,所述三价、双特异性抗体包含在两个 CH3 结构域中的一个中的 Y349C, T366W 突变和在这两个 CH3 结构域中的另一个中的 S354C, T366S, L368A, Y407V 突变,或者所述三价、双特异性抗体包含在两个 CH3 结构域中的一个中的 Y349C, T366W 突变和在这两个 CH3 结构域中的另一个中的 S354C, T366S, L368A, Y407V 突变,并且额外地,包含在“凸起链”CH3 结构域中的 R409D ;K370E 突变和在“孔洞链”CH3 结构域中的 D399K ;E357K 突变。

[0172] 本发明的另一个实施方案是三价、双特异性抗体,其包含:

[0173] a) 全长抗体,其特异性结合人 ErbB-1 并且由下述组成:

[0174] aa) 两个抗体重链,其在 N-端至 C-端方向由抗体重链可变结构域 (VH), 抗体恒定重链结构域 1 (CH1), 抗体铰链区 (HR), 抗体重链恒定结构域 2 (CH2), 和抗体重链恒定结构域 3 (CH3) 组成;和

[0175] ab) 两个抗体轻链,其在 N-端至 C-端方向由抗体轻链可变结构域 (VL), 和抗体轻链恒定结构域 (CL) (VL-CL) 组成;和

[0176] b) 一个特异性结合人 c-Met 的单链 Fab 片段,

[0177] 其中所述单链 Fab 片段由抗体重链可变结构域 (VH) 和抗体恒定结构域 1 (CH1), 抗体轻链可变结构域 (VL), 抗体轻链恒定结构域 (CL) 和接头组成,并且其中所述抗体结构域和所述接头在 N-端至 C-端方向具有下述顺序之一:

[0178] ba) VH-CH1-接头-VL-CL, 或 bb) VL-CL-接头-VH-CH1;

[0179] 其中所述接头是至少 30 个氨基酸的肽,优选在 32 和 50 个氨基酸残基之间的肽;

[0180] 并且其中 b) 中所述单链 Fab 片段通过肽连接体在 a) 中所述全长抗体的重链或轻链的 C-或 N-末端 (优选重链的 C-末端) 融合到所述全长抗体;

[0181] 其中所述肽连接体是至少 5 个氨基酸的肽,优选在 10 和 50 个氨基酸之间的肽。

[0182] 在这一实施方案中,优选地,所述三价、双特异性抗体包含在两个 CH3 结构域中的一个中的 T366W 突变和在这两个 CH3 结构域中的另一个中的 T366S, L368A, Y407V 突变,并且更优选地,所述三价、双特异性抗体包含在两个 CH3 结构域中的一个中的 Y349C, T366W 突变和在这两个 CH3 结构域中的另一个中的 S354C (或 E356C), T366S, L368A, Y407V 突变。任选地,在所述实施方案中,所述三价、双特异性抗体包含在“凸起链”CH3 结构域中的 R409D ;K370E 突变和在“孔洞链”CH3 结构域中的 D399K ;E357K 突变。

[0183] 本发明的另一个实施方案是三价、双特异性抗体,其包含:

[0184] a) 全长抗体,其特异性结合人 ErbB-1 并且由下述组成:

[0185] aa) 两个抗体重链,其在 N-端至 C-端方向由抗体重链可变结构域 (VH),抗体恒定重链结构域 1(CH1),抗体铰链区 (HR),抗体重链恒定结构域 2(CH2),和抗体重链恒定结构域 3(CH3) 组成;和

[0186] ab) 两个抗体轻链,其在 N-端至 C-端方向由抗体轻链可变结构域 (VL),和抗体轻链恒定结构域 (CL) (VL-CL) 组成;和

[0187] b) 一个特异性结合人 c-Met 的单链 Fv 片段,

[0188] 其中 b) 中所述单链 Fv 片段通过肽连接体在 a) 中所述全长抗体的重链或轻链的 C-或 N-末端(优选重链的 C-末端)融合到所述全长抗体;

[0189] 其中所述肽连接体是至少 5 个氨基酸的肽,优选在 10 和 50 个氨基酸之间的肽。

[0190] 在这一实施方案中,优选地,所述三价、双特异性抗体包含在两个 CH3 结构域中的一个中的 T366W 突变和在这两个 CH3 结构域中的另一个中的 T366S, L368A, Y407V 突变,并且更优选地,所述三价、双特异性抗体包含在两个 CH3 结构域中的一个中的 Y349C, T366W 突变和在这两个 CH3 结构域中的另一个中的 S354C(或 E356C), T366S, L368A, Y407V 突变。任选地,在所述实施方案中,所述三价、双特异性抗体包含在“凸起链”CH3 结构域中的 R409D; K370E 突变和在“孔洞链”CH3 结构域中的 D399K; E357K 突变。

[0191] 因此,优选的实施方案是三价、双特异性抗体,其包含:

[0192] a) 全长抗体,其特异性结合人 ErbB-1 并且由下述组成:

[0193] aa) 两个抗体重链,其在 N-端至 C-端方向由抗体重链可变结构域 (VH),抗体恒定重链结构域 1(CH1),抗体铰链区 (HR),抗体重链恒定结构域 2(CH2),和抗体重链恒定结构域 3(CH3) 组成;和

[0194] ab) 两个抗体轻链,其在 N-端至 C-端方向由抗体轻链可变结构域 (VL),和抗体轻链恒定结构域 (CL) (VL-CL) 组成;和

[0195] b) 一个特异性结合人 c-Met 的单链 Fv 片段,

[0196] 其中 b) 中所述单链 Fv 片段通过肽连接体在 a) 中所述全长抗体的重链的 C-末端融合到所述全长抗体(产生两抗体重链-单链 Fv 融合肽);和

[0197] 其中所述肽连接体是至少 5 个氨基酸的肽。

[0198] 本发明的另一个实施方案是三价、双特异性抗体,其包含:

[0199] a) 全长抗体,其特异性结合人 ErbB-1 并且由下述组成:

[0200] aa) 两个抗体重链,其在 N-端至 C-端方向由抗体重链可变结构域 (VH),抗体恒定重链结构域 1(CH1),抗体铰链区 (HR),抗体重链恒定结构域 2(CH2),和抗体重链恒定结构域 3(CH3) 组成;和

[0201] ab) 两个抗体轻链,其在 N-端至 C-端方向由抗体轻链可变结构域 (VL),和抗体轻链恒定结构域 (CL) 组成;和

[0202] b) 由下述组成的多肽:

[0203] ba) 抗体重链可变结构域 (VH);或

[0204] bb) 抗体重链可变结构域 (VH) 和抗体恒定结构域 1(CH1),

[0205] 其中所述多肽的 VH 结构域 N 端通过肽连接体融合到所述全长抗体的两条重链中的一条重链的 C 端(产生抗体重链-VH 融合肽),其中所述肽连接体是至少 5 个氨基酸的肽,优选在 25 和 50 个氨基酸之间的肽;

[0206] c) 由下述组成的多肽：

[0207] ca) 抗体轻链可变结构域 (VL)，或

[0208] cb) 抗体轻链可变结构域 (VL) 和抗体轻链恒定结构域 (CL)；

[0209] 其中所述多肽的 VL 结构域 N 端通过肽连接体融合到所述全长抗体的两条重链中的另一条重链的 C 端（产生抗体重链-VL 融合肽）；

[0210] 其中所述肽连接体与 b) 中所述肽连接体相同；

[0211] 并且其中 b) 中所述多肽的抗体重链可变结构域 (VH) 和 c) 中所述多肽的抗体轻链可变结构域 (VL) 一起形成特异性结合人 c-Met 的抗原结合位点。

[0212] 在这一实施方案中，优选地，所述三价、双特异性抗体包含在两个 CH3 结构域中的一个中的 T366W 突变和在这两个 CH3 结构域中的另一个中的 T366S, L368A, Y407V 突变，并且更优选地，所述三价、双特异性抗体包含在两个 CH3 结构域中的一个中的 Y349C, T366W 突变和在这两个 CH3 结构域中的另一个中的 S354C（或 E356C），T366S, L368A, Y407V 突变。任选地，在所述实施方案中，所述三价、双特异性抗体包含在“凸起链”CH3 结构域中的 R409D；K370E 突变和在“孔洞链”CH3 结构域中的 D399K；E357K 突变。

[0213] 在本发明的另一个方面中，本发明所述的三价、双特异性抗体包含：

[0214] a) 结合人 ErbB-1 的全长抗体，其由两个抗体重链 VH-CH1-HR-CH2-CH3 和两个抗体轻链 VL-CL 组成；

[0215] （其中优选地，两个 CH3 结构域中的一个包含 Y349C, T366W 突变，并且这两个 CH3 结构域中的另一个包含 S354C（或 E356C），T366S, L368A, Y407V 突变）；

[0216] b) 由下述组成的多肽：

[0217] ba) 抗体重链可变结构域 (VH)；或

[0218] bb) 抗体重链可变结构域 (VH) 和抗体恒定结构域 1 (CH1)，

[0219] 其中所述多肽的 VH 结构域 N 端通过肽连接体融合到所述全长抗体的两条重链中的一条重链的 C 端；

[0220] c) 由下述组成的多肽：

[0221] ca) 抗体轻链可变结构域 (VL)，或

[0222] cb) 抗体轻链可变结构域 (VL) 和抗体轻链恒定结构域 (CL)；

[0223] 其中所述多肽的 VL 结构域 N 端通过肽连接体融合到所述全长抗体的两条重链中的另一条重链的 C 端；

[0224] 并且其中 b) 中所述多肽的抗体重链可变结构域 (VH) 和 c) 中所述多肽的抗体轻链可变结构域 (VL) 一起形成特异性结合人 c-Met 的抗原结合位点。

[0225] 四价双特异性形式

[0226] 在一个实施方案中，本发明所述的多特异性抗体是四价的，其中特异性结合人 c-Met 的抗原结合位点抑制 c-Met 二聚化（例如，如在 WO 2009/007427 中所述）。

[0227] 在本发明的一个实施方案中，所述抗体是特异性结合人 ErbB-1 和人 c-Met 的四价的、双特异性抗体，其包含特异性结合人 ErbB-1 的两个抗原结合位点和特异性结合人 c-Met 的两个抗原结合位点，其中所述特异性结合人 c-Met 的抗原结合位点抑制 c-Met 的二聚化（例如，如在 WO 2009/007427 中所述）。

[0228] 因此，本发明的另一个方面是四价、双特异性抗体，其包含：

[0229] a) 全长抗体,其特异性结合人 c-Met 并且由两个抗体重链和两个抗体轻链组成;
和

[0230] b) 特异性结合 ErbB-1 的两个相同的单链 Fab 片段,

[0231] 其中 b) 中所述单链 Fab 片段通过肽连接体在 a) 中所述全长抗体的重链或轻链的 C- 或 N- 末端融合到所述全长抗体。

[0232] 因此,本发明的另一个优选方面是四价、双特异性抗体,其包含:

[0233] a) 全长抗体,其特异性结合人 ErbB-1 并且由两个抗体重链和两个抗体轻链组成;
和

[0234] b) 特异性结合人 c-Met 的两个相同的单链 Fab 片段,

[0235] 其中 b) 中所述单链 Fab 片段通过肽连接体在 a) 中所述全长抗体的重链或轻链的 C- 或 N- 末端融合到所述全长抗体。

[0236] 对于示例性图解结构,参见图 6a。

[0237] 因此,本发明的另一个优选方面是四价、双特异性抗体,其包含:

[0238] a) 全长抗体,其特异性结合 ErbB-1 并且由两个抗体重链和两个抗体轻链组成;和

[0239] b) 特异性结合人 c-Met 的两个相同的单链 Fv 片段,

[0240] 其中 b) 中所述单链 Fv 片段通过肽连接体在 a) 中所述全长抗体的重链或轻链的 C- 或 N- 末端融合到所述全长抗体。

[0241] 因此,本发明的另一个优选方面是四价、双特异性抗体,其包含:

[0242] a) 全长抗体,其特异性结合人 c-Met 并且由两个抗体重链和两个抗体轻链组成;
和

[0243] b) 特异性结合 ErbB-1 的两个相同的单链 Fv 片段,

[0244] 其中 b) 中所述单链 Fv 片段通过肽连接体在 a) 中所述全长抗体的重链或轻链的 C- 或 N- 末端融合到所述全长抗体。

[0245] 对于示例性图解结构,参见图 6b。

[0246] 在一个优选的实施方案中,所述结合人 c-Met 或人 ErbB-1 的单链 Fab 或 Fv 片段通过肽连接体在所述全长抗体的重链的 C- 端融合到所述全长抗体。

[0247] 本发明的另一个实施方案是四价、双特异性抗体,其包含:

[0248] a) 全长抗体,其特异性结合人 ErbB-1 并且由下述组成:

[0249] aa) 两个相同的抗体重链,其在 N- 端至 C- 端方向由抗体重链可变结构域 (VH), 抗体恒定重链结构域 1 (CH1), 抗体铰链区 (HR), 抗体重链恒定结构域 2 (CH2), 和抗体重链恒定结构域 3 (CH3) 组成;和

[0250] ab) 两个相同的抗体轻链,其在 N- 端至 C- 端方向由抗体轻链可变结构域 (VL), 和抗体轻链恒定结构域 (CL) (VL-CL) 组成;和

[0251] b) 特异性结合人 c-Met 的两个单链 Fab 片段,

[0252] 其中所述单链 Fab 片段由抗体重链可变结构域 (VH) 和抗体恒定结构域 1 (CH1), 抗体轻链可变结构域 (VL), 抗体轻链恒定结构域 (CL) 和接头组成,并且其中所述抗体结构域和所述接头在 N- 端至 C- 端方向具有下述顺序之一:

[0253] ba) VH-CH1- 接头 -VL-CL, 或 bb) VL-CL- 接头 -VH-CH1;

[0254] 其中所述接头是至少 30 个氨基酸的肽,优选在 32 和 50 个氨基酸残基之间的肽;

[0255] 并且其中 b) 中所述单链 Fab 片段通过肽连接体在 a) 中所述全长抗体的重链或轻链的 C- 或 N- 末端融合到所述全长抗体；

[0256] 其中所述肽连接体是至少 5 个氨基酸的肽，优选在 10 和 50 个氨基酸之间的肽。

[0257] 当用在三价或四价形式中时，术语“全长抗体”指由两条“全长抗体重链”和两条“全长抗体轻链”组成的抗体（见图 1）。“全长抗体重链”是这样的多肽，其在 N 端到 C 端方向由抗体重链可变结构域（VH）、抗体恒定重链结构域 1（CH1），抗体铰链区（HR），抗体重链恒定结构域 2（CH2），和抗体重链恒定结构域 3（CH3）组成，缩写为 VH-CH1-HR-CH2-CH3；并且在 IgE 亚类的抗体的情形中，任选地还包括抗体重链恒定结构域 4（CH4）。优选地，“全长抗体重链”是在 N 端到 C 端方向由 VH，CH1，HR，CH2 和 CH3 组成的多肽。“全长抗体轻链”是在 N 端到 C 端方向由抗体轻链可变结构域（VL），和抗体轻链恒定结构域（CL）组成的多肽，缩写为 VL-CL。所述抗体轻链恒定结构域（CL）可以是 κ （kappa）或 λ （lambda）。两条全长抗体链通过在 CL 结构域和 CH1 结构域之间的多肽间二硫键和全长抗体重链的铰链区之间的多肽间二硫键连接在一起。典型的全长抗体的实例是天然抗体如 IgG（例如，IgG1 和 IgG2），IgM，IgA，IgD，和 IgE。根据本发明所述的全长抗体可以来自单一物种，例如人，或它们可以是嵌合的或人源化的抗体。根据本发明所述的全长抗体包含分别由 VH 和 VL 配对形成的两个抗原结合位点，这两个抗原结合位点都特异性结合于相同的抗原。所述全长抗体的重链或轻链的 C 端指在所述重链或轻链的 C 端的最后的氨基酸。所述全长抗体的重链或轻链的 N 端指在所述重链或轻链的 N 端的最后的氨基酸。

[0258] 术语“肽连接体”用于本发明时指具有氨基酸序列的肽，其优选地是合成来源的。这些本发明所述的肽连接体用于将单链 Fab 片段融合到全长抗体的 C- 或 N- 端，以形成本发明所述的多特异性抗体。优选地，b) 中所述肽连接体是具有长度为至少 5 个氨基酸的氨基酸序列的肽，优选长度为 5-100 个、更优选长度为 10-50 个氨基酸的氨基酸序列的肽。在一个实施方案中，所述肽连接体是 $(GxS)_n$ 或 $(GxS)_nG_m$ ，其中 G = 甘氨酸，S = 丝氨酸，且 $(x = 3, n = 3, 4, 5 \text{ 或 } 6, \text{ 且 } m = 0, 1, 2 \text{ 或 } 3) \text{ 或 } (x = 4, n = 2, 3, 4 \text{ 或 } 5 \text{ 且 } m = 0, 1, 2 \text{ 或 } 3)$ ，优选地 $x = 4$ 且 $n = 2$ 或 3，更优选地 $x = 4, n = 2$ 。优选地，在三价、双特异性抗体中，其中 VH 或 VH-CH1 多肽和 VL 或 VL-CL 多肽（图 7a-c）通过两个相同的肽连接体融合到全长抗体的 C- 端，所述肽连接体是至少 25 个氨基酸的肽，优选是 30-50 个氨基酸的肽，并且更优选地，所述肽连接体是 $(GxS)_n$ 或 $(GxS)_nG_m$ ，其中 G = 甘氨酸，S = 丝氨酸，且 $(x = 3, n = 6, 7 \text{ 或 } 8, \text{ 且 } m = 0, 1, 2 \text{ 或 } 3) \text{ 或 } (x = 4, n = 5, 6, \text{ 或 } 7 \text{ 且 } m = 0, 1, 2 \text{ 或 } 3)$ ，优选 $x = 4$ 且 $n = 5, 6, 7$ 。

[0259] “单链 Fab 片段”（见图 2a）是由抗体重链可变结构域（VH），抗体恒定结构域 1（CH1），抗体轻链可变结构域（VL），抗体轻链恒定结构域（CL）和接头组成的多肽，其中所述抗体结构域和所述接头从 N 端到 C 端方向具有下列顺序之一：a) VH-CH1-接头-VL-CL，b) VL-CL-接头-VH-CH1，c) VH-CL-接头-VL-CH1 或 d) VL-CH1-接头-VH-CL；并且其中所述接头是至少 30 个氨基酸的多肽，优选地 32-50 个氨基酸的多肽。所述单链 Fab 片段 a) VH-CH1-接头-VL-CL，b) VL-CL-接头-VH-CH1，c) VH-CL-接头-VL-CH1 和 d) VL-CH1-接头-VH-CL，通过在 CL 结构域和 CH1 结构域之间的天然二硫键稳定。术语“N-端”指 N 端的最后的氨基酸。术语“C-端”指 C 端的最后的氨基酸。

[0260] 术语“接头”在本发明中与单链 Fab 片段联系使用，并且指具有氨基酸序列的肽，

其优选地是合成来源的。将本发明所述的这些肽用于连接 a) VH-CH1 与 VL-CL, b) VL-CL 与 VH-CH1, c) VH-CL 与 VL-CH1 或 d) VL-CH1 与 VH-CL 从而形成下列本发明所述的单链 Fab 片段: a) VH-CH1- 接头 -VL-CL, b) VL-CL- 接头 -VH-CH1, c) VH-CL- 接头 -VL-CH1 或 d) VL-CH1- 接头 -VH-CL。在所述单链 Fab 片段中的所述接头是具有至少 30 个氨基酸长度的氨基酸序列, 优选地具有 32-50 个氨基酸长度的氨基酸序列。在一个实施方案中, 所述接头是 $(G_xS)_n$, 其中 G = 甘氨酸, S = 丝氨酸, ($x = 3, n = 8, 9$ 或 10 和 $m = 0, 1, 2$ 或 3) 或 ($x = 4$ 和 $n = 6, 7$ 或 8 和 $m = 0, 1, 2$ 或 3), 优选地其中 $x = 4, n = 6$ 或 7 和 $m = 0, 1, 2$ 或 3 , 更优选地 $x = 4, n = 7$ 和 $m = 2$ 。在一个实施方案中, 所述接头是 $(G_4S)_6G_2$ 。

[0261] 在一个优选的实施方案中, 在所述单链 Fab 片段中的所述抗体结构域和所述接头在 N- 端至 C- 端方向具有下述顺序之一:

[0262] a) VH-CH1- 接头 -VL-CL, 或 b) VL-CL- 接头 -VH-CH1, 更优选地 VL-CL- 接头 -VH-CH1。

[0263] 在另一个优选的实施方案中, 在所述单链 Fab 片段中的所述抗体结构域和所述接头在 N- 端至 C- 端方向具有下述顺序之一:

[0264] a) VH-CL- 接头 -VL-CH1 或 b) VL-CH1- 接头 -VH-CL。

[0265] 任选地, 在所述单链 Fab 片段中, 除了在 CL- 结构域和 CH1 结构域之间的天然二硫键之外, 还通过在下列位置之间引入二硫键来对抗体重链可变结构域 (VH) 和抗体轻链可变结构域 (VL) 进行二硫化物稳定:

[0266] i) 重链可变结构域位置 44 到轻链可变结构域位置 100,

[0267] ii) 重链可变结构域位置 105 到轻链可变结构域位置 43, 或

[0268] iii) 重链可变结构域位置 101 到轻链可变结构域位置 100 (总是根据 Kabat 的 EU 索引编号)。

[0269] 单链 Fab 片段的这些另外的二硫化物稳定通过在单链 Fab 片段的可变结构域 VH 和 VL 之间引入二硫键来实现。例如, 引入非天然的二硫键来稳定单链 Fv 的技术描述在 WO 94/029350, Rajagopal, V., 等, 蛋白质工程 (Prot. Engin.) 10(1997) 1453-59; Kobayashi, H., 等, 核医学和生物学 (Nuclear Medicine & Biology), 25(1998) 387-393; 或 Schmidt, M., 等, 癌基因 (Oncogene) 18(1999) 1711-1721 中。在一个实施方案中, 包含在本发明所述的抗体中的单链 Fab 片段的可变结构域之间的任选的二硫键在重链可变结构域位置 44 和轻链可变结构域位置 100 之间。在一个实施方案中, 包含在本发明所述的抗体中的单链 Fab 片段的可变结构域之间的任选的二硫键在重链可变结构域位置 105 和轻链可变结构域位置 43 之间 (总是根据 Kabat 的 EU 索引编号)。

[0270] 在一个实施方案中, 优选在单链 Fab 片段的可变结构域 VH 和 VL 之间不具有所述任选的二硫化物稳定的单链 Fab 片段。

[0271] “单链 Fv 片段” (见图 2b) 是由抗体重链可变结构域 (VH)、抗体轻链可变结构域 (VL)、和单链 Fv 接头组成的多肽, 其中所述抗体结构域和所述单链 Fv 接头从 N 端到 C 端方向具有下列顺序之一: a) VH- 单链 Fv 接头 -VL, b) VL- 单链 Fv 接头 -VH; 优选 a) VH- 单链 Fv 接头 -VL, 并且其中所述单链 Fv 接头是具有至少 15 个氨基酸长度的氨基酸序列的多肽, 在一个实施方案中, 是具有至少 20 个氨基酸长度的氨基酸序列的多肽。术语“N- 端”指 N 端的最后的氨基酸。术语“C- 端”指 C 端的最后的氨基酸。

[0272] 当用于单链 Fv 片段中时,术语“单链 Fv 接头”指具有氨基酸序列的肽,其优选地是合成来源的。所述单链 Fv 接头是具有至少 15 个氨基酸长度的氨基酸序列的肽,在一个实施方案中,是具有至少 20 个氨基酸长度的氨基酸序列的肽,且优选是具有 15-30 个氨基酸长度的氨基酸序列的肽。在一个实施方案中,所述单链接头是 $(G_xS)_n$,其中 G = 甘氨酸, S = 丝氨酸, $(x = 3 \text{ 且 } n = 4, 5 \text{ 或 } 6) \text{ 或 } (x = 4 \text{ 且 } n = 3, 4, 5 \text{ 或 } 6)$, 优选 $x = 4, n = 3, 4 \text{ 或 } 5$, 更优选 $x = 4, n = 3 \text{ 或 } 4$ 。在一个实施方案中,所述单链 Fv 接头是 $(G_4S)_3$ 或 $(G_4S)_4$ 。

[0273] 此外,所述单链 Fv 片段优选是二硫化物稳定的。单链抗体的这些另外的二硫化物稳定通过在单链抗体的可变结构域之间引入二硫键来实现,并且,例如,在 WO 94/029350, Rajagopal, V., 等, 蛋白质工程 (Prot. Engin.) 10 (1997) 1453-59 ;Kobayashi, H., 等, 核医学和生物学 (Nuclear Medicine & Biology), 25 (1998) 387-393 ;或 Schmidt, M., 等, 癌基因 (Oncogene) 18 (1999) 1711-1721 中所述。

[0274] 在二硫化物稳定的单链 Fv 片段的一个实施方案中,对于每种单链 Fv 片段,包含在本发明所述的抗体中的单链 Fv 片段的可变结构域之间的二硫键独立地选自:

[0275] i) 重链可变结构域位置 44 到轻链可变结构域位置 100,

[0276] ii) 重链可变结构域位置 105 到轻链可变结构域位置 43, 或

[0277] iii) 重链可变结构域位置 101 到轻链可变结构域位置 100。

[0278] 在一个实施方案中,包含在本发明所述的抗体中的单链 Fv 片段的可变结构域之间的二硫键在重链可变结构域位置 44 和轻链可变结构域位置 100 之间。

[0279] 在一个实施方案中,本发明所述的双特异性 Her1/c-Met 抗体在不存在 HGF 时抑制 A431 (ATCC No. CRL-1555) 癌细胞增殖至少 30% (48 小时后测量,见实施例 7a)。

[0280] 在一个实施方案中,本发明所述的双特异性 Her1/c-Met 抗体在存在 HGF 时抑制 A431 (ATCC No. CRL-1555) 癌细胞增殖至少 30% (48 小时后测量,见实施例 7b)。

[0281] 本发明所述的抗体由重组方式产生。因此,本发明的一个方面是编码本发明所述的抗体的核酸,并且另一个方面是包含编码本发明所述的抗体的核酸的细胞。用于重组生产的方法是现有技术中广泛已知的并且包括在原核细胞和真核细胞中的蛋白表达,以及随后的抗体分离和通常纯化为药用纯度。对于前述抗体在宿主细胞中的表达,将编码各个修饰的轻链和重链的核酸通过标准方法插入表达载体中。在适合的原核或真核宿主细胞如 CHO 细胞, NS0 细胞, SP2/0 细胞, HEK293 细胞, COS 细胞, PER.C6 细胞, 酵母, 或大肠杆菌 (E. coli) 细胞中进行表达,并且将所述抗体从细胞 (上清液或裂解后的细胞) 中回收。用于抗体重组生产的一般方法是现有技术中公知的,并且例如在 Makrides, S. C., 蛋白表达和纯化 (Protein Expr. Purif.) 17 (1999) 183-202 ;Geisse, S., 等, 蛋白表达和纯化 (Protein Expr. Purif.) 8 (1996) 271-282 ;Kaufman, R., J., 分子生物技术 (Mol. Biotechnol.) 16 (2000) 151-160 ;Werner, R., G., 药物研究 (Drug Res.) 48 (1998) 870-880 的综述文章中描述。

[0282] 通过常规免疫球蛋白纯化方法,将双特异性抗体适当地从培养基中分离,所述纯化方法如,例如蛋白质 A-琼脂糖,羟基磷灰石层析法,凝胶电泳,透析或亲和层析法。编码所述单克隆抗体的 DNA 和 RNA 容易地使用常规方法进行分离和测序。杂交瘤细胞可以充当所述 DNA 和 RNA 的来源。一旦被分离,可以将 DNA 插入表达载体中,所述表达载体接着被转染到不另外产生免疫球蛋白的宿主细胞如 HEK 293 细胞、CHO 细胞、或骨髓瘤细胞中,从而

在宿主细胞中获得重组单克隆抗体的合成。

[0283] 双特异性抗体的氨基酸序列变体（或突变体）通过将适合的核苷酸变化引入抗体 DNA 中，或通过核苷酸合成进行制备。然而，这样的修饰可以仅在例如如上述的非常有限的范围内进行。例如，修饰不改变上述提及的抗体特征如 IgG 同种型和抗原结合，但是可以提高重组生产的产率、蛋白稳定性或有利于纯化。

[0284] 术语“宿主细胞”用于本申请时是指可以被改造从而产生本发明所述的抗体的细胞系统的任何种类。在一个实施方案中，将 HEK293 细胞和 CHO 细胞用作宿主细胞。用于本文时，表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，且全部这些名称都包括后代。因此，词语“转化体”和“转化的细胞”包括原代受试者细胞和来源于其的培养物，而不考虑转移数。还理解，由于有意或无意的突变，所有的后代的 DNA 内容物可能不精确一致。包括具有与在最初转化的细胞中筛选的功能或生物学活性相同的功能或生物学活性的变体后代。

[0285] 在 NS0 细胞中的表达记述在，例如，Barnes, L. M., 等，细胞技术学 (Cytotechnology) 32 (2000) 109-123 ; Barnes, L. M., 等，生物技术和生物工程 (Biotech. Bioeng.) 73 (2001) 261-270 中。瞬时表达记述在，例如，Durocher, Y., 等，核酸研究 (Nucl. Acids. Res.) 30 (2002) E9 中。可变结构域的克隆记述在 Orlandi, R., 等，美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 86 (1989) 3833-3837 ; Carter, P., 等，美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 89 (1992) 4285-4289 ; 和 Norderhaug, L., 等，免疫学方法杂志 (J. Immunol. Method) 204 (1997) 77-87 中。优选的瞬时表达系统 (HEK 293) 记述在 Schlaeger, E.-J., 和 Christensen, K., 细胞技术学 (Cytotechnology) 30 (1999) 71-83 中和 Schlaeger, E.-J., 免疫学方法杂志 (J. Immunol. Methods) 194 (1996) 191-199 中。

[0286] 适合用于原核生物的控制序列，例如包括启动子，任选地操纵子序列，和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、增强子和多腺苷酸化信号。

[0287] 当核酸在被置于与另一个核酸序列的功能关系中时，其是“可操作地连接的”。例如，前序列 (pre-sequence) 或分泌前导序列的 DNA 与多肽的 DNA 可操作地连接，条件是其表达为参与多肽分泌的前蛋白 (pre-protein) ; 启动子或增强子与编码序列可操作地连接，条件是其影响序列的转录 ; 或核糖体结合位点与编码序列可操作地连接，条件是其被定位为促进翻译。一般地，“可操作地连接的”意指被连接的 DNA 序列是连续的，且在分泌前导序列的情形中，是连续的且在阅读框中。然而，增强子不必须是连续的。连接通过在方便的限制性位点处的连接来实现。如果不存在这样的位点，则根据常规实践使用合成的寡核苷酸适体或接头。

[0288] 通过标准技术，包括碱 / SDS 处理，CsCl 分级 (CsCl banding)，柱层析法，琼脂糖凝胶电泳，和其它本领域公知的技术，进行抗体的纯化从而消除细胞成分或其它污染物，例如其它细胞核酸或蛋白。见 Ausubel, F., 等，编，现代分子生物学方法 (Current Protocols in Molecular Biology), Greene Publishing 和 Wiley Interscience, 纽约 (1987)。不同的方法是充分建立的并且广泛用于蛋白纯化，如用微生物蛋白进行的亲和层析法（例如，蛋白质 A 或蛋白质 G 亲和层析法），离子交换层析法（例如阳离子交换（羧甲基树脂），阴离子交换（氨基乙基树脂）和混合模式的交换），亲疏吸附（例如，用 β -巯基乙醇和其它 SH 配体），疏水相互作用或芳香吸附层析法（例如用苯基-琼脂糖、氮杂-arenophilic 树脂，或间-氨基苯基硼酸），金属螯合亲和层析法（例如用 Ni (II)-和 Cu (II)-亲和性材料），

大小排阻层析法和电泳方法（如凝胶电泳，毛细管电泳）(Vijayalakshmi, M., A., 应用生物化学生物技术 (Appl. Biochem. Biotech.) 75(1998)93-102)。

[0289] 用于本文时，表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，且全部这些名称都包括后代。因此，词语“转化体”和“转化的细胞”包括原代受试者细胞和来源于其的培养物，而不考虑转移数。还理解，由于有意或无意的突变，所有的后代的 DNA 内容物可能不精确一致。包括具有与在最初转化的细胞中筛选的功能或生物学活性相同的功能或生物学活性的变体后代。在需要不同命名的情形中，其将从上下文中变得清楚。

[0290] 术语“转化”用于本文中时，指将载体 / 核酸转移到宿主细胞中的过程。如果将不具有难以克服的细胞壁屏障的细胞用作宿主细胞，则转染例如通过如 Graham, F. L., 和 van der Eb, A. J., Virology (病毒学) 52(1973)456-467 所述的磷酸钙沉淀法来进行。然而，还可以使用其他将 DNA 引入细胞的方法，诸如通过核注射或通过原生质体融合。如果使用原核细胞或包含实质细胞壁结构的细胞，例如一种转染方法是利用氯化钙的钙处理，如 Cohen, S., N, 等, PNAS (美国科学院学报). 69(1972)2110-2114 所述。

[0291] 用于本文中时，“表达”指将核酸转录为 mRNA 的过程和 / 或将转录的 mRNA (也称为转录物) 随后翻译为肽、多肽或蛋白质的过程。转录物和所编码的多肽共同称为基因产物。如果多核苷酸源自基因组 DNA，则在真核细胞中的表达可以包括 mRNA 的剪接。

[0292] “载体”是一种核酸分子，特别是自体复制的，其将插入的核酸分子转移到宿主细胞之中和 / 或之间。该术语包括主要功能为将 DNA 或 RNA 插入细胞（例如，染色体整合）的载体，主要功能是复制 DNA 或 RNA 的复制载体，和功能是转录和 / 或翻译 DNA 或 RNA 的表达载体。还包括提供多于一种上述功能的载体。

[0293] “表达载体”是一种多核苷酸，其在引入到合适的宿主细胞中时能够被转录和翻译为多肽。“表达系统”通常指包括表达载体的适当宿主细胞，所述表达载体可以起作用产生所需的表达产物。

[0294] 药物组合物

[0295] 本发明的一个方面是包含本发明所述的抗体的药物组合物。本发明的另一个方面是本发明所述的抗体用于制备药物组合物的应用。本发明的另一个方面是制备包含本发明所述的抗体的药物组合物的方法。在另一个方面中，本发明提供一种组合物，例如，一种药物组合物，其包含本发明所述的抗体，本发明所述的抗体与药物载体一起配制。

[0296] 本发明的一个实施方案是用于治疗癌症的本发明所述的双特异性抗体。

[0297] 本发明的另一个方面是用于治疗癌症的所述药物组合物。

[0298] 本发明的另一个方面是本发明所述的抗体用于制备用于治疗癌症的药物的应用。

[0299] 本发明的另一个方面是治疗患有癌症的患者的方法，其通过向需要所述治疗的患者施用本发明所述的抗体进行。

[0300] 当用于本文时，“药物载体”意在包括生理相容的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地，所述载体适于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮施用（例如，通过注射或输注）。

[0301] 本发明的组合物可以通过多种本领域已知的方法施用。如技术人员清楚地，施用的路径和 / 或方式将根据需要的结果变化。为了通过某些施用路径施用本发明的化合物，可能需要用防止其失活的材料包被所述化合物，或使所述化合物与防止其失活的材料共同

施用。例如,所述化合物可以在适合的载体中施用于受试者,所述载体例如是脂质体或稀释剂。药用稀释剂包括盐水和水性缓冲溶液。药物载体包括无菌水溶液或分散体和用于即时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。这些介质和药剂用于药物活性物质是本领域已知的。

[0302] 措辞“肠胃外施用”和“肠胃外地施用”用于本文时意为除了肠和局部施用之外的施用方式,通常通过注射施用,并且包括,但不限于,静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、角质下(subcuticular)、关节内、囊下、蛛网膜下、脊内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0303] 术语癌症用于本文时指增生性疾病,如淋巴瘤(lymphomas),淋巴细胞白血病(lymphocytic leukemias),肺癌(lung cancer),非小细胞肺(NSCL)癌(non small cell lung(NSCL)cancer),支气管肺泡细胞肺癌(bronchioloalviolar cell lung cancer),骨癌(bone cancer),胰腺癌(pancreatic cancer),皮肤癌(skin cancer),头或颈癌(cancer of the head or neck),皮肤或眼内黑素瘤(cutaneous or intraocular melanoma),子宫癌(uterine cancer),卵巢癌(ovarian cancer),直肠癌(rectal cancer),肛区癌(cancer of the anal region),胃癌(stomach cancer),胃癌(gastric cancer),结肠癌(colon cancer),乳腺癌(breast cancer),子宫癌(uterine cancer),输卵管癌(carcinoma of the fallopian tubes),子宫内膜癌(carcinoma of the endometrium),子宫颈癌(carcinoma of the cervix),阴道癌(carcinoma of the vagina),外阴癌(carcinoma of the vulva),霍奇金病(Hodgkin' s Disease),食管癌(cancer of the esophagus),小肠癌(cancer of the small intestine),内分泌系统癌(cancer of the endocrine system),甲状腺癌(cancer of the thyroid gland),甲状旁腺癌(cancer of the parathyroid gland),肾上腺癌(cancer of the adrenal gland),软组织肉瘤(sarcoma of soft tissue),尿道癌(cancer of the urethra),阴茎癌(cancer of the penis),前列腺癌(prostate cancer),膀胱癌(cancer of the bladder),肾癌或输尿管癌(cancer of the kidney or ureter),肾细胞癌(renal cell carcinoma),肾盂癌(carcinoma of the renal pelvis),间皮瘤(mesothelioma),肝细胞癌(hepatocellular cancer),胆管癌(biliary cancer),中枢神经系统(CNS)肿瘤(neoplasms of the central nervous system(CNS)),脊椎轴肿瘤(spinal axis tumors),脑干胶质瘤(brain stem glioma),多形性成胶质细胞瘤(glioblastoma multiforme),星形细胞瘤(astrocytomas),神经鞘瘤(schwannomas),室管膜瘤(ependymomas),髓细胞瘤(medulloblastomas),脑膜瘤(meningiomas),鳞状细胞癌(squamous cell carcinomas),垂体腺瘤(pituitary adenoma),和埃文斯肉瘤(Ewings sarcoma),包括任一种上述癌症的难治性形式,或一种或多种上述癌症的组合。

[0304] 本发明的另一方面是作为抗-血管生成剂的本发明所述的双特异性抗体或所述药物组合物。这种抗-血管生成剂可用于治疗癌症(特别是实体瘤)和其它血管疾病。

[0305] 本发明的一个实施方案是用于治疗血管疾病的本发明所述的双特异性抗体。

[0306] 本发明的另一方面是本发明所述的抗体用于制备用于治疗血管疾病的药物的应用。

[0307] 本发明的另一方面是治疗患有血管疾病的患者的方法,其通过向需要这种治疗的患者施用本发明所述的抗体进行。

[0308] 术语“血管疾病 (vascular diseases)”包括癌症 (Cancer), 炎症疾病 (Inflammatory diseases), 动脉粥样硬化 (Atherosclerosis), 缺血 (Ischemia), 创伤 (Trauma), 脓毒症 (Sepsis), COPD, 哮喘 (Asthma), 糖尿病 (Diabetes), AMD, 视网膜病 (Retinopathy), 中风 (Stroke), 肥胖 (Adipositas), 急性肺损伤 (Acute lung injury), 出血 (Hemorrhage), 血管渗漏 (Vascular leak) (例如细胞因子诱导的血管渗漏), 变态反应 (Allergy), 格雷夫斯病 (Graves' Disease), 桥本自身免疫性甲状腺炎 (Hashimoto's Autoimmune Thyroiditis), 特发性血小板减少性紫癜 (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura), 巨细胞动脉炎 (Giant Cell Arteritis), 类风湿关节炎 (Rheumatoid Arthritis), 系统性红斑狼疮 (Systemic Lupus Erythematosus (SLE)), 狼疮性肾炎 (Lupus Nephritis), 局限性回肠炎 (Crohn's Disease), 多发性硬化 (Multiple Sclerosis), 溃疡性结肠炎 (Ulcerative Colitis), 特别是实体瘤, 眼内新血管综合征 (intraocular neovascular syndrome) 诸如增殖性视网膜病 (proliferative retinopathies) 或年龄相关的黄斑变性 (age-related macular degeneration) (AMD), 类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis) 和银屑病 (psoriasis) (Folkman, J., 等, J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M., 等, Annu. Rev. Physiol. (生理学年度综述) 53 (1991) 217-239; 和 Garner, A., Vascular diseases (血管疾病), 在: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach (眼科疾病, 即动力学途径的病理学), Garner, A., 和 Klintworth, G. K., (编) 第 2 版, Marcel Dekker, 纽约 (1994) 1625-1710)。

[0309] 这些组合物还可以包含辅药如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。防止微生物的存在可以通过灭菌方法 (见上文) 和通过包含各种抗细菌和抗真菌药剂来确保, 所述抗细菌和抗真菌药剂例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山梨酸等。可能需要在组合物中包含等渗剂, 如糖、氯化钠等。此外, 可以通过包含延缓吸附的试剂如单硬脂酸铝和明胶来导致可注射药物形式的延长的吸收。

[0310] 不管所选择的施用路径为何, 通过本领域技术人员已知的常规方式, 将可以以适合的水合形式使用的本发明的化合物、和 / 或本发明的药物组合物配制成药用剂型。

[0311] 在本发明的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可以变化从而获得这样的活性成分的量, 其对于特定的患者、组合物和施用方式有效获得需要的治疗反应, 而不会对患者具有毒性。选定的剂量水平将取决于多种药物代谢动力学因素, 包括所用的本发明的特定组合物的活性、施用路径、施用时间、使用的特定化合物的排泄速率、治疗的延续时间、与所用的特定组合物组合使用的其它药物、化合物和 / 或材料、待治疗的患者的年龄、性别、体重、病症、一般健康和以前的医疗病史, 以及医疗领域中公知的类似因素。

[0312] 所述组合物必需是无菌和可流动的, 到所述组合物可通过注射器递送的程度。除了水之外, 所述载体优选地是等渗缓冲的盐水溶液。

[0313] 适当的流动性可以例如通过使用涂层如磷脂酰胆碱 (lecithin), 在分散体的情形中通过维持需要的颗粒大小, 和通过使用表面活性剂来维持。在许多情形中, 优选在所述组合物中包括等渗剂, 例如, 糖、多元醇如甘露醇或山梨醇、和氯化钠。

[0314] 现在已经可见, 本发明所述的针对人 ErbB-1 和人 c-Met 的双特异性抗体具有有价值的特征, 诸如生物学或药理学活性。

[0315] 提供下述实施例、序列列表和附图来辅助理解本发明, 本发明的真正范围在后附的

权利要求书中描述。应该理解,在不背离本发明的精神的前提下,可以在所述的方法中进行修改。

[0316] 氨基酸序列描述

[0317] SEQ ID NO :1 重链可变结构域 <ErbB-1> 西妥昔单抗

[0318] SEQ ID NO :2 轻链可变结构域 <ErbB-1> 西妥昔单抗

[0319] SEQ ID NO :3 重链可变结构域 <ErbB-1> 人源化 ICR62

[0320] SEQ ID NO :4 轻链可变结构域 <ErbB-1> 人源化 ICR62

[0321] SEQ ID NO :5 重链可变结构域 <c-Met>Mab 5D5

[0322] SEQ ID NO :6 轻链可变结构域 <c-Met>Mab 5D5

[0323] SEQ ID NO :7 重链 <c-Met>Mab 5D5

[0324] SEQ ID NO :8 轻链 <c-Met>Mab 5D5

[0325] SEQ ID NO :9 重链 <c-Met>Fab 5D5

[0326] SEQ ID NO :10 轻链 <c-Met>Fab 5D5

[0327] SEQ ID NO :11 人 IgG1 的重链恒定区

[0328] SEQ ID NO :12 人 IgG3 的重链恒定区

[0329] SEQ ID NO :13 人轻链 κ 恒定区

[0330] SEQ ID NO :14 人轻链 λ 恒定区

[0331] SEQ ID NO :15 人 c-Met

[0332] SEQ ID NO :16 人 ErbB-1

[0333] SEQ ID NO :17 重链 CDR3H, <ErbB-1> 西妥昔单抗

[0334] SEQ ID NO :18 重链 CDR2H, <ErbB-1> 西妥昔单抗

[0335] SEQ ID NO :19 重链 CDR1H, <ErbB-1> 西妥昔单抗

[0336] SEQ ID NO :20 轻链 CDR3L, <ErbB-1> 西妥昔单抗

[0337] SEQ ID NO :21 轻链 CDR2L, <ErbB-1> 西妥昔单抗

[0338] SEQ ID NO :22 轻链 CDR1L, <ErbB-1> 西妥昔单抗

[0339] SEQ ID NO :23 重链 CDR3H, <ErbB-1> 人源化 ICR62

[0340] SEQ ID NO :24 重链 CDR2H, <ErbB-1> 人源化 ICR62

[0341] SEQ ID NO :25 重链 CDR1H, <ErbB-1> 人源化 ICR62

[0342] SEQ ID NO :26 轻链 CDR3L, <ErbB-1> 人源化 ICR62

[0343] SEQ ID NO :27 轻链 CDR2L, <ErbB-1> 人源化 ICR62

[0344] SEQ ID NO :28 轻链 CDR1L, <ErbB-1> 人源化 ICR62

[0345] SEQ ID NO :29 重链 CDR3H, <c-Met>Mab 5D5

[0346] SEQ ID NO :30 重链 CDR2H, <c-Met>Mab 5D5

[0347] SEQ ID NO :31 重链 CDR1H, <c-Met>Mab 5D5

[0348] SEQ ID NO :32 轻链 CDR3L, <c-Met>Mab 5D5

[0349] SEQ ID NO :33 轻链 CDR2L, <c-Met>Mab 5D5

[0350] SEQ ID NO :34 轻链 CDR1L, <c-Met>Mab 5D5

[0351] 附图描述

[0352] 图 1 特异性结合第一抗原 1 的不具有 CH4 结构域的全长抗体的示意性结构,所述

全长抗体具有以典型顺序包含可变结构域和恒定结构域的两对重链和轻链。

[0353] 图 2a-c 二价双特异性 <ErbB-1/c-Met> 抗体的示意性结构,所述抗体包含:a) 特异性结合人 ErbB-1 的全长抗体的轻链和重链;和 b) 特异性结合人 c-Met 的全长抗体的轻链和重链,其中恒定结构域 CL 和 CH1、和 / 或可变结构域 VL 和 VH 相互替换,其用凸起-进入-孔洞技术修饰。

[0354] 图 3 本发明所述的三价双特异性 <ErbB-1/c-Met> 抗体示意图,所述抗体包含特异性结合 ErbB-1 的全长抗体,对其

[0355] a) 图 3a:融合两个多肽 VH 和 VL(这两个多肽的 VH 和 VL 结构域一起形成特异性结合 c-Met 的抗原结合位点);

[0356] b) 图 3b:融合两个多肽 VH-CH1 和 VL-CL(这两个多肽的 VH 和 VL 结构域一起形成特异性结合 c-Met 的抗原结合位点);

[0357] 图 3c:具有“凸起和孔洞”的本发明所述的三价双特异性抗体的示意图,所述抗体包含特异性结合 ErbB-1 的全长抗体,对其融合两个多肽 VH 和 VL(这两个多肽的 VH 和 VL 结构域一起形成特异性结合 c-Met 的抗原结合位点);

[0358] 图 3d:具有“凸起和孔洞”的本发明所述的三价双特异性抗体示意图,所述抗体包含特异性结合 ErbB-1 的全长抗体,对其融合两个多肽 VH 和 VL(这两个多肽的 VH 和 VL 结构域一起形成特异性结合 c-Met 的抗原结合位点,其中这些 VH 和 VL 结构域包含在位置 VH44 和 VL100 之间的链间二硫键)。

[0359] 图 4a:四种可能的单链 Fab 片段的示意性结构;

[0360] 4b:两种单链 Fv 片段的示意性结构。

[0361] 图 5 三价双特异性 <ErbB-1/c-Met> 抗体的示意性结构,所述抗体包含全长抗体和一个单链 Fab 片段(图 5a) 或一个单链 Fv 片段(图 5b)-具有凸起和孔洞的双特异性三价实例

[0362] 图 6 四价双特异性 <ErbB-1/c-Met> 抗体的示意性结构,所述抗体包含全长抗体和两个单链 Fab 片段(图 6a) 或两个单链 Fv 片段(图 6b)-c-Met 结合位点来源于抑制 c-Met 二聚化的抗体。

[0363] 图 7a 在鳞状细胞癌细胞系 A431 中 ErbB1/2/3 和 c-Met 的细胞表面表达的流式细胞术分析。

[0364] 图 7b 在卵巢癌细胞系 OVCAR-8 中 ErbB1/2/3 和 c-Met 的细胞表面表达的流式细胞术分析。

[0365] 图 8a 在癌细胞系 A431 中的增殖测定-与单特异性亲本 <HER1> 和 <c-Met> 抗体相比较,本发明所述的双特异性 <HER1/c-Met> 抗体 BsAB01(BsAb) 对癌细胞增殖的抑制。

[0366] 图 8b 存在 HGF 时,癌细胞系 A431 中的增殖测定-与单特异性亲本 <HER1> 和 <c-Met> 抗体相比较,本发明所述的双特异性 <HER1/c-Met> 抗体 BsAB01(BsAb) 对癌细胞增殖的抑制。

[0367] 图 9 在 0,30,60 和 120 分钟(=0,0.5,1,和 2 小时)测量的 OVCAR-8 癌细胞中的内在化测定。

[0368] 图 10a OVCAR-8 癌细胞中的增殖测定。与单特异性亲本 <HER1> 和 <c-Met> 抗体相比较,本发明所述的双特异性 <HER1/c-Met> 抗体 BsAB01(BsAb) 对癌细胞增殖的抑制。

[0369] 图 10b 存在 HGF 时,在癌细胞系 A431 中的增殖测定。与单特异性亲本 <HER1> 和 <c-Met> 抗体相比较,本发明所述的双特异性 <HER1/c-Met> 抗体 BsAB01 (BsAb) 对癌细胞增殖的抑制。

[0370] 实验方法

实施例

[0371] 材料和方法

[0372] 重组 DNA 技术

[0373] 使用标准方法操作 DNA,如 Sambrook, J. 等, Molecular cloning :A laboratory manual (分子克隆 :实验室手册); Cold Spring Harbor Laboratory Press (冷泉港实验室出版社), Cold Spring Harbor (冷泉港), 纽约, 1989 中所述。分子生物学试剂按照供应商的使用说明使用。

[0374] DNA 和蛋白序列分析和序列数据管理

[0375] 关于人免疫球蛋白轻链和重链的核苷酸序列的通用信息在 Kabat, E. , A. , 等, (1991) 免疫目的的蛋白质序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第五版, NIH 出版号 91-3242 中提供。抗体链的氨基酸按照 EU 编号进行编号 (Edelman, G. M. , 等, PNAS 63 (1969) 78-85 ; Kabat, E. A. , 等, (1991) 免疫目的的蛋白质序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第五版, NIH 出版号 91-3242)。GCG (Genetics Computer Group (遗传学计算小组), Madison, 威斯康星) 的软件包版本 10.2 和 Infomax 载体 NT1 进展组版本 8.0 (Infomax's Vector NTI Advance suite version 8.0) 用于序列构建、作图、分析、注解和说明。

[0376] DNA 测序

[0377] DNA 序列通过在 SequiServe (Vaterstetten, 德国) 和 Geneart AG (Regensburg, 德国) 进行的双链测序来确定。

[0378] 基因合成

[0379] 所需基因区段由 Geneart AG (Regensburg, 德国) 从化学合成的寡核苷酸和通过自动化基因合成的 PCR 产物来制备。将侧邻单个限制性内切核酸酶裂解位点的基因区段克隆到 pGA18 (ampR) 质粒中。从转化的细菌纯化质粒 DNA, 并且通过 UV 光谱法确定浓度。亚克隆基因片段的 DNA 序列通过 DNA 测序验证。以相似的方式, 通过基因合成制备编码在 CH3 结构域中携带 S354C 和 T366W 突变的修饰的“凸起 - 进入 - 孔洞” <ErbB-1> 抗体重链 (其有 / 无由肽连接体连接的 C- 端 <c-Met>5D5 scFab VH 区) 的 DNA 序列和编码携带 Y349C, T366S, L368A 和 Y407V 突变的修饰的“凸起 - 进入 - 孔洞” <ErbB-1> 抗体重链 (其有 / 无由肽连接体连接的 C- 端 <c-Met>5D5 scFab VL 区) 的 DNA 序列, 所述 DNA 序列具有侧连的 BamHI 和 XbaI 限制性位点。最后, 合成编码 <ErbB-1> 抗体和 <c-Met>5D5 抗体的未修饰的重链和轻链的 DNA 序列, 所述 DNA 序列具有侧连的 BamHI 和 XbaI 限制性位点。将所有的构建体设计具有编码前导肽 (MGWSCIILFLVATATGVHS) 的 5' - 端 DNA 序列, 所述前导肽靶向用以在真核细胞中分泌的蛋白。

[0380] 构建表达质粒

[0381] 将 Roche 表达载体用于构建所有编码重链和轻链 scFv 融合蛋白的表达质粒。所

述载体包括下述元件：

- [0382] - 作为选择标记的潮霉素抗性基因，
- [0383] - 埃巴病毒 (EBV) 的复制起点，oriP，
- [0384] - 来自载体 pUC18 的复制起点，其允许该质粒在大肠杆菌中复制，
- [0385] - β -内酰胺酶基因，其赋予大肠杆菌氨苄青霉素抗性，
- [0386] - 来自人巨细胞病毒 (HCMV) 的即时早期增强子和启动子，
- [0387] - 人 I-免疫球蛋白聚腺苷酸化 (“聚 A”) 信号序列，和
- [0388] - 特有的 BamHI 和 XbaI 限制性位点。

[0389] 如所描述的，通过基因合成制备免疫球蛋白融合基因，其包含重链或轻链构建体以及具有 C 端 VH 和 VL 结构域的“凸起-进入-孔洞”构建体，将该融合基因克隆进入 pGA18(ampR) 质粒。带有合成的 DNA 区段和 Roche 表达载体的 pG18(ampR) 质粒用 BamHI 和 XbaI 限制性酶 (Roche Molecular Biochemicals) 消化并进行琼脂糖凝胶电泳。然后将纯化的重链和轻链编码 DNA 区段连接到分离的 Roche 表达载体 BamHI/XbaI 片段，产生最终表达载体。将最终表达载体转化到大肠杆菌细胞中，分离表达质粒 DNA (Miniprep) 并进行限制性酶分析和 DNA 测序。正确的克隆在 150ml LB-Amp 培养基中生长，再次分离质粒 DNA (Maxiprep) 并通过 DNA 测序确认序列完整性。

[0390] 免疫球蛋白变体在 HEK293 细胞中的瞬时表达

[0391] 根据供应商的说明书，使用 FreeStyle™ 293 表达系统 (Invitrogen, USA) 通过人胚肾 293-F 细胞的瞬时转染来表达重组免疫球蛋白变体。简言之，将混悬的 FreeStyle™ 293-F 细胞在 FreeStyle™ 293 表达培养基中在 37°C / 8% CO₂ 进行培养，并在转染当天将细胞以 1-2x10⁶ 个活细胞 /ml 的密度接种在新鲜的培养基中。使用 325 μ l 的 293fectin™ (Invitrogen, 德国) 和 250 μ g 1 : 1 摩尔比率的重链和轻链质粒 DNA 在 Opti-MEM® I 培养基 (Invitrogen, USA) 中制备 DNA-293fectin™ 复合物，最终转染体积为 250ml。“凸起-进入-孔洞”DNA-293fectin 复合物如下制备：在 Opti-MEM® I 培养基 (Invitrogen, USA) 中使用 325 μ l 的 293fectin™ (Invitrogen, 德国) 和 250 μ g 的 1 : 1 : 2 摩尔比的“凸起-进入-孔洞”重链 1 和 2 和轻链质粒 DNA (最终转染体积 250ml) 制备。在转染后 7 天，通过以 14000g 离心 30 分钟并通过无菌过滤器 (0.22 μ m) 过滤收获包含抗体的细胞培养物上清液。将上清液贮存在 -20°C 直到纯化。

[0392] 双特异性抗体和对照抗体的纯化

[0393] 使用蛋白质 A-Sepharose™ (GE Healthcare, 瑞典) 和 Superdex200 大小排阻层析法，通过亲和层析法从细胞培养物上清液中纯化三价双特异性抗体和对照抗体。简言之，将无菌过滤的细胞培养物上清液应用到用 PBS 缓冲液 (10mM Na₂HPO₄, 1mM KH₂PO₄, 137mM NaCl 和 2.7mM KCl, pH7.4) 平衡的 HiTrap 蛋白质 A HP (5ml) 柱上。将未结合的蛋白用平衡缓冲液洗涤下来。抗体和抗体变体用 pH 2.8 的 0.1M 柠檬酸缓冲液洗脱，并且用 pH 8.5 的 0.1M 1M Tris 中和含有蛋白的级分。然后，汇聚洗脱的蛋白级分，将其用 Amicon 超离心过滤装置 (MWC0 :30K, Millipore) 浓缩至 3ml 体积，并且上样到用 pH 6.0 的 20mM Histidin, 140mM NaCl 平衡的 Superdex200 HiLoad 120ml 16/60 凝胶过滤柱 (GE Healthcare, 瑞典) 上。汇聚具有少于 5% 的高分子量聚集物的包含纯化的双特异性抗体和对照抗体的级分，并且以 1.0mg/ml 的等分试样保存在 -80°C。通过木瓜蛋白酶消化纯化的 5D5 单克隆抗体产生

Fab 片段,并且随后通过蛋白质 A 层析法去除污染的 Fc 结构域。将未结合的 Fab 片段进一步在用 pH 6.0 的 20mM Histidine, 140mM NaCl 平衡的 Superdex200 HiLoad 120ml 16/60 凝胶过滤柱 (GE Healthcare, 瑞典) 上纯化,并且以 1.0mg/ml 的等分试样保存在 -80℃。

[0394] 纯化的蛋白的分析

[0395] 利用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数,通过测量 280nm 的光密度 (OD),来确定纯化的蛋白样品的蛋白浓度。通过在存在和不存在还原剂 (5mM 1,4-二硫苏糖醇) 条件下的 SDS-PAGE 并且用考马斯亮蓝染色,分析双特异性抗体和对照抗体的纯度和分子量。按照供应商的使用说明使用 NuPAGE® Pre-Cast 凝胶系统 (Invitrogen, USA) (4-20% Tris-甘氨酸凝胶)。使用 Superdex 200 分析级大小排阻柱 (GE Healthcare, 瑞典),在 200mM KH_2PO_4 , 250mM KCl, pH 7.0 运行缓冲液中在 25℃,通过高效 SEC 分析双特异性抗体和对照抗体样品的聚集物含量。将 25 μg 蛋白以 0.5ml/分钟的流速注射到柱上,并且在 50 分钟内匀速 (isocratic) 洗脱。对于稳定性分析,将浓度为 1mg/ml 的纯化的蛋白在 4℃ 和 40℃ 温育 7 天,然后通过高效 SEC 评估。在通过用肽-N-糖苷酶 F (Roche Molecular Biochemicals) 酶处理去除 N-聚糖后,通过纳米电喷雾 Q-TOF 质谱法验证还原的双特异性抗体轻链和重链的氨基酸骨架的完整性。

[0396] c-Met 磷酸化测定

[0397] 在 HGF 刺激前一天,将 5×10^5 个 A549 细胞接种在 6 孔板的每个孔中的具有 0.5% FCS (胎牛血清) 的 RPMI 中。次日,用含有 0.2% BSA (牛血清白蛋白) 的 RPMI 替换生长培养基 1 小时。然后,向培养基中加入 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 双特异性抗体,并且将细胞温育 10 分钟,对其加入 HGF 以 50ng/mL 的终浓度继续 10 分钟。将细胞用含有 1mM 钒酸钠的冰冷 PBS 洗涤一次,将其置于冰上,在细胞培养板中用 100 μL 裂解缓冲液 (50mM Tris-Cl pH7.5, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.5% DOC, aprotinine, 0.5mM PMSF, 1mM 钒酸钠) 裂解。将细胞裂解物转移到 eppendorf 管中,并且允许裂解在冰上继续进行 30 分钟。利用 BCA 法 (Pierce) 确定蛋白浓度。在 4-12% Bis-Tris NuPage 凝胶 (Invitrogen) 上分离 30-50 μg 裂解物,并且将凝胶上的蛋白转移到硝基纤维素膜上。将膜用含有 5% BSA 的 TBS-T 封闭 1 小时,并且用针对 Y1230, 1234, 1235 的磷-特异性 c-Met 抗体 (44-888, Biosource) 按照供应商的使用说明进行显色。免疫印迹用结合未磷酸化的 c-Met 的抗体 (AF276, R&D) 再次探测。

[0398] ErbB1/Her1 磷酸化测定

[0399] 在加入抗体前一天,将 5×10^5 个 A431 细胞接种在 6 孔板的每个孔中的具有 10% FCS (胎牛血清) 的 RPMI 中。次日,向培养基中加入 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照抗体或双特异性抗体,并且将细胞再温育 1 小时。将细胞用含有 1mM 钒酸钠的冰冷 PBS 洗涤一次,将其置于冰上,在细胞培养板中用 100 μL 裂解缓冲液 (50mM Tris-Cl pH7.5, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.5% DOC, aprotinine, 0.5mM PMSF, 1mM 钒酸钠) 裂解。将细胞裂解物转移到 eppendorf 管中,并且允许裂解在冰上继续进行 30 分钟。利用 BCA 法 (Pierce) 确定蛋白浓度。在 4-12% Bis-Tris NuPage 凝胶 (Invitrogen) 上分离 30-50 μg 裂解物,并且将凝胶上的蛋白转移到硝基纤维素膜上。将膜用含有 5% BSA 的 TBS-T 封闭 1 小时,并且用针对 Y1173 的磷-特异性 EGFR 抗体 (sc-12351, Santa Cruz) 按照供应商的使用说明进行显色。免疫印迹用结合未磷酸化的 EGFR 的抗体 (06-847, Upstate) 再次探测。

[0400] AKT 磷酸化测定

[0401] 在加入抗体前一天,将 5×10^5 个 A431 细胞接种在 6 孔板的每个孔中的具有 10% FCS(胎牛血清)的 RPMI 中。次日,向培养基中加入 $5 \mu\text{g/mL}$ 对照抗体或双特异性抗体,并且将细胞再温育 1 小时。然后,将细胞亚组用 25ng/mL HGF(R&D, 294-HGN) 刺激另外的 15 分钟。将细胞用含有 1mM 钒酸钠的冰冷 PBS 洗涤一次,将其置于冰上,在细胞培养板中用 $100 \mu\text{L}$ 裂解缓冲液(50mM Tris-Cl pH7.5, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.5% DOC, aprotinine, 0.5mM PMSF, 1mM 钒酸钠)裂解。将细胞裂解物转移到 eppendorf 管中,并且允许裂解在冰上继续进行 30 分钟。利用 BCA 法(Pierce)确定蛋白浓度。在 4-12% Bis-Tris NuPage 凝胶(Invitrogen)上分离 $30\text{--}50 \mu\text{g}$ 裂解物,并且将凝胶上的蛋白转移到硝基纤维素膜上。将膜用含有 5% BSA 的 TBS-T 封闭 1 小时,并且用针对 Thr308 的磷-特异性 AKT 抗体(Cell Signaling, 9275)按照供应商的使用说明进行显色。免疫印迹用结合肌动蛋白的抗体(Abcam, ab20272)再次探测。

[0402] ERK1/2 磷酸化测定

[0403] 在加入抗体前一天,将 5×10^5 个 A431 细胞接种在 6 孔板的每个孔中的具有 10% FCS(胎牛血清)的 RPMI 中。次日,向培养基中加入 $5 \mu\text{g/mL}$ 对照抗体或双特异性抗体,并且将细胞再温育 1 小时。然后,将细胞亚组用 25ng/mL HGF(R&D, 294-HGN) 刺激另外的 15 分钟。将细胞用含有 1mM 钒酸钠的冰冷 PBS 洗涤一次,将其置于冰上,在细胞培养板中用 $100 \mu\text{L}$ 裂解缓冲液(50mM Tris-Cl pH7.5, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.5% DOC, aprotinine, 0.5mM PMSF, 1mM 钒酸钠)裂解。将细胞裂解物转移到 eppendorf 管中,并且允许裂解在冰上继续进行 30 分钟。利用 BCA 法(Pierce)确定蛋白浓度。在 4-12% Bis-Tris NuPage 凝胶(Invitrogen)上分离 $30\text{--}50 \mu\text{g}$ 裂解物,并且将凝胶上的蛋白转移到硝基纤维素膜上。将膜用含有 5% BSA 的 TBS-T 封闭 1 小时,并且用针对 Thr202/Tyr204 的磷-特异性 Erk1/2 抗体(Cell Signaling, Nr. 9106)按照供应商的使用说明进行显色。免疫印迹用结合肌动蛋白的抗体(Abcam, ab20272)再次探测。

[0404] 细胞-细胞散布测定(分散测定)

[0405] 在化合物处理前一天,将 A549(4000 个细胞/孔)或 A431(8000 个细胞/孔)以 $200 \mu\text{L}$ 的总体积接种在 96 孔 E-板(Roche, 05232368001)中的具有 0.5% FCS 的 RPMI 中。贴壁和细胞生长用实时细胞分析仪机器监测过夜,每 15 分钟扫描(sweeps)监测阻抗。次日,将细胞用 $5 \mu\text{L}$ 在 PBS 中的各自抗体稀释液预先温育,每 5 分钟扫描。30 分钟后,加入产生 20ng/mL 终浓度的 $2.5 \mu\text{L}$ 的 HGF 溶液,并且允许实验再继续进行 72 小时。每分钟扫描持续 180 分钟监测即时变化,然后其余的时间每 15 分钟扫描。

[0406] 流式细胞术测定(FACS)

[0407] a) 结合测定

[0408] 解离并且计数 c-Met 和 ErbB-1 表达细胞。将 1.5×10^5 个细胞接种在锥形 96 孔平板的每个孔中。将细胞离心(1500rpm , 4°C , 5 分钟)并且在冰上在具有 2% FCS(胎牛血清)的 PBS 中的 $50 \mu\text{L}$ 各自的双特异性抗体的系列稀释液中温育 30 分钟。将细胞再次离心,并且用 $200 \mu\text{L}$ 含有 2% FCS 的 PBS 洗涤一次,然后用针对人 Fc 的藻红蛋白-偶联的抗体第二次温育 30 分钟,所述藻红蛋白-偶联的抗体稀释在含有 2% FCS 的 PBS(Jackson Immunoresearch(杰克逊免疫研究), 109116098)中。将细胞离心,用 $200 \mu\text{L}$ 含有 2% FCS 的 PBS 洗涤两次,重悬在 BD CellFix 溶液(BD Biosciences(BD 生物科学))中并且在冰上

温育至少 10 分钟。通过流式细胞术 (FACSCanto, BD) 确定细胞的平均荧光强度 (mfi)。至少进行重复的两次独立染色来确定 Mfi。使用 FlowJo 软件 (TreeStar) 进一步处理流式细胞术光谱。使用 XLFit 4.0 (IDBS) 和剂量反应单位点模型 (one site model) 205 确定半最大结合。

[0409] b) 内在化测定

[0410] 解离并且计数细胞。将 5×10^5 个细胞置于 eppendorf 管中的 50 μ L 完全培养基中, 并且在 37°C 用 5 μ g/mL 各自的双特异性抗体温育。在温育时间点后, 将细胞保存在冰上, 直到时间过程结束。然后, 将细胞转移到 FACS 管中, 离心 (1500rpm, 4°C, 5 分钟), 用 PBS+2% FCS 洗涤, 并且在 50 μ L 针对人 Fc 的藻红蛋白 - 偶联的二级抗体中温育 30 分钟, 所述二级抗体稀释在含有 2% FCS 的 PBS (Jackson ImmunoResearch (杰克逊免疫研究), 109116098) 中。将细胞再次离心, 用 PBS+2% FCS 洗涤, 并且通过流式细胞术 (FACS Canto, BD) 确定荧光强度。

[0411] 细胞滴定发光测定 (Cell Titer Glow Assay)

[0412] 使用细胞滴定发光测定 (Promega) 量化细胞存活力和增殖。该测定按照供应商的使用说明进行。简言之, 将细胞在 96 孔板中以 100 μ L 的总体积培养所需要的时间期间。对于增殖测定, 将细胞从温箱中取出, 并且置于室温下 30 分钟。加入 100 μ L 细胞滴定发光试剂, 并且将多孔板放置在定轨摇床上 2 分钟。15 分钟后在微量平板读数仪 (Tecan) 上定量发光。

[0413] Wst-1 测定

[0414] 进行 Wst-1 存活力和细胞增殖测定作为终点分析, 以检测代谢活性细胞的数目。简言之, 向 200 μ L 培养基中加入 20 μ L Wst-1 试剂 (Roche, 11644807001)。将 96 孔板进一步温育 30 分钟 -1 小时, 直到出现染料的强显色。在微量平板读数仪 (Tecan) 上在 450nm 波长定量染色强度。

[0415] 设计双特异性 <ErbB1-c-Met> 抗体

[0416] 所有下述表达的和纯化的双特异性 <ErbB1-c-Met> 抗体包括 IgG1 亚类的恒定区或至少 Fc 部分 (SEQ ID NO:11 的人恒定 IgG1 区), 其最终按下述修饰。

[0417] 在表 1 中: 具有表 1 所示的各自的特征的基于全长 ErbB-1 抗体 (西妥昔单抗或人源化 ICR62) 和来自 c-Met 抗体 (cMet 5D5) 的一个单链 Fab 片段 (关于基本结构图见图 5a) 的三价双特异性 <ErbB1-c-Met> 抗体按照上述通用方法表达和纯化或可以按照上述通用方法表达和纯化。在序列表中提供西妥昔单抗或人源化 ICR62 的相对应的 VH 和 VL。

[0418] 表 1:

[0419]

对于双特异性抗体的分子名称 scFab-Ab-命名	BsAB01	BsAB03
特征:		
凸起-入-孔洞突变	S354C: T366W/ Y349'C: T366'S: L368'A: Y407'V	S354C: T366W/ Y349'C: T366'S: L368'A: Y407'V
全长抗体骨架来源于	西妥昔单抗	人源化ICR62
单链 Fab 片段来源于	cMet 5D5 (人源化的)	cMet 5D5 (人源化的)

[0420]

对于双特异性抗体的分子名称 scFab-Ab-命名	BsAB01	BsAB03
附着到抗体的 scFab 的位置	C-端凸起重链	C-端凸起重链
接头 (ScFab)	(G ₄ S) ₅ GG	(G ₄ S) ₅ GG
肽连接体	(G ₄ S) ₂	(G ₄ S) ₂
ScFab 二硫化物 VH44/VL100 稳定的	-	-

[0421] 实施例 1:

[0422] 针对 ErbB-1 和 c-Met 的双特异性抗体的结合

[0423] (表面等离子共振 (Surface Plasmon Resonance))

[0424] 利用标准结合测定法, 诸如表面等离子共振技术 (BIAcore®, GE-Healthcare

Uppsala, 瑞典), 在 25℃ 确定结合亲和力。对于亲和力测定, 将 30 μ g/ml 抗 Fc γ 抗体 (来自山羊, Jackson Immuno Research) 在 SPR 仪器 (Biacore T100) 上通过标准的胺-偶联和封闭化学偶联到 CM-5 传感芯片表面上。缀合后, 将单-或双特异性 ErbB1/cMet 抗体在 25℃ 以 5 μ L/ 分钟的流速注射, 然后以 30 μ L/ 分钟注射人 ErbB1 或 c-Met ECD 的系列稀释物 (0nM-1000nM)。对于结合实验, 使用 PBS/0.1% BSA 作为运行缓冲液。然后, 将芯片用 10mM 甘氨酸-HCl, pH 2.0 溶液 60 秒脉冲进行再生。

[0425] 表: 通过表面等离子共振确定的结合 ErbB1/cMet 的双特异性抗体的结合特征。

[0426]

结合特异性		BsAB01 [Mol]
c-Met	ka (1/Ms)	1,10E+04
	kd (1/s)	5,80E-05
	KD (M)	5,50E-09
ErbB-1	ka (1/Ms)	1,54E+06
	kd (1/s)	8,84E-04
	KD (M)	5,75E-10

[0427] 实施例 2:

[0428] 通过双特异性 Her1/c-Met 抗体形式抑制 HGF- 诱导的 c-Met 受体磷酸化。

[0429] 为了确定双特异性 Her1/c-Met 抗体中 c-Met 部分的功能性, 进行 c-Met 磷酸化测定。在该实验中, 在暴露于 HGF 之前, 将 A549 肺癌细胞或 A431 结肠直肠癌细胞用双特异性抗体或亲本对照抗体处理。亲本或双特异性抗体的结合导致对受体磷酸化的抑制。备选地, 人们还可以使用具有自分泌 HGF 环的细胞, 例如 U87MG, 并且在不存在或存在亲本或双特异性抗体时评估 c-Met 受体磷酸化。

[0430] 实施例 3:

[0431] 在用 Her1/cMet 双特异性抗体处理后分析 Her1 受体磷酸化

[0432] 为了确定双特异性 Her1/cMet 抗体中 EGFR- 结合部分的功能性, 将 A431 用亲本 EGFR 抗体或双特异性 Her1/cMet 抗体温育。亲本或双特异性抗体而非不相关 IgG 对照抗体的结合导致对受体磷酸化的抑制。备选地, 人们还可以使用这样的细胞, 所述细胞在存在或不存在亲本或双特异性抗体时用 EGF 刺激从而诱导 ErbB1/Her1 受体磷酸化。

[0433] 实施例 4:

[0434] 在用 Her1/cMet 双特异性抗体处理后, 分析 PI3K 信号传导

[0435] EGFR 和 c-Met 受体可以通过 PI3K 途径信号传导, 所述 PI3K 途径传输促有丝分裂信号。为了证明 EGFR 和 c-Met 受体的同时靶向, 可以监测 AKT 的磷酸化, 其为 PI3K 途径的下游靶标。为了这一目的, 将未刺激的细胞、用 EGF 或 HGF 处理的细胞或用这两种细胞因子处理的细胞用非特异性的、亲本对照或双特异性抗体平行地温育。备选地, 人们还可以评估过表达 ErbB1/Her1 和 / 或具有激活 c-Met 信号传导的自分泌 HGF 环的细胞。AKT 是 PI3K 途径的主要下游信号传导成分, 并且该蛋白的磷酸化是经由该途径的信号传导的主要指征。

[0436] 实施例 5:

[0437] 在用 Her1/cMet 双特异性抗体处理后,分析 MAPK 信号传导

[0438] ErbB1/Her1 和 c-Met 受体可以经由 MAPK 途径信号传导。为了证明 ErbB1/Her1 和 c-Met 受体的靶向,可以监测 ERK1/2 的磷酸化,其为 MAPK 途径的主要下游靶标。为了这一目的,将未刺激的细胞、用 EGF 或 HGF 处理的细胞或用这两种细胞因子处理的细胞用非特异性的、亲本对照或双特异性抗体平行地温育。备选地,人们还可以评估过表达 ErbB1/Her1 和 / 或具有激活 c-Met 信号传导的自分泌 HGF 环的细胞。

[0439] 实施例 6:

[0440] 通过双特异性 Her1/c-Met 抗体形式抑制 HGF- 诱导的 HUVEC 增殖

[0441] 可以进行 HUVEC 增殖测定来证明 HGF 的血管生成和促有丝分裂的作用。向 HUVEC 中加入 HGF 导致细胞增殖增加,所述细胞增殖可以被 c-Met 结合抗体以剂量 - 依赖性方式抑制。

[0442] 实施例 7:

[0443] 通过双特异性 Her1/c-Met 抗体抑制 A431 增殖

[0444] a) A431 细胞表现出高 Her1 细胞表面水平和中等高的 c-Met 细胞表面表达,这独立地在流式细胞术中得到证实。在 48 小时后,在 CellTiterGlow™ 测定中测量双特异性 Her1/c-Met 抗体对 A431 增殖的抑制。结果显示在图 8a 中。对照为 PBS 缓冲液。

[0445] 第二测量表现出 29% 抑制的 EGFR 抗体西妥昔单抗的抑制 (与缓冲液对照相比,将其设定为 0% 抑制)。双特异性 Her1/c-Met BsAB01 (BsAb) 抗体导致更明显的癌细胞增殖抑制 (38% 抑制)。单价 c-Met 抗体单臂 5D5 (OA5D5) 没有表现出对增殖的影响。EGFR 抗体西妥昔单抗和单价 c-Met 抗体单臂 5D5 (OA5D5) 的组合导致较不明显的减少 (20% 抑制)。

[0446] b) A431 主要依赖于 EGFR 信号传导。为了刺激其中发生活性 EGFR-c-Met- 受体信号传导网络的情形,如 a) 所述,但是在存在 HGF- 条件培养基时进行进一步的增殖测定 (48 小时后的 CellTiterGlow™ 测定)。结果显示在图 8b 中。

[0447] 第二测量表明,EGFR 抗体西妥昔单抗几乎没有抑制作用 (0% 抑制),且单价 c-Met 抗体单臂 5D5 (OA5D5) 几乎没有抑制作用 (1% 抑制)。双特异性 Her1/c-Met 抗体 BsAB01 (BsAb) (39% 抑制) 表现出明显的 A431 细胞癌细胞增殖的抑制。EGFR 抗体西妥昔单抗和单价 c-Met 抗体单臂 5D5 (OA5D5) 的组合导致较不明显的细胞增殖的减少 (20% 抑制)。

[0448] 实施例 8:

[0449] 分析双特异性 Her1/c-Met 抗体形式对癌细胞系 DU145 中 HGF- 诱导的细胞 - 细胞散布 (分散) 的抑制。

[0450] HGF- 诱导的分散诱导细胞的形态变化,这导致细胞变圆,丝足样突出,纺锤样结构和特定的细胞运动性。双特异性 Her1/cMet 抗体抑制 HGF- 诱导的细胞 - 细胞散布。

[0451] 实施例 9:

[0452] 分析 ErbB-1 和 c-Met 表达癌细胞系中的抗体 - 介导的受体内在化

[0453] 已经表明,用特异性结合 Her1 或 c-Met 的抗体温育细胞引发受体的内在化。为了评估双特异性抗体的内在化能力,设计实验设置来研究抗体 - 诱导的受体内在化。为了这一目的,将 OVCAR-8 细胞 (NCI 细胞系命名;购自 NCI (国家癌症研究所 (National Cancer

Institute)) OVCAR-8-NCI ; Schilder RJ, 等, 国际癌症杂志 (Int J Cancer.) 1990 年 3 月 15 日 ; 45 (3) : 416-22 ; Ikediobi ON, 等, 分子癌症治疗 (Mol Cancer Ther.) 2006 ; 5 ; 2606-12 ; Lorenzi, P. L., 等, 分子癌症治疗 (Mol Cancer Ther) 2009 ; 8 (4) : 713-24)) (其表达 Her1 和 c-Met, 这通过流式细胞术证实 - 见图 7b) 用各自的一级抗体在 37°C 温育不同的时间期间 (例如, 0, 30, 60, 120 分钟 = 0, 0.5, 1, 2 小时 (h))。通过将细胞迅速冷却至 4°C 而终止细胞过程。使用特异性结合一级抗体的 Fc 的二级荧光团 - 偶联的抗体来检测与细胞表面结合的抗体。抗体 - 受体复合物的内在化消耗细胞表面上的抗体 - 受体复合物, 并且导致减少的平均荧光强度。研究 Ovar-8 细胞中的内在化。结果显示在下表和图 9 中。通过各自抗体的内在化测量各自受体的 % 内在化 (在图 9 中, 将双特异性 <ErbB1-cMet> 抗体 BsAB01 命名为 cMet/HER1, 将亲本单特异性、二价抗体命名为 <HER1> 和 <cMet>。)

[0454] 表 : 与亲本单特异性、二价 c-Met 抗体相比较, 在 OVCAR-8 细胞上 2 小时 (2h) 后用 FACS 测定法测量的双特异性 Her1/cMet 抗体的 c-Met 受体的 % 内在化。将在 0 小时 (= 不存在抗体时) 细胞表面上的 c-Met 受体的量度 % 设定为细胞表面上 100% 的 c-Met 受体。

[0455]

抗体	2 小时后测量的 OVCAR-8 细胞表面 上的 % c-Met 受体	在 OVCAR-8 细胞 (ATCC No. CRL-1555) 上 2 小时后的 c-Met 的 % 内 在化 (= 100 - 细胞表面上的 % 抗体)
A) 单 特 异 性 <c-Met> 亲本抗体		
Mab 5D5	54	44
B) 双 特 异 性 <ErbB1-cMet > 抗 体		
BsAB01	114	-14

[0456] 实施例 10

[0457] 制备糖改造形式的双特异性 Her1/c-Met 抗体

[0458] 将双特异性 Her1/c-Met 抗体的 DNA 序列亚克隆到哺乳动物表达载体中, 使其处在 MPSV 启动子的控制下并且在合成的 polyA 位点上游, 每个载体携带 EBV OriP 序列。

[0459] 通过利用磷酸钙 - 转染法用哺乳动物双特异性抗体表达载体共转染 HEK293-EBNA 细胞产生双特异性抗体。通过磷酸钙法转染指数生长的 HEK293-EBNA 细胞。为了产生糖改

造的抗体,将细胞用两种另外的质粒分别以 4 : 4 : 1 : 1 的比率共转染,一种质粒用于融合 GnTIII 多肽表达 (GnT-III 表达载体),一种质粒用于甘露糖苷酶 II 表达 (高尔基甘露糖苷酶 II 表达载体)。使用补充 10% FCS 的 DMEM 培养基,细胞在 T 烧瓶中以贴壁单层培养物生长,并且当它们处于 50-80% 汇合时进行转染。对于 T150 烧瓶的转染,在转染前 24 小时,将 15×10^6 个细胞接种在 25ml 补充 FCS (最终 10% V/V) 的 DMEM 培养基中,并将细胞置于具有 5% CO₂ 气氛的温箱中在 37°C 过夜。对于每个待转染的 T150 烧瓶,通过混合在轻链和重链表达载体之间等分的 94 μ g 总质粒载体 DNA、水至终体积 469 μ l 和 469 μ l 的 1M CaCl₂ 溶液,制备 DNA、CaCl₂ 和水的溶液。向该溶液中加入 938 μ l pH7.05 的 50mM HEPES, 280mM NaCl, 1.5mM Na₂HPO₄ 溶液,立即混合 10 秒,并且在室温下静置 20 秒。混悬液用 10ml 补充 2% FCS 的 DMEM 稀释,并且加入 T150 中替换已有的培养基。然后,加入另外 13ml 转染培养基。将细胞在 37°C, 5% CO₂ 温育约 17-20 小时,然后用 25ml DMEM, 10% FCS 替换培养基。在转染后 7 天,通过以 210xg 离心 15 分钟收获条件培养基,将溶液无菌过滤 (0.22 μ m 滤器),并且加入终浓度为 0.01% w/v 的叠氮化钠,并且保存在 4°C。

[0460] 分泌的双特异性非典型岩藻糖基化的 (afucosylated) 糖改造的抗体通过下述纯化:蛋白质 A 亲和层析,然后阳离子交换层析,和在 Superdex 200 柱 (Amersham Pharmacia (安玛西亚法玛西亚)) 上的最后的大小排阻层析步骤,将缓冲液交换为 pH 6.7 的 25mM 磷酸钾, 125mM 氯化钠, 100mM 甘氨酸溶液,并且收集纯的单体 IgG1 抗体。使用分光光度计由 280nm 处吸光度估算抗体浓度。

[0461] 如所述,通过 MALDI/TOF-MS 分析附着到抗体 Fc 区的寡糖。通过 PNGaseF 消化由抗体酶促释放寡糖,其中抗体被固定在 PVDF 膜上或在溶液中。得到的含有释放的寡糖的消化物溶液直接制备用于 MALDI/TOF-MS 分析或在用于 MALDI/TOF-MS 分析的样品制备前进一步用 EndoH 糖苷酶消化。

[0462] 实施例 11

[0463] 分析双特异性 Her1/c-Met 抗体的糖结构

[0464] 为了确定包含岩藻糖的寡糖结构和包含非岩藻糖 (非典型岩藻糖 (a-fucose)) 的寡糖结构的相对比率,通过 MALDI-Tof- 质谱法分析纯化的抗体物质释放的聚糖。为此,将抗体样品 (约 50 μ g) 在 pH 6.0 的 0.1M 磷酸钠缓冲液中用 5mU N-糖苷酶 F (Prozyme#GKE-5010B) 在 37°C 温育过夜,从而从蛋白骨架释放寡糖。随后,将释放的聚糖结构分离,并且用 NuTip-碳吸管头 (NuTip-Carbon pipet tips) (由 Glygen 获得: NuTip1-10 μ l, Cat. Nr#NT1CAR) 脱盐。第一步,通过将 NuTip-碳吸管头用 3 μ L 1M NaOH 洗涤,然后用 20 μ L 纯水 (例如,来自 Baker 的 HPLC-梯度级别, #4218) 洗涤,用 3 μ L 30% v/v 乙酸洗涤,再用 20 μ L 纯水洗涤,准备 NuTip-碳吸管头用于结合寡糖。为此,将各种溶液上样到 NuTip-碳吸管头中色谱材料的顶部,并且加压通过。之后,通过来回摇动上述 N-糖苷酶 F 消化物 4-5 次,将与 10 μ g 抗体相对应的聚糖结构结合到 NuTip-碳吸管头中的材料上。将结合到 NuTip-碳吸管头中材料上的聚糖用 20 μ L 纯水以上述方式洗涤,并且分别用 0.5 μ L 10% 和 2.0 μ L 20% 乙腈逐步洗脱。对于该步,将洗脱液填装在 0.5mL 反应小瓶中,并且分别来回摇动 4-5 次。对于通过 MALDI-Tof 质谱法分析,组合两种洗脱物。对于这种测量,将 0.4 μ L 组合的洗脱物在 MALDI 靶标上用 1.6 μ L SDHB 基质溶液 (2.5-二氢苯甲酸 / 2-羟基 -5-甲氧基苯甲酸 [Bruker Daltonics #209813], 其以 5mg/ml 溶解在 20%

乙醇/5mMNaCl 中)混合,并且用适当调谐的 Bruker Ultraflex TOF/TOF 仪器分析。常规地,记录 50-300 次发射,并且总结为单次实验。所得到的光谱通过 flex 分析软件 (Bruker Daltonics) 评价,并且对于所检测到的每个峰确定质量。随后,通过比较关于各种结构 (例如,分别为复合型的、杂合型的和低聚-或高-甘露糖型,有和无岩藻糖) 计算的质量和理论预测的质量,而将峰指定为含有岩藻糖的或含有非典型岩藻糖的 (非岩藻糖) 的二元醇 (glycol) 结构。

[0465] 为了确定杂合型结构的比例,将抗体样品同时用 N-糖苷酶 F 和内切糖苷酶 H 消化。N-糖苷酶 F 由蛋白骨架释放所有 N-连接的聚糖结构 (复合型的、杂合型的与低聚-和高甘露糖型结构),内切糖苷酶 H 切割另外在聚糖还原端的两个 GlcNAc- 残基之间的所有杂合型聚糖。随后,将该消化物以上述关于 N-糖苷酶 F 消化样品相同的方式进行处理并通过 MALDI-ToF 质谱法分析。通过比较 N-糖苷酶 F 消化物和组合的 N-糖苷酶 F/ 内切 H 消化物的模式,将特定的糖结构信号减少的程度用来估算杂合型结构的相对含量。

[0466] 由单个二元醇结构的峰高与所检测的所有糖结构的峰高总和的比例,计算每种糖结构的相对量。岩藻糖的量是含有岩藻糖的结构相对于在 N-糖苷酶 F 处理的样品中鉴定的所有糖结构 (例如,分别为复合型的、杂合型的与低聚-和高-甘露糖型结构) 的百分数。非典型岩藻糖基化的量是缺少岩藻糖的结构相对于在 N-糖苷酶 F 处理的样品中鉴定的所有糖结构 (例如,分别为复合型的、杂合型的与低聚-和高-甘露糖型结构) 的百分数。

[0467] 实施例 12:

[0468] 分析用 Her1/cMet 双特异性抗体处理后的细胞移动性

[0469] 活性 c-Met 信号传导的一个重要方面是诱导移动性和侵入性程序。c-Met 抑制性抗体的功效可以通过测量 HGF- 诱导的细胞移动性的抑制而确定。为了这一目的,将 HGF- 可诱导的癌细胞系 A431 在不存在或存在双特异性抗体或 IgG 对照抗体时用 HGF 处理,并且使用具有阻抗读取的 CIM- 板,在 Acea 实时细胞分析仪上以时间依赖性方式测量通过 8 μ m 孔移动的细胞数目。

[0470] 实施例 13

[0471] 双特异性 Her1/c-Met 抗体的体外 ADCC

[0472] 本发明所述的 Her1/cMet 双特异性抗体在表达这两种受体的细胞上表现出减少的内在化 (与相对应的单特异性亲本 c-Met 抗体相比)。减少的内在化强烈地支持糖改造这些抗体的基本原理,因为抗体-受体复合物在细胞表面上的延长的暴露更可能被 Nk 细胞识别。与亲本抗体相比,减少的内在化和糖改造转化为增强的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。使用在细胞表面上表达 Her1 和 cMet 二者的癌细胞,例如 A431,和效应细胞,如 Nk 细胞系或 PBMC' s,可以设计证明这些作用的体外实验设置。将肿瘤细胞用亲本单特异性抗体或双特异性抗体预先温育至多 24 小时,然后加入效应细胞系。定量细胞裂解,并且允许单-和双特异性抗体的区别。

[0473] 用胰蛋白酶/EDTA (Gibco # 25300-054) 收集指数生长期的靶细胞,例如 PC-3 (DSMZ #ACC 465,前列腺癌,在 Ham' s F12 营养素混合物 +2mM L- 丙氨酰-L- 谷氨酰胺 +10% FCS 中培养)。在洗涤步骤和检查细胞数目和存活力后,将需要的等分试样在细胞培养温箱中在 37°C 用钙黄绿素 (Invitrogen #C3100MP; 1 小瓶重悬在 50 μ l DMSO 中,用于 5ml 培养基中的 5Mio 细胞) 标记 30 分钟。然后,将细胞用 AIM-V 培养基洗涤三次,检查细

胞数目和存活力,并且将细胞数目调整为 0.3Mio/ml。

[0474] 同时,按照供应商的方法(洗涤步骤:1x400g 和 2x 每次 350g 10 分钟)通过密度梯度离心(Histopaque-1077, Sigma #H8889)制备作为效应细胞的 PBMC。检查细胞数目和存活力,并且将细胞数目调整为 15Mio/ml。

[0475] 将 100 μ l 钙黄绿素 - 染色的靶细胞平板接种在圆底 96 孔板中,加入 50 μ l 稀释的抗体和 50 μ l 效应细胞。在一些实施方案中,将靶细胞与 Redimune® NF 液体(ZLB Behring)以 10mg/ml Redimune 的浓度混合。

[0476] 将通过不用抗体共培养靶细胞和效应细胞确定的自发裂解作为对照,最大裂解仅通过靶细胞的 1% Triton X-100 裂解确定。将平板在潮湿的细胞培养温箱中在 37°C 温育 4 小时。

[0477] 按照供应商的使用说明,使用细胞毒性检测试剂盒(LDH 检测试剂盒, Roche # 1644 793),通过测量来自损伤细胞的 LDH 释放而评估靶细胞的杀伤。简言之,将来自每个孔的 100 μ l 上清液与试剂盒的 100 μ l 底物在透明的平底 96 孔板中混合。在 ELISA 读数仪中在 490nm 至少 10 分钟确定底物颜色反应的 V_{max} 值。特异性抗体 - 介导的杀伤百分数计算如下: $((A-SR)/(MR-SR) \times 100)$, 其中 A 是特定抗体浓度下的 V_{max} 平均值, SR 是自发释放的 V_{max} 平均值, MR 是最大释放的 V_{max} 平均值。

[0478] 实施例 14

[0479] 在具有旁分泌 HGF 环的皮下异种移植模型中,双特异性 Her1/cMet 抗体的体内功效

[0480] 与 Mrc-5 细胞共同注射的皮下 A549 模型模拟用于 c-Met 的旁分泌活化环。A549 在细胞表面上表达 c-Met 和 Her1。将 A549 和 Mrc-5 细胞在标准细胞培养条件下保持在对数生长期。以 10 : 1 的比率注射 A549 和 Mrc-5 细胞,其中一千万个 A549 细胞和一百万个 Mrc-5。将细胞植入到 SCIDbeige 小鼠。在肿瘤建立且已经达到 100-150mm³ 的尺寸后,开始治疗。用 20mg/kg 抗体 / 小鼠的负荷剂量,然后用 10mg/kg 抗体 / 小鼠每周一次治疗小鼠。肿瘤体积每周测量两次,并且平行地监测动物体重。将单一治疗和单种抗体的组合与使用双特异性抗体的治疗进行比较。

[0481] 实施例 15

[0482] 在具有旁分泌 HGF 环的皮下异种移植模型中,双特异性 Her1/cMet 抗体的体内功效

[0483] 与 Mrc-5 细胞共同注射的皮下 A431 模型模拟用于 c-Met 的旁分泌活化环。A431 在细胞表面上表达 c-Met 和 Her1。将 A431 和 Mrc-5 细胞在标准细胞培养条件下保持在对数生长期。以 10 : 1 的比率注射 A431 和 Mrc-5 细胞,其中一千万个 A431 细胞和一百万个 Mrc-5。将细胞植入到 SCIDbeige 小鼠。在肿瘤建立且已经达到 100-150mm³ 的尺寸后,开始治疗。用 20mg/kg 抗体 / 小鼠的负荷剂量,然后用 10mg/kg 抗体 / 小鼠每周一次治疗小鼠。肿瘤体积每周测量两次,并且平行地监测动物体重。将单一治疗和单种抗体的组合与使用双特异性抗体的治疗进行比较。

[0484] 实施例 16

[0485] 通过双特异性 Her1/cMet 抗体抑制 Ovar-8 增殖

[0486] a) Ovar-8 细胞表现出高 Her1 细胞表面水平和中等高的 c-Met 细胞表面表达,这

独立地在流式细胞术中得到证实。在 48 小时后,在 CellTiterGlow™ 测定中测量双特异性 Her1/c-Met 抗体对 Ovcara-8 增殖的抑制。结果显示在图 10a 中。对照为 PBS 缓冲液。

[0487] EGFR 抗体西妥昔单抗没有表现出抑制(与缓冲液对照相比较,将缓冲液对照设定为 0%抑制)。双特异性 Her1/c-Met BsAB01(BsAb) 抗体导致小的但是显著的癌细胞增殖抑制(8%抑制)。单价 c-Met 抗体单臂 5D5(OA5D5) 没有表现出对增殖的影响。EGFR 抗体西妥昔单抗与单价 c-Met 抗体单臂 5D5(OA5D5) 的组合几乎没有导致增殖的减少(2%抑制)。

[0488] b) Ovcara-8 可以进一步用 HGF 刺激。为了刺激其中发生活性 EGFR-c-Met- 受体信号传导网络的情形,如 a) 所述,但是在存在 HGF- 条件培养基时进行进一步的增殖测定(48 小时后的 CellTiterGlow™ 测定)。结果显示在图 10b 中。

[0489] 添加 HGF 导致增殖增加(10%)。与仅用 HGF 处理的细胞相比较(将其设定为 0%抑制),EGFR 抗体西妥昔单抗和单价 c-Met 抗体单臂 5D5(OA5D5) 仅表现出较小的增殖抑制作用(2%,7%)。双特异性 Her1/c-Met 抗体 BsAB01(BsAb)(15%抑制)表现出显著的 Ovcara-8 细胞癌细胞增殖抑制。EGFR 抗体西妥昔单抗和单价 c-Met 抗体单臂 5D5(OA5D5) 的组合导致较不明显的细胞增殖减少(10%抑制)。

[0001]

序列表

<110> 罗氏格黎卡特股份公司

<120> 双特异性抗 -ErbB-1/ 抗 -c-Met 抗体

<130> 26066 WO

<150> EP 09005109.5

<151> 2009-04-07

<160> 34

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> 小家鼠 (mus musculus)

<400> 1

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

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

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

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

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

[0002]

<210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 2

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

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

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
85 90 95

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

<210> 3
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 重链可变结构域 < ErbB-1> 人源化 ICR62

<400> 3

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

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

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

[0003]

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链可变结构域 < ErbB-1> 人源化 ICR62

<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

[0004]

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

<210> 5
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重链可变结构域 <c-Met> Mab 5D5

<400> 5

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> 6
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 轻链可变结构域 <c-Met> Mab 5D5

[0005]

<400> 6

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

<210> 7

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链 cMet Mab 5D5

<400> 7

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

[0006]

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

[0007]

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

Cys Leu 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 Tyr 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> 8
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工的

[0008]

<220>
<223> 轻链 cMet Mab 5D5
<400> 8
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

[0009]

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 9
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重链 cMet Fab 5D5

<400> 9

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

[0010]

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
225

<210> 10
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 轻链 cMet Fab 5D5

<400> 10

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys 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

[0011]

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> 11

<211> 330

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 11

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

[0012]

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

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

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

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

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

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

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

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

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

[0013]

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 12
<211> 377
<212> PRT
<213> 人

<400> 12

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
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 Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

[0014]

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro	145	150	155	160
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys	165	170	175	
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val	180	185	190	
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr	195	200	205	
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu	210	215	220	
Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	225	230	235	240
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	245	250	255	
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln	260	265	270	
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met	275	280	285	
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro	290	295	300	
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn	305	310	315	320
Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu	325	330	335	
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile	340	345	350	
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln	355	360	365	

[0015]

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14
<211> 104
<212> PRT
<213> 人

<400> 14

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

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
20 25 30

[0016]

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
35 40 45

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

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
65 70 75 80

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

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100

<210> 15
<211> 1390
<212> PRT
<213> 人

<400> 15

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

[0017]

Lys	Asp	Asn	Ile	Asn	Met	Ala	Leu	Val	Val	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Asp
		115					120					125			
Gln	Leu	Ile	Ser	Cys	Gly	Ser	Val	Asn	Arg	Gly	Thr	Cys	Gln	Arg	His
	130					135					140				
Val	Phe	Pro	His	Asn	His	Thr	Ala	Asp	Ile	Gln	Ser	Glu	Val	His	Cys
145					150					155					160
Ile	Phe	Ser	Pro	Gln	Ile	Glu	Glu	Pro	Ser	Gln	Cys	Pro	Asp	Cys	Val
				165					170					175	
Val	Ser	Ala	Leu	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Ser	Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe
			180					185					190		
Ile	Asn	Phe	Phe	Val	Gly	Asn	Thr	Ile	Asn	Ser	Ser	Tyr	Phe	Pro	Asp
		195					200					205			
His	Pro	Leu	His	Ser	Ile	Ser	Val	Arg	Arg	Leu	Lys	Glu	Thr	Lys	Asp
	210					215					220				
Gly	Phe	Met	Phe	Leu	Thr	Asp	Gln	Ser	Tyr	Ile	Asp	Val	Leu	Pro	Glu
225					230					235					240
Phe	Arg	Asp	Ser	Tyr	Pro	Ile	Lys	Tyr	Val	His	Ala	Phe	Glu	Ser	Asn
				245					250					255	
Asn	Phe	Ile	Tyr	Phe	Leu	Thr	Val	Gln	Arg	Glu	Thr	Leu	Asp	Ala	Gln
			260					265					270		
Thr	Phe	His	Thr	Arg	Ile	Ile	Arg	Phe	Cys	Ser	Ile	Asn	Ser	Gly	Leu
		275					280					285			
His	Ser	Tyr	Met	Glu	Met	Pro	Leu	Glu	Cys	Ile	Leu	Thr	Glu	Lys	Arg
	290					295					300				
Lys	Lys	Arg	Ser	Thr	Lys	Lys	Glu	Val	Phe	Asn	Ile	Leu	Gln	Ala	Ala
305					310					315					320
Tyr	Val	Ser	Lys	Pro	Gly	Ala	Gln	Leu	Ala	Arg	Gln	Ile	Gly	Ala	Ser
				325				330						335	

[0018]

Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp	
340	345 350
Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys	
355	360 365
Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg	
370	375 380
Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg	
385	390 395 400
Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr	
	405 410 415
Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly	
	420 425 430
Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly	
	435 440 445
Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln	
	450 455 460
Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu	
465	470 475 480
Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu	
	485 490 495
Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys	
	500 505 510
Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln	
	515 520 525
Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys	
	530 535 540
Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile	

[0019]

545	550	555	560
Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu	565	570	575
Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg	580	585	590
Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu	595	600	605
Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys	610	615	620
Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile	625	630	635
Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp	645	650	655
Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly	660	665	670
Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg	675	680	685
His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn	690	695	700
Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe	705	710	715
Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe	725	730	735
Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser	740	745	750
Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn	755	760	765

[0020]

Ser	Val	Ser	Val	Pro	Arg	Met	Val	Ile	Asn	Val	His	Glu	Ala	Gly	Arg
770						775					780				
Asn	Phe	Thr	Val	Ala	Cys	Gln	His	Arg	Ser	Asn	Ser	Glu	Ile	Ile	Cys
785					790					795					800
Cys	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Gln	Gln	Leu	Asn	Leu	Gln	Leu	Pro	Leu	Lys
				805					810					815	
Thr	Lys	Ala	Phe	Phe	Met	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu	Ser	Lys	Tyr	Phe	Asp
			820					825					830		
Leu	Ile	Tyr	Val	His	Asn	Pro	Val	Phe	Lys	Pro	Phe	Glu	Lys	Pro	Val
	835						840					845			
Met	Ile	Ser	Met	Gly	Asn	Glu	Asn	Val	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Asn	Asp
850						855					860				
Ile	Asp	Pro	Glu	Ala	Val	Lys	Gly	Glu	Val	Leu	Lys	Val	Gly	Asn	Lys
865					870					875					880
Ser	Cys	Glu	Asn	Ile	His	Leu	His	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Cys	Thr	Val
				885					890					895	
Pro	Asn	Asp	Leu	Leu	Lys	Leu	Asn	Ser	Glu	Leu	Asn	Ile	Glu	Trp	Lys
			900					905					910		
Gln	Ala	Ile	Ser	Ser	Thr	Val	Leu	Gly	Lys	Val	Ile	Val	Gln	Pro	Asp
	915						920					925			
Gln	Asn	Phe	Thr	Gly	Leu	Ile	Ala	Gly	Val	Val	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala
	930					935					940				
Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Phe	Phe	Leu	Trp	Leu	Lys	Lys	Arg	Lys	Gln
945					950					955					960
Ile	Lys	Asp	Leu	Gly	Ser	Glu	Leu	Val	Arg	Tyr	Asp	Ala	Arg	Val	His
			965						970					975	
Thr	Pro	His	Leu	Asp	Arg	Leu	Val	Ser	Ala	Arg	Ser	Val	Ser	Pro	Thr
			980					985					990		

[0021]

Thr	Glu	Met	Val	Ser	Asn	Glu	Ser	Val	Asp	Tyr	Arg	Ala	Thr	Phe	Pro
		995					1000					1005			
Glu	Asp	Gln	Phe	Pro	Asn	Ser	Ser	Gln	Asn	Gly	Ser	Cys	Arg	Gln	
	1010					1015					1020				
Val	Gln	Tyr	Pro	Leu	Thr	Asp	Met	Ser	Pro	Ile	Leu	Thr	Ser	Gly	
	1025					1030					1035				
Asp	Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Asn	Thr	Val	His	Ile	
	1040					1045					1050				
Asp	Leu	Ser	Ala	Leu	Asn	Pro	Glu	Leu	Val	Gln	Ala	Val	Gln	His	
	1055					1060					1065				
Val	Val	Ile	Gly	Pro	Ser	Ser	Leu	Ile	Val	His	Phe	Asn	Glu	Val	
	1070					1075					1080				
Ile	Gly	Arg	Gly	His	Phe	Gly	Cys	Val	Tyr	His	Gly	Thr	Leu	Leu	
	1085					1090					1095				
Asp	Asn	Asp	Gly	Lys	Lys	Ile	His	Cys	Ala	Val	Lys	Ser	Leu	Asn	
	1100					1105					1110				
Arg	Ile	Thr	Asp	Ile	Gly	Glu	Val	Ser	Gln	Phe	Leu	Thr	Glu	Gly	
	1115					1120					1125				
Ile	Ile	Met	Lys	Asp	Phe	Ser	His	Pro	Asn	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	
	1130					1135					1140				
Gly	Ile	Cys	Leu	Arg	Ser	Glu	Gly	Ser	Pro	Leu	Val	Val	Leu	Pro	
	1145					1150					1155				
Tyr	Met	Lys	His	Gly	Asp	Leu	Arg	Asn	Phe	Ile	Arg	Asn	Glu	Thr	
	1160					1165					1170				
His	Asn	Pro	Thr	Val	Lys	Asp	Leu	Ile	Gly	Phe	Gly	Leu	Gln	Val	
	1175					1180					1185				
Ala	Lys	Gly	Met	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ser	Lys	Lys	Phe	Val	His	Arg	
	1190					1195					1200				

[0022]

Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Cys	Met	Leu	Asp	Glu	Lys	Phe	Thr	Val
1205						1210					1215			
Lys	Val	Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Asp	Met	Tyr	Asp	Lys	Glu
1220						1225					1230			
Tyr	Tyr	Ser	Val	His	Asn	Lys	Thr	Gly	Ala	Lys	Leu	Pro	Val	Lys
1235						1240					1245			
Trp	Met	Ala	Leu	Glu	Ser	Leu	Gln	Thr	Gln	Lys	Phe	Thr	Thr	Lys
1250						1255					1260			
Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Leu	Leu	Trp	Glu	Leu	Met	Thr
1265						1270					1275			
Arg	Gly	Ala	Pro	Pro	Tyr	Pro	Asp	Val	Asn	Thr	Phe	Asp	Ile	Thr
1280						1285					1290			
Val	Tyr	Leu	Leu	Gln	Gly	Arg	Arg	Leu	Leu	Gln	Pro	Glu	Tyr	Cys
1295						1300					1305			
Pro	Asp	Pro	Leu	Tyr	Glu	Val	Met	Leu	Lys	Cys	Trp	His	Pro	Lys
1310						1315					1320			
Ala	Glu	Met	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Glu	Leu	Val	Ser	Arg	Ile	Ser
1325						1330					1335			
Ala	Ile	Phe	Ser	Thr	Phe	Ile	Gly	Glu	His	Tyr	Val	His	Val	Asn
1340						1345					1350			
Ala	Thr	Tyr	Val	Asn	Val	Lys	Cys	Val	Ala	Pro	Tyr	Pro	Ser	Leu
1355						1360					1365			
Leu	Ser	Ser	Glu	Asp	Asn	Ala	Asp	Asp	Glu	Val	Asp	Thr	Arg	Pro
1370						1375					1380			
Ala	Ser	Phe	Trp	Glu	Thr	Ser								
1385						1390								

<210> 16

[0023]

<211> 1210

<212> PRT

<213> 人

<400> 16

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
50 55 60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
65 70 75 80

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
100 105 110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
115 120 125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
130 135 140

His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
145 150 155 160

Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
165 170 175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
180 185 190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln

[0024]

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

[0025]

Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Arg	Thr	Lys	Gln	
			420					425					430			
His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ser	Leu	
		435					440					445				
Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	Ile	Ile	Ser	
	450					455					460					
Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Trp	Lys	Lys	Leu	
465					470					475					480	
Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn	Arg	Gly	Glu	
				485				490						495		
Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His	Ala	Leu	Cys	Ser	Pro	
			500					505					510			
Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys	Val	Ser	Cys	Arg	Asn	
	515						520					525				
Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	Asn	Leu	Leu	Glu	Gly	
	530					535					540					
Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys	Ile	Gln	Cys	His	Pro	
545					550					555					560	
Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	
				565					570					575		
Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro	His	Cys	Val	
			580					585					590			
Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Asn	Asn	Thr	Leu	Val	Trp	
		595					600					605				
Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu	Cys	His	Pro	Asn	Cys	
	610					615					620					
Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Pro	Thr	Asn	Gly	
625					630					635					640	

[0026]

Pro Lys Ile	Pro Ser Ile	Ala Thr Gly	Met Val Gly	Ala Leu Leu	Leu Leu
	645		650		655
Leu Leu Val	Val Ala Leu	Gly Ile Gly	Leu Phe Met	Arg Arg Arg	His
	660		665		670
Ile Val Arg	Lys Arg Thr	Leu Arg Arg	Leu Leu Gln	Glu Arg Glu	Leu
	675		680		685
Val Glu Pro	Leu Thr Pro	Ser Gly Glu	Ala Pro Asn	Gln Ala Leu	Leu
	690		695		700
Arg Ile Leu	Lys Glu Thr	Glu Phe Lys	Lys Ile Lys	Val Leu Gly	Ser
705		710		715	720
Gly Ala Phe	Gly Thr Val	Tyr Lys Gly	Leu Trp Ile	Pro Glu Gly	Glu
	725		730		735
Lys Val Lys	Ile Pro Val	Ala Ile Lys	Glu Leu Arg	Glu Ala Thr	Ser
	740		745		750
Pro Lys Ala	Asn Lys Glu	Ile Leu Asp	Glu Ala Tyr	Val Met Ala	Ser
	755		760		765
Val Asp Asn	Pro His Val	Cys Arg Leu	Leu Gly Ile	Cys Leu Thr	Ser
	770		775		780
Thr Val Gln	Leu Ile Thr	Gln Leu Met	Pro Phe Gly	Cys Leu Leu	Asp
785		790		795	800
Tyr Val Arg	Glu His Lys	Asp Asn Ile	Gly Ser Gln	Tyr Leu Leu	Asn
	805		810		815
Trp Cys Val	Gln Ile Ala	Lys Gly Met	Asn Tyr Leu	Glu Asp Arg	Arg
	820		825		830
Leu Val His	Arg Asp Leu	Ala Ala Arg	Asn Val Leu	Val Lys Thr	Pro
	835		840		845
Gln His Val	Lys Ile Thr	Asp Phe Gly	Leu Ala Lys	Leu Leu Gly	Ala
	850		855		860

[0027]

Glu	Glu	Lys	Glu	Tyr	His	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Val	Pro	Ile	Lys	Trp
865					870					875					880
Met	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	His	Arg	Ile	Tyr	Thr	His	Gln	Ser	Asp
				885					890					895	
Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Thr	Val	Trp	Glu	Leu	Met	Thr	Phe	Gly	Ser
			900					905					910		
Lys	Pro	Tyr	Asp	Gly	Ile	Pro	Ala	Ser	Glu	Ile	Ser	Ser	Ile	Leu	Glu
		915					920					925			
Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Ile	Cys	Thr	Ile	Asp	Val	Tyr
	930					935					940				
Met	Ile	Met	Val	Lys	Cys	Trp	Met	Ile	Asp	Ala	Asp	Ser	Arg	Pro	Lys
945					950					955					960
Phe	Arg	Glu	Leu	Ile	Ile	Glu	Phe	Ser	Lys	Met	Ala	Arg	Asp	Pro	Gln
				965					970					975	
Arg	Tyr	Leu	Val	Ile	Gln	Gly	Asp	Glu	Arg	Met	His	Leu	Pro	Ser	Pro
			980					985					990		
Thr	Asp	Ser	Asn	Phe	Tyr	Arg	Ala	Leu	Met	Asp	Glu	Glu	Asp	Met	Asp
		995					1000					1005			
Asp	Val	Val	Asp	Ala	Asp	Glu	Tyr	Leu	Ile	Pro	Gln	Gln	Gly	Phe	
	1010					1015					1020				
Phe	Ser	Ser	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Thr	Pro	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	
	1025					1030					1035				
Ser	Ala	Thr	Ser	Asn	Asn	Ser	Thr	Val	Ala	Cys	Ile	Asp	Arg	Asn	
	1040					1045					1050				
Gly	Leu	Gln	Ser	Cys	Pro	Ile	Lys	Glu	Asp	Ser	Phe	Leu	Gln	Arg	
	1055					1060					1065				
Tyr	Ser	Ser	Asp	Pro	Thr	Gly	Ala	Leu	Thr	Glu	Asp	Ser	Ile	Asp	

[0028]

<210>	18
<211>	16
<212>	PRT
<213>	小家鼠

74

<400> 18

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 19

Asn Tyr Gly Val His
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 20

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr
1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 21

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

[0030]

<220>

<223> 重链 CDR3H, <ErbB-1> 人源化 ICR62

<400> 23

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

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链 CDR2H, <ErbB-1> 人源化 ICR62

<400> 24

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

Gly

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链 CDR1H, <ErbB-1> 人源化 ICR62

<400> 25

Asp Tyr Lys Ile His
1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链 CDR3L, <ErbB-1> 人源化 ICR62

<400> 26

Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
1 5

[0031]

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 轻链 CDR2L, <ErbB-1> 人源化 ICR62

<400> 27

Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr
1 5

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 轻链 CDR1L, <ErbB-1> 人源化 ICR62

<400> 28

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

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重链 CDR3H, <c-Met> Mab 5D5

<400> 29

Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重链 CDR2H, <c-Met> Mab 5D5

<400> 30

Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe Lys
1 5 10 15

[0032]

Asp

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重链 CDR1H, <c-Met> Mab 5D5

<400> 31

Ser Tyr Trp Leu His
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 轻链 CDR3L, <c-Met> Mab 5D5

<400> 32

Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 轻链 CDR2L, <c-Met> Mab 5D5

<400> 33

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 轻链 CDR1L, <c-Met> Mab 5D5

[0033]

<400> 34

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

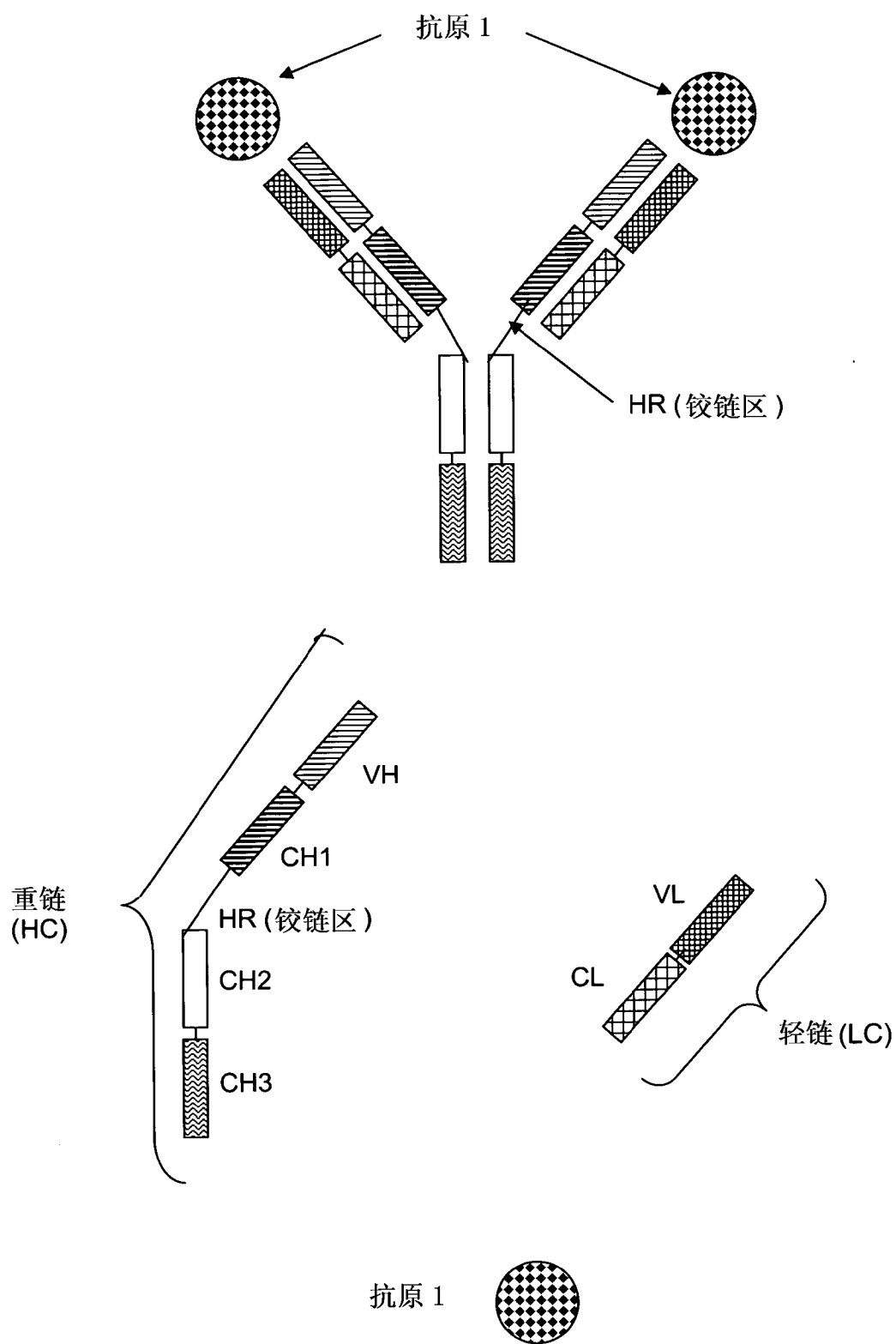


图 1

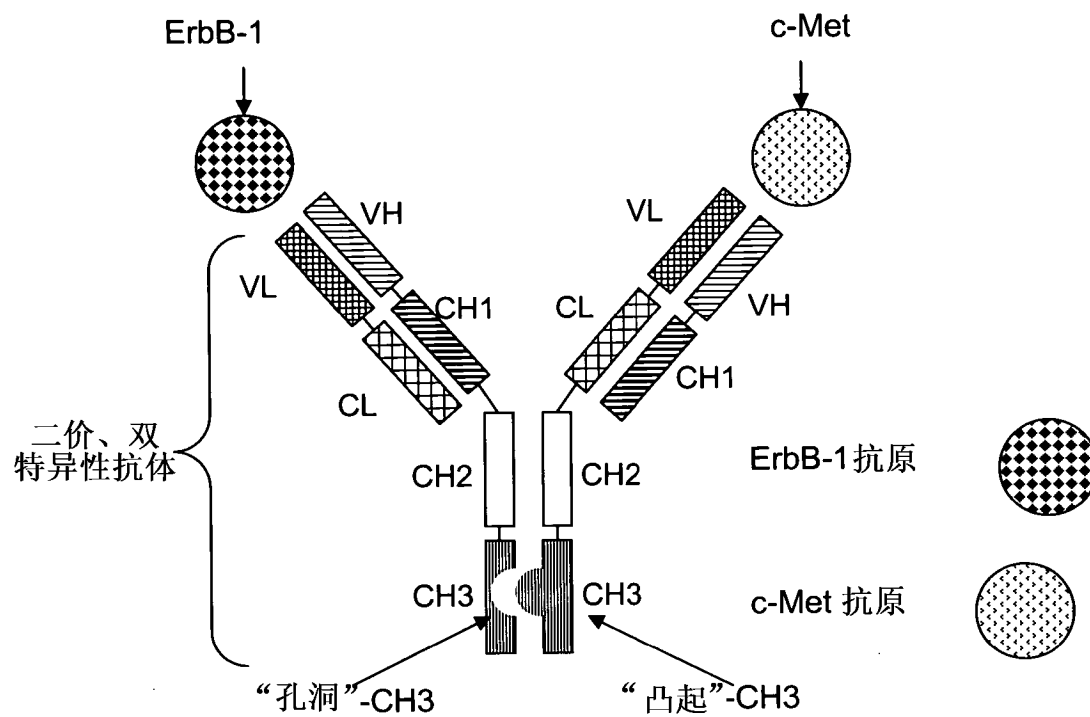


图 2a

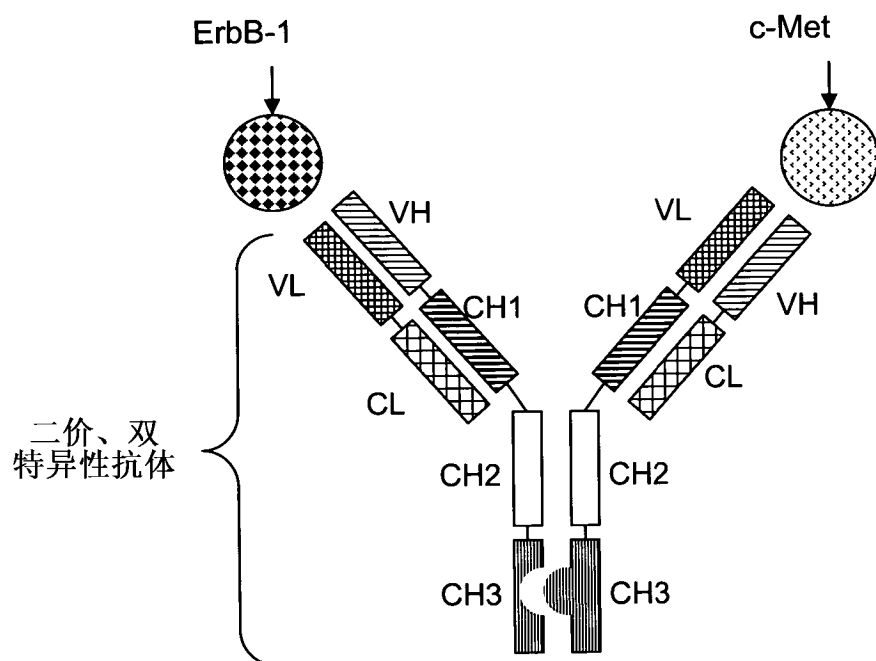


图 2b

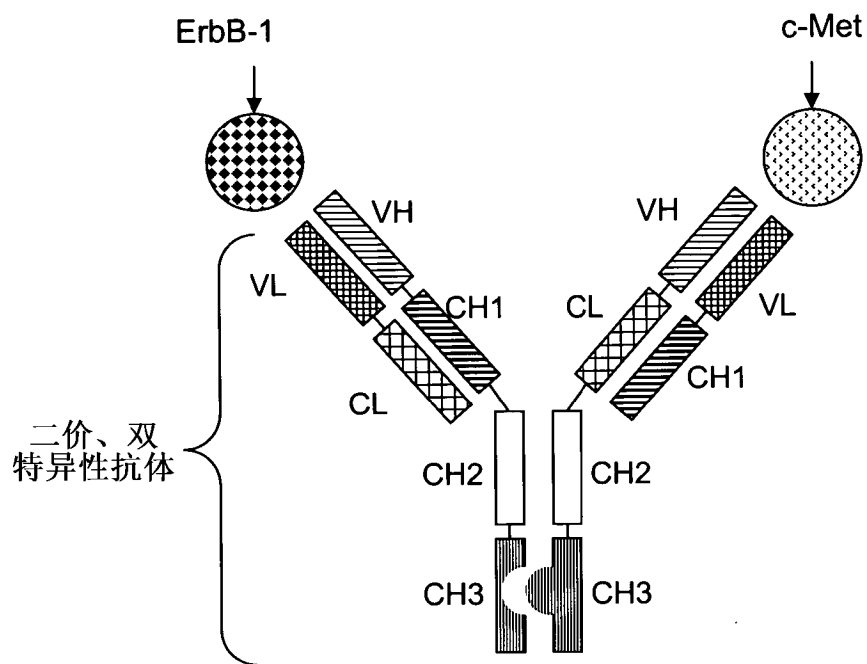


图 2c

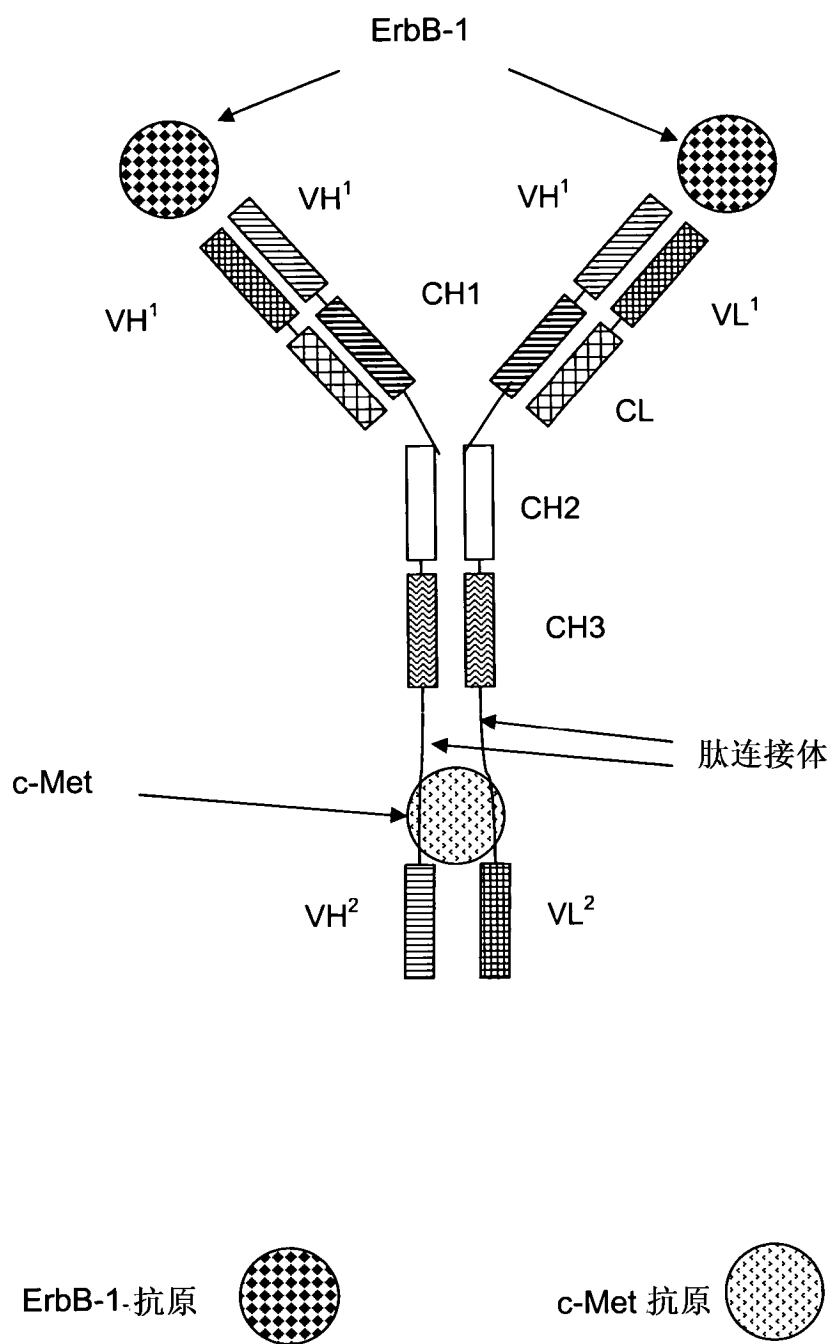


图 3a

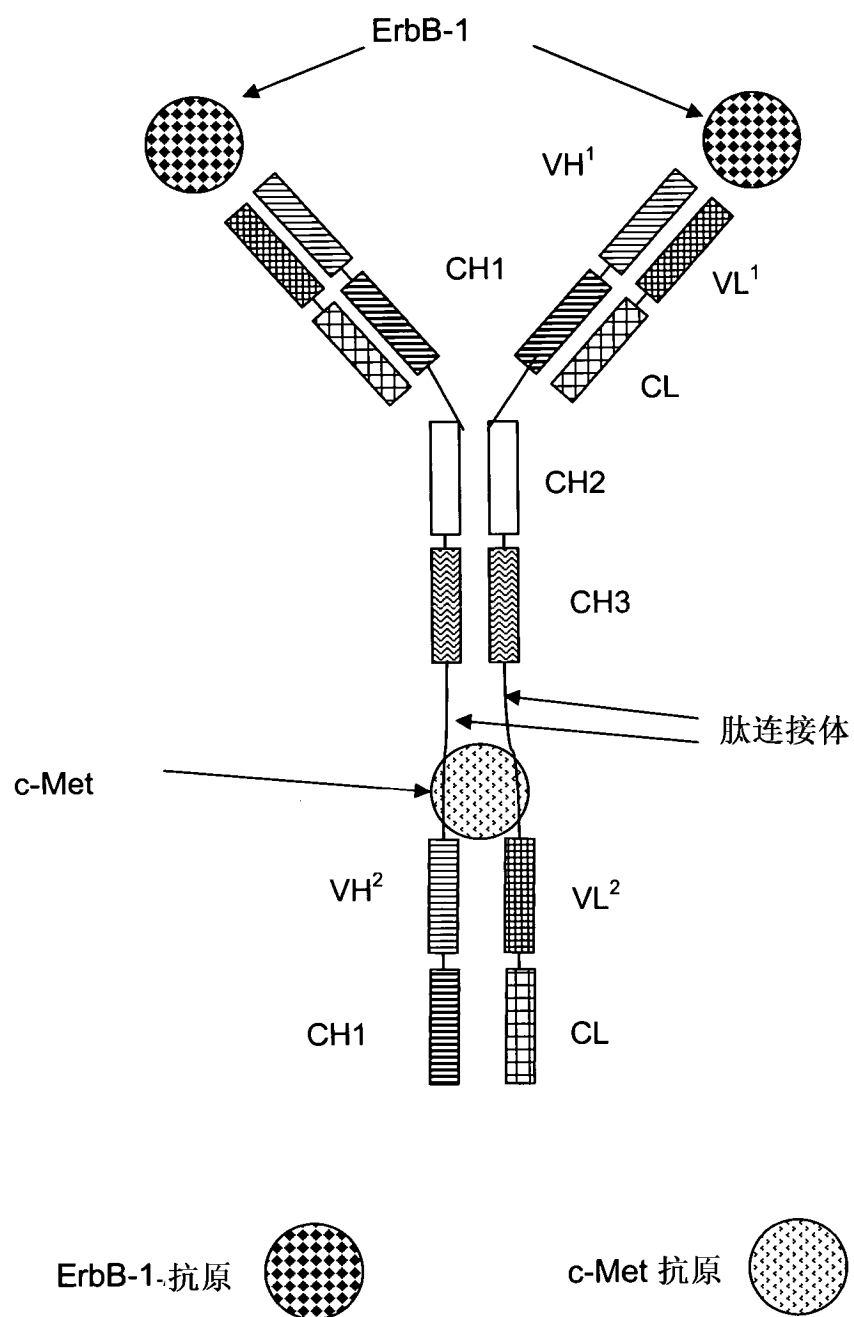


图 3b

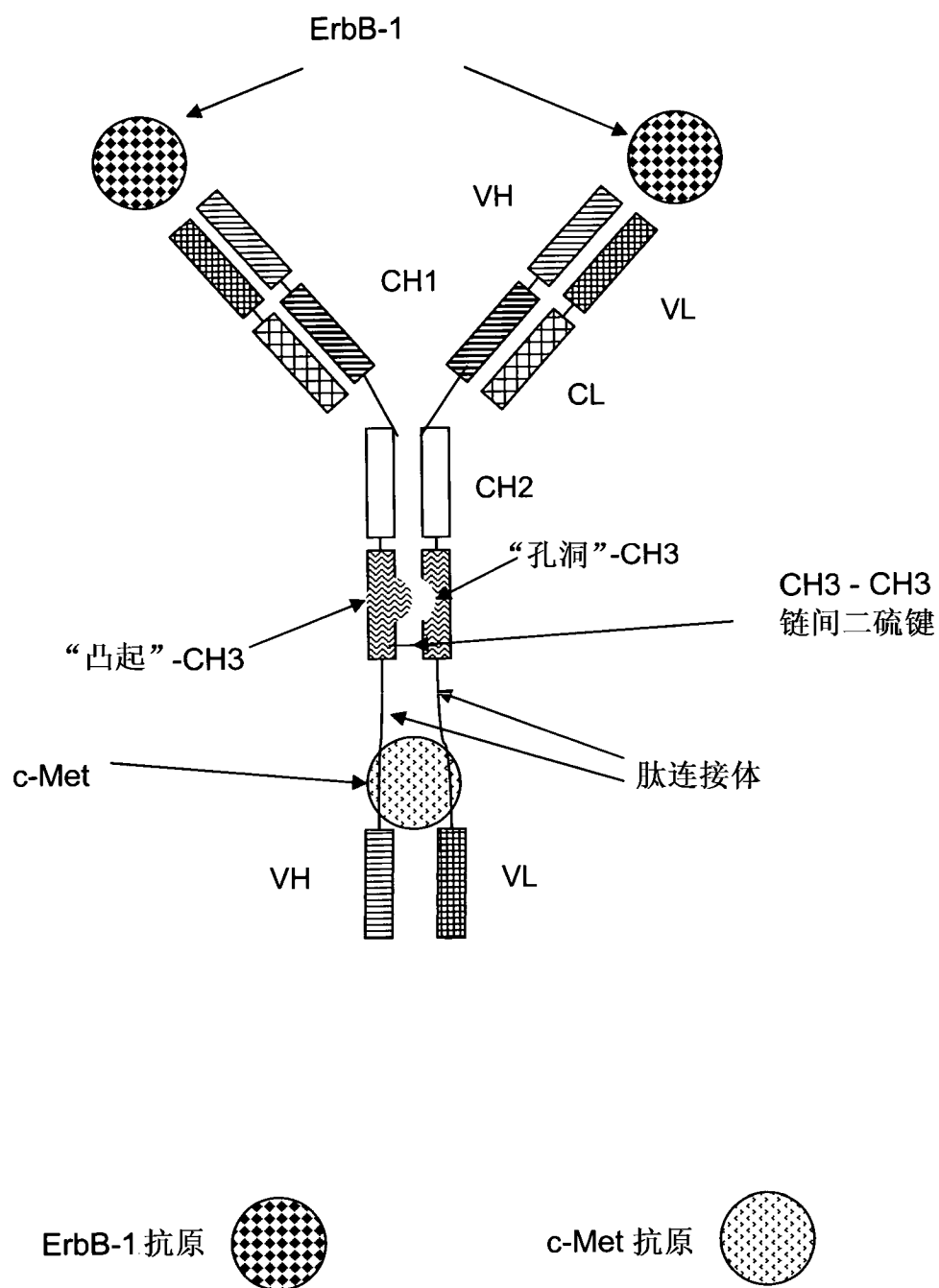


图 3c

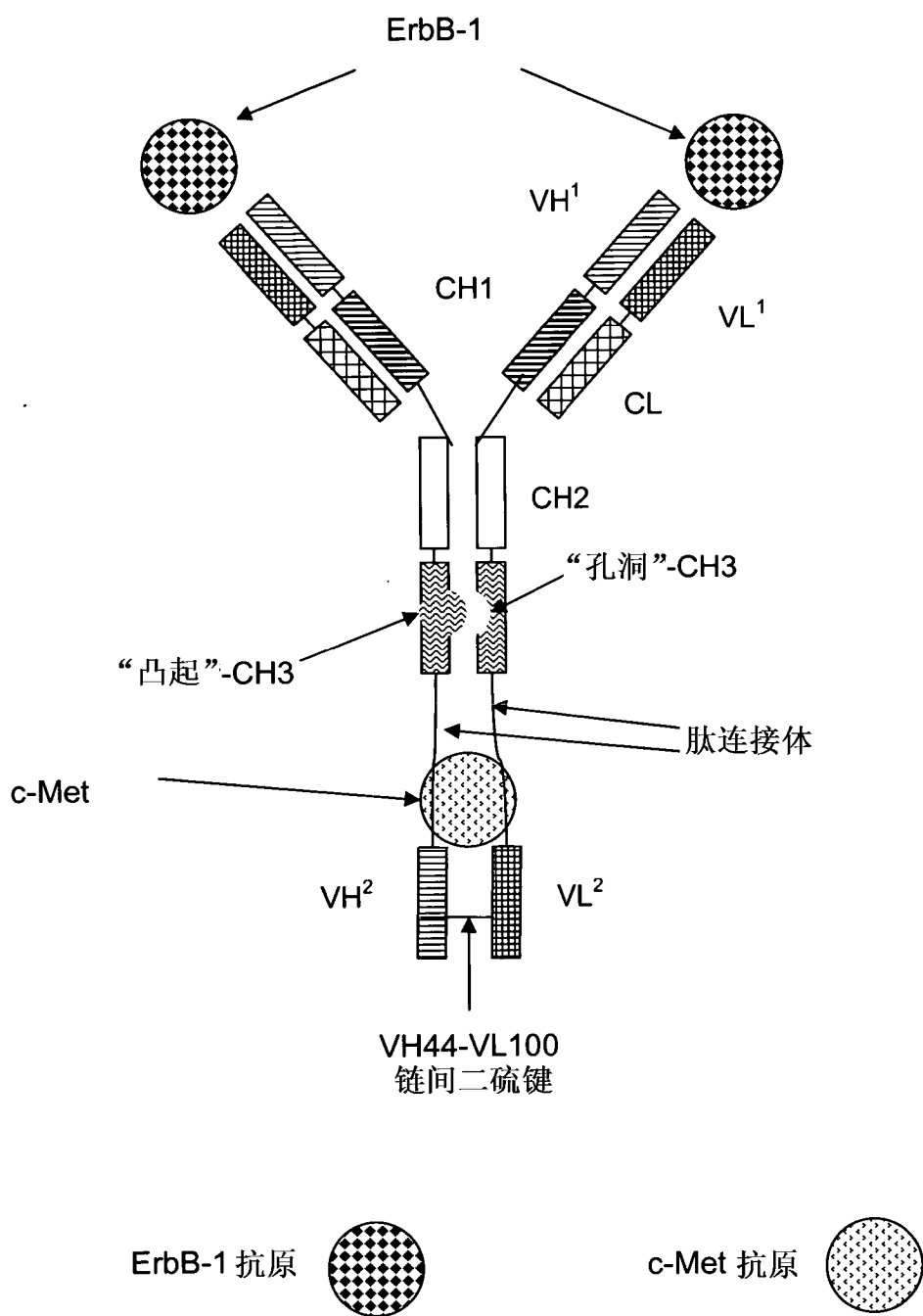


图 3d

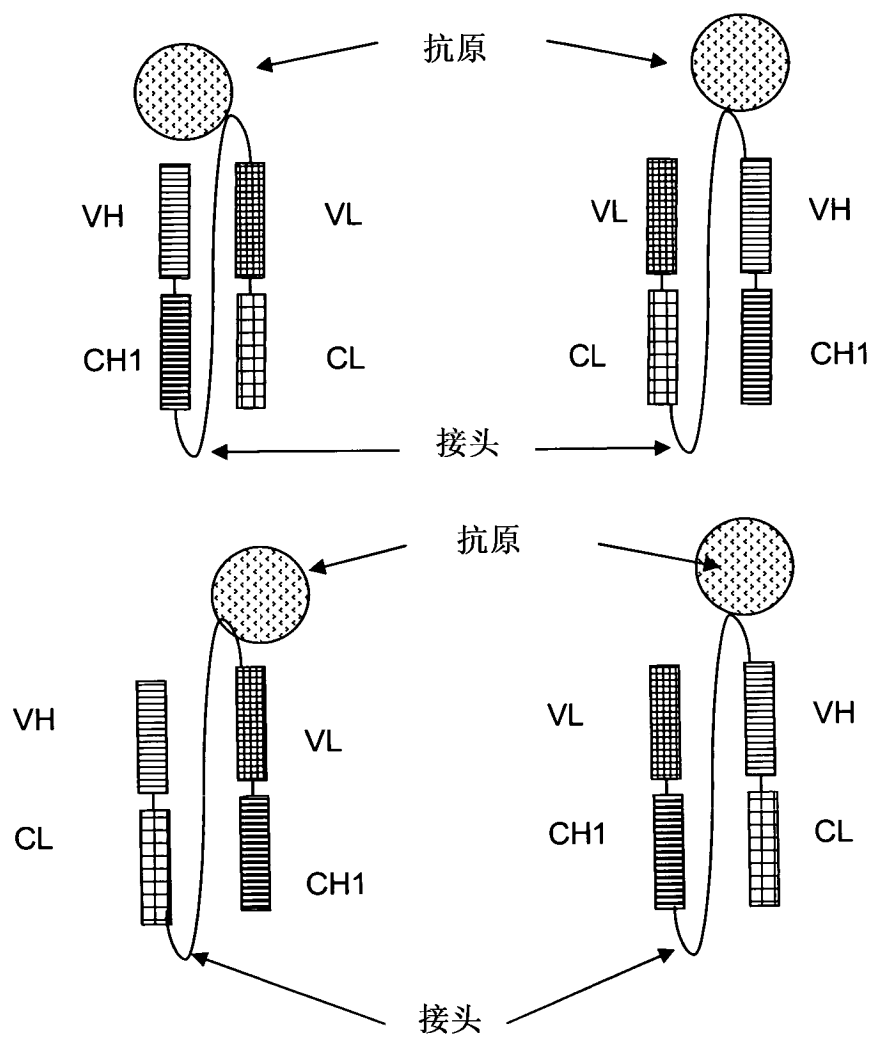


图 4a

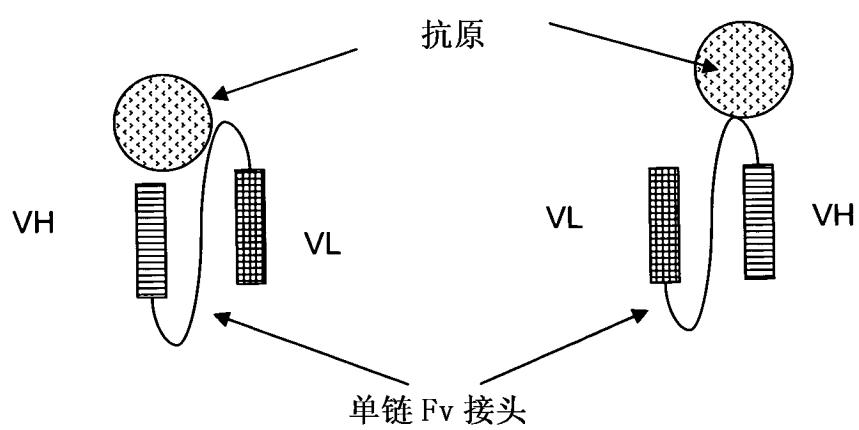


图 4b

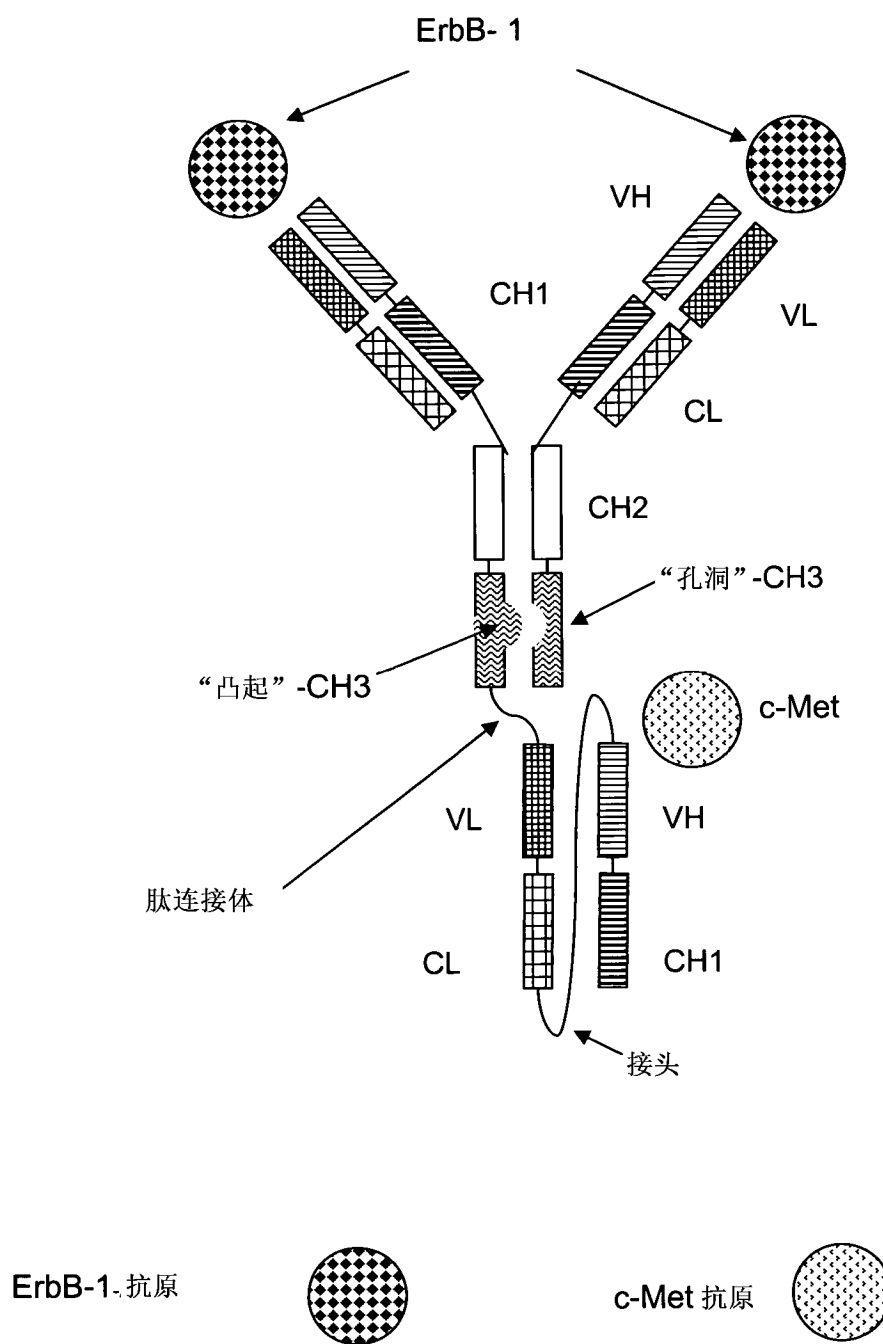


图 5a

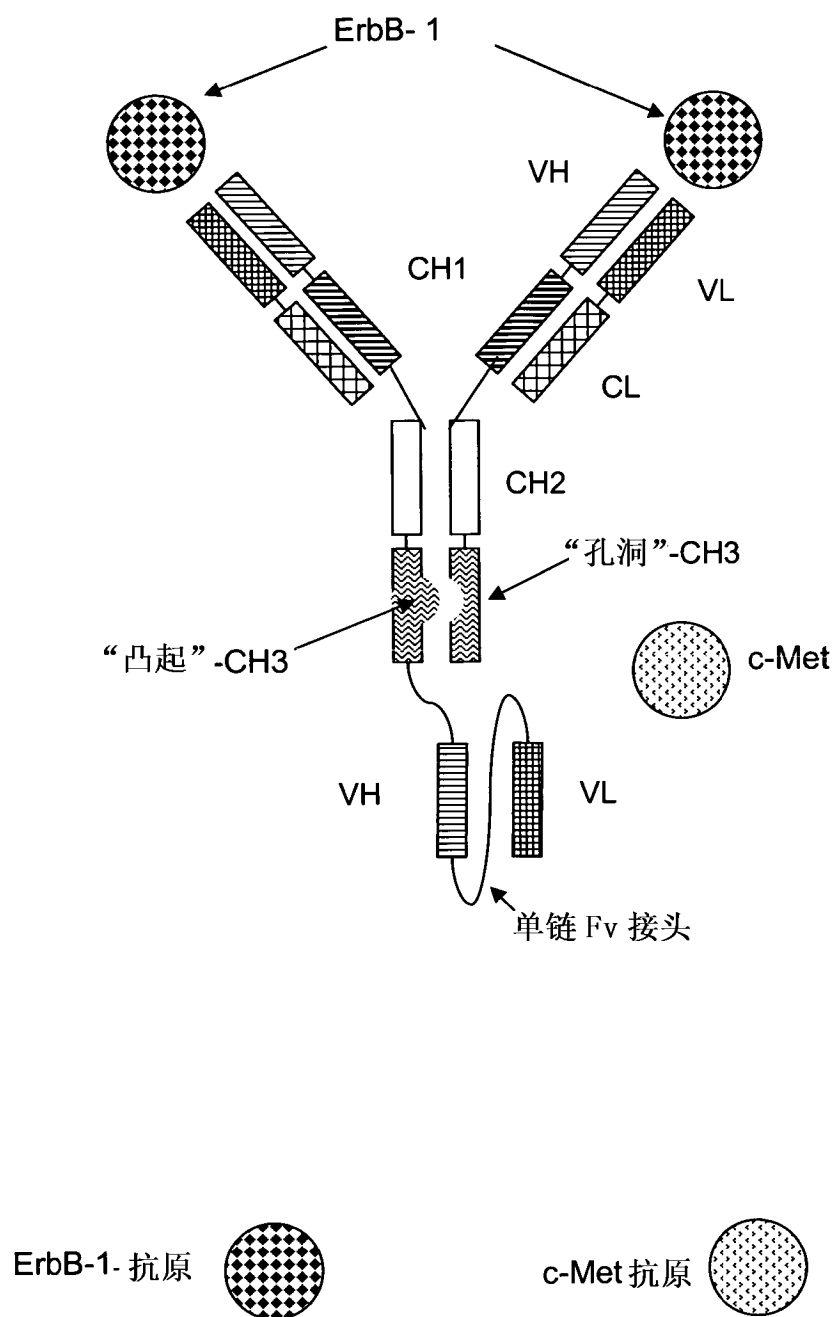


图 5b

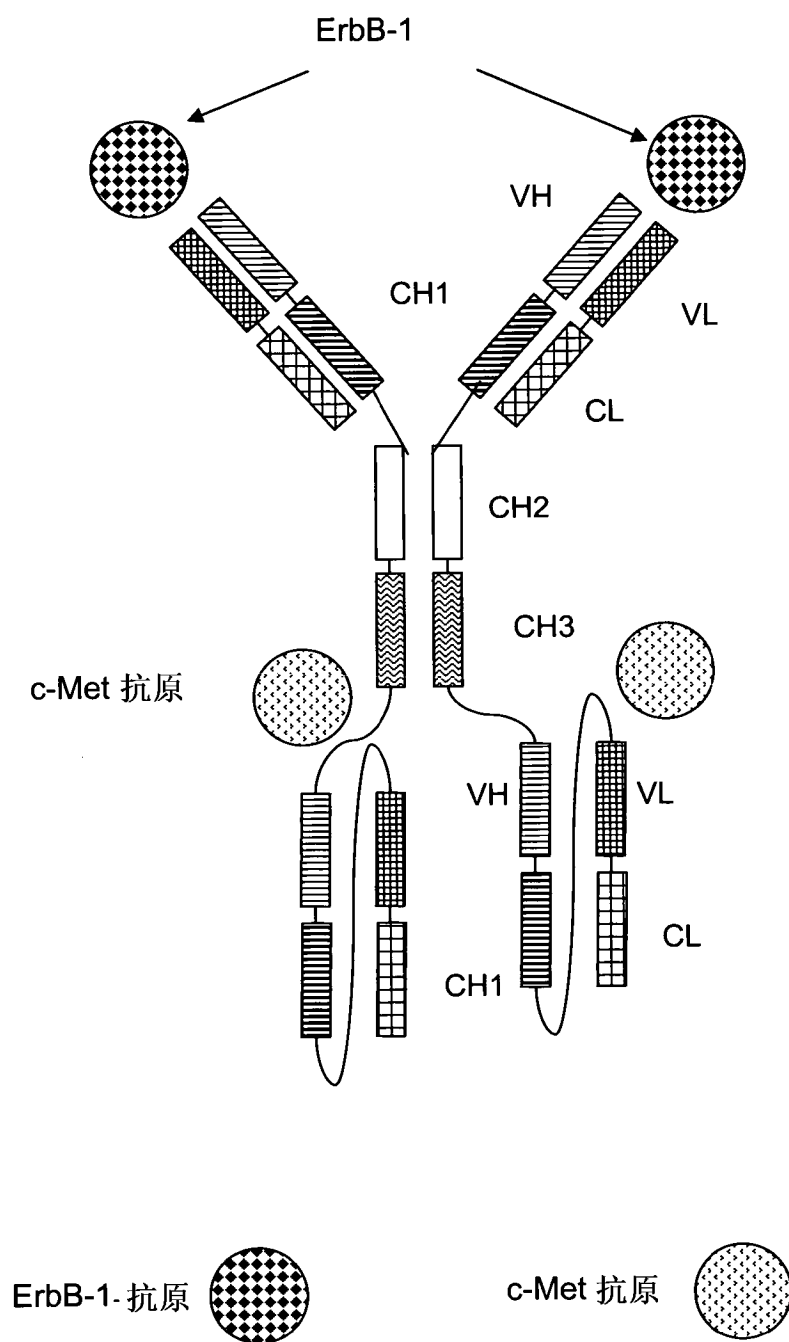


图 6a

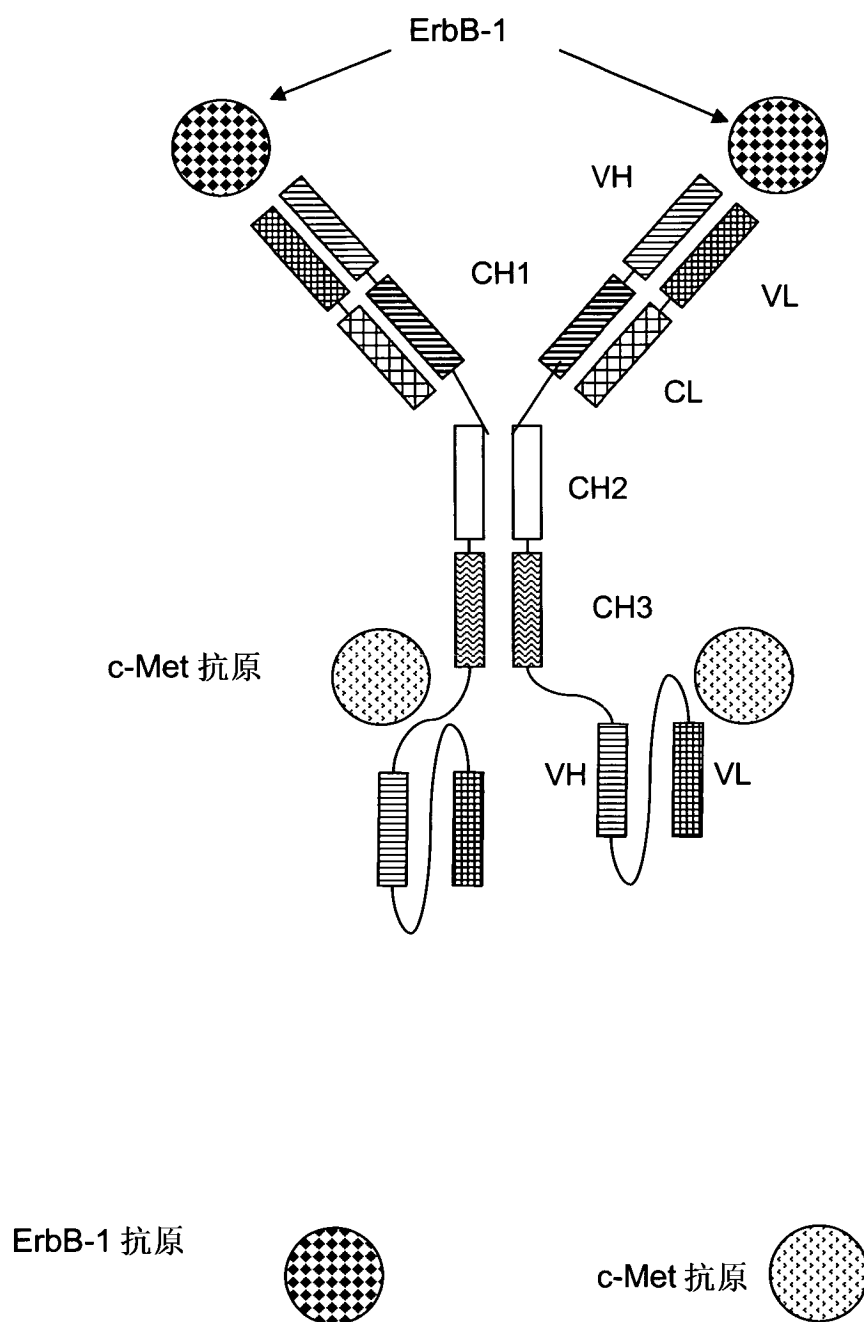


图 6b

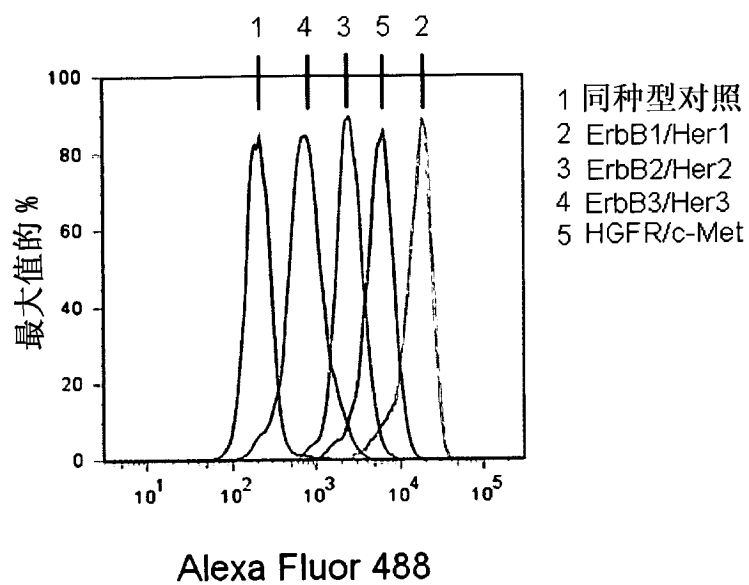


图 7a

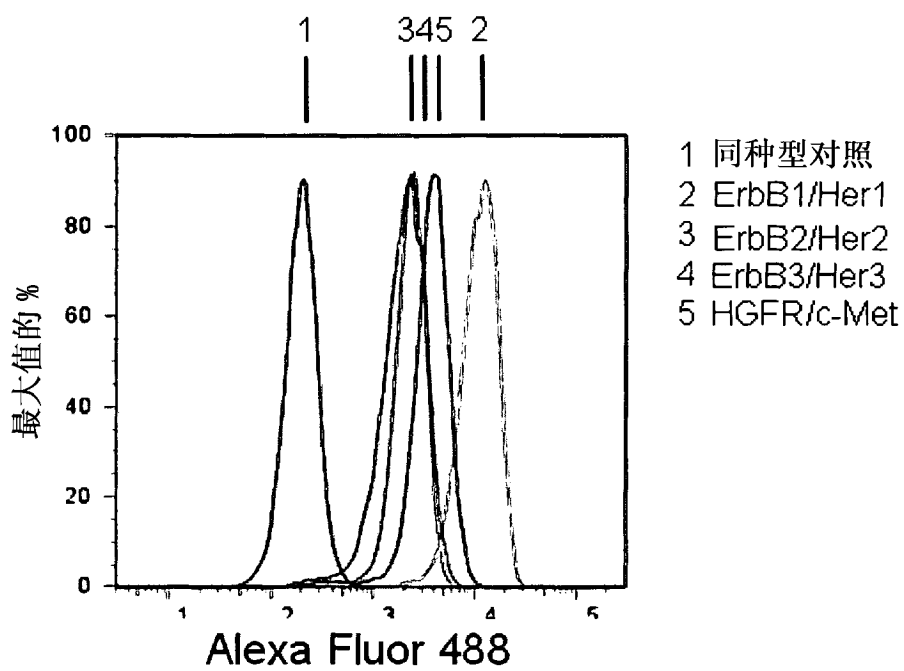


图 7b

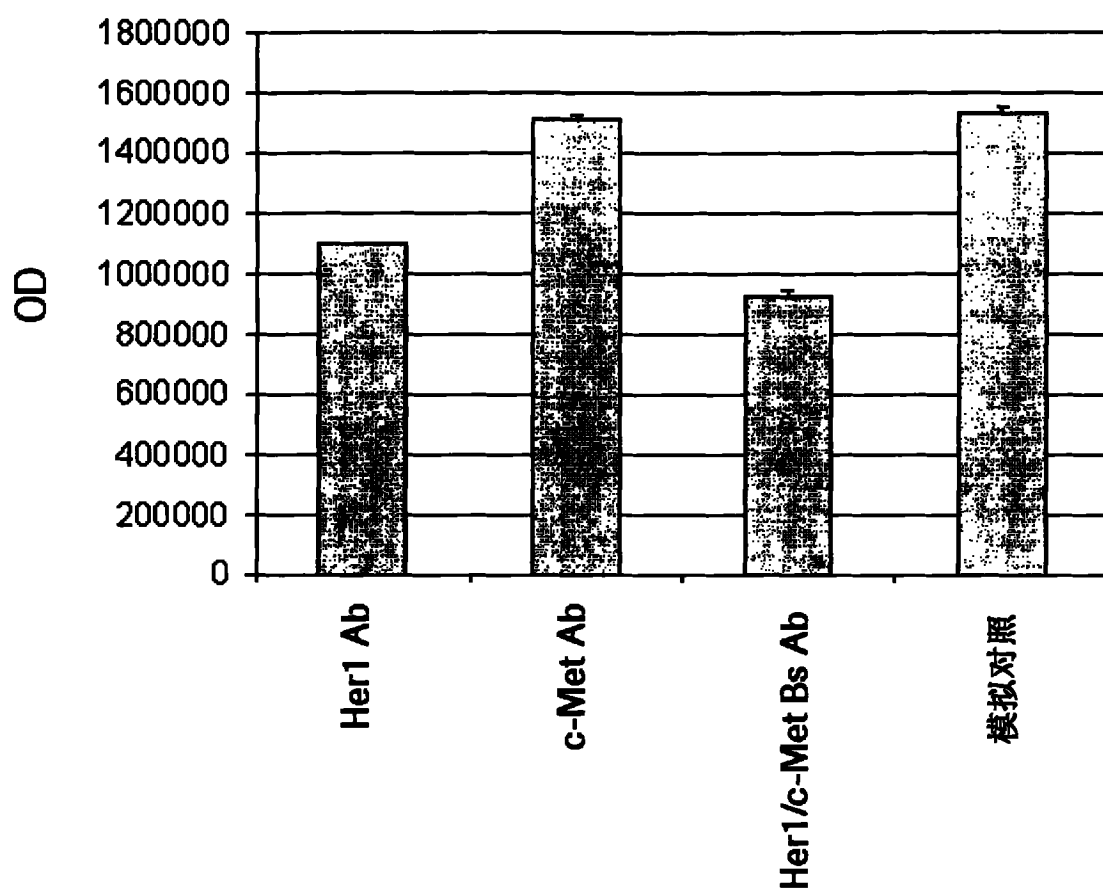


图 8a

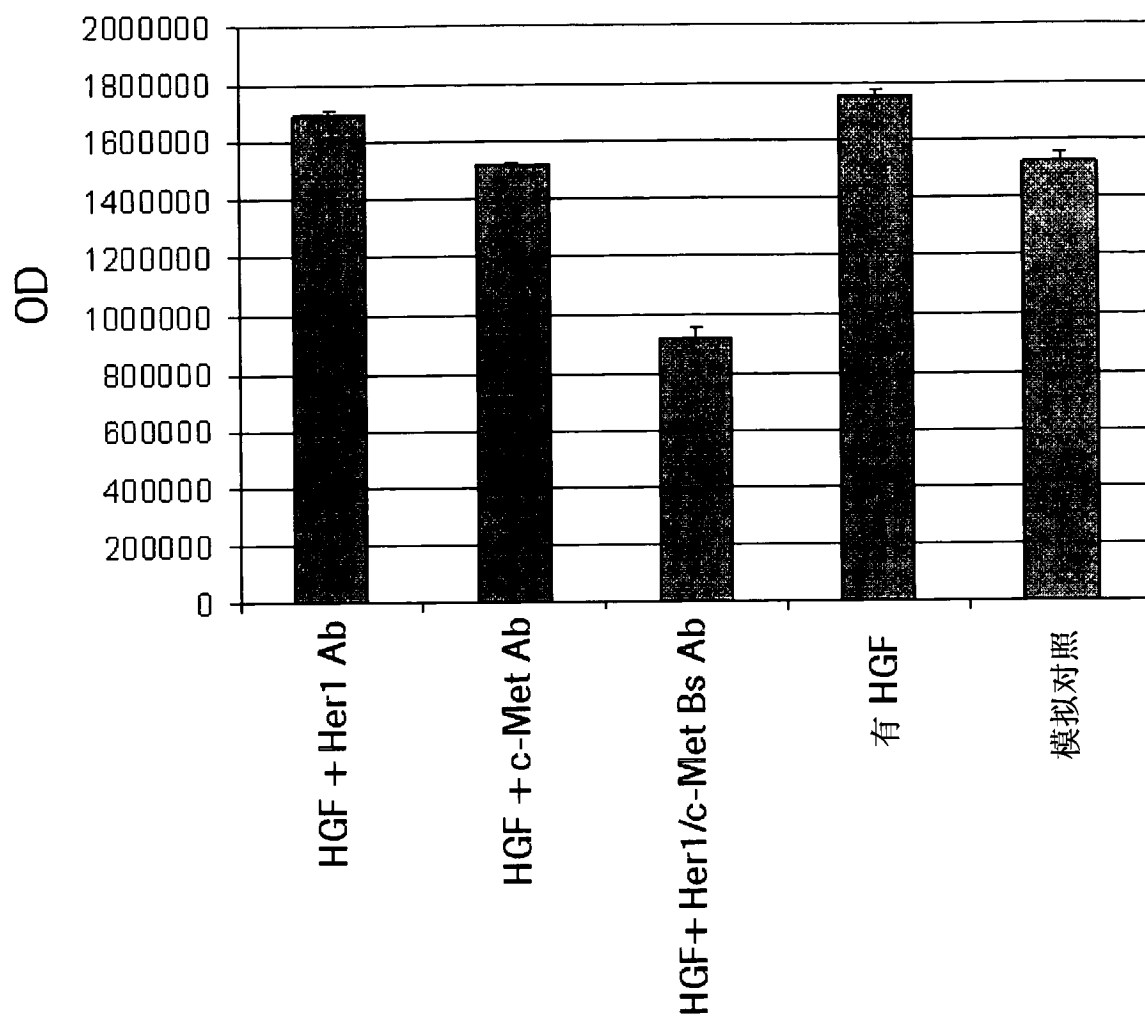


图 8b

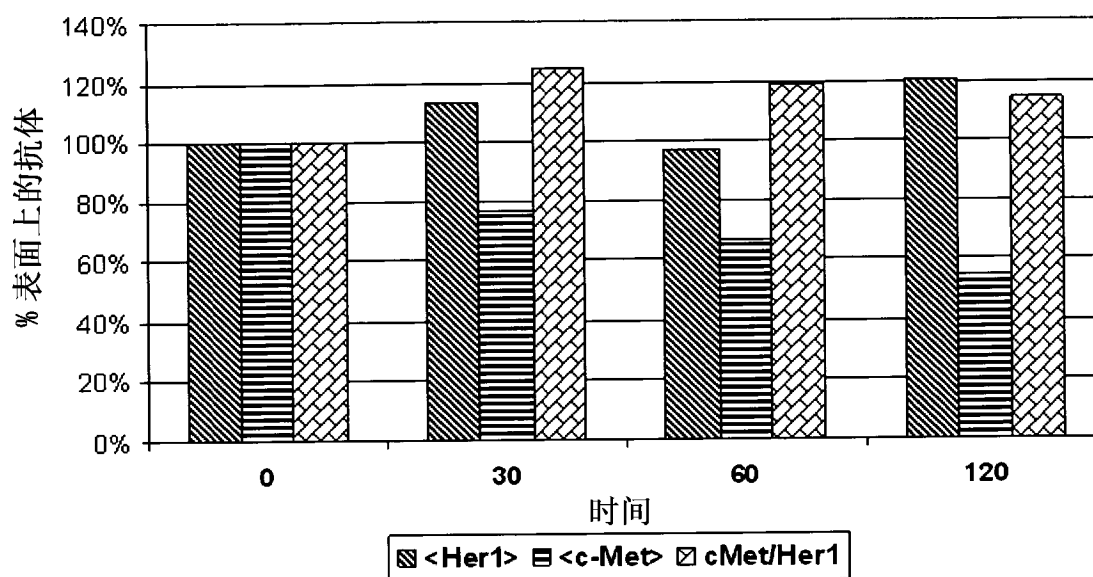


图 9

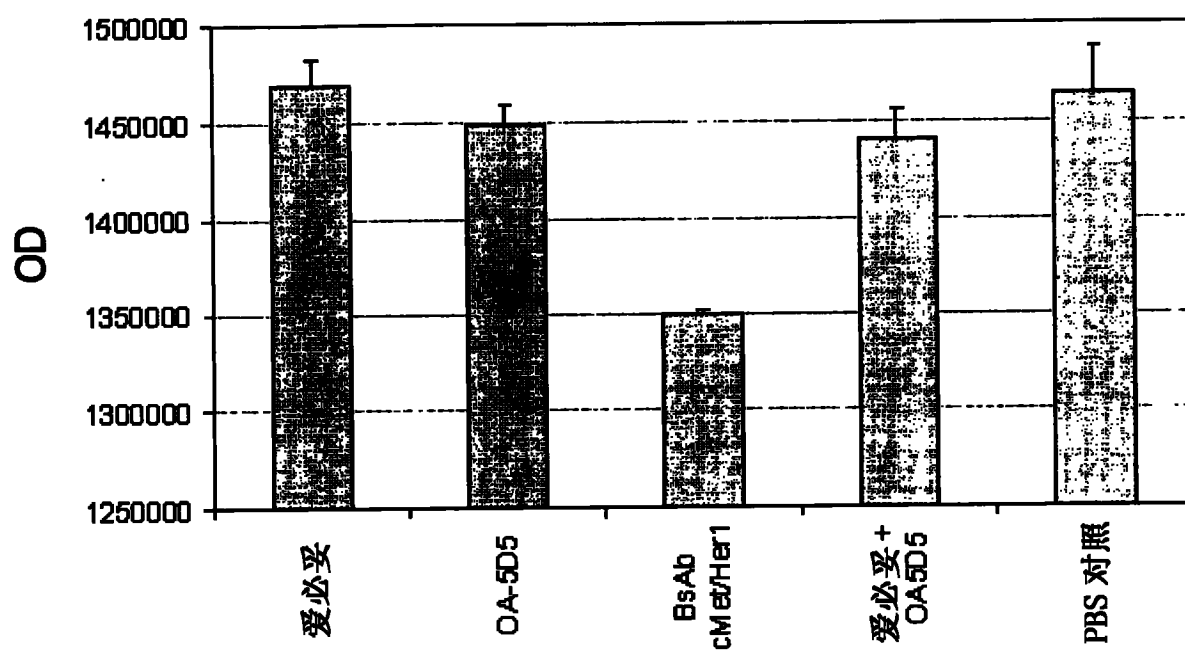


图 10a

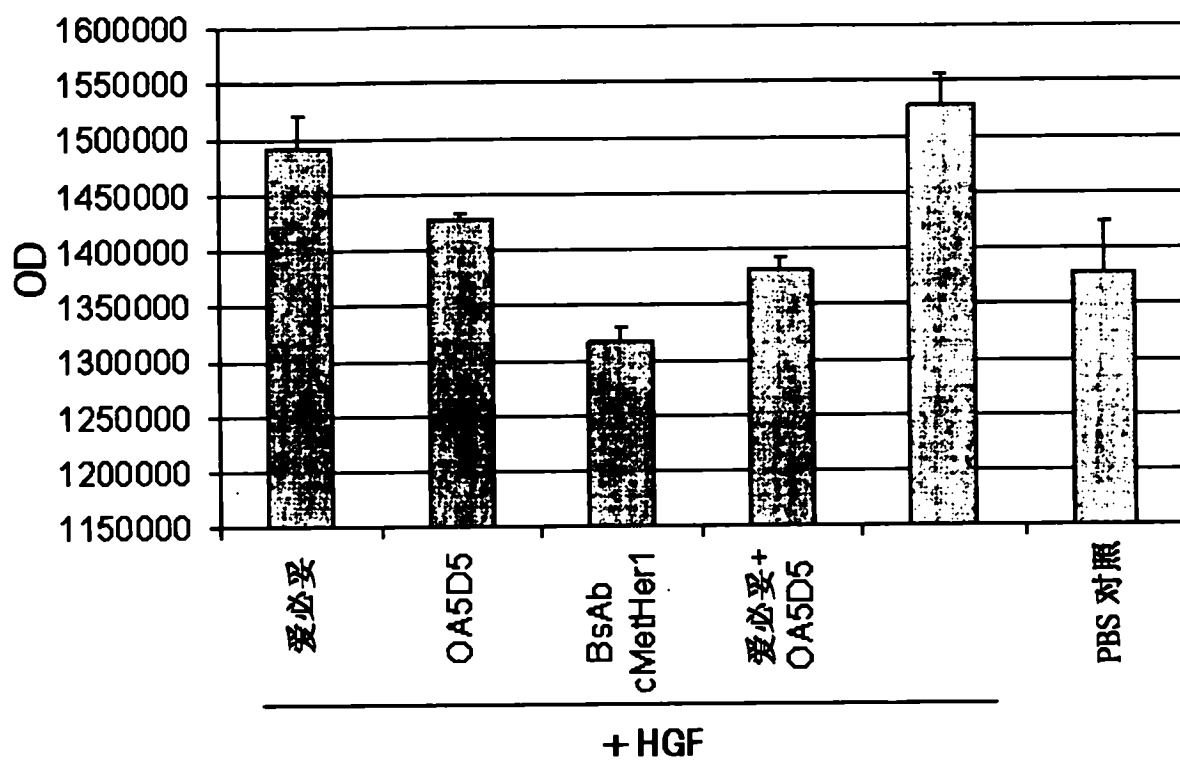


图 10b