



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I577387 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 11 日

(21)申請案號：102138314

(22)申請日：中華民國 97 (2008) 年 04 月 01 日

(51)Int. Cl. : A61K39/395 (2006.01)

A61K45/06 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2007/04/02 美國

60/909,699

2007/05/04 美國

60/916,187

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

美國

(72)發明人：戴斯挪爾斯 路斯 DESNOYERS, LUC (CA)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

JP 2006-158339A

審查人員：顏逸瑜

申請專利範圍項數：5 項 圖式數：12 共 206 頁

(54)名稱

克羅梭 (K L O T H O) B E T A 之用途

USE OF KLOTHO BETA

(57)摘要

本發明係關於抗 KLβ 劑之用途，及 KLβ 及/或 FGF19 及/或 FGFR4 之偵測。

The invention concerns uses of anti-KLβ agents, and detection of KLβ and/or FGF19 and/or FGFR4.

指定代表圖：

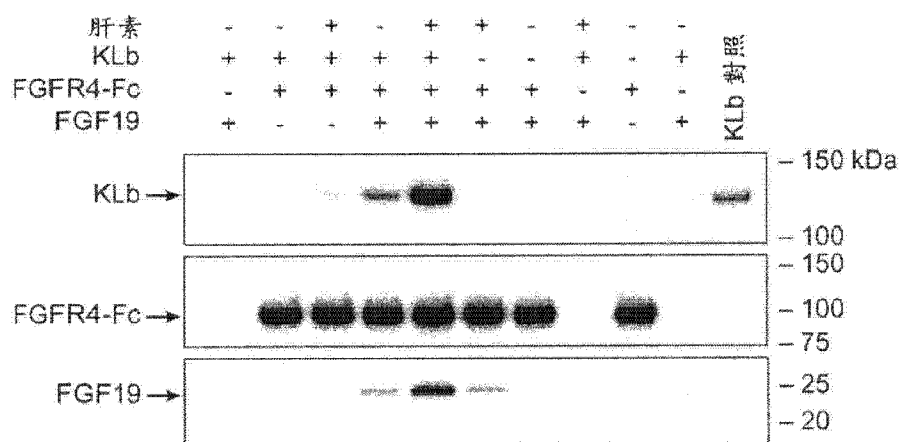


圖1B

發明摘要

公告

※ 申請案號：102138314 (由97111903分割)

※ 申請日：97.4.1

※IPC 分類：A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】

克羅梭(KLOTHO) BETA 之用途

USE OF KLOTHO BETA

【中文】

本發明係關於抗KL β 劑之用途，及KL β 及/或FGF19及/或FGFR4之偵測。

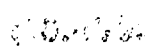
【英文】

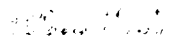
The invention concerns uses of anti-KL β agents, and detection of KL β and/or FGF19 and/or FGFR4.

【代表圖】

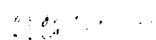
【本案指定代表圖】：第（1B）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

 (無元件符號說明)







【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

克羅梭(KLOTHO) BETA 之用途

USE OF KLOTHO BETA

【技術領域】

本發明一般係關於分子生物學領域。更特定而言，本發明係關於抗KL β 劑之用途，及KL β 及/或FGF19及/或FGFR4之偵測。

本申請案主張2007年4月2日申請之美國臨時申請案第60/909,699號及2007年5月4日申請之美國臨時申請案第60/916,187號之優先權，2個申請案均以引用之方式全部併入本文。

【先前技術】

克羅梭(Klotho) beta ("KL β "、"KLB"或"beta克羅梭")為具有短(29個胺基酸)細胞內域之130-kDa 1型跨膜蛋白質，其不具有預測激酶活性(Ito等人，Mech. Dev. 98 (2000) 115-119)。KL β 具有2個缺乏酶促活性所必需之特徵麩胺酸殘基之細胞外糖苷酶域。缺乏Klb之小鼠(Klb^{-/-}小鼠)具有增加之CYP7A1表現及減少之膽囊尺寸，其指示Klb^{-/-}小鼠不再能抑止膽汁酸合成(Inagaki, T等人(2005) Cell Metab 2:217-25)。KL β 主要在肝及胰腺中表現。同上，小鼠中之編碼KL β 之基因的破壞造成膽固醇7 α -羥化酶(CYP7A1)之mRNA含量明顯增加，該膽固醇7 α -羥化酶為膽汁酸生物合成路徑中之第一及限速酶。Ito等人(2005) J Clin Invest 115(8):2202-2208；Arrese等人(2006) Hepatology 43(1): 191-193；Moschetta及Kliwer, (2005) J Clin Invest 115(8): 2075-2077。

纖維母細胞生長因子(FGF)家族由22種結構相關多肽組成，其與

4種受體酪胺酸激酶(FGFR1-4)及1種激酶缺乏受體(FGFR5)結合(Eswarakumar等人(2005) *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 139-149; Ornitz等人(2001) *Genome Biol* 2, REVIEWS3005; Sleeman等人(2001) *Gene* 271, 171-182)。FGF與FGFR1-4之相互作用產生受體均二聚及自體磷酸化、諸如FRS2之胞內接附子之募集及多信號傳輸路徑之起始(Powers等人(2000) *Endocr Relat Cancer* 7, 165-197; Schlessinger, J. (2004) *Science* 306, 1506-1507)。

FGF及FGFR藉由調節細胞增殖、遷移、向化性、分化、形態發生及血管生成而在發育及組織修復中起重要作用(Ornitz等人(2001) *Genome Biol* 2, REVIEWS3005; Auguste等人(2003) *Cell Tissue Res* 314, 157-166; Steiling等人(2003) *Curr Opin Biotechnol* 14, 533-537)。若干FGF及FGFR與乳癌、前列腺癌、子宮頸癌、胃癌及結腸癌之發病機制相關(Jeffers等人(2002) *Expert Opin Ther Targets* 6, 469-482; Mattila等人, (2001) *Oncogene* 20, 2791-2804; Ruohola等人, (2001) *Cancer Res* 61, 4229-4237; Marsh等人(1999) *Oncogene* 18, 1053-1060; Shimokawa等人(2003) *Cancer Res* 63, 6116-6120; Jang, (2001) *Cancer Res* 61, 3541-3543; Cappellen (1999) *Nat Genet* 23, 18-20; Gowardhan, (2005) *Br J Cancer* 92, 320-327)。

FGF19為FGF之7個亞科之最遠者的成員。FGF19為FGFR4之高親和力配位體(Xie等人(1999) *Cytokine* 11:729-735)。FGF19通常藉由膽及腸上皮分泌。FGF19藉由抑制膽固醇-7- α -羥化酶1(Cyp7 α 1)之肝表現而在膽固醇內穩定中起作用，該膽固醇-7- α -羥化酶1(Cyp7 α 1)為膽固醇及膽汁酸合成之限速酶(Gutierrez等人(2006) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 301-306; Yu等人(2000) *J Biol Chem* 275, 15482-15489; Holt, JA等人, (2003) *Genes Dev* 17(130):158)。轉殖基因小鼠模型中之FGF19異位表現增加肝細胞增殖，促進肝細胞發育不良且達

10月齡時產生瘤形成(Nicholes等人，(2002). Am J Pathol 160, 2295-2307)。認為FGF19誘導之肝細胞癌瘤之機制涉及FGFR4相互作用。腫瘤組織中之FGF19過度表現描述於共同所有之同在申請中之美國專利申請案第11/673,411號(2007年2月9日申請)中。異位表現FGF19之轉殖基因小鼠比其野生型同窩出生者重量輕，其部分歸因於白色脂肪組織之減少。Tomlinson, E等人，(2002) Endocrinology 143:1741-1747。儘管FGF19轉殖基因小鼠具有增加之食物攝入，但是其亦具有較高代謝率，其不依賴於瘦素、IGF-1、生長激素或甲狀腺激素含量之增加。同樣地，用FGF-19進行治療增加代謝率且逆轉膳食及瘦素缺乏糖尿病。FGF19投藥改良葡萄糖耐受性且減少血清胰島素、瘦素、膽固醇及甘油三酯。Fu等人(2004) 145:2594-2603。向*ob/ob*小鼠投與重組FGF19，或將FGF19轉殖基因小鼠交叉至*ob/ob*背景上，產生與*ob/ob*小鼠比較，重量較輕且具有較低血清葡萄糖含量及改良葡萄糖敏感性之小鼠。同上，FGF-19亦描述於(例如)Harmer等人(2004) Biochemistry 43:629-640中。

FGFR4表現廣泛分布於且報導於發育中之骨骼肌、肝、肺、胰腺、腎上腺、腎及腦中(Kan等人，(1999) J Biol Chem 274, 15947-15952；Nicholes等人，(2002). Am J Pathol 160, 2295-2307；Ozawa等人，(1996) Brain Res Mol Brain Res 41, 279-288；Stark等人，(1991) Development 113, 641-651)。FGFR4擴增報導於乳腺及卵巢腺癌中(Jaakkola等人，(1993)Int J Cancer 54, 378-382)。FGFR4突變及截斷與惡性疾病相關，且在一些狀況下與前列腺及肺腺癌、頭及頸鱗狀細胞癌、軟組織肉瘤、星形細胞瘤及垂體腺瘤相關(Jaakkola等人，(1993) Int J Cancer 54, 378-382；Morimoto (2003) Cancer 98, 2245-2250；Qian (2004) J Clin Endocrinol Metab 89, 1904-1911；Spinola等人，(2005) J Clin Oncol 23, 7307-7311；Streit等人，(2004) Int J Cancer

111, 213-217 ; Wang, (1994) Mol Cell Biol 14, 181-188 ; Yamada (2002)Neurol Res 24, 244-248)。腫瘤組織中之FGFR4過度表現描述於WO 2007/13693中。

顯然，仍需要具有最佳開發為治療劑之臨床屬性的藥劑。本文中所述之本發明滿足該需要且提供其他利益。

本文中引用之全部參考文獻，包括專利申請案及公開案，均以引用之方式全部併入。

【發明內容】

本文中證明，FGF19需要KLβ以便與FGFR4結合、FGFR4下游信號傳輸及下游基因調節。因此，據展示，KLβ及其與FGFR之相互作用可為在設計抵抗與FGF/FGFR路徑之異常或不良信號傳輸相關之病理性病狀的預防及/或治療性方法中用於較大微調(fine-tuning)之獨特及有利標靶。因此，本發明提供方法、組合物、套組及製品，其用於識別及使用能夠經由調節與FGFR結合之KLβ及調節與FGF結合之KLβ來調節FGF/FGFR路徑的物質，且用於調節與FGF/FGFR信號傳輸相關之生物/生理活性。KLβ作為重要及有利治療標靶存在，且本發明亦提供基於結合KLβ之組合物及方法。如本文中所述之KLβ結合劑提供適用於靶向與KLβ-FGF-FGFR路徑之表現及/或活性相關之病理性病狀的重要治療劑及診斷劑。

在一態樣中，本發明提供與KLβ結合有關之方法、組合物、套組及製品，及KLβ及/或FGF19及/或FGFR4結合之偵測。

在一態樣中，本發明提供適用於調節與KLβ之表現及/或活性，諸如增加之表現及/或活性或不當表現及/或活性相關之疾病病況的方法及組合物，該等方法包含向需要該治療之個體投與有效劑量之KLβ拮抗劑(諸如抗KLβ抗體)。

在一態樣中，本發明提供用於治療腫瘤、癌症或細胞增生性病

症之方法，其包含向需要該治療之個體投與有效量之KLβ拮抗劑(諸如抗KLβ抗體)。在一些實施例中，腫瘤、癌症或細胞增生性病症為肝細胞癌瘤、胰腺癌、非小細胞肺癌、乳癌或結腸直腸癌。

在一態樣中，本發明提供用於殺死細胞(諸如癌或腫瘤細胞)之方法，該等方法包含向需要該治療之個體投與有效量之KLβ拮抗劑(諸如抗KLβ抗體)。在一些實施例中，該細胞為肝細胞癌瘤細胞或胰腺癌細胞。在一些實施例中，該細胞為肝或胰腺細胞。

在一態樣中，本發明提供用於降低、抑制、阻斷或防止腫瘤或癌症之生長之方法，該等方法包含向需要該治療之個體投與有效量之KLβ拮抗劑(諸如抗KLβ抗體)。在一些實施例中，腫瘤、癌症或細胞增生性病症為肝細胞癌瘤、胰腺癌、非小細胞肺癌、乳癌或結腸直腸癌。

在一態樣中，本發明提供用於治療及/或預防肝病症之方法，該等方法包含向需要該治療之個體投與有效量之KLβ拮抗劑(諸如抗KLβ抗體)。在一些實施例中，肝病症為肝硬化。

在一態樣中，本發明提供用於治療消瘦病症之方法，其包含向需要該治療之個體投與有效量之KLβ拮抗劑(諸如抗KLβ抗體)。在一些實施例中，個體患有腫瘤、癌症及/或細胞增生性病症。

在一態樣中，本發明提供用於治療低血糖症之方法，其包含向需要該治療之個體投與有效量之KLβ拮抗劑(諸如抗KLβ抗體)。

在一態樣中，本發明提供用於治療膽汁鬱滯或膽汁酸新陳代謝失調之方法，其包含向需要該治療之個體投與有效量之KLβ拮抗劑(諸如抗KLβ抗體)。

在一態樣中，本發明提供用於治療肥胖或肥胖相關病狀之方法，其包含向需要該治療之個體投與有效劑量之KLβ促效劑。在一些實施例中，肥胖相關病狀為糖尿病、心血管疾病、胰島素抵抗、高血

壓、高膽固醇血症、血栓堵塞疾病(諸如中風)、動脈粥樣硬化、血脂異常(例如高總膽固醇或高甘油三酯含量)、骨關節炎、膽囊疾病、骨關節炎及睡眠呼吸暫停及其他呼吸病症。

在一態樣中，本發明提供誘導胰島素敏感性增加之方法，其包含向需要該治療之個體投與有效劑量之KL β 促效劑。

在一態樣中，本發明提供用於降低總身體質量之方法，其包含向需要該治療之個體投與有效劑量之KL β 促效劑。

在一態樣中，本發明提供用於治療高血糖症之方法，其包含向需要該治療之個體投與有效劑量之KL β 促效劑。

在一態樣中，本發明提供用於降低甘油三酯及游離脂肪酸含量之至少一者之方法，其包含向需要該治療之個體投與有效劑量之KL β 促效劑。

本發明之方法可用以影響任何適合病理狀態。示範性病態描述於本文中。

在一實施例中，在本發明之方法中所靶向之細胞為癌細胞。舉例而言，癌細胞可為選自由肝細胞癌細胞或胰腺癌細胞組成之群之癌細胞。在一實施例中，在本發明之方法中所靶向之細胞為過度增生及/或增生性細胞。在一實施例中，在本發明之方法中所靶向之細胞為發育不良細胞。在另一實施例中，在本發明之方法中所靶向之細胞為轉移性細胞。在一實施例中，所靶向之細胞為硬變肝細胞。

本發明之方法可另外包含額外治療步驟。舉例而言，在一實施例中，方法另外包含將所靶向細胞及/或組織(例如，癌細胞)暴露於輻射治療或化學治療劑之步驟。

KL β 拮抗劑及促效劑在此項技術中已知且一些描述且例證於本文中。在一些實施例中，KL β 拮抗劑為與KL β 結合且中和、阻斷、抑制、廢除、降低或干擾KL β 相關效應之一或多個態樣之分子。

在一些實施例中，KL β 拮抗劑為抗體。在一些實施例中，抗體為單株抗體。在一些實施例中，抗體為多株抗體。在一些實施例中，抗體係選自由以下者組成之群：嵌合抗體、親和力成熟抗體、人類化抗體及人類抗體。在一些實施例中，抗體為抗體片段。在一些實施例中，抗體為Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂或scFv。

在一實施例中，抗體為嵌合抗體，例如，包含來自接合至異源非人類、人類或人類化序列(例如構架及/或恆定域序列)之非人類供體之抗原結合序列的抗體。在一實施例中，非人類供體為小鼠。在一實施例中，抗原結合序列為合成的，例如，藉由突變獲得(例如噬菌體呈現篩選等)。在一實施例中，嵌合抗體具有鼠V區及人類C區。在一實施例中，鼠輕鏈V區與人類 κ 輕鏈融合。在一實施例中，鼠重鏈V區與人類IgG1 C區融合。

適用於本發明之方法之人類化抗體包括在FR中具有胺基酸取代之彼等抗體及在所接合CDR中具有改變之親和力成熟變異體。CDR或FR中之經取代胺基酸不限於供體或受體抗體中存在之彼等胺基酸。在其他實施例中，抗體另外包含Fc區中之胺基酸殘基之改變，其引起改良之效應功能，包括增強之CDC及/或ADCC功能及B細胞殺死。其他抗體包括具有改良穩定性之特定改變之彼等抗體。在其他實施例中，適用抗體包含Fc區中之胺基酸殘基之改變，其引起降低之效應功能，例如降低之CDC及/或ADCC功能及/或降低之B細胞殺死。在一些實施例中，抗體之特徵為降低與天然殺手(NK)細胞上之人類互補因子C1q及/或人類Fc受體的結合(諸如缺少結合)。在一些實施例中，抗體之特徵為降低與人類Fc γ RI、Fc γ RIIA及/或Fc γ RIIIA的結合(諸如缺少結合)。在一些實施例中，抗體屬於IgG類(例如IgG1或IgG4)且包含E233、L234、L235、G236、D265、D270、N297、E318、K320、K322、A327、A330、P331及/或P329(根據EU索引編號)中之至少一種

突變。在一些實施例中，抗體包含突變 L234A/L235A 或 D265A/N297A。

在一態樣中，KL β 拮抗劑為包含本文中提供之抗原結合序列之任何者的抗KL β 多肽，其中抗KL β 多肽特異性結合KL β 。

在一態樣中，KL β 拮抗劑為免疫結合物(可交替地稱為"抗體藥物結合物"或"ADC")，其包含與諸如藥物之藥劑結合之抗KL β 多肽(諸如抗KL β 抗體)。

在一態樣中，KL β 拮抗劑為KL β siRNA。KL β siRNA之實例描述於本文中。

在一些實施例中，KL β 拮抗劑可調節KL β 相關效應之一或多個態樣，包括(但不限於)結合FGFR(例如FGFR4)(視需要連同肝素)，結合FGF(例如FGF19)(視需要連同肝素)，結合FGFR4及FGF19(視需要連同肝素)，促進cFos、Junb及/或Junc之FGF19介導之誘導(活體外或活體內)，促進FGFR4及/或FGF19下游信號傳輸(包括(但不限於)FGFR磷酸化、FRS2磷酸化、ERK1/2磷酸化及Wnt路徑活化)，及/或促進任何生物學上有關之KL β 及/或FGFR及/或FGF之生物學路徑，及/或促進腫瘤、細胞增生性病徵或癌症，及/或促進與KL β 表現及/或活性(諸如增加之KL β 表現及/或活性)相關之病徵。在一些實施例中，拮抗劑結合(諸如特異性結合)KL β 。在一些實施例中，拮抗劑結合KL β 之FGFR(諸如FGFR4)結合區域。在一些實施例中，拮抗劑結合KL β 之FGF(例如FGF19)結合區域。在一些實施例中，拮抗劑活體內及/或活體外降低、抑制及/或阻斷KL β 活性。在一些實施例中，拮抗劑與FGFR4競爭結合(降低及/或阻斷FGFR4結合KL β)。在一些實施例中，拮抗劑與FGF19競爭結合(降低及/或阻斷FGF19結合KL β)。

在另一態樣中，本發明供應組合物，其包含一或多種KL β 拮抗劑(諸如抗KL β 抗體)及載劑。該組合物可另外包含第二藥劑，其中KL β

拮抗劑為第一藥劑。(例如)用於癌症治療之該第二藥劑可為另一KLβ拮抗劑(諸如抗KLβ抗體)、化學治療劑、細胞毒素劑、抗血管生成劑、免疫抑制劑、前藥、細胞激素、細胞激素拮抗劑、細胞毒素放射療法、皮質類固醇、止吐劑、癌症疫苗、止痛劑、抗血管劑或生長抑制劑。在另一實施例中，第二藥劑係以有效量投與個體，其中抗體為第一藥劑。該第二藥劑為一種以上之藥劑，且較佳為另一抗體、化學治療劑、細胞毒素劑、抗血管生成劑、免疫抑制劑、前藥、細胞激素、細胞激素拮抗劑、細胞毒素放射療法、皮質類固醇、止吐劑、癌症疫苗、止痛劑、抗血管劑或生長抑制劑。更特定藥劑包括(例如)伊立替康(irinotecan；CAMPTOSAR®)、西妥昔單抗(cetuximab；ERBITUX®)、氟維司群(fulvestrant；FASLODEX®)、長春瑞濱(vinorelbine；NAVELBINE®)、諸如埃羅替尼(erlotinib；TARCEVA®)之EGF受體拮抗劑、諸如貝伐單抗(bevacizumab；AVASTIN®)之VEGF拮抗劑、長春新鹼(vincristine；ONCOVIN®)、諸如雷帕黴素(rapamycin)及CCI-779之mTor(絲胺酸/蘇胺酸蛋白激酶)之抑制劑，及諸如曲妥珠單抗(trastuzumab；HERCEPTIN®)、帕妥珠單抗(pertuzumab；OMNITARG™)或拉帕替尼(lapatinib)之抗HER1、HER2、ErbB及/或EGFR拮抗劑及包括化學治療劑之其他細胞毒素劑。在一些實施例中，第二藥劑為抗雌激素藥物，諸如他莫西芬(tamoxifen)、氟維司群；或芳香酶抑制劑；血管內皮生長因子(VEGF)或ErbB或ErbB受體或Her-1或Her-2之拮抗劑。在一些實施例中，第二藥劑為他莫西芬、來曲唑(letrozole)、依西美坦(exemestane)、安美達錠(anastrozole)、伊立替康、西妥昔單抗、氟維司群、長春瑞濱、埃羅替尼、貝伐單抗、長春新鹼、伊馬替尼(imatinib)、索拉非尼(sorafenib)、拉帕替尼或曲妥珠單抗，且較佳地，第二藥劑為埃羅替尼、貝伐單抗或曲妥珠單抗。

在一態樣中，本發明提供製品，其包含一容器及含在該容器內之組合物，其中該組合物包含一或多種KL β 拮抗劑(諸如抗KL β 抗體)。在一實施例中，包含KL β 拮抗劑之組合物另外包含載劑，在一些實施例中，該載劑為醫藥學上可接受者。在一實施例中，本發明之製品另外包含將組合物(例如抗KL β 抗體)投與個體之說明書(諸如本文中所述方法之任何者之說明書)。

在一態樣中，本發明提供套組，其包含一包含組合物之第一容器，該組合物包含一或多種抗KL β 拮抗劑；及一包含緩衝液之第二容器。該組合物可另外包含第二藥劑，其中該KL β 拮抗劑為第一藥劑。示範性第二藥劑描述於上文及本文中之其他處。在一實施例中，緩衝液為醫藥學上可接受者。在一實施例中，包含抗體之組合物另外包含載劑，在一些實施例中，該載劑為醫藥學上可接受者。在一實施例中，套組另外包含將組合物(例如抗體)投與個體之說明書。

在另一態樣中，本發明提供用於偵測KL β 之方法，該等方法包含偵測樣本(諸如生物樣本)中之KL β 。如本文中所使用之術語"偵測"包括在參考或不參考對照物之情況下之定性偵測及/或定量偵測(量測含量)。在一些實施例中，生物樣本來自患者，該患者患有或懷疑患有腫瘤、癌症及/或細胞增生性病變，諸如肝細胞癌、胰腺癌、非小細胞肺癌、乳癌或結腸直腸癌。在一些實施例中，生物樣本來自腫瘤。在一些實施例中，生物樣本表現FGF(例如FGF19)及/或FGFR(例如FGFR4)。

在另一態樣中，本發明提供用於偵測與KL β 表現及/或活性相關之病變之方法，該等方法包含偵測來自個體之生物樣本中之KL β 。在一些實施例中，KL β 表現為增加之表現或異常表現。在一些實施例中，病變為腫瘤、癌症及/或細胞增生性病變，諸如肝細胞癌、胰腺癌、非小細胞肺癌、乳癌或結腸直腸癌。在一些實施例中，生物樣

本為血清或為腫瘤之生物樣本。

在另一態樣中，本發明提供用於偵測與FGFR4及KL β 表現及/或活性相關之病症之方法，該等方法包含偵測來自個體之生物樣本中之FGFR4及KL β 。在一些實施例中，KL β 表現為增加之表現或異常表現。在一些實施例中，FGFR4表現為增加之表現或異常表現。在一些實施例中，病症為肝細胞癌、胰腺癌、非小細胞肺癌、乳癌或結腸直腸癌。在一些實施例中，生物樣本為血清或為腫瘤之生物樣本。在一些實施例中，FGFR4之表現在第一生物樣本中偵測，且KL β 之表現在第二生物樣本中偵測。

在另一態樣中，本發明提供用於偵測與FGF19及KL β 表現及/或活性相關之病症之方法，該等方法包含偵測來自個體之生物樣本中之FGF19及KL β 。在一些實施例中，KL β 表現為增加之表現或異常表現。在一些實施例中，FGF19表現為增加之表現或異常表現。在一些實施例中，病症為腫瘤、癌症及/或細胞增生性病症，諸如肝細胞癌、胰腺癌、非小細胞肺癌、乳癌或結腸直腸癌。在一些實施例中，生物樣本為血清或為腫瘤之生物樣本。在一些實施例中，FGF19之表現在第一生物樣本中偵測，且KL β 之表現在第二生物樣本中偵測。

在另一態樣中，本發明提供用於偵測與FGFR4、FGF19及KL β 表現及/或活性相關之病症之方法，該等方法包含偵測來自個體之生物樣本中之FGFR4、FGF19及KL β 。在一些實施例中，KL β 表現為增加之表現或異常表現。在一些實施例中，FGFR4表現為增加之表現或異常表現。在一些實施例中，病症為腫瘤、癌症及/或細胞增生性病症，諸如肝細胞癌、胰腺癌、非小細胞肺癌、乳癌或結腸直腸癌。在一些實施例中，生物樣本為血清或來自腫瘤。在一些實施例中，FGFR4之表現在第一生物樣本中偵測，FGF19之表現在第二生物樣本中偵測，且KL β 之表現在第三生物樣本中偵測。

在另一態樣中，本發明提供藉由投與有效量之KLβ拮抗劑(例如抗KLβ抗體)來治療患有或懷疑患有癌症、腫瘤及/或細胞增生性病變或肝病變(諸如肝硬化)之個體之方法，其中癌症、腫瘤及/或細胞病變或肝病變之生物樣本表現(i) KLβ，(ii) KLβ及FGFR4，(iii) KLβ及FGF19，或(iv) KLβ、FGFR4及FGF19。在一些實施例中，癌症、腫瘤及/或細胞增生性病變或肝病變為肝細胞癌、胰腺癌、非小細胞肺癌、乳癌及/或結腸直腸癌。

在另一態樣中，本發明提供藉由投與有效量之FGF19拮抗劑(例如抗FGF19抗體)來治療患有或懷疑患有癌症、腫瘤及/或細胞增生性病變或肝病變(諸如肝硬化)之個體之方法，其中癌症、腫瘤及/或細胞病變或肝病變之生物樣本表現(i) KLβ，(ii) KLβ及FGFR4，(iii) KLβ及FGF19，或(iv) KLβ、FGFR4及FGF19。在一些實施例中，癌症、腫瘤及/或細胞增生性病變或肝病變為肝細胞癌、胰腺癌、非小細胞肺癌、乳癌及/或結腸直腸癌。

在另一態樣中，本發明提供藉由投與有效量之FGFR4拮抗劑(例如抗FGFR4抗體)來治療患有或懷疑患有癌症、腫瘤及/或細胞增生性病變或肝病變(諸如肝硬化)之個體之方法，其中癌症、腫瘤及/或細胞病變或肝病變之生物樣本表現(i) KLβ，(ii) KLβ及FGFR4，(iii) KLβ及FGF19，或(iv) KLβ、FGFR4及FGF19。在一些實施例中，癌症、腫瘤及/或細胞增生性病變或肝病變為肝細胞癌、胰腺癌、非小細胞肺癌、乳癌及/或結腸直腸癌。

在另一態樣中，本發明提供用於選擇對於個體之治療之方法，該等方法包含：(a)測定在個體之生物樣本中之(若存在)(i) KLβ表現，(ii) KLβ及FGF19表現，(iii) KLβ及FGFR4表現，或(iv) KLβ、FGF19及FGFR4表現；及(b)步驟(a)之後，選擇對於個體之治療，其中治療之選擇係基於步驟(a)中測定之表現。在一些實施例中，測定個體之

生物樣本中KL β 表現相對於參考值或對照樣本之增加。在一些實施例中，在個體中測定個體之生物樣本中KL β 表現相對於參考值或對照樣本之降低。在一些實施例中，測定KL β 表現且選擇用抗KL β 抗體之治療。在一些實施例中，測定KL β 表現且選擇用FGF19拮抗劑(諸如抗FGF19抗體)之治療。在一些實施例中，測定KL β 表現且選擇用FRFR4拮抗劑(諸如抗FGFR4抗體)之治療。FGFR4拮抗劑在此項技術中已知。在一些實施例中，個體患有腫瘤、癌症及/或細胞增生性病變，諸如肝細胞癌、胰腺癌、非小細胞肺癌、乳癌或結腸直腸癌。

在另一態樣中，本發明提供藉由投與有效量之抗KL β 抗體來治療患有或懷疑患有癌症、腫瘤及/或細胞增生性病變或肝病變(諸如肝硬化)之個體之方法，另外其中在投與抗KL β 抗體之前、期間或之後，測定個體之生物樣本中之(i) KL β 表現，(ii) KL β 及FGF19表現，(iii) KL β 及FGFR4表現，或(iv) KL β 、FGF19及FGFR4表現。在一些實施例中，生物樣本為癌症、腫瘤及/或細胞增生性病變之生物樣本。在一些實施例中，生物樣本為血清。在一些實施例中，在投與抗KL β 抗體之前、期間及/或之後，測定KL β 過度表現。在一些實施例中，在投與抗KL β 抗體之前、期間及/或之後，測定FGFR4表現。表現可在投與抗KL β 抗體之前；期間；之後；之前及期間；之前及之後；期間及之後；或之前、期間及之後測定。

在另一態樣中，本發明提供藉由投與有效量之抗FGF19抗體來治療患有或懷疑患有癌症、腫瘤及/或細胞增生性病變或肝病變(諸如肝硬化)之個體之方法，另外其中在投與抗FGF19抗體之前、期間或之後，測定個體之生物樣本中之(i) KL β 表現，(ii) KL β 及FGF19表現，(iii) KL β 及FGFR4表現，或(iv) KL β 、FGF19及FGFR4表現。在一些實施例中，生物樣本為癌症、腫瘤及/或細胞增生性病變之生物樣本。在一些實施例中，生物樣本為血清。在一些實施例中，在投與抗

FGF19抗體之前、期間及/或之後，測定KL β 過度表現。在一些實施例中，在投與抗FGF19抗體之前、期間及/或之後，測定FGFR4表現。表現可在投與抗FGF19抗體之前；期間；之後；之前及期間；之前及之後；期間及之後；或之前、期間及之後測定。抗FGF19抗體及包含使用抗FGF19抗體之治療方法描述於共同所有之同在申請中之美國專利申請案第11/673,411號(2007年2月9日申請)中，該申請案之內容在此以引用之方式併入。

在涉及偵測之實施例中，除偵測FGFR4表現外或作為偵測FGFR4表現之替代者，可偵測FGFR4下游分子信號傳輸之表現。在一些實施例中，FGFR4下游分子信號傳輸之偵測包含MAPK、FRS2或ERK1/2(或ERK1及/或ERK2)之磷酸化偵測之一或多者。

在一些涉及偵測之實施例中，FGFR4之表現包含偵測FGFR4基因缺失、基因擴增及/或基因突變。在一些涉及偵測之實施例中，KL β 之表現包含偵測KL β 基因缺失、基因擴增及/或基因突變。在一些涉及偵測之實施例中，FGF19之表現包含偵測FGF19基因缺失、基因擴增及/或基因突變。

一些涉及偵測之實施例另外包含偵測Wnt路徑活化。在一些實施例中，Wnt路徑活化之偵測包含 β -索脛素之酪胺酸磷酸化、Wnt標靶基因之表現、 β -索脛素突變及與 β -索脛素結合之E-鈣黏素之一或多者。Wnt路徑活化之偵測在此項技術中已知，且一些實例描述及例證於本文中。

生物樣本描述於本文中，例如描述於生物樣本之定義中。在一些實施例中，生物樣本為血清或為腫瘤之生物樣本。

在涉及KL β 及/或FGFR4及/或FGF19表現之偵測之實施例中，可偵測KL β 及/或FGFR4及/或FGF19聚核苷酸表現及/或KL β 及/或FGFR4及/或FGF19多肽表現。在一些涉及KL β 及/或FGFR4及/或FGF19表現

之偵測之實施例中，偵測KL β 及/或FGFR4及/或FGF19 mRNA表現。在其他實施例中，使用抗KL β 劑及/或抗FGFR4劑偵測KL β 及/或FGFR4及/或FGF19多肽表現。在一些實施例中，使用抗體偵測KL β 及/或FGFR4及/或FGF19多肽表現。任何適合抗體均可用於偵測及/或診斷，包括單株及/或多株抗體、人類抗體、嵌合抗體、親和力成熟抗體、人類化抗體及/或抗體片段。在一些實施例中，本文中所述之抗KL β 抗體用於偵測。在一些實施例中，使用免疫組織化學(IHC)偵測KL β 及/或FGFR4及/或FGF19多肽表現。在一些實施例中，使用IHC將多肽表現計分為2或以上。

在一些涉及KL β 及/或FGFR4及/或FGF19表現之偵測之實施例中，可偵測KL β 及/或FGFR4及/或FGF19表現之存在及/或不存在及/或含量。可增加KL β 及/或FGFR4及/或FGF19表現。應瞭解，缺少KL β 及/或FGFR4及/或FGF19表現包括不顯著或最低限度。在一些實施例中，測試生物樣本中之標靶表現比對對照生物樣本所觀察者(或表現之對照或參考量)高。在一些實施例中，測試生物樣本中之標靶表現比對對照生物樣本中之標靶表現高至少約2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、75倍、100倍、150倍或以上。在一些實施例中，在免疫組織化學("IHC")檢定中測定標靶多肽表現，以對染色強度計分為至少2或以上。在一些實施例中，在IHC檢定中測定標靶多肽表現，以對染色強度計分為至少1或以上，或至少3或以上。在一些實施例中，測試生物樣本中之標靶表現比對對照生物樣本所觀察者(或對照表現量)低。

在一態樣中，本發明提供識別抑制KL β 與FGFR(例如FGFR4)結合之候選抑制劑物質的方法，該方法包含：(a)使候選物質與包含FGFR、FGF(例如FGF19)及KL β 之第一樣本接觸，及(b)比較該樣本中之FGFR生物活性之量與參考樣本中之FGFR生物活性之量，該參考樣

本包含與第一樣本相似之量之KL β 、FGF及FGFR，但其還未與該候選物質接觸，藉以，與參考樣本比較，第一樣本中之FGFR生物活性的量降低指示候選物質能夠抑制KL β 與FGFR結合。

在另一態樣中，本發明提供識別抑制KL β 與FGFR(例如FGFR4)結合之候選抑制劑物質的方法，該方法包含：(a)使候選物質與包含FGFR、FGF及KL β 之第一樣本接觸，及(b)比較該樣本中之FGFR-KL β 複合物之量與參考樣本中之FGFR-KL β 複合物之量，該參考樣本包含與第一樣本相似之量之KL β 、FGF及FGFR，但其還未與該候選物質接觸，藉以，與參考樣本比較，第一樣本中之FGFR-KL β 複合物的量降低指示候選物質能夠抑制KL β 與FGFR結合。

在另一態樣中，本發明提供測定候選物質是否抑制KL β 與FGFR(例如FGFR4)結合之方法，該方法包含：(a)使候選物質與包含FGFR、FGF及KL β 之第一樣本接觸，及(b)比較該樣本中之FGFR生物活性之量與參考樣本中之FGFR生物活性之量，該參考樣本包含與第一樣本相似之量之KL β 、FGF及FGFR，但其還未與該候選物質接觸，藉以，與參考樣本比較，第一樣本中之FGFR生物活性的量降低指示候選物質能夠抑制KL β 與FGFR結合。

在另一態樣中，本發明提供測定候選物質是否抑制FGF與KL β 結合之方法，該方法包含：(a)使候選物質與包含FGF、FGFR及KL β 之第一樣本接觸，及(b)比較該樣本中之FGFR生物活性之量與參考樣本中之FGFR生物活性之量，該參考樣本包含與第一樣本相似之量之FGF、FGFR及KL β ，但其還未與該候選物質接觸，藉以，與參考樣本比較，第一樣本中之FGFR生物活性的量降低指示候選物質能夠抑制KL β 。

在另一態樣中，本發明提供測定候選物質是否促進KL β 生物活性之方法，該方法包含：(a)使候選物質與包含FGFR及KL β 之第一樣本

接觸，及(b)比較該樣本中之FGFR生物活性之量與參考樣本中之FGFR生物活性之量，該參考樣本包含與第一樣本相似之量之KLβ及FGFR，但其還未與該候選物質接觸，藉以，與參考樣本比較，第一樣本中之FGFR生物活性的量增加指示候選物質能夠促進KLβ與FGFR結合。

FGFR生物活性描述於本文中。在一些實施例中，FGFR、FGF、KLβ係呈對於FGFR生物活性有效之量。

【圖式簡單說明】

圖1：KLβ與FGF19、FGFR4及肝素形成複合物。(A)在4°C下，在KLβΔTM改良性培養基中，將FGF19(0.5 μg)、肝素(0.5 μg)及不同FGFR-Fc融合蛋白質(0.5 μg)培養18小時。藉由蛋白質A-瓊脂糖沈澱及免疫墨點分析測定蛋白質相互作用。(B)在4°C下，在存在或不存在FGF19(0.5 μg)、肝素(0.5 μg)或FGFR4-Fc融合蛋白質(0.5 μg)之情況下，將KLβΔTM改良性培養基或對照改良性培養基培養18小時。藉由蛋白質A-瓊脂糖沈澱及免疫墨點分析測定蛋白質相互作用。(C)及(D)在存在或不存在肝素及FGF19之情況下，培養來自經空白表現載體(對照載體)、FGFR4表現載體、KLβ-Flag表現載體或FGFR4表現載體與KLβ-Flag表現載體之組合轉染之HEK293細胞的溶胞物。藉由FGFR4(C)及KLβ-Flag(D)免疫沈澱及免疫墨點分析蛋白質相互作用。(E)藉由免疫沈澱及免疫墨點分析HEPG2細胞溶胞物中之FGFR4-KLβ相互作用。

圖2：KLβ為FGF19信號傳輸所需。使用經空白表現載體(對照載體)(A)、KLβ表現載體(B)、FGFR4表現載體(C)或FGFR4表現載體與KLβ表現載體之組合(D)轉染之HEK293細胞分析KLβ對FGF19信號傳輸之效應。用媒劑(PBS)或FGF19(0-500 ng/mL)將經轉染之細胞培養10分鐘，使其溶解，且藉由免疫墨點分析FRS2及ERK1/2磷酸化。

圖3：KLβ為基因表現之FGF19下游調節所需。(A)FGF19抑制KLβ表現。用FGF19(100 ng/mL；0-24小時)培養細胞株，且藉由RT-PCR分析KLβ表現量。在0時刻，將所有值與HEP3B細胞中之KLβ表現量相比較。分析各條件下之三組數據。數據呈現為平均值± SEM。(B-D)FGF19促進c-Fos、JunB及c-Jun之表現。用FGF19(100 ng/mL；0-24小時)培養細胞株且藉由RT-PCR分析c-Fos表現(B)、JunB表現(C)及c-Jun表現(D)。值表示特定基因之表現與其暴露於FGF19之前之表現相比較的相對增加倍數。(E)KLβ siRNA轉染抑制KLβ合成。藉由免疫墨點分析經4種不同KLβ siRNA之各者轉染之HEP3B細胞的KLβ表現。(F)藉由KLβ siRNA轉染抑制KLβ表現抑制FGF19信號傳輸。用媒劑(PBS)或FGF19(100 ng/mL)將經4種不同KLβ siRNA之各者轉染之HEP3B細胞培養10分鐘，且藉由免疫墨點分析FRS2及ERK1/2磷酸化。(G)藉由KLβ siRNA轉染抑制KLβ表現抑制FGF19介導之c-Fos誘導。用FGF19(100 ng/mL)將經4種不同KLβ siRNA之各者轉染之HEP3B細胞培養90分鐘，且藉由RT-PCR分析KLβ及c-Fos表現量。值表示各特定基因與經對照siRNA轉染之細胞之彼者比較的相對表現。(H)用PBS或FGF19(100 ng/mL)將經空白表現載體(對照載體)、KLβ表現載體、FGFR4表現載體或FGFR4表現載體與KLβ表現載體之組合轉染之HEK293細胞培養90分鐘；藉由RT-PCR分析c-Fos表現。值表示與細胞暴露於FGF19之前之表現量比較的c-Fos表現之增加倍數。

圖4：KLβ及FGFR4分布決定FGF19組織特異性活性。人類組織中之KLβ及FGFR4分布。如藉由BioExpress資料庫之mRNA分析所測定，展示人類組織中之KLβ表現(A)及FGFR4表現(B)的盒鬚圖(Whisker-box plot)。中心線指示中值；盒表示第一與第三四分位數之間的四分位數間距範圍。鬚線(whisker)自四分位距延伸至極值位置。藉由RT-PCR測定一組小鼠組織中之KLβ表現(C)及FGFR4表現(D)。各

器官之值表示平均表現(n=3隻小鼠)相對於腦組織中所觀察到之表現量之倍數。(E)在用PBS或FGF19(1 mg/kg)注射小鼠(n=3)後30分鐘，藉由分析各種器官組織中之c-Fos表現測定FGF19之活體內組織特異性。值表示與經PBS注射之小鼠中的表現量比較，經FGF19注射之小鼠中之c-Fos表現。(F)經FGF19(1 mg/kg)或PBS注射後30分鐘，小鼠肝中之CYP7A1表現。值表示與經PBS注射之小鼠中的所見之表現比較，經FGF19注射之小鼠中之CYP7A1表現。分析各條件下之三組數據。數據呈現為平均值± SEM。

圖5：KLβ為HEPG2細胞中之基因表現之FGF19下游調節所需。

(A)KLβ siRNA轉染抑制KLβ合成。藉由免疫墨點分析用4種不同KLβ siRNA之各者轉染之HEPG2細胞中的KLβ表現。(B)KLβ siRNA轉染抑制FGF19信號傳輸。用PBS或FGF19(100 ng/mL)將經4種不同KLβ siRNA之各者轉染之HEPG2細胞培養10分鐘，使其溶解，且藉由免疫墨點分析FRS2磷酸化程度。(C)KLβ siRNA轉染抑制FGF19介導之c-Fos誘導。用FGF19(100 ng/mL)將經4種不同KLβ siRNA之各者轉染之HEPG2細胞培養90分鐘，且藉由RT-PCR分析KLβ及c-Fos表現。值表示各基因與其在對照siRNA轉染細胞中之表現比較表現。

圖6：用抗KLβ抗體之治療抑制FGF19介導之c-Fos誘導。用對照抗體或針對小鼠KLβ產生但與人類KLβ交叉反應之多株抗KLβ抗體(10 μg/ml)治療HEPG2細胞。藉由RT-PCR量測FGF19刺激之c-Fos誘導。抗KLβ抗體治療抑制FGF19介導之c-Fos誘導，而對照抗體不具有任何顯著效應。

圖7：KLβ活性位點突變抑制FGF19路徑活化。HEK293細胞未經轉染或經KLβ E416A(活性位點)或KLβ E693A(非活性位點)突變體轉染。藉由磷酸化FRS2及磷酸化ERK1/2免疫偵測評估FGF19刺激活性。FGF19治療(100 ng/ml；10 min)引起野生型(wt)KLβ轉染之細胞中

之磷酸化FRS2及磷酸化ERK1/2信號增加，而該等信號在未經轉染之細胞中不可偵測。KLβ E693A突變轉染之細胞中之FRS2及ERK1/2磷酸化可與野生型KLβ轉染之細胞中之FRS2及ERK1/2磷酸化相當。KLβ E416A轉染之細胞中之FGF19刺激與野生型KLβ轉染之細胞中之FGF19刺激比較大大降低。該等發現確證藉由KLβ增強FGF19信號傳輸，且另外暗示對於FGF19信號傳輸需要KLβ酶促活性。

圖8：KLβ抗體治療抑制小鼠肝中之FGF19依賴性c-Fos誘導。在用KLβ抗體(2.2 mg/kg)治療0、3、9或24小時之小鼠肝中量測FGF19依賴性c-Fos誘導。在FGF19注射(1 mg/kg)之前歷時3、9或24小時之抗KLβ抗體治療分別將肝特異性FGF19介導之c-Fos誘導降低58%、68%及91%。

圖9：測定腫瘤組織中KLβ mRNA之表現。

圖10：測定腫瘤組織中FGFR4 mRNA之表現。

圖11：描述示範性KLβ核酸序列(SEQ ID NO:1)。

圖12：描述示範性KLβ胺基酸序列(SEQ ID NO:2)。

【實施方式】

在一態樣中，本發明提供基於結合KLβ之組合物及方法。如本文中所述之KLβ結合劑提供適用於靶向與KLβ-FGF19-FGFR4路徑之表現及/或活性相關之病理性病狀的重要治療及診斷劑。因此，本發明提供與KLβ結合有關之方法、組合物、套組及製品。在另一態樣中，本發明提供基於偵測FGF(諸如FGF19)及/或FGFR(諸如FGFR4)之KLβ之方法。

通用技術

由熟習此項技術者使用諸如以下文獻中所述之廣泛利用方法之習知方法，通常可充分理解且普遍使用本文中所述或所參考之技術及程序：Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第3

版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(F. M. Ausubel 等人編, (2003)); 系列 METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH(M. J. MacPherson, B. D. Hames及G. R. Taylor編(1995)), Harlow及Lane編(1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, 及ANIMAL CELL CULTURE(R. I. Freshney編(1987))。

定義

"經分離"抗體為已經識別且與其天然環境之組分分離及/或自其回收之抗體。其天然環境之污染組分為將干擾抗體之診斷或治療用途之物質，且可包括酶、激素及其他蛋白質或非蛋白質溶質。在較佳實施例中，抗體(1)如藉由Lowry方法所測定，純化至大於95重量%之抗體，且最佳超過99重量%，(2)純化至足以藉由使用旋杯式序列測定儀獲得至少15個殘基之N-末端或內部胺基酸序列的程度，或(3)使用考馬斯藍(Coomassie blue)或較佳銀染劑，在還原條件或非還原條件下，藉由SDS-PAGE純化達到均質。因為抗體天然環境之至少一種組分將不存在，所以經分離抗體包括原位處於重組細胞內之抗體。然而，通常，經分離抗體將藉由至少一個純化步驟製備。

"經分離"核酸分子為經識別且與至少一種污染核酸分子分離之核酸分子，其在該抗體核酸之天然來源中通常與該污染核酸分子相關。經分離核酸分子不同於天然所見之形式或組。經分離核酸分子因此不同於存在於天然細胞中時之核酸分子。然而，經分離核酸分子包括通常表現抗體之細胞中所含之核酸分子，其中(例如)核酸分子在染色體位置方面不同於天然細胞。

術語"按Kabat中編號之可變域殘基"或"按Kabat中編號之胺基酸位置"及其變化形式係指Kabat等人，Sequences of Proteins of

Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)中用於抗體編輯之重鏈可變域或輕鏈可變域之編號系統。使用該編號系統，實際直鏈胺基酸序列可含有與可變域之FR或CDR之縮短或插入相應之少數或額外胺基酸。舉例而言，重鏈可變域可包括H2之殘基52後之單一胺基酸插入物(根據Kabat之殘基52a)及重鏈FR殘基82後之插入殘基(例如，根據Kabat之殘基82a、82b及82c等等)。可藉由在抗體序列具有同源性之區域處，與"標準"Kabat編號序列對準，確定給定抗體之殘基之Kabat編號。

如本文中所用，短語"大體上相似"或"大體上相同"表示，兩個數值之間具有足夠高程度的相似性(一般而言，一數值與抗體相關，而另一數值與參考/比較抗體相關)，以便在藉由該等值(例如Kd值)所量測之生物學特徵之情況下，熟習此項技術者將2個值之間的差異視為幾乎沒有生物學及/或統計學顯著性。該2個值之間的差異作為參考/比較抗體之值的函數較佳小於約50%、較佳小於約40%、較佳小於約30%、較佳小於約20%、較佳小於約10%。

"結合親和力"通常係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間的非共價相互作用之總強度。除非另外指示，否則如本文所使用之"結合親和力"係指固有結合親和力，其反映結合對(例如抗體與抗原)之成員之間的1:1相互作用。分子X對其搭配物Y之親和力通常可藉由解離常數(Kd)表示。可藉由此項技術中已知之常用方法，包括本文所述之彼等方法來量測親和力。低親和力抗體通常緩慢結合抗原且易趨向於解離，而高親和力抗體通常較快結合抗原且趨向於保持結合較長時間。量測結合親和力之各種方法在此項技術中已知，其任何方法可用於本發明之目的。特定說明性實施例描述於下文。

在一實施例中，根據本發明之" K_d "或" K_d 值"係藉由放射性標記抗原結合檢定(RIA)量測，該檢定用所關注之抗體之Fab版本及其抗原來執行，其如藉由以下檢定所述：藉由在一系列用於滴定之非標記抗原存在下，用最低濃度之(^{125}I)-標記抗原平衡Fab，隨後以抗Fab抗體塗佈之板俘獲結合抗原來量測Fab對抗原之溶解結合親和力(Chen, 等人, (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881)。為建立檢定條件，將微量滴定板(Dynex)以於50 mM碳酸鈉(pH 9.6)中之5 $\mu\text{g/ml}$ 俘獲抗Fab抗體(Cappel Labs)塗佈隔夜，且隨後在室溫下(大致23°C)以於PBS中之2%(w/v)牛血清白蛋白阻斷2至5小時。在無吸附劑板(Nunc #269620)中，將100 pM或26 pM [^{125}I]-抗原與所關注之Fab之連續稀釋液混合(例如，與Presta等人, (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599中抗VEGF抗體，Fab-12評估一致)。隨後培養所關注之Fab隔夜；然而，培養可持續更長時期(例如65小時)以確保達到平衡。此後，在室溫下將混合物轉移至俘獲板中以用於培養(例如歷時1小時)。隨後移除溶液且用於PBS中之0.1% Tween-20將板洗滌8次。當已將板乾燥時，添加150微升/孔之閃爍體(MicroScint-20；Packard)，且在Topcount伽瑪計數儀(Packard)上將板計數10分鐘。選擇得到小於或等於20%最大結合之各Fab濃度用於競爭性結合檢定。根據另一實施例，在25°C，藉由使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)，使用表面電漿共振檢定，用約10個響應單位(RU)之固定抗原CM5晶片量測 K_d 或 K_d 值。簡言之，根據供應商之說明書，用N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基琥珀醯亞胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物感應器晶片(CM5, BIAcore Inc)。將抗原以10 mM乙酸鈉(pH 4.8)稀釋至5 $\mu\text{g/ml}$ (約0.2 μM)，之後以5微升/分鐘之流動速率注射，以達到大致10個響應單位(RU)之偶合蛋白質。注射抗原後，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應之基團。就動力學量測而言，在

25°C 下，以大致 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流動速率，注射 Fab 於具有 0.05% Tween 20 之 PBS(PBST) 中之 2 倍連續稀釋液 (0.78 nM 至 500 nM)。使用簡單一對一朗繆爾 (Langmuir) 結合模型 (BIAcore 評估軟體 3.2 版)，藉由同時擬合締合及解離感應圖來計算締合速率 (k_{on}) 及解離速率 (k_{off})。平衡解離常數 (K_d) 計算為比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 。參見例如 Chen, Y. 等人，(1999) J. Mol Biol 293:865-881。若據上文之表面電漿共振檢定，締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ，則締合速率可藉由使用螢光淬滅技術來測定，該技術在 25°C 下，在如於諸如具有攪拌式紅色比色管之止流裝備光譜儀 (Aviv Instruments) 或 8000 系列 SLM-Aminco 光譜儀 (ThermoSpectronic) 的光譜儀中所量測之濃度增加之抗原存在下，量測於 PBS (pH 7.2) 中之 20 nM 抗-抗原抗體 (Fab 形式) 之螢光發射強度 (激發 = 295 nm；發射 = 340 nm，16 nm 帶通) 之增加或降低。

根據本發明之 "締合速率" 或 " k_{on} " 亦可在 25°C 下，用上文所述之相同表面電漿共振技術，使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)，用約 10 個響應單位 (RU) 之固定抗原 CM5 晶片來測定。簡言之，根據供應商之說明書，用 N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基) 碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDC) 及 N-羥基琥珀醯亞胺 (NHS) 活化羧甲基化葡聚糖生物感應器晶片 (CM5, BIAcore Inc.)。將抗原以 10 mM 乙酸鈉 (pH 4.8) 稀釋至 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (約 0.2 μM)，之後以 5 微升/分鐘之流動速率注射，以達到大致 10 個響應單位 (RU) 之偶合蛋白質。注射抗原後，注射 1 M 乙醇胺以阻斷未反應之基團。就動力學量測而言，在 25°C 下，以大致 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流動速率，注射 Fab 於具有 0.05% Tween 20 之 PBS(PBST) 中之 2 倍連續稀釋液 (0.78 nM 至 500 nM)。使用簡單一對一朗繆爾結合模型 (BIAcore 評估軟體 3.2 版)，藉由同時擬合締合及解離感應圖來計算締合速率 (k_{on}) 及解離速率 (k_{off})。平衡解離常數 (K_d) 計算為比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 。參見例如 Chen, Y. 等人，(1999) J. Mol Biol

293:865-881。然而，若據上文之表面電漿共振檢定，締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ，則締合速率較佳藉由使用螢光淬滅技術來測定，該技術在 25°C 下，在如於諸如具有攪拌式比色管之止流裝備光譜儀(Aviv Instruments)或8000系列SLM-Aminco光譜儀(ThermoSpectronic)之光譜儀中所量測之濃度增加之抗原存在下，量測於PBS(pH 7.2)中之20 nM 抗-抗原抗體(Fab形式)之螢光發射強度(激發 = 295 nm；發射 = 340 nm，16 nm帶通)之增加或降低。

如本文中所使用，術語"載體"欲指核酸分子，其能夠輸送已與其連接之另一核酸。一類型之載體為"質體"，其係指額外DNA片段可連接至其之環狀雙鏈DNA環。另一類型之載體為噬菌體載體。另一類型之載體為病毒載體，其中額外DNA區段可連接至病毒基因組中。某些載體能夠在引入該等載體之宿主細胞中自發複製(例如，具有細菌複製起點之細菌載體及游離基因哺乳動物載體)。其他載體(例如非游離基因哺乳動物載體)可在引入宿主細胞中之後整合至宿主細胞之基因組中，且進而連同宿主基因組一起複製。此外，某些載體能夠引導與其可操作地連接之基因之表現。該等載體在本文中稱為"重組表現載體"(或簡稱"重組載體")。一般而言，用於重組DNA技術中之表現載體常常呈質體形式。在本說明書中，"質體"及"載體"可交替使用，因為質體為載體之最常用形式。

如本文中可交替使用之"聚核苷酸"或"核酸"係指任何長度之核苷酸之聚合物，且包括DNA及RNA。核苷酸可為脫氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾核苷酸或鹼基及/或其類似物，或可藉由DNA或RNA聚合酶或藉由合成反應而併入聚合物中之任何受質。聚核苷酸可包含經修飾核苷酸，諸如甲基化核苷酸及其類似物。若存在，則可在裝配聚合物之前或之後對核苷酸結構進行修飾。核苷酸之序列可藉由非核苷酸組分中斷。可在合成後，諸如藉由與標記結合進一步修飾聚核苷

酸。其他類型之修飾包括(例如)："帽子"，天然存在核苷酸之一或更多者經類似物取代；核苷酸間修飾，諸如具有不帶電鍵之彼等物(例如磷酸甲酯、磷酸三酯、胺基磷酸酯、胺基甲酸酯等)及具有帶電鍵之彼等物(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)，含有懸垂部分之彼等物，諸如蛋白質(例如核酸酶、毒素、抗體、信號肽、ply-L-離胺酸等)，具有嵌入劑之彼等物(例如吡啶(acridine)、補骨脂素(psoralen)等)，含有螯合劑之彼等物(例如金屬、放射性金屬、硼、氧化性金屬等)、含有烷化劑之彼等物、具有經修飾鍵之彼等物(例如 α -變旋異構核酸等)，以及聚核苷酸之未經修飾形式。另外，通常存在於糖中之任何羥基均可(例如)經磷酸酯基、磷酸酯基置換，經標準保護基團保護或經活化以製備與額外核苷酸之額外鍵聯；或可與固體或半固體支撐物結合。5'及3'末端OH可經磷酸化或經胺或具有1至20個碳原子之有機封端基團部分取代。其他羥基亦可衍生成標準保護基。聚核苷酸亦可含有此項技術中通常已知之核糖或脫氧核糖之類似形式，包括(例如)2'-O-甲基-核糖、2'-O-烯丙基-核糖、2'-氟-核糖或2'-疊氮基-核糖；碳環糖類似物； α -變旋異構糖；差向異構糖，諸如阿拉伯糖、木糖或來蘇糖；呋喃糖；呋喃糖；景天庚酮糖(sedoheptulose)；非環狀類似物及諸如甲基核糖苷之鹼性核苷類似物。一或多個磷酸二酯鍵可經替代鍵聯基置換。該等替代鍵聯基團包括(但不限於)以下實施例，其中磷酸酯基經P(O)S("硫代酸酯基")、P(S)S("二硫代酸酯基")、(O)NR₂("醯胺酸酯基")、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂("甲縮醛基")置換，其中各R或R'獨立地為H或視需要含有醚鍵(-O-)、芳基、烯基、環烷基、環烯基或芳烷基(araldyl)之經取代或未經取代的烷基(1-20 C)。聚核苷酸中之所有鍵聯無需相同。上文描述適用於本文中所提及之所有聚核苷酸，包括RNA及DNA。

如本文中所使用，"寡核苷酸"通常係指短的、一般單鏈、一般合

成的聚核苷酸，其長度通常(但未必)小於約200個核苷酸。術語"寡核苷酸"及"聚核苷酸"不互相排斥。上文對聚核苷酸之描述同樣且完全適用於寡核苷酸。

如本文中所使用，除非另外特定或自上下文指示，否則術語"克羅梭beta"(可交替稱為"KL β "或"Beta克羅梭"或" β 克羅梭")係指任何天然或變異(無論天然還是合成)KL β 多肽。術語"天然序列"特定涵蓋天然存在之截斷或分泌形式(例如細胞外域序列)、天然存在變異體形式(例如，替代性剪接形式)及天然存在之對偶基因變異體。術語"野生型KL β "通常係指包含天然存在KL β 蛋白質之胺基酸序列之多肽。術語"野生型KL β 序列"通常係指見於天然存在KL β 中之胺基酸序列。

如本文中所使用之術語"FGF19"(可交替稱為"纖維母細胞生長因子19")，除非另外特定或自上下文指示，否則係指任何天然或變異(無論天然還是合成)KL β 多肽。術語"天然序列"特定涵蓋天然存在之截斷或分泌形式(例如細胞外域序列)、天然存在變異體形式(例如，替代性剪接形式)及天然存在之對偶基因變異體。術語"野生型KL β "通常係指包含天然存在KL β 蛋白質之胺基酸序列之多肽。術語"野生型KL β 序列"通常係指見於天然存在KL β 中之胺基酸序列。

"FGF19拮抗劑"係指能夠中和、阻斷、抑制、廢除、降低或干擾FGF19活性之分子，包括(例如)結合KL β (視需要連同肝素)，結合FGFR4(視需要連同肝素)，結合KL β 及FGFR4(視需要連同肝素)，促進cFos、Junb及/或Junc之FGF19介導之誘導(活體外或活體內)，促進FGFR4及/或FGF19下游信號傳輸(包括(但不限於)FRS2磷酸化、ERK1/2磷酸化及Wnt路徑活化)，及/或促進任何生物學有關FGF19及/或FGFR4生物學路徑，及/或促進腫瘤、細胞增生性病徵或癌症，及/或促進與FGF19表現及/或活性(諸如增加之FGF19表現及/或活性)相關之病徵。FGF19拮抗劑包括抗體及其抗原結合片段、蛋白質、肽、醣

蛋白、糖肽、糖脂、多醣、寡醣、核酸、生物有機分子、肽模擬物、藥理學藥劑及其代謝物、轉錄及轉譯控制序列及其類似物。拮抗劑亦包括蛋白質及融合蛋白質、受體分子及特異性結合蛋白質進而將其結合物隱變為其標靶之衍生物的小分子抑制劑，蛋白質、針對蛋白質之 siRNA 分子、針對蛋白質之反義分子、RNA 適體及對於蛋白質之核糖核酸酶的拮抗劑變異體。在一些實施例中，FGF19 拮抗劑為與 FGF19 結合且中和、阻斷、抑制、廢除、降低或干擾 FGF19 之生物活性之分子。

"KLβ 拮抗劑"係指能夠中和、阻斷、抑制、廢除、降低或干擾 KLβ 活性之分子，包括(例如)結合 FGFR(例如 FGFR4)(視需要連同肝素)，結合 FGF(例如 FGF19)(視需要連同肝素)，結合 FGFR4 及 FGF19(視需要連同肝素)，促進 cFos、Junb 及/或 Junc 之 FGF19 介導之誘導(活體外或活體內)，促進 FGFR4 及/或 FGF19 下游信號傳輸(包括(但不限於)FRS2 磷酸化、ERK1/2 磷酸化及 Wnt 路徑活化)，及/或促進任何生物學有關 KLβ 及/或 FGFR4 生物學路徑，及/或促進腫瘤、細胞增生性病徵或癌症，及/或促進與 KLβ 表現及/或活性(諸如增加之 KLβ 表現及/或活性)相關之病症。KLβ 拮抗劑包括抗體及其抗原結合片段、蛋白質、肽、醣蛋白、糖肽、糖脂、多醣、寡醣、核酸、生物有機分子、肽模擬物、藥理學藥劑及其代謝物、轉錄及轉譯控制序列及其類似物。拮抗劑亦包括蛋白質及融合蛋白質、受體分子及特異性結合蛋白質進而將其結合物隱變為其標靶之衍生物的小分子抑制劑，蛋白質、針對蛋白質之 siRNA 分子、針對蛋白質之反義分子、RNA 適體及對於蛋白質之核糖核酸酶的拮抗劑變異體。在一些實施例中，KLβ 拮抗劑為與 KLβ 結合且中和、阻斷、抑制、廢除、降低或干擾 KLβ 之生物活性之分子。

如本文中所使用之術語"FGFR4"(可交替稱為"纖維母細胞生長因

子受體4")，除非另外特定或自上下文指示，否則係指任何天然或變異(無論天然還是合成)FGFR4多肽。術語"天然序列"特定涵蓋天然存在之截斷或分泌形式(例如細胞外域序列)、天然存在變異體形式(例如，替代性剪接形式)及天然存在之對偶基因變異體。術語"野生型FGFR4"通常係指包含天然存在FGFR4蛋白質之胺基酸序列之多肽。術語"野生型FGFR4序列"通常係指見於天然存在FGFR4中之胺基酸序列。

"FGFR拮抗劑"係指能夠中和、阻斷、抑制、廢除、降低或干擾FGF受體("FGFR")活性之分子，包括(例如)結合KLβ(視需要連同肝素)，結合FGF(例如FGF19)(視需要連同肝素)，結合KLβ及FGF(例如FGF19)(視需要連同肝素)，促進cFos、Junb及/或Junc之FGF19介導之誘導(活體外或活體內)，促進FGFR及/或FGF下游信號傳輸(包括(但不限於)FRS2磷酸化、ERK1/2磷酸化及Wnt路徑活化)，及/或促進任何生物學有關FGF及/或FGFR生物學路徑，及/或促進腫瘤、細胞增生性病變或癌症，及/或促進與FGFR表現及/或活性(諸如增加之FGFR表現及/或活性)相關之病症。FGFR拮抗劑包括抗體及其抗原結合片段、蛋白質、肽、醣蛋白、糖肽、糖脂、多醣、寡醣、核酸、生物有機分子、肽模擬物、藥理學藥劑及其代謝物、轉錄及轉譯控制序列及其類似物。拮抗劑亦包括蛋白質及融合蛋白質、受體分子及特異性結合蛋白質進而將其結合物隱變為其標靶之衍生物的小分子抑制劑，蛋白質、針對蛋白質之siRNA分子、針對蛋白質之反義分子、RNA適體及對於蛋白質之核糖核酸酶的拮抗劑變異體。在一些實施例中，FGFR拮抗劑(例如FGFR4拮抗劑)為與FGFR結合且中和、阻斷、抑制、廢除、降低或干擾FGFR生物活性之分子。

術語"抗體"及"免疫球蛋白"在廣義上可交替使用且包括單株抗體(例如全長或完整單株抗體)、多株抗體、多價抗體、多特異性抗體(例

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

術語"可變"係指可變域之某些部分在抗體之間在序列上廣泛不同且可用於各特定抗體對其特定抗原之結合及特異性。然而，可變性並非均勻分布於整個抗體之可變域中。其集中於輕鏈可變域與重鏈可變域中之稱為互補判定區(CDR)或高變區之三個區段。可變域之更高度保守之部分稱為構架(FR)。天然重鏈及輕鏈之可變域各包含四個主要採用 β -摺疊片構型、藉由3個CDR連接之FR區域，其形成連接及(在一些狀況下)形成 β -摺疊片結構之部分之環。各鏈中之CDR以及來自其他鏈之CDR藉由FR區域緊密結合在一起，有助於形成抗體之抗原結合位點(參見Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，National Institute of Health, Bethesda, MD (1991))。抗體與抗原之結合中並不直接涉及恆定域，但其呈現各種效應功能，諸如使抗體參與抗體依賴性細胞毒性。

抗體之木瓜酵素消化產生2個稱為"Fab"片段之相同抗原結合片段，各具有單一抗原結合位點；及殘餘"Fc"片段，該名稱反映其易結晶之能力。胃蛋白酶處理產生具有2個抗原結合性位點且仍能夠與抗原交聯之 $F(ab')_2$ 片段。

"Fv"為含有完整抗原識別位點及抗原結合位點之最小抗體片段。在雙鏈Fv物質中，該區域由緊密、非共價締合之一個重鏈可變域及一個輕鏈可變域之二聚體組成。在單鏈Fv物質中，一重鏈可變域及一輕鏈可變域可藉由可撓性肽連接子共價連接，以便輕鏈及重鏈可締合於與雙鏈Fv物質中之彼結構類似之"二聚"結構中。在其構型中，各可變域之3個CDR相互作用以界定VH-VL二聚體表面上之抗原結合位點。總體而言，6個CDR賦予抗體抗原結合特異性。然而，儘管親和力比

整個結合位點低，但是即使單一可變域(或僅包含3個對抗原有特異性之CDR之一半Fv)亦具有識別及結合抗原之能力。

Fab片段亦含有輕鏈之恆定域及重鏈之第一恆定域(CH1)。Fab'片段由於在重鏈CH1域之羧基末端處添加少數包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸之殘基而不同於Fab片段。Fab'-SH在本文中指代恆定域之半胱胺酸殘基帶有游離硫醇基之Fab'。F(ab')₂抗體片段最初產生為其間具有鉸鏈半胱胺酸之Fab'片段對。亦已知抗體片段之其他化學偶合。

來自任何脊椎動物物種之抗體(免疫球蛋白)之"輕鏈"，基於其恆定域之胺基酸序列，可分為兩種稱為 κ 及 λ 之明顯不同類型之一。

視其重鏈之恆定域之胺基酸序列而定，免疫球蛋白可分為不同類別。存在5個主要類別之免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且若干該等者可進一步分成子類(同型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。相應於不同類別之免疫球蛋白之重鏈恆定域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。不同類別之免疫球蛋白之子單元結構及三維構型為熟知的。

"抗體片段"僅包含完整抗體之一部分，其中該部分較佳保留通常與當存在於完整抗體中時之彼部分相關之功能的至少一者，較佳大部分或全部。抗體片段之實例包括Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段；雙功能抗體；線性抗體；單鏈抗體分子；及自抗體片段形成之多特異性抗體。在一實施例中，抗體片段包含完整抗體之抗原結合位點且因此保留結合抗原之能力。在另一實施例中，抗體片段(例如包含Fc區之片段)保留通常與當存在於完整抗體中時之Fc區相關之生物功能的至少一者，諸如FcRn結合、抗體半衰期調節、ADCC功能及補體結合。在一實施例中，抗體片段為具有大體上與完整抗體相似之活體內半衰期的單價抗體。舉例而言，該抗體片段可包含與Fc序列連接之抗原結合

臂，該Fc序列能夠使該片段具有活體內穩定性。

術語"高變區"、"HVR"或"HV"當在本文中使用時，係指為序列高變及/或在結構上形成限定環之抗體可變域的區域。通常，抗體包含6個高變區；3個在VH中(H1、H2、H3)且3個在VL中(L1、L2、L3)。本文中使用的且涵蓋許多高變區描述。Kabat互補判定區(CDR)係基於序列可變性且最常用(Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothia取而代之提及結構環之位置(Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。AbM高變區表示Kabat CDR與Chothia結構環之間的折衷，且藉由Oxford Molecular's AbM抗體模型化軟體使用。"接觸"高變區係基於可用複雜晶體結構之分析。

高變區可包含如下之"延伸高變區"：VL中之24-36(L1)、46-56(L2)及89-97(L3)，及VH中之26-35(H1)、49-65或50至65(H2)及93-102(H3)。對該等定義之各者而言，可變域殘基根據Kabat等人(同上)來編號。

"構架"或"FR"殘基為不同於如本文中定義之高變區殘基之彼等可變域殘基。

非人類(例如鼠)抗體之"人類化"形式為含有得自非人類免疫球蛋白之最小序列之嵌合抗體。在極大程度上，人類化抗體為人類免疫球蛋白(受體抗體)，其中來自受體高變區之殘基經來自具有所要特異性、親和力及能力之諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物之非人類物種(供體抗體)之高變區的殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之構架區(FR)殘基經相應之非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含受體抗體或供體抗體中未見之殘基。進行該等修飾以進一步改進抗體效能。一般而言，人類化抗體將包含至少一個且通常2個可變域之大體上所有者，其中所有或大體上所有高變環相應於非人類免疫

球蛋白之彼等高變環，且所有或大體上所有FR爲人類免疫球蛋白序列之彼等FR。人類化抗體視需要亦將包含至少一部分免疫球蛋白恆定區(Fc)，通常爲人類免疫球蛋白之恆定區。對於其他詳情，參見 Jones 等人，*Nature* 321:522-525 (1986)；Riechmann 等人，*Nature* 332:323-329 (1988)；及 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。亦參見以下評論文章及其中引用之參考文獻：Vaswani及 Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998)；Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995)；Hurle及Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)。

"嵌合"抗體(免疫球蛋白)具有與得自特定物種或屬於特定抗體類別或子類之抗體中之相應序列相同或同源的重鏈及/或輕鏈之部分，而該等鏈中之剩餘者與得自另一物種或屬於另一抗體類別或子類之抗體中之相應序列相同或同源；以及該等抗體之片段，只要其呈現所要生物活性即可(美國專利第4,816,567號；及Morrison等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。如本文所使用之人類化抗體爲嵌合抗體之子集。

"單鏈Fv"或"scFv"抗體片段包含抗體之VH及VL域，其中該等域存在於單個多肽鏈中。通常，scFv多肽另外包含在VH與VL域之間使scFv能夠形成用於抗原結合之所要結構的多肽連接子。對於scFv之評述，參見Pluckthun，於*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*，第113卷中，Rosenburg及Moore編，Springer-Verlag, New York，第269-315頁(1994)。

"抗原"爲抗體可選擇性結合之預定抗原。標靶可爲多肽、碳水化合物、核酸、脂質、半抗原或其他天然存在或合成之化合物。較佳地，標靶爲多肽。

術語"雙功能抗體"係指具有2個抗原結合位點之小抗體片段，該

等片段包含與同一多肽鏈中之輕鏈可變域(VL)連接之重鏈可變域(VH)(VH-VL)。藉由使用太短以至於不允許同一鏈上2個域之間配對之連接子，迫使該等域與另一鏈之互補域配對且產生2個抗原結合位點。雙功能抗體更完面地描述於(例如)EP 404,097；WO 93/11161；及 Hollinger等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:6444-6448 (1993)中。

"人類抗體"為擁有相應於由人類產生之抗體之彼胺基酸序列之胺基酸序列及/或已使用如本文所揭示任何用於製造人類抗體之技術製得的抗體。人類抗體之該定義特別排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

"親和力成熟"抗體為在其一或多個CDR中具有一或多種改變之抗體，與不擁有彼等改變之親本抗體比較，該或該等改變產生抗體對抗原之親和力之改良。較佳親和力成熟抗體將對標靶具有奈莫耳或甚至皮莫耳親和力。親和力成熟抗體藉由此項技術中已知之程序產生。Marks等人，*Bio/Technology* 10:779-783 (1992)描述藉由VH及VL域改組之親和力成熟。CDR及/或構架殘基之隨機突變由以下文獻描述：Barbas等人，*Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994)；Schier等人，*Gene* 169:147-155 (1995)；Yelton等人，*J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995)；Jackson等人，*J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995)；及 Hawkins等人，*J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)。

抗體"效應功能"係指可歸因於抗體之Fc區(天然序列Fc區或胺基酸序列變異體Fc區)之彼等生物活性，且其隨抗體同型而變化。抗體效應功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；下調細胞表面受體(例如B細胞受體)；及B細胞活化。

"抗體依賴性細胞介導之細胞毒性"或"ADCC"係指一種細胞毒性形式，其中與存在於某些細胞毒素細胞(例如天然殺手(NK)細胞、嗜

中性白細胞及巨噬細胞)上之Fc受體(FcR)結合之分泌Ig使該等細胞毒素效應細胞能夠特異性結合帶有抗原之標靶細胞且隨後以細胞毒素殺死標靶細胞。抗體"配備(arm)"細胞毒素細胞且完全為該殺死所需。介導ADCC之初級細胞，NK細胞僅表現FcγRIII，而單核細胞表現FcγRI、FcγRII及FcγRIII。FcR在造血細胞上之表現概括於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)之第464頁上的表3中。為評估所關注之分子之ADCC活性，可執行活體外ADCC檢定，諸如美國專利第5,500,362號或第5,821,337號或Presta美國專利第6,737,056號中所述之彼檢定。可用於該等檢定中之效應細胞包括周邊血液單核細胞(PBMC)及天然殺手(NK)細胞。或者或另外，所關注之分子之ADCC活性可活體內評估，例如在諸如Clynes等人，*PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)中揭示之彼者之動物模型中評估。

"人類效應細胞"為表現一或多個FcR且執行效應功能之白血球。較佳地，該等細胞表現至少FcγRIII且執行ADCC效應功能。介導ADCC之人類白血球之實例包括周邊血液單核細胞(PBMC)、天然殺手(NK)細胞、單核細胞、細胞毒性T細胞及嗜中性白血球；PBMC及NK細胞較佳。效應細胞可自天然來源，例如自血液分離。

"Fc受體"或"FcR"描述結合抗體之Fc區之受體。較佳FcR為天然序列人類FcR。此外，較佳FcR為結合IgG抗體之FcR(γ受體)且包括FcγRI、FcγRII及FcγRIII子類之受體，包括該等受體之對偶基因變異體及替代剪接形式。FcγRII受體包括具有相似胺基酸序列之FcγRIIA("活化受體")及FcγRIIB("抑制受體")，該等胺基酸序列主要不同之處在於其細胞質域。活化受體FcγRIIA在其細胞質域中含有以免疫受體酪胺酸為主之活化基元(ITAM)。抑制受體FcγRIIB在其細胞質域中含有以免疫受體酪胺酸為主之抑制基元(ITIM)。(參見評述M. in Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997))。FcR係評述於Ravetch及

Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991) ; Capel 等人 , *Immunomethods* 4:25-34 (1994) ; 及 de Haas 等人 , *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995) 中。其他 FcR (包括將來欲識別之彼等 FcR) 均由本文中之術語 "FcR" 涵蓋。該術語亦包括新生兒受體 FcRn , 其負責將母本 IgG 轉移至胎兒 (Guyer 等人 , *J. Immunol.* 117:587 (1976) 及 Kim 等人 , *J. Immunol.* 24:249 (1994)) 且調節免疫球蛋白之內穩定。

WO 00/42072 (Presta) 描述與 FcR 改良或減弱結合之抗體變異體。彼專利公開案之內容以引用之方式特定併入本文。亦參見 Shields 等人 , *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)。

量測與 FcRn 之結合之方法為已知的 (參見 (例如) Ghetie 1997, Hinton 2004)。可 (例如) 在表現人類 FcRn 之轉殖基因小鼠或經轉染人類細胞株中或在經 Fc 變異體多肽投藥之靈長類動物中 , 檢定與人類 FcRn 之活體內結合及人類 FcRn 高親和力結合多肽之血清半衰期。

"補體依賴性細胞毒性" 或 "CDC" 係指標靶細胞在補體存在下之溶解。經典補體路徑之活化係藉由補體系統之第一組分 (C1q) 結合與其同源抗原結合之 (適當子類之) 抗體而引發。為評估補體活化 , 可執行 (例如) 如 Gazzano-Santoro 等人 , *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996) 中所述之 CDC 檢定。

具有經改變 Fc 區之胺基酸序列及增加或降低之 C1q 結合能力之多肽變異體描述於美國專利第 6,194,551 B1 號及 WO 99/51642 中。彼等專利公開案之內容以引用之方式特定併入本文。亦參見 Idusogie 等人 , *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)。

"阻斷" 抗體或 "拮抗劑" 抗體為抑制或降低其所結合之抗原之生物活性的抗體。較佳之阻斷抗體或拮抗劑抗體大體上或完全抑制抗原之生物活性。

"生物樣本" (可交替稱為 "樣本" 或 "組織或細胞樣本") 涵蓋自個體

獲得之各種樣本類型，且可用於診斷或監測檢定。該定義涵蓋血液及具有生物學起源之其他液體樣本；實體組織樣本，諸如活組織檢查樣本或組織培養物或自其衍生之細胞及其後裔。該定義亦包括已在其獲得後以任何方式處理之樣本，諸如藉由用試劑處理、溶解或富集諸如蛋白質或聚核苷酸之某些組分或出於切片目的而嵌入半固體或固體基質中。術語"生物樣本"涵蓋臨床樣本，且亦包括培養物中之細胞、細胞上清液、細胞溶胞物、血清、血漿、生物流體及組織樣本。生物樣本之來源可為如來自新鮮、冷凍及/或保存器官或組織樣本或活組織檢查或抽出物之實體組織；血液或任何血液組分；體液，諸如大腦脊髓液、羊水、腹膜液或間隙流體；得自個體之妊娠或發育中之任何時間之細胞。在一些實施例中，生物樣本自原發性或轉移性腫瘤獲得。生物樣本可含有本質上不與組織天然混合之化合物，諸如防腐劑、抗凝劑、緩衝劑、固定劑、養分、抗生素或其類似物。

就本文中之目的而言，組織樣本之"切片"意謂組織樣本之單一部分或碎片，例如自組織樣本切割之組織或細胞之薄片。應瞭解，可獲得組織樣本之多個切片且使其經受根據本發明之分析。在一些實施例中，在形態學與分子級別下分析組織樣本之同一切片，或就蛋白質與核酸進行分析。

字組"標記"當用於本文中時係指與諸如核酸探針之試劑或抗體直接或間接結合或融合且促進其所結合或融合之試劑之偵測的化合物或組合物。標記自身可為可偵測的(例如，放射性同位素標記或螢光標記)，或在酶促標記之狀況下，可催化可偵測之受質化合物或組合物之化學改變。

"藥物"為治療所討論病症或其症狀或副作用之活性藥物。

"病症"或"疾病"為自用本發明之物質/分子或方法治療受益之任何病狀。其包括慢性及急性病症或疾病，包括使哺乳動物易患所討論病

症之彼等病理性病狀。本文中欲治療之病症之非限制性實例包括惡性及良性腫瘤；癌瘤；胚細胞瘤及肉瘤。

術語"細胞增生性病變"及"增生性病變"係指與某種程度之異常細胞增生相關之病症。在一實施例中，細胞增生性病變為癌症。

如本文中所使用之"腫瘤"係指所有贅生性細胞生長及增生，無論惡性還是良性，及所有癌變前及癌細胞及組織。術語"癌"、"癌性"、"細胞增生性病變"、"增生性病變"及"腫瘤"如本文中所提及並不互相排斥。

術語"癌症"及"癌性"係指或描述哺乳動物中通常由失調細胞生長/增生表徵之生理病狀。癌症之實例包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病。該等癌症之更特定實例包括鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、垂體癌、食管癌、星形細胞瘤、軟組織肉瘤、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、胰腺癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝腫瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌瘤、唾液腺癌瘤、腎癌、肝癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌瘤、腦癌、子宮內膜癌、睪丸癌、膽管癌瘤、膽囊癌瘤、胃癌、黑素瘤及各種類型之頭頸癌。血管生成之調節障礙可引起許多可由本發明之組合物及方法治療之病症。該等病症包括非贅生性及贅生性病狀。贅生性病包括(但不限於)上述之彼等病症。非贅生性病變包括(但不限於)不良或異常肥大、關節炎、類風濕性關節炎(RA)、牛皮癬、牛皮癬斑塊、肉狀瘤病、動脈粥樣硬化、動脈粥樣硬化斑、糖尿病性及其他增生性視網膜病變(包括早產兒視網膜病變)、晶狀體後纖維組織增生、新生血管性青光眼、年齡相關之黃斑退化、糖尿病性黃斑水腫、角膜新血管生成、角膜移植物新血管生成、角膜移植物排斥反應、視網膜/脈絡膜新血管生成、隅角新血管生成(虹膜紅變)、眼內新生血管疾病、血管再狹

窄、動靜脈畸形(AVM)、腦膜瘤、血管瘤、血管纖維瘤、甲狀腺增生(包括格雷夫氏病(Grave's disease))、角膜及其他組織移植、慢性炎症、肺炎、急性肺損傷/ARDS、敗血症、原發性肺循環血壓過高、惡性肺部積液、腦水腫(例如與急性中風/閉合性頭部損傷/外傷有關)、滑膜發炎、RA中之血管翳形成、骨化性肌炎、肥厚性骨形成、骨關節炎(OA)、難治性腹水、多囊卵巢病、子宮內膜異位、流體第三間隔疾病(3rd spacing of fluid diseases)(胰腺炎、間隔症候群、燒傷、腸病)、子宮纖維瘤、早產、諸如IBD之慢性炎症(克隆氏病(Crohn's disease)及潰瘍性結腸炎)、腎同種異體移植排斥反應、發炎性腸疾病、腎病症候群、不良或異常組織腫塊生長(非癌症)、血友病性關節、肥厚性瘢痕、頭髮生長之抑制、奧韋氏症候群(Osler-Weber syndrome)、化膿性肉芽腫晶狀體後纖維組織增生、硬皮病、沙眼、血管黏附、滑膜炎、皮炎、先兆子癇、腹水、心包積液(諸如與心包炎相關之心包積液)及胸腔積液。

術語"消瘦"病症(例如消瘦症候群、惡病質、肌肉減少症)係指由不良及/或不健康體重損失或體細胞質量損失引起之病症。在老年人以及在AIDS及癌症患者中，消瘦疾病可造成不當體重損失，包括脂肪及去脂隔室損失。消瘦疾病可為食物攝入不足及/或與疾病及/或衰老過程相關之代謝改變之結果。癌症患者及AIDS患者以及廣泛手術後或患有慢性感染、免疫疾病、甲狀腺機能亢進、克羅恩氏病(Crohn's disease)、精神性疾病、慢性心力衰竭或其他嚴重外傷之患者通常遭受消瘦疾病，其有時亦稱為惡病質、代謝病症且有時稱為進食病症。惡病質另外由代謝亢進及分解代謝過度表徵。儘管惡病質及消瘦病症常常交替用以指消瘦病狀，但至少一種體研究以去脂質量且尤其為體細胞質量之損失將惡病質與消瘦症候群加以區分(Mayer, 1999, J. Nutr. 129(1S增刊): 256S-259S)。肌肉減少症，可影響老化個體之

另一該病症，通常由肌肉質量損失表徵。如上所述之晚期消瘦疾病可在遭受惡病質或肌肉減少症之個體中發展。

如本文所使用，"治療"係指試圖改變所治療之個體或細胞之自然過程的臨床介入，且可出於預防之目的或在臨床病理學過程期間進行。治療之理想效應包括預防疾病之發生或復發、減輕症狀、減少疾病之任何直接或間接病理後果、降低疾病進程速率、改善或減輕疾病病況及緩解或改良預後。在一些實施例中，抗體用以延遲疾病或病症之發展。

"抗血管生成劑"或"血管生成抑制劑"係指直接或間接抑制血管生成、血管發生或不良血管滲透性之小分子量物質、聚核苷酸、多肽、經分離蛋白質、重組蛋白質、抗體或其結合物或融合蛋白質。舉例而言，抗血管生成劑為如上文所定義之抗體或血管生成劑之其他拮抗劑，例如VEGF之抗體、VEGF受體之抗體、阻斷VEGF受體信號傳輸之小分子(例如PTK787/ZK2284、SU6668、SUTENT/ SU11248(舒尼替尼蘋果酸鹽(sunitinib malate))、AMG706)。抗血管生成劑亦包括天然血管生成抑制劑，例如血管生長抑素、內皮抑制素等等。參見(例如)Klagsbrun及D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991)；Streit及Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003)(例如，表3列出惡性黑色素瘤之抗血管生成療法)；Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999)；Tonini等人，*Oncogene*, 22:6549-6556 (2003)(例如，表2列出抗血管生成因子)；及Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003)(例如，表1列出臨床試驗中所使用之抗血管生成劑)。

"個體"為脊椎動物，較佳為哺乳動物，更佳為人類。哺乳動物包括(但不限於)家畜(諸如母牛)、運動動物、寵物(諸如貓、狗及馬)、靈長類動物、小鼠及大鼠。

就治療目的而言，"哺乳動物"係指歸類為哺乳動物之任何動物，

包括人類、馴養及農場動物及動物園動物、運動動物或寵物動物，諸如狗、馬、貓、母牛等。較佳地，哺乳動物為人類。

"有效量"係指以所需劑量及時期有效達到所要治療或預防結果之量。

本發明之物質/分子、促效劑或拮抗劑之"治療有效量"可根據以下因素而變化：諸如個體之疾病病況、年齡、性別及體重，及物質/分子、促效劑或拮抗劑在個體中引出所需反應之能力。治療有效量亦為物質/分子、促效劑或拮抗劑之任何毒性或有害效應由治療有益效應超過之量。"預防有效量"係指以所需劑量及時期有效達到所要預防結果之量。因為預防劑量在疾病前或在疾病早期用於個體，所以預防有效量將通常但並非必然小於治療有效量。

"與肥胖有關之病狀"係指為肥胖之結果或由肥胖惡化之病狀，諸如(但不限於)皮膚學病症，諸如感染、靜脈曲張、黑棘皮病(Acanthosis nigricans)及濕疹、運動耐受力不足、II型糖尿病、胰島素抵抗、高血壓、高膽固醇血症、膽石病、骨關節炎、矯形外科損傷、血栓插塞疾病、癌症及冠狀動脈(或心血管)心臟疾病，尤其為與個體中之高甘油三酯及游離脂肪酸相關之心血管病狀。

"肥胖"係指哺乳動物具有據體重(kg)除以身高²(公尺)所計算為至少25.9之體重指數(BMI)的病狀。習知地，具有正常體重之彼等人具有19.9至小於25.9之BMI。本文中之肥胖可歸因於任何病因，無論遺傳性還是環境性的。可造成肥胖或為肥胖之病因之病症的實例包括飲食過量及貪食症、多室卵巢病、顱咽管瘤、普拉德-威利症候群(Prader-Willi Syndrome)、弗勒利希氏症候群(Frohlich's syndrome)、II型糖尿病、缺乏GH之個體、普通變化矮小身材、特納氏症候群(Turner's syndrome)及展示降低之代謝活性或呈總去脂質量百分比之靜能消耗降低的其他病理性病狀，例如具有急性淋巴母細胞白血病之

兒童。

如本文中所使用之術語"細胞毒素劑"係指抑制或防止細胞之功能及/或引起細胞之破壞之物質。該術語欲包括放射性同位素(例如, At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 及Lu之放射性同位素);化學治療劑,例如甲胺喋呤、阿黴素(adriamicin)、長春生物鹼類(vinca alkaloids)(長春新鹼、長春花鹼(vinblastine)、依託泊苷(etoposide))、阿黴素(doxorubicin)、美法侖(melphalan)、絲裂黴素C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、道諾黴素(daunorubicin)或其他插入劑;酶及其片段,諸如核酸分解酶;抗生素及毒素,諸如細菌、真菌、植物或動物來源之小分子毒素或酶促活性毒素,包括其片段及/或變異體,及下文所揭示之各種抗瘤劑或抗癌劑。其他細胞毒素劑在下文描述。殺腫瘤劑引起腫瘤細胞之破壞。

"化學治療劑"為適用於治療癌症之化合物。化學治療劑之實例包括:烷化劑,諸如硫替派(thiotepa)及CYTOXAN®環磷醯胺;磺酸烷基酯類,諸如百消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶類,諸如苯唑多巴(benzodopa)、卡巴醌(carboquone)、米特多巴(meturedopa)及尤利多巴(uredopa);伸乙基亞胺類及甲基蜜胺類,包括六甲蜜胺(altretamine)、三伸乙基蜜胺(triethylenemelamine)、三伸乙基磷醯胺(triethylenephosphoramidate)、三伸乙基硫代磷醯胺(triethylenethiophosphoramidate)及三羥甲基蜜胺(trimethylolomelamine);多聚乙醯類(acetogenins)(尤其為布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone)); Δ -9-四氫大麻酚(delta-9-tetrahydrocannabinol)(卓那比諾(dronabinol; MARINOL®)); β -拉帕酮(beta-lapachone);拉帕醇(lapachol);秋水仙鹼(colchicine);樺木酸(betulinic acid);喜樹鹼(camptothecin)(包括合成類似物拓朴替康(topotecan; HYCAMTIN®)、CPT-11(伊立替康(irinotecan);

CAMPTOSAR®)、乙醯基喜樹鹼(acetylcamptothecin)、斯考普萊叮(scopolectin)及9-胺基喜樹鹼)；苔蘚蟲素(bryostatin)；卡利士他汀(callystatin)；CC-1065(包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；足葉草毒素(podophyllotoxin)；足葉草酸(podophyllinic acid)；替尼泊甙(teniposide)；念珠藻環肽(cryptophycin)(尤其念珠藻環肽1及念珠藻環肽8)；海兔毒素(dolastatin)；多卡黴素(duocarmycin)(包括合成類似物，KW-2189及CB1-TM1)；艾榴素(eleutherobin)；盤克士他汀(pancratistatin)；沙考的汀(sarcodictyin)；海綿素(spongistatin)；氮芥類，諸如苯丁酸氮芥、蔡氮芥(chlornaphazine)、環磷醯胺、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺、二氯甲基二乙胺、鹽酸二氯甲基二乙胺氧化物(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法侖、新氮芥(novembichin)、膽固醇對苯乙酸氮芥(phenesterine)、潑尼莫司汀(prednimustine)、氯乙環磷醯胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)；硝基脲，諸如卡莫斯丁(carmustine)、氯脲黴素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、嘧啶亞硝脲(nimustine)及拉甯司汀(ranimustine)；抗生素，諸如烯二炔抗生素(例如，刺孢黴素(calicheamicin)，尤其刺孢黴素 γ I及刺孢黴素 ω 1(參見(例如)，Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))；達米辛(dynemicin)，包括達米辛A；艾斯帕米辛(esperamicin)；以及新制癌菌素(neocarzinostatin)發色團及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團)、克拉斯米辛(aclacinomysins)、放線菌素(actinomycin)、奧斯拉米辛(authramycin)、重氮絲胺酸(azaserine)、博萊黴素(bleomycin)、放線菌素C(cactinomycin)、卡拉比辛(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌黴素(carzinophilin)、克羅米辛(chromomycinis)、放線菌素D(dactinomycin)、道諾黴素、地托比星

(detorubicin)、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、ADRIAMYCIN®阿黴素(包括N-嗎啉基-阿黴素(morpholino-doxorubicin)、氰基N-嗎啉基-阿黴素(cyanomorpholino-doxorubicin)、2-吡咯啉并-阿黴素及去氧阿黴素(deoxydoxorubicin))、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊達比星(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycins)(諸如絲裂黴素C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycins)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、奎那黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑菌素(streptonigrin)、鏈脲黴素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤及5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil；5-FU)；葉酸類似物，諸如儉諾特呤(denopterin)、甲胺喋呤、喋羅呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉濱(fludarabine)、6-巰基嘌呤(6-mercaptopurine)、噻咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，諸如環胞苷(ancitabine)、阿紮胞苷(azacitidine)、6-氮雜尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙脫氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿核苷(floxuridine)；雄性激素，諸如卡普甾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸酯(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、甾內酯(testolactone)；抗腎上腺劑，諸如胺基苯乙哌啶酮(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如夫羅林酸(frolinic acid)；醋葡內酯(aceglatone)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸(aminolevulinic acid)；伊利盧拉(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；倍思塔布(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；艾達曲克

(edatraxate)；得弗伐胺(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吡醌(diaziquone)；艾弗利散(elfornithine)；依利醋鉍(elliptinium acetate)；埃坡黴素(epothilone)；乙環氧啉(etoglucid)；硝酸鎂(gallium nitrate)；羥基脲(hydroxyurea)；香菇糖(lentinan)；羅尼達寧(lonidainine)；類美登素(maytansinoids)，諸如美登素(maytansine)及胺沙托辛(ansamitocins)；丙脒脲(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫比達摩(mopidanmol)；硝拉維林(nitraerine)；噴妥司汀(pentostatin)；凡那明(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；2-乙基醯肼(2-ethylhydrazide)；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；丙亞胺(razoxane)；根瘤菌素(rhizoxin)；西佐糖(sizofiran)；螺鍺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌(triaziquone)；2,2',2''-三氯三乙基胺；單端孢黴烯族毒素(trichothecenes)(尤其為T-2毒素、弗納庫林A(verracurin A)、桿孢菌素A(roridin A)及胺癸叮(anguidine))；烏拉坦(urethan)；長春地辛(vindesine；ELDISINE®、FILDESIN®)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露醇氮芥(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；甲托辛(gacytosine)；阿糖胞苷(arabinoside；"Ara-C")；噻替派(thiotepa)；紫杉醇(taxoids)，例如TAXOL®太平洋紫杉醇(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)；ABRAXANETM不含Cremophor-太平洋紫杉醇之白蛋白工程化奈米粒子調配物(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)及TAXOTERE®多西他賽(doxetaxel；Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France)；克羅南布(chloranbucil)；吉西他濱(gemcitabine；GEMZAR®)；6-硫鳥嘌呤(6-thioguanine)；巯基嘌呤(mercaptopurine)；甲胺喋呤；鉑類似物，諸如順鉑(cisplatin)及卡鉑

(carboplatin)；長春花鹼(vinblastine；VELBAN®)；鉑；依託泊苷(VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌(mitoxantrone)；長春新鹼(ONCOVIN®)；奧賽力鉑(oxaliplatin)；盧考弗文(leucovorin)；長春瑞寶(NAVELBINE®)；諾凡特龍(novantrone)；依達曲沙(edatrexate)；道諾黴素；胺基喋呤；伊班膦酸鹽(ibandronate)；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(difluoromethylornithine；DMFO)；類視色素類，諸如視黃酸(retinoic acid)；卡西他賓(capecitabine；XELODA®)；以上任何者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物；以及以上兩種或兩種以上之組合，諸如CHOP(環磷醯胺、阿黴素、長春新鹼與去氫皮質醇(prednisolone)之混合治療之縮寫)及FOLFOX(用奧賽力鉑(ELOXATIN™)與5-FU及盧考弗文組合之治療方案之縮寫)。

該定義中亦包括起調節、降低、阻斷或抑制可促進癌生長之激素效應之作用的抗激素劑，且其通常以全身性或整體性(whole-body)治療之形式。其可為激素本身。實例包括抗雌激素及選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，例如包括它莫西芬(tamoxifen)(包括NOLVADEX®它莫西芬)、EVISTA®雷諾昔芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羥基他莫西芬(4-hydroxytamoxifen)、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)及FARESTON®托瑞米芬(toremifene)；抗黃體酮；雌激素受體向下調節劑(ERD)；起抑制或停止卵巢作用之藥劑，例如黃體素釋放激素(LHRH)促效劑，諸如LUPRON®及ELIGARD®乙酸柳培林(leuprolide acetate)、乙酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、乙酸布舍瑞林(buserelin acetate)及曲特瑞林(tripterelin)；其他抗雄性激素，諸如氟他胺(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)及比卡魯胺(bicalutamide)；以及抑制芳香酶的芳香酶抑制劑(其調節腎上腺中之雌激素產生)，諸如4(5)-咪唑、胺基苯乙哌啶酮

(aminoglutethimide)、MEGASE® 乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)、AROMASIN® 依西美坦(exemestane)、弗米斯坦(formestane)、法倔唑(fadrozole)、RIVISOR® 伏氮唑(vorozole)、FEMARA® 來曲唑(letrozole)及ARIMIDEX® 安美達錠(anastrozole)。另外，化學治療劑之該定義包括：雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)(例如，BONAFOS®或OSTAC®)、DIDROCAL® 依替膦酸鹽(etidronate)、NE-58095、ZOMETA® 唑來膦酸/唑來膦酸鹽、FOSAMAX® 阿倫膦酸鹽(alendronate)、AREDIA® 帕米膦酸鹽(pamidronate)、SKELID® 替魯膦酸鹽(tiludronate)或ACTONEL® 利塞膦酸鹽(risedronate)；以及曲沙他濱(troxacitabine)(1,3-二氧戊環核苷胞嘧啶類似物)；反義寡核苷酸，尤其抑制基因在與異常細胞增生相關之信號傳導路徑中之表現的彼等物，諸如PKC- α 、Raf、H-Ras及表皮生長因子受體(EGF-R)；疫苗，諸如THERATOPE® 疫苗及基因治療疫苗，例如ALLOVECTIN® 疫苗、LEUVECTIN® 疫苗及VAXID® 疫苗；LURTOTECAN® 拓撲異構酶I抑制劑；ABARELIX® rmRH；拉帕替尼對甲苯磺酸鹽(ErbB-2與EGFR二元酪氨酸激酶小分子抑制劑，亦稱GW572016)；及以上任一治療劑之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

"生長抑制劑"當用於本文中時係指抑制細胞(諸如表現KL β 之細胞)活體外或活體內生長之化合物或組合物。因此，生長抑制劑可為顯著降低S期中細胞(諸如表現KL β 之細胞)百分比之藥劑。生長抑制劑之實例包括阻斷細胞週期進程(在不同於S期之其他位置)之藥劑，諸如誘導G1停滯及M期停滯之藥劑。經典M期阻斷劑包括長春鹼類(長春新鹼及長春鹼)、紫杉烷(taxane)及拓撲異構酶II抑制劑(諸如阿黴素、表柔比星、道諾黴素、依託泊苷及博萊黴素)。停滯G1之彼等藥劑亦涉及S期停滯，彼等藥劑例如DNA烷化劑，諸如他莫西芬、強的松、達卡巴嗪、二氯甲基二乙酸、順鉑、甲胺喋呤、5-氟尿嘧啶及

ara-C。其他資訊可見於The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及Israel編，第1章，標題為"Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs"，Murakami等人(WB Saunders: Philadelphia, 1995)尤其為第13頁。紫杉烷類(太平洋紫杉醇(paclitaxel)及多烯紫杉醇(docetaxel))為得自紫杉樹之抗癌藥。得自歐洲紫杉(European yew)之多烯紫杉醇(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer)為太平洋紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb)之半合成類似物。太平洋紫杉醇及多烯紫杉醇促進自微管蛋白二聚體組裝微管且藉由防止解聚作用來穩定微管，其將產生細胞有絲分裂之抑制作用。

"阿黴素"為一種蒽環黴素抗生素。阿黴素之完整化學名稱為(8S-順)-10-[(3-胺基-2,3,6-三去氧- α -L-來蘇-己吡喃糖基)氧基]-7,8,9,10-四氫-6,8,11-三羥基-8-(羥基乙醯基)-1-甲氧基-5,12-并四苯二酮。

術語"包含Fc區之多肽"係指諸如抗體或免疫黏附素(參見下文定義)之包含Fc區之多肽。可(例如)在純化多肽期間或藉由重組工程化編碼多肽之核酸來移除Fc區之C末端離胺酸(根據EU編號系統之殘基447)。因此，包含根據本發明之具有Fc區之多肽的組合物可包含具有K447之多肽、所有K447均移除之多肽或具有K447殘基之多肽與不具有K447殘基之多肽之混合物。

KL β

KL β 為跨膜蛋白質，其包含含有2個與家族1糖苷酶中之彼等區域同源之區域的細胞外域、跨膜域及在羧基末端處之短細胞內親水性尾部。人類KL β 蛋白質為1043胺基酸蛋白質且含有以下區域：信號肽(胺基酸1-51)；糖苷酶(胺基酸77-508)；糖苷酶(胺基酸517-967)；跨膜(胺基酸996-1012)；及細胞質域(胺基酸1013-1043)。KL β 核酸及胺基酸序列在此項技術中已知且進一步討論本文中。編碼KL β 之核酸序列可使用KL β 之所要區域之胺基酸序列來設計。或者，可使用KL β 之

cDNA序列(或其片段)。人類KL β 之寄存編號為NM_175737，且小鼠KL β 之寄存編號為NM_031180。額外示範性KL β 序列(例如)展示於圖17及18中，且描述於(例如)Ito等人(2000) Mech Dev 98:115-119中。

KL β 調節劑

KL β 之調節劑為調節KL β 之活性之分子，例如促效劑及拮抗劑。術語"KL β 促效劑"在KL β 之生物學作用之上下文中定義。在某些實施例中，如上文所定義，促效劑控制KL β 之生物活性。在一些實施例中，KL β 促效劑結合FGFR4(視需要連同肝素)，結合FGF19(視需要連同肝素)，結合FGFR4及FGF19(視需要連同肝素)，促進cFos、Junb及/或Junc之FGF19介導之誘導(活體外或活體內)，促進FGFR4及/或FGF19下游信號傳輸(包括(但不限於)FRS2磷酸化、ERK1/2磷酸化及Wnt路徑活化)，及/或促進任何生物學上有關之KL β 及/或FGFR4之生物學路徑。

KL β 調節劑在此項技術中已知，且一些調節劑描述及例證於本文中。所涵蓋之KL β 拮抗劑(諸如抗KL β 抗體)之示範性及非限制性清單提供於下文"定義"中。

適用於本發明之調節劑可藉由此項技術中已知之各種檢定表徵其物理/化學性質及生物功能。在一些實施例中，針對以下任何一或多者表徵KL β 拮抗劑：與KL β 結合，降低或阻斷FGFR4活化，降低或阻斷FGFR4受體下游分子信號傳輸，抑制KL β 酶促活性(諸如KL β 糖苷酶活性)，破壞或阻斷與FGF19之結合，降低及/或阻斷FGF19下游分子信號傳輸，及/或治療及/或預防腫瘤、細胞增生性病變或癌症(諸如肝細胞癌)，及/或治療或預防與KL β 表現及/或活性相關之病變。表徵KL β 拮抗劑及促效劑之方法在此項技術中已知，且一些方法描述及例證於本文中。

FGFR調節劑

FGFR之調節劑為調節FGFR之活性之分子，例如促效劑及拮抗劑。"FGFR拮抗劑"係指能夠中和、阻斷、抑制、廢除、降低或干擾FGF受體("FGFR")之活性的分子，包括(例如)結合KLβ(視需要連同肝素)，結合FGF(例如FGF19)(視需要連同肝素)，結合KLβ及FGF(例如FGF19)(視需要連同肝素)，促進cFos、Junb及/或Junc之FGF19介導之誘導(活體外或活體內)，促進FGFR及/或FGF下游信號傳輸(包括(但不限於)FRS2磷酸化、ERK1/2磷酸化及Wnt路徑活化)，及/或促進任何生物學上有關之FGF及/或FGFR之生物學路徑，及/或促進腫瘤、細胞增生性病徵或癌症，及/或促進與FGFR表現及/或活性(諸如增加之FGFR表現及/或活性)相關之病症。FGFR拮抗劑包括抗體及其抗原結合片段、蛋白質、肽、醣蛋白、糖肽、糖脂、多醣、寡醣、核酸、生物有機分子、肽模擬物、藥理學藥劑及其代謝物、轉錄及轉譯控制序列及其類似物。拮抗劑亦包括蛋白質及融合蛋白質、受體分子及特異性結合蛋白質進而將其結合物隱變為其標靶之衍生物的小分子抑制劑，蛋白質、針對蛋白質之siRNA分子、針對蛋白質之反義分子、RNA適體及對於蛋白質之核糖核酸酶的拮抗劑變異體。在一些實施例中，FGFR拮抗劑(例如FGFR4拮抗劑)為與FGFR結合且中和、阻斷、抑制、廢除、降低或干擾FGFR生物活性之分子。

FGFR調節劑在此項技術中已知。舉例而言，FGFR小分子抑制劑描述於Manetti, F.及Botta, M., Curr. Pharm. Des., 9, 567-581 (2003)中。FGFR4小分子抑制劑之實例為PD173074 (Pfizer, Inc. Groton CT)。所涵蓋之FGFR拮抗劑(諸如抗FGFR抗體)之示範性及非限制性清單提供於下文"定義"中。表徵FGFR拮抗劑之方法在此項技術中已知，且一些方法描述及例證於本文中。

FGF19拮抗劑

"FGF19拮抗劑"係指能夠中和、阻斷、抑制、廢除、降低或干擾

FGF19之活性的分子，包括(例如)結合KL β (視需要連同肝素)，結合FGFR4(視需要連同肝素)，結合KL β 及FGFR4(視需要連同肝素)，促進cFos、Junb及/或Junc之FGF19介導之誘導(活體外或活體內)，促進FGFR4及/或FGF19下游信號傳輸(包括(但不限於)FRS2磷酸化、ERK1/2磷酸化及Wnt路徑活化)，及/或促進任何生物學上有關之FGF19及/或FGFR4之生物學路徑，及/或促進腫瘤、細胞增生性病變或癌症，及/或促進與FGF19表現及/或活性(諸如增加之FGF19表現及/或活性)相關之病變。FGF19拮抗劑包括抗體及其抗原結合片段、蛋白質、肽、醣蛋白、糖肽、糖脂、多醣、寡醣、核酸、生物有機分子、肽模擬物、藥理學藥劑及其代謝物、轉錄及轉譯控制序列及其類似物。拮抗劑亦包括蛋白質及融合蛋白質、受體分子及特異性結合蛋白質進而將其結合物隱變為其標靶之衍生物的小分子抑制劑，蛋白質、針對蛋白質之siRNA分子、針對蛋白質之反義分子、RNA適體及對於蛋白質之核糖核酸酶的拮抗劑變異體。在一些實施例中，FGF19拮抗劑為與FGF19結合且中和、阻斷、抑制、廢除、降低或干擾FGF19之生物活性之分子。

FGF19拮抗劑在此項技術中已知。所涵蓋之FGF19拮抗劑(諸如抗FGFR抗體)之示範性及非限制性清單提供於下文"定義"中。表徵FGFR拮抗劑之方法在此項技術中已知，且一些方法描述及例證於本文中。

抗體

抗體較佳為單株抗體，儘管多株抗體亦可適用且例證於本文中。在本發明之範疇內亦涵蓋本文提供之抗體之Fab、Fab'、Fab'-SH及F(ab')₂片段。該等抗體片段可藉由諸如酶促消化之傳統方式產生，或可藉由重組技術產生。該等抗體片段可為嵌合或人類化抗體片段。該等片段可用於下文所述之診斷及治療目的。抗KL β 抗體在此項技術中已知，例如Ito等人(2005) J Clin Invest 115(8): 2202-2208；R&D

Systems目錄號MAB3738中所揭示之抗體。抗FGF19抗體揭示於(例如)WO 2007/13693中。抗FGF19抗體可為包含以下者之抗體：(a)輕鏈，其包含(i)包含序列KASQDINSFLA (SEQ ID NO:53)之HVR-L1；(ii)包含序列RANRLVS (SEQ ID NO:54)之HVR-L2；及(iii)包含序列LQYDEFPLT (SEQ ID NO:55)之HVR-L3；及(b)重鏈，其包含(i)包含序列GFSLTITYGVH (SEQ ID NO:56)之HVR-H1；(ii)包含序列GVIWPGGGTDYNAAFIS (SEQ ID NO:57)之HVR-H2；及(iii)包含序列VRKEYANLYA (SEQ ID NO:58)之HVR-H3。

單株抗體可自大體上均質之抗體群體(亦即，包含個別抗體之群體除可以較小量存在之可能天然存在的突變外其餘均相同)獲得。因此，修飾語"單株"指示抗體在不為離散抗體之混合物時之特性。

單株抗體可使用最先由Kohler等人，Nature, 256:495 (1975)描述之融合瘤法製造或可藉由重組DNA法(美國專利第4,816,567號)製造。

在融合瘤法中，對小鼠或諸如倉鼠之其他適當宿主動物免疫以引出產生或能夠產生將與用於免疫之蛋白質特異性結合之抗體的淋巴細胞。給定標靶之抗體通常藉由標靶免疫原及佐劑之多次皮下(sc)或腹膜內(ip)注射而在動物中產生。標靶多肽可使用此項技術中熟知之方法製備，一些方法進一步描述於本文中。舉例而言，蛋白質之重組產生描述於下文中。在一實施例中，將動物用含有與免疫球蛋白重鏈之Fc部分融合之標靶之細胞外域(ECD)的抗原衍生物來免疫。在一實施例中，將動物用標靶多肽-IgG1融合蛋白質免疫。動物通常用單磷酸基脂質A(MPL)/海藻糖雙分支酸鹽(trehalose dicrynomylate；TDM)(Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT)針對標靶多肽之免疫原結合物或衍生物來免疫，且在多個位點皮內注射溶液。兩週後對動物加強免疫。7至14天後，對動物採血且檢定血清之抗-抗原效價。對動物加強免疫直至效價平台期。

或者，可活體外將淋巴細胞免疫。隨後，使用適當融合劑(諸如聚乙二醇)使淋巴細胞與骨髓瘤細胞融合，以形成融合瘤細胞(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*，第 59-103 頁 (Academic Press, 1986))。

接種由此製備之融合瘤細胞，並使其在較佳含有一或多種抑制未融合、親本骨髓瘤細胞之生長或存活之物質的適當培養基中生長。舉例而言，若親本骨髓瘤細胞缺乏酶次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(HGPRT或HPRT)，則用於融合瘤之培養基中通常將包括次黃嘌呤、胺基喋呤及胸苷(HAT培養基)，該等物質防止缺乏HGPRT之細胞之生長。

較佳骨髓瘤細胞為有效融合、支持藉由所選產生抗體之細胞穩定高產量地產生抗體的骨髓瘤細胞，且其對諸如HAT培養基之培養基敏感。其中，較佳骨髓瘤細胞株為鼠骨髓瘤株，諸如自可購自Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA之MOPC-21及MPC-11小鼠腫瘤獲得之細胞株及可購自American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA之SP-2或X63-Ag8-653細胞。亦已就人類單株抗體之產生描述人類骨髓瘤及小鼠-人類異源骨髓瘤細胞株(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*，第51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

對於產生針對抗原之單株抗體檢定融合瘤細胞生長於其中之培養基。較佳地，藉由免疫沈澱或藉由諸如放射免疫檢定(RIA)或酶聯結免疫吸附檢定(ELISA)之活體外結合檢定測定由融合瘤細胞產生之單株抗體之結合特異性。

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

識別產生具有所要特異性、親和力及/或活性之抗體之融合瘤細胞後，可藉由有限稀釋程序次選殖純系且藉由標準方法(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第59-103頁(Academic Press, 1986))使其生長。適用於該目的之培養基包括(例如)D-MEM或RPMI-1640培養基。另外，可使融合瘤細胞於活體內作為動物體內之腹水腫瘤生長。

藉由諸如蛋白A-瓊脂糖、羧磷灰石層析、凝膠電泳、透析或親和層析之習知免疫球蛋白純化程序使由次純系分泌之單株抗體與培養基、腹水或血清適當分離。

抗體可藉由使用組合庫以篩選具有所要活性之合成抗體純系來製得。原則上，藉由篩選含有呈現與噬菌體鞘蛋白融合之抗體可變區(Fv)之各種片段的噬菌體之噬菌體庫來選擇合成抗體純系。藉由針對所要抗原之親和層析來篩檢該等噬菌體庫。使表現能夠與所要抗原結合之Fv片段之純系吸附至抗原，且因此使其與庫中之非結合純系分離。隨後將結合純系自抗原溶離，且其可藉由額外之抗原吸附/溶離循環進一步富集。可藉由設計適當抗原篩選程序以選擇所關注之噬菌體純系，接著使用來自所關注之噬菌體純系之Fv序列及Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版，NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991)，第1-3卷中所述之合適恆定區(Fc)序列構築全長抗體純系來獲得任何所要抗體。

抗體之抗原結合域係由2個具有約110個胺基酸之可變(V)區形成，各區域分別由輕鏈(VL)及重鏈(VH)形成，2者均存在3個高變環或互補判定區(CDR)。可變域可作為單鏈Fv(scFv)片段(其中VH與VL經由短、可撓性肽共價鍵聯)或作為Fab片段(其中VH與VL各自與恆定域融合且非共價相互作用)功能性地呈現於噬菌體上，如Winter等人，*Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455(1994)中所述。如本文中所使用，編

碼噬菌體純系之scFv以及編碼噬菌體純系之Fab共同稱為"Fv噬菌體純系"或"Fv純系"。

VH基因庫與VL基因庫可藉由聚合酶鏈反應(PCR)獨立選殖，且在噬菌體庫中隨機重組，隨後可如Winter等人，*Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455(1994)中所述，搜尋抗原結合純系。來自經免疫來源之庫提供對免疫原之高親和力抗體而無需構築融合瘤。或者，天然庫可經選殖以向廣泛範圍之非自體抗原以及自體抗原提供單一來源之人類抗體而無需任何免疫作用，其如Griffiths等人，*EMBO J*, 12: 725-734 (1993)所述。最後，天然庫亦可藉由自幹細胞選殖未經重排之V-基因區段，且使用含有隨機序列之PCR引子編碼高變CDR3區域且完成活體外重排來合成製得，其如Hoogenboom及Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)所述。

絲狀噬菌體藉由與少量鞘蛋白pIII融合來用以呈現抗體片段。抗體片段可呈現為單鏈Fv片段，其中VH域與VL域藉由可撓性多肽間隔基連接於同一多肽鏈上，例如，如Marks等人，*J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)中所述；或呈現為Fab片段，其中一鏈與pIII融合且另一鏈分泌至細菌性宿主細胞周質中，在該周質內藉由置換一些野生型鞘蛋白而組裝呈現於噬菌體表面上的Fab鞘蛋白結構，例如，如Hoogenboom等人，*Nucl. Acids Res.*, 19:4133-4137 (1991)中所述。

一般而言，編碼抗體基因片段之核酸係由人類或動物收穫之免疫細胞獲得。若需要偏利於抗-抗原純系之庫，則用抗原多肽使個體免疫以產生抗體反應，且回收脾細胞及/或循環B細胞、其他末梢血液淋巴細胞(PBLs)用於庫之建構。在一個較佳實施例中，偏利於抗-人類純系之人類抗體基因片段庫係藉由載有功能性人類免疫球蛋白基因陣列(array)(且缺乏功能性內源性抗體產生系統)之轉殖基因小鼠中產生抗-人類抗體反應以免疫引起產生對抗抗原之人類抗體之B細胞來獲

得。下文描述產生人類抗體之轉殖基因小鼠之產生。

抗-抗原反應性細胞群體之其他豐富化可藉由使用合適篩選程序，例如藉由抗原親和力層析進行細胞分離或使細胞吸附至經螢光染料標記之抗原蛋白質接著進行流式活化細胞分選(FACS)，以分離表現抗原特異性膜結合抗體之B細胞來獲得。

或者，使用未免疫供體之脾細胞及/或B細胞或其他PBLs提供可能之抗體庫之更好呈現，且亦允許使用抗原對其不具抗原性之任何動物(人類或非人類)物種來建構抗體庫。對於併入活體外抗體基因建構之庫而言，自個體收穫幹細胞以提供編碼未重排抗體基因區段之核酸。所關注之免疫細胞可自多種動物物種獲得，諸如人類、小鼠、大鼠、兔類、狼、犬、貓、豬、牛、馬及禽類物種等。

自所關注之細胞回收編碼抗體可變基因區段(包括VH及VL區段)之核酸，且使其擴增。在重排VH及VL基因庫之狀況，所欲DNA可藉由自淋巴細胞分離基因組DNA或mRNA，接著用與重排VH及VL基因之5'端及3'端匹配之引子進行聚合酶鏈反應(PCR)來獲得，如Orlandi等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86:3833-3837 (1989)中所述，從而製得用於表現之多樣V基因庫。V基因可由cDNA及基因組DNA用編碼成熟V-域之外顯子之5'端的後向引子及定位於J-區段內之前向引子擴增，如Orlandi等人(1989)及Ward等人，*Nature*, 341:544-546 (1989)中所述。然而，對於由cDNA擴增而言，後向引子亦可定位於前導外顯子中，如Jones等人，*Biotechnol.*, 9:88-89 (1991)中所述，且前向引子亦可定位於恆定區內，如Sastry等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86:5728-5732 (1989)中所述。為使互補性最大，如Orlandi等人(1989)或Sastry等人(1989)中所述，簡併性可併入引子中。庫多樣性較佳藉由使用靶向各V-基因家族之PCR引子來最大化，以擴增存在於免疫細胞核酸樣本中之所有可得VH與VL配置，如Marks等人，*J. Mol. Biol.*,

222:581-597 (1991)之方法中所述，或如Orum等人，*Nucleic Acids Res.*, 21:4491-4498 (1993)之方法中所述。對將經擴增DNA選殖入表現載體中而言，可在一末端處作為標籤之PCR引子內引入罕有限制性位點，其如Orlandi等人(1989)中所述；或藉由用作標籤之引子進行其他PCR擴增，如Clackson等人，*Nature*, 352: 624-628 (1991)中所述。

合成性重排之V基因庫可活體外自V基因區段衍生。大多數人類VH-基因區段已經選殖且定序(報導於Tomlinson等人，*J. Mol. Biol.*, 227:776-798 (1992)中)，且已繪出圖譜(報導於Matsuda等人，*Nature Genet.*, 3:88-94 (1993)中)；該等選殖區段(包括H1與H2環之所有主要構形)可與編碼不同序列及長度之H3環之PCR引子一起用以產生不同VH基因庫，其如Hoogenboom及Winter，*J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992)中所述。如Barbas等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992)中所述，亦可製得VH庫，全部序列多樣性均集中於單倍長之長H3環中。人類V κ 及V λ 區段已經選殖且定序(報導於Williams及Winter，*Eur. J. Immunol.*, 23:1456-1461 (1993)中)且可用以製得合成輕鏈庫。基於一定範圍之VH與VL摺疊及L3與H3長度之合成V基因庫將編碼具有可觀結構多樣性之抗體。擴增編碼DNA之V-基因之後，生殖系V-基因區段可根據Hoogenboom及Winter，*J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)之方法活體外重排。

可藉由以若干方式將VH及VL基因庫組合在一起來構築抗體片段庫。各庫可建立於不同載體中，且活體外重組載體，例如，如Hogrefe等人，*Gene*, 128:119-126 (1993)中所述；或藉由組合感染活體內組合載體，例如，Waterhouse等人，*Nucl. Acids Res.*, 21:4133-4137(1991)中所述之loxP系統。活體內重組方法利用Fab片段之雙鏈性質來克服由大腸桿菌(*E. coli*)轉形效率所強加之對於庫大小之限制。獨立選殖天然VH庫及天然VL庫，一個選殖至噬菌粒中而另一個選殖

至噬菌體載體中。隨後，藉由含有噬質粒之細菌之噬菌體感染來組合2個庫，以便各細胞含有不同組合且庫大小僅受所存在細胞之數量(約 10^{12} 個純系)限制。2個載體均含有活體內重組信號，以便VH及VL基因重組於單一複製子上且共包裝於噬菌體病毒粒子中。該等巨大庫提供大量具有良好親和力(K_d^{-1} 為約 10^{-8} M)之不同抗體。

或者，該等庫可依序選殖入同一載體中，例如，如Barbas等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978-7982 (1991)中所述；或藉由PCR組裝在一起且隨後選殖，例如，如Clackson等人，*Nature*, 352:624-628 (1991)中所述。亦可使用PCR組裝以將VH及VL DNA與編碼可撓性肽間隔基之DNA連接在一起以形成單鏈Fv(scFv)庫。在另一技術中，使用"細胞內PCR組裝"以藉由PCR將VH與VL基因在淋巴細胞內組合，且隨後選殖經連接基因之庫，其如Embleton等人，*Nucl. Acids Res.* 20:3831-37 (1992)中所述。

藉由天然庫所產生之抗體(天然或合成抗體)可具有適度親和力(約 10^6 至 10^7 M^{-1} 之 K_d^{-1})，但親和力成熟亦可如Winter等人(1994)(同上)中所述，藉由建構二級庫及從中再選擇來模擬。舉例而言，突變可藉由在Hawkins等人，*J. Mol. Biol.*, 226 : 889-896 (1992)之方法中或在Gram等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 : 3576-3580 (1992)之方法中，使用易出錯聚合酶(報導於Leung等人，*Technique*, 1: 11-15 (1989)中)來隨機活體外引入。另外，可藉由(例如)使用以載有跨越所關注之CDR之隨機序列的引子之PCR在所選個別Fv純系中使一或多個CDR隨機突變且篩選較高親和力純系來執行親和力成熟。WO 9607754(1996年3月14日公開)描述一種在免疫球蛋白輕鏈之互補判定區中誘導突變以產生輕鏈基因庫之方法。另一有效方法為將藉由噬菌體呈現所選擇的VH域或VL域與獲自未免疫供體之天然存在V域變異體之庫重組，且以若干輪之鏈改組針對較高親和力進行篩選，如

Marks等人，*Biotechnol.*, 10:779-783 (1992)中所述。該技術允許產生親和力在 10^{-9} M範圍內之抗體及抗體片段。

編碼抗原之核酸序列可使用抗原之所要區域之胺基酸序列來設計。或者，可使用cDNA序列(或其片段)。編碼抗原之DNA可藉由此項技術中已知之各種方法製備。該等方法包括(但不限於)由Engels等人，*Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28: 716-734 (1989)中所述之方法之任何方法的化學合成，諸如三酯、亞磷酸酯、亞磷醯胺酸酯及H-磷酸酯方法。在一實施例中，將對於表現宿主細胞而言較佳之密碼子用於DNA設計。或者，可將編碼抗原之DNA自基因組或cDNA庫分離。

建構編碼抗原之DNA分子後，將DNA分子可操作地連接於諸如質體之表現載體中之表現控制序列中，其中該控制序列藉由用載體轉形之宿主細胞識別。一般而言，質體載體含有自可與宿主細胞相容之物種獲得之複製及控制序列。載體通常載有複製位點以及編碼能夠在經轉形細胞中提供表型選擇之蛋白質的序列。用於在原核及真核宿主細胞中表現之合適載體在此項技術中已知，且一些載體進一步描述於本文中。可使用諸如酵母之真核生物體或自諸如哺乳動物之多細胞生物體獲得之細胞。

視需要，將編碼抗原之DNA可操作地連接於分泌前導序列，引起由宿主細胞將表現產物分泌入培養基中。分泌前導序列之實例包括stII、ecotin、lamB、疱疹GD、lpp、鹼性磷酸酶、轉化酶及 α 因子。亦適用於本文中的為蛋白質A之36個胺基酸前導序列(Abrahmsen等人，*EMBO J.*, 4: 3901 (1985))。

宿主細胞用上文所述之本發明之表現或選殖載體轉染且較佳轉形，且將其在經針對誘導啟動子、選擇轉形體或擴增編碼所要序列之基因而適當改質的習知營養培養基中培養。

轉染係指藉由無論實際上是否表現任何編碼序列之宿主細胞吸

收表現載體。熟習此項技術者已知許多轉染方法，例如CaPO₄沈澱及電穿孔。通常當該載體操作之任何指示出現於宿主細胞內時，識別成功轉染。用於轉染之方法在此項技術中熟知，且一些方法進一步描述於本文中。

轉形意謂將DNA引入生物體中以便DNA可作為染色體外元件或藉由染色體成分來複製。視所用宿主細胞而定，使用適於該等細胞之標準技術進行轉形。用於轉形之方法在此項技術中熟知，且一些方法進一步描述於本文中。

可如通常Sambrook等人(同上)中所述來培養用以產生抗原之原核宿主細胞。

可在各種培養基中培養用以產生抗原之哺乳動物宿主細胞，培養基在此項技術中熟知且其中一些描述於本文中。

本揭示案中所提及之宿主細胞涵蓋活體外培養物中之細胞以及宿主動物體內之細胞。

抗原之純化可使用此項技術中公認之方法完成。

可將純化抗原連接於合適基質以用於噬菌體呈現純系之親和層析分離，該基質諸如瓊脂糖珠粒、丙烯醯胺珠粒、玻璃珠、纖維素、各種丙烯酸共聚物、羥基甲基丙烯酸酯凝膠、聚丙烯酸系共聚物及聚甲基丙烯酸系共聚物、耐綸、中性及離子性載劑及其類似物。蛋白質連接於基質可藉由Methods in Enzymology，第44卷(1976)中所述之方法完成。使蛋白配位體連接於多醣基質(例如瓊脂糖、葡聚糖或纖維素)之常用技術涉及用鹵化氰來活化載劑，且隨後使肽配位體之初級脂族或芳族胺與經活化基質偶合。

或者，可使用抗原以塗佈吸附板之孔，表現於附著至吸附板之宿主細胞上或用於細胞分選，或結合至生物素以便用抗生蛋白鏈菌素塗佈之珠粒俘獲，或用於任何其他此項技術已知之方法中以用於淘選

噬菌體呈現庫。

在適於使噬菌體粒子之至少一部分與吸附劑結合之條件下，使噬菌體庫樣本與經固定抗原接觸。通常，對包括pH值、離子強度、溫度及其類似條件之條件進行選擇以模擬生理條件。將結合固相之噬菌體洗滌且隨後藉由酸溶離，例如，如Barbas等人，*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88:7978-7982 (1991)中所述；或藉由鹼溶離，例如，如Marks等人，*J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)中所述；或藉由KLβ抗原競爭，例如以與Clackson等人，*Nature*, 352:624-628 (1991)之抗原競爭方法相似之程序溶離。可以單輪選擇富集20-1,000倍之噬菌體。此外，可使所富集之噬菌體在細菌培養物中生長且經歷其他輪之選擇。

選擇效率視許多因素而定，包括洗滌期間之解離動力學及單一噬菌體上之多個抗體片段是否可同時與抗原接合。具有快速解離動力學(及弱結合親和力)之抗體可藉由使用短時間洗滌、多價噬菌體呈現及抗原於固相中之高塗佈密度來保留。高密度不僅經由多價相互作用來穩定噬菌體，而且有利於使已解離之噬菌體再結合。具有緩慢解離動力學(及良好結合親和力)之抗體之選擇可藉由使用如Bass等人，*Proteins*, 8 : 309-314 (1990)中及WO 92/09690中所述之長時間洗滌及單價噬菌體呈現，及如Marks等人，*Biotechnol.*, 10 : 779-783 (1992)中所述之抗原之低塗佈密度來促進。

有可能在對抗原具有不同親和力、甚至具有略微不同之親和力的噬菌體抗體之間進行選擇。然而，所選抗體之隨機突變(例如，如上文所述之一些親和成熟技術中所執行)可能產生許多突變體，其中大多數與抗原結合而少數具有較高親和力。在限制抗原之情況下，可淘汰罕有具有高親和力之噬菌體。為保留所有具有較高親和力之突變體，可用過量生物素標記抗原培養噬菌體，但經生物素標記抗原處於

比抗原之標靶莫耳親和力常數低之莫耳濃度的濃度下。隨後可藉由經抗生蛋白鏈菌素塗佈之順磁珠粒俘獲高親和力結合噬菌體。該"平衡俘獲"容許抗體根據其結合親和力而選擇，其敏感性容許自顯著過量之具有較低親和力之噬菌體中分離僅2倍高親和力的突變體純系。亦可操縱用於洗滌與固相結合之噬菌體之條件以基於解離動力學來區分。抗-抗原純系亦可根據活性來選擇。

可容易地分離編碼融合瘤衍生之單株抗體或噬菌體呈現Fv純系之DNA且使用習知程序(例如，藉由使用經設計以由融合瘤或噬菌體DNA模板特異性擴增所關注之重鏈及輕鏈編碼區之寡核苷酸引子)來定序。一旦分離，就可將DNA置於表現載體內，隨後將表現載體轉染至不會另外產生免疫球蛋白蛋白質之宿主細胞(諸如大腸桿菌細胞、猿COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞)中，以在重組宿主細胞中達成所要單株抗體之合成。關於在細菌中重組表現編碼抗體之DNA的評述文章包括Skerra等人，*Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993)及Pluckthun, *Immunol. Revs*, 130: 151 (1992)。

可將編碼Fv純系之DNA與已知編碼重鏈及/或輕鏈恆定區之DNA序列(例如適當DNA序列可自Kabat等人(同上)獲得)組合，以形成編碼全長或部分長度重鏈及/或輕鏈之純系。應瞭解，任何同型之恆定區可用於該目的，包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恆定區，且該等恆定區可自任何人類或動物物種獲得。如本文中所使用之"嵌合"及"雜交"抗體定義中包括自一動物(諸如人類)物種之可變域DNA獲得Fv純系且隨後與另一動物物種之恆定區DNA融合以形成"雜交"全長重鏈及/或輕鏈之編碼序列。在一較佳實施例中，自人類可變DNA獲得之Fv純系與人類恆定區DNA融合以形成全部人類、全長或部分長度重鏈及/或輕鏈之編碼序列。

編碼得自融合瘤之抗-抗原抗體之DNA亦可經修飾，例如藉由人

類重鏈恆定域及輕鏈恆定域之編碼序列取代得自融合瘤純系的同源鼠序列(例如，如Morrison等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)之方法)。可藉由使非免疫球蛋白多肽之所有或部分編碼序列與免疫球蛋白編碼序列共價連接來進一步修飾編碼融合瘤或Fv純系衍生之抗體或片段的DNA。以該方式，製備具有Fv純系之結合特異性或融合瘤純系衍生抗體之結合特異性之"嵌合"或"雜交"抗體。

抗體片段

本發明涵蓋抗體片段。在某些情況下，使用抗體片段而非使用整個抗體具有優點。較小尺寸之片段允許快速清除且可產生達到實體腫瘤之改良。

已開發出各種技術用於產生抗體片段。傳統上，該等片段經由完整抗體之蛋白水解消化得到(參見(例如)Morimoto等人，Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)；及Brennan等人，Science, 229:81 (1985))。然而，該等片段現在可藉由重組宿主細胞直接產生。Fab、Fv及ScFv抗體片段均可表現於大腸桿菌中且由大腸桿菌分泌，因此可容易地產生大量該等片段。可自上文所討論之抗體噬菌體庫分離抗體片段。或者，可直接自大腸桿菌回收Fab'-SH片段且使其化學偶合以形成F(ab')₂片段(Carter等人，Bio/Technology 10:163-167 (1992))。根據另一方法，F(ab')₂片段可直接自重組宿主細胞培養物分離。具有增加之活體內半衰期，包含救助受體結合抗原決定基殘基之Fab及F(ab')₂片段描述於美國專利第5,869,046號中。產生抗體片段之其他技術對熟習此項技術者將為明顯的。在其他實施例中，所選擇之抗體為單鏈Fv片段(scFv)。參見WO 93/16185；美國專利第5,571,894；及5,587,458號。Fv及sFv為具有完整結合位點之僅有種類，其缺乏恆定區；因此，其適於在活體內使用期間降低非特異性結合。sFv融合蛋白質可經構築以在sFv之胺基或羧基末端處產生效應

子蛋白質之融合。參見Antibody Engineering, Borrebaeck編，同上。(例如)如美國專利第5,641,870中所述，抗體片段亦可為"線性抗體"。該等線性抗體片段可為單特異性或雙特異性抗體片段。

人類化抗體

本發明涵蓋人類化抗體。用於人類化非人類抗體之各種方法在此項技術中已知。舉例而言，人類化抗體可具有一或多個自非人類來源引入其中之胺基酸殘基。該等非人類胺基酸殘基常稱為"輸入"殘基，其通常獲自"輸入"可變域。人類化可基本上按照Winter及同事(Jones等人(1986) Nature 321:522-525；Riechmann等人(1988) Nature 332:323-327；Verhoeyen等人(1988) Science 239:1534-1536)之方法，藉由用高變區序列取代人類抗體之相應序列來執行。因此，該等"人類化"抗體為嵌合抗體(美國專利第4,816,567號)，其中大體上近似完整之人類可變域已經源自非人類物種的相應序列取代。實際上，人類化抗體通常為一些高變區殘基及可能一些FR殘基經來自齧齒動物抗體中之類似位點之殘基取代的人類抗體。

對用於製造人類化抗體之人類可變域(輕鏈與重鏈)的選擇，對降低抗原性而言極為重要。根據所謂的"最佳擬合"方法，齧齒動物抗體之可變域之序列針對已知人類可變域序列之完整庫來篩選。隨後，最接近齧齒動物之序列之人類序列當作用於人類化抗體之人類構架(Sims等人(1993) J. Immunol. 151:2296；Chothia等人(1987) J. Mol. Biol. 196:901)。另一方法使用得自輕鏈或重鏈之特定子群之所有人類抗體的一致序列之特定構架。相同構架可用於若干不同人類化抗體(Carter等人，(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285；Presta等人，(1993) J. Immunol., 151: 2623)。

另外重要的為，抗體經人類化而保持對抗原之高親和力及其他有利生物學性質。為達該目標，根據一種方法，藉由使用親本序列及

人類化序列之三維模型分析親本序列及各種概念上之人類化產物的方法來製備人類化抗體。三維免疫球蛋白模型通常為可用者且為熟習此項技術者所熟悉。說明及呈現所選候選免疫球蛋白序列之可能三維構形結構之電腦程式為可用者。該等呈現之檢驗允許分析在候選免疫球蛋白序列起作用時殘基之可能作用，亦即分析影響候選免疫球蛋白與其抗原結合之能力的殘基。以該方式，可自受體及輸入序列選擇FR殘基且使其組合，以便達成所要抗體特徵，諸如對標靶增加之親和力。一般而言，高變區殘基直接且大多數大體上涉及對抗原結合之影響。

人類抗體

人類抗KL β 抗體可藉由將選自人類衍生噬菌體呈現庫之Fv純系可變域序列與如上所述之已知人類恆定域序列組合來建構。或者，人類單株抗KL β 抗體可藉由融合瘤方法製得。用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類異源骨髓瘤細胞株已(例如)由以下文獻描述：Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984)；Brodeur等人，Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications，第51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；及Boerner等人，J. Immunol., 147: 86 (1991)。

現可能產生免疫後能夠在不存在內源免疫球蛋白產生之情況下產生人類抗體之完全庫的轉殖基因動物(例如小鼠)。舉例而言，已描述嵌合及生殖系突變體小鼠中之抗體重鏈連接區(JH)基因的純合子缺失引起對於內源抗體產生之完全抑制。將人類生殖系免疫球蛋白基因陣列轉移至該生殖系突變體小鼠體內，將在抗原攻毒後引起人類抗體之產生。參見(例如)Jakobovits等人，Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 2551 (1993)；Jakobovits等人，Nature, 362: 255 (1993)；Bruggermann等人，Year in Immunol., 7: 33 (1993)。

亦可使用基因改組自非人類(例如齧齒動物)抗體獲得人類抗體，其中人類抗體具有與起始非人類抗體類似之親和力及特異性。根據該方法(其亦稱為"抗原決定基印記法")，藉由如上所述之噬菌體呈現技術所獲得之非人類抗體片段之重鏈或輕鏈可變區經人類V域基因之庫置換，產生非人類鏈/人類鏈scFv或Fab嵌合體之群體。用抗原之選擇引起非人類鏈/人類鏈嵌合scFv或Fab之分離，其中人類鏈恢復在移除初級噬菌體呈現純系中之相應非人類鏈後破壞之抗原結合位點，亦即抗原決定基決定(印記)對於人類鏈搭配物之選擇。當重複該方法以置換剩餘非人類鏈時，獲得人類抗體(參看1993年4月1日公開之PCT WO 93/06213)。與藉由CDR移植傳統人類化非人類抗體不同，該技術提供不具有非人類來源之FR或CDR殘基的完整人類抗體。

雙特異性抗體

雙特異性抗體為對至少2種不同抗原具有結合特異性之單株抗體，較佳為人類或人類化抗體。在一實施例中，結合特異性之一係針對KLβ且另一者係針對其他任何抗原。示範性雙特異性抗體可結合於KLβ蛋白質之2個不同抗原決定基。雙特異性抗體亦可用以使細胞毒素劑定位於表現KLβ之細胞。該等抗體擁有KLβ結合臂及結合細胞毒素劑(例如，沙泊寧(saporin)、抗干擾素-α、長春花生物鹼、蓖麻毒素A鏈、甲胺喋呤或放射性同位素半抗原)之臂。雙特異性抗體可製備為全長抗體或抗體片段(例如F(ab')₂雙特異性抗體)。

製造雙特異性抗體之方法在此項技術中已知。傳統上，雙特異性抗體之重組產生基於2個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之共同表現，其中2個重鏈具有不同特異性(Milstein及Cuello，Nature，305：537(1983))。由於免疫球蛋白重鏈及輕鏈之隨機分配，該等融合瘤(四源雜交瘤(quadromas))產生10種不同抗體分子之潛在混合物，其中僅一種具有正確雙特異性結構。通常藉由親和層析步驟進行之正確分子之

純化相當繁瑣，且產物產率低。相似程序揭示於1993年5月13日公開之WO 93/08829中及Traunecker等人，EMBO J., 10: 3655 (1991)中。

根據不同及更佳方法，將具有所要結合特異性(抗體-抗原組合位點)之抗體可變域與免疫球蛋白恆定域序列融合。融合較佳係與包含至少部分鉸鏈區、CH₂及CH₃區之免疫球蛋白重鏈恆定域之融合。較佳為在融合物之至少一者中存在含有輕鏈結合所必需之位點之第一重鏈恆定區(CH₁)。將編碼免疫球蛋白重鏈融合物及若需要免疫球蛋白輕鏈之DNA插入獨立表現載體中，且隨後共同轉染至適合宿主生物體中。當在建構中所使用之3個多肽鏈之不等比率提供最佳產率時，其提供在實施例中調整3個多肽片段之相互比例的極大靈活性。然而，當呈相等比率之至少2個多肽鏈之表現產生高產率或當比率並非特別重要時，可能將2個或全部3個多肽鏈之編碼序列插入1個表現載體中。

在該方法之一較佳實施例中，雙特異性抗體由在一臂中之具有第一結合特異性之雜交免疫球蛋白重鏈及在另一臂中之雜交免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(提供第二結合特異性)組成。已發現由於免疫球蛋白輕鏈僅存在於一半雙特異性分子中提供一種簡便分離方式，所以該不對稱結構促進所要雙特異性化合物與非所要免疫球蛋白鏈組合之分離。該方法揭示於WO 94/04690中。對產生雙特異性抗體之其他細節，參見(例如)Suresh等人，Methods in Enzymology, 121:210 (1986)。

根據另一方法，可工程化一對抗體分子間之介面以使自重組細胞培養物回收之異源二聚體之百分比最大化。較佳介面包含抗體恆定域之C_H3域之至少一部分。以該方法，使來自第一抗體分子之介面之一或多個小胺基酸側鏈經較大側鏈(例如，酪胺酸或色胺酸)置換。尺寸與大側鏈相同或相似之互補"空腔"藉由將大胺基酸側鏈置換為較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)而產生於第二抗體分子之介面上。

其提供一種使異源二聚體之產率增加超過其他非所要終點產物(諸如同源二聚體)的機制。

雙特異性抗體包括交聯抗體或"異源結合"抗體。舉例而言，異源結合物中之抗體之一可與抗生物素蛋白偶合，另一抗體與生物素偶合。已建議該等抗體(例如)將免疫系統細胞靶向非所要細胞(美國專利第4,676,980號)，且用於治療HIV感染(WO 91/00360、WO 92/00373及EP 03089)。異源結合抗體可使用任何便利之交聯方法製得。適合交聯劑在此項技術中熟知，且連同許多交聯技術一起揭示於美國專利第4,676,980號中。

自抗體片段產生雙特異性抗體之技術亦已描述於文獻中。舉例而言，可使用化學鍵聯製備雙特異性抗體。Brennan等人，*Science*, 229: 81 (1985)描述一種完整抗體經蛋白質裂解以產生F(ab')₂片段之程序。在二硫醇複合劑亞砷酸鈉存在下還原該等片段，以穩定鄰近二硫醇且防止分子間二硫鍵形成。隨後，將所產生之Fab'片段轉化成硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。隨後藉由用巰基乙胺之還原將Fab'-TNB衍生物之一再轉化成Fab'-硫醇，且將其與等莫耳量之另一Fab'-TNB衍生物混合以形成雙特異性抗體。所產生之雙特異性抗體可用作用於選擇性固定酶之試劑。

近期之發展已促進自大腸桿菌直接回收Fab'-SH片段，其可經化學偶合以形成雙特異性抗體。Shalaby等人，*J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)描述完全人類化雙特異性抗體F(ab')₂分子之產生。大腸桿菌獨立地分泌各Fab'片段且使其經受活體外定向化學偶合以形成雙特異性抗體。因此形成之雙特異性抗體能夠與過度表現HER2受體之細胞及正常人類T細胞結合，且觸發人類細胞毒性淋巴細胞對人類乳房腫瘤標靶之溶解活性。

亦已描述直接自重組細胞培養物製造及分離雙特異性抗體片段

之各種技術。舉例而言，已使用白胺酸拉鏈產生雙特異性抗體。Kostelny等人，J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)。藉由基因融合將來自Fos及Jun蛋白質之白胺酸拉鏈肽與2種不同抗體之Fab'部分連接。在鉸鏈區還原抗體同源二聚體以形成單體，且隨後使其再氧化以形成抗體異源二聚體。該方法亦可用於產生抗體同源二聚體。藉由Hollinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)所述之"雙功能抗體"技術已提供製造雙特異性抗體片段之替代機制。該等片段包含藉由連接子連接於輕鏈可變域(VL)之重鏈可變域(VH)，該連接子過短以致不允許同一鏈上之2個域之間配對。因此，迫使一個片段之VH及VL域與另一片段之互補VL及VH域配對，進而形成2個抗原結合位點。亦已報導另一藉由使用單鏈Fv(sFv)二聚體來製造雙特異性抗體片段之策略。參見Gruber等人，J. Immunol., 152:5368 (1994)。

涵蓋具有2價以上之抗體。舉例而言，可製備三特異性抗體。Tutt等人，J. Immunol. 147: 60 (1991)。

多價抗體

多價抗體可藉由表現與抗體結合之抗原之細胞而比二價抗體更快內化(及/或異化)。本發明之抗體可為具有3個或3個以上抗原結合位點之多價抗體(其不同於IgM類別)(例如四價抗體)，其可容易地藉由重組表現編碼抗體多肽鏈之核酸來產生。多價抗體可包含二聚域及3個或3個以上抗原結合位點。較佳二聚域包含Fc區或鉸鏈區或由Fc區或鉸鏈區組成。在該情形下，抗體將包含Fc區及3個或3個以上在Fc區胺基末端之抗原結合位點。本文中之較佳多價抗體包含3至約8個、但較佳4個抗原結合位點或由3至約8個、但較佳4個抗原結合位點組成。多價抗體包含至少一條多肽鏈(且較佳2條多肽鏈)，其中多肽鏈包含兩個或兩個以上可變域。舉例而言，多肽鏈可包含VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc，其中VD1為第一可變域，VD2為第二可變域，Fc為Fc區之

一多肽鏈，X1及X2表示胺基酸或多肽，且n為0或1。舉例而言，多肽鏈可包含：VH-CH1-可撓性連接子-VH-CH1-Fc區鏈；或VH-CH1-VH-CH1-Fc區鏈。本文中之多價抗體較佳另外包含至少2個(且較佳4個)輕鏈可變域多肽。本文之多價抗體可(例如)包含約2個至約8個輕鏈可變域多肽。在此涵蓋之輕鏈可變域多肽包含輕鏈可變域且視需要另外包含CL域。

抗體變異體

在一些實施例中，涵蓋本文中所述之抗體之胺基酸序列修飾。舉例而言，可需要改良抗體之結合親和力及/或其他生物學性質。抗體之胺基酸序列變異體藉由將適當核苷酸改變引入抗體核酸中或藉由肽合成來製備。該等修飾包括(例如)抗體胺基酸序列內之殘基缺失及/或插入及/或取代。進行缺失、插入及取代之任何組合以達到最終構築體，其限制條件為最終構築體擁有所要特徵。可在製造序列時將胺基酸改變引入本發明抗體胺基酸序列中。

識別為用於突變之較佳位置之抗體的某些殘基或區域之適用方法稱為"丙胺酸掃描突變"，其如Cunningham及Wells (1989) Science, 244:1081-1085所述。在此，識別殘基或標靶殘基之群(例如，帶電殘基，諸如arg、asp、his、lys及glu)且藉由中性或帶負電胺基酸(最佳為丙胺酸或聚丙胺酸)將其置換以影響胺基酸與抗原之相互作用。隨後，藉由在取代位點處或為取代位點引入其他變異體以改進證明對取代具有功能敏感性之彼等胺基酸位置。因此，雖然預定用於引入胺基酸序列變化之位點，但是突變之性質本身無需預定。舉例而言，為分析給定位點之突變效能，在標靶密碼子或區域進行ala掃描或隨機突變且對所要活性篩選所表現之免疫球蛋白。

胺基酸序列插入物包括長度在1個殘基至含有100個或100個以上殘基之多肽範圍變化之胺基及/或羧基末端融合物，以及具有單一或多個胺基酸殘基之序列內插入物。末端插入物之實例包括具有N末端

甲硫胺醯基殘基之抗體或與細胞毒素多肽融合之抗體。抗體分子之其他插入變異體包括抗體之N末端或C末端與酶(例如，對於ADEPT而言)或增加抗體之血清半衰期之多肽的融合物。

另一類型之抗體胺基酸變異體改變抗體之原始糖基化模式。該改變包括缺失抗體中所見之一或多個碳水化合物部分及/或添加一或多個抗體中不存在之糖基化位點。

多肽之糖基化通常為N連接或O連接。N連接係指碳水化合物部分與天冬醯胺殘基之側鏈連接。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-蘇胺酸(其中X為除脯胺酸以外之任何胺基酸)為用於碳水化合物部分與天冬醯胺側鏈之酶促連接之識別序列。因此，多肽中該等三肽序列任一者之存在產生潛在糖基化位點。O連接糖基化係指糖N-乙醯基半乳胺糖、半乳糖或木糖中之一者與羥基胺基酸連接，儘管亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸，但是該羥基胺基酸最通常為絲胺酸或蘇胺酸。

藉由改變胺基酸序列以使其含有上述三肽序列中之一或多者來方便地完成向抗體添加糖基化位點(對於N連接糖基化位點而言)。亦可藉由將一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基添加至原始抗體之序列或經其取代來進行改變(對O連接糖基化位點而言)。

在抗體包含Fc區時，可改變連接於其上之碳水化合物。舉例而言，具有缺乏連接於抗體Fc區之海藻糖之成熟碳水化合物結構的抗體描述於美國專利申請案第US 2003/0157108號(Presta, L.)中。亦參見US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。在連接於抗體Fc區之碳水化合物中具有對分N-乙醯葡萄糖胺(GlcNAc)之抗體在Jean-Mairet等人之WO 2003/011878及Umana等人之美國專利第6,602,684號中提及。在連接於抗體Fc區之寡醣中具有至少1個半乳糖殘基之抗體報導於Patel等人之WO 1997/30087中。有關具有連接於其Fc區之經改變碳

水化合物的抗體，亦可參看 WO 1998/58964 (Raju, S.) 及 WO 1999/22764 (Raju, S.)。關於具有經修飾糖基化之抗原結合分子，亦參見 US 2005/0123546 (Umana等人)。

本文中之較佳糖基化變異體包含Fc區，其中連接於Fc區之碳水化合物結構缺乏海藻糖。該等變異體具有改良之ADCC功能。視需要，Fc區中另外包含一或多處進一步改良ADCC之胺基酸取代，例如Fc區298、333及/或334位置(殘基之EU編號)處之取代。與"去海藻糖基(defucosylated)"或"缺乏海藻糖"抗體有關之公開案之實例包括：US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO 2005/053742；Okazaki等人，J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki等人，Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)。產生去海藻糖基抗體之細胞株之實例包括蛋白質海藻糖基化不足之Lec13 CHO細胞(Ripka等人，Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)；Presta, L之美國專利申請案第US 2003/0157108 A1號；及Adams等人之WO 2004/056312 A1，尤其實例11)，及剔除細胞株，諸如 α -1,6-海藻糖基轉移酶基因、FUT8、剔除CHO細胞(Yamane-Ohnuki等人，Biotech. Bioeng. 87:614 (2004))。

另一類型之變異體為胺基酸取代變異體。該等變異體在抗體分子中具有至少一個經不同殘基置換之胺基酸殘基。最受關注之取代突變位點包括高變區，但亦涵蓋FR改變。保守取代以標題"較佳取代"展示於表1中。若該等取代引起生物活性改變，則可引入更多實質性修改，其在表1中命名為"例示性取代"或下文參考胺基酸類進一步描述；且篩選產物。

表 1

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

對抗體生物學性質之實質修飾可藉由選擇取代來完成，該等取代在其對維持以下者之效應中顯著不同：(a)取代區域中多肽骨架之結構，例如，呈摺疊片或螺旋構形；(b)分子在標靶位點處之電荷或

疏水性；或(c)大部分側鏈。天然存在之殘基基於共同側鏈性質而分群：

(1)疏水性：正白胺酸、met、ala、val、leu、ile；

(2)中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(3)酸性：asp、glu；

(4)鹼性：his、lys、arg；

(5)影響鏈定向之殘基：gly、pro；及

(6)芳族：trp、tyr、phe。

非保守取代將需要使該等種類之一的成員交換另一種類的成員。

一種類型之取代變異體涉及取代親本抗體(例如人類化抗體或人類抗體)之一或多個高變區殘基。通常，針對進一步開發選擇之所得變異體應相對於產生其之親本抗體具有改良之生物學性質。產生該等取代變異體之適宜路線涉及使用噬菌體呈現之親和力成熟。簡言之，使若干高變區位點(例如6-7個位點)突變，以於各位點處產生所有可能之胺基酸取代。因此產生之抗體在與包裝於各粒子內之M13之基因III產物融合時自絲狀噬菌體粒子呈現。隨後，針對如本文所揭示之抗體之生物活性(例如結合親和力)篩選經噬菌體呈現之變異體。為識別用於修飾之候選高變區位點，可執行丙胺酸掃描突變以識別顯著有助於抗原結合之高變區殘基。或者或另外，其可有益於分析抗原-抗體複合物之晶體結構以識別抗體與抗原之間的接觸點。該等接觸殘基及鄰近殘基為用於根據本文中詳述之技術取代的候選物。一旦產生該等變異體，則如本文所述使變異體組經受篩選，且可在一或多個相關檢定中選擇具有優越性質之抗體用於進一步開發。

編碼抗體之胺基酸序列變異體之核酸分子係藉由此項技術中已知之各種方法製備。該等方法包括(但不限於)自天然源分離(在天然存

在胺基酸序列變異體之狀況下)，或藉由寡核苷酸介導(或定點)突變、PCR突變及抗體之較早製備之變異體或非變異體版本的卡匣突變製備。

可需要將一或多個胺基酸修飾引入免疫球蛋白多肽之Fc區中，進而產生Fc區變異體。Fc區變異體可包含在一或多個包括鉸鏈半胱胺酸之彼位置之胺基酸位置處包含胺基酸修飾(例如取代)之人類Fc區序列(例如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)。

根據本說明及此項技術之教示，預期在一些實施例中，與野生型對應物抗體相比，本發明之方法中之所用抗體可包含一或多個例如在Fc區中之改變。儘管如此，該等抗體將保留與其野生型對應物相比，大體上相同之治療實用性所需之特徵。舉例而言，據認為，某些改變可在Fc區中製得，其將(例如)如WO 99/51642中所述，產生經改變(亦即改良或減少)之C1q結合及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)。關於Fc區變異體之其他實例，亦參見Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988)；美國專利第5,648,260號；美國專利第5,624,821號；及WO 94/29351。WO 00/42072 (Presta)及WO 2004/056312 (Lowman)描述具有與FcR改良或減弱之結合之抗體變異體。該等專利公開案之內容以引用之方式特定併入本文。亦參見Shields等人，J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)。具有增加半衰期及與新生兒Fc受體(FcRn)改良之結合之抗體描述於US 2005/0014934 A1 (Hinton等人)中，該新生兒Fc受體對母體IgG向胎兒之轉移負責(Guyer等人，J. Immunol. 117:587 (1976)及Kim等人，J. Immunol. 24:249 (1994))。該等抗體包含Fc reg，其上具有一或多個改良Fc區與FcRn之結合之取代。具有經改變Fc區之胺基酸序列及增加或降低之C1q結合能力之多肽變異體描述於美國專利第6,194,551 B1號、WO 99/51642中。彼等專利公開案之內容以引用之方式特定併入本文。亦參見Idusogie等人，J. Immunol.

164: 4178-4184 (2000)。

抗體衍生物

可進一步修飾本發明之抗體使其含有此項技術中已知且可易獲得之額外非蛋白部分。較佳地，適於抗體之衍生之部分為水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、聚-1,3-二氧戊環、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)及葡聚糖或聚(N-乙基吡咯啉酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛因其於水中之穩定性而可於製造時具有優勢。聚合物可具有任何分子量，且可具支鏈或不具支鏈。連接於抗體之聚合物的數量可變化，且若連接一種以上聚合物，則其可為相同或不同分子。一般而言，用於衍生作用之聚合物之數量及/或類型可基於包括(但不限於)欲改良抗體之特定性質或功能、抗體衍生物是否將用於指定條件下之療法等考慮來確定。

載體、宿主細胞及重組方法

對於抗體之重組產生而言，編碼其之核酸經分離且插入至可複製載體中以便進一步選殖(擴增DNA)或表現。編碼抗體之DNA易於分離且使用習知程序(例如，藉由使用能夠特異性結合於編碼抗體之重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)來定序。許多載體為可用者。載體之選擇部分視所使用之宿主細胞而定。通常，較佳宿主細胞具有原核或真核(通常為哺乳動物)起源。應瞭解，任何同型之恆定區可用於該目的，包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恆定區，且該等恆定區可自任何人類或動物物種獲得。

a.使用原核宿主細胞產生抗體：

i. 載體建構

編碼抗體之多肽組分之聚核苷酸序列可使用標準重組技術獲得。可自諸如融合瘤細胞之產生抗體之細胞分離且定序所要聚核苷酸序列。或者，可使用核苷酸合成器或PCR技術合成聚核苷酸。一旦獲得，則將編碼多肽之序列插入能夠在原核宿主中複製且表現異源聚核苷酸之重組載體中。對於本發明之目的而言，可使用此項技術中可用且已知之許多載體。適當載體之選擇將主要視欲插入載體中之核酸尺寸及經載體轉形之特定宿主細胞而定。各載體含有各種組分，視其功能(異源聚核苷酸之擴增或表現或兩者)及其與其所駐留之特定宿主細胞的相容性而定。載體組分通常包括(但不限於)：複製起點、選擇標記基因、啟動子、核糖體結合位點(RBS)、信號序列、異源核酸插入物及轉錄終止序列。

一般而言，含有得自可與宿主細胞相容之物種之複製子及控制序列的質體載體連同該等宿主一起使用。載體通常載有複製位點以及能夠在經轉形細胞中提供表型選擇之標記序列。舉例而言，大腸桿菌通常使用pBR322(一種得自大腸桿菌物種之質體)來轉形。pBR322含有編碼安比西林(ampicillin, Amp)及四環素(tetracycline, Tet)抗性之基因，且因此提供用於識別轉形細胞之簡易方式。pBR322、其衍生物或其他微生物質體或細菌噬菌體亦可含有或經修飾以含有啟動子，其可藉由用於表現內生蛋白質之微生物體使用。用於表現特定抗體之pBR322衍生物之實例詳細描述於Carter等人，美國專利第5,648,237號中。

另外，含有可與宿主微生物相容之複製子及控制序列的噬菌體載體可作為轉形載體連同該等宿主一起使用。舉例而言，可利用諸如λGEM.TM.-11之細菌噬菌體製造可用以轉形諸如大腸桿菌LE392之敏感宿主細胞的重組載體。

表現載體可包含兩個或兩個以上啓動子-順反子對，其編碼多肽組分之各組分。啓動子爲位於調節其表現之順反子上游(5')之未經轉譯的調節序列。原核啓動子通常分爲兩類，亦即可誘導啓動子及構成性啓動子。可誘導啓動子爲在其對培養條件之改變(例如養分存在與否或溫度改變)作出回應之控制下引發順反子之轉錄量增加之啓動子。

大量藉由多種潛在宿主細胞所識別之啓動子爲熟知的。藉由經限制酶消化自源DNA移除啓動子且將經分離啓動子序列插入載體中，可將所選擇之啓動子可操作地連接於編碼輕鏈或重鏈之順反子DNA。天然啓動子序列及許多異源啓動子可用以引導標靶基因之擴增及/或表現。在一些實施例中，利用異源啓動子，因爲與天然標靶多肽啓動子相比，其通常允許經表現之標靶基因之更大程度轉錄且產率更高。

適於供原核宿主使用之啓動子包括PhoA啓動子、 β -半乳糖酶及乳糖啓動子系統、色胺酸(trp)啓動子系統及雜交啓動子，諸如tac或trc啓動子。然而，在細菌中具有功能性之其他啓動子(諸如其他已知之細菌或噬菌體啓動子)亦適用。已公開其核苷酸序列，進而使熟習此項技術者能使用供應任何所需限制位點之連接子或接附子可操作地將其連接於編碼標靶輕鏈及重鏈之順反子(Siebenlist等人(1980) Cell 20 : 269)。

在一態樣中，重組載體內之各順反子均包含引導經表現之多肽跨膜移位之分泌信號序列組分。一般而言，信號序列可爲載體之組分，或其可爲插入載體中之標靶多肽DNA之部分。出於本發明之目的選擇之信號序列應爲藉由宿主細胞識別及處理(亦即藉由信號肽酶分裂)之信號序列。對不識別及處理異源多肽之天然信號序列的原核宿主細胞而言，信號序列經(例如)選自由以下者組成之群之原核信號序列取代：鹼性磷酸酶、青黴素酶(penicillinase)、Ipp或熱穩定性腸毒

素II(STII)前導子、LamB、PhoE、PelB、OmpA及MBP。在一實施例中，用於表現系統之2種順反子中之信號序列為STII信號序列或其變異體。

在另一態樣中，根據本發明之免疫球蛋白的產生可於宿主細胞之細胞質中發生，且因此無需各順反子內均存在分泌信號序列。就此而言，免疫球蛋白輕鏈及重鏈均在細胞質內表現、摺疊且組裝以形成功能性免疫球蛋白。某些宿主菌株(例如大腸桿菌Gene, 159:203 (1995)。

適於表現抗體之原核宿主細胞包括古細菌(Archaeobacteria)及真細菌(Eubacteria)，諸如革蘭氏陰性(Gram-negative)或革蘭氏陽性生物體。適用細菌之實例包括埃希氏菌屬(*Escherichia*)(例如大腸桿菌)、桿菌屬(例如枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*))、腸道細菌、假單胞菌屬物種(例如綠膿桿菌(*P. aeruginosa*)、鼠傷寒沙門氏桿菌(*Salmonella typhimurium*)、黏質沙雷氏菌(*Serratia marcescans*)、克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)、變形桿菌屬(*Proteus*)、志賀桿菌屬(*Shigella*)、根瘤菌屬(*Rhizobia*)、透明顫菌(*Vitreoscilla*)或副球菌屬(*Paracoccus*)。在一實施例中，使用革蘭氏陰性細胞。在一實施例中，大腸桿菌細胞作為宿主用於本發明。大腸桿菌菌株之實例包括菌株 W3110(Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*，第2卷(Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987)，第1190-1219頁；ATCC寄存編號 27,325)及其衍生物，包括具有基因型 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR之菌株 33D3(美國專利第 5,639,635 號)。其他菌株及其衍生物，諸如大腸桿菌 294(ATCC 31,446)、大腸桿菌 B、大腸桿菌 λ 1776 (ATCC 31,537)及大腸桿菌 RV308 (ATCC 31,608)亦為適用的。該等實例為說明性的而非限制性

的。建構具有限定基因型之上述細菌之任何者的衍生物之方法在此項技術中已知且描述於(例如)Bass等人，*Proteins*, 8:309-314 (1990)中。通常需要考慮複製子在細菌細胞中之可複製性來選擇適當細菌。舉例而言，當使用熟知質體，諸如pBR322、pBR325、pACYC177或pKN410以供應複製子時，大腸桿菌、沙雷氏菌(*Serratia*)或沙門氏菌(*Salmonella*)物種可適於用作宿主。通常，宿主細胞應分泌最小量之蛋白水解酶，且可需要將額外蛋白酶抑制劑併入細胞培養物中。

ii. 抗體產生

將宿主細胞用上述表現載體轉形，且將其經針對誘導啟動子、選擇轉形體或擴增編碼所要序列之基因而適當改質的習知營養培養基中培養。

轉形意謂將DNA引入原核宿主中以使DNA可作為染色體外元件或藉由染色體成分來複製。視所用宿主細胞而定，使用適於該等細胞之標準技術進行轉形。使用氯化鈣之鈣處理通常用於含有實質細胞壁障壁之細菌細胞。另一轉形方法使用聚乙二醇/DMSO。另一所用技術為電穿孔。

將用以產生多肽之原核細胞在此項技術中已知且適於培養所選擇之宿主細胞的培養基中生長。合適培養基之實例包括蛋白胰肉湯(luria broth; LB)加必需的營養補充物。在一些實施例中，培養基亦含有基於表現載體之建構而選擇之選擇劑，其用以選擇性允許含有表現載體之原核細胞的生長。舉例而言，將安比西林添加至培養基中以使表現安比西林抗性基因之細胞生長。

亦可包括單獨或呈與另一種補充物或培養基之混合物(諸如複合氮源)以適當濃度引入的除碳、氮及無機磷酸鹽來源外之任何必需補充物。視需要，培養基可含有一或多種選自由以下者組成之群之還原劑：麩胱甘肽、半胱胺酸、胱胺、巯基乙醇酸酯、二硫赤藻糖醇及二

硫蘇糖醇。

將原核宿主細胞在合適溫度下培養。對大腸桿菌生長而言，(例如)較佳溫度範圍在約20℃至約39℃，更佳約25℃至約37℃之範圍變化，甚至更佳在約30℃下。培養基之pH可為在約5至約9之範圍變化之任何pH，其主要視宿主生物體而定。對大腸桿菌而言，pH較佳為約6.8至約7.4，且更佳約7.0。

若可誘導啟動子用於表現載體中，則在適於活化該啟動子之條件下誘導蛋白質表現。在一態樣中，PhoA啟動子用於控制多肽之轉錄。因此，將經轉形之宿主細胞在磷酸鹽限制性培養基中培養以用於誘導。較佳地，磷酸鹽限制培養基為C.R.A.P培養基(參見(例如)Simmons等人，J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147)。如此項技術中所知，可根據所使用之載體構築體使用各種其他誘導物。

在一實施例中，本發明之經表現多肽分泌至宿主細胞周質中且自其回收。蛋白質回收通常涉及通常藉由諸如滲透壓休克(osmotic shock)、超音波處理或溶解之方式破壞微生物。一旦破壞細胞，則可藉由離心或過濾移除細胞碎片或整個細胞。可進一步(例如)藉由親和樹脂層析純化蛋白質。或者，可將蛋白質轉運至培養基中且於其中進行分離。可將細胞自培養物移除，且過濾培養物上清液且濃縮以進一步純化所產生之蛋白質。可進一步分離經表現之多肽且使用諸如聚丙烯醯胺凝膠電泳(PAGE)及西方墨點檢定之通常已知的方法來識別。

在一態樣中，大量抗體產生藉由醱酵方法進行。各種大規模進料-分批醱酵程序可用於產生重組蛋白質。大規模醱酵具有至少1,000公升之容量，較佳約1,000至100,000公升之容量。該等醱酵罐使用攪拌器葉輪分配氧及養分，尤其葡萄糖(較佳碳/能量來源)。小規模醱酵通常係指在不超過大致100公升之容量且可在約1公升至約100公升範圍變化之醱酵罐中之醱酵。

在醱酵方法中，通常在細胞已於合適條件下生長至所要密度(例如OD550為約180至220)後引發對蛋白質表現之誘導，在該階段細胞處於穩定期早期。如此項技術中所知及上文所述，可根據所使用之載體構築體使用各種其他誘導物。可於誘導前使細胞生長一段較短之時期。儘管可使用較長或較短之誘導時間，但通常誘導細胞歷時約12至50小時。

為改良多肽之生產產率及品質，可修改各種醱酵條件。舉例而言，為改良經分泌抗體多肽之適當組裝及摺疊，可使用過度表現伴隨蛋白之額外載體共轉形宿主原核細胞，該等伴隨蛋白諸如Dsb蛋白(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD及/或DsbG)或FkpA(具有伴隨活性之肽基脯胺醯基順反異構酶)。已證實伴隨蛋白促進細菌宿主細胞中所產生之異源蛋白之適當摺疊及溶解性。Chen等人，(1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605；Georgiou等人，美國專利第6,083,715號；Georgiou等人，美國專利第6,027,888號；Bothmann及Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105；Ramm及Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113；Arie等人，(2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210。

為最小化經表現異源蛋白(尤其對蛋白水解敏感之彼等蛋白)之蛋白水解，可將某些蛋白水解酶缺陷性宿主菌株用於本發明。舉例而言，可修飾宿主細胞菌株以實現編碼已知細菌蛋白酶(諸如蛋白酶III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶I、蛋白酶Mi、蛋白酶V、蛋白酶VI及其組合)之基因的遺傳突變。一些大腸桿菌蛋白酶缺陷性菌株為可用的且描述於(例如)Joly等人，(1998)，同上；Georgiou等人，美國專利第5,264,365號；Georgiou等人，美國專利第5,508,192號；Hara等人，*Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996)中。

在一實施例中，使用蛋白水解酶缺陷性且經過度表現一或多種伴隨蛋白之質體轉形的大腸桿菌菌株作為表現系統中的宿主細胞。

iii. 抗體純化

可使用此項技術中已知之標準蛋白質純化方法。以下程序為示範性合適純化程序：免疫親和力或離子交換柱分餾、乙醇沈澱、逆相HPLC、矽石層析或諸如DEAE之陽離子交換樹脂層析、等電聚焦層析(chromatofocusing)、SDS-PAGE、硫酸銨沈澱及使用(例如)Sephadex G-75之凝膠過濾。

在一態樣中，將固定於固相上之蛋白質A用於全長抗體產物之免疫親和力純化。蛋白質A為來自金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)之41 kD細胞壁蛋白，其以高親和力與抗體之Fc區結合。Lindmark等人(1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13。蛋白質A固定於其之固相較佳為包含玻璃或矽石表面之管柱，更佳為受控有孔玻璃管柱或矽酸管柱。在一些應用中，管柱經諸如甘油之試劑塗佈以求防止污染物之非特異性黏附。

作為純化之第一步驟，將如上所述得自細胞培養物之製劑應用至固定蛋白質A之固相上，以使得所關注之抗體特異性結合蛋白質A。隨後洗滌固相以移除非特異性結合於固相之污染物。最終，所關注之抗體藉由溶離自固相回收。

b. 使用真核宿主細胞產生抗體：

載體組分通常包括(但不限於)以下一或多者：信號序列、複製起點、一或多個標記基因、強化子元件、啟動子及轉錄終止序列。

(i) 信號序列組分

用於真核宿主細胞中之載體亦可含有信號序列或在所關注之成熟蛋白質或多肽之N末端具有特異性分裂位點的其他多肽。所選擇之異源信號序列較佳為藉由宿主細胞識別及處理(亦即藉由信號肽酶分裂)之信號序列。在哺乳動物細胞表現中，哺乳動物信號序列以及病毒分泌前導子(例如單純性疱疹gD信號)為可用的。

該前驅區之DNA在閱讀框架中與編碼抗體之DNA連接。

(ii) 複製起點

通常，哺乳動物表現載體無需複製起點組分。舉例而言，通常可使用SV40起點僅因其含有早期啟動子。

(iii) 選擇基因組分

表現及選殖載體可含有選擇基因，亦稱為可選擇標記。典型選擇基因編碼蛋白質(a)賦予對於抗生素或其他毒素(例如安比西林、新黴素(neomycin)、甲胺喋呤或四環素)之抗性，(b)補充其中有關之營養缺陷，或(c)提供不可自複合培養基獲得之關鍵養分。

選擇流程之一實例利用藥物以停滯宿主細胞之生長。經異源基因成功轉形之彼等細胞產生賦予藥物抗性之蛋白質且因此在選擇方案中存活。該顯性選擇之實例使用藥物新黴素、黴酚酸及濕黴素(hygromycin)。

適用於哺乳動物細胞之可選擇標記之另一實例為使得能夠識別可勝任吸收抗體核酸之細胞的彼等標記，諸如DHFR、胸苷激酶、金屬硫蛋白-I及II(較佳為靈長類動物金屬硫蛋白基因)、腺苷脫胺酶、鳥胺酸脫羧酶等。

舉例而言，首先藉由在含有甲胺喋呤(Mtx)(DHFR之競爭性拮抗劑)之培養基中培養所有轉化體來識別經DHFR選擇基因轉形的細胞。適當宿主細胞在使用野生型DHFR時為缺乏DHFR活性之中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株(例如，ATCC CRL-9096)。

或者，可藉由在含有可選擇標記之選擇劑(諸如胺基糖苷抗生素，例如康黴素(kanamycin)、新黴素或G418)的培養基中進行細胞生長來選擇經編碼抗體之DNA序列、野生型DHFR蛋白及另一可選擇標記(諸如胺基糖苷3'-磷酸轉移酶(APH))轉形或共轉形之宿主細胞(尤其含有內源DHFR之野生型宿主)。參見美國專利第4,965,199號。

(iv) 啓動子組分

表現及選殖載體通常含有由宿主生物體識別且可操作地連接於抗體多肽核酸之啓動子。已知用於真核生物之啓動子序列。實際上，所有真核基因均具有位於距引發轉錄處之位點之上游大致25至30個鹼基處的AT-富集區域。見於許多基因之轉錄起始處上游70至80個鹼基處之另一序列爲CNCAAT區域，其中N可爲任何核苷酸。大多數真核基因之3'端處爲AATAAA序列，該序列可爲編碼序列之3'末端添加poly A尾之信號。所有該等序列均適於插入真核表現載體中。

在哺乳動物宿主細胞中自載體之抗體多肽轉錄(例如)受自病毒(諸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(諸如腺病毒2)、牛乳頭狀瘤病毒、禽肉瘤病毒、細胞巨大病毒、逆轉錄病毒、B型肝炎病毒及猿病毒40(SV40))基因組，自異源哺乳動物啓動子(例如肌動蛋白啓動子或免疫球蛋白啓動子)，自熱休克啓動子獲得的啓動子控制，其限制條件爲該等啓動子可與宿主細胞系統相容。

便利地獲得SV40病毒之早期及晚期啓動子，其爲亦含有SV40病毒複製起點之SV40限制片段。便利地獲得人類細胞巨大病毒之直接早期啓動子，其爲HindIII E限制片段。在使用牛乳頭狀瘤病毒作爲載體之哺乳動物宿主中表現DNA之系統揭示於美國專利第4,419,446號中。該系統之修改描述於美國專利第4,601,978號中。或者，勞氏肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus)長末端重複序列可用作啓動子。

(v) 強化子元件組分

由高級真核生物對編碼本發明抗體多肽之DNA的轉錄常常藉由將強化子序列插入載體中來增加。現已知許多來自哺乳動物基因(血球蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、 α -胎蛋白及胰島素)之強化子序列。然而，熟習此項技術者通常將使用來自真核細胞病毒之強化子。實例包括複製起點(bp 100-270)後側上之SV40強化子、細胞巨大病毒早期

啓動子強化子、複製起點後側上之多形瘤強化子及腺病毒強化子。關於用於活化真核啓動子之增強元件，亦參見Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)。可將強化子在抗體多肽編碼序列之5'或3'位置處剪接至載體中，但其較佳位於離啓動子之5'位置處。

(vi)轉錄終止組分

用於真核宿主細胞中之表現載體通常亦含有終止轉錄且穩定mRNA所必需之序列。該等序列通常可自真核或病毒DNA或cDNA之5'且偶而3'非轉譯區域獲得。該等區域含有轉錄爲編碼抗體之mRNA之非轉譯部分中之多聚腺嘌呤化片段的核苷酸區段。一種適用之轉錄終止組分爲牛生長激素多聚腺嘌呤化區域。參見WO 94/11026及其中所揭示之表現載體。

(vii)宿主細胞之選擇及轉形

適用於選殖或表現本文載體中之DNA之宿主細胞包括本文所述之高級真核生物細胞，包括脊椎動物宿主細胞。使脊椎動物細胞在培養物(組織培養物)中繁殖已成爲一種常規程序。有用哺乳動物宿主細胞株之實例爲藉由SV40轉形之猴腎CV1系(COS-7, ATCC CRL 1651)；人類胚腎系(293或經次選殖以便在懸浮液培養物中生長之293細胞，Graham等人，J. Gen Virol. 36:59 (1977))；幼倉鼠腎細胞(BHK, ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR (CHO, Urlaub等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；小鼠塞托利細胞(mouse sertoli cell)(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980))；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠色猴腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；人類宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34)；布法羅大鼠(buffalo rat)肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442)；人類肺細胞(W138, ATCC CCL 75)；人類肝細胞(Hep G2, HB 8065)；小鼠乳腺腫瘤(MMT 060562, ATCC CCL51)；

TRI細胞(Mather等人，Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982))；MRC 5細胞；FS4細胞；及人類肝腫瘤系(Hep G2)。

宿主細胞用上文所述用於抗體產生之表現或選殖載體轉染，且將其經針對誘導啟動子、選擇轉形體或擴增編碼所要序列之基因而適當改質的習知營養培養基中培養。

(viii) 培養宿主細胞

用以產生抗體之宿主細胞可在各種培養基中培養。市售培養基，諸如Ham氏F10(Sigma)、最低必需培養基(MEM) (Sigma)、RPMI-1640(Sigma)及Dulbecco氏修飾之Eagle氏培養基(DMEM)(Sigma)，適於培養宿主細胞。另外，描述於Ham等人，Meth. Enz. 58:44 (1979)；Barnes等人，Anal. Biochem.102:255 (1980)；美國專利第4,767,704號；第4,657,866號；第4,927,762號；第4,560,655號或第5,122,469號；WO 90/03430；WO 87/00195；或美國專利參考案30,985中之任何培養基均可用作宿主細胞之培養基。任何該等培養基均可按需要補充有激素及/或其他生長因子(諸如胰島素、運鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽(諸如氯化鈉、鈣、鎂及磷酸鹽)、緩衝液(諸如HEPES)、核苷酸(諸如腺苷及胸苷)、抗生素(諸如GENTAMYCIN™藥物)、痕量元素(定義為無機化合物，通常以在微莫耳範圍內之最終濃度存在)及葡萄糖或等效能源。任何其他必要補充劑亦可以熟習此項技術者已知之適當濃度包括在內。諸如溫度、pH及其類似物之培養條件為先前供針對表現所選之宿主細胞使用之彼等條件，且將對熟習此項技術者而言為明顯的。

(ix) 抗體之純化

當使用重組技術時，抗體可細胞內產生或直接分泌至培養基中。若抗體細胞內產生，則作為第一步驟，(例如)藉由離心或超濾移除微粒碎片，即宿主細胞或已溶解之片段。在抗體分泌至培養基中之

情況下，通常首先使用市售蛋白質濃縮過濾器，例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超濾單元，濃縮來自該等表現系統之上清液。任何上述步驟中均可包括諸如 PMSF 之蛋白酶抑制劑以抑制蛋白水解，且可包括抗生素以防止外來污染物之生長。

可使用(例如)羧磷灰石層析、凝膠電泳、透析及親和層析純化自細胞製備之抗體組合物，親和層析法為較佳純化技術。蛋白質 A 作為親和力配位體之適合性視存在於抗體中之任何免疫球蛋白 Fc 域之物種及同型而定。蛋白質 A 可用以純化基於人類 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重鏈的抗體 (Lindmark 等人, J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。蛋白質 G 推薦用於所有小鼠同型及人類 $\gamma 3$ (Guss 等人, EMBO J. 5:1567-1575 (1986))。親和力配位體所連接之基質最常為瓊脂糖，但其他基質亦可用。諸如受控有孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯之機械穩定性基質允許比用瓊脂糖所達到者更快之流動速率及更短之處理時間。在抗體包含 CH3 域之情況下，Bakerbond ABX™ 樹脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) 可用於純化。視欲回收之抗體而定，亦可使用其他用於蛋白質純化之技術，諸如離子交換管柱分餾、乙醇沈澱、逆相 HPLC、矽石層析、肝素 SEPHAROSE™ 層析、陰離子或陽離子交換樹脂(諸如聚天冬胺酸管柱)層析、等電聚焦層析、SDS-PAGE 及硫酸銨沈澱。

任何初步純化步驟之後，可使用 pH 在約 2.5-4.5 之間的溶離緩衝液使包含所關注之抗體及污染物的混合物經受低 pH 疏水性相互作用層析，較佳在低鹽濃度下(例如約 0-0.25 M 鹽)執行。

免疫結合物

本發明亦提供免疫結合物(可交替稱為"抗體-藥結合物"或"ADC")，其包含與細胞毒素劑(諸如化學治療劑、藥物、生長抑制劑、毒素(例如細菌、真菌、植物或動物來源之酶促活性毒素，或其片段)或放射性同位素(亦即放射性結合物))結合之本文中所述之任何

抗KL β 抗體。

抗體-藥物結合物在治療癌症中用於局部傳遞細胞毒素或細胞生長抑制劑(亦即殺死或抑制腫瘤細胞之藥物)的用途(Syrigos及Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614 ; Niculescu-Duvaz及Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172 ; 美國專利4,975,278)允許藥物部分向腫瘤靶向傳遞及細胞內積聚於其中，其中該等非結合藥劑之全身性投藥可產生對正常細胞以及欲遭淘汰之腫瘤細胞而言不可接受程度之毒性(Baldwin等人，(1986) *Lancet* (1986年3月15日)：第603-05頁；Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," 於 *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera等人(編)，第475-506頁中)。因此尋找最大功效以及最小毒性。已報導多株抗體與單株抗體可用於該等策略(Rowland等人，(1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87)。該等方法中使用之藥物包括道諾黴素、阿黴素、甲胺喋呤及長春地辛(Rowland等人，(1986)同上)。用於抗體-毒素結合物中之毒素包括諸如白喉毒素之細菌毒素、諸如蓖麻毒素之植物毒素、諸如膠達納黴素(geldanamycin)之小分子毒素(Mandler等人(2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581 ; Mandler等人(2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028 ; Mandler等人(2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)、類美登素(EP 1391213 ; Liu等人，(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623)及刺孢黴素(Lode等人(1998) *Cancer Res.* 58:2928 ; Hinman等人(1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342)。該等毒素可藉由包括微管蛋白結合、DNA結合或拓撲異構酶抑制之機制來實現其細胞毒性及細胞抑制效應。一些細胞毒素藥物在與大抗體或蛋白質受體配位體結合時趨向於為惰性或弱活性的。

ZEVALIN®(替伊莫單抗替烏克坦 (ibritumomab tiuxetan)，

Biogen/Idec)爲抗體-放射性同位素結合物，其由藉由硫脲連接子-螯合劑所結合之針對正常及惡性B淋巴細胞之表面上所見之CD20抗原之鼠IgG1 κ 單株抗體與¹¹¹In或⁹⁰Y放射性同位素組成(Wiseman等人(2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77；Wiseman等人(2002) Blood 99(12):4336-42；Witzig等人(2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63；Witzig等人(2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)。儘管ZEVALIN具有抗B細胞非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's Lymphoma)(NHL)的活性，但是投藥在大多數患者中導致嚴重及長期血細胞減少症。MYLOTARG™(吉妥珠單抗奧唑米星(gemtuzumab ozogamicin)，Wyeth Pharmaceuticals)，一種由連接於刺孢黴素之hu CD33抗體組成之抗體藥物結合物，於2000年獲准用於藉由注射治療急性骨髓性白血病(Drugs of the Future (2000) 25(7):686；美國專利第4970198號；第5079233號；第5585089號；第5606040號；第5693762號；第5739116號；第5767285號；第5773001號)。康圖單抗美坦辛(Cantuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.)，一種由經由二硫化物連接子SPP連接於類美登素藥物部分DM1之huC242抗體組成之抗體藥物結合物，正進入治療表現CanAg之癌症(諸如結腸癌、胰腺癌、胃癌及其他癌)之II期試驗。MLN-2704(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)，一種由連接於類美登素藥物部分DM1之抗-前列腺特定膜抗原(PSMA)單株抗體組成之抗體藥物結合物，正在開發用於前列腺腫瘤之潛在治療。奧瑞斯他汀(auristatin)肽、奧瑞斯他汀E(AE)及單甲基奧瑞斯他汀(monomethylauristatin；MMAE)(海兔毒素之合成類似物)係與嵌合單株抗體cBR96(對癌瘤上之Lewis Y具有特異性)及cAC10(對血液學惡性疾病上之CD30具有特異性)結合(Doronina等人(2003) Nature Biotechnology 21 (7):778-784)且正在治療開發中。

可用於產生免疫結合物之化學治療劑描述於本文中(例如上文)。

可使用的酶促活性毒素及其片段包括：白喉A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A鏈、相思豆毒素A鏈、葫蘆根毒蛋白A鏈、 α -帶麴菌素(alpha-sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白質、康乃馨蛋白質、美洲商陸(*Phytolacca americana*)蛋白質(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制劑、麻瘋樹毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crotonin)、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制劑、多花白樹毒蛋白(gelonin)、有絲分裂素(mitogellin)、侷限麴菌素(restrictocin)、酚黴素、伊諾黴素(enomycin)及黴菌毒素(tricothecene)。參見(例如)，1993年10月28日公開之WO 93/21232。各種放射性核素可用於產生放射性結合之抗體。實例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及 ^{186}Re 。抗體及細胞毒素劑之結合物係使用諸如以下者之各種雙功能蛋白質偶合劑來製得：N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺基酯之雙功能衍生物(諸如己二亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苄醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙-(對重氮苄醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人，*Science*, 238:1098 (1987)中所述來製備。碳14標記之1-異硫氰基苄基-3-甲基二仲乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)為用於將放射性核苷酸結合於抗體之示範性螯合劑。參見WO 94/11026。

本文亦涵蓋抗體與一或多種小分子毒素(諸如刺胞黴素、類美登素、海兔毒素、奧瑞他汀、單端孢黴毒素及CC1065以及該等毒素之具有毒素活性之衍生物)的結合物。

i. 美登素及類美登素

在一些實施例中，免疫結合物包含與一或多個類美登素分子結

合之抗體(全長或片段)。

類美登素為藉由抑制微管蛋白聚合而起作用之有絲分裂抑制劑。美登素最先自東非灌木齒葉美登木(*Maytenus serrata*)分離(美國專利第3,896,111號)。隨後，發現某些微生物亦產生類美登素，諸如美登醇及C-3美登醇酯(美國專利第4,151,042號)。合成美登醇及其衍生物及類似物揭示於(例如)美國專利第4,137,230號；第4,248,870號；第4,256,746號；第4,260,608號；第4,265,814號；第4,294,757號；第4,307,016號；第4,308,268號；第4,308,269號；第4,309,428號；第4,313,946號；第4,315,929號；第4,317,821號；第4,322,348號；第4,331,598號；第4,361,650號；第4,364,866號；第4,424,219號；第4,450,254號；第4,362,663號；及第4,371,533號中。

類美登素藥物部分為抗體藥物結合物中之有吸引力的藥物部分，因為其：(i)相對可達到藉由醱酵或化學修飾進行醱酵產物衍生，(ii)服從用適於經由非二硫化物連接子結合於抗體之官能基衍生，(iii)在血漿中穩定，及(iv)有效抵抗各種腫瘤細胞株。

含有類美登素之免疫結合物、製造其之方法及其治療用途揭示於(例如)美國專利第5,208,020號、第5,416,064號及歐洲專利EP 0 425 235 B1中，其揭示案在此以引用之方式明確併入。Liu等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996)描述包含連接於針對人類結腸直腸癌之單株抗體C242之類美登素(命名為DM1)的免疫結合物。已發現該共軛物對所培養之結腸癌細胞具有高細胞毒性且在活體內腫瘤生長檢定中展示抗腫瘤活性。Chari等人，*Cancer Research* 52:127-131 (1992)描述免疫結合物，其中類美登素經由二硫化物連接子與結合至人類結腸癌細胞株上之抗原的鼠抗體A7結合，或與結合HER-2/neu致癌基因之另一鼠單株抗體TA.1結合。在活體外，對每個細胞表現 3×10^5 個HER-2表面抗原之人類乳癌細胞株SK-BR-3測試TA.1-類美登素

結合物之細胞毒性。藥物結合物達到與游離類美登素藥物相似之細胞毒性程度，該細胞毒性程度可藉由增加每個抗體分子之類美登素分子之數量而增加。A7-類美登素結合物在小鼠中展示低全身性細胞毒性。

在不顯著降低抗體或類美登素分子之生物活性之情況下，藉由將抗體與類美登素分子化學連接來製備抗體-類美登素結合物。參見(例如)美國專利第5,208,020號(其揭示案在此以引用之方式明確併入本文)。每個抗體分子平均結合3-4個類美登素分子已展示增強標靶細胞之細胞毒性之功效，而對抗體功能或溶解性無不利影響，但預期甚至1分子毒素/抗體即可增強細胞毒性超過使用裸抗體。類美登素在此項技術中熟知，且可藉由已知技術合成或自天然來源分離。合適類美登素揭示於(例如)美國專利第5,208,020號及上文提及之其他專利及非專利公開案中。較佳類美登素為美登醇及在美登醇分子之芳族環中或其他位置處改質之美登醇類似物，諸如各種美登醇酯。

此項技術中已知之用於製造抗體-類美登素結合物之許多鍵聯基團包括(例如)美國專利第5,208,020號或歐洲專利0 425 235 B1；Chari等人，Cancer Research 52:127-131(1992)及美國專利申請案第10/960,602(2004年10月8日申請)中所揭示的彼等鍵聯基團，其揭示案在此以引用方式明確併入本文中。包含連接子組分SMCC之抗體-類美登素結合物可如2004年10月8日申請之美國專利申請案第10/960,602號來製備。鍵聯基團包括二硫基、硫醚基、酸不穩定基團、光不穩定基團、肽酶不穩定基團或酯酶不穩定基團，如上述專利中所揭示，二硫基及硫醚基團為較佳者。額外鍵聯基團描述及例證於本文中。

抗體與類美登素之結合物可使用諸如以下者之各種雙功能蛋白質偶合劑來製得：N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、琥珀醯亞胺基-4-(N-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯

(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙官能衍生物(諸如己二亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙-(對疊氮基苄醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙-(對重氮苄醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。尤其較佳之偶合劑包括提供二硫鍵之N-琥珀醯亞胺-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP) (Carlsson等人, Biochem. J. 173:723-737 (1978))及N-琥珀醯亞胺-4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯(SPP)。

可視連接類型而將連接子連接於類美登素分子之各種位置處。舉例而言,可藉由使用習知偶合技術與羥基反應形成酯鍵。該反應可發生於具有羥基之C-3位置、經羥甲基修飾之C-14位置、經羥基修飾之C-15位置及具有羥基之C-20位置處。在一較佳實施例中,鍵聯形成於美登醇或美登醇類似物之C-3位置處。

ii. 奧瑞斯他汀及海兔毒素

在一些實施例中,免疫結合物包含與海兔毒素或海兔毒素肽類似物及衍生物、奧瑞斯他汀結合之抗體(美國專利第5635483號;第5780588號)。已展示海兔毒素及奧瑞斯他汀干擾微管動力學、GTP水解及核及細胞分裂(Woyke等人(2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584)且具有抗癌活性(US 5663149)及抗真菌活性(Pettit等人(1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)。海兔毒素或奧瑞斯他汀藥物部分可經由肽藥物部分之N(胺基)末端或C(羧基)末端與抗體連接(WO 02/088172)。

示範性奧瑞斯他汀實施例包括"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US第10/983,340號(2004年11月5日申請,其揭示內容以引用之方式全部明確併入)中所揭示的N-末端連接之單甲基奧瑞斯他汀藥物部分DE及DF。

通常，肽基藥物部分可藉由在兩個或兩個以上胺基酸及/或肽片段之間形成肽鍵而製備。該等肽鍵(例如)可根據肽化學領域中熟知之液相合成方法(參見E. Schröder及K. Lübke, "The Peptides", 第1卷, 第76-136頁, 1965, Academic Press)製備。奧瑞斯他汀/海兔毒素藥物部分可根據以下文獻中之方法製備: US 5635483; US 5780588; Pettit等人(1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit等人(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R.等人, Synthesis, 1996, 719-725; 及Pettit等人(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863。亦參見Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US 第10/983,340號, 2004年11月5日申請, 其在此以引用方式全文併入(例如, 揭示連接子及製備與連接子結合之單甲基纈胺酸化合物(諸如MMAE及MMAF)的方法)。

iii. 刺孢黴素

在其他實施例中, 免疫結合物包含與一或多種刺孢黴素分子結合之抗體。抗生素之刺孢黴素家族能夠在亞皮莫耳濃度下產生雙鏈DNA斷裂。對刺孢黴素家族結合物之製備而言, 參見美國專利 5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001、5,877,296 (全部屬於American Cyanamid Company)。可使用之刺孢黴素之結構類似物包括(但不限於) γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙醯基- γ_1^I 、PSAG及 θ_1^I (Hinman等人, Cancer Research 53:3336-3342 (1993); Lode等人, Cancer Research 58:2925-2928 (1998)及上述屬於American Cyanamid之美國專利)。可與抗體結合之另一抗腫瘤藥物為QFA, 其為抗葉酸劑。刺孢黴素與QFA均具有細胞內作用位點且不易於跨過質膜。因此, 該等藥劑經由抗體介導之內化之細胞吸收大大增強其細胞毒素效應。

iv. 其他細胞毒素劑

可與抗體結合之其他抗腫瘤劑包括 BCNU、鏈脲佐菌素 (streptozotycin)、長春新鹼及5-氟尿嘧啶、美國專利第5,053,394號、第5,770,710號中所述之共同稱為LL-E33288複合物的藥劑家族以及艾斯帕米辛(美國專利第5,877,296號)。

可使用的酶促活性毒素及其片段包括：白喉A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌)、蓖麻毒素A鏈、相思豆毒素A鏈、葫蘆根毒蛋白A鏈、 α -帶麴菌素、油桐蛋白質、康乃馨蛋白質、美洲商陸蛋白質(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜抑制劑、麻瘋樹毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草抑制劑、多花白樹毒蛋白、有絲分裂素、侷限麴菌素、酚黴素、伊諾黴素及黴菌毒素。參見(例如)，1993年10月28日公開之WO 93/21232。

本發明另外涵蓋抗體與具有核分解活性之化合物(例如核糖核酸酶或DNA核酸內切酶，諸如脫氧核糖核酸酶；DNase)之間所形成的免疫結合物。

為選擇性破壞腫瘤，抗體可包含高度放射性原子。各種放射性同位素可用於產生放射性結合抗體。實例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及Lu之放射性同位素。當使用結合物進行偵測時，其可包含用於閃爍攝影研究之放射性原子，例如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} ；或用於核磁共振(NMR)成像(亦稱為磁共振成像，mri)之自旋標記，諸如碘-123、碘-131、銥-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、鈦、錳或鐵。

可以已知方式將放射性標記或其他標記併入結合物中。舉例而言，肽可生物合成，或可藉由使用合適胺基酸前驅物(涉及(例如)以氟-19替代氫)之化學胺基酸合成來合成。諸如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 及 In^{111} 之標記可經由肽中之半胱胺酸殘基連接。可經由離胺酸殘

基連接鈹-90。 IODOGEN方法(Fraker等人(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57)可用以併入碘-123。 "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy"(Chatal, CRC Press 1989)詳細地描述其他方法。

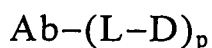
抗體與細胞毒素劑之結合物可使用諸如以下者之各種雙功能蛋白質偶合劑來製得：N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、琥珀醯亞胺基-4-(N-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙官能衍生物(諸如己二亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙-(對疊氮基苄醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙-(對重氮苄醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如 Vitetta 等人， Science, 238:1098 (1987)中所述來製備。碳14標記之1-異硫氰基苄基-3-甲基二伸乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)為用於將放射性核苷酸結合於抗體之示範性螯合劑。參見 WO 94/11026。連接子可為促進細胞毒素藥物在細胞中釋放之"可分裂連接子"。舉例而言，可使用酸不穩定連接子、肽酶敏感性連接子、光不穩定連接子、二甲基連接子或含二硫鍵連接子(Chari 等人， Cancer Research 52:127-131 (1992)；美國專利第5,208,020號)。

該等化合物明確涵蓋(但不限於)用以下交聯試劑製備之ADC：BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC及磺基-SMPB及SVSB(琥珀醯亞胺基-(4-乙烯基磺)苯甲酸酯)，其為市售的(例如得自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。參見2003-2004

Applications Handbook及Catalog，第467-498。

v. 製備抗體藥物結合物

在抗體藥物結合物(ADC)中，抗體(Ab)經由連接子(L)與一或多個藥物部分(D)結合，例如每個抗體約1至約20個藥物部分。式I之ADC可藉由若干路線，使用熟習此項技術者已知之有機化學反應、條件及試劑來製備，包括：(1)經由共價鍵結使抗體之親核基團與二價連接子試劑反應以形成Ab-L，接著與藥物部分D反應；及(2)經由共價鍵結使藥物部分之親核基團與二價連接子試劑反應以形成D-L，接著與抗體之親核基團反應。用於製備ADC之額外方法描述於本文中。



I

連接子可由一或多種連接子組分組成。示範性連接子組分包括6-馬來醯亞胺基己醯基("MC")、馬來醯亞胺基丙醯基("MP")、纈胺酸-瓜胺酸("val-cit")、丙胺酸-苯丙胺酸("ala-phe")、對胺基苯甲氧基羰基("PAB")、N-琥珀醯亞胺基4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯("SPP")、N-琥珀醯亞胺基4-(N-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯("SMCC")及N-琥珀醯亞胺基(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸酯("SIAB")。額外連接子組分在此項技術中已知且一些連接子組分描述於本文中。亦參見"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US第10/983,340號，2004年11月5日申請，其內容在此以引用之方式全部併入。

在一些實施例中，連接子可包含胺基酸殘基。示範性胺基酸連接子組分包括二肽、三肽、四肽或五肽。示範性二肽包括：纈胺酸-瓜胺酸(vc或val-cit)、丙胺酸-苯丙胺酸(af或ala-phe)。示範性三肽包括：甘胺酸-纈胺酸-瓜胺酸(gly-val-cit)及甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸(gly-gly-gly)。包含胺基酸連接子組分之胺基酸殘基包括彼等天然存在之胺基酸以及次要胺基酸及非天然存在之胺基酸類似物，諸如瓜胺酸。

可對胺基酸連接子組分進行設計且最佳化其對特定酶(例如腫瘤相關蛋白酶、組織蛋白酶B、C及D或纖溶酶蛋白酶)之酶促分裂之選擇性。

抗體上之親核基團包括(但不限於)：(i)N-末端胺基，(ii)側鏈胺基，例如離胺酸，(iii)側鏈硫醇基，例如半胱胺酸，及(iv)在抗體經糖基化之情況下為糖羥基或胺基。胺、硫醇及羥基具親核性且能夠與連接子部分及連接子試劑上之親電基團反應以形成共價鍵結，該等連接子部分及連接子試劑包括：(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵甲酸酯及醯基鹵；(ii)烷基鹵及苄基鹵，諸如鹵乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及馬來醯亞胺基。某些抗體具有可還原之鏈間二硫化物，亦即半胱胺酸橋。可藉由用諸如DTT(二硫蘇糖醇)之還原劑處理而使抗體具有與連接子試劑結合之反應性。因此，理論上各半胱胺酸橋將形成2種反應性硫醇親核試劑。可經由離胺酸與2-亞胺基硫雜環戊烷(Traut試劑)之反應使胺轉化為硫醇而將額外親核基團引入抗體中。可藉由引入1個、2個、3個、4個或4個以上半胱胺酸殘基將反應性硫醇基引入抗體(或其片段)中(例如製備包含一或多個非天然半胱胺酸胺基酸殘基之突變抗體)。

抗體藥物結合物亦可藉由修飾抗體以引入可與連接子試劑或藥物上之親核取代基反應之親電子部分來產生。可將糖基化抗體之糖以(例如)過碘酸鹽氧化試劑氧化以形成可與連接子試劑或藥物部分之胺基反應的醛或酮基。所得亞胺希夫鹼(Schiff base)基團可形成穩定鍵聯，或可經(例如)硼氫化物試劑還原以形成穩定胺鍵。在一實施例中，糖基化抗體之碳水化合物部分與半乳糖氧化酶或偏過碘酸鈉(sodium meta-periodate)之反應可於蛋白質中產生可與藥物上之適當基團反應的羰基(醛及酮基)(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一實施例中，含有N-末端絲胺酸或蘇胺酸殘基之蛋白質可與偏過碘酸

鈉反應，引起產生醛替代第一胺基酸(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146；US 5362852)。該醛可與藥物部分或連接子親核試劑反應。

同樣地，藥物部分上之親核基團包括(但不限於)：能夠與連接子部分及連接子試劑上之親電基團反應以形成共價鍵結之胺、硫醇、羥基、醯肼、肟、肼、硫半卡巴腓、肼羧酸鹽及芳基醯肼基，該等連接子部分及連接子試劑包括：(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵甲酸酯及醯基鹵；(ii)烷基鹵及苄基鹵，諸如鹵乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及馬來醯亞胺基。

或者，可(例如)藉由重組技術或肽合成製造包含抗體及細胞毒素劑之融合蛋白質。DNA之長度可包含編碼結合物之2個部分的各別區域，該等區域彼此相鄰或由編碼不破壞結合物之所要性質之連接子肽的區域隔離。

在另一實施例中，抗體可與用於腫瘤預靶向中之"受體" (諸如抗生蛋白鏈菌素)結合，其中將抗體-受體結合物投與患者，接著使用廓清劑將未結合之結合物自循環中移除，且隨後投與與細胞毒素劑(例如，放射性核苷酸)結合之"配位體"(例如，抗生物素蛋白)。

結合寡肽

結合寡肽為結合，較佳特異性結合於如本文中所述之KL β 、FGFR或KL β -FGFR複合物之寡肽。結合寡肽可使用已知寡肽合成方法化學上合成或可使用重組技術製備及純化。結合寡肽之長度通常為至少約5個胺基酸，或者長度為至少約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、

74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100個胺基酸或100個胺基酸以上，其中該等寡肽能夠結合，較佳特異性結合於如本文中所述之多肽。可使用熟知技術而無不當實驗之情況下識別結合寡肽。在該點上，應注意，用於篩選能夠特異性結合於多肽標靶的寡肽之寡肽庫之技術在此項技術中熟知(參見(例如)，美國專利第5,556,762號、第5,750,373號、第4,708,871號、第4,833,092號、第5,223,409號、第5,403,484號、第5,571,689號、第5,663,143號；PCT公開案第WO 84/03506號及第WO 84/03564號；Geysen等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984)；Geysen等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985)；Geysen等人，於Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986)中；Geysen等人，J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987)；Schoofs等人，J. Immunol., 140:611-616 (1988)；Cwirla, S. E.等人，(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378；Lowman, H.B.等人，(1991) Biochemistry, 30:10832；Clackson, T.等人，(1991) Nature, 352: 624；Marks, J. D.等人，(1991), J. Mol. Biol., 222:581；Kang, A.S.等人，(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363，及Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668)。

在該點上，細菌噬菌體(噬菌體)呈現為一種熟知技術，其允許熟習此項技術者篩選大寡肽庫以識別彼等庫之能夠特異性結合於多肽標靶之成員。噬菌體呈現為變異體多肽藉由其呈現為細菌噬菌體粒子表面上之鞘蛋白質的融合蛋白質之技術(Scott, J.K.及Smith, G. P. (1990) Science, 249: 386)。噬菌體呈現之實用性基於以下事實：選擇性隨機化蛋白質變異體(或隨機選殖cDNA)之大庫可針對以高親和力結合於標靶分子之彼等序列快速及有效地分選。在噬菌體上呈現肽(Cwirla, S. E.等人，(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378)或蛋白質

(Lowman, H.B.等人, (1991) *Biochemistry*, 30:10832; Clackson, T.等人, (1991) *Nature*, 352: 624; Marks, J. D.等人, (1991), *J. Mol. Biol.*, 222:581; Kang, A.S.等人, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8363)庫, 已用於篩選數百萬多肽或寡肽中之具有特異性結合性質之多肽或寡肽(Smith, G. P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2:668)。分選隨機突變體之噬菌體庫需要用於構築及增殖大量變異體之策略, 使用標靶受體之親和力純化程序及評估結合富集結果之方式。美國專利第5,223,409號、第5,403,484號、第5,571,689號及第5,663,143號。

儘管大多數噬菌體呈現方法已使用絲狀噬菌體, 但是 λ 形噬菌體呈現系統(WO 95/34683; U.S. 5,627,024)、T4噬菌體呈現系統(Ren等人, *Gene*, 215: 439 (1998); Zhu等人, *Cancer Research*, 58(15): 3209-3214 (1998); Jiang等人, *Infection & Immunity*, 65(11): 4770-4777 (1997); Ren等人, *Gene*, 195(2):303-311 (1997); Ren, *Protein Sci.*, 5: 1833 (1996); Efimov等人, *Virus Genes*, 10: 173 (1995))及T7噬菌體呈現系統(Smith及Scott, *Methods in Enzymology*, 217: 228-257 (1993); U.S. 5,766,905)亦為已知者。

現已開發出基本噬菌體呈現概念之許多其他改良及變化。該等改良增強呈現系統篩選結合於所選標靶分子之肽庫的能力及呈現具有針對所要性質篩選該等蛋白質之潛力之功能蛋白的能力。已開發出用於噬菌體呈現反應之組合反應裝置(WO 98/14277)且噬菌體呈現庫已用以分析及控制雙分子相互作用(WO 98/20169; WO 98/20159)及受約束螺旋肽之性質(WO 98/20036)。WO 97/35196描述分離親和力配位體之方法, 其中使噬菌體呈現庫與其中配位體將結合於標靶分子之一溶液及其中親和力配位體將不結合於標靶分子之第二溶液接觸以選擇性分離結合配位體。WO 97/46251描述生物淘選具有親和力純化之抗體之隨機噬菌體呈現庫且隨後分離結合噬菌體, 接著使用微量培養板孔

之微淘選方法以分離高親和力結合噬菌體的方法。亦已報導金黃色葡萄球菌蛋白質A(*Staphylococcus aureus* protein A)作為親和力標籤之用途(Li等人, (1998) *Mol Biotech.*, 9:187)。WO 97/47314描述受質扣除庫使用可為噬菌體呈現庫之組合庫來區別酶特異性之用途。使用噬菌體呈現選擇適用於清潔劑之酶之方法描述於WO 97/09446中。選擇特定結合蛋白質之額外方法描述於美國專利第5,498,538號、第5,432,018號及WO 98/15833中。

產生肽庫及篩選該等庫之方法亦揭示於美國專利第5,723,286號、第5,432,018號、第5,580,717號、第5,427,908號、第5,498,530號、第5,770,434號、第5,734,018號、第5,698,426號、第5,763,192號及第5,723,323號中。

結合小分子

結合小分子較佳為不同於如本文中所定義之寡肽或抗體之有機分子，其結合，較佳特異性結合於如本文中所述之KLβ、FGFR或KLβ/FGFR複合物。結合有機小分子可使用已知方法識別及化學上合成(參見(例如)PCT公開案第WO 00/00823號及第WO 00/39585號)。結合有機小分子之尺寸通常小於約2000道爾頓，或者尺寸小於約1500、750、500、250或200道爾頓，其中能夠結合，較佳特異性結合如本文中所述之多肽之該等有機小分子可使用熟知技術而無不當實驗來識別。在該點上，應注意，用於篩選能夠結合於多肽標靶之分子之有機小分子庫的技術在此項技術中熟知(參見(例如)PCT公開案第WO 00/00823號及第WO 00/39585號)。結合有機小分子可為(例如)醛、酮、肟、腙、半卡巴腙、卡腙、一級胺、二級胺、三級胺、N-經取代脒、醯脒、醇、醚、硫醇、硫醚、二硫化物、羧酸、酯、醯胺、脲、胺基甲酸酯、碳酸酯、縮酮、酮縮硫醇、縮醛、硫縮醛、芳基鹵、磺酸芳基酯、烷基鹵化物、磺酸烷基酯、芳族化合物、雜環化合物、苯

胺、烯、炔、二醇、胺基醇、噁唑啉、噁唑啉、噻唑啉、噻唑啉、烯胺、乙磺醯胺、環氧化物、氮丙啶、異氰酸酯、磺醯氯、重氮化合物、酸氯化物或其類似物。

篩選具有所要性質之抗體、寡肽及有機小分子

在一些實施例中，拮抗劑結合KL β ，且在一些實施例中，可調節KL β 相關效應之一或多個態樣，包括(但不限於)結合FGFR4(視需要連同肝素)，結合FGF19(視需要連同肝素)，結合FGFR4及FGF19(視需要連同肝素)，促進cFos、Junb及/或Junc之FGF19-介導之誘導(活體外或活體內)，促進FGFR4及/或FGF19下游信號傳輸(包括(但不限於)FRS2磷酸化、ERK1/2磷酸化及Wnt路徑活化)，及/或促進任何生物學有關之KL β 及/或FGFR4生物學路徑，及/或促進腫瘤、細胞增生性病變或癌症，及/或促進與KL β 表現及/或活性(諸如增加之KL β 表現及/或活性)相關之病症。

可將經純化抗體另外藉由一系列檢定來表徵，該等檢定包括(但不限於)N末端定序、胺基酸分析、非變性尺寸排除高壓液相層析(HPLC)、質譜法、離子交換層析及木瓜酵素消化。

在本發明之某些實施例中，分析本文所產生之抗體之生物活性。在一些實施例中，測試本發明抗體之抗原結合活性。此項技術中已知且可用於本文中之抗原結合檢定包括(但不限於)使用諸如西方墨點法、放射免疫檢定、ELISA(酶聯結免疫吸附劑檢定)、“夾層”免疫檢定、免疫沈澱檢定、螢光免疫檢定及蛋白A免疫檢定之技術進行的任何直接或競爭性結合檢定。下文實例部分中提供說明性抗原結合檢定。

擁有本文中所述性質之抗KL β 抗體可藉由任何合宜方法，藉由針對所要性質篩選抗KL β 融合瘤純系來獲得。

測定抗KL β 抗體之結合能力之其他功能檢定在此項技術中已知，

其中一些例證於本文中。

擁有本文中所述性質之抗FGFR4抗體可藉由任何合宜方法，藉由針對所要性質篩選抗FGFR4融合瘤純系來獲得。

測定抗FGFR4抗體之結合能力之其他功能檢定在此項技術中已知，其中一些例證於本文中。

為篩選結合於藉由所關注之抗體結合之多肽上的抗原決定基之抗體、寡肽或其他有機小分子，可執行常規交叉阻斷檢定，諸如 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及David Lane (1988)中所述之彼檢定。若測試抗體、寡肽或其他有機小分子結合與已知抗體相同之位點或抗原決定基，則該檢定可用於測定。或者或另外，抗原決定基映射可藉由此項技術中已知之方法來執行。舉例而言，抗體序列可(諸如)藉由丙胺酸掃描來突變以識別接觸殘基。最初測試突變抗體與多株抗體之結合以確保適當摺疊。在一不同方法中，相應於多肽之不同區域之肽可用於與測試抗體或與測試抗體及具有經表徵或已知抗原決定基之抗體的競爭檢定中。

在一些實施例中，本發明涵蓋經改變抗體，其擁有一些但並非所有效應功能，該等效應功能使其成為其中抗體在活體內之半衰期為重要的但某些效應功能(諸如補體及ADCC)並非必需或有害之許多應用中的所要候選者。在某些實施例中，量測所產生之免疫球蛋白之Fc活性以確保僅維持所要性質。可進行活體外及/或活體內細胞毒性檢定以確認CDC及/或ADCC活性之降低/耗盡。舉例而言，可進行Fc受體(FcR)結合檢定，以確保抗體缺乏FcγR結合(因此可能缺乏ADCC活性)，但保留FcRn結合能力。介導ADCC之初級細胞，NK細胞僅表現FcγRIII，而單核細胞表現FcγRI、FcγRII及FcγRIII。FcR在造血細胞上之表現概括於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)之第464頁上的表3中。評估所關注之分子之ADCC活性的活體外檢定

之實例描述於美國專利第5,500,362號或第5,821,337號中。用於該等檢定中之效應細胞包括周邊血液單核細胞(PBMC)及天然殺手(NK)細胞。或者或另外，所關注之分子之ADCC活性可活體內評估，例如在諸如Clynes等人PNAS (USA) 95:652-656 (1998)中揭示之彼者之動物模型中評估。亦可進行C1q結合檢定以確認抗體不能結合C1q且因此缺乏CDC活性。為評估補體活化，可執行CDC檢定，例如，如Gazzano-Santoro等人，J. Immunol. Methods 202:163 (1996)中所述。亦可使用此項技術中已知之方法執行FcRn結合及活體內清除/半衰期測定。

在一些實施例中，使用擁有增加之效應功能及/或增加之半衰期之經改變抗體。

多肽及核酸

核苷酸序列在分子生物學技術中具有各種應用，以及用於療法之用途等等。編碼多肽之核酸亦將適用於藉由本文中所述之重組技術來製備多肽，其中彼等多肽可在(例如)如本文中所述之抗體之製備中得到使用。

全長天然序列多肽基因或其部分可用作用於cDNA庫之雜交探針，以分離其他cDNA(例如，編碼多肽之天然存在變異體或來自其他物種之多肽之彼等cDNA)，其具有相對本文中所揭示之天然多肽序列之所要序列同一性。視需要，探針長度將為約20至約50個鹼基。雜交探針可得自全長天然核苷酸序列之至少部分新穎區域，其中彼等區域可被測定而無不當實驗或來自包括天然序列多肽之啟動子、強化子元件及內含子之基因組序列。舉例而言，篩選方法將包含分離多肽基因之編碼區域，使用已知DNA序列合成約40個鹼基之所選探針。雜交探針可藉由各種標記來標記，包括放射性核苷酸，諸如³²P或³⁵S，或酶促標記，諸如經由抗生物素蛋白/生物素偶合系統偶合於探針之鹼性

磷酸酶。具有與本發明之多肽基因之彼序列互補之序列的經標記探針可用以篩選人類cDNA、基因組DNA或mRNA之庫，以測定該等庫之何成員與探針雜交。雜交技術更詳細描述於下文實例中。本申請案中揭示之任何EST序列可同樣使用本文中所揭示之方法用作探針。

編碼多肽之核酸之其他可用片段包括反義或正義寡核苷酸，其包含能夠結合以靶向多肽mRNA(正義)或多肽DNA(反義)序列之單鏈核酸序列(RNA或DNA)。根據本發明之反義或正義寡核苷酸包含編碼如本文中所述之hepsin、pro-HGF或結合片段之DNA之編碼區域的片段。該片段通常包含至少約14個核苷酸，較佳約14至30個核苷酸。基於編碼給定蛋白質之cDNA序列來衍生反義或正義寡核苷酸之能力描述於(例如)Stein及Cohen(Cancer Res. 48:2659, 1988)及van der Krol等人(BioTechniques 6:958, 1988)中。

反義或正義寡核苷酸靶向核酸序列之結合引起形成雙鏈體，該等雙鏈體藉由包括雙鏈體之增加降解、轉錄或轉譯之早熟終止的若干方式之一或藉由其他方式來阻斷標靶序列之轉錄或轉譯。該等方法藉由本發明涵蓋。反義寡核苷酸因此可用以阻斷蛋白質表現，其中蛋白質可在哺乳動物中之癌症誘導中起作用。反義或正義寡核苷酸另外包含具有經修飾糖-磷酸二酯骨架(或其他糖鍵，諸如WO 91/06629中所述之彼等糖鍵)且其中該等糖鍵抵抗內源核酸酶之寡核苷酸。具有抗性糖鍵之該等寡核苷酸在活體內穩定(亦即，能夠抵抗酶促降解)，但保留能夠與標靶核苷酸序列結合之序列特異性。

反義結合之較佳基因內位點包括併入基因之開放閱讀框架(ORF)之轉譯起始密碼子(5'-AUG/5'-ATG)或終止密碼子(5'-UAA、5'-UAG及5'-UGA/5'-TAA、5'-TAG及5'-TGA)的區域。該等區域係指mRNA或基因之部分，其涵蓋自轉譯起始或終止密碼子之任一方向(亦即5'或3')上之約25至約50個鄰接核苷酸。反義結合之其他較佳區域包括：內含

子；外顯子；內含子-外顯子接合物；開放閱讀框架(ORF)或"編碼區域"，其為轉譯起始密碼子與轉譯終止密碼子之間的區域；mRNA之5'帽，其包含經由5'-5'三磷酸酯鍵聯與mRNA之最靠5'殘基連接之N7-甲基化鳥嘌呤核苷殘基，且包括5'帽結構自身以及鄰近於該帽之前50個核苷酸；5'末轉譯區域(5'UTR)，即自轉譯起始密碼子之5'方向上之mRNA的部分，且因此包括5'帽位點與mRNA之轉譯起始密碼子之間的核苷酸或基因上之相應核苷酸；及3'末轉譯區域(3'UTR)，即自轉譯終止密碼子之3'方向上之mRNA的部分，且因此包括轉譯終止密碼子與mRNA之3'末端之間的核苷酸或基因上之相應核苷酸。

適用於抑制多肽表現之較佳反義化合物之特定實例包括含有經修飾骨架或非天然核苷間鍵聯之寡核苷酸。具有經修飾骨架之寡核苷酸包括在骨架中保留磷原子之彼等寡核苷酸，及在骨架中不具有磷原子之彼等寡核苷酸。就本說明書之目的而言，且有時當在此項技術中提及時，在其核苷間骨架中不具有磷原子之經修飾寡核苷酸亦可視為寡核苷。較佳經修飾寡核苷酸骨架包括(例如)硫代磷酸酯，掌性硫代磷酸酯，二硫代磷酸酯，磷酸三酯，胺基烷基磷酸三酯，甲基及其他烷基磷酸酯，包括3'-伸烷基磷酸酯、5'-伸烷基磷酸酯及掌性磷酸酯，亞磷酸酯，胺基磷酸酯，包括3'-胺基胺基磷酸酯及胺基烷基胺基磷酸酯、硫羰基胺基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯、硒基磷酸酯及硼基磷酸酯，其具有正常3'-5'鍵聯，該等者之2'-5'連接類似物，及具有反極性之彼等者，其中一或多個核苷酸間鍵聯為3'與3'、5'與5'或2'與2'鍵聯。具有反極性之較佳寡核苷酸包含在最靠3'核苷酸間鍵聯之單一3'與3'鍵聯，亦即可為單價(abasic)之單一反向核苷殘基(核酸鹼基缺失或具有羥基將其替代)。亦包括各種鹽、混合鹽及游離酸形式。教示含磷鍵聯之製備之代表性美國專利包括(但不限於)美國專利第3,687,808號；第4,469,863號；第4,476,301號；第

5,023,243 號；第 5,177,196 號；第 5,188,897 號；第 5,264,423 號；第 5,276,019 號；第 5,278,302 號；第 5,286,717 號；第 5,321,131 號；第 5,399,676 號；第 5,405,939 號；第 5,453,496 號；第 5,455,233 號；第 5,466,677 號；第 5,476,925 號；第 5,519,126 號；第 5,536,821 號；第 5,541,306 號；第 5,550,111 號；第 5,563,253 號；第 5,571,799 號；第 5,587,361 號；第 5,194,599 號；第 5,565,555 號；第 5,527,899 號；第 5,721,218 號；第 5,672,697 號及第 5,625,050 號，其各者以引用之方式併入本文。

其中不包括磷原子之較佳經修飾寡核苷酸骨架具有藉由短鏈烷基或環烷基核苷間鍵聯、混合雜原子及烷基或環烷基核苷間鍵聯，或一或多個短鏈雜原子或雜環核苷間鍵聯形成之骨架。該等骨架包括具有嗎啉基鍵聯(部分由核苷之糖部分形成)之彼等骨架；矽氧烷骨架；硫化物、亞碲及碲骨架；甲醯基(formacetyl)及硫甲醯基骨架；亞甲基甲醯基及硫甲醯基骨架；核糖乙醯基(riboacetyl)骨架；含烯骨架；胺基磺酸酯骨架；亞甲基亞胺基及亞甲基胍基骨架；磺酸酯及乙磺醯胺骨架；醯胺骨架；及具有混合 N、O、S 及 CH₂ 組分部分之其他骨架。教示該等寡核苷之製備之代表性美國專利包括(但不限制)美國專利第 5,034,506 號；第 5,166,315 號；第 5,185,444 號；第 5,214,134 號；第 5,216,141 號；第 5,235,033 號；第 5,264,562 號；第 5,264,564 號；第 5,405,938 號；第 5,434,257 號；第 5,466,677 號；第 5,470,967 號；第 5,489,677 號；第 5,541,307 號；第 5,561,225 號；第 5,596,086 號；第 5,602,240 號；第 5,610,289 號；第 5,602,240 號；第 5,608,046 號；第 5,610,289 號；第 5,618,704 號；第 5,623,070 號；第 5,663,312 號；第 5,633,360 號；第 5,677,437 號；第 5,792,608 號；第 5,646,269 號及第 5,677,439 號，其各者以引用之方式併入本文。

在其他較佳反義寡核苷酸中，核苷酸單元之糖及核苷間鍵聯(亦

即骨架)係經新穎基團置換。維持鹼基單元以用於與適當核酸標靶化合物雜交。已展示具有極好雜交性質之一種該寡聚化合物，寡核苷酸模擬物，稱為肽核酸(PNA)。在PNA化合物中，寡核苷酸之糖骨架經含鹽胺之骨架，尤其為胺基乙基甘胺酸骨架置換。核酸鹼基經保留且直接或間接結合於骨架之鹽胺部分之氮雜氮原子。教示PNA化合物之製備之代表性美國專利包括(但不限於)美國專利第5,539,082號；第5,714,331號及第5,719,262號，其各者以引用之方式併入本文。PNA化合物之其他教示可見於Nielsen等人，Science, 1991, 254, 1497-1500中。

較佳反義寡核苷酸併入硫代磷酸酯骨架及/或雜原子骨架，尤其-CH₂-NH-O-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-[稱為亞甲基(甲基亞胺基)或MMI骨架]、-CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂-及-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂-[其中天然磷酸二酯骨架表示為-O-P-O-CH₂-]，其描述於上文提及之美國專利第5,489,677號，及上文提及之美國專利第5,602,240號之鹽胺骨架。亦佳為具有上文提及之美國專利第5,034,506號之嗎啉基骨架結構的反義寡核苷酸。

經修飾之寡核苷酸亦可含有一或多個經取代之糖部分。較佳寡核苷酸在2'位置包含以下之一：OH；F；O-烷基、S-烷基或N-烷基；O-烯基、S-烯基或N-烯基；O-炔基、S-炔基或N-炔基；或O-烷基-O-烷基，其中該烷基、烯基及炔基可為經取代或未經取代之C₁至C₁₀烷基或C₂至C₁₀烯基及炔基。尤其較佳為O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂及O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂，其中n及m為1至約10。其他較佳反義寡核苷酸在2'位置包含以下之一：C₁至C₁₀低碳烷基、經取代之低碳烷基、烯基、炔基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、

N_3 、 NH_2 、雜環烷基、雜環烷芳基、胺基烷基胺基、聚烷基胺基、經取代之矽烷基、RNA裂解基團、報導基因(reporter)基團、插入基(intercalator)、改良寡核苷酸之藥物動力學性質之基團、或改良寡核苷酸之藥效(pharmacodynamic)性質之基團、及具有相似性質之其他取代基。一個較佳修飾包括2'-甲氧基乙氧基($2'-O-CH_2CH_2OCH_3$ ，亦稱為2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(Martin等人，*Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504)，亦即烷氧基烷氧基。另一較佳修飾包括2'-二甲基胺基氧基乙氧基，亦即 $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 基團，亦稱為2'-DMAOE，如下文實例中所述，及2'-二甲基胺基乙氧基乙氧基(在此項技術中亦稱為2'-O-二甲基胺基乙氧基乙基或2'-DMAEOE)，亦即 $2'-O-CH_2-O-CH_2-N(CH_3)_2$ 。

另一較佳修飾包括鎖定核酸(LNAs)，其中2'-羥基連接於糖環之3'或4'碳原子，進而形成雙環糖部分。鍵聯較佳為橋接2'氧原子及4'碳原子之亞甲基($-CH_2-$)_n，其中n為1或2。LNAs及其製備描述於WO 98/39352及WO 99/14226中。

其他較佳修飾包括2'-甲氧基($2'-O-CH_3$)、2'-胺基丙氧基($2'-OCH_2CH_2CH_2NH_2$)、2'-烯丙基($2'-CH_2-CH=CH_2$)、2'-O-烯丙基($2'-O-CH_2-CH=CH_2$)及2'-氟($2'-F$)。2'修飾可在阿糖基(arabino)(向上)位置或核糖基(向下)位置。較佳2'-阿糖基修飾為2'-F。相似修飾亦可在寡核苷酸上之其他位置進行，尤其在3'端核苷酸上糖之3'位置或在2'-5'連接之寡核苷酸及5'端核苷酸之5'位置。寡核苷酸亦可具有糖模擬物，諸如替代五呋喃糖基糖之環丁基部分。教示該等修飾之糖結構之製備之代表性美國專利包括(但不限於)美國專利第4,981,957號；第5,118,800號；第5,319,080號；第5,359,044號；第5,393,878號；第5,446,137號；第5,466,786號；第5,514,785號；第5,519,134號；第5,567,811號；第5,576,427號；第5,591,722號；第5,597,909號；第

5,610,300 號；第 5,627,053 號；第 5,639,873 號；第 5,646,265 號；第 5,658,873 號；第 5,670,633 號；第 5,792,747 號；及第 5,700,920 號，各以引用之方式全部併入本文。

寡核苷酸亦可包括核酸鹼基(在此項技術中常常簡單地稱為"鹼基")修飾或取代。如本文中所使用，"未經修飾"或"天然"核酸鹼基包括嘌呤鹼基腺嘌呤(A)及鳥嘌呤(G)，及嘧啶鹼基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U)。經修飾核酸鹼基包括其他合成及天然核酸鹼基，諸如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)；5-羥甲基胞嘧啶；黃嘌呤；次黃嘌呤；2-氨基腺嘌呤；腺嘌呤及鳥嘌呤之6-甲基及其他烷基衍生物；腺嘌呤及鳥嘌呤之2-丙基及其他烷基衍生物；2-硫尿嘧啶、2-硫胸嘧啶及2-硫胞嘧啶；5-鹵尿嘧啶及胞嘧啶；5-丙炔基(-C≡C-CH₃或-CH₂-C≡CH)尿嘧啶及胞嘧啶及嘧啶鹼基之其他炔基衍生物；6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶及胸腺嘧啶；5-尿嘧啶(假尿嘧啶)；4-硫尿嘧啶；8-鹵基、8-氨基、8-硫醇基、8-硫烷基、8-羥基及其他8-經取代腺嘌呤及鳥嘌呤；5-鹵基，尤其5-溴基、5-三氟甲基及其他5-經取代尿嘧啶及胞嘧啶；7-甲基鳥嘌呤及7-甲基腺嘌呤；2-F-腺嘌呤；2-氨基-腺嘌呤；8-氮雜鳥嘌呤及8-氮雜腺嘌呤；7-去氮雜鳥嘌呤及7-去氮雜腺嘌呤；及3-去氮雜鳥嘌呤及3-去氮雜腺嘌呤。其他經修飾核酸鹼基包括三環嘧啶，諸如啡噁嘧胞嘧啶核苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噁嘧-2(3H)-酮)、啡噁嘧胞嘧啶核苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噁嘧-2(3H)-酮)；G-夾鉗物，諸如經取代啡噁嘧胞嘧啶核苷(例如，9-(2-氨基乙氧基)-H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噁嘧-2(3H)-酮)、呋唑胞嘧啶核苷(2H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-2-酮)、吡哆并吡啶胞嘧啶核苷(H-吡哆并[3',2':4,5]吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-酮)。經修飾核酸鹼基亦可包括其中嘌呤或嘧啶鹼基經其他雜環置換之彼等核酸鹼基，例如7-去氮雜-腺嘌呤、7-去氮雜鳥苷、2-氨基吡啶及2-吡啶酮。其他核酸鹼基包括揭示於美國專利第3,687,808號

中之彼等核酸鹼基，揭示於The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I.編. John Wiley & Sons, 1990中之彼等核酸鹼基，及由Englisch等人，Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613所揭示之彼等核酸鹼基。某些該等核酸鹼基尤其適用於增加本發明之寡聚化合物之結合親和力。該等包括5-經取代嘧啶、6-氮雜嘧啶及N-2、N-6及O-6經取代嘌呤，包括2-胺基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶及5-丙炔基胞嘧啶。已展示5-甲基胞嘧啶取代使核酸雙鏈體穩定性增加0.6-1.2°C (Sanghvi等人，Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993，第276-278頁)且為較佳鹼基取代，甚至更尤其在與2'-O-甲氧基乙基糖修飾組合時為較佳的。教示經修飾核酸鹼基之製備之代表性美國專利包括(但不限於)：美國專利第3,687,808號以及美國專利第4,845,205號；第5,130,302號；第5,134,066號；第5,175,273號；第5,367,066號；第5,432,272號；第5,457,187號；第5,459,255號；第5,484,908號；第5,502,177號；第5,525,711號；第5,552,540號；第5,587,469號；第5,594,121號；第5,596,091號；第5,614,617號；第5,645,985號；第5,830,653號；第5,763,588號；第6,005,096號；第5,681,941號及第5,750,692號，其各者以引用之方式併入本文。

化學連接於寡核苷酸之反義寡核苷酸之另一修飾為一或多個增加寡核苷酸之活性、細胞分布或細胞吸收之部分或結合物。本發明之化合物可包括共價結合於諸如第一或第二羥基之官能基之結合基團。本發明之結合基團包括插入基、報導基因分子、多元胺、聚醯胺、聚乙二醇、聚醚、增加寡聚物之藥效性質之基團及增加寡聚物之藥物動力學性質之基團。典型結合基團包括膽固醇、脂質、陽離子脂質、磷脂、陽離子性磷脂、生物素、啡嗪、葉酸、啡啶、蔥醌、吡啶、螢光

素、若丹明(rhodamines)、香豆素及染料。在本發明之情況下增加藥效性質之基團包括改良寡聚物吸收、增加寡聚物對降解之抗性及/或增強與RNA之序列特異性雜交之基團。在本發明之情況下增加藥物動力學性質之基團包括改良寡聚物吸收、分布、新陳代謝或排出之基團。結合部分包括(但不限於)脂質部分，諸如膽固醇部分(Letsinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556)，膽酸(Manoharan等人，Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060)，硫醚，例如己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人，Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309；Manoharan等人，Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770)，硫膽固醇(Oberhauser等人，Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538)，脂肪鏈，例如十二烷二醇或十一基殘基(Saison-Behmoaras等人，EMBO J., 1991, 10, 1111-1118；Kabanov等人，FEBS Lett., 1990, 259, 327-330；Svinarchuk等人，Biochimie, 1993, 75, 49-54)，磷脂，例如二-十六基-外消旋-甘油或三乙基-銻1,2-二-O-十六基-外消旋-甘油鹽-3-H-磷酸酯(Manoharan等人，Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654；Shea等人，Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783)，多元胺或聚乙二醇鏈(Manoharan等人，Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973)，或金剛烷乙酸(Manoharan等人，Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654)，十八烷鹽基部分(Mishra等人，Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237)，或十八烷基胺或己基胺基-羰基-羥膽固醇部分。本發明之寡核苷酸亦可結合於活性藥物物質，例如阿司匹靈(aspirin)、殺鼠靈(warfarin)、苯布宗(phenylbutazone)、布洛芬(ibuprofen)、舒洛芬(suprofen)、芬布芬(fenbufen)、酮洛芬(ketoprofen)、(S)-(+)-普拉洛芬(pranoprofen)、卡洛芬(carprofen)、丹醯基肌胺酸(dansylsarcosine)、2,3,5-三碘苯甲酸、氟滅酸(flufenamic acid)、亞葉酸、苯并噻二嗪、氯噻嗪、二氮

呋、吲哚美羅辛(indomethicin)、巴比妥酸鹽(barbiturate)、頭孢菌素(cephalosporin)、磺胺劑、抗糖尿病劑、抗細菌劑或抗生素。寡核苷酸-藥物結合物及其製備描述於美國專利申請案第09/334,130號(1999年6月15日申請)及美國專利第4,828,979號；第4,948,882號；第5,218,105號；第5,525,465號；第5,541,313號；第5,545,730號；第5,552,538號；第5,578,717號；第5,580,731號；第5,580,731號；第5,591,584號；第5,109,124號；第5,118,802號；第5,138,045號；第5,414,077號；第5,486,603號；第5,512,439號；第5,578,718號；第5,608,046號；第4,587,044號；第4,605,735號；第4,667,025號；第4,762,779號；第4,789,737號；第4,824,941號；第4,835,263號；第4,876,335號；第4,904,582號；第4,958,013號；第5,082,830號；第5,112,963號；第5,214,136號；第5,082,830號；第5,112,963號；第5,214,136號；第5,245,022號；第5,254,469號；第5,258,506號；第5,262,536號；第5,272,250號；第5,292,873號；第5,317,098號；第5,371,241號；第5,391,723號；第5,416,203號；第5,451,463號；第5,510,475號；第5,512,667號；第5,514,785號；第5,565,552號；第5,567,810號；第5,574,142號；第5,585,481號；第5,587,371號；第5,595,726號；第5,597,696號；第5,599,923號；第5,599,928號及第5,688,941號中，其各者以引用之方式併入本文。

在給定化合物中，並非所有位置都必需均勻修飾，且事實上述修飾之超過一者可併入單一化合物中或甚至併入寡核苷酸內之單一核苷處。本發明亦包括為嵌合化合物之反義化合物。在本發明之情況下，"嵌合"反義化合物或"嵌合體"為反義化合物，尤其為寡核苷酸，其含有兩個或兩個以上化學相異區域，各區域由至少一個單體單元(亦即，在寡核苷酸化合物之狀況下為核苷酸)組成。該等寡核苷酸通常含有至少一個區域，其中寡核苷酸經修飾以便在寡核苷酸上賦予對

核酸酶降解之增加抗性，增加之細胞吸收及/或對標靶核酸之增加之結合親和力。寡核苷酸之額外區域可用作能夠分裂RNA:DNA或RNA:RNA雜交物之酶之受質。舉例而言，RNase H為分裂RNA:DNA雙鏈體之RNA鏈之細胞核酸內切酶。RNase H之活化因此引起RNA標靶分裂，進而大大增加寡核苷酸抑制基因表現之效率。因此，當使用嵌合寡核苷酸時，與雜交於相同標靶區域之硫代磷酸酯去氧基寡核苷酸比較，常常可用較短寡核苷酸獲得相當結果。本發明之嵌合反義化合物可形成兩種或兩種以上如上所述之寡核苷酸、經修飾寡核苷酸、寡核苷及/或寡核苷酸模擬物之複合結構。較佳嵌合反義寡核苷酸在3'末端併入至少一個2'經修飾糖(較佳2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃)以賦予核酸酶抗性，及併入具有至少4個鄰接2'-H糖之區域以賦予RNase H活性。該等化合物在此項技術中亦已稱為雜交物或間隙體(gapmer)。較佳間隙體在3'-末端具有2'經修飾糖(較佳2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃)之區域且在5'末端藉由至少一個具有至少4個鄰接2'-H糖之區域分離，且較佳併入硫代磷酸酯骨架鍵聯。教示該等雜交結構之製備之代表性美國專利包括(但不限於)美國專利第5,013,830號；第5,149,797號；第5,220,007號；第5,256,775號；第5,366,878號；第5,403,711號；第5,491,133號；第5,565,350號；第5,623,065號；第5,652,355號；第5,652,356號及第5,700,922號，其各者以引用之方式全部併入本文。

根據本發明使用之反義化合物可方便及習慣性地經由固相合成之熟知技術來製得。該合成之設備藉由包括(例如)Applied Biosystems(Foster City, Calif.)之若干供應商出售。可另外或替代地使用此項技術中已知之用於該合成之任何其他方式。熟知使用相似技術以製備諸如硫代磷酸酯及烷基化衍生物之寡核苷酸。本發明之化合物亦可與其他分子、分子結構或化合物之混合物混合、用其囊封、與其結合或另外與其締合，就實例而言，該等其他分子、分子結構或化合

物之混合物爲脂質體、受體靶向分子、口服、直腸、局部或其他調配物，其有助於攝取、分布及/或吸收。教示該等攝取、分布及/或吸收輔助調配物之製備之代表性美國專利包括(但不限於)美國專利第5,108,921號；第5,354,844號；第5,416,016號；第5,459,127號；第5,521,291號；第5,543,158號；第5,547,932號；第5,583,020號；第5,591,721號；第4,426,330號；第4,534,899號；第5,013,556號；第5,108,921號；第5,213,804號；第5,227,170號；第5,264,221號；第5,356,633號；第5,395,619號；第5,416,016號；第5,417,978號；第5,462,854號；第5,469,854號；第5,512,295號；第5,527,528號；第5,534,259號；第5,543,152號；第5,556,948號；第5,580,575號及第5,595,756號，其各者以引用之方式併入本文。

正義或反義寡核苷酸之其他實例包括彼等寡核苷酸：其共價連接於有機部分，諸如WO 90/10048中所述之彼等部分，及增加寡核苷酸對標靶核酸序列之親和力之其他部分，諸如聚-(L-離胺酸)。另外，諸如玫瑰樹鹼之插入劑及烷化劑或金屬複合物可連接於正義或反義寡核苷酸，以修飾反義或正義寡核苷酸對標靶核苷酸序列之結合特異性。

反義或正義寡核苷酸可藉由任何基因轉移方法，包括(例如)CaPO₄介導之DNA轉染、電穿孔或藉由使用諸如埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus)之基因轉移載體而引入含有標靶核酸序列之細胞中。在一較佳程序中，將反義或正義寡核苷酸插入適合逆轉錄病毒載體中。將含有標靶核酸序列之細胞與重組逆轉錄病毒載體活體內或離體接觸。合適逆轉錄病毒載體包括(但不限於)得自鼠逆轉錄病毒M-MuLV之彼等載體、N2(得自M-MuLV之逆轉錄病毒)或命名爲DCT5A、DCT5B及DCT5C之雙重複本載體(參見WO 90/13641)。

正義或反義寡核苷酸亦可如WO 91/04753中所述，藉由與配位體

結合分子形成結合物而引入含有標靶核苷酸序列之細胞中。合適配位體結合分子包括(但不限於)細胞表面受體、生長因子、其他細胞激素或結合於細胞表面受體之其他配位體。較佳地，配位體結合分子之結合大體上不干擾配位體結合分子與其相應分子或受體結合之能力，或不阻斷正義或反義寡核苷酸或其結合版本進入細胞中。

或者，正義或反義寡核苷酸可如WO 90/10448中所述，藉由形成寡核苷酸-脂質複合物而引入含有標靶核酸序列之細胞中。正義或反義寡核苷酸-脂質複合物較佳藉由內源脂肪酶在細胞內解離。

反義或正義RNA或DNA分子長度通常為至少約5個核苷酸，或者長度為至少約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990或1000個核苷酸，其中在本文中，術語"約"意謂所提及核苷酸序列長度加或減彼提及長度之10%。

探針亦可用於PCR技術中以產生用於識別緊密相關多肽編碼序列之序列之池。

編碼多肽之核苷酸序列亦可用以構築用於映射編碼彼多肽之基因及用於遺傳分析患有遺傳病症之個體的雜交探針。本文中提供之核

苷酸序列可使用諸如原位雜交、針對已知染色體標記之鍵聯分析及庫雜交篩選之已知技術，映射至染色體及染色體之特定區域。

多肽可用於檢定中以識別涉及與多肽之結合相互作用之其他蛋白質或分子。藉由該等方法，可識別受體/配位體結合相互作用之抑制劑。涉及該等結合相互作用之蛋白質亦可用以篩選結合相互作用之肽或小分子抑制劑。篩選檢定可經設計以尋找模擬天然多肽或多肽受體之生物活性之前導化合物。該等篩選檢定將包括服從化學庫之高產量篩選，使其尤其適於識別小分子藥物候選者之檢定。所涵蓋之小分子包括合成有機或無機化合物。可以包括蛋白質-蛋白結合檢定、生物化學篩選檢定、免疫鑑定及基於細胞之檢定之各種方式執行檢定，該等檢定在此項技術中已經充分表徵。

編碼多肽之核酸或其經修飾形式亦可用以產生轉殖基因動物或"剔除"動物，其又適用於開發及篩選治療適用性試劑。轉殖基因動物(例如小鼠或大鼠)為具有含有轉殖基因之細胞之動物，該轉殖基因在出生前，例如胚期引入動物或動物之祖先。轉殖基因為DNA，其整合至轉殖基因動物自其發育之細胞之基因組中。在一實施例中，編碼多肽之cDNA可用以根據已建立技術選殖編碼多肽之基因組DNA，且基因組序列可用以產生含有表現編碼多肽之DNA之細胞的轉殖基因動物。產生轉殖基因動物，尤其為諸如小鼠或大鼠之動物之方法，在此項技術中已成為習知者，且描述於(例如)美國專利第4,736,866號及第4,870,009號中。通常，將靶向特定細胞以便與組織特異性強化子一起進行多肽轉殖基因併入。包括編碼在胚期引入動物生殖系中之多肽之轉殖基因複本的轉殖基因動物可用以檢查編碼多肽之DNA之表現增加的效應。該等動物可用作認為賦予保護以避免(例如)與其過度表現相關病理性病狀之試劑之測試動物。根據本發明之該態樣，用該試劑治療動物且與具有轉殖基因之未經治療動物比較，病理性病狀之發生率

降低將指示用於病理性病狀之潛在治療介入。

或者，多肽之非人類同系物可用以構築基因"剔除"動物，其由於編碼多肽之內源基因與編碼引入動物之胚胎幹細胞中之多肽的經改變基因組DNA之間的同源重組，而具有編碼多肽之缺陷性或經改變基因。舉例而言，根據已建立之技術，編碼多肽之cDNA可用以選殖編碼多肽之基因組DNA。編碼多肽之基因組DNA之部分可經缺失或經另一基因置換，諸如編碼可用以監視整合之可選標記之基因。通常，載體中包括若干千鹼基之未經改變側接DNA(在5'及3'末端)[參看(例如)Thomas及Capecchi, Cell, 51:503(1987)之同源重組載體之描述]。將載體引入胚胎幹細胞株(例如，藉由電穿孔)及細胞中，其中選擇已與內源DNA同源重組之所引入DNA[參看(例如)Li等人，Cell, 69:915(1992)]。隨後，將所選細胞注射至動物(例如，小鼠或大鼠)之胚胎中以形成凝集嵌合體[參見(例如)Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson編輯(IRL, Oxford, 1987)，第113-152頁]。隨後可將嵌合胚胎植入合適假孕雌性培育動物內，且使胚胎萌芽以產生"剔除"動物。在其生殖細胞中含有同源重組DNA之子代可藉由標準技術來識別且用以繁殖動物，其中動物之所有細胞均含有同源重組DNA。剔除動物可(例如)就其抵抗某些病理性病狀之能力及其由於缺少多肽而發展病理性病狀來表徵。

編碼多肽之核酸亦可用於基因療法中。在基因療法應用中，將基因引入細胞中以達到治療有效遺傳產物之活體內合成，(例如)以置換缺陷性基因。"基因療法"包括持久效應藉由單一治療達成之習知基因療法，及投與基因治療劑，其涉及一次投與或重複投與治療有效之DNA或mRNA。反義RNA及DNA可用作用於阻斷某些基因活體內表現之治療劑。已展示，可將短反義寡核苷酸引入細胞中，其中，不管藉由其由細胞膜之限制性吸收引起之其低細胞內濃度，其仍擔當抑制

劑。(Zamecnik 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986])。寡核苷酸可經修飾以增強其吸收, 例如藉由不帶電基團取代其帶負電磷酸二酯基團來修飾。

存在可用於將核酸引入活細胞中之各種技術。該等技術視核酸活體外轉移至培養細胞中還是活體內轉移至所欲宿主之細胞中而變化。適於將核酸活體外轉移至哺乳動物細胞中之技術包括使用脂質體、電穿孔、顯微注射、細胞融合、DEAE-葡聚糖、磷酸鈣沈澱方法等等。當前較佳活體內基因轉移技術包括用病毒(通常逆轉錄病毒)載體轉染及病毒鞘蛋白質-脂質體介導轉染(Dzau 等人, Trends in Biotechnology 11, 205-210 [1993])。在一些情況下, 理想的為提供核酸來源靶向標靶細胞之藥劑, 諸如對細胞表面膜蛋白質或標靶細胞有特異性之抗體, 標靶細胞上之受體之配位體等等。在使用脂質體之情況下, 結合與內飲作用相關之細胞表面膜蛋白質之蛋白質可用於靶向及/或促進吸收(例如)對特定細胞類型有向性(tropic)之衣殼蛋白質或其片段, 在循環中經歷內化之蛋白質、靶向細胞內局部化且增強細胞內半衰期之蛋白質之抗體。受體介導內飲作用之技術(例如)由Wu等人, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); 及Wagner等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)描述。對基因標記及基因療法協定之評述, 參見Anderson等人, Science 256, 808-813 (1992)。

涉及篩選之方法

本發明涵蓋篩選化合物以識別防止多肽之效應(拮抗劑)或促進多肽之效應(促效劑)的彼等化合物之方法。針對拮抗劑藥物候選者之篩選檢定經設計以識別化合物, 該等化合物結合藉由本文中識別之基因編碼之多肽或與其複合, 或另外干擾所編碼多肽與其他細胞蛋白質之相互作用, 包括(例如)抑制多肽自細胞之表現。該等篩選檢定將包括服從化學庫之高產量篩選, 使其尤其適於識別小分子藥物候選者之檢

定。

可以包括蛋白質-蛋白結合檢定、生物化學篩選檢定、免疫鑑定及基於細胞之檢定之各種方式執行檢定，該等檢定在此項技術中已經充分表徵。

針對拮抗劑之所有檢定為常見的，特徵在於其要求使藥物候選者與藉由本文中識別之核酸編碼之多肽在足以使該等2個組分互相作用之條件下接觸且歷時足以使該等2個組分互相作用之時間。

在結合檢定中，相互作用為結合且所形成複合物可在反應混合物中分離或偵測。在一特定實施例中，多肽或藥物候選者藉由共價或非共價連接固定於固相上，例如微量滴定板上。非共價連接通常藉由用多肽之溶液塗佈固體表面且乾燥來完成。或者，例如單株抗體之對欲固定之多肽有特異性的固定抗體可用以將其錨定於固體表面。檢定藉由將可藉由可偵測標記來標記之非固定組分添加至固定組分，例如含有經錨定組分之塗佈表面而執行。當反應完成時，(例如)藉由洗滌移除非反應組分，且偵測錨定於固體表面上之複合物。當最初非固定組分帶有可偵測標記時，偵測到固定於表面上之標記指示彼複合發生。在最初非固定組分不帶有標記時，複合可例如藉由使用特異性結合固定複合物之經標記抗體來偵測。

若候選化合物與多肽相互作用但不結合於多肽，則其與彼多肽之相互作用可藉由用於偵測蛋白質-蛋白質相互作用之熟知方法來檢定。該等檢定包括傳統方法，諸如交聯、共同免疫沈澱及經由梯度或層析柱之共同純化。另外，蛋白質-蛋白質相互作用可藉由使用由Fields及同事(Fields及Song, *Nature (London)*, 340:245-246 (1989)；Chien等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991))所述之基於酵母之遺傳系統來監測，其如由Chevray及Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991)所揭示。諸如酵母GAL4之許多

轉錄活化劑由2個物理上離散之模組化域組成，一個擔當DNA-結合域，另一個起轉錄-活化域作用。上述公開案中所述之酵母表現系統(通常稱為"雙雜交系統")利用該性質，且使用2種雜交蛋白質，一者中，抗原與GAL4之DNA-結合域融合，另一者中候選活化蛋白質與活化域融合。GAL1-*lacZ*報導基因在GAL4活化啟動子之控制下之表現視GAL4活性經由蛋白質-蛋白質相互作用之重建而定。用 β -半乳糖苷酶之產色受質偵測含有互相作用多肽之菌落。使用雙雜交技術識別2種特定蛋白質之間的蛋白質-蛋白質相互作用之完整套組(MATCHMAKER™)係自Clontech市售。該系統亦可擴充以映射涉及特定蛋白質相互作用之蛋白質域以及精確定位對該等相互作用而言為關鍵之胺基酸殘基。

干擾本文中識別之編碼多肽之基因及其他細胞內或細胞外組分之相互作用的化合物可如下測試：通常，在允許2種產物之相互作用及結合條件下歷時允許2種產物之相互作用及結合之時間製備含有基因產物及細胞內或細胞外組分之反應混合物。為測試候選化合物抑制結合之能力，在不存在及存在測試化合物之情況下進行反應。另外，可將安慰劑添加至第三反應混合物中以用作正對照。測試化合物與存在於混合物中之細胞內或細胞外組分之間的結合(複合物形成)如上文所述來監測。在對照反應中而非在含有測試化合物之反應混合物中形成複合物，指示測試化合物干擾測試化合物與其反應搭配物之相互作用。

為檢定拮抗劑，可將多肽連同欲針對特定活性來篩選之化合物一起添加至細胞中，且該化合物在多肽存在下抑制所關注之活性之能力指示，化合物為多肽之拮抗劑。或者，拮抗劑可藉由在適於競爭性抑制檢定之條件下，將多肽及潛在拮抗劑與膜結合多肽受體或編碼受體組合來偵測。多肽可(諸如)藉由放射性來標記，以便結合於受體之

多肽分子數量可用以測定潛在拮抗劑之有效性。編碼受體之基因可藉由熟習此項技術者已知之許多方法，例如配位體淘選及FACS分選來識別。Coligan等人，*Current Protocols in Immun.*, (2)：第5章(1991)。較佳地，使用表現選殖，其中自對多肽起反應之細胞製備多聚腺嘌呤化RNA，且將自該RNA產生之cDNA庫分成池且用以轉染COS細胞或對多肽不敏感之其他細胞。使在玻璃載玻片上生長之經轉染細胞暴露於經標記多肽。多肽可藉由包括碘化或包合位點特異性蛋白激酶之識別位點之各種方式來標記。固定及培養之後，使載玻片經受自動放射線分析。識別陽性池且製備子池，且使用互動式子彙集及再篩選方法再轉染，最後產生編碼推定受體之單一純系。

作為用於受體識別之替代方法，經標記多肽可與表現受體分子之細胞膜或提取物製劑光親和連接。藉由PAGE將交聯材料拆分且暴露於X射線膠片。可將含有受體之經標記複合物切除、拆分成肽片段，且使其經受蛋白質微定序。自微定序獲得之胺基酸序列將用以設計一組簡并寡核苷酸探針，以篩選cDNA庫來識別編碼推定受體之基因。

在針對拮抗劑之另一檢定中，在候選化合物存在下，用經標記多肽培養表現受體之哺乳動物細胞或膜製劑。可隨後量測化合物增強或阻斷該相互作用之能力。

潛在拮抗劑之更特定實例包括結合於免疫球蛋白與多肽之融合物之寡核苷酸，且尤其為包括(而不限於)以下者之抗體：多株及單株抗體及抗體片段、單鏈抗體、抗遺傳型抗體及該等抗體或片段之嵌合或人類化版本，以及人類抗體及抗體片段。或者，潛在拮抗劑可為緊密相關之蛋白質，例如識別受體但不賦予效應，進而競爭性抑制多肽之作用之多肽的突變形式。

另一潛在拮抗劑為使用反義技術製備之反義RNA或DNA構築

體，其中(例如)反義RNA或DNA分子起作用以藉由與經靶向mRNA雜交且防止蛋白質轉譯來直接阻斷mRNA轉譯。反義技術可用以經由三重螺旋形成或反義DNA或RNA來控制基因表現，兩種方法均係基於聚核苷酸與DNA或RNA之結合。舉例而言，編碼本文中之成熟多肽之聚核苷酸序列之5'編碼部分可用以設計長度約10至40個鹼基對之反義RNA寡核苷酸。DNA寡核苷酸經設計以與涉及轉錄之基因之區域互補(三重螺旋-參見Lee等人，Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979)；Cooney等人，Science, 241: 456 (1988)；Dervan等人，Science, 251:1360 (1991))，進而防止多肽之轉錄及產生。反義RNA寡核苷酸與mRNA活體內雜交且阻斷mRNA分子轉譯至多肽(反義-Okano, Neurochem., 56:560 (1991)；Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression(CRC Press: Boca Raton, FL, 1988)中。上文所述之寡核苷酸亦可傳遞至細胞中，以便反義RNA或DNA可活體內表現以抑制多肽產生。當使用反義DNA時，得自例如標靶基因核苷酸序列之約-10與+10位置之間的轉譯起始位點之寡聚脫氧核糖核苷酸為較佳的。

潛在拮抗劑包括小分子，其與多肽之活性位點、受體結合位點或生長因子或其他有關結合位點結合，進而阻斷多肽之正常生物活性。小分子之實例包括(但不限於)小肽或肽樣分子，較佳為可溶性肽及合成非肽基有機或無機化合物。

核糖核酸酶為能夠催化RNA之特定分裂之酶促RNA分子。核糖核酸酶藉由與互補標靶RNA序列特異性雜交，接著核酸內切性分裂來起作用。潛在RNA標靶內之特定核糖核酸酶分裂位點可藉由已知技術識別。對其他細節，參見(例如)Rossi, Current Biology, 4:469-471 (1994)，及PCT公開案第WO 97/33551號(1997年9月18日公開)。

在用以抑制轉錄之三重螺旋形成中之核酸分子應為單鏈的且包含脫氧核苷酸。該等寡核苷酸之鹼基組成經設計以便其經由

Hoogsteen鹼基配對規則促進三重螺旋形成，該等規則通常需要在雙鏈體之一個鏈上之嘌呤或嘧啶之相當大展幅。對其他細節，參見(例如)PCT公開案第WO 97/33551號，同上。

該等小分子可藉由上文討論之篩選檢定之任何一或多者及/或藉由熟習此項技術者熟知之任何其他篩選技術來識別。

編碼核酸之經分離多肽可使用此項技術中熟知及如本文中所述之技術用於重組產生多肽。又，所產生之多肽可使用此項技術中熟知及如本文中所述之技術用於產生抗體。

特異性結合本文中所識別之多肽之抗體以及藉由上文揭示之篩選檢定識別之其他分子可以醫藥組合物形式投與以用於治療各種病症，包括癌症。

若多肽在細胞內且完整抗體用作抑制劑，則內化抗體為較佳的。然而，脂質轉染或脂質體亦可用以將抗體或抗體片段傳遞至細胞中。在使用抗體片段之情況下，與抗原之結合域特異性結合之極小抑制片段為較佳的。舉例而言，基於抗體之可變區序列，肽分子可經設計保留結合抗原序列之能力。該等肽可化學合成及/或藉由重組DNA技術產生。參見(例如)Marasco等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)。

醫藥調配物

藉由將具有所要純度之抗體與任選生理學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑混合(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第20版(2000))來製備呈水溶液、冷凍乾燥或其他乾燥調配物形式之包含抗體之治療調配物以供儲存。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對受體無毒性，且包括：緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽、組胺酸及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如十八基二甲基苄基氯化銨；氯化六氫季銨

(hexamethonium chloride)；氯化苯甲烴銨(benzalkonium chloride)；苄索氯銨(benzethonium chloride)；苯酚；丁醇或苄醇；對羥苯甲酸烷基酯，諸如對羥苯甲酸甲酯或對羥苯甲酸丙酯；兒茶酚(catechol)；間苯二酚(resorcinol)；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽抗衡離子，諸如鈉離子；金屬複合物(例如鋅蛋白質複合物)；及/或非離子型界面活性劑，諸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

本文中之調配物亦可含有一種以上對於正治療之特定適應症所必需之活性化合物，較佳為具有彼此不負面影響之互補活性的彼等活性化合物。該等分子以對所預期之目的有效的量適宜地以組合形式存在。

活性成分亦可(例如)藉由凝聚技術或藉由界面聚合俘獲於所製備之微膠囊(例如分別為羥甲基纖維素微膠囊或明膠微膠囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊)中，膠狀藥物傳遞系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊)中或巨乳液中。該等技術揭示於 *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*，第20版(2000)中。

欲用於活體內投藥之調配物必須為無菌的。其易藉由經無菌濾膜過濾來實現。

可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之合適實例包括含有免疫球蛋白之固體疏水性聚合物之半透性基質，該等基質呈成形物品(例如薄膜或微膠囊)的形式。持續釋放基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如，聚(甲基丙烯酸2-羥基乙酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸交酯(美國專利

第3,773,919號)、L-麩胺酸與 γ -L-麩胺酸乙酯之共聚物、不可降解性乙烯-乙酸乙烯酯、可降解性乳酸-乙醇酸共聚物(諸如LUPRON DEPOT™(包含乳酸-乙醇酸共聚物與乙酸柳培林(leuprolide acetate)之可注射微球體))及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。雖然諸如乙烯-乙酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸之聚合物能釋放分子歷時超過100天,但是某些水凝膠釋放蛋白質歷時較短時間。當囊封之免疫球蛋白在體內長久保留時,其可由於在37°C下暴露於濕氣而變性或聚集,導致生物活性損失及可能的免疫原性改變。可設計合理策略用於穩定,其視所涉及之機制而定。舉例而言,若發現凝集機制為經由硫基-二硫化物互換形成分子間S-S鍵,則可藉由修飾硫氫基殘基、自酸性溶液冷凍乾燥、控制濕氣含量、使用適當添加劑及開發特定聚合物基質組合物來達成穩定。

另外涵蓋,可藉由基因療法將適用於本發明之藥劑引入個體中。基因療法係指藉由將核酸投與個體來執行之療法。在基因療法應用中,將基因引入細胞中以達成治療有效遺傳產物之活體內合成,例如置換缺陷性基因。"基因療法"包括持久效應藉由單一治療達成之習知基因療法與基因治療劑之投藥,其涉及一次或重複投與治療有效DNA或mRNA。反義RNA及DNA可用作用於阻斷某些基因活體內表現之治療劑。參見(例如)實例中所述之KL β -SiRNA。已展示,可將短反義寡核苷酸引入細胞中,其中,不管藉由其由細胞膜之限制性吸收引起之其低細胞內濃度,其仍擔當抑制劑。(Zamecnik等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 (1986))。寡核苷酸可經修飾以增強其吸收,例如藉由不帶電基團取代其帶負電磷酸二酯基團來修飾。對基因療法之方法之一般評述,參見(例如)Goldspiel等人, Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993); Wu及Wu Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan Science 260:926-932 (1993); Morgan及Anderson Ann. Rev. Biochem.

62:191-217 (1993)；及May TIBTECH 11:155-215 (1993)。可使用之重組DNA技術中通常已知之方法描述於Ausubel等人編(1993) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY；及Kriegler (1990) Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY中。

用途

KL β 調節劑可用於(例如)活體外、離體及活體內治療方法中。

本發明提供適用於調節與KL β 之表現及/或活性，諸如增加之表現及/或活性或不當表現及/或活性相關之疾病病況的方法及組合物，該等方法包含向需要該治療之個體投與有效劑量之KL β 拮抗劑(諸如抗KL β 抗體)。

在一態樣中，本發明提供用於調節與KL β 及FGF19之表現及/或活性，諸如增加之表現及/或活性或不當表現及/或活性相關之疾病病況的方法，該等方法包含向需要該治療之個體投與有效劑量之KL β 拮抗劑(諸如抗KL β 抗體)。

在一態樣中，本發明提供用於調節與KL β 及FGFR4之表現及/或活性，諸如增加之表現及/或活性或不當表現及/或活性相關之疾病病況的方法，該等方法包含向需要該治療之個體投與有效劑量之KL β 拮抗劑(諸如抗KL β 抗體)。

熟習此項技術者可使用此項技術中已知之方法及本文中所揭示之方法來測定病症是否與KL β 、FGF19及/或FGFR4之表現及/或活性相關。

應瞭解，任何適合KL β 拮抗劑(諸如抗KL β 抗體)可用於治療方法中，該拮抗劑包括單株及/或多株抗體、人類抗體、嵌合抗體、親和力成熟抗體、人類化抗體及/或抗體片段。

此外，至少一些抗體可結合來自其他物種之抗原。因此，抗體

可用以(例如)在含有抗原之細胞培養物中、人類個體體內或具有與抗體交叉反應之抗原之其他哺乳動物個體(例如黑猩猩、狒狒、絨猴、獼猴及恆河猴、豬或小鼠)體內結合特定抗原活性。在一實施例中，抗體可藉由使抗體與抗原接觸以便抑制抗原活性而用於抑制抗原活性。較佳地，抗原為人類蛋白質分子。

在一實施例中，抗體可用於結合遭受與增加之抗原表現及/或活性相關之病症的個體中之抗原之方法中，該方法包含向個體投與抗體以便結合個體體內之抗原。較佳地，抗原為人類蛋白分子且個體為人類個體。或者，個體可為表現與抗體結合之抗原之哺乳動物。另外，個體可為已引入抗原(例如，藉由投與抗原或由表現抗原轉殖基因)之哺乳動物。抗體可投與人類個體用於治療目的。此外，可將抗體投與表現與該免疫球蛋白交叉反應之抗原的非人類哺乳動物(例如靈長類動物、豬或小鼠)用於獸醫目的或將其作為人類疾病之動物模型。就後者而言，該等動物模型可適用於評估抗體之治療功效(例如測試投藥劑量及時程)。

抗體可用以治療、抑制、延遲與一或多種抗原分子之表現及/或活性相關之疾病、病症或病況之進程、防止/延遲其復發、改善或預防該等疾病、病症或病況。

在某些實施例中，將包含與一或多種細胞毒素劑結合之抗體之免疫結合物投與患者。在一些實施例中，免疫結合物及/或與其結合之抗原經細胞內化，產生免疫結合物殺死其所結合之標靶細胞之治療功效增加。在一實施例中，細胞毒素劑靶向或干擾標靶細胞中之核酸。在一實施例中，細胞毒素劑靶向或干擾微管聚合。該等細胞毒素劑之實例包括本文所述之任何化學治療劑(諸如類美登素、奧瑞斯他汀、海兔毒素或刺胞黴素)、放射性同位素或核糖核酸酶或DNA核酸內切酶。

在本文中之任何方法中，熟習此項技術者可將有效量之第二藥劑連同KL β 拮抗劑一起投與個體或患者(其中本文中之抗體為第一藥劑)，該第二藥劑為可治療需要治療之個體中之病狀的另一活性劑。舉例而言，KL β 拮抗劑可與另一KL β 拮抗劑、抗體、化學治療劑(包括化學治療劑之混合物)、抗血管生成劑、免疫抑制劑、細胞激素、細胞激素拮抗劑及/或生長抑制劑共同投與。該第二藥劑之類型視包括以下者之各種因素而定：諸如癌症或自體免疫病症之病症之類型、疾病嚴重性、患者之病狀及年齡、所用第一藥劑之類型及劑量等等。

在KL β 拮抗劑抑制腫瘤生長之情況下，例如可尤其需要將其與一或多種亦抑制腫瘤生長之其他治療劑組合。舉例而言，在治療方案中，例如，在治療包括肝細胞癌及胰腺癌之本文中所述之任何疾病中，KL β 拮抗劑可與抗血管生成劑，諸如抗VEGF抗體(例如AVASTIN®)及/或抗ErbB抗體(例如HERCEPTIN®曲妥珠單抗抗HER2抗體，或與HER2之域II結合之抗HER2抗體，諸如OMNITARG™帕妥珠單抗抗HER2抗體)組合。或者或另外，患者可接受組合輻射療法(例如，外光束照射，或用放射性標記劑(諸如抗體)治療)。上述該等組合療法包括組合投藥(其中兩種或兩種以上藥劑包括於同一或分開之調配物中)及獨立投藥，在該狀況下，抗體之投藥可在施以佐劑療法之前及/或之後進行。另外，預期KL β 拮抗劑與諸如另一生物分子之相對非細胞毒素劑(例如抗體)組合相對於KL β 拮抗劑與對細胞高毒性之其他藥劑之化學治療劑組合將降低細胞毒性。

用KL β 拮抗劑與一或多種第二藥劑之組合之治療較佳引起癌症之徵象或症狀改善。舉例而言，該療法可相對於僅用第二藥劑(例如僅化學治療劑)治療之患者引起存活改良(總存活及/或無進展存活)，及/或可產生客觀反應*(部分或完全，較佳為完全反應)。此外，用KL β 拮抗劑與一或多種第二藥劑之組合之治療較佳引起對患者之相加且更佳

協同(或大於相加)治療利益。較佳地，在該組合方法中，第二藥劑之至少一次投藥與KL β 拮抗劑之至少一次投藥之間的定時為約1個月或1個月以下，更佳為約2週或2週以下。

對治療癌症而言，第二藥劑較佳為另一KL β 拮抗劑、抗體、化學治療劑(包括化學治療劑之混合物)、抗血管生成劑、免疫抑制劑、前藥、細胞激素、細胞激素拮抗劑、細胞毒素放射療法、皮質類固醇、止吐劑、癌症疫苗、止痛劑、抗血管劑及/或生長抑制劑。細胞毒素劑包括與DNA相互作用之藥劑、抗代謝物、拓撲異構酶I或II抑制劑，或紡錘體抑制劑或穩定劑(例如，較佳為長春花生物鹼，更佳選自長春鹼、脫氧長春花鹼(deoxyvinblastine)、長春新鹼、長春地辛、長春瑞濱、長春匹定、長春磷汀(vinfosiltine)、長春利定(vinzolidine)及長春寧(vinfunine))，或用於化學療法中之任何藥劑，諸如5-FU、紫杉烷、阿黴素或地塞米松(dexamethasone)。

在另一實施例中，第二藥劑為用以治療癌症之抗體，諸如針對HER2/neu受體之細胞外域之彼等抗體，例如曲妥珠單抗或其功能性片段之一，pan-HER抑制劑、Src抑制劑、MEK抑制劑或EGFR抑制劑(例如抗EGFR抗體(諸如抑制EGFR之酪胺酸激酶活性之抗體)，其較佳為小鼠單株抗體225、其小鼠-人類嵌合衍生物C225或得自該抗體225之人類化抗體或衍生天然藥劑、二苯胺基鄰苯二甲醯亞胺、吡啶并吡啶啉或吡咯并吡啶啉、喹啉、吉非替尼(gefitinib)、埃羅替尼(erlotinib)、西妥昔單抗、ABX-EFG、卡奈替尼、EKB-569及PKI-166)或雙重EGFR/HER-2抑制劑，諸如拉帕替尼(lapatinib)。額外第二藥劑包括阿來組單抗(alemtuzumab；CAMPATH™)；FavID(IDKLH)；具有經改變糖基化之CD20抗體，諸如GA-101/GLYCART™；奧利默森(oblimersen；GENASENSE™)；沙立度胺(thalidomide)及其類似物，諸如來那度胺(lenalidomide；REVLIMID™)；伊馬替尼；索拉非尼；

毆妥目單抗(ofatumumab；HUMAX-CD20™)；抗CD40抗體，例如SGN-40；及抗CD-80抗體，例如加利昔單抗(galiximab)。

止吐劑較佳為昂丹司瓊鹽酸鹽(ondansetron hydrochloride)、格拉司瓊鹽酸鹽(granisetron hydrochloride)、甲氧氯普胺(metoclopramide)、多潘立酮(domperidone)、氟哌啶醇(haloperidol)、賽克利嗪(cyclizine)、氯羧安定(lorazepam)、丙氯拉嗪(prochlorperazine)、地塞米松、左美丙嗪(levomepromazine)或托烷司瓊(tropisetron)。疫苗較佳為以GM-CSF DNA及細胞為主之疫苗、樹突狀細胞疫苗、重組病毒疫苗、熱休克蛋白(HSP)疫苗、同種異體或自體腫瘤疫苗。止痛劑較佳為布洛芬、萘普生、三水楊酸膽鹼鎂或鹽酸氧可酮(oxycodone hydrochloride)。抗血管劑較佳為貝伐單抗或rhuMAb-VEGF。其他第二藥劑包括抗增生劑，諸如法呢基(farnesyl)蛋白質轉移酶抑制劑、抗VEGF抑制劑、p53抑制劑或PDGFR抑制劑。本文中之第二藥劑亦包括生物靶向療法，諸如用(例如)抵抗某些受體之抗體以及小分子靶向療法之治療。

許多抗血管生成劑已經識別且在此項技術中已知，該等抗血管生成劑包括本文中所列之彼等藥劑，例如，定義下所列舉之彼等藥劑及例如Carmeliet及Jain, *Nature* 407:249-257(2000)；Ferrara等人，*Nature Reviews: Drug Discovery*, 3:391-400 (2004)；及Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003)中所列舉之彼等藥劑。亦參見美國專利申請案US 20030055006。在一實施例中，抗KLβ抗體係與包括但不限於以下各者之抗VEGF中和抗體(或片段)及/或另一種VEGF拮抗劑或VEGF受體拮抗劑組合使用：(例如)可溶性VEGF受體(例如，VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、神經氈蛋白(neuropilin)(例如，NRP1、NRP2))片段、能夠阻斷VEGF或VEGFR、中和抗VEGFR抗體之適體、VEGFR酪氨酸激酶(RTK)之低分子量抑制劑、VEGF之反義策略、針

對VEGF或VEGF受體之核糖酶、VEGF之拮抗劑變異體及其任何組合。或者或另外，除VEGF拮抗劑及其他藥劑之外，兩種或兩種以上血管生成抑制劑可視需要共投與患者。在某些實施例中，一或多種額外治療劑(例如抗癌劑)可與KL β 拮抗劑(諸如抗KL β 抗體)、VEGF拮抗劑及抗血管生成劑組合投與。

本文中所用之化學治療劑描述於上文(例如)"化學治療劑"之定義中。

示範性第二藥劑包括烷化劑，葉酸拮抗劑，嘧啶拮抗劑，細胞毒素抗生素，鉑化合物或以鉑為主之化合物，紫杉烷，長春花生物鹼，c-Kit抑制劑，拓撲異構酶抑制劑，抗血管生成抑制劑，諸如抗VEGF抑制劑、HER-2抑制劑、EGFR抑制劑或雙重EGFR/HER-2激酶抑制劑，抗雌激素，諸如氟維司群，及激素療法藥劑，諸如卡鉑、順鉑、吉西他濱、卡西他賓、表柔比星、他莫西芬，芳香酶抑制劑及強的松。最佳地，癌症為結腸直腸癌且第二藥劑為EGFR抑制劑，諸如埃羅替尼，抗VEGF抑制劑，諸如貝伐單抗，或為西妥昔單抗、埃諾替康(arinotecan)、伊立替康或FOLFOX，或癌症為乳癌，第二藥劑為抗雌激素調節劑，諸如氟維司群、他莫西芬或芳香酶抑制劑，諸如來曲唑、依西美坦或安美達錠，或為VEGF抑制劑，諸如貝伐單抗，或為化學治療劑，諸如阿黴素，及/或紫杉烷，諸如太平洋紫杉醇，或為抗HER-2抑制劑，諸如曲妥珠單抗或雙重EGFR/HER-2激酶抑制劑，諸如拉帕替尼或HER-2下調劑(downregulator)，諸如17AAG(膠達納黴素衍生物，其為熱休克蛋白[Hsp] 90毒物)(例如，用於已具有曲妥珠單抗進程之乳癌)。在其他實施例中，癌症為肺癌，諸如小細胞肺癌，且第二藥劑為VEGF抑制劑，諸如貝伐單抗，或EGFR抑制劑，諸如埃羅替尼，或c-Kit抑制劑，諸如伊馬替尼。在其他實施例中，癌症為肝癌，諸如肝細胞癌瘤，且第二藥劑為EGFR抑制劑，諸如埃羅

替尼；化學治療劑，諸如阿黴素或伊立替康；紫杉烷，諸如太平洋紫杉醇；沙立度胺及/或干擾素。另外，用於癌症之前線療法之較佳化學治療劑為紫杉德(taxotere)，其單獨與其他第二藥劑組合。最佳地，若施以化學療法，則先給予化學療法，接著給予抗體。

該等第二藥劑可在投與抗體後48小時內投與，或在該藥劑後24小時內，或12小時內，或3-12小時內投與，或可經預選時期投與，該預選時期較佳為約1至2天。另外，該藥劑之劑量可為次治療性的。

KLβ拮抗劑可與第二藥劑同時、順序或交替投與或在對其他療法無反應性時投與。因此，第二藥劑之組合投藥包括使用獨立調配物或單一醫藥調配物共同投藥(同時投藥)，及以任何順序連續投藥，其中較佳存在一時期，此時兩種(或所有)藥劑同時發揮其生物活性。所有該等第二藥劑可彼此組合使用或其自身與第一藥劑使用，因此如本文中所使用之表達"第二藥劑"並不意謂其分別為除第一藥劑外之唯一藥劑。因此，第二藥劑無需為一種藥劑，但可構成或包含一種以上該藥物。

如本文中所述之該等第二藥劑可以與第一藥劑相同之劑量及投藥路線來使用，或以第一藥劑之劑量之約1至99%來使用。若完全使用該等第二藥劑，則較佳地，其以比若不存在第一藥劑小之量使用，尤其在超過第一藥劑之初始劑量之後續劑量中如此，以便消除或減小由此所引起之副作用。

本發明亦提供抑制或預防復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長之方法及組合物。復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長係用以描述一種病狀，其中正經歷或經一或多種當前可用療法(例如癌療法，諸如化學療法、放射療法、手術、激素療法及/或生物學療法/免疫療法、抗VEGF抗體療法，尤其為用於特定癌之標準治療方案)治療之患者，在臨床上不足以治療該等患者，或該等患者不再自該療法接受任何有

益效果，以致該等患者需要額外有效療法。如本文中所使用，詞語亦可係指"非反應性/難治性"患者之病狀，例如，其描述對療法反應但遭受副作用、發展抗性、不對療法反應、不對療法令人滿意地反應等等之患者。在各種實施例中，癌症為復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長，其中癌細胞之數量未顯著降低，或已增加，或腫瘤尺寸未顯著降低，或已增加，或未能達到癌細胞之尺寸或數量上之任何進一步降低。藉由此項技術中已知用於檢定治療對癌細胞之有效性之任何方法，在該情況下使用"復發性"或"難治性"或"非反應性"之此項技術公認的含義，可活體內或活體外測定癌細胞是否為復發性腫瘤生長還是復發性癌細胞生長。對抗VEGF治療有抗性之腫瘤為復發性腫瘤生長之實例。

本發明提供阻斷或降低個體中之復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長之方法，其係藉由投與一或多種KLβ拮抗劑(諸如抗KLβ抗體)來阻斷或降低個體中之復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長。在某些實施例中，KLβ拮抗劑可在癌症治療劑之後投與。在某些實施例中，KLβ拮抗劑與癌症療法同時投與。或者或另外，KLβ拮抗劑療法與另一癌症療法交替，其可以任何順序執行。本發明亦涵蓋投與一或多種抑制性抗體以防止經預診患有癌症之患者之癌症發作或復發的方法。通常，個體已經歷癌症療法或當前正經歷癌症療法。在一實施例中，癌症療法係用抗血管生成劑(例如VEGF拮抗劑)治療。抗血管生成劑包括此項技術中已知之彼等藥劑及見於本文中定義下之彼等藥劑。在一實施例中，抗血管生成劑為抗VEGF中和抗體或片段(例如，人類化A4.6.1、AVASTIN®(Genentech, South San Francisco, CA)、Y0317、M4、G6、B20、2C3等等)。參見(例如)，美國專利6,582,959、6,884,879、6,703,020；WO 98/45332；WO 96/30046；WO 94/10202；EP 0666868 B1；美國專利申請案20030206899、

20030190317、20030203409及20050112126；Popkov等人，*Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004)；及WO 2005012359。額外藥劑可與用於阻斷或降低復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長之VEGF拮抗劑及KL β 拮抗劑組合投與。

KL β 拮抗劑(及輔助治療劑)可藉由任何適合方式投與，包括非經腸、皮下、腹膜內、肺內及鼻內，且若需要用於局部治療，則病灶內投藥。非經腸輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投藥。另外，KL β 拮抗劑藉由脈衝輸液，尤其以降低劑量之抗體來適當投與。部分視投藥之短期或長期性而定，可藉由任何合適路線，例如藉由注射，諸如靜脈內或皮下注射來給藥。

KL β 拮抗劑組合物將以符合良好醫療實踐之方式調配、給藥及投與。在該情況下所考慮之因素包括欲治療之特定病症、欲治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床病狀、病症之原因、藥劑之傳遞位點、投藥方法、投藥時程及醫師所知之其他因素。KL β 拮抗劑無需但視需要可與一或多種當前用於預防或治療所討論病症之藥劑一起調配。該等其他藥劑之有效量視存在於該調配物中之KL β 拮抗劑量、病症或治療之類型及以上討論之其他因素而定。該等藥劑通常以上文所使用之相同劑量及投藥路線使用或以迄今所使用劑量之約1%至99%使用。

對預防或治療疾病而言，KL β 拮抗劑之適當劑量(當單獨使用或與其他藥劑組合使用時)將視欲治療之疾病類型、抗體類型、疾病之嚴重性及時程、出於預防目的還是治療目的來投與抗體、先前療法、患者之臨床病史及對抗體之反應以及主治醫師之判斷而定。抗體適於一次性或經一系列治療投與患者。視疾病類型及嚴重性而定，約1 μ g/kg至15 mg/kg(例如0.1 mg/kg-10 mg/kg)之抗KL β 抗體為(例如)藉由一或多次獨立投藥或藉由連續輸液投與患者之初始候選劑量。一典型日劑量可在約1 μ g/kg至100 mg/kg或100 mg/kg以上之範圍變化，其視

上文所提及之因素而定。對經若干天或更久之重複投藥而言，視病狀而定，持續治療直至出現疾病症狀之所需抑止。抗體之一示範性劑量將在約0.05 mg/kg至約10 mg/kg之範圍內。因此，可將約0.5 mg/kg、2.0 mg/kg、4.0 mg/kg或10 mg/kg(或其任何組合)之一或多種劑量投與患者。該等劑量可間歇投與，例如每週或每三週(例如，以便患者接受約2次劑量至約20次劑量，例如約6次劑量之抗體)。可投與初始較高負載劑量，接著可投與一或多次較低劑量。示範性給藥方案包含投與約4 mg/kg之初始負載劑量之抗體，接著投與約2 mg/kg之每週維持劑量之抗體。然而，其他給藥方案可為適用的。該治療之進程易於藉由習知技術及檢定來監測。

包含偵測KL β 之用途

在另一態樣中，本發明提供用於偵測KL β 之方法，該等方法包含偵測樣本中之KL β 。如本文中所使用之術語"偵測"包括在參考或不參考對照物之情況下之定性偵測及/或定量偵測(量測含量)。

在一態樣中，本發明提供用於偵測與KL β 表現及/或活性相關之病症之方法，該等方法包含偵測來自個體之生物樣本中之KL β 。在一些實施例中，KL β 表現為增加之表現或異常表現。在一些實施例中，病症為腫瘤、癌症及/或細胞增生性病症(諸如肝細胞癌及胰腺癌)、肝病(諸如肝硬化)或本文中所述之任何病症。在一些實施例中，生物樣本為血清或為腫瘤之生物樣本。

舉例而言，藉由自所要來源獲得樣本，將樣本與抗標靶抗原抗體混合以使抗體與混合物中存在之任何者形成抗體/標靶抗原複合物，且偵測存在於混合物中之任何抗體/標靶抗原複合物，可檢定樣本之標靶抗原(例如KL β 、FGF19及/或FGFR4)。可藉由此項技術中已知之適於特定樣本之方法製備生物樣本用於檢定。根據所用檢定類型選擇將樣本與抗體混合之方法及偵測抗體/標靶抗原複合物之方法。

該等檢定包括免疫組織化學、競爭及夾層檢定及空間抑制檢定。對於樣本製備而言，可使用來自哺乳動物(通常為人類患者)之組織或細胞樣本。樣本之實例包括但不限於：癌細胞，諸如結腸、乳房、前列腺、卵巢、肺、胃、胰腺、淋巴瘤及白血病患細胞。標靶抗原亦可在血清中量測。可藉由此項技術中已知之各種程序獲得樣本，該等程序包括(但不限於)手術切除、抽吸或活組織檢查。組織可為新鮮或冷凍的。在一實施例中，將樣本固定且嵌埋於石蠟或其類似物中。組織樣本可藉由習知方法固定(亦即保存)(參見(例如)，"Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology,"第3版(1960) Lee G. Luna, HT (ASCP)編者，The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, New York；The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel編者，Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.)。熟習此項技術者應瞭解，固定劑之選擇藉由欲經組織學染色或另外分析之樣本之目的確定。熟習此項技術者亦將瞭解，固定長度視組織樣本之尺寸及所使用之固定劑而定。舉例而言，中性緩衝福馬林(neutral buffered formalin)、Bouin氏或聚甲醛可用以固定樣本。通常，先將樣本固定且隨後經由遞升級數之醇脫水，浸潤且用石蠟或其他切片培養基嵌埋，以便可將組織樣本切片。或者，熟習此項技術者可將組織切片且固定所獲得之切片。舉例而言，組織樣本可藉由習知方法在石蠟中嵌埋及處理(參見(例如)"Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology"，同上)。可使用之石蠟之實例包括(但不限於)Paraplast、Broid及Tissuemay。一旦將組織樣本嵌埋，樣本就可藉由微切片機或其類似物來切片(參見(例如)"Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of

Pathology"，同上)。對該程序舉例而言，切片可在約3微米至約5微米厚之範圍變化。一旦經切片，切片就可藉由若干標準方法附著於載玻片。載玻片黏著劑之實例包括(但不限於)矽烷、明膠、聚-L-離胺酸及其類似物。舉例而言，經石蠟嵌埋之切片可附著於帶正電載玻片及/或經聚-L-離胺酸塗佈之載玻片。若石蠟已用作嵌埋材料，則通常將組織切片脫石蠟且與水再水合。組織切片可藉由若干習知標準方法來脫石蠟。舉例而言，可使用二甲苯及逐漸遞減級數之醇(參見(例如)"Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology"，同上)。或者，可使用市售脫石蠟非有機藥劑，諸如 Hemo-De7(CMS, Houston, Texas)。

抗KL β 抗體適用於偵測特定細胞或組織中之KL β 表現之檢定(諸如診斷性或預後檢定)，其中抗體如下文所述來標記及/或固定於不溶基質上。然而，應瞭解，任何合適抗KL β 抗體均可用於涉及偵測及診斷之實施例中。製造抗KL β 抗體之一些方法描述於本文中且製造抗KL β 抗體之方法在此項技術中熟知，例如，Ito等人，(2005) J Clin Invest 115(8): 2202-2208；R&D系統目錄號MAB3738及AF2619中所揭示之抗體。

用於標靶抗原之分析方法全部使用以下試劑之一或多者：經標記標靶抗原類似物、經固定標靶抗原類似物、經標記抗標靶抗原抗體、經固定抗標靶抗原抗體及空間結合物。經標記試劑亦稱為"示蹤劑"。

所用標記為任何可偵測官能度，其不干擾標靶抗原及抗標靶抗原抗體之結合。已知許多用於免疫檢定之標記，實例包括可直接偵測之部分，諸如螢光染料、化學發光劑及放射性標記；以及必須經反應或衍生來偵測之部分，諸如酶。

所用標記為任何可偵測官能度，其不干擾標靶抗原及抗標靶抗

原抗體之結合。已知許多用於免疫檢定之標記，實例包括可直接偵測之部分，諸如螢光染料、化學發光劑及放射性標記；以及必須經反應或衍生來偵測之部分，諸如酶。該等標記之實例包括放射性同位素³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H及¹³¹I；螢光團，諸如稀土螯合劑或螢光素及其衍生物；若丹明(rhodamine)及其衍生物；丹醯基；傘酮；螢光素酶，例如螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶(美國專利第4,737,456號)；蟲螢光素；2,3-二氫酞嗪二酮；辣根過氧化物酶(HRP)；鹼性磷酸酶；β-半乳糖苷酶；葡萄糖澱粉酶；溶菌酶；醣氧化酶，例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶；雜環氧化酶，諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶，其與使用過氧化氫氧化染料前驅物之酶(諸如HRP、乳過氧化物酶或微過氧化物酶)偶合；生物素/抗生物素蛋白；自旋標記；細菌噬菌體標記；穩定自由基及其類似物。

可使用習知方法使該等標記與蛋白質或多肽共價結合。舉例而言，可使用諸如二醛、碳化二亞胺、二馬來醯亞胺、雙醯亞胺酯、雙重氮化聯苯胺及其類似物之偶合劑將抗體用上述螢光、化學發光及酶標記來作標籤。參見(例如)，美國專利第3,940,475號(螢光測定法)及第3,645,090號(酶)；Hunter等人，*Nature*, **144**: 945 (1962)；David等人，*Biochemistry*, **13**: 1014-1021 (1974)；Pain等人，*J. Immunol. Methods*, **40**: 219-230 (1981)；及Nygren, J. *Histochem. and Cytochem.*, **30**: 407-412 (1982)。本文中之較佳標記為酶，諸如辣根過氧化物酶及鹼性磷酸酶。該標記(包括該等酶)與抗體之結合為熟習免疫檢定技術者之標準操作程序。參見(例如)，O'Sullivan等人，"Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay,"在*Methods in Enzymology*中，編者J.J. Langone及H. Van Vunakis，第73卷(*Academic Press, New York, New York, 1981*)，第147-166頁。

某些檢定方法中需要固定試劑。固定需要將抗標靶抗原抗體自在溶液中保持游離之任何標靶抗原分離。該操作習知地藉由以下方法完成：如藉由吸附於水不溶性基質或表面(Bennich等人之U.S. 3,720,760)，藉由共價偶合(例如使用戊二醛交聯)在檢定程序前使抗標靶抗原抗體或標靶抗原類似物不溶解，或(例如)藉由免疫沈澱在檢定程序之後使抗標靶抗原抗體或標靶抗原類似物不溶解。

可使用免疫組織化學及染色協定檢查樣本中蛋白質之表現。已展示，組織切片之免疫組織化學染色為評估或偵測樣本中蛋白質之存在之可靠方法。免疫組織化學("IHC")技術通常藉由產色或螢光方法利用抗體原位探查及觀測細胞抗原。對於樣本製備而言，可使用來自哺乳動物(通常為人類患者)之組織或細胞樣本。可藉由此項技術中已知之各種程序獲得樣本，該等程序包括(但不限於)手術切除、抽吸或活組織檢查。組織可為新鮮或冷凍的。在一實施例中，將樣本固定且嵌埋於石蠟或其類似物中。組織樣本可藉由習知方法固定(亦即保存)。熟習此項技術者應瞭解，固定劑之選擇藉由欲經組織學染色或另外分析之樣本之目的確定。熟習此項技術者亦將瞭解，固定長度視組織樣本之尺寸及所使用之固定劑而定。

IHC可與諸如形態染色及/或螢光原位雜交之額外技術組合執行。2種IHC通用方法為可用的；即直接檢定與間接檢定。根據第一檢定，直接測定抗體與標靶抗原(例如KL β)之結合。該直接檢定使用可在無需進一步抗體相互作用之情況下觀測之經標記試劑，諸如經螢光標籤或酶標記之一級抗體。在典型間接檢定中，未結合之一級抗體與抗原結合，且隨後經標記之二級抗體與一級抗體結合。在二級抗體與酶促標記結合之情況下，添加產色或螢光受質以便觀測抗原。因為若干二級抗體可與一級抗體上之不同抗原決定基反應，所以出現信號擴增。

用於免疫組織化學之一級及/或二級抗體通常經可偵測部分標記。可用許多標記，其通常可分組為以下類別：

除上述樣品製備程序之外，可需要在IHC之前、期間或之後進一步處理組織切片，例如，可進行抗原決定基回收方法，諸如在檸檬酸緩衝液中加熱組織樣本（參見（例如）Leong 等人，*Appl. Immunohistochem.* 4(3):201 (1996)）。

在任選阻斷步驟後，在合適條件下使組織切片暴露於一級抗體歷時一段足夠之時期，以便一級抗體與組織樣本中之抗原結合。用於達成其之適當條件可藉由常規實驗確定。藉由使用上文所討論之可偵測標記中之任何一者測定抗體與樣本之結合程度。較佳地，標記為催化產色受質（諸如3,3'-二胺基聯苯胺色原體）之化學改變之酶促標記（例如HPRO）。較佳地，使酶促標記與特異性結合於一級抗體之抗體結合（例如一級抗體為兔多株抗體且二級抗體為山羊抗兔抗體）。

可安裝由此製備之試樣且以蓋玻片覆蓋。隨後（例如）使用顯微鏡測定載玻片評估，且可使用此項技術常規使用之染色強度標準。

稱為競爭或夾層檢定之其他檢定方法已良好建立且廣泛用於商業診斷工業中。

競爭檢定依賴示蹤標靶抗原類似物與測試樣本標靶抗原競爭有限量之抗標靶抗原抗體抗原結合位點之能力。抗標靶抗原抗體通常在競爭前或後為不溶的且隨後將與抗標靶抗原抗體結合之示蹤標靶抗原自未結合之示蹤劑及標靶抗原分離。該分離可藉由傾析（在使結合搭配物預先不溶解之情況下）或藉由離心（在競爭反應後使結合搭配物沈澱之情況下）完成。如藉由標記物質之量所量測，測試樣本標靶抗原之量與所結合示蹤劑之量成反比。製作已知量之標靶抗原之劑量反應曲線，且將其與測試結果比較以定量確定測試樣本中存在之標靶抗原之量。當酶用作可偵測標記時，該等檢定稱為ELISA系統。

另一種競爭檢定，稱為"均質"檢定，不需要相分離。在此，製備酶與標靶抗原之結合物，且使用其以便當抗標靶抗原抗體結合於標靶抗原時，抗標靶抗原抗體之存在改進酶活性。在該狀況下，標靶抗原或其免疫活性片段以雙官能有機橋結合於諸如過氧化酶之酶。選擇結合物以供抗標靶抗原抗體使用，以便抗標靶抗原抗體之結合抑制或加強標記之酶活性。該方法本身已以EMIT之名稱廣泛實踐。

將空間結合物用於均質檢定之空間位阻方法中。該等結合物係藉由將低分子量半抗原共價連接於小標靶抗原片段而合成，以便半抗原之抗體大體上不能與抗標靶抗原抗體同時結合結合物。在該檢定程序下，存在於測試樣本中之標靶抗原將結合抗標靶抗原抗體，進而使抗半抗原結合結合物，引起結合物半抗原之特徵改變，例如當半抗原為螢光團時螢光性之改變。

夾層檢定尤其適用於測定標靶抗原或抗標靶抗原抗體。在連續夾層檢定中，使用固定抗標靶抗原抗體以吸附測試樣本標靶抗原，藉由洗滌移除測試樣本，將結合之標靶抗原用以吸附第二、經標記抗標靶抗原抗體且隨後將經結合物質自殘餘示蹤劑分離。經結合示蹤劑之量與測試樣本標靶抗原成正比。在"同時發生"之夾層檢定中，在添加經標記抗標靶抗原之前不分離測試樣本。使用抗標靶抗原單株抗體作為一抗體及多株抗標靶抗原抗體作為另一抗體之連續夾層檢定適用於測試樣本之標靶抗原。

上述僅僅為用於標靶抗原之示範性偵測檢定。現在或其後開發之使用抗標靶抗原抗體確定標靶抗原之其他方法包括於其範疇內，包括本文所述之生物檢定。

在一態樣中，本發明提供偵測(例如，存在與否或量)來自諸如人類個體之個體之生物樣本中的聚核苷酸(例如標靶聚核苷酸)之方法。可使用用於偵測聚核苷酸之各種方法且其包括(例如)RT-PCR、

taqman、擴增方法、聚核苷酸微陣列及其類似方法。

用於偵測聚核苷酸(諸如mRNA)之方法為熟知的且包括(例如)使用互補DNA探針之雜交檢定(諸如使用經標記標靶核酸探針之原位雜交)、北方墨點及相關技術，及各種核酸擴增檢定(諸如使用對標靶具有特異性之互補引子之RT-PCR，及其他擴增型偵測方法，諸如分支DNA、SPIA、Ribo-SPIA、SISBA、TMA及其類似方法)。

可方便地使用北方、點式墨點或PCR分析來檢定來自哺乳動物之生物樣本之(例如)標靶mRNA。舉例而言，諸如定量PCR檢定之RT-PCR檢定在此項技術中為熟知的。在一說明性實施例中，用於偵測生物樣本中之標靶mRNA之方法包含藉由使用至少一個引子之逆轉錄自樣本產生cDNA；使用標靶聚核苷酸作為正義及反義引子來擴增因此產生之cDNA，以擴增其中之標靶cDNA；及偵測所擴增標靶cDNA之存在與否。另外，該等方法可包括一或多個步驟，其允許熟習此項技術者測定生物樣本中之標靶mRNA之量(含量)(例如，藉由同時檢查諸如肌動蛋白家族成員之內務基因之比較對照mRNA序列的含量)。視需要，可測定所擴增標靶cDNA之序列。

探針及/或引子可經可偵測標記，諸如放射性同位素、螢光化合物、生物發光化合物、化學發光化合物、金屬螯合劑或酶來標記。該等探針及引子可用以偵測樣本中之標靶聚核苷酸之存在且作為偵測表現抗原之細胞之方式。如藉由熟習此項技術者所瞭解，許多不同引子及探針可經製備(例如，基於本文中提供之序列)且有效用以擴增、選殖及/或測定標靶mRNA之存在與否及/或量。

本發明之任選方法包括協定，其包含使用微陣列技術偵測組織或細胞樣本之聚核苷酸，諸如標靶聚核苷酸。舉例而言，使用核酸微陣列，將來自測試及對照組織樣本之測試及對照mRNA樣本逆轉錄且將其標記以產生cDNA探針。隨後，將探針與固定於固體支撐物上之

核酸陣列雜交。陣列經配置以便陣列之各成員之序列及位置為已知的。舉例而言，在某些疾病病況中具有表現潛力之基因的選擇群可排列於固體支撐物上。經標記探針與特定陣列成員之雜交指示，探針自其衍生之樣本表現彼基因。疾病組織之差異基因表現分析可提供有價值之資訊。微陣列技術利用核酸雜交技術及計算技術以評估單一實驗內之數千基因之mRNA表現概況。(關於陣列製造之討論，參見(例如)2001年10月11日公開之WO 01/75166；參見(例如)U.S. 5,700,637、美國專利 5,445,934 及美國專利 5,807,522，Lockart, *Nature Biotechnology*, 14:1675-1680 (1996)；Cheung, V.G. 等人，*Nature Genetics* 21(增刊):15-19 (1999))。DNA微陣列為含有直接合成於玻璃或其他受質上或點於玻璃或其他受質上之基因片段之微型陣列。數千基因通常以單一陣列來表示。典型微陣列實驗涉及以下步驟：1.由自樣本分離之RNA製備經螢光標記之標靶，2.將經標記標靶與微陣列雜交，3.洗滌、染色及掃描陣列，4.分析經掃描影像及5.產生基因表現概況。當前正使用2種主要類型之DNA微陣列：寡核苷酸(通常25聚體至70聚體)陣列及含有由cDNA製備之PCR產物之基因表現陣列。在形成陣列中，寡核苷酸可經預製造且點於表面或直接合成於表面上(原位)。

Affymetrix GeneChip®系統為市售微陣列系統，其包含藉由在玻璃表面上直接合成寡核苷酸來製造之陣列。探針/基因陣列：寡核苷酸(通常25聚體)藉由以半導體為主之光微影及固相化學合成技術之組合而直接合成於玻璃晶圓上。各陣列含有至多400,000種不同寡聚物且各寡聚以數百萬複本存在。因為寡核苷酸探針在陣列上之已知位置中合成，所以雜交模式及信號強度可藉由Affymetrix Microarray Suite軟體就基因同一性及相對表現量來解釋。各基因藉由一系列不同寡核苷酸探針表現於陣列上。各探針對由理想匹配寡核苷酸及錯配寡核苷

酸組成。理想匹配探針具有與特定基因精確互補之序列且因此量測基因表現。錯配探針因在中心鹼基位置處之單一鹼基取代而不同於理想匹配探針，其打亂標靶基因轉錄物之結合。其有助於測定貢獻於對理想匹配寡聚物所量測之信號之背景及非特異性雜交。Microarray Suite軟體將錯配探針之雜交強度自理想匹配探針之彼等強度減去，以確定各探針組之絕對強度值或特定強度值。基於來自GenBank及其他核苷酸庫之當前資訊選擇探針。據信序列識別基因之3'末端之獨特區域。GeneChip雜交烘箱("迴轉式烤肉器(rotisserie)"烘箱)用以一次性進行至多64個陣列之雜交。射流站執行探針陣列之洗滌及染色。其為完全自動的且含有4個模組，各模組持有一個探針陣列。各模組經由Microarray Suite軟體使用預程式化射流協定來獨立控制。掃描器為共焦雷射螢光掃描器，其量測藉由結合於探針陣列之經標記cRNA發射之螢光強度。具有Microarray Suite軟體之電腦工作站控制射流站及掃描器。Microarray Suite軟體可使用用於探針陣列之預程式化雜交、洗滌及染色協定來控制至多8個射流站。該軟體亦獲得雜交強度資料且使用適當算法將雜交強度資料轉化成各基因之存在/缺乏命令。最終，軟體藉由比較分析偵測實驗之間的基因表現改變且將其以.txt文檔格式輸出，其可供其他軟體程式使用以用於進一步資料分析。

在一些實施例中，偵測基因缺失、基因突變或基因擴增(例如KLβ及/或FGFR4及/或FGF19基因缺失、基因突變或基因擴增)。基因缺失、基因突變或擴增可藉由此項技術中已知之多種協定之任何一種協定來量測，例如藉由習知南方墨點、北方墨點以定量mRNA之轉錄(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980))，藉由點式墨點(DNA分析)或使用經適當標記之探針之原位雜交(例如FISH)細胞發生方法或使用經適當標記之探針之比較基因組雜交(CGH)來量測。另外，該等方法可用以偵測標靶基因缺失、配位體突變或基因擴增。

如本文中所使用，"偵測KLβ表現"涵蓋偵測KLβ基因缺失、基因突變或基因擴增。

另外，可檢查組織或細胞樣本中之標靶基因之甲基化狀態。基因5'調節區域中之CpG島之異常脫甲基化及/或過甲基化常常在不朽及轉形細胞中發生，且可造成各種基因之表現改變。檢查基因之甲基化狀態之各種檢定在此項技術中熟知。舉例而言，可在南方雜交方法中利用不能分裂含有甲基化CpG位點之序列之甲基化敏感性限制酶，以評估CpG島之甲基化狀態。另外，MSP(甲基化特異性PCR)可快速將存在於給定基因之CpG島中之所有CpG位點的甲基化狀態進行概括。該程序涉及藉由亞硫酸氫鈉進行之DNA之初始修飾(其將所有未甲基化之胞嘧啶轉化成尿嘧啶)，接著使用相對未甲基化DNA而言，對甲基化DNA具有特異性之引子擴增。涉及甲基化干擾之協定亦可見於(例如)Current Protocols In Molecular Biology，第12單元，Frederick M. Ausubel等人編，1995；De Marzo等人，Am. J. Pathol. 155(6): 1985-1992 (1999)；Brooks等人，Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 1998, 7:531-536；及Lethe等人，Int. J. Cancer 76(6): 903-908 (1998)中。如本文中所使用，"偵測KLβ表現"涵蓋偵測KLβ基因甲基化。

在一些實施例中，使用包括本文中所述之彼等方法之此項技術中已知的方法，可偵測一或多個標靶之聚核苷酸及/或多肽表現。舉例而言，上文所述之IHC技術可用以偵測樣本中之一或多種該等分子之存在。如本文中所使用，"聯合(in conjunction)"意欲涵蓋任何同時及/或順序偵測。因此，涵蓋，在不僅檢查生物樣本之第一標靶之存在，而且檢查第二標靶之存在之實施例中，可由相同組織或樣本製備獨立載玻片，且用分別與第一及/或第二標靶結合之試劑測試各載玻片。或者，可由組織或細胞樣本製備單一載玻片，且可將分別針對第一及第二標靶之抗體連同多種染色協定一起使用，以允許觀測及偵

測第一及第二標靶。

生物樣本描述於本文中，例如描述於生物樣本之定義中。在一些實施例中，生物樣本為血清或為腫瘤之生物樣本。

製品

在本發明之另一態樣中，提供一種含有適用於治療、預防及/或診斷上文所述病症之物質的製品。製品包含容器及容器上或與容器相關之標記或包裝插頁。合適容器包括(例如)瓶子、小瓶、注射器等等。容器可由諸如玻璃或塑膠之各種材料形成。容器容納單獨或與有效治療、預防及/或診斷病狀之另一組合物組合之組合物，且可具有無菌接取口(例如容器可為靜脈內溶液袋或具有可由皮下注射針刺穿之塞子的小瓶)。組合物中之至少一種活性劑為抗體。標籤或包裝插頁指示組合物用於治療諸如癌症之所選病狀。此外，製品可包含(a)第一容器，該第一容器中含有組合物，其中該組合物包含KL β 拮抗劑(諸如抗KL β 抗體)；及(b)第二容器，該第二容器中含有組合物。本發明之此實施例中之製品可另外包含包裝插頁，其指示第一抗體組合物與第二抗體組合物可用以治療特定病狀，例如癌症。或者或另外，製品可另外包含第二(或第三)容器，其包含醫藥學上可接受之緩衝液，諸如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液。就商業及使用者觀點而言，其可另外包括其他理想材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

以下為本發明之方法及組合物之實例。應瞭解，可基於上文所提供之基本描述實施各種其他實施例。

實例

以下材料及方法用於實例1-15中。

DNA構築體：

全長人類克羅梭BETA構築體：使用RNeasy套組(Quiagen)提取來自HepG2肝細胞癌細胞株之總RNA。藉由逆轉錄酶PCR(RT-PCR)，使用SuperScript III一步RT-PCR套組(Invitrogen)及以下引子來選殖人類克羅梭BETA(KL β)：

前向引子 5'-CGGGCGCTAGCATGAAGCCAGGCTGTGCGGCAGG-3' (SEQ ID NO: 3)

反向引子 5'-CAGTGGATCCTTACTTATCGTCGTCATCC TTGTAATCGCTAACAACCTCTTGCCTTTCTTTC-3' (SEQ ID NO: 4)

用NheI及BamHI消化所得KL β PCR產物且連接至pIRESpuro3(Clontech)中以獲得全長人類KL β c末端經flag作標籤之構築體(pCMVhKL β -Flag(SEQ ID NO: 49))。

全長人類FGFR4構築體：使用RNeasy套組(Quiagen)提取來自HepG2肝細胞癌細胞株之總RNA。藉由逆轉錄酶PCR(RT-PCR)，使用SuperScript III一步RT-PCR套組(Invitrogen)及以下引子來選殖人類FGFR4 cDNA：

前向引子 5'-CCGCCGGATATCATGCGGCTGCTGCTGG CCCTGTTGG-3' (SEQ ID NO: 5)

反向引子 5'-CCGCCGGAATTCTGTCTGCACCCCAGACC CGAAGGGG-3' (SEQ ID NO: 6)

用EcoRV及EcoRI消化所得FGFR4 PCR產物且連接至pIRESpuro3(Clontech)中以獲得全長人類FGFR4。

用C末端Flag標籤構築人類FGFR4：使用Stratagene XL QuickChange定點突變套組及以下引子將C末端flag標籤添加至人類pIRESpuro3FGFR4中：

前向引子：5'-GGT CTG GGG TGC AGA CAG GTA AGC CTA TCC CTA ACC CTC TCC TCG GTC TCG ATT CTA CGT AGG AAT

TCG GAT CCG CGG C-3' (SEQ ID NO: 7)

反向引子：5'-GCC GCG GAT CCG AAT TCC TAC GTA GAA

TCG AGA CCG AGG AGA GGG TTA GGG ATA GGC TTA CCT GTC

TGC ACC CCA GAC C-3' (SEQ ID NO: 8)

用 C 末端 His 標籤構築人類分泌 KL β ：藉由 PCR，使用 pCMVHuKL β -Flag 作為模板及以下引子獲得人類分泌 KL β 細胞外域：

前向引子：5'-GAA TTC CAC CAT GAA GCC AGG CTG TGC GGC AGG ATC TCC AG-3' (SEQ ID NO: 9)

反向引子：5'-GGC GCG CCG ACA AGG AAT AAG CAG ACA GTG CAC TCT G-3' (SEQ ID NO: 10)

用 EcoRI 及 AscI 消化所得分泌 PCR 產物，且連接至 pRK5_c-His(DNA540910)中以獲得 pRK5HuKL β Δ TM-His (SEQ ID NO: 50)。

構築人類 KL β E416A 及 E693A：使用 XL QuickChange 定點突變套組(Stratagene)及以下引子，藉由在 pCMVHuKL β _Flag 中使 E416 突變至 A416，獲得人類 KL β E416A c 末端 flag 構築體(pCMVhKL β _Flag E416A(SEQID NO: 51))：

前向引子：5'-CCC TCG AAT CTT GAT TGC TGC GAA TGG CTG GTT CAC AGA CAG-3' (SEQ ID NO: 11)

反向引子：5'-CTG TCT GTG AAC CAG CCA TTC GCA GCA ATC AAG ATT CGA GGG-3' (SEQ ID NO: 12)

使用 XL QuickChange 定點突變套組(Stratagene)及以下引子，藉由在 pCMVHuKL β _Flag 中使 E693 突變至 A693，獲得人類 KL β E693A c 末端 flag 構築體(pCMVhKL β -Flag E693A(SEQID NO:52))：

前向引子：5'-GCT CTG GAT CAC CAT CAA CGC GCC TAA CCG GCT AAG TGA C-3' (SEQ ID NO: 13)

反向引子：5'-GTC ACT TAG CCG GTT AGG CGC GTT GAT

GGT GAT CCA GAG C-3' (SEQ ID NO: 14)

hKLβΔTM改良性培養基

用空白或含有表現載體之C末端經his作標籤之人類克羅梭BETA細胞外域(hKLβΔTM)轉染HEK293細胞。轉染後，在不含血清之PS25培養基中維持細胞72-96小時。將所得培養基過濾，補充40 mM HEPES pH 7.2，濃縮4倍且藉由西方墨點，使用結合hKLβ之單株抗體(R&D Systems, 目錄號MAB3738)評估hKLβΔTM含量。

共沈澱

用Triton-X100 (Calbiochem)補充濃縮對照或hKLβΔTM改良性培養基達到0.5%之最終濃度，且在4°C下，在用或不用0.5 μg/ml FGFR-IgG(R&D Systems, 目錄號如下：FGFR1 α IIIb, 655-FR-050；FGFR1 α III, 658-FR-050；FGFR1 β IIIb, 765-FR-050；FGFR1 β IIIc, 661-FR-050；FGFR2 α III, 663-FR-050；FGFR2 α IIIc, 712-FR-050；FGFR2 β IIIb, 665-FR-050；FGFR2 β IIIc, 684-FR-050；FGFR3 IIIb, 1264-FR-050；FGFR3 IIIc, 766-FR-050；FGFR4, 685-FR-050)、0.5 μg/ml肝素(Sigma)、1 μg/ml FGF19(R&D Systems)、10 μl EZ視紅蛋白質A親和力凝膠(view Red Protein A affinity gel)(Sigma)之情況下培養18 h。將親和力基質離心且用PBS/0.5% Triton-X100洗滌3次且用PBS洗滌1次。用含有5% β-巯基乙醇之SDS-PAGE樣本緩衝液溶離小球，且藉由西方墨點，使用抗克羅梭β單株抗體(R&D Systems 目錄號MAB3738)、FGF19抗體(純系1A6；Genentech Inc.)、抗FGFR4抗體(純系8G11；Genentech Inc.)或HRP結合抗人類IgG抗體(Jackson Immunochemical)來分析。

細胞培養物及穩定細胞株

自美國典型微生物菌種保藏中心(American Type Culture Collection)獲得HEK 293細胞(ATCC寄存編號CRL-1573)、HepG2細胞

(ATCC寄存編號HB-8065)及Hep 3B細胞(ATCC寄存編號HB-8064)，且在用10%胎牛血清(FBS)及2 mM L-麩醯胺酸補充之F-12:DMEM混合物(50:50)中維持。產生穩定表現空白載體、人類纖維母細胞生長因子受體 4(hFGFR4)R388-V5、hFGFR4 G388-V5、人類克羅梭 b-FLAG(hKLβ-FLAG)、hFGFR4 R388-V5 及 hKLβ-FLAG 或 hFGFR4 R388-V5及hKLβ-FLAG之HEK 293細胞，且使其在含有500 μg/ml遺傳黴素(geneticin)及2.5 μg/ml嘌呤黴素(puromycin)之選擇性培養基中生長。

經FGF19處理之細胞中之基因表現時程

以 10^6 個細胞/孔將細胞塗於6孔培養板中，且使其在完全培養基中生長隔夜。用PBS將細胞洗滌2次，用不含血清之培養基洗滌1次，且在不含血清之培養基中維持隔夜。第二天，用20 ng/ml FGF19將細胞處理1、2、4、6或24小時，且在處理結束時，使用RNeasy套組(Qiagen)提取RNA。藉由Taqman測定c-fos、c-jun、junB及KLβ之相對表現量。

半定量RT-PCR

使用RNeasy套組(Qiagen)提取總RNA。使用特定引子及螢光(fluorogenic)探針擴增及定量基因表現。將基因特異性信號正規化成RPL19內務基因。將針對各條件之三組資料取平均值。所有TaqMan RT-PCR試劑均購自Applied Biosystems(Foster City, California)。資料呈現為平均值±SEM。Taqman引子及探針(報導染料為FAM且淬滅染料為TAMRA)。引子序列如下：

RPL19前向引子：AGC GGA TTC TCA TGG AAC A(SEQ ID NO: 15)

RPL19反向引子：CTG GTC AGC CAG GAG CTT(SEQ ID NO: 16)

RPL19探針：TCC ACA AGC TGA AGG CAG ACA AGG(SEQ ID NO: 17)

hKLβ前向引子：GCA GTC AGA CCC AAG AAA ATA CAG A(SEQ ID NO: 18)

hKLβ反向引子：CCC AGG AAT ATC AGT GGT TTC TTC(SEQ ID NO: 19)

hKLβ反向探針：TGC ACT GTC TGC TTA TTC CTT GT(SEQ ID NO: 20)

hc-fos前向引子：CGA GCC CTT TGA TGA CTT CCT(SEQ ID NO: 21)

hc-fos反向引子：GGA GCG GGC TGT CTC AGA(SEQ ID NO: 22)

hc-fos探針：CCC AGC ATC ATC CAG GCC CAG(SEQ ID NO: 23)

hjunb前向引子：AGT CCT TCC ACC TCG ACG TTT(SEQ ID NO: 24)

hjunb反向引子：AAT CGA GTC TGT TTC CAG CAG AA(SEQ ID NO: 25)

hjunb探針：AGC CCC CCC TTC CAC TTT TT(SEQ ID NO: 26)

hc-jun前向引子：CGT TAA CAG TGG GTG CCA ACT(SEQ ID NO: 27)

hc-jun反向引子：CCC GAC GGT CTC TCT TCA AA(SEQ ID NO: 28)

hc-jun探針：ATG CTA ACG CAG CAG TTG CAA ACA(SEQ ID NO: 29)

mKLβ前向：TGT GGT GAG CGA AGG ACT GA (SEQ ID NO:

30)

mKLβ反向：GGA GTG GGT TGG GTG GTA CA (SEQ ID NO:

31)

mKLβ探針：CTG GGC GTC TTC CCC ATG G (SEQ ID NO:32)

mc-fos前向：CCT GCC CCT TCT CAA CGA (SEQ ID NO: 33)

mc-fos反向：TCC ACG TTG CTG ATG CTC TT (SEQ ID NO: 34)

mc-fos探針：CCA AGC CAT CCT TGG AGC CAG T (SEQ ID

NO: 35)

mFGFR4前向：CGC CAG CCT GTC ACT ATA CAA A (SEQ ID

NO: 36)

mFGFR4反向：CCA GAG GAC CTC GAC TCC AA (SEQ ID NO:

37)

mFGFR4探針：CGT TTC CCT TTG GCC CGA CAG TTC T (SEQ

ID NO: 38)

HEPG2及HEP3B細胞中之siRNA轉染：

KLβ及GAPDH siRNA寡聚物自Dharmacon獲得。

KLβ siRNA：

雙鏈體1：正義：5'-GCACACUACUACAAACAGAUU-3' (SEQ ID NO: 39)

反義：5'-UCUGUUUGUAGUAGUGUGCUU-3' (SEQ ID NO: 40)

雙鏈體2：正義：5'-GCACGAAUGGUUCCAGUGAUU-3' (SEQ ID NO: 41)

反義：5'-UCACUGGAACCAUUCGUGCUU-3' (SEQ ID NO: 42)

雙鏈體3：正義：5'-CGAUGGAUAUAUUCAAAUGUU-3' (SEQ ID NO: 43)

反義：5'-CAUUUGAAUAUAUCCAUCGUU-3' (SEQ ID NO: 44)

雙鏈體4：正義：5'-UGAAUAACCACACGCUAUUU-3' (SEQ ID NO: 45)

反義：5'-AUAGCGUGUGGUUAUUUCAUU-3' (SEQ ID NO: 46)

GAPDH siRNA：正義：5'-UGGUUUACAUGUCCAAUA-3' (SEQ ID NO: 47)

反義：5'-UAUUGGAACAUGUAAACCA-3' (SEQ ID NO: 48)

使用DharmaFECT轉染套組(Dharmacon)且按照製造商之推薦協定轉染各種siRNA雙鏈體。轉染後24小時，用PBS將細胞洗滌2次且用不含血清之培養基洗滌1次，且在不含血清之培養基中維持隔夜。第二天，用20 ng/ml FGF19 (R&D Systems)將細胞處理2小時。用RNeasy套組(Qiagen)製備RNA樣本。藉由Taqman測定c-fos、RPL19及KLβ之相對表現量。

活體外KLβ抗體處理

以10⁶個細胞/孔將HEPG2細胞塗於6孔培養板中，且使其在完全培養基中生長隔夜。用含有0.1% BSA之不含血清培養基將細胞洗滌3次，且在相同培養基中維持隔夜。第二天，用10 μg/ml KLβ特異性多株抗體(R&D Systems；目錄號AF2619)或對照抗體將細胞處理4 h。隨後，用100 ng/ml FGF19將細胞處理2小時，且使用RNeasy套組(Qiagen)提取RNA。藉由Taqman測定c-fos之相對表現量。

共同免疫沈澱

用經完整不含EDTA之蛋白酶抑制劑混合物(Roche)補充之RIPA溶解緩衝液(含有1% Triton X-100及1% NP-40之PBS)溶解瞬間(24-48小時轉染)或穩定表現空白載體、hFGFR4 R388-V5、hKLβ-FLAG或hFGFR4 R388-V5及hKLβ-FLAG之HEK 293細胞。藉由BCA蛋白質檢定(Pierce)測定總蛋白濃度。在4°C下，用EZ視紅抗FLAG M2親和力凝膠(Sigma)或抗V5瓊脂糖親和力凝膠(Sigma)將相等量之各樣本溶胞

物之總蛋白免疫沈澱隔夜。用TBST將免疫沈澱蛋白質洗滌3次，且隨後在4℃下，於經0.5% FBS及0.5% Triton X-100補充之F-12:DMEM混合物(50:50)中在不用或用1 mg/ml FGF-19(R&D Systems)之情況下培養3小時。隨後，用含有1% Triton X-100之Krebs-Ringer-HEPES(KRH)緩衝液將珠粒洗滌1次，且用KRH緩衝液洗滌3次。藉由添加1X NuPAGE LDS樣本緩衝液(Invitrogen)且沸騰5分鐘來溶離免疫沈澱蛋白質。回收樣本緩衝液中之溶離蛋白質，且添加1X NuPAGE還原劑(Invitrogen)且隨後沸騰10分鐘。在4-12% NuPAGE Bis-Tris凝膠上使蛋白質樣本電泳，接著轉移至硝化纖維膜，且隨後經受使用抗hKLβ抗體(1 mg/ml，R&D Systems；目錄號MAB3738)、抗hFGFR4抗體(1 mg/ml，純系8G1，Genentech)或抗FGF-19抗體(1 mg/ml，純系1A6，Genentech)之免疫墨點分析。使用ECL Plus受質(GE Healthcare)偵測信號。

FGF路徑活化

用0、1、10或100 ng/ml之FGF-19(R&D Systems)、20 ng/ml之FGF-1(FGF酸性，R&D Systems)或20 ng/ml表皮生長因子(Roche)將瞬間(24小時轉染)或穩定表現空白載體、hFGFR4 R388-V5、hFGFR4 G388-V5、hKLβ-FLAG、hFGFR4 R388-V5及hKLβ-FLAG或hFGFR4 G388-V5及hKLβ-FLAG之HEK 293細胞處理10分鐘。用經完整不含EDTA之蛋白酶抑制劑混合物(Roche)及磷酸酶抑制劑混合物1及2(Sigma)補充之RIPA溶解緩衝液(Upstate)將細胞溶解。藉由BCA蛋白質檢定(Pierce)測定總蛋白濃度。對FRS2及ERK1/2磷酸化之分析而言，在10% NuPAGE Bis-Tris凝膠(Invitrogen)上將相等量之總蛋白電泳，接著轉移硝化纖維膜且隨後使用抗磷酸-FRS2抗體(1:1,000，Cell Signaling Technology)或抗ERK1/2抗體(1:1,000，Cell Signaling Technology)來免疫墨點分析。對總FRS2及ERK1/2之偵測而言，將膜

剝離且用抗FRS2抗體(1 mg/ml, Upstate Biotechnology)或抗ERK1/2抗體(1:1,000, Cell Signaling Technology)再探測。使用ECL Plus受質(GE Healthcare)偵測信號。

活體內實驗

所有動物協定均由機構動物照顧與使用小組(Institutional Animal Care and Use Committee)批准。自Charles River實驗室獲得5至6週大雌性FVB小鼠。提供小鼠標準食物且水任意採食直至處理前12小時，在該時間點移除食物。用媒劑(PBS)或1 mg/kg FGF19靜脈內注射小鼠。當指示時，在靜脈內FGF19接種之前3、9或24小時，用2.2 mg/kg KLβ抗體(R&D Systems; 目錄號AF2619)靜脈內注射小鼠。30 min後，處死來自所有群組之小鼠且收集組織樣本，在液氮中冷凍，且在-70°C下儲存。使用RNAeasy套組(Qiagen)製備來自冷凍組織樣本之總RNA。對各條件分析具有3-5隻動物之群組。資料呈現為平均值±SEM且藉由學生t-測試來分析。

電子表現分析(In silico expression analysis)

對KLβ及FGFR4表現分析而言，基於自BioExpress™資料庫(Gene Logic, Inc., Gaithersburg, MD, USA)提取之正規化基因表現資料繪製曲線圖。在此報導之KLβ表現相應於分別藉由在Affymetrix GeneChips上分析之人類組織中之探針號244276_at及204579_at給出的信號。粗體中心線指示中值；盒(白色，正常；灰色，腫瘤)表示第一與第三四分位數之間的四分位差。給定樣本之值之分布藉由虛線指示。已由BioExpress™資料庫之創始人描述人類樣本收集(Shen-Ong GL等人，*Cancer Res* 2003; 63: 3296-301)。在Affymetrix HG-U133P寡核苷酸晶片(Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA)上執行各別雜交：簡言之，該等晶片以25聚體寡核苷酸為主且允許偵測超過33,000個孔具體化人類基因，每種轉錄物使用具有11種寡核苷酸之探針組。

實例1：KLβ細胞外域及FGF19結合特異性限於FGFR4

將FGF19、肝素及FGFR-Fc融合蛋白質在含有KLβΔTM之改良性培養基中培養。隨後藉由共同沈澱分析蛋白質相互作用。KLβ及FGF19僅與FGFR4共同締合且僅由FGFR4-Fc拉開(pull down)(圖1A)。該等資料指示，KLβ細胞外域及FGF19之結合特異性限於FGFR4，且KLβ細胞外域、FGF19及FGFR4可能形成三連複合物(tripartite complex)。

實例2：KLβ與FGFR4結合藉由FGF19及肝素促進

為評估各組分對複合物形成之貢獻，使用共同沈澱檢定。在存在或不存在FGFR4-Fc、FGF19及肝素之情況下，培養含對照或KLβΔTM之改良性培養基。在不存在肝素及FGF19之情況下，未偵測到KLβ與FGFR4-Fc之間之相互作用(圖1B)。肝素為弱促進劑，而FGF19為KLβ-FGFR4相互作用之強促進劑。在肝素與FGF19存在下，發生最大量之KLβ-FGFR4-Fc相互作用穩定化。相反地，FGF19與FGFR4-Fc結合需要肝素或KLβ之存在。當肝素及KLβ均包括於反應中時，發生最大量之FGF19與FGFR4結合。該等資料證明，KLβ足以支持FGF19與FGFR4結合。亦展示，KLβ促進先前所證明之FGF19與FGFR4之肝素依賴性相互作用(Xie等人(1999) Cytokine 11:729-35)。因此，各個別組分有助於FGF19-FGFR4-KLβ-肝素複合物之穩定性。

與旁泌性FGF家族成員比較，FGF19具有低肝素結合親和力，使其以內分泌方式起作用而不拴系於分泌細胞之細胞周蛋白聚糖(Choi, M等人(2006) Nat Med 12: 1253-5；Harmer, NJ等人(2004) Biochem 43:629-40；Inagaki, Y等人(2005) Cell Metab 2:217-25；Lundasen, T等人(2006) J Intern Med 260:530-6)。當FGF19結合於其受體時，FGF19肝素結合位點之拓撲學防止FGF19與肝素形成氫鍵(Goetz, R等人，(2007) Mol Cell Biol. 27:3417-28)。因此，KLβ可擔當穩定弱FGF19-

FGFR4-肝素相互作用之FGFR4共同受體。

實例3：經轉染FGFR4及KLβ在細胞表面處之相互作用

為測試KLβ及FGFR4是否亦與FGF19及肝素一起參與在細胞表面處之複合物形成，吾人評估FGFR4及KLβ在存在或不存在肝素之情況下將FGF19自瞬間或穩定轉染細胞之溶胞物免疫沈澱之能力。無可偵測FGF19自僅經對照或FGFR4-表現載體轉染之細胞之溶胞物共同沈澱出(圖1C及圖1D)。FGFR4及KLβ僅在肝素存在下將FGF19自KLβ轉染細胞溶胞物拉開，其指示KLβ轉染促進肝素依賴性FGF19與內源HEK293 FGFR4結合。

該等發現暗示，FGFR4及KLβ作為預形成複合物存在且其相互作用並不由FGF19增強。

實例4：內源FGFR4及KLβ在細胞表面處之相互作用

KLβ及FGFR4跨膜域可直接彼此相互作用或藉由將其拴系於細胞表面而促進蛋白質之相互作用。為測試KLβ及FGFR4在細胞表面處形成構成性複合物之假設，吾人評估在不存在FGF或肝素之情況下，KLβ是否與FGFR4一起自HEPG2細胞溶胞物共同免疫沈澱。用抵抗FGFR4之抗體培養HEPG2細胞溶胞物免疫沈澱FGFR4及KLB，而用對照抗體，則無蛋白質免疫沈澱(圖1E)，展示內源跨膜KLβ及FGFR4形成構成性肝素及配位體獨立性複合物。KLβ-FGFR4細胞表面複合物可改變先前對旁泌性FGF所述之肝素及配位體誘導受體二聚(Plonikov, A (1999) Cell 98:641-50; Schlessinger, J等人, (2000) Mol Cell 6:743-50)。該等資料指示，內源KLβ及FGFR4在細胞表面處互相作用。申請人注意到，申請人之先前申請案，即2007年4月2日申請之US第60/909,699號之圖4，(相應於本申請案之圖1E)展示處於150 kDa之分子量標記，而圖1E展示130 kDa分子量標記。'699申請案之圖4之誤標明顯為無意誤差，因為已知KLβ為130-kDa蛋白質(參見(例如)Ito等

人，Mech. Dev. 98 (2000) 115-119)。

實例5：*FGF19*在細胞表面與*FGFR4*及*KLβ*結合

為測試*KLβ*及*FGFR4*是否亦與*FGF19*及肝素一起在細胞表面處參與複合物形成，吾人評估在存在或不存在肝素之情況下，*FGFR4*及*KLβ*自瞬間或穩定轉染細胞之溶胞物免疫沈澱*FGF19*之能力。無可偵測*FGF19*自僅經對照或*FGFR4*-表現載體轉染之細胞之溶胞物共同沈澱出(圖1C及圖1D)。*FGFR4*及*KLB*僅在肝素存在下將*FGF19*自*KLβ*轉染細胞溶胞物拉開，其指示*KLβ*轉染促進肝素依賴性*FGF19*與內源HEK293 *FGFR4*結合。

在來自*KLβ*及*FGFR4*共同轉染細胞之溶胞物中，*KLβ*及*FGFR4*易於拉開*FGF19*。在肝素存在下該相互作用進一步穩定化(圖1C及圖1D)。該等資料展示，*KLβ*為*FGF19*與細胞表面*FGFR4*結合所需，且肝素促進該相互作用。另外，*FGFR4*及*KLβ*易於在共同轉染細胞中以肝素及配位體獨立性方式互相作用。該結果與用分泌嵌合*FGFR4*及*KLβ*蛋白質所觀察到之肝素及配位體依賴性複合物形成形成對比。該差異指示，*KLβ*及*FGFR4*跨膜域在複合物形成中之作用。

該等發現暗示，*FGF19*在細胞表面處與*KLβ*及*FGFR4*結合且肝素增強該相互作用。

實例6：*FGF19*抑制克羅梭*BETA*表現

在各種細胞株中評估*FGF19*對*KLβ*表現之效應。吾人在肝細胞株(HepG2及Hep3B)中偵測到高*KLβ*表現，但在腎細胞株(HEK293)或結腸細胞株(SW620及Colo205；圖3A)中僅偵測到痕量。暴露於*FGF19*後，HepG2及Hep3B中之*KLβ*表現逐漸受抑制，6小時後達到未經暴露細胞之50-60%量，且在該量下保持至少24小時。暴露於*FGF19*不影響其他細胞株中之*KLβ*表現量。藉由*FGF19*抑制*KLβ*表現可為肝細胞中之調節負反饋機制。

實例7：FGF19為基因表現之FGF19下游調節所需

因為生理性及病理性刺激之多血症在多種細胞類型中誘導Fos及Jun家族之基因，所以吾人測試FGF19在各種細胞株中是否調節c-Fos、JunB及c-Jun表現(Ashida, R等人，(2005) *Inflammapharmacology* 13: 113-25；Hess, J等人，(2004) *Biochemistry* 43:629-40；Shaulian, E等人，(2002) *Nat Cell Biol* 4:E131-6)。FGF19在表現KL β 之細胞(HepG2及HEP3B；圖3B-D)中上調c-Fos及JunB表現以及c-Jun表現達到更小程度。誘導c-Fos、JunB及c-Jun表現在暴露於FGF19之30分鐘內發生，且在大多數狀況下，6小時後表現返回基本量。JunB表現在HEP3B細胞中保持升高至少24小時(圖3C)。

該等資料指示，FGF19僅在表現KL β 之細胞中誘導c-Fos、Junb及c-Jun表現。

實例8：KL β 敲除(knock-down)抑制FGF19依賴性c-fos誘導

為測試KL β 在HEP3B及HEPG2細胞中是否促進FGF19信號傳輸及c-Fos誘導，吾人使用特定siRNA抑制KL β 表現。KL β siRNA轉染在HEP3B(圖3G及圖3E)及HEPG2細胞(圖5A)中顯著降低KL β mRNA及蛋白質表現。4種不同KL β siRNA之個別轉染顯著衰減FGF19介導之FRS2及ERK1/2磷酸化(圖3F、圖5B)。另外，與對照細胞比較，用KL β siRNA轉染之HEP3B細胞之轉染抑制FGF19介導之c-Fos誘導62%-80%(圖3G)。同樣地，與對照細胞比較，用KL β siRNA之HEPG2細胞之轉染降低FGF19依賴性FRS2及ERK1/2磷酸化以及c-Fos誘導之程度(圖5C)。該等結果指示，KL β 表現為FGF19依賴性路徑活化及c-Fos誘導所需。該等結果指示，KL β 表現為FGF19依賴性c-Fos誘導所需。

為進一步評估KL β 參與FGF19介導之c-Fos誘導，吾人用空白表現載體、KL β 表現載體、FGFR4表現載體或KL β 表現載體及FGFR4表現載體之組合轉染HEK293細胞且使細胞暴露於FGF19。僅經KL β 與

FGFR4表現載體轉染之細胞回應FGF19而誘導c-Fos(圖3H)。該等資料指示，KLβ為FGF19路徑活化及基因調節之調變所需。

實例9：用抗KLβ抗體之處理抑制FGF19依賴性c-Fos誘導

為進一步評估KLβ對FGF19依賴性c-Fos誘導之貢獻，在細胞經FGF19處理之前，用抗KLβ抗體(針對小鼠KLβ而產生，但可與人類KLβ交叉反應)或對照抗體處理HEPG2細胞。抗KLβ抗體處理降低FGF19依賴性c-Fos誘導80%，而對照抗體不展示任何顯著效應(圖6)。

該等結果證明，用特異性抗體靶向KLβ抑制FGF19活性。

實例10：KLβ為FGF19信號傳輸所需

為測試KLβ是否有助於FGF19信號傳輸路徑之活化，吾人評估在KLβ及/或FGFR4轉染HEK 293細胞以及對照中，FGF19對FGFR受質2(FRS2)及細胞外信號調節激酶-1及-2(ERK1/2)磷酸化之效應。在經空白表現載體轉染之細胞中FGF19不促進FRS2或ERK1/2磷酸化(圖2)。經KLβ或FGFR4轉染之HEK 293細胞僅展示ERK1/2磷酸化之弱、劑量依賴性增加，但在暴露於FGF19後，無可偵測FRS2磷酸化。FGFR4與KLβ之共同轉染促進HEK 293細胞中之FGF19信號傳輸，指示FRS2及ERK1/2磷酸化之穩固、劑量依賴性增加。該效應之一種可能解釋為，FGF19及FGFR4之局部、高濃度允許在缺少KLβ之情況下有弱信號傳輸。然而，因為FGF19具有內分泌功能且其平均循環濃度為 193 ± 36 pg/mL(49-590 pg/mL之範圍)，故其為不可能的(Lundasen, T等人，(J Intern Med 260:530-6)。因此，FGF19信號傳輸之KLβ之穩固誘導可能在FGF19之生理濃度下發生。

實例11：KLβ活性位點突變抑制FGF19路徑活化

KLβ對FGF19刺激活性之需求藉由在經野生型(wt)KLβ或KLβ突變體轉染之HEK 293細胞中偵測下游信號傳輸(亦即磷酸-FRS2及磷酸-ERK1/2)來評估。Wt KLβ轉染之細胞在用100 ng/ml FGF19處理後，展

示可偵測磷酸-FRS2及磷酸-ERK1/2(圖7)。當用相同FGF19劑量處理時，KL β E416A突變體(在推定活性位點之一中含有麩胺酸酯至丙胺酸突變；關於該殘基之描述，參見Ito等人，(2000) Mech. Dev. 98 (1-2):115-119)不展示FRS2或ERK1/2之可偵測磷酸化。因此，在KL β 之E416推定活性位點中之突變消除FGFR4下游信號傳輸，暗示KL β 酶促活性為FGFR4信號傳輸所需。

經KL β E693A突變體(在推定活性位點之一中含有麩胺酸酯至丙胺酸突變；關於該殘基之描述，參見Ito等人，同上)轉染之細胞之FGF19處理展示磷酸-FRS2或磷酸-ERK1/2對表現wt KL β 之經FGF19處理細胞之相似磷酸化程度(圖7)。因此，KL β 之E693推定活性位點中之突變不影響KL β 活性。因此，僅KL β 之E416推定活性位點為FRS2及ERK1/2磷酸化之FGF19依賴性刺激所需。偵測KL β 蛋白質表現以證明經表現wt或突變KL β 之載體轉染之細胞表現相等量之蛋白質。

該等發現確證，經由FGFR4之FGF19信號傳輸因KL β 之存在而增強，且進一步暗示，KL β 酶促活性為FGFR4信號傳輸所需。

實例12：小鼠組織中KL β 表現之活體內分布

為測試FGF19僅對表現FGFR4與KL β 之組織起作用之假設，吾人先使用半定量RT-PCR調查各種小鼠器官中之KL β 及FGFR4分布。相對mRNA含量表示與腦(經調查具有最低表現之器官)比較之相對倍數表現。KL β 主要在肝中表現(圖4C)。較低KL β 表現量亦見於脂肪及結腸中。所測試之額外器官展示KL β 之邊緣表現量。FGFR4在肝、肺、腎上腺、腎及結腸中高度表現(圖4D)。在腸、卵巢、肌肉及胰腺中亦觀察到較低FGFR4量表現。小鼠組織中之總KL β 及FGFR4分布與人類組織之彼分布相似。然而，與人類組織中所發現者相反，在小鼠胰腺中不能偵測到一致KL β 或FGFR4表現。另外，在小鼠結腸中偵測到低KL β 表現量，而在相應人類組織中未發現表現。該等差異可歸因於物

種及/或菌株特異性組織分布。該等資料指示，肝為KLβ及FGFR4高度共同表現之唯一小鼠器官。

實例13：FGF19對小鼠肝起特異性作用

為測定FGF19特異性位點作用，吾人比較在經FGF19注射之小鼠之器官中的c-Fos表現量與經PBS(對照)注射之小鼠之彼等表現量。吾人選擇監測對FGF19之c-Fos反應，因為c-Fos表現為廣布的且其誘導對FGF19刺激敏感。與經PBS注射之小鼠之肝比較，c-Fos表現在經FGF19注射之小鼠之肝中高1300倍(圖4E)。FGF19依賴性c-Fos誘導在所有其他所測試器官中低至少150倍。FGF19在肝中之活性藉由CYP7A1表現之98%抑制而確認(圖4F)。該等資料證明，FGF19在肝中起特異性作用，肝為表現高含量之KLβ與FGFR4之唯一小鼠器官。

總之，實例12及13中所示之資料證明，FGF19需要KLβ以便與FGFR4結合，細胞內信號傳輸及下游基因調節。最重要地，對KLβ之需求限制FGF19對表現FGFR4與KLβ之組織之內分泌活性。FGF19之肝特異性活性藉由該分子機制支持。該等資料證明，肝為小鼠中FGF19之作用之主要位點。

實例14：用抗KLβ抗體之活體內處理抑制小鼠肝中之FGF19依賴性c-Fos誘導

為評估活體內對FGF19活性之KLβ需求，在經KLβ抗體處理不同時間長度之小鼠之肝中測定FGF19依賴性c-Fos誘導。在FGF19注射之前3、9或24小時，用2.5 mg/kg之KLβ抗體處理小鼠，分別降低肝特異性FGF19介導之c-Fos誘導58%、68%及91%(圖8)。

該等資料指示，KLβ為活體內經由FGFR4之FGF19信號傳輸所需。另外，資料進一步證明，KLβ特異性抗體可用以活體內抑制FGF19活性。

實例15：在正常及癌症組織中分析KLβ及FGFR4表現

藉由分析BioExpress資料庫(Gene Logic, Inc., Gaithersburg, MD, USA), 在各種人類組織中評估KL β 及FGFR4表現。以信號強度之遞減次序, KL β 在脂肪、肝、胰腺及乳房組織中表現(圖4A)。以信號強度之遞減次序, FGFR4在肝、肺、膽囊、小腸、胰腺、結腸、淋巴、卵巢及乳房組織中表現(圖4B)。該等資料展示, KL β 表現僅限於幾個組織, 而FGFR4表現更廣泛分布。僅在肝及胰腺中觀察到KL β 及FGFR4之高共同表現量。因為KL β 及FGFR4之表現為FGF19活性所需, 所以該發現暗示, 肝及胰腺為KL β 及FGFR4在其中具有活性之主要器官。KL β 及FGFR4之邊緣表現量亦在乳房組織中觀察到。KL β 在脂肪組織中高度表現, 但FGFR4之缺少排除FGF19在該組織中之功能。可能的為, KL β 以不同於脂肪組織中之FGFR結合特異性促進其他內分泌FGF家族成員之活性。注意, FGF21藉由內分泌機制, 藉由對脂肪組織特異性作用來調節葡萄糖吸收(Kharitonov, A等人, (2005) J Clin Invest 115:1627-35)。由於其低肝素結合親和力, FGF21可能需要KL β 以經由FGFR1及FGFR2來信號傳輸(Goetz, R等人, (2007) Mol Cell Biol 27:3417-28; Kharitonov, 同上)。

亦在各種癌症組織中評估KL β 表現及FGFR4。與有關正常組織比較, KL β 表現在其他癌症組織中通常得以降低(圖9)。以信號強度之遞減次序, FGFR4在以下癌症組織中表現: 肝、結腸、胃、食道、腎、睪丸、小腸、胰腺、卵巢及乳房(圖10)。該等資料展示, FGFR4表現廣泛分布且其正常表現在癌症中得以改變。

實例16：討論

在該研究中, 吾人已提供以下證據, FGF19需要KLB以便與FGFR4結合、細胞內信號傳輸及下游基因調節。然而, 該需求之原因仍不明確。與旁泌性FGF家族成員比較, FGF19具有低肝素結合親和力, 使其以內分泌方式起作用而不拴系於分泌細胞之細胞周蛋白聚糖

(3、6、8、15)。當FGF19結合於其受體時(5)，FGF19肝素結合位點之拓撲學防止FGF19與肝素形成氫鍵。因此，KLβ可擔當穩定FGF19-FGFR4-肝素弱相互作用之FGFR4共同受體。

另外，吾人已展示，FGFR4及KLβ易於在細胞表面處以肝素及配位體獨立性方式互相作用。該結果與用分泌嵌合FGFR4及KLβ蛋白質所觀察到之肝素及配位體依賴性複合物形成形成對比。該差異可指示，KLβ及FGFR4跨膜域在複合物形成中之作用。KLβ及FGFR4跨膜域可直接彼此相互作用或藉由將其拴系於細胞表面而促進蛋白質之相互作用。KLβ-FGFR4細胞表面複合物可改變先前對旁泌性FGF所述之肝素及配位體誘導之受體二聚(18、20)。

吾人在脂肪組織發現KLβ之高度表現。然而，FGFR4表現之缺少排除該組織中之FGF19活性。因此，可能的為，KLβ以不同於脂肪組織中之FGFR結合特異性促進其他內分泌FGF家族成員之活性。注意，近期已展示KLβ為FGF21脂肪特異活性所需(17)。由於其低肝素結合親和力，FGF21可需要KLβ以經由FGFR1及FGFR2來信號傳輸(6、12)。

總之，該等資料證明，FGF19需要KLβ以便與FGFR4結合、細胞內信號傳輸及下游基因調節。最重要地，對KLβ之需求限制FGF19對表現FGFR4與KLβ之組織之內分泌活性。FGF19之肝特異性活性藉由該分子機制支持。

部分參考文獻清單

1. Ashida, R.等人，2005. Inflammopharmacology 13:113-25。
2. Chiang, J. Y. 2004. J Hepatol 40:539-51。
3. Choi, M., A.等人，2006. Nat Med 12:1253-5。
4. Fu, L.等人，2004. Endocrinology 145:2594-603。
5. Goetz, R., A.等人，2007. Mol Cell Biol 27:3417-28。

6. Harmer, N. J.等人，2004. *Biochemistry* 43:629-40。
7. Hess, J., P. Angel及M. Schorpp-Kistner. 2004. *J Cell Sci* 117:5965-73。
8. Inagaki, T., M.等人，2005. *Cell Metab* 2:217-25。
9. Ito, S., T.等人，2005. *J Clin Invest* 115:2202-8。
10. Ito, S.等人，2000. *Mech Dev* 98:115-9。
11. Jelinek, D. F.等人，1990. *J Biol Chem* 265:8190-7。
12. Kharitononkov, A.等人，2005. *J Clin Invest* 115:1627-35。
13. Kurosu, H.等人，2006. *J Biol Chem* 281:6120-3。
14. Li, Y. C.等人，1990. *J Biol Chem* 265:12012-9。
15. Lundasen, T.等人，2006. *J Intern Med* 260:530-6。
16. Nicholes, K.等人，2002. *Am J Pathol* 160:2295-307。
17. Ogawa, Y.等人，(2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 7432-7437。
18. Plotnikov, A. N.等人，1999. *Cell* 98:641-50。
19. Russell, D. W. 2003. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 72:137-74。
20. Schlessinger, J.等人，2000. *Mol Cell* 6:743-50。
21. Shaulian, E.及M. Karin. 2002. *Nat Cell Biol* 4:E131-6。
22. Tomlinson, E.等人，2002. *Endocrinology* 143:1741-7。
23. Trauner, M.及J. L. Boyer. 2004. *Curr Opin Gastroenterol* 20:220-30。
24. Urakawa, I.等人，2006. *Nature* 444:770-4。
25. Winer, J.等人，1999. *Anal Biochem* 270:41-9。
26. Xie, M. H.等人，1999. *Cytokine* 11:729-35。

儘管上述發明已出於理解明確性之目的而經由說明及實例相當詳細地描述，但是該等描述及實例不應解釋為限制本發明之範疇。

序 列 表

<110> 美商建南德克公司

<120> 克羅梭(KLOTHO)BETA

<130> P2477R1

<140> 097111903

<141> 2008-04-01

<150> 60/909,699 ; 60/916,187

<151> 2007-04-02 ; 2007-05-04

<160> 58

<210> 1

<211> 3132

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

```

atgaagccag gctgtgcggc aggatctcca gggaatgaat ggattttctt 50
cagcactgat gaaataacca cacgctatag gaatacaatg tccaacgggg 100
gattgcaaag atctgtcatc ctgtcagcac ttattctgct acgagctgtt 150
actggattct ctggagatgg aagagctata tggctctaaa atcctaattt 200
tactccggta aatgaaagtc agctgtttct ctatgacact ttccctaaaa 250
actttttctg ggggtattggg actggagcat tgcaagtga agggagtgg 300
aagaaggatg gaaaaggacc ttctatatgg gatcatttca tccacacaca 350
ccttaaaaat gtcagcagca cgaatggttc cagtacagc tatatttttc 400
tggaanaaga cttatcagcc ctggatttta taggagtttc tttttatcaa 450
ttttcaattt cctggccaag gcttttcccc gatggaatag taacagtgtc 500
caacgcaaaa ggtctgcagt actacagtac tcttctggac gctctagtgc 550
ttagaaacat tgaacctata gttactttat accactggga ttgcctttg 600
gcactacaag aaaaatatgg ggggtggaaa aatgatacca taatagatat 650
cttcaatgac tatgccacat actgtttcca gatgtttggg gaccgtgtca 700
aatattggat tacaattcac aacctatc tagtggcttg gcatgggtat 750
gggacaggta tgcatgcccc tggagagaag ggaaatttag cagctgtcta 800
cactgtggga cacaacttga tcaaggctca ctcgaaagt tggcataact 850
acaacacaca tttccgcca catcagaagg gttggttata gatcacgttg 900
ggatctcatt ggatcgagcc aaaccggtcg gaaaacacga tggatatatt 950
caaatgtcaa caatccatgg tttctgtgct tggatggtt gccaaccta 1000
tccatgggga tggcgactat ccagagggga tgagaagaa gttgttctcc 1050
gttctacca ttttctctga agcagagaag catgagatga gaggcacagc 1100
tgatttttt gccttttctt ttggaccaa caacttcaag cccctaaaca 1150
ccatggctaa aatgggacaa aatgtttcac ttaatttaag agaagcgtg 1200
aactggatta aactggaata caacaacct cgaatcttga ttgtcgcgaa 1250
tggtcgttcc acagacagtc gtgtgaaaac agaagacacc acggccatct 1300

```

acatgatgaa gaatttcttc agccagggtgc ttcaagcaat aaggtagat 1350
 gaaatacgag tggttggtta tactgcctgg tctctcctgg atggctttga 1400
 atggcaggat gcttacacca tccgccgagg attattttat gtggatttta 1450
 acagtaaaca gaaagagcgg aaacctaaagt cttcagcaca ctactacaaa 1500
 cagatcatac gagaaaatgg tttttcttta aaagagtcca cgccagatgt 1550
 gcagggccag tttccctgtg acttctcctg ggggtgcact gaatctgttc 1600
 ttaagcccg gtcgttggtc tcgtccccc agttcagcga tctctatctg 1650
 tacgtgtgga acgccactgg caacagactg ttgcaccgag tggaaggggt 1700
 gaggtgaaa acacgaccgg ctcaatgcac agattttgta aacatcaaaa 1750
 aacaacttga gatgttgga agaataaag tcacccacta ccggtttgct 1800
 ctggattggg cctcggtcct tcccactggc aaactgtccg cggtgaaccg 1850
 acaggccctg aggtactaca ggtgcgtggt cagtggggg ctgaagcttg 1900
 gcatctccgc gatggtcacc ctgtattatc cgaccacgc ccacctaggc 1950
 ctccccgagc ctctgttgca tgccgacggg tggctgaacc catcgacggc 2000
 cgaggccttc caggcctacg ctgggctgtg cttccaggag ctgggggacc 2050
 tggatgaagc ctggatcacc atcaacgcgc ctaaccggct aagtgcacac 2100
 tacaaccgct ctggcaacga cacctacggg gcggcgacac acctgctggt 2150
 ggcccacgcc ctggcctggc gcctctacga ccggcagttc aggccctcac 2200
 agcgcggggc cgtgtcgtg tcgctgcacg cggactgggc ggaacccgcc 2250
 aaccctatg ctgactcgca ctggaggggc gccgagcgtc tctgcagtt 2300
 cgagatgcc tggttcgcc agccgctctt caagaccggg gactaccccg 2350
 cggccatgag ggaatacatt gcctccaagc accgacgggg gctttccagc 2400
 tcggccctgc cgcgcctcac cgaggccgaa aggaggctgc tcaagggcac 2450
 ggtcgacttc tgcgcgtca accacttcac cactaggttc gtgatgcacg 2500
 agcagctggc cggcagccgc tacgactcgg acagggacat ccagtttctg 2550
 caggacatca cccgcctgag ctccccacg cgcttggtg tgattccctg 2600
 ggggggtgcg aagctgctgc ggtgggtccg gaggaactac ggcgacatgg 2650
 acatttacat caccgccagt ggcatcgacg accaggctct ggaggatgac 2700
 cggtccgga agtactacct aggggaagta cttcaggagg tgctgaaagc 2750
 atacctgatt gataaagta gaataaagg ctattatgca ttcaaactgg 2800
 ctgaagagaa atctaaaccc agatttgat tcttcacac tgattttaaa 2850
 gctaaatcct caatacaatt ttacaacaaa gtgatcagca gcaggggctt 2900
 cccttttgag aacagtagtt ctgatgcag tcagacccaa gaaatacag 2950
 agtgcactgt ctgcttattc cttgtgcaga agaaaccact gatattcctg 3000
 ggttggtgct tcttctccac cctggttcta ctcttatcaa ttgccatttt 3050
 tcaaaggcag aagagaagaa agttttggaa agcaaaaaac ttacaacaca 3100
 taccattaaa gaaaggcaag agagtgtta gc 3132

<210> 2

<211> 1044
<212> PRT
<213> 人化

<400> 2

Met	Lys	Pro	Gly	Cys	Ala	Ala	Gly	Ser	Pro	Gly	Asn	Glu	Trp	Ile	1	5	10	15
Phe	Phe	Ser	Thr	Asp	Glu	Ile	Thr	Thr	Arg	Tyr	Arg	Asn	Thr	Met	20	25	30	
Ser	Asn	Gly	Gly	Leu	Gln	Arg	Ser	Val	Ile	Leu	Ser	Ala	Leu	Ile	35	40	45	
Leu	Leu	Arg	Ala	Val	Thr	Gly	Phe	Ser	Gly	Asp	Gly	Arg	Ala	Ile	50	55	60	
Trp	Ser	Lys	Asn	Pro	Asn	Phe	Thr	Pro	Val	Asn	Glu	Ser	Gln	Leu	65	70	75	
Phe	Leu	Tyr	Asp	Thr	Phe	Pro	Lys	Asn	Phe	Phe	Trp	Gly	Ile	Gly	80	85	90	
Thr	Gly	Ala	Leu	Gln	Val	Glu	Gly	Ser	Trp	Lys	Lys	Asp	Gly	Lys	95	100	105	
Gly	Pro	Ser	Ile	Trp	Asp	His	Phe	Ile	His	Thr	His	Leu	Lys	Asn	110	115	120	
Val	Ser	Ser	Thr	Asn	Gly	Ser	Ser	Asp	Ser	Tyr	Ile	Phe	Leu	Glu	125	130	135	
Lys	Asp	Leu	Ser	Ala	Leu	Asp	Phe	Ile	Gly	Val	Ser	Phe	Tyr	Gln	140	145	150	
Phe	Ser	Ile	Ser	Trp	Pro	Arg	Leu	Phe	Pro	Asp	Gly	Ile	Val	Thr	155	160	165	
Val	Ala	Asn	Ala	Lys	Gly	Leu	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Leu	Leu	Asp	170	175	180	
Ala	Leu	Val	Leu	Arg	Asn	Ile	Glu	Pro	Ile	Val	Thr	Leu	Tyr	His	185	190	195	
Trp	Asp	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Gln	Glu	Lys	Tyr	Gly	Gly	Trp	Lys	200	205	210	
Asn	Asp	Thr	Ile	Ile	Asp	Ile	Phe	Asn	Asp	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Cys	215	220	225	
Phe	Gln	Met	Phe	Gly	Asp	Arg	Val	Lys	Tyr	Trp	Ile	Thr	Ile	His	230	235	240	
Asn	Pro	Tyr	Leu	Val	Ala	Trp	His	Gly	Tyr	Gly	Thr	Gly	Met	His	245	250	255	
Ala	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly	Asn	Leu	Ala	Ala	Val	Tyr	Thr	Val	Gly	260	265	270	
His	Asn	Leu	Ile	Lys	Ala	His	Ser	Lys	Val	Trp	His	Asn	Tyr	Asn	275	280	285	
Thr	His	Phe	Arg	Pro	His	Gln	Lys	Gly	Trp	Leu	Ser	Ile	Thr	Leu	290	295	300	
Gly	Ser	His	Trp	Ile	Glu	Pro	Asn	Arg	Ser	Glu	Asn	Thr	Met	Asp	305	310	315	
Ile	Phe	Lys	Cys	Gln	Gln	Ser	Met	Val	Ser	Val	Leu	Gly	Trp	Phe	320	325	330	
Ala	Asn	Pro	Ile	His	Gly	Asp	Gly	Asp	Tyr	Pro	Glu	Gly	Met	Arg	335	340	345	
Lys	Lys	Leu	Phe	Ser	Val	Leu	Pro	Ile	Phe	Ser	Glu	Ala	Glu	Lys				

350	355	360
His Glu Met Arg Gly Thr Ala Asp Phe	Phe Ala Phe Ser Phe Gly	
365	370	375
Pro Asn Asn Phe Lys Pro Leu Asn Thr	Met Ala Lys Met Gly Gln	
380	385	390
Asn Val Ser Leu Asn Leu Arg Glu Ala	Leu Asn Trp Ile Lys Leu	
395	400	405
Glu Tyr Asn Asn Pro Arg Ile Leu Ile	Ala Ala Asn Gly Trp Phe	
410	415	420
Thr Asp Ser Arg Val Lys Thr Glu Asp	Thr Thr Ala Ile Tyr Met	
425	430	435
Met Lys Asn Phe Leu Ser Gln Val Leu	Gln Ala Ile Arg Leu Asp	
440	445	450
Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala	Trp Ser Leu Leu Asp Gly	
455	460	465
Phe Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Ile	Arg Arg Gly Leu Phe Tyr	
470	475	480
Val Asp Phe Asn Ser Lys Gln Lys Glu	Arg Lys Pro Lys Ser Ser	
485	490	495
Ala His Tyr Tyr Lys Gln Ile Ile Arg	Glu Asn Gly Phe Ser Leu	
500	505	510
Lys Glu Ser Thr Pro Asp Val Gln Gly	Gln Phe Pro Cys Asp Phe	
515	520	525
Ser Trp Gly Val Thr Glu Ser Val Leu	Lys Pro Glu Ser Val Ala	
530	535	540
Ser Ser Pro Gln Phe Ser Asp Pro His	Leu Tyr Val Trp Asn Ala	
545	550	555
Thr Gly Asn Arg Leu Leu His Arg Val	Glu Gly Val Arg Leu Lys	
560	565	570
Thr Arg Pro Ala Gln Cys Thr Asp Phe	Val Asn Ile Lys Lys Gln	
575	580	585
Leu Glu Met Leu Ala Arg Met Lys Val	Thr His Tyr Arg Phe Ala	
590	595	600
Leu Asp Trp Ala Ser Val Leu Pro Thr	Gly Asn Leu Ser Ala Val	
605	610	615
Asn Arg Gln Ala Leu Arg Tyr Tyr Arg	Cys Val Val Ser Glu Gly	
620	625	630
Leu Lys Leu Gly Ile Ser Ala Met Val	Thr Leu Tyr Tyr Pro Thr	
635	640	645
His Ala His Leu Gly Leu Pro Glu Pro	Leu Leu His Ala Asp Gly	
650	655	660
Trp Leu Asn Pro Ser Thr Ala Glu Ala	Phe Gln Ala Tyr Ala Gly	
665	670	675
Leu Cys Phe Gln Glu Leu Gly Asp Leu	Val Lys Leu Trp Ile Thr	
680	685	690
Ile Asn Ala Pro Asn Arg Leu Ser Asp	Ile Tyr Asn Arg Ser Gly	
695	700	705
Asn Asp Thr Tyr Gly Ala Ala His Asn	Leu Leu Val Ala His Ala	
710	715	720
Leu Ala Trp Arg Leu Tyr Asp Arg Gln	Phe Arg Pro Ser Gln Arg	

725	730	735
Gly Ala Val Ser Leu Ser Leu His Ala Asp Trp Ala Glu Pro Ala		
740	745	750
Asn Pro Tyr Ala Asp Ser His Trp Arg Ala Ala Glu Arg Phe Leu		
755	760	765
Gln Phe Glu Ile Ala Trp Phe Ala Glu Pro Leu Phe Lys Thr Gly		
770	775	780
Asp Tyr Pro Ala Ala Met Arg Glu Tyr Ile Ala Ser Lys His Arg		
785	790	795
Arg Gly Leu Ser Ser Ser Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Ala Glu		
800	805	810
Arg Arg Leu Leu Lys Gly Thr Val Asp Phe Cys Ala Leu Asn His		
815	820	825
Phe Thr Thr Arg Phe Val Met His Glu Gln Leu Ala Gly Ser Arg		
830	835	840
Tyr Asp Ser Asp Arg Asp Ile Gln Phe Leu Gln Asp Ile Thr Arg		
845	850	855
Leu Ser Ser Pro Thr Arg Leu Ala Val Ile Pro Trp Gly Val Arg		
860	865	870
Lys Leu Leu Arg Trp Val Arg Arg Asn Tyr Gly Asp Met Asp Ile		
875	880	885
Tyr Ile Thr Ala Ser Gly Ile Asp Asp Gln Ala Leu Glu Asp Asp		
890	895	900
Arg Leu Arg Lys Tyr Tyr Leu Gly Lys Tyr Leu Gln Glu Val Leu		
905	910	915
Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Arg Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala		
920	925	930
Phe Lys Leu Ala Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe		
935	940	945
Thr Ser Asp Phe Lys Ala Lys Ser Ser Ile Gln Phe Tyr Asn Lys		
950	955	960
Val Ile Ser Ser Arg Gly Phe Pro Phe Glu Asn Ser Ser Ser Arg		
965	970	975
Cys Ser Gln Thr Gln Glu Asn Thr Glu Cys Thr Val Cys Leu Phe		
980	985	990
Leu Val Gln Lys Lys Pro Leu Ile Phe Leu Gly Cys Cys Phe Phe		
995	1000	1005
Ser Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Ile Ala Ile Phe Gln Arg Gln		
1010	1015	1020
Lys Arg Arg Lys Phe Trp Lys Ala Lys Asn Leu Gln His Ile Pro		
1025	1030	1035
Leu Lys Lys Gly Lys Arg Val Val Ser		
1040		

<210> 3
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列為合成的

<400> 3
 cgggcgctag catgaagcca ggctgtgcgg cagg 34

<210> 4
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 4
 cagtggatcc ttacttatcg tcgtcatcct tgtaatcgct aacaactctc 50
 ttgcctttct ttc 63

 <210> 5
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 5
 ccgccggata tcatgcggt gctgctggcc ctgttgg 37

 <210> 6
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 6
 ccgccggaat tctgtctgca cccagaccc gaagggg 37

 <210> 7
 <211> 79
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 7
 ggtctggggt gcagacaggt aagcctatcc ctaaccctct cctcggtctc 50
 gattctacgt aggaattcgg atccgcggc 79

 <210> 8
 <211> 79
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 8
 gccgcggatc cgaattccta cgtagaatcg agaccgagga gagggtagg 50
 gataggctta cctgtctgca cccagacc 79

 <210> 9
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 9
 gaattccacc atgaagccag gctgtgcggc aggatctcca g 41

 <210> 10
 <211> 37

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列為合成的

<400> 10
ggcgcgccga caaggaataa gcagacagt cactctg 37

<210> 11
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列為合成的

<400> 11
ccctcgaatc ttgattgctg cgaatggctg gttcacagac ag 42

<210> 12
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列為合成的

<400> 12
ctgtctgtga accagccatt cgcagcaatc aagattcgag gg 42

<210> 13
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列為合成的

<400> 13
gctctggatc accatcaacg cgcctaaccg gctaagtac 40

<210> 14
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列為合成的

<400> 14
gtcacttagc cggtaggcg cgttgatggt gatccagagc 40

<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列為合成的

<400> 15
agcggattct catggaaca 19

<210> 16
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列為合成的

<400> 16
ctggtcagcc aggagctt 18

<210> 17
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 17
 tccacaagct gaaggcagac aagg 24

 <210> 18
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 18
 gcagtcagac ccaagaaaat acaga 25

 <210> 19
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 19
 cccaggaata tcagtggttt cttc 24

 <210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 20
 tgcactgtct gcttattcct tgt 23

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

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 21
 cgagcccttt gatgacttcc t 21

 <210> 22
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 22
 ggagcgggct gtctcaga 18

 <210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 23

cccagcatca tccaggccca g 21

<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列為合成的

<400> 24
agtccttcca cctcgacgtt t 21

<210> 25
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列為合成的

<400> 25
aatcgagtct gtttccagca gaa 23

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列為合成的

<400> 26
agccccccct tccacttttt 20

<210> 27
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列為合成的

<400> 27
cgttaacagt gggcgccaac t 21

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列為合成的

<400> 28
cccagcggtc tctcttcaaa 20

<210> 29
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列為合成的

<400> 29
atgctaacgc agcagttgca aaca 24

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列為合成的

<400> 30
 tgtggtgagc gaaggactga 20

 <210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 31
 ggagtgggtt ggggtgtaca 20

 <210> 32
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 32
 ctgggcgtct tccccatgg 19

 <210> 33
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 33
 cctgcccctt ctcaacga 18

 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 34
 tccacgttgc tgatgctctt 20

 <210> 35
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 35
 ccaagccatc cttggagcca gt 22

 <210> 36
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 36
 cgccagcctg tcactataca aa 22

 <210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 37
 ccagaggacc tcgactccaa 20

 <210> 38
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 38
 cgtttcctt tggcccgaca gtct 25

 <210> 39
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 39
 gcacacuacu acaaacagau u 21

 <210> 40
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 40
 ucuguuugua guagugugcu u 21

 <210> 41
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 41
 gcacgaugg uuccagugau u 21

 <210> 42
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 42
 ucacuggaac cauucgugcu u 21

 <210> 43
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 序列為合成的

 <400> 43
 cgauggauau auucaaugu u 21

 <210> 44
 <211> 21
 <212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列為合成的

<400> 44

cauuugaaua uauccaucgu u 21

<210> 45

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列為合成的

<400> 45

ugaaauaacc acacgcuaau u 21

<210> 46

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列為合成的

<400> 46

auagcgugug guuauuucau u 21

<210> 47

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列為合成的

<400> 47

ugguuuacau guuccaau 19

<210> 48

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列為合成的

<400> 48

uauuggaaca uguaaacca 19

<210> 49

<211> 3159

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列為合成的

<400> 49

atgaagccag gctgtgcggc aggatctcca gggaatgaat ggattttctt 50

cagcactgat gaaataacca cacgctatag gaatacaatg tccaacgggg 100

gattgcaaag atctgtcatc ctgtcagcac ttattctgct acgagctgtt 150

actggattct ctggagatgg aagagctata tggctctaaa atcctaattt 200

tactccggt aatgaaagtc agctgtttct ctatgacact ttccctaaaa 250

actttttctg gggatttggg actggagcat tgcaagtga agggagtgg 300

aagaaggatg gaaaaggacc ttctatatgg gatcatttca tccacacaca 350

ccttaaaaat gtcagcagca cgaatgggtc cagtgacagt tatatttttc 400
 tggaaaaaga ctatcagcc ctggatttta taggagtttc tttttatcaa 450
 ttttcaattt cctggccaag gcttttcccc gatggaatag taacagttgc 500
 caacgcaaaa ggtctgcagt actacagtac tcttctggac gctctagtgc 550
 ttagaaacat tgaacctata gttactttat accactggga tttgcctttg 600
 gcactacaag aaaaatatgg ggggtggaaa aatgatacca taatagatat 650
 cttcaatgac tatgccacat actgtttcca gatgtttggg gaccgtgtca 700
 aatattggat tacaattcac aaccataatc tagtggcttg gcatgggtat 750
 gggacaggta tgcattcccc tggagagaag gaaaatttag cagctgtcta 800
 cactgtggga cacaacttga tcaaggctca ctcgaaagt ttggcataact 850
 acaacacaca tttccgcccc catcagaagg gttggttata gatcacgttg 900
 ggatctcatt ggatcgagcc aaaccggctg gaaaacacga tggatatatt 950
 caaatgtcaa caatccatgg tttctgtgct tggatggttt gccaaccta 1000
 tccatgggga tggcgactat ccagagggga tgagaaagaa gttgttctcc 1050
 gttctacca ttttctctga agcagagaag catgagatga gaggcacagc 1100
 tgatttcttt gccttttctt ttggacccaa caacttcaag ccctaaaca 1150
 ccatggctaa aatgggacaa aatgtttcac ttaatttaag agaagcgtg 1200
 aactggatta aactggaata caacaaccct cgaatcttga ttgctgagaa 1250
 tggctgggtc acagacagtc gtgtgaaaac agaagacacc acggccatct 1300
 acatgatgaa gaatttcctc agccagggtc ttcaagcaat aaggttagat 1350
 gaaatacgag tgttttggtt tactgcctgg tctctcctgg atggctttga 1400
 atggcaggat gcttacacca tccgccgagg attattttat gtggatttta 1450
 acagtaaaca gaaagagcgg aaacctaatg cticagcaca ctactacaaa 1500
 cagatcatal gagaaaaatg tttttcttta aaagagtcca cgccagatgt 1550
 gcagggccag tttccctgtg acttctcctg ggggtgctact gaatctgttc 1600
 ttaagccga gtctgtggct tcgtcccccac agttcagcga tcctcatctg 1650
 tacgtgtgga acgccactgg caacagactg ttgcaccgag tggaaggggt 1700
 gaggtgaaa acacgacccg ctcaatgcac agattttgta aacatcaaaa 1750
 aacaacttga gatgttgga agaataaaag tcaccacta ccggtttgct 1800
 ctggattggg cctcgtcctt tccactggc aacctgtccg cggatgaaccg 1850
 acaggccctg aggtactaca ggtgcgtggt cagtgagggg ctgaagcttg 1900
 gcattctcgc gatgttcacc ctgtattatc cgaccacgc ccacctaggc 1950
 ctccccgagc ctctgttgca tgccgacggg tggctgaacc catcgacggc 2000
 cgaggccttc caggcctacg ctgggctgtg cttccaggag ctgggggacc 2050
 tggatgaagt ctggatcacc atcaacgagc ctaaccggct aagtacatc 2100
 tacaaccgct ctggcaacga cacctacggg gcggcgacac acctgctggt 2150
 ggcccacgcc ctggcctggc gcctctacga ccggcagttc aggcctcac 2200
 agcgcggggc cgtgtcgtg tcgtgcacg cggactgggc ggaacccgcc 2250

aacccctatg ctgactcgca ctggagggcg gccgagcgct tcctgcagtt 2300
 cgagatcgcc tggttcgccg agccgctctt caagaccggg gactaccccg 2350
 cggccatgag ggaatacatt gcctccaagc accgacgggg gctttccagc 2400
 tcggccctgc cgcgcctcac cgaggccgaa aggaggctgc tcaaggcac 2450
 ggtcgacttc tgcgcgtca accacttcac cactagggtc gtgatgcacg 2500
 agcagctggc cggcagccgc tacgactcgg acagggacat ccagtttctg 2550
 caggacatca cccgcctgag ctccccacg cgcttggtg tgattccctg 2600
 ggggtgctgc aagctgctgc ggtgggtccg gaggaactac ggcgacatgg 2650
 acatttacat caccgccagt ggcatcgacg accaggctct ggaggatgac 2700
 cggctccgga agtactacct aggggaagta cttcaggagg tgctgaaagc 2750
 atacctgatt gataaagtca gaatcaaagg ctattatgca ttcaactgg 2800
 ctgaagagaa atctaaccce agatttggat tcttcacatc tgatttttaa 2850
 gctaaatcct caatacaatt ttacaacaaa gtgatcgaca gcaggggctt 2900
 cccctttgag aacagtagtt ctagatgcag tcagacccaa gaaaatacag 2950
 agtgcactgt ctgcttattc cttgtgcaga agaaaccact gatattcctg 3000
 ggttgttctt tcttctccac cctggttcta ctcttatcaa ttgccatttt 3050
 tcaaaggcag aagagaagaa agttttggaa agcaaaaaac ttacaacaca 3100
 taccattaaa gaaaggcaag agagtgttta gcgattacaa ggatgacgac 3150
 gataagtaa 3159

<210> 50
 <211> 3012
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列為合成的

<400> 50
 atgaagccag gctgtgcggc aggatctcca gggaatgaat ggattttctt 50
 cagcactgat gaaataacca cacgctatag gaatacaatg tccaacgggg 100
 gattgcaaag atctgtcatc ctgtcagcac ttattctgct acgagctgtt 150
 actggattct ctggagatgg aagagctata tggcttaaaa atcctaattt 200
 tactcggta aatgaaagtc agctgtttct ctatgacact ttccctaaaa 250
 actttttctg ggggtattggg actggagcat tgcaagtga agggagtgg 300
 aagaaggatg gaaaaggacc ttctatatgg gatcatttca tccacacaca 350
 ccttaaaaat gtcagcagca cgaatgggtc cagtgcagct tatatttttc 400
 tggaaaaaga cttatcagcc ctggatttta taggagtttc tttttatcaa 450
 ttttcaattt cctggccaag gcttttcccc gatggaatag taacagtgc 500
 caacgcaaaa ggtctgcagc actacagtac tcttctggac gctctagtgc 550
 ttagaaacat tgaacctata gttactttat accactggga ttgcctttg 600
 gcactacaag aaaaatatgg ggggtggaaa aatgatacca taatagatat 650
 cttcaatgac tatgccacat actgtttcca gatgtttggg gaccgtgtca 700

aatattggat tacaattcac aacccatata tagtggcttg gcatgggtat 750
gggacaggta tgcatgcccc tggagagaag ggaaatttag cagctgtcta 800
cactgtggga cacaacttga tcaaggctca ctgaaagt tggcataact 850
acaacacaca tttccgcccc catcagaagg gttggttatc gatcacgttg 900
ggatctcatt ggatcgagcc aaaccggctg gaaaacacga tggatatatt 950
caaatgtcaa caatccatgg ttctgtgct tggatggtt gccaaccta 1000
tccatgggga tggcgactat ccagagggga tgagaaagaa gttgttctcc 1050
gttctacca tttctctga agcagagaag catgagatga gaggcacagc 1100
tgatttctt gccitttctt ttggacccaa caacttcaag cccctaaaca 1150
ccatggctaa aatgggacaa aatgtttcac ttaatttaag agaagcgctg 1200
aactggatta aactggaata caacaacct cgaatcttga ttgctgagaa 1250
tggtctgttc acagacagtc gtgtgaaaac agaagacacc acggccatct 1300
acatgatgaa gaatttctc agccagggtc ttcaagcaat aaggttagat 1350
gaaatacgag tgtttggta tactgcctgg tctctcctgg atggcttga 1400
atggcaggat gcttacacca tccgccgagg attattttat gtggatttta 1450
acagtaaaca gaaagagcgg aaacctaat cttcagcaca ctactacaaa 1500
cagatcatc gagaaaatgg ttttcttta aaagagtcca cgccagatgt 1550
gcagggccag ttccctgtg acttctcctg ggggtgcact gaatctgttc 1600
ttaagccga gtctgtggct tcgtcccccac agttcagcga tcctcatctg 1650
tacgtgtgga acgccactgg caacagactg ttgcaccgag tgggaagggt 1700
gaggctgaaa acacgacccg ctcaatgcac agattttgta aacatcaaaa 1750
aacaacttga gatgttgga agaataaaag taccacta cgggtttgct 1800
ctggattggg cctcgtcct tccactggc aacctgtccg cggatgaacc 1850
acaggccctg aggtactaca ggtgcgtggt cagtgagggg ctgaagcttg 1900
gcatctccgc gatggtcacc ctgtattatc cgaccacgc ccacctaggc 1950
ctccccgagc ctctgttgca tgccgacggg tggctgaacc catcgacgc 2000
cgaggccttc caggcctacg ctgggctgtg cttccaggag ctgggggacc 2050
tggatgaagct ctggatcacc atcaacgagc ctaaccggct aagtgcatac 2100
tacaaccgct ctggcaacga cacctacggg gcggcgacac acctgctggt 2150
ggcccacgcc ctggcctggc gcctctacga ccggcagttc aggcctcac 2200
agcgcggggc cgtgtcgtg tcgtgcacg cggactgggc ggaaccgcc 2250
aaccctatg ctgactcgca ctggagggcg gccgagcgt tcctgcagtt 2300
cgagatgcc tggttcgccg agccgtctt caagaccggg gactaccccg 2350
cggccatgag ggaatacatt gcctccaagc accgacgggg gctttccagc 2400
tcggccctgc cgcgcctcac cgaggccgaa aggaggctgc tcaagggcac 2450
ggtcgacttc tgcgcgtca accacttcac cactaggttc gtgatgcacg 2500
agcagctggc cggcagccgc tacgactcgg acagggacat ccagtttctg 2550

caggacatca cccgcctgag ctccccacg cgcctggctg tgattccctg 2600
 gggggtgcgc aagctgctgc ggtgggtccg gaggaactac ggcgacatgg 2650
 acatttacat caccgccagt ggcacgcagc accaggctct ggaggatgac 2700
 cggctccgga agtactacct agggaagtac cttcaggagg tgctgaaagc 2750
 atacctgatt gataaagtca gaatcaaagg ctattatgca ttcaaactgg 2800
 ctgaagagaa atctaaaccc agatttggat tcttcacatc tgattttaaa 2850
 gctaaatcct caatacaatt ttacaacaaa gtgatcagca gcaggggctt 2900
 cccttttgag aacagtagtt ctatgacgag tcagacccaa gaaaatacag 2950
 agtgcactgt ctgcttattc cttgtcggcg cgcccatca tcatcatcat 3000
 catcaccact aa 3012

<210> 51
 <211> 3159
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列為合成的

<400> 51
 atgaagccag gctgtgcggc aggatctcca gggaatgaat ggattttctt 50
 cagcactgat gaaataacca cacgctatag gaatacaatg tccaacgggg 100
 gattgcaaag atctgtcatc ctgtcagcac ttattctgct acgagctgtt 150
 actggattct ctggagatgg aagagctata tggcttaaaa atcctaattt 200
 tactccggtg aatgaaagtc agctgtttct ctatgacact ttccctaaaa 250
 actttttctg ggggtattggg actggagcat tgcaagtgga agggagtgg 300
 aagaaggatg gaaaaggacc ttctatatgg gatcatttca tccacacaca 350
 ccttaaaaat gtcagcagca cgaatggttc cagtgcagct tatatttttc 400
 tggaaaaaga cttatcagcc ctggatttta taggagtttc tttttatcaa 450
 ttttcaattt cctggccaag gcttttcccc gatggaatag taacagtgc 500
 caacgcaaaa ggtctgcagt actacagtac tcttctggac gctctagtgc 550
 ttagaaacat tgaacctata gttactttat accactggga ttgcctttg 600
 gcactacaag aaaaatatgg ggggtggaaa aatgatacca taatagatat 650
 cttcaatgac tatgccacat actgtttcca gatgtttggg gaccgtgtca 700
 aatattggat tacaattcac aaccatatac tagtggcttg gcatgggtat 750
 gggacaggta tgcagcccc tggagagaag ggaatttag cagctgtcta 800
 cactgtggga cacaacttga tcaaggctca ctcgaaagt tggcataact 850
 acaacacaca ttccgccca catcagaagg gttggttata gatcacgttg 900
 ggatctcatt ggatcgagcc aaaccggtcg gaaaacacga tggatatatt 950
 caaatgtcaa caatccatgg tttctgtgct tggatggtt gccaacctta 1000
 tccatgggga tggcgactat ccagagggga tgagaaagaa gttgttctcc 1050
 gttctacca ttttctctga agcagagaag catgagatga gaggcacagc 1100
 tgattttctt gccttttctt ttggacccaa caacttcaag cccttaaca 1150

ccatggctaa aatgggacaa aatgtttcac ttaatttaag agaagcgctg 1200
aactggatta aactggaata caacaaccct cgaatcttga ttgctgcgaa 1250
tggctgggtc acagacagtc gtgtgaaaac agaagacacc acggccatct 1300
acatgatgaa gaatttcctc agccagggtgc ttcaagcaat aaggtttagat 1350
gaaatacgag tgtttgggta tactgcctgg tctctcctgg atggccttga 1400
atggcaggat gcttacacca tccgccgagg attattttat gtggatttta 1450
acagtaaaca gaaagagcgg aaacctaaagt cttcagcaca ctactacaaa 1500
cagatcatac gagaaaatgg tttttcttta aaagagtcca cgccagatgt 1550
gcaggggccag tttccctgtg acttctcctg ggggtgctact gaatctgttc 1600
ttaagcccca gtctgtggct tcgtcccccac agttcagcga tcctcatctg 1650
tacgtgtgga acgccactgg caacagactg ttgcaccgag tggaaggggt 1700
gaggctgaaa acacgacccg ctcaatgcac agattttgta aacatcaaaa 1750
aacaacttga gatgttggca agaataaaag tcaccacta ccggtttgct 1800
ctggattggg cctcggtcct tccactggc aacctgtccg cggatgaacc 1850
acaggccctg aggtactaca ggtgcgtggt cagtgaaggg ctgaagcttg 1900
gcatctccgc gatggtcacc ctgtattatc cgaccacgc ccacctaggc 1950
ctccccgagc ctctgttgca tgccgacggg tggtgaacc catcgacggc 2000
cgaggccttc caggcctacg ctgggctgtg cttccaggag ctggggggacc 2050
tggtgaagct ctggatcacc atcaacgagc ctaaccggct aagtgcacac 2100
tacaaccgct ctggcaacga cacctacggg gcggcgacac acctgctggt 2150
ggcccacgcc ctggcctggc gcctctacga ccggcagttc aggcctcac 2200
agcgcggggc cgtgtcgtg tcgtgcacg cggactgggc ggaaccgcc 2250
aaccctatg ctgactcgca ctggaggcg gccgagcgt tcctgcagtt 2300
cgagatcgcc tggttcgccg agccgctctt caagaccggg gactacccc 2350
cggccatgag ggaatacatt gcctccaagc accgacggg gctttccagc 2400
tcggccctgc cgcgcctcac cgaggccgaa aggaggctgc tcaagggcac 2450
ggtcgacttc tgcgcgtca accacttcac cactaggttc gtgatgcacg 2500
agcagctggc cggcagccgc tacgactcgg acagggacat ccagtttctg 2550
caggacatca cccgcctgag ctccccacg cgcctggctg tgattccctg 2600
gggggtgcgc aagctgctgc ggtgggtccg gaggaactac ggcgacatgg 2650
acatttacat caccgccagt ggcacgcag accaggctct ggaggatgac 2700
cggtccgga agtactacct agggaagtac cttcaggagg tgctgaaagc 2750
atactgatt gataaagta gaataaagg ctattatgca ttcaactgg 2800
ctgaagagaa atctaacc cagatttggat tcttcacac tgattttaaa 2850
gctaaatcct caatacaatt ttacaacaaa gtgatcagca gcaggggctt 2900
cccttttgag aacagtagtt ctagatgcag tcagacccaa gaaaatacag 2950
agtgcactgt ctgcttattc cttgtgcaga agaaaccact gatattcctg 3000
ggttgttgct tcttctccac cctgggttcta ctcttatcaa ttgccatttt 3050

tcaaaggcag aagagaagaa agttttggaa agcaaaaaac ttacaacaca 3100
taccattaaa gaaaggcaag agagttgtta gcgattacaa ggatgacgac 3150
gataagtaa 3159

<210> 52
<211> 3159
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列為合成的

<400> 52
atgaagccag gctgtgcggc aggatctcca gggaatgaat ggattttctt 50
cagcactgat gaaataacca cacgctatag gaatacaatg tccaacgggg 100
gattgcaaag atctgtcatc ctgtcagcac ttattctgct acgagctgtt 150
actggattct ctggagatgg aagagctata tggctctaaa atcctaattt 200
tactccggta aatgaaagtc agctgtttct ctatgacact ttcctaaaa 250
actttttctg ggggtattggg actggagcat tgcaagtga agggagtgtg 300
aagaaggatg gaaaaggacc ttctatatgg gatcatttca tccacacaca 350
ccttaaaaat gtcagcagca cgaatgggtc cagtgcagct tatatttttc 400
tggaataaga cttatcagcc ctggatttta taggagtttc tttttatcaa 450
ttttcaattt cctggccaag gcttttcccc gatggaatag taacagttgc 500
caacgcaaaa ggtctgcagt actacagtac tcttctggac gctctagtgc 550
ttagaaacat tgaacctata gttactttat accactggga ttgaccttg 600
gcactacaag aaaaatatgg ggggtggaaa aatgatacca taatagatat 650
cttcaatgac tatgccacat actgtttcca gatgtttggg gaccgtgtca 700
aatattggat tacaattcac aacctatct tagtggttg gcatgggtat 750
gggacaggta tgcattcccc tggagagaag ggaaatttag cagctgtcta 800
cactgtggga cacaacttga tcaaggctca ctgaaagt ttgcataact 850
acaacacaca ttccgcccc catcagaagg gttggttctc gatcacgttg 900
ggatctcatt ggatcgagcc aaaccggctg gaaaacacga tggatatatt 950
caaattgcaa caatccatgg tttctgtgct tggatggtt gccaaccta 1000
tccatgggga tggcgactat ccagagggga tgagaaagaa gttgttctcc 1050
gttctaccca ttttctctga agcagagaag catgagatga gaggcacagc 1100
tgatttcttt gccttttctt ttggacccaa caacttcaag ccctaaca 1150
ccatggctaa aatgggacaa aatgtttcac ttaatttaag agaagcgtg 1200
aactggatta aactggaata caacaacct cgaatcttga ttgctgcgaa 1250
tggtgtgttc acagacagtc gtgtgaaaac agaagacacc acggccatct 1300
acatgatgaa gaatttcctc agccagggtc ttcaagcaat aaggttagat 1350
gaaatacgag tgtttgttta tactgcctgg tctctcctgg atggcttga 1400
atggcaggat gcttacacca tccgccgagg attattttat gtggatttta 1450
acagtaaaca gaaagagcgg aaacctaatg cttcagcaca ctactacaaa 1500

cagatcatac gagaaaatgg tttttcttta aaagagtcca cgccagatgt 1550
gcaggggccag tttccctgtg acttctcctg ggggtgtcact gaatctgttc 1600
ttaagcccga gtctgtggct tcgtcccccac agttcagcga tcctcatctg 1650
tacgtgtgga acgccactgg caacagactg ttgcaccgag tggaaggggt 1700
gagggtgaaa acacgacccg ctcaatgcac agattttgta aacatcaaaa 1750
aacaacttga gatgttggca agaataaaag tcaccacta ccggtttgct 1800
ctggattggg cctcggtcct tcccactggc aacctgtccg cggatgaaccg 1850
acaggccctg aggtactaca ggtgcgtggt cagtgagggg ctgaagcttg 1900
gcattctccg gatggtcacc ctgtattatc cgaccacgc ccacctaggc 1950
ctccccgagc ctctgttgca tgccgacggg tggtgaacc catcgacggc 2000
cgaggccttc caggcctacg ctgggctgtg cttccaggag ctgggggacc 2050
tggtgaagct ctggatcacc atcaacgcgc ctaaccggct aagtgcacac 2100
tacaaccgct ctggcaacga cacctacggg gcggcgaca acctgctggt 2150
ggcccacgcc ctggcctggc gcctctacga ccggcagttc aggccctcac 2200
agcgcggggc cgtgtcgtg tcgctgcacg cggactgggc ggaacccgcc 2250
aaccctatg ctgactcgca ctggagggcg gccgagcgt tcctgcagtt 2300
cgagatgcc tggttcgcg agccgctctt caagaccggg gactaccccg 2350
cggccatgag ggaatacatt gcctccaagc accgacgggg gctttccagc 2400
tcggccctgc cgcgcctcac cgaggccgaa aggaggctgc tcaagggcac 2450
ggtcgacttc tgcgcgtca accactcac cactaggttc gtgatgcacg 2500
agcagctggc cggcagccgc tacgactcgg acagggacat ccagtttctg 2550
caggacatca cccgcctgag ctccccacg cgcttggtg tgattccctg 2600
gggggtgcgc aagctgtgc ggtgggtccg gaggaactac ggcgacatgg 2650
acatttacat caccgccagt ggcatcgacg accaggctct ggaggatgac 2700
cggctccgga agtactacct aggaagtac cttcaggagg tgctgaaagc 2750
atacctgatt gataaagta gaataaagg ctattatgca ttcaactgg 2800
ctgaagagaa atctaaaccc agatttggat tcttcacac tgattttaaa 2850
gctaaatcct caatacaatt ttacaacaaa gtgatcgca gcaggggctt 2900
cccttttgag aacagtagtt ctagatgcag tcagacccaa gaaaatacag 2950
agtgcactgt ctgcttattc ctgtgcaga agaaaccact gatattcctg 3000
ggttgttgct tcttctccac cctggttcta ctcttatcaa ttgccatttt 3050
tcaaaggcag aagagaagaa agttttggaa agcaaaaaac ttacaacaca 3100
taccattaaa gaaaggcaag agagttgtta gcgattaca ggatgacgac 3150
gataagtaa 3159

<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 序列為合成的

<400> 53

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Phe Leu Ala
5 10

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列為合成的

<400> 54

Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser
5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 55

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr
5

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 56

Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr Gly Val His
5 10

<210> 57

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 57

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

Ile Ser

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 58

Val Arg Lys Glu Tyr Ala Asn Leu Tyr Ala
5 10

106年1月13日修(更)正本

申請專利範圍

公告本

1. 一種KL β 促效劑之用途，其係用於製造供治療與KL β 之表現或活性相關之病症的藥劑，其該中病症為糖尿病或胰島素抵抗，且其中該KL β 促效劑為抗-KL β 抗體。
2. 如請求項1之用途，其中該抗體為單株抗體。
3. 如請求項1或2之用途，其中該抗體係選自由以下組成之群：嵌合抗體、人類化抗體、親和力成熟抗體及人類抗體。
4. 如請求項1或2之用途，其中該抗體係雙特異抗體。
5. 如請求項1或2之用途，其中該抗體為抗體片段。