



(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 I481412 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 04 月 21 日

(21)申請案號：098129193

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 08 月 31 日

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

C07K16/30 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2008/08/29 丹麥

PA 2008 01202

2008/09/02 美國

61/136,391

(71)申請人：賽門弗鎮公司 (丹麥) SYMPHOGEN A/S (DK)

丹麥

(72)發明人：彼得森 米克 汪達爾 PEDERSEN, MIKKEL WANDAHN (DK)；葛雷 麥可

KRAGH, MICHAEL (DK)；黑 亞當 HEY, ADAM (DK)；傑克柏森 海爾

JACOBSEN, HELLE (DK)

(74)代理人：桂齊恆；閻啟泰

(56)參考文獻：

TW 200902552A

TW 201231066A

Niederfellner G., " Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies " Blood. 2011, 118(2), 358-67 全

審查人員：吳佩諄

申請專利範圍項數：24 項 圖式數：47 共 311 頁

(54)名稱

重組抗表皮生長因子受體抗體組成物

RECOMBINANT ANTI-EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR ANTIBODY
COMPOSITIONS

(57)摘要

本發明係關於用於人類癌症治療之重組抗體領域。更特定言之，本發明提供對人類 EGFR 具有兩種獨特的非重疊結合特異性之抗體組成物的用途。該抗體組成物可在用其他抗 EGFR 抗體治療後有效於治療癌症，無論該癌症是否在該先前治療期間或之後顯示進展皆然。該抗體組成物亦可用於在用本發明之抗體組成物進行第一線治療後重複治療復發性腫瘤，因為該組成物不會導致抗性腫瘤選擇性。另一治療用途為使用本發明之抗體組成物治療對已知抗 EGFR 抗體具有抗性之癌症。

The invention relates to the field of recombinant antibodies for use in human cancer therapy. More specifically the invention provides the use of an antibody composition with two distinct non-overlapping binding specificities to human EGFR. The antibody composition is effecting in treating cancer following treatment with other anti-EGFR antibodies, whether the cancer shows progression during or following the prior treatment or not. The antibody composition can also be used for repeated treatment of recurrent tumours following first-line therapy with the antibody composition of the invention, as the composition does not lead to selection of resistant tumours. A further therapeutic use is the use of an antibody composition of the invention for treatment of cancer that is resistant to known anti-EGFR antibodies.

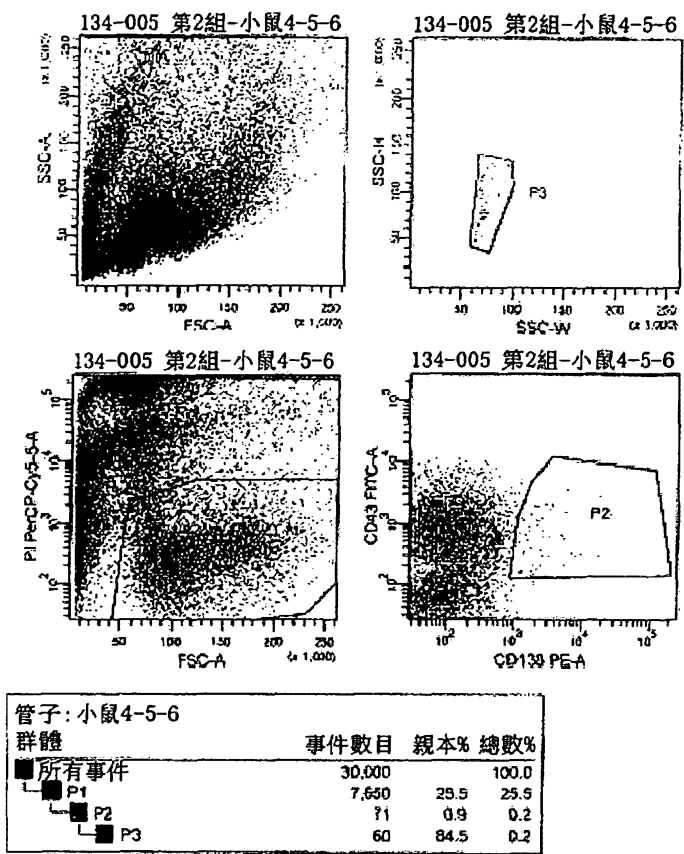


圖 1

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於用於人類癌症治療之重組抗體領域。

【先前技術】

表皮生長因子受體 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) 在細胞增殖以及凋亡、血管生成及轉移性擴散 (對腫瘤進展至關重要之過程) 中發揮著重要作用 (Salomon 等人, Crit. Rev. Oncology/Haematology, 19:183-232 (1995); Wu 等人, J. Clin. Invest., 95:1897-1905 (1995); Karnes 等人, Gastroenterology, 114:930-939 (1998); Woodburn 等人, Pharmacol. Therap. 82: 241-250 (1999); Price 等人, Eur. J. Cancer, 32A:1977-1982 (1996))。實際上, 已有研究顯示在包括非小細胞肺癌、前列腺癌、乳癌、胃癌及頭頸部腫瘤之多種實體瘤中 EGFR 介導之細胞生長有所增加 (Salomon DS 等人, Critical Reviews in Oncology/Haematology, 19:183-232 (1995))。此外, 現已知癌細胞表面上 EGFR 之過度活化與晚期疾病、轉移性表型之發展及癌症患者之不良預後相關 (Salomon DS 等人, Critical Reviews in Oncology/Haematology 19:183-232 (1995))。

此外, EGFR 表現時常伴有由 EGFR 表現腫瘤細胞產生 EGFR 配位體 (尤其 TGF- α 及 EGF), 此表明自分泌環參與此等細胞之進展 (Baselga 等人, (1994) Pharmac. Therapeut. 64: 127-154; Modjtahedi 等人, (1994) Int. J. Oncology. 4: 277-296)。因此, 阻斷該等 EGFR 配位體與 EGFR 之間的相

互作用可抑制腫瘤生長及存活 (Baselga 等人, (1994) Pharmac. Therapeut. 64: 127-154)。

EGFR 為具有約 170 kDa 分子量之膜結合醣蛋白。EGFR 由以短的 23 個胺基酸之跨膜連接子連接之糖基化外部配位體結合域 (621 個殘基) 及細胞質域 (542 個殘基) 組成。EGFR 之細胞外部分含有 25 個雙硫鍵及 12 個 N 連接糖基化位點, 且通常認為其由四個子域 (sub-domain) 組成。EGFR 之 X 射線晶體結構表明該受體採用不能結合 EGF 之自抑制束縛構形 (tethered-conformation) (Ferguson 等人, Mol Cell, 2003, 第 11 卷: 507-517) 與可介導 EGF 配位體結合及受體二聚之活性構形 (Garret 等人, Cell 2002, 第 110 卷: 763-773; Ogiso 等人, Cell, 2002, 第 110 卷: 775-787) 兩者。詳言之, 已提出域 I 及域 III 為高親和力配位體結合位點之形成提供加性貢獻。域 II 及域 IV 為富含半胱胺酸之層黏連蛋白樣區域, 其使蛋白質摺疊穩定且含有可能的 EGFR 二聚界面。

已知 EGFR 以多種不同構形存在於細胞表面, 其中束縛構形或鎖定構形最為常見。束縛構形不能二聚且因此無活性。已知治療性抗體爾必得舒 (Erbix) 藉由與域 III 結合且在空間上阻礙受體達到非束縛狀態來使束縛構形穩定。然而, 一些受體可能仍能夠採用非束縛構形, 結合配位體且二聚。單株抗體 (monoclonal antibody, mAb) 典型地僅可有效結合一種構形, 且因此不能有效地靶向展現其他構形之癌細胞或展現多種構形之癌細胞。

針對 EGFR 之配位體結合域的單株抗體 (mAb) 可阻斷與 EGFR 配位體之相互作用且隨之阻斷所得細胞內傳訊路徑。

爾必得舒TM (西妥昔單抗 (Cetuximab)) 為與人類 (EGFR) 之細胞外域特異性結合之重組人類/小鼠嵌合單株抗體。爾必得舒係由鼠類抗 EGFR 抗體之 Fv 區域與人類 IgG1 重鏈及 κ 輕鏈恆定區組成且分子量約為 152 kDa。爾必得舒係在哺乳動物細胞培養物 (鼠類骨髓瘤) 中產生。爾必得舒已獲准用於治療患有轉移性結腸直腸癌且自身之腫瘤表現 EGFR 之患者。另外，爾必得舒可與放射療法組合用於治療患有不能藉由手術移除之頭頸部鱗狀細胞癌之患者，或用作標準鉑基療法已失敗之頭頸部鱗狀細胞癌之第二線治療。

維克替比TM (VectibixTM) (帕尼單抗 (panitumumab)) 為與人類 EGFR 特異性結合之重組人類 IgG2 κ 單株抗體。維克替比之分子量約為 147 kDa。帕尼單抗係在遺傳工程改造之哺乳動物細胞 (中國倉鼠卵巢 (Chinese Hamster Ovary)) 中產生。維克替比已獲准用於治療患有轉移性結腸直腸癌、自身之腫瘤表現 EGFR 且在含有氟嘧啶、奧沙利鉑 (oxaliplatin) 及伊立替康 (irinotecan) 之化學療法攝生法治療期間或之後疾病有進展之患者。

由 Imclone 以商品名稱爾必得舒出售之西妥昔單抗描述於 US 4,943,533 及 WO 96/40210 中。由 Abgenix 以商品名稱維克替比出售之帕尼單抗描述於 US 6,235,883 中。紫

妥木單抗 (Zalutumumab) (Humax-EGFR) 為目前正處臨床開發階段之另一抗 EGFR 抗體。該抗體已由 Genmab 開發且描述於 WO 02/100348 及 WO 2004/056847 中。西妥昔單抗、帕尼單抗及紫妥木單抗結合 EGFR 上之相同抗原決定基。

在全世界許多國家，但不包括歐洲或美國，US 5,891,996 及 US 6,506,883 中所述之尼妥珠單抗 (Nimotuzumab) (TheraCIM hR3) 已獲准用於治療癌症。

此外，正處於臨床開發階段或已處於臨床開發階段之單株抗 EGFR 抗體包括：

- 由癌症研究學會 (Institute of Cancer Research) 開發之 ICR62。該抗體描述於 WO 95/20045 中。

- mAb806，其為針對 EGFR 之突變形式 (EGFR vIII) 的單株抗體。該抗體係由路德維格癌症研究學會 (Ludwig Institute of Cancer Research) 開發且描述於 WO 02/092771 中。

- 由 Merck-Serono 開發之馬妥珠單抗 (Matuzumab) (EMD72000) 描述於 WO 02/66058 中。鼠類前驅體 mAb425 描述於 WO 92/15683 中。

在此項技術中已知，長時期暴露於單株抗體會引起抗性腫瘤選擇性。該類情形可在接受長時期用單株抗體治療之患者中發生。隨著爾必得舒 (來自 Imclone) 及維克替比 (來自 Abgenix) (兩種單株抗體結合相同抗原決定基) 之廣泛使用，臨床醫師很可能將遇到對此等抗體具有抗性之腫瘤。其他單株抗體正處於臨床測試階段且在不遠的將來可

能會進入市場。在此等單株抗體中有結合與爾必得舒及維克替比相同之抗原決定基的 Humax-Egfr (來自 Genmab 之紫妥木單抗)。可假定對此三種單株抗體中之任一者具有抗性之腫瘤亦對其他兩者具有抗性。

同樣，可能存在有對目前正處臨床測試階段之任何其他單株抗 EGFR 抗體 (尼妥珠單抗 (YM Biosciences, Cuba)、馬妥珠單抗 (Merck KGaA)、mAb806 (路德維格學會) 及 ICR62 (癌症研究學會)) 具有抗性之腫瘤的臨床實例。

腫瘤對任何此等單株抗體之完全或部分抗性可使用自患者分離之樣本來檢定，以便可先驗地瞭解該腫瘤是否具有抗性。

除了對單株抗體療法之抗性 (或難治性腫瘤) 外，在治療 EGFR 表現癌症中遇到之另一問題為在手術、放射療法及/或用化學治療劑、酪胺酸激酶抑制劑 (TKI) 及/或單株抗體作醫學治療後腫瘤有復發或進展。現有如下推測：因為復發或進展可能由抗性或至少部分抗性引起，所以復發性或進行性腫瘤應用不同藥劑進行治療。因此，對於對早期抗 EGFR 抗體治療不起反應或在該早期抗 EGFR 抗體治療後仍有進展之癌症需要第二線或第三線治療。

【發明內容】

本發明之發明人已發現，對爾必得舒 (西妥昔單抗) 具有抗性之癌細胞系可在試管內用本發明之抗體組成物來有效地治療，而將抗性細胞系暴露於維克替比 (帕尼單抗)

如用爾必得舒治療般無效。可預期紫妥木單抗亦將對此細胞系無效。此等結果可導致如下結論：本發明之抗體組成物對爾必得舒、維克替比及紫妥木單抗抗性腫瘤有效。因此，本發明之抗體組成物可用於治療對任一此等產品不起反應之患者。同樣，本發明之抗體組成物可用於治療自一開始對任一此等單株抗體具有抗性之腫瘤。對諸如爾必得舒之單株抗體的抗性可在試管內使用實施例 21 中所述之方法來檢定。因此，當癌細胞系在含有 10 $\mu\text{g/mL}$ 爾必得舒之培養基中增殖時，認為其對爾必得舒具有部分抗性。對帕尼單抗及紫妥木單抗之抗性可以相同方式檢定。

基於此等觀察結果，本發明之發明人亦預期使用本發明之抗體組成物來治療對目前正處開發階段之任何其他抗 EGFR 抗體具有抗性或部分抗性的癌症，該等其他抗 EGFR 抗體包括（但不限於）西妥昔單抗、帕尼單抗、紫妥木單抗、尼妥珠單抗、ICR62、mAb806、馬妥珠單抗、及能夠與任何此等抗體結合相同抗原決定基之抗體。

該等結果已藉由一項活體內研究（實施例 23）來證實，其中將侵襲性癌細胞系植入小鼠體內。在用爾必得舒作初始處理後，選出部分反應者且對其用爾必得舒作延長處理或用本發明之抗體組成物處理。後者使得腫瘤尺寸快速減小，而在連續的爾必得舒處理下腫瘤尺寸卻保持不變。即使爾必得舒與本發明之抗體 1024 及 992 之間在結合方面存在有部分重疊，仍可達成臨床前功效。因此，在自爾必得舒轉變為 1024/992 療法後不久，在腫瘤中將存在有殘餘爾

必得舒，且爾必得舒與本發明之組成物中的兩種抗體之間在結合方面將存在有競爭，此可能會降低本發明之抗體組成物的功效。然而，此不會顯著影響 1024/992 處理之功效。

一項活體內研究亦已證實（實施例 25），爾必得舒抗性細胞可用本發明之抗體組合來有效地治療。因此，針對爾必得舒之後天抗性機制不會影響本發明之抗體組成物的功效。

總之，本發明之抗體組成物可用於治療對單株抗 EGFR 抗體（諸如爾必得舒）具有抗性或部分抗性之癌症，且可用於治療已在先前治療攝生法中接受用單株抗 EGFR 抗體（諸如爾必得舒）治療之個體的癌症。

基於爾必得舒、維克替比及紮妥木單抗之相同結合，可預期對於此三種 mAb 可達成類似結果。基於此等觀察結果，本發明之發明人亦預期使用本發明之抗體組成物來治療先前已用另一單株抗 EGFR 抗體治療過之癌症，該另一單株抗 EGFR 抗體包括（但不限於）西妥昔單抗、帕尼單抗、紮妥木單抗、尼妥珠單抗、ICR62、mAb806、馬妥珠單抗、及能夠與任何此等抗體結合相同抗原決定基之抗體。該治療之功效可在類似於實施例 23 中所述之研究的臨床前研究中進行驗證。

此外，本發明之發明人已確定，在用本發明之抗體組成物治療後，復發性腫瘤生長可成功地使用本發明之抗體組成物來消除。此點已在實施例 22 中所述之臨床前研究中得到證實。復發性腫瘤與最初植入之腫瘤同樣有效地被消

除，此顯然表明此等腫瘤對本發明之抗體組成物的治療不具有抗性。

因此，在第一方面，本發明係關於一種用於治療已經接受涉及抗人類 EGFR 抗體之先前治療攝生法之個體的癌症之方法中的抗體組成物，該抗體組成物包含至少 2 種獨特的抗人類 EGFR 抗體分子，

a.其中第一獨特的抗 EGFR 抗體分子係選自由以下者所組成之群組：抗體 992、包含抗體 992 之 V_L 序列 (SEQ ID NO 72 之胺基酸 3-109) 及 V_H 序列 (SEQ ID NO 40 之胺基酸 3-124) 之抗體、具有抗體 992 之 CDR3 (SEQ ID NO 116 及 111) 之抗體、與抗體 992 結合相同抗原決定基之抗體、及能夠抑制抗體 992 與人類 EGFR 結合之抗體；且

b.其中第二獨特的抗 EGFR 抗體分子係選自由以下者所組成之群組：抗體 1024、包含抗體 1024 之 V_L 序列 (SEQ ID NO 73 之胺基酸 3-114) 及 V_H 序列 (SEQ ID NO 41 之胺基酸 3-120) 之抗體、具有抗體 1024 之 CDR3 (SEQ ID NO 120 及 114) 之抗體、與抗體 1024 結合相同抗原決定基之抗體、及能夠抑制抗體 1024 與人類 EGFR 結合之抗體。

在一項具體實例中，該先前治療攝生法涉及與該抗體組成物相同之抗體組成物。

在另一項具體實例中，該先前治療攝生法涉及選自由以下者所組成之群組的抗人類 EGFR 抗體：西妥昔單抗、帕尼單抗、紫妥木單抗、尼妥珠單抗、ICR62、mAb806、馬妥珠單抗、及能夠與任何此等抗體結合相同抗原決定基之

抗體。較佳地，該抗人類 EGFR 抗體係選自由以下者所組成之群組：西妥昔單抗、帕尼單抗、及紫妥木單抗以及能夠與任何此等抗體結合相同抗原決定基之抗體。更佳地，該抗人類 EGFR 抗體係選自由以下者所組成之群組：西妥昔單抗及帕尼單抗以及能夠與任何此等抗體結合相同抗原決定基之抗體。更佳地，該抗人類 EGFR 抗體為西妥昔單抗或能夠與西妥昔單抗結合相同抗原決定基之抗體。

該癌症可選自由以下者所組成之群組：頭頸部癌、結腸癌、乳癌、腎癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、神經膠質瘤、胰腺癌、膀胱癌、非小細胞肺癌 (non-small-cell-lung-carcinoma, NSCLC)、胃癌、子宮頸癌、肝細胞癌、胃食道癌、結腸直腸癌、直腸癌、上皮癌、RCC、頭頸部鱗狀細胞癌 (squamous cell carcinoma of the head and neck, SCCHN)、食道癌、多形性神經膠質母細胞瘤、鱗狀細胞癌、以及腎臟癌、黑色素瘤、癌瘤及肉瘤，如本文中所述。

該抗體治療可為繼手術及/或放射療法後之輔助療法。

該治療可為涉及用化學療法及/或至少一種酪胺酸激酶抑制劑及/或至少一種血管生成抑制劑及/或至少一種激素及/或至少一種分化誘導劑治療之組合療法。

該先前治療攝生法可為第一線療法、第二線療法或第三線療法。

該第一線療法可另外涉及用化學療法及/或至少一種酪胺酸激酶抑制劑及/或至少一種血管生成抑制劑及/或至少

一種激素及/或至少一種分化誘導劑之治療攝生法。

化學療法較佳包括投予選自由以下者所組成之群組的化學治療化合物：阿德力黴素 (adriamycin)、順鉑 (cisplatin)、紫杉醇 (taxol)、多柔比星 (doxorubicin)、拓朴替康 (topotecan)、氟嘧啶、奧沙利鉑、及伊立替康。

在本發明之一些具體實例中，該個體在先前治療攝生法期間或之後疾病有進展。在其他具體實例中，該個體在該先前治療攝生法之後疾病有進展。

該癌症可對先前治療攝生法具有抗性或部分抗性。

在另一個方面，本發明係關於一種用於治療癌症之方法中的抗體組成物，其中該癌症對使用至少一種選自由以下者所組成之群組的其他抗 EGFR 抗體之治療具有抗性或部分抗性：西妥昔單抗、帕尼單抗、紫妥木單抗、尼妥珠單抗、ICR62、mAb806、馬妥珠單抗、及能夠與任何此等抗體結合相同抗原決定基之抗體；該抗體組成物包含至少 2 種獨特的抗人類 EGFR 抗體分子，

a. 其中第一獨特的抗 EGFR 抗體分子係選自由以下者所組成之群組：抗體 992、包含抗體 992 之 V_L 序列 (SEQ ID NO 72 之胺基酸 3-109) 及 V_H 序列 (SEQ ID NO 40 之胺基酸 3-124) 之抗體、具有抗體 992 之 CDR3 (SEQ ID NO 116 及 111) 之抗體、與抗體 992 結合相同抗原決定基之抗體、及能夠抑制抗體 992 與人類 EGFR 結合之抗體；且

b. 其中第二獨特的抗 EGFR 抗體分子係選自由以下者所組成之群組：抗體 1024、包含抗體 1024 之 V_L 序列 (SEQ

ID NO 73 之胺基酸 3-114) 及 V_H 序列 (SEQ ID NO 41 之胺基酸 3-120) 之抗體、具有抗體 1024 之 CDR3 (SEQ ID NO 120 及 114) 之抗體、與抗體 1024 結合相同抗原決定基之抗體、及能夠抑制抗體 1024 與人類 EGFR 結合之抗體。

根據此方面，該組成物可用於第一線療法。

在此方面之其他具體實例中，該組成物用於繼涉及化學療法及/或至少一種酪胺酸激酶抑制劑及/或至少一種血管生成抑制劑及/或至少一種激素及/或至少一種分化誘導劑之治療攝生法後的第二線療法。該組成物亦可用於第三線療法。

該組成物可與化學療法及/或至少一種酪胺酸激酶抑制劑及/或至少一種血管生成抑制劑及/或至少一種激素及/或至少一種分化誘導劑一起用於組合療法。

在一些具體實例中，該組成物用作繼手術及/或放射療法後之輔助療法。

完全或部分的抗性較佳係藉由檢定自該個體分離之癌細胞樣本來判定。此檢定可包括量測西妥昔單抗、帕尼單抗、紫妥木單抗、尼妥珠單抗、ICR62、mAb806、馬妥珠單抗、及能夠與任何此等抗體結合相同抗原決定基之抗體與來自該個體之癌細胞的結合。不存在結合指示對抗體之抗性。或者，部分或完全抗性可以類似於實施例 21 中之檢定的增殖檢定來判定。

在其他相關方面中，本發明係關於：

- 一種降低 EGFR 傳訊之方法；

- 一種殺死表現 EGFR 之細胞的方法；
- 一種誘導表現 EGFR 之細胞凋亡的方法；
- 一種抑制表現 EGFR 之細胞增殖的方法；
- 一種誘導活體內腫瘤細胞分化之方法；及
- 一種誘導 EGFR 內化之方法，

該等方法包含向 EGFR 表現性細胞之組成物投予抗體組成物，該等細胞先前已經接受選自由以下者所組成之群組的抗 EGFR 抗體處理：西妥昔單抗、帕尼單抗、紫妥木單抗、尼妥珠單抗、ICR62、馬妥珠單抗、mAb806、及能夠與任何此等抗體結合相同抗原決定基之抗體，該抗體組成物係如本申請案中所述。

在其他方面，本發明係關於：

- 一種降低 EGFR 傳訊之方法；
- 一種殺死表現 EGFR 之細胞的方法；
- 一種誘導表現 EGFR 之細胞凋亡的方法；
- 一種抑制表現 EGFR 之細胞增殖的方法；
- 一種誘導活體內腫瘤細胞分化之方法；及
- 一種誘導 EGFR 內化之方法，

該等方法包含向 EGFR 表現性細胞之組成物投予抗體組成物，該等細胞對選自由以下者所組成之群組的抗 EGFR 抗體具有抗性或部分抗性：西妥昔單抗、帕尼單抗、紫妥木單抗、尼妥珠單抗、ICR62、馬妥珠單抗、mAb806、及能夠與任何此等抗體結合相同抗原決定基之抗體，該抗體組成物係如本申請案中所述。

對於本發明之此等方面，本發明之抗體組成物可為本文所述之任何組成物。較佳地，本發明之抗體組成物係如標題為較佳抗體組成物之章節中所述（亦即，如本文中所述之基於抗體 1024 及 992 的抗體組成物）。

定義

術語「抗體」描述血清之一種功能性組分且通常稱作一個分子集合（抗體或免疫球蛋白）或一種分子（抗體分子或免疫球蛋白分子）。抗體分子能夠與特定抗原決定子（抗原或抗原性抗原決定基）結合或反應，此又可導致引發免疫效應機制。個別抗體分子通常被視為具有單特異性，且抗體分子之組成物可為單株抗體（亦即，由相同抗體分子組成）或多株抗體（亦即，由兩種或兩種以上與相同抗原或甚至獨特、不同的抗原上之相同或不同抗原決定基反應的不同抗體分子組成）。各抗體分子均具有使其能夠與其相應抗原特異性結合之獨有結構，且所有天然抗體分子均具有相同總體基本結構：兩條相同輕鏈及兩條相同重鏈。抗體亦被統稱為免疫球蛋白。如本文中所使用之術語抗體亦意欲包括：嵌合及單鏈抗體；以及抗體之結合片段，諸如 Fab、Fv 片段或 scFv 片段；以及多聚形式，諸如二聚 IgA 分子或五價 IgM。抗體可為人類、鼠類、嵌合、人類化或改型（reshaped）抗體。

術語「同源 V_H 及 V_L 編碼對」描述相同的抗體產生細胞內所含有或來源於相同的抗體產生細胞之原始 V_H 及 V_L 編碼序列對。因此，同源 V_H 及 V_L 對代表最初存在於該類

細胞所源自之供體中之 V_H 及 V_L 配對。術語「由 V_H 及 V_L 編碼對表現之抗體」指示抗體或抗體片段係由含有 V_H 及 V_L 編碼序列之載體、質體或類似物產生。當同源 V_H 及 V_L 編碼對被表現為完全抗體或其穩定片段時，其保持最初由其所源自之細胞表現之抗體的結合親和力及特異性。同源對文庫亦稱為同源對之庫或集合，且可個別地保存或彙集。

術語「CDR」(互補決定區/complementarity determining region) 係如 Lefranc 等人，(2003) IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. Dev. Comp Immunol 27, 55-77 中所定義。

術語「重組多株蛋白質之獨特成員」表示包含不同但同源的蛋白質分子之蛋白質組成物中的一種蛋白質分子，其中各蛋白質分子與該組成物中之其他分子同源，而且含有一或多段可變多肽序列，其特徵在於在多株蛋白質之個別成員之間胺基酸序列有差異。

術語「頭接頭啟動子 (head-to-head promoter)」係指啟動子對係以極接近之方式置放以便使由該等啟動子驅動之兩個基因片段之轉錄在相反方向上發生。頭接頭啟動子亦可用介於兩個啟動子之間由不相關核酸所組成之填充片段 (stuffer) 建構。該類填充片段可易於含有多於 500 個的核苷酸。頭接頭啟動子亦可稱為雙向啟動子。

術語「免疫球蛋白」通常係用作存在於血液或血清中之抗體混合物的總稱，但亦可用於表示來源於其他來源之

抗體混合物。

術語「免疫球蛋白分子」表示個別抗體分子，例如作為免疫球蛋白之一部分，或任何多株或單株抗體組成物之一部分。

術語「所關注之變異核酸分子文庫」用於描述共同編碼「所關注之重組多株蛋白質」之核酸分子的集合。當用於轉染時，所關注之變異核酸分子文庫包含於表現載體文庫中。該類文庫典型地具有至少 2、3、5、10、20、50、1000、 10^4 、 10^5 或 10^6 個獨特成員。

術語「成群轉移 (mass transfer)」用於描述所關注之核酸序列自一載體群體轉移至另一載體群體，且對於各 DNA 同時如此進行而不藉助於所關注之個別 DNA 之分離。該等載體群體可為含有例如所關注之可變區、啟動子、前導序列或增強元件之文庫。此等序列可隨後在不預先自例如噬菌體載體分離之情況下移至哺乳動物表現載體中。尤其對於抗體序列，此技術確保在將文庫自例如選擇載體（例如噬菌體呈現載體）移至哺乳動物表現載體時不會失去 V_H 與 V_L 之間連接的多樣性。由此，保留 V_H 及 V_L 之初始配對。

如本文中所使用，術語「可操作地連接」係指一區段與另一區段在功能上相關時該區段係連接於該另一區段。舉例而言，編碼信號序列之 DNA 若表現為參與多肽向內質網之轉移的前導序列，則與編碼該多肽之 DNA 可操作地連接。又，啟動子或增強子若刺激編碼序列之轉錄，則與該序列可操作地連接。

術語「多株抗體」描述能夠與相同或不同抗原上之若干不同特異性抗原決定子結合或反應的不同抗體分子之組成物。通常認為多株抗體之可變性位於該多株抗體之所謂的可變區中。然而，在本發明之上下文中，多株性亦可理解為描述個別抗體分子之間的存在於所謂恆定區中之差異，例如在含有兩種或兩種以上抗體同型之抗體混合物的情況下，該等抗體同型諸如有人類同型 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2，或鼠類同型 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 及 IgA。出於本發明之目的，該類多株抗體亦可稱為「抗體組成物」。

術語「抗原決定基」常用於描述動物（較佳為哺乳動物且最佳為人類）體內具有抗原或免疫原活性之較大分子之部分或較大分子之一部分（例如抗原或抗原性位點）。具有免疫原活性之抗原決定基為可引發動物體內之抗體反應的較大分子之一部分。具有抗原活性之抗原決定基為較大分子中如藉由此項技術中熟知之任何方法（例如藉由本文所述之免疫檢定）所確定的可為抗體以免疫特異性方式所結合之一部分。抗原性抗原決定基並非必定需要具有免疫原性。抗原為可為抗體或抗體片段以免疫特異性方式所結合之物質，例如毒素、病毒、細菌、蛋白質或 DNA。除非抗原或抗原性位點極小，否則其通常具有一個以上的抗原決定基，且通常能夠刺激免疫反應。抗原決定基可為線性或構形抗原決定基。線性抗原決定基係由蛋白質分子上可為抗體所識別之約 6 至 10 個相鄰胺基酸組成。與此相反，

構形抗原決定基係由不按序排列之胺基酸組成。此處抗體僅可識別 3 維結構。當蛋白質分子摺疊成三維結構時，形成抗原決定基之胺基酸被並置以使抗體能夠識別該序列。在變性蛋白質中僅線性抗原決定基可被識別。根據定義，構形抗原決定基須位於摺疊蛋白質之外部。可識別構形抗原決定基之抗體可能僅在溫和、非變性的程序下結合。與同一抗原上之不同抗原決定基結合之抗體視抗原決定基之位置而定可對其所結合之抗原之活性具有不同效應。與抗原之活性位點中之抗原決定基結合的抗體可完全阻斷該抗原之功能，而結合於不同抗原決定基處之另一抗體可能僅對抗原活性具有極小影響或甚至無影響。然而，該等抗體仍可活化互補序列且從而消除抗原，且當與一或多種結合於同一抗原上之不同抗原決定基處之抗體組合時可產生協同效應。在本發明中，抗原決定基較佳為 EGFR 細胞外域之部分。本發明之抗原較佳為可為抗體或抗體片段以免疫特異性方式所結合之細胞外域 EGFR 蛋白質、多肽或其片段。EGFR 相關抗原亦可為可為抗體或抗體片段以免疫特異性方式所結合之 EGFR 多肽細胞外域或其片段的類似物或衍生物。

能夠互相競爭結合於同一抗原之抗體可結合相同或重疊抗原決定基或可具有彼此緊挨之結合位點，以便使競爭主要係由位阻引起。測定抗體之間的競爭之方法描述於實施例中。

如本文中所使用，術語「多株蛋白質」或「多株性」

係指包含不同但同源的蛋白質分子之蛋白質組成物，其中該等蛋白質分子較佳選自免疫球蛋白超家族。因此，各蛋白質分子與該組成物之其他分子同源，而且含有一或多段可變多肽序列，其特徵在於在多株蛋白質之個別成員之間胺基酸序列有差異。該等多株蛋白質之已知實例包括抗體或免疫球蛋白分子、T細胞受體及B細胞受體。多株蛋白質可由所定義之蛋白質分子子集組成，所述子集已由諸如對所需標靶之共有結合活性的共同特徵來定義，例如在針對所需靶抗原之多株抗體情況下。

「蛋白質」或「多肽」意謂任何胺基酸鏈，而不考慮長度或轉譯後修飾。蛋白質可以包含兩個或兩個以上經組裝之多肽鏈、蛋白質片段、多肽、寡肽或肽之單體或多聚體形式存在。

術語「RFLP」係指「限制性片段長度多形性」，一種在用限制酶裂解後分析核酸分子片段之遷移凝膠圖案之方法。

術語「不規則性 (scrambling)」描述以下情況：其中包含兩個不同多肽鏈之多株蛋白質之兩個或兩個以上獨特的成員（例如來自免疫球蛋白超家族）係自個別的細胞表現。此情況可在個別細胞將一對以上基因區段整合至基因組中時出現，其中各對基因區段編碼多株蛋白質之獨特成員。在該等情況下，可產生由該等基因區段表現之非預期的多肽鏈組合。此等非預期的多肽鏈組合可能不具有任何治療效應。

術語「 V_H - V_L 鏈不規則性」為以上定義之不規則性之一個實例。在此實例中， V_H 及 V_L 編碼基因區段構成一對基因區段。該不規則性在非預期之 V_H 與 V_L 多肽之組合係由細胞產生時出現，其中兩個不同 V_H 及 V_L 編碼基因區段對被整合至同一細胞中。該類不規則性抗體分子不太可能保留其初始特異性且因此可能不具有任何治療效應。

術語「轉染」在本文中係用作關於將外來 DNA 引入細胞中之廣義術語。該術語亦意欲涵蓋其他用於將外來 DNA 引入細胞中之功能上等效的方法，諸如轉型、感染、轉導或供體細胞與受體細胞之融合。

術語「可變多肽序列」及「可變區」可互換使用。

術語「獨特抗原決定基」意謂當兩種不同抗體結合獨特抗原決定基時，對於抗原結合，競爭率低於 100%，較佳為競爭率低於 50%，更佳為基本上無競爭。抗體對之「獨特抗原決定基」之分析典型的是在飽和抗體條件下利用結合實驗經由對表現 EGFR 之細胞及個別經螢光標記之抗體作 FACS 分析或如實施例中所述使用捕獲或結合於流動單元表面之 EGFR 抗原進行表面電漿共振分析而測定。

術語能夠「抑制 EGF 結合」當應用於一種抗體分子時意謂該抗體分子對於與 EGFR 結合之 EGF 展現的 IC₅₀ 值小於 10 nM，較佳小於 8 nM，更佳小於 7 nM，更佳小於 5 nM，更佳小於 4 nM，更佳小於 3 nM，更佳小於 2 nM，更佳小於 2 nM，更佳小於 1 nM。

術語「表皮生長因子受體」、「EGFR」及「EGFR 抗原」

在本文中可互換使用，且包括人類 EGFR 之變異體、同功異構物及物種同源物。在一項較佳具體實例中，本發明之抗體與 EGFR 抗原之結合藉由抑制或阻斷 EGFR 配位體與 EGFR 之結合而抑制表現 EGFR 的細胞（例如腫瘤細胞）之生長。術語「EGFR 配位體」涵蓋 EGFR 之所有（例如生理學）配位體，包括（但不限於）EGF、TGF- α 、結合肝素之 EGF（HB-EGF）、雙調蛋白（amphiregulin，AR）、和瑞古林（heregulin）、 β -細胞調節素（beta-celluli）及表皮調節素（epiregulin，EPI）。在另一項較佳具體實例中，本發明之抗體與 EGFR 抗原之結合介導表現 EGFR 之細胞的效應細胞吞噬及/或殺死。

EGFR 域結構：成熟 EGFR（SwissProt acc.#P00533）之細胞外部分由 621 個胺基酸及四個受體域組成：域 I 包涵殘基 1-165，域 II 包涵殘基 166-312，域 III 包涵殘基 313-481 且域 IV 包涵殘基 482-621（Cochran 等人，2004 J Immunol. Methods 287, 147-158）。已提出域 I 及域 III 有助於形成配位體之高親和力結合位點。域 II 及域 IV 為富含半胱胺酸之層黏連蛋白樣區域，其使蛋白質摺疊穩定且含有可能的 EGFR 二聚界面。

如本文中所使用，術語「抑制生長」（例如提及細胞）意欲意謂某一細胞當與抗 EGFR 抗體接觸時，與未與抗 EGFR 抗體接觸之相同細胞之生長相比，在增殖（細胞數目增加）或代謝方面有可量測之任何程度的減少，例如對細胞培養物之生長的抑制率達至少約 10%、20%、30%、40%、

50%、60%、70%、80%、90%、99%或100%。

如本文中所使用，術語「抑制結合」及「阻斷結合」（例如提及抑制/阻斷 EGFR 配位體與 EGFR 之結合）可互換使用且包涵部分與完全抑制/阻斷。抑制/阻斷 EGFR 配位體與 EGFR 結合較佳使在無抑制或阻斷之情況下 EGFR 配位體與 EGFR 結合時存在的正常程度或類型之細胞傳訊有所降低或改變。抑制及阻斷亦意欲意謂 EGFR 配位體在與抗 EGFR 抗體接觸時，與未與抗 EGFR 抗體接觸之狀況相比，在與 EGFR 之結合親和力方面有可量測之任何程度的降低，例如對 EGFR 配位體與 EGFR 結合之阻斷率達至少約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或100%。

術語「重組抗體」係用於描述由某一細胞或細胞系表現之一種抗體分子或若干種分子，其中該細胞或細胞系經包含不與該細胞天然相關的該抗體之編碼序列的表現載體轉染。

癌症：癌症（醫學術語：惡性贅瘤）為如下一類疾病，其中一組細胞顯示不受控制之生長（超過正常限度之分裂）、侵襲（侵擾及破壞相鄰組織）及有時的轉移（經由淋巴或血液擴散至體內其他位置）。癌症之此三種惡性性質使其有別於自限性、不會侵襲或轉移之良性腫瘤。大部分癌症形成腫瘤，但如白血病的一些癌症並非如此。癌症亦可稱為贅生性生長及過度增殖病症。

輔助療法：在初步治療後給予以用來提高治癒可能性

之治療。輔助療法可包括化學療法、放射療法、激素療法或生物學療法。

化學療法：用小分子藥物進行治療。

放射療法：用放射進行治療。

第一線療法：對疾病或病狀之最初治療。在癌症患者中，第一線療法可為手術、化學療法、放射療法、抗體療法或此等療法之組合。亦稱為初步療法及初步治療。

第二線療法：當初始治療（第一線療法）不起作用或停止發揮作用時所給予之治療。

第三線療法：當第二線療法不起作用或停止發揮作用時所給予之治療。

TKI：酪胺酸抑制劑抑制劑。

進展：在醫學中，疾病（諸如癌症）在其於體內惡化或擴散時之過程。

抗性癌症：對治療不起反應之癌症。該癌症可在開始治療時具有抗性或其可在治療期間變得具有抗性。亦稱為難治性癌症。與此對比，有效治療可使腫瘤根除。

部分抗性癌症：部分抗性癌症對治療起反應，但該治療並不能使腫瘤根除。在部分抗性癌症中，腫瘤生長可部分或完全受到抑制，但該腫瘤並不消退或消退僅僅為不明顯的。

對選自由西妥昔單抗、帕尼單抗、紫妥木單抗、尼妥珠單抗、ICR62、mAb425、馬妥珠單抗及能夠與任何此等抗體結合相同抗原決定基之抗體所組成之群組的抗 EGFR

抗體之抗性或部分抗性可在接受一或多種該等抗體之患者體內觀察到，或可在試管內檢定中（例如藉由測定 EGFR 之表現及由單株抗體無結合或結合較弱來確定）或在增殖檢定（諸如實施例 21 中所述）中量測出。

【實施方式】

抗體混合物

本發明係關於一種用於治療個體的癌症之方法中的抗體組成物，其中該個體已經接受涉及抗人類 EGFR 抗體之先前治療攝生法，或其中該癌症對至少一種其他抗 EGFR 抗體之治療具有抗性或部分抗性，該抗體組成物包含至少 2 種獨特的抗人類 EGFR 抗體分子。在本發明中，該至少 2 種獨特的抗人類 EGFR 抗體與非重疊抗原決定基結合。該等抗體之非重疊性質較佳係使用經不同標記之抗體對 EGFR 表現性細胞作 FACS 分析來確定，或藉由使用捕獲或結合於流動單元表面之 EGFR 抗原作表面電漿共振分析來確定。亦可使用如實施例中所述之基於 ELISA 之方法。結合兩個或兩個以上非重疊 EGFR 抗原決定基之組成物可用於對抗較寬範圍之 EGFR 依賴性癌症類型，此係因為與靶向一或兩個抗原決定基之單株抗體組成物相比，前者較不易受 EGFR 構形差異影響且不易受突變影響。此外，結合兩個或兩個以上非重疊 EGFR 抗原決定基之抗體組成物與靶向僅一個抗原決定基之組成物相比可提供優良的功效。詳言之，該抗體組成物可就活體內癌細胞終末分化而言提供優良的功效。對於單株抗 EGFR 抗體療法，特定比例之患者將不能有效地對

該抗體治療起反應。對於一些患者，此可能係歸因於該抗體之迅速清除或由於該抗體在患者體內產生針對該抗體之免疫反應。對於一些患者，缺乏反應可能係由於其特定 EGFR 依賴性癌症表現某一構形之 EGFR，此時單株抗體不能結合其抗原決定基。此可能係由於如下原因：糖基化差異、域缺失或突變及/或 SNP。

又，對於一些癌症，由癌細胞產生配位體引起之自分泌 EGFR 刺激具有重要性，而在其他情況下，由癌細胞所表現之 EGFR 無需配位體刺激。對於後面的癌症類型，能夠抑制配位體結合之抗體可能無效。

所含抗體能夠結合 EGFR 上之至少兩個獨特的抗原決定基之抗體組成物將會有更廣泛之應用，此係因為兩個抗原決定基相較於該等抗體所識別之抗原決定基皆發生改變之可能性得到減低。此外，所有抗體均被患者清除之可能性更小得多。在誘導癌細胞終末分化方面已藉由使用針對非重疊抗原決定基之兩種域 III 抗體而最明顯地顯示出優越性。該有效的抗體誘導之癌細胞終末分化先前未有報導，且其在設計有效的基於抗體之癌症療法方面代表一項重大進步。後來的結果顯示：類似或更優良之結果可使用兩種抗體之特定組合獲得。

為了改良臨床功效且拓寬針對較寬範圍之 EGFR 依賴性癌症類型的效用範圍，可增加組成物中之抗體種數。因此，組成物可包含能夠結合三個非重疊抗原決定基之抗體。組成物可包含能夠結合四個非重疊抗原決定基之抗

體。組成物可包含能夠結合五個非重疊抗原決定基之抗體。組成物可包含能夠結合六個非重疊抗原決定基之抗體。本申請案之實施例顯示至少六種獨特的抗體可同時與 EGFR 結合（實施例 3）。此並不排除可能或甚至宜藉由謹慎選擇抗體來設計包含能夠結合多於六個（諸如七個或八個）非重疊抗原決定基之抗體的組成物。

可存在有包括針對重疊抗原決定基之抗體的優勢，因為此可提高抗原決定基被結合之可能性。在此背後之一項基本原理為：在一些患者中及/或在一些癌細胞中，抗原決定基可能由於構形變化或突變或 SNP 而改變。雖然此可能影響一種抗體之結合，但其可能不影響結合重疊抗原決定基之另一抗體之結合。此外，存在以下風險：該等抗體中之一者由於其被視為抗原而被患者清除。藉由包括兩種結合不同但重疊的抗原決定基之抗體，可減少兩種抗體中之一者被清除的後果及抗原決定基突變的後果之發生。

已使用能夠結合兩個非重疊 EGFR 抗原決定基之抗體的特定組合而獲得優良結果。此等較佳之「兩種抗體」的組成物連同與如何設計本發明之抗體組成物有關之指導一起係在下文中作更詳細的描述。已有結果表明，與包含抗體 992、1030 及 1042 之三種抗體的組成物相比，當使用僅具有兩種抗體（992 及 1024）之組成物時可獲得類似或甚至改良之功效。由於抗體 1024 與 1042 屬於同一聚類（cluster），因此具有相同結合特異性，實際上，對於三種抗體的組成物所觀察到之結果（包括對終末分化之影響）可

歸因於組成物中僅有的兩種結合特异性（992 及 1024/1042）。

組成物之抗體可為具有非人類可變鏈與人類恆定鏈之嵌合抗體。非人類可變鏈可來自小鼠、大鼠、綿羊、豬、雞、非人類靈長類動物或其他合適的動物。為獲得全人類抗體，抗體可在具有人類抗體基因之轉殖基因動物體內產生。抗體亦可為所謂的人類化抗體，其中非人類 CDR 序列已被植入人類構架序列中。

較佳地，人類恆定鏈為 IgG1 或 IgG2 同型。更佳地，組成物中之所有抗體均具有相同同型以便於製造。然而，組成物中可能宜包括不同同型之抗體。

較佳地，本發明之抗體組成物包含能夠與選自由人類 EGFR、突變人類 EGFR 及人類 EGFR 之缺失變異體所組成之群組的 EGFR 結合之抗體。較佳地，抗體能夠結合人類與非人類靈長類 EGFR 兩者，以便其可在臨床實驗之前在相關毒理學研究中進行測試。較佳地，非人類靈長類動物為獼猴（食蟹獼猴（*Macaca fascicularis*））。

為支持以上所確定之使用結合兩個或兩個以上獨特的抗原決定基之抗體治療 EGFR 依賴性癌症的構想，本發明之發明人已鑑別、製造且特性化一系列針對 EGFR 之嵌合小鼠/人類抗體。已將此等嵌合抗體個別地及以混合物形式與現有技術水平之單株抗體（以爾必得舒TM及維克替比TM為例）進行對比。

表 1 展示個別嵌合抗體及與此等抗體有關之特徵的概

況。抗體編號為貫穿本申請案所使用之參考數字。特異性係針對抗體所結合之 EGFR 域，此如實施例 3 中所證實。 Δ EGFR 為抗體與 EGFR 突變體 (EGFRvIII) 結合之能力，此如實施例 1 中所述。獼猴 EGFR 為抗體結合獼猴 EGFR 之能力 (實施例 10)。EGF inhib 為抗體抑制 EGF 結合之能力 (實施例 4)。增殖為抗體抑制癌細胞系 (A431 及 HN-5) 增殖之能力 (實施例 6)。

表 1. 本發明之抗體

抗體編號	特異性	Δ EGFR	獼猴 EGFR	EGF inhib	增殖
992	域 III	不能/弱	能	能/弱	能
1030	域 III	能	能	能	能
1024	域 III	能	能		能
1042	域 III	弱	能	(能)	能
1277	域 III	能	能	能	HN5
1254	域 III	能	能	能	HN5
1208	域 III	能	能	能	能 HN5+/-992
1320	域 III	弱	不能	能	能
1257	域 I/II	不能	能	不能	能
1261	域 I	不能	能	不能	能
1229	非域 I/II	能	不能	不能	能 (A431)
1284	域 I	不能	能	能	能
1344	域 I/II	不能	能	nd	HN5 w/992
1260	域 I/II	不能	能	能	A431
1308	域 I	不能	能	nd	HN5 w/992
1347	域 I	不能	能	nd	HN5 w/992
1428	域 I 及 II	不能	能	能	HN5 w/992

根據使用嵌合抗體在增殖、結合、受體降解/失活及活動力檢定中以及在動物模型中作單獨及組合測試所產生的資料，可得出多個結論。

使用兩種癌細胞系 HN-5 及 A431 (實施例 6) 獲得之結

果已使用不同的癌細胞系（MDA-MB-468—乳癌細胞系；DU145—前列腺癌細胞系）進行重複。自此等實驗顯而易見，由本發明之發明人提供之抗體組合顯示針對極廣範圍之癌細胞系的功效，此支持抗體組成物針對一系列 EGFR 構形之功效。

亦已顯示在增殖檢定中抗體混合物之優勢在將生理學濃度之配位體（EGF）添加至生長培養基中時高於不添加 EGF 時（圖 17）。根據文獻（Hayashi 及 Sakamoto 1998 J Pharmacobiodyn 11;146-51），血清含有約 1-1.8 ng/ml 或 0.2-0.3 nM EGF，而胃液據報導含有 0.3 ng/ml（約 0.05 nM）（Pessonen 等人，1987 Life Sci. 40; 2489-94）。在活體內環境中，可能存在 EGF 及其他 EGFR 配位體，且因此，抗體混合物之能力在 EGFR 配位體存在下有效為本發明之抗體混合物之重要特徵。

本發明之嵌合小鼠/人類抗體在組合使用時提供比單獨使用時更佳之結果。此在若干實驗（參見例如實施例 6）中進行例示，在該等實驗中，當單獨測試時，抗體對癌細胞系（A431-NS）僅展示中度抗增殖效應，但在以任一組合使用時，展示顯著優良之結果。此等結果已使用本發明之嵌合抗體之多種組合得到證實。已使用包含抗體 992 及 1024 之組成物獲得尤其優良之結果。

舉例而言，若干抗體已與抗體 992、1208、1254 及 1277 中之任一者一起在使用 A431-NS 及 HN-5 之抗增殖檢定中進行了測試。

受體結合研究已顯示一些抗體可實際上刺激其他抗體之結合，以使得特定抗體在受體經一種或數種抗體飽和後以較高數量與該受體結合。針對域 III 之抗體 992 之結合明顯受益於藉由預先用一或多種結合非重疊抗原決定基之抗體來飽和受體所獲得之此協同效應。當相對於經結合非重疊抗原決定基之抗體飽和的 EGFR 測試針對未知抗原決定基之抗體 1396 時可見此協同效應之另一實例。

受體結合研究亦已顯示，有可能使至少 6 種抗體與 EGFR 細胞外域同時結合。此 6 種抗體為 3 種域 III 抗體、一種域 I 抗體、一種域 I/II 抗體及一種結合未知抗原決定基之抗體。有趣的是，三種域 III 抗體之結合似乎促進其他抗體之後續結合。此顯然支持提供具有若干結合獨特抗原決定基之抗體的抗體組成物之構想。

當設計針對 EGFR 之抗體組成物之組成物時，較佳使用針對非重疊抗原決定基之抗體，因為此等抗體可提供較高的協同效應。

EGFR 之域 III 對於配位體與受體之結合很重要。此外，與域 III 結合之抗體可穩定呈不會產生受體傳訊之束縛單體構形之 EGFR。因此，較佳的是抗體組成物含有至少兩種對域 III 具有特異性之抗體。較佳之域 III 抗體包括抗體 992、1024、1030、1208、1254、1277 及 1320。抗體組成物可較佳包含兩種以上域 III 抗體，諸如至少 3 種域 III 抗體，例如至少 4 種域 III 抗體，諸如至少 5 種域 III 抗體，例如至少 6 種域 III 抗體。

在另一項較佳具體實例中，抗體組成物包含至少一種域 I 抗體。較佳地，該至少一種域 I 抗體係選自由抗體 1284、1308、1344 及 1347 所組成之群組。更佳地，該至少一種域 I 抗體係選自由抗體 1284 及 1347 所組成之群組。

在另一項較佳具體實例中，抗體組成物包含至少一種域 I/II 抗體。較佳地，該至少一種域 I/II 抗體係選自由抗體 1257、1260、1261、1428 及 1434 所組成之群組。更佳地，該至少一種域 I/II 抗體係選自由抗體 1261 及 1260 所組成之群組。

具有三種抗體之較佳混合物包括：抗體 992+1320+1024；992+1024+1030；992+1255+1024；992+1024+1214；992+1024+1284；992+1024+1211；992+1024+1030。

具有四種抗體之較佳混合物包括：抗體 992+1320+1024+1030；992+1024+1030+1284。

具有五種抗體之較佳混合物包括：抗體 992+1030+1024+1260+1347；992+1030+1024+1261+1347；992+1030+1024+1261+1284。

一種具有八種抗體之較佳混合物包括：抗體 992+1030+1024+1277+1254+1320+1260+1261+1284+1347。

此外，為能夠對非人類靈長類動物進行毒理學研究，較佳的是組成物中之所有抗體均不僅與人類 EGFR 結合，而且與至少一種其他靈長類 EGFR 結合，該其他靈長類 EGFR 諸如黑猩猩 (chimpanzee)、恆河獼猴 (Macaca mulatta)、

恆河猴 (Rhesus monkey) 及其他猴類或獼猴之 EGFR。獼猴為相對較小之動物，且極其適合於毒理學研究。因此，其他靈長類 EGFR 較佳為獼猴 EGFR。較佳地，該等抗體以大致相同之親和力與人類及非人類靈長類 EGFR 結合。

本發明當在一種組成物中組合 2 種、3 種、4 種、5 種、6 種、7 種及 8 種抗體時在一或多個功能檢定中展示優良結果。雖然此等資料對組成物中抗體種數之選擇提供指導，但其決不應以限制性方式來解釋。儘管實驗資料僅展示 6 種抗體之同時結合，組成物亦可包含多於 8 種抗體。對於組成物中包括多於 6 種抗體，可能存在其他原因，諸如抗體成員之清除速率之差異。

組成物之抗體的另一較佳特徵為蛋白質均質性，因此可容易地純化該等抗體。對於個別抗體成員，為便於特性化，具有一個獨特峰之離子交換層析圖譜較佳。為便於特性化最終抗體組成物，清晰的離子交換層析圖譜亦較佳。當組合抗體時，亦較佳的是該等抗體可使用離子交換層析法來區分，以便使具有所有抗體之組成物可在一次操作中得以特性化。

該等抗體可來自任何來源，諸如人類、鼠類、兔、雞、豬、羊駝、綿羊。該等抗體亦可為如實施例中所述之嵌合抗體或可為使用此項技術中所述之熟知方法獲得之其人類化、超人類化或改型形式。

較佳抗體組成物

如隨附實施例中所示，基於抗體 992 及 1024 之抗 EGFR

組成物具有獨有且獨特之特性。抗體 992 之結合因包括 1024 之其他抗體之結合而增強。與市售抗體不同，992 與 1024 優先與細胞上所呈現之構形抗原決定基結合（實施例 14 及 15）。992 與 1024 之抗原決定基均與爾必得舒及維克替比抗原決定基重疊，但不同於爾必得舒及維克替比抗原決定基。與個別抗體與非重疊抗原決定基結合之若干種其他兩種抗體的組成物不同，基於抗體 992 及 1024 之結合特異性的組成物可迅速且有效地引發受體內化。在動物模型中在用基於抗體 992 及 1024 之抗體組成物處理後觀察到涉及伴有套膜蛋白（involucrin）表現增加及角質珠（keratin pearl）出現之終末分化的新穎作用機制。此獨有的作用機制導致試管內及活體內更有效且持續的生長抑制。此最明顯地見於活體內實施例中，其中腫瘤在終止治療後繼續減小。在接受爾必得舒之對照組中，腫瘤在終止治療後不久開始生長。此顯然指示不同的作用機制。

咸信該新穎作用機制係藉由使用由一種抗體組成物中之抗體 992 與 1024 所顯示之兩種結合特異性的組合達成。當使用不與抗體 992 及 1024 競爭之第三抗體時，例如在抗體 992、1024 與 1030 之三重組合中亦可觀察到此作用機制。

此等觀察結果使得可設計包含至少 2 種獨特的抗人類 EGFR 抗體分子之抗體組成物，其中第一獨特的抗 EGFR 抗體分子係選自由以下者所組成之群組：抗體 992、包含抗體 992 之 V_L 序列（SEQ ID NO 72 之胺基酸 3-109）及 V_H 序列（SEQ ID NO 40 之胺基酸 3-124）之抗體、具有抗體 992 之

CDR3 (SEQ ID NO 116 及 111) 之抗體、與抗體 992 結合相同抗原決定基之抗體及能夠抑制抗體 992 與人類 EGFR 結合之抗體；且其中第二獨特的抗 EGFR 抗體分子係選自由以下者所組成之群組：抗體 1024、包含抗體 1024 之 V_L 序列 (SEQ ID NO 73 之胺基酸 3-114) 及 V_H 序列 (SEQ ID NO 41 之胺基酸 3-120) 之抗體、具有抗體 1024 之 CDR3 (SEQ ID NO 120 及 114) 之抗體、與抗體 1024 結合相同抗原決定基之抗體及能夠抑制抗體 1024 與人類 EGFR 結合之抗體。

較佳地，該第一獨特的抗 EGFR 抗體分子係選自由以下者所組成之群組：抗體 992、包含抗體 992 之 V_L 序列及 V_H 序列之抗體、具有抗體 992 之 CDR3 之抗體及與抗體 992 結合相同抗原決定基之抗體；且該第二獨特的抗 EGFR 抗體分子係選自由以下者所組成之群組：抗體 1024、包含抗體 1024 之 V_L 序列及 V_H 序列之抗體、具有抗體 1024 之 CDR3 之抗體及與抗體 1024 結合相同抗原決定基之抗體。

本發明涵蓋抗體 992 及 1024 之 CDR3 序列的突變以提供具有相同結合特異性之抗體。因此，在一項具體實例中，具有與抗體 992 相同之結合特異性的抗體包含具有下式之 CDRH3：CTX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅W，其中 X₁ 至 X₁₅ 係個別地選自以下所列胺基酸之群：

X₁ = R 或 K；

X₂ = N、D、E 或 Q；

X₃ = G、A、V 或 S；

X₄ = D、E、N 或 Q；

$X_5 = Y、F、W$ 或 H ；

$X_6 = Y、F、W$ 或 H ；

$X_7 = V、I、L$ 或 A ；

$X_8 = S、T、G$ 或 A ；

$X_9 = S、T、G$ 或 A ；

$X_{10} = G、A、V$ 或 S ；

$X_{11} = D、E、N$ 或 Q ；

$X_{12} = A、G、V$ 或 S ；

$X_{13} = M、L、I$ 或 V ；

$X_{14} = D$ 或 E ；且

$X_{15} = Y$ 或 F ；

及由下式說明之 $CDRL3$ ： $CX_1X_2X_3X_4X_5X_6PPTF$ ，其中
 X_1 至 X_6 係個別地選自以下所列胺基酸之群：

$X_1 = Q$ 或 H ；

$X_2 = H、E$ 或 Q ；

$X_3 = Y、F、W$ 或 H ；

$X_4 = N、Q$ 或 H ；

$X_5 = T、S、G$ 或 A ；且

$X_6 = V、I、L$ 或 A 。

因此，在一項具體實例中，具有與抗體 1024 相同之結合特異性的抗體包含具有下式之 $CDRH3$ ：
 $CVX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}W$ ，其中 X_1 至 X_{11} 係個別地選自以下所列胺基酸之群：

$X_1 = R$ 或 K ；

$X_2 = Y、F、W$ 或 H ；

$X_3 = Y、F、W$ 或 H ；

$X_4 = G、A、V$ 或 S ；

$X_5 = Y、F、W$ 或 H ；

$X_6 = D、E、N$ 或 Q ；

$X_7 = E$ 或 D ；

$X_8 = A、G、V$ 或 S ；

$X_9 = M、L、I$ 或 V ；

$X_{10} = D、E、N$ 或 Q ；且

$X_{11} = Y$ 或 F ；

及由下式說明之 $CDRL3: CX_1X_2X_3X_4X_5X_6PX_7TF$ ，其中 X_1 至 X_7 係個別地選自以下所列胺基酸之群：

$X_1 = A、G$ 或 V ；

$X_2 = Q$ 或 H ；

$X_3 = N、Q$ 或 H ；

$X_4 = L、I、M$ 或 V ；

$X_5 = E、D、N$ 或 Q ；

$X_6 = L、I、M$ 或 V ；且

$X_7 = Y、F、W$ 或 H 。

具有突變 $CDR3$ 之抗體可使用標準技術來製備且可使用本文所述之方法加以表現並針對結合加以測試。

根據本發明之此方面之抗體可為嵌合、人類、人類化、改型或超人類化抗體。此可藉由使用此項技術中已知之方法來達成。舉例而言，抗體 992 及 1024 可使用實施例 18

中所述之方法來人類化。「超人類化」之方法描述於 US 6,881,557 中。

更佳地，該第一獨特的抗 EGFR 抗體分子係選自由以下者所組成之群組：抗體 992、包含抗體 992 之 V_L 序列及 V_H 序列之抗體及具有抗體 992 之 CDR3 之抗體；且該第二獨特的抗 EGFR 抗體分子係選自由以下者所組成之群組：抗體 1024、包含抗體 1024 之 V_L 序列及 V_H 序列之抗體及具有抗體 1024 之 CDR3 之抗體。

更佳地，該第一獨特的抗 EGFR 抗體分子係選自由以下者所組成之群組：抗體 992 及包含抗體 992 之 V_L 序列及 V_H 序列之抗體；且該第二獨特的抗 EGFR 抗體分子係選自由以下者所組成之群組：抗體 1024 及包含抗體 1024 之 V_L 序列及 V_H 序列之抗體。

最佳地，組成物包含抗體 992 及 1024。

正如所述，第一及第二抗 EGFR 抗體較佳不抑制彼此與人類 EGFR 之結合。甚至更佳的是，該等抗體中之至少一者能夠增強另一抗體對於人類 EGFR 之最大結合能力。對於抗體 992 及 1024 觀察到此效應（實施例 16）。

兩種抗體之間的比率不必精確地為 1:1 比率。因此，組成物中第一抗體相對於第二抗體之比例可介於 5% 與 95% 之間，諸如介於 10% 與 90% 之間，較佳介於 20% 與 80% 之間，更佳介於 30% 與 70% 之間，更佳介於 40% 與 60% 之間，諸如介於 45% 與 55% 之間，諸如為約 50%。

較佳地，第一及第二抗體為同型 IgG1 或 IgG2。

本發明之發明人鑑別出之與抗體 992 結合相同抗原決定基之抗體的實例為來自包含純系 1209、1204、992、996、1033 及 1220 之抗體聚類的抗體。

本發明之發明人鑑別出之與抗體 1024 結合相同抗原決定基之抗體的實例為來自包含純系 1031、1036、1042、984、1024、1210、1217、1221 及 1218 之抗體聚類的抗體。

CDR3 決定著抗體之結合特異性。在較佳具體實例中，包含抗體 992 之 CDR3 的抗體另外包含抗體 992 之 V_H 及 V_L 的 CDR1 及 CDR2。同樣，包含抗體 1024 之 CDR3 的抗體較佳另外包含抗體 1024 之 V_H 及 V_L 的 CDR1 及 CDR2。抗體之 CDR 序列可見於實施例 17 之表 12 中。

在其他具體實例中，與抗體 992 競爭之抗體係選自由抗體 1208、1254 及 1277 所組成之群組。同樣，與抗體 1024 競爭之抗體可選自由抗體 1042 及 1320 所組成之群組。

在一項具體實例中，組成物除該第一及第二抗體外不含有其他抗體，更佳為不含有其他抗 EGFR 抗體。

在其他具體實例中，組成物進一步包含第三獨特的抗 EGFR 抗體，其中該第三獨特的抗 EGFR 抗體分子係選自由以下者所組成之群組：抗體 1030、包含抗體 1030 之 V_L 序列 (SEQ ID NO 74 之胺基酸 3-113) 及 V_H 序列 (SEQ ID NO 42 之胺基酸 3-120) 之抗體、具有抗體 1030 之 CDR3 (SEQ ID NO 112 及 119) 之抗體、與抗體 1030 結合相同抗原決定基之抗體及能夠抑制抗體 1030 與人類 EGFR 結合之抗體。該第三抗體較佳使得該第一及/或該第二抗體與人類 EGFR

之結合增強。在一項具體實例中，組成物除該第一、該第二及第三抗體外不含有其他抗體，更佳為不含有其他抗 EGFR 抗體。

與抗體 1030 結合相同抗原決定基之抗體可選自由純系 1195、1030、1034、1194、980、981、1246 及 1223 所組成之抗體聚類。

包含抗體 1030 之 CDR3 的抗體可另外包含抗體 1030 之 V_H 及 V_L 的 CDR1 及 CDR2。

該等抗體可調配於一個容器中以供投藥。然而，其可個別地製造、純化且特性化，並以分裝部分之套組形式提供於 2 個或 3 個獨立容器中，其中每一容器中具有一種抗體。因此，其可同時、依次或單獨投予。

在另一個方面，將抗體 992 及 1024 之兩種結合特異性組合於一種雙特異性結合分子中。較佳地，該雙特異性結合分子包含抗體 992 及 1024 之 CDR，更佳為包含抗體 992 及 1024 之 V_H 及 V_L 序列。雙特異性結合分子可為如實施例 19 中所述之雙可變域抗體。亦可如文獻中所述設計呈雙特異性 Fab 片段、雙特異性 scFV 或雙功能抗體形式之雙特異性結合分子。

基於抗體 992 及 1024 之結合特異性的抗體組成物較佳引起一或多個以下結果：受體內化、活體內 A431NS 腫瘤消退、誘導活體內 A431NS 細胞終末分化及上調活體內腫瘤套膜蛋白表現。

本申請案提供具有與抗體 992 與 1024 之組合相同或類

似的效應之抗體的若干實例。此等抗體之實例包括自與該兩種抗體中之一種相同的免疫中獲得且屬於與該兩種抗體中之一種相同的聚類之抗體，及個別地與該兩種抗體中之一種競爭之抗體。具有相同或類似效應之抗體組成物可基於抗體 992 及 1024 之 V_L 序列及 V_H 序列以及基於該等抗體之 CDR，尤其此兩種抗體之 CDR3 加以設計。

具有相同或類似效應之其他抗體組成物可藉由基本上如實施例中所述進行免疫及篩選來製備。具有與抗體 992 及 1024 相同之結合特異性的抗體可如本文所述在兩個獨立競爭檢定中鑑別出來。最終，一種抗體可增強另一抗體之結合的抗體組成物可基本上如實施例 16 中所述藉由進行結合實驗來鑑別。可如實施例中所述就對受體內化、試管內及活體內功效、結合親和力等之影響對抗體組成物作進一步篩選。

本發明之抗體組成物之用途

為用於活體內治療及預防與 EGFR 表現（例如過度表現）相關之疾病，使用任何合適之投藥途徑（諸如注射及此項技術中已知之用於基於抗體之臨床產品的其他投藥途徑）向患者（例如人類個體）以治療有效劑量（例如可引起表現 EGFR 之腫瘤細胞之生長抑制、吞噬、活動力降低、終末分化及/或可殺死該等腫瘤細胞之劑量）投予本發明之抗體。

可用本發明之抗體來治療、改善及/或預防之典型 EGFR 相關疾病包括（但不限於）自體免疫疾病及癌症。舉例而

言，可被治療、改善及/或預防之癌症包括膀胱癌、乳癌、子宮/子宮頸癌、結腸癌、腎癌、卵巢癌、前列腺癌、腎細胞癌、胰腺癌、結腸癌、直腸癌、胃癌、鱗狀細胞癌、肺（非小細胞）癌、食道癌、頭頸部癌、皮膚癌。可被治療之自體免疫疾病包括例如牛皮癬。

在另一項具體實例中，本發明係關於一種治療、改善及/或預防以下疾病之方法：神經膠質母細胞瘤，包括多形性神經膠質母細胞瘤；星形細胞瘤，包括兒童星形細胞瘤；神經膠質瘤；神經母細胞瘤；胃腸道之神經內分泌腫瘤；支氣管肺泡癌；濾泡狀樹突細胞肉瘤；唾液腺癌；絨膜母細胞瘤；惡性周邊神經鞘腫瘤；內分泌胰腺腫瘤；或睪丸生殖細胞腫瘤，包括精原細胞瘤、胚胎癌、卵黃囊瘤、畸胎瘤及絨膜癌。

可變重鏈及可變輕鏈編碼對之分離及選擇

產生抗 EGFR 重組抗體組成物之方法包括自合適之來源分離編碼可變重鏈（ V_H ）及可變輕鏈（ V_L ）之序列，從而產生 V_H 及 V_L 編碼對之庫。通常，獲得 V_H 及 V_L 編碼序列之合適來源為含有淋巴細胞之細胞部分，諸如來自用人類 EGFR 多肽或肽、或用來源於表現人類 EGFR 之細胞的 EGFR 蛋白質或用表現人類 EGFR 之細胞或該等細胞之部分免疫/接種之非人類動物的血液、脾臟或骨髓樣本。較佳地，自具有人類免疫球蛋白基因之非人類哺乳動物或轉殖基因動物收集含有淋巴細胞之部分。所收集之含有淋巴細胞之細胞部分可經進一步富集以獲得特定淋巴細胞群體，例如 B

淋巴細胞譜系之細胞。較佳地，使用磁珠細胞分選 (magnetic bead cell sorting, MACS) 及 / 或 螢光活化細胞分選 (fluorescence activated cell sorting, FACS)，利用例如 B 細胞、漿母細胞及 / 或 漿細胞之譜系特異性細胞表面標記蛋白質執行富集。較佳地，針對 B 細胞、漿母細胞及 / 或 漿細胞富集或分選含有淋巴細胞之細胞部分。甚至更佳地，自脾臟或血液分離具有 CD43 及 CD138 之高度表現之細胞。此等細胞有時稱為循環漿細胞、早期漿細胞或漿母細胞。為方便起見，在本發明中僅將其稱為漿細胞，不過亦可互換地使用其他術語。

V_H 及 V_L 編碼序列之分離可以傳統方式執行，其中將 V_H 及 V_L 編碼序列隨機組合於載體中以產生 V_H 及 V_L 編碼序列對之組合文庫。然而，在本發明中，較佳的是反映出在 EGFR 免疫後於體液免疫反應中產生之抗體的多樣性、親和力及特異性。此包括保持最初存在於供體中之 V_H 及 V_L 配對，從而產生序列對之庫，其中各對編碼對應於最初存在於由可分離出該等序列之供體產生的抗體中之 V_H 及 V_L 對的可變重鏈 (V_H) 及可變輕鏈 (V_L)。此亦稱為 V_H 及 V_L 編碼序列之同源對且該抗體被稱為同源抗體。較佳地，本發明之組合的或同源的 V_H 及 V_L 編碼對係自小鼠供體獲得，且因此該等序列為鼠類序列。

對於產生 V_H 及 V_L 編碼序列之同源對，存在有若干種不同方法，一種方法包括自由含有淋巴細胞之細胞部分分選出之單細胞擴增且分離 V_H 及 V_L 編碼序列。為獲得類似

於供體中 V_H 及 V_L 序列對之多樣性的 V_H 及 V_L 編碼序列對之庫，使 V_H 及 V_L 對之不規則性（隨機組合）儘可能小的高通量方法較佳，例如如 WO 2005/042774（以引用的方式併入本文中）中所述。

V_H 及 V_L 編碼序列可經單獨擴增且在第二步驟中配對，或其可在擴增期間配對（Coronella 等人，2000. *Nucleic Acids Res.* 28 : E85；Babcook 等人，1996. *PNAS* 93 : 7843-7848 及 WO 2005/042774）。第二種方法包括 V_H 及 V_L 編碼序列之細胞內擴增及配對（Embleton 等人，1992. *Nucleic Acids Res.* 20 : 3831-3837；Chapal 等人，1997. *BioTechniques* 23 : 518-524）。第三種方法為選擇淋巴細胞抗體法（selected lymphocyte antibody method, SLAM），其組合溶血空斑檢定與 V_H 及 V_L cDNA 之選殖（Babcook 等人，1996. *PNAS* 93:7843-7848）。可與小鼠配合使用之另一方法為標準融合瘤技術，繼而篩選及選擇優勢候選者（lead candidate）且隨後選殖所編碼之抗體。

在本發明之一較佳具體實例中，成員對反映負責由 EGFR 免疫產生之體液免疫反應之基因對的 V_H 及 V_L 編碼對之庫係根據包含以下步驟之方法產生：i) 提供來自經人類 EGFR 免疫之動物供體的含有淋巴細胞之細胞部分；ii) 視情況自該細胞部分富集 B 細胞或漿細胞；iii) 獲得經分離單細胞之群體，其包含將細胞自該細胞部分個別地分配至複數個器皿中；iv) 以多路重疊延伸 RT-PCR 程序，使用來源於該等經分離單細胞之模板擴增 V_H 及 V_L 編碼對且實現

V_H 及 V_L 編碼對之連接；及 v) 視情況進行已連接之 V_H 及 V_L 編碼對之巢式 PCR (nested PCR)。較佳地，使該等經分離之同源 V_H 及 V_L 編碼對經受如下所述之篩選程序。

一旦產生 V_H 及 V_L 序列對後，隨即進行篩選程序以鑑別出編碼針對 EGFR 相關抗原具有結合活性之 V_H 及 V_L 對的序列。較佳地，該 EGFR 相關抗原包含 EGFR 之細胞外部分，諸如域 III、II、I 及/或 IV，該等域之片段或完整細胞外域。其他抗原包括突變體，諸如 EGFR 或 SNP 之缺失突變體，或其片段。若 V_H 及 V_L 序列對為組合的，則可在篩選之前應用噬菌體呈現程序來富集編碼與 EGFR 結合之抗體片段的 V_H 及 V_L 對。

為反映出在經 EGFR 免疫後於體液免疫反應中產生之抗體的多樣性、親和力及特異性，本發明已開發出一種用於同源對之篩選程序，以便獲得儘可能最廣泛的多樣性。出於篩選目的，使用已轉染至合適宿主細胞中之細菌或哺乳動物篩選載體使同源 V_H 及 V_L 編碼對之庫個別地表現為抗體片段（例如 scFv 或 Fab）或全長抗體。可針對（但不限於）以下方面篩選 Fab/抗體之庫：對 EGFR 之活性、針對表現 EGFR 之癌細胞系的抗增殖活性以及抑制配位體（例如 EGF）與 EGFR 結合之能力、抑制磷酸化、誘導凋亡、EGFR 內化。

同時，針對諸如人類及視情況存在之獼猴或黑猩猩或恆河猴 EGFR 肽之選定抗原篩選 Fab/抗體之庫。該等抗原肽可例如選自人類 EGFR 細胞外域、人類突變 EGFR 細胞外

域及獼猴 EGFR 細胞外域或其片段。該等肽可生物素化以有利於在篩選期間固定於珠粒或板上。亦可使用替代性固定方法。基於 EGFR 生物學知識選擇抗原且可提供能夠與此等抗原潛在結合之預期中和及/或保護效應抗體。此篩選程序同樣可應用於組合噬菌體呈現文庫。

用於篩選之重組 EGFR 蛋白質可表現於細菌、昆蟲細胞、哺乳動物細胞或另一合適之表現系統中。出於正確加工（包括糖基化）之目的，使該等蛋白質表現於哺乳動物細胞中。EGFR-ECD 蛋白質可表現為可溶性蛋白質（無跨膜區及細胞內區域）或其可與第三蛋白質融合，以增強穩定性。若 EGFR 蛋白質與融合標籤一起被表現，則該融合搭配物可能在篩選之前發生裂解。除上述初級篩選外，可執行二級篩選，以便確保所選序列均不編碼假陽性。

通常，免疫檢定適用於本發明中所執行之篩選。該等檢定在此項技術中係熟知的且構成例如 ELISPOT、ELISA、FLISA、膜檢定（例如西方墨點法（Western blot））、過濾器上之陣列（array on filter）及 FACS。或者可在無任何預先富集步驟之情況下，利用由編碼 V_H 及 V_L 對之序列產生之多肽執行該等檢定。倘若 V_H 及 V_L 編碼對之庫為同源對，則在篩選之前無需藉由例如噬菌體呈現進行富集。然而，在篩選組合文庫時，免疫檢定較佳與富集方法組合執行或在富集方法之後執行，該等富集方法諸如噬菌體呈現、核糖體呈現、細菌表面呈現、酵母呈現、真核病毒呈現、RNA 呈現或共價呈現（於 FitzGerald, K., 2000. Drug Discov.

Today 5, 253-258 中有所評論)。

通常使篩選中所選出之 V_H 及 V_L 對編碼序列經受定序，且對可變區多樣性進行分析。尤其關注 CDR 區域之多樣性，而且關注 V_H 及 V_L 家族表現 (family representation)。基於此等分析，選出編碼 V_H 及 V_L 對之序列，其中該等 V_H 及 V_L 對代表自一或多個動物供體分離之 EGFR 結合抗體之總體多樣性。較佳地，選出在所有 CDR 區域 (CDRH1、CDRH2、CDRH3 以及 CDRL1、CDRL2 及 CDRL3) 中均具有差異之序列。若存在具有一或多個相同或極類似的 CDR 區且屬於不同 V_H 或 V_L 家族之序列，則亦將此等序列選出。較佳地，在所選序列對之中，至少可變重鏈之 CDR3 區域 (CDRH3) 不同。可能地， V_H 及 V_L 序列對之選擇可嚴格地基於 CDRH3 區之可變性而進行。在序列之啟動及擴增期間，在可變區之構架區中 (尤其在第一構架區中) 可能發生突變。較佳地，校正第一構架區中發生之錯誤，以便確保序列與生殖系來源之序列完全或至少 98% 一致，例如使得 V_H 及 V_L 序列為完全鼠類序列。

當確保所選之編碼 V_H 及 V_L 對之序列的集合之總體多樣性高度代表遺傳層面上在對 EGFR 免疫之體液反應中所見之多樣性時，可預期由所選 V_H 及 V_L 編碼對之集合表現之抗體的總體特異性亦可代表 EGFR 免疫動物體內所產生之抗體的特異性。由所選 V_H 及 V_L 編碼對之集合表現之抗體的特異性是否代表由供體產生之抗體的特異性之標誌可藉由將供體血液對所選抗原之抗體力價與由所選 V_H 及 V_L

編碼對之集合表現之抗體的特異性進行比較來獲得。此外，可對由所選 V_H 及 V_L 編碼對之集合表現之抗體的特異性作進一步分析。特異性程度與可偵測到結合活性之不同抗原的數目有關。在本發明之另一項具體實例中，由所選 V_H 及 V_L 編碼對之集合表現之個別抗體的特異性係藉由抗原決定基定位來分析。

抗原決定基定位可藉由多種方法執行，該等方法不一定互相排斥。一種定位抗體分子之抗原決定基特異性的方法為評估與來源於靶抗原之一級結構的不同長度之肽的結合。該等肽既可為線性肽，又可為構形肽，且可用於多種檢定格式中，該等檢定格式包括 ELISA、FLISA 及表面電漿共振 (SPR, Biacore, FACS)。此外，該等肽可使用可用序列及結構資料來作出合理選擇以代表例如靶抗原之細胞外區或保守區，或可設計為代表所選部分抗原或全部抗原之一組重疊肽 (Meloan RH, Puijk WC, Schaaper WMM. Epitope mapping by PEPSCAN. Immunology Methods Manual, Iwan Lefkovits 編, 1997, Academic Press, 第 982-988 頁)。抗體純系針對一或多種該等肽之特定活性通常為抗原決定基特異性之標誌。然而，在許多情況下，肽為由針對蛋白質抗原產生之抗體識別之抗原決定基的不良模擬物，此既歸因於缺乏天然或特定構形，而且亦歸因於相較於抗體及肽，抗體與蛋白質抗原之間的相互作用之包埋表面積 (buried surface area) 通常較大。允許確定直接針對蛋白質抗原之特異性的第二種抗原決定基定位方法係

藉由使用現有、明確確定之抗體選擇性地遮蔽抗原決定基而進行。繼阻斷後第二探測抗體與抗原之結合減少通常指示共有或重疊抗原決定基。藉由選擇性遮蔽來進行抗原決定基定位可藉由多種免疫檢定法執行，該等免疫檢定法包括（但不限於）此項技術中所熟知之 ELISA 及 Biacore（例如 Ditzel 等人，1997. J. Mol. Biol. 267:684-695；Aldaz-Carroll 等人，2005. J. Virol. 79：6260-6271）。另一種確定抗 EGFR 抗體之抗原決定基特異性的潛在方法為在抗體存在下選擇逃避突變體（escape mutant）。此可例如使用丙胺酸掃描來執行。所關注之來自該等逃避突變體之基因的定序通常可揭示抗原中之何種胺基酸對於抗體識別很重要且因此構成抗原決定基（之一部分）。

由所選 V_H 及 V_L 編碼對製造抗 EGFR 抗體組成物

本發明之抗體組成物可在一或數個生物反應器或其等效物中由多株表現細胞系製得。按照此方法可將抗 EGFR 抗體以單一製劑形式自反應器中純化出來而不必在處理期間分離構成抗 EGFR 抗體組成物之個別成員。若抗體組成物係在一個以上生物反應器中製備，則經純化之抗 EGFR 抗體組成物可藉由彙集自各生物反應器之經個別純化的上清液獲得之抗體而獲得。

一種製備重組抗體組成物之方法描述於 WO 2004/061104 及 WO 2006/007850（此等參考文獻係以引用的方式併入本文中）中。其中所述之方法係以將抗體編碼序列位點特異性地整合至個別宿主細胞之基因組中為基礎，

從而確保在製備期間 V_H 及 V_L 蛋白質鏈得以保持其初始配對。此外，該位點特異性整合使位置效應最小化且因此可預期多株細胞系中之個別細胞之生長及表現特性極其類似。一般而言，該方法涉及以下項：i) 具有一或多個重組酶識別位點之宿主細胞；ii) 具有至少一個重組酶識別位點與宿主細胞之重組酶識別位點相容的表現載體；iii) 藉由將所選 V_H 及 V_L 編碼對自篩選載體轉移至表現載體以使得全長抗體或抗體片段可由該載體表現（若篩選載體與表現載體相同則該類轉移可為不必要的）來產生表現載體之集合；iv) 用該表現載體集合及編碼重組酶之載體轉染宿主細胞，其中該重組酶能夠組合宿主細胞基因組中之重組酶識別位點與表現載體中之重組酶識別位點；v) 自該經轉染之宿主細胞獲得/產生多株細胞系；及 vi) 由該多株細胞系表現抗體組成物且進行收集。

若對於一種組成物使用少數種類(2-3 種或 2-3 種以上)的抗體，則其可以類似於製造單株抗體之方式個別地加以表現且純化，例如如 WO 2004/085474 中所述。該等經純化之抗體可在純化後混合或包裝於獨立小瓶中以供在投藥之前混合或用於單獨投藥。

較佳地，使用哺乳動物細胞，諸如 CHO 細胞、COS 細胞、BHK 細胞、骨髓瘤細胞（例如 Sp2/0 或 NS0 細胞）、纖維母細胞（諸如 NIH 3T3）及不朽化人類細胞（諸如海拉細胞（HeLa cell）、HEK 293 細胞或 PER.C6）。然而，亦可使用非哺乳動物真核或原核細胞，諸如植物細胞、昆蟲細胞、

酵母細胞、真菌、大腸桿菌 (*E. coli*) 等。合適之宿主細胞在其基因組中包含一或多個合適之重組酶識別位點。宿主細胞亦應含有與整合位點可操作地連接之選擇模式，以便能夠對整合物（亦即，在整合位點處具有抗 EGFR Ab 表現載體或表現載體片段之整合複本的細胞）進行選擇。在基因組之預定位置處具有 FRT 位點之細胞的製備描述於例如 US 5,677,177 中。較佳地，宿主細胞僅具有單個整合位點，其位於使整合物能夠高度表現之位點（所謂熱點 (hot-spot)）處。

合適之表現載體包含匹配宿主細胞之重組酶識別位點之重組識別位點。較佳地，該重組酶識別位點與不同於用於建構宿主細胞之選擇基因的合適選擇基因連接。選擇基因在此項技術中係熟知的，且包括麩胺醯胺合成酶基因 (GS)、二氫葉酸還原酶基因 (DHFR) 及新黴素 (neomycin)，其中 GS 或 DHFR 可用於所插入之 V_H 及 V_L 序列的基因擴增。該載體亦可含有兩個不同的重組酶識別位點，以允許抗體編碼序列之重組酶介導之匣式交換 (recombinase-mediated cassette exchange, RMCE) 代替載體之完全整合。RMCE 描述於 (Langer 等人, 2002; Schlake 及 Bode 1994) 中。合適之重組酶識別位點在此項技術中係熟知的，且包括 FRT、lox 及 attP/attB 位點。較佳地，整合載體為同型編碼載體，其中恆定區（較佳包括內含子）在自篩選載體轉移 V_H 及 V_L 編碼對之前存在於該整合載體中（或若對全長抗體執行篩選，則恆定區已存在於篩選載體

中)。存在於載體中之恆定區可為整個重鏈恆定區 (CH_1 至 CH_3 或至 CH_4) 或編碼抗體之 Fc 部分之恆定區 (CH_2 至 CH_3 或至 CH_4)。在轉移之前亦可存在輕鏈 κ 或 λ 恆定區。恆定區 (若存在) 數目之選擇視所使用之篩選及轉移系統而定。重鏈恆定區可選自同型 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgD 及 IgE。較佳同型為 IgG1、IgG2 及 / 或 IgG3。此外，用於抗 EGFR 抗體編碼核酸的位點特異性整合之表現載體含有指導 V_H 及 V_L 鏈中之每一者之高量表現的合適啟動子或等效序列。圖 4 說明一種設計表現載體之可能方式，不過亦可能存在多種其他設計。

自篩選載體轉移所選 V_H 及 V_L 編碼對可藉由習知限制酶裂解及接合來執行，以使得各表現載體分子含有一個 V_H 及 V_L 編碼對。較佳地， V_H 及 V_L 編碼對係個別地被轉移，然而必要時，其亦可整體地被轉移。當所有所選 V_H 及 V_L 編碼對均轉移至表現載體中時，獲得表現載體之集合或文庫。必要時，亦可使用替代性轉移方法。若篩選載體與表現載體相同，則表現載體之文庫係由篩選期間所選出之 V_H 及 V_L 序列對構成，該等 V_H 及 V_L 序列對位於篩選/表現載體中。

將核酸序列轉染至宿主細胞中之方法在此項技術中係已知的。為確保位點特異性整合，亦必須向宿主細胞提供合適之重組酶。此較佳係藉由共轉染編碼重組酶之質體來實現。合適之重組酶為例如 Flp、Cre 或噬菌體 Φ C31 整合酶，其與具有相應重組酶識別位點之宿主細胞/載體系統一

起使用。宿主細胞可成批地被轉染，此意謂以單一反應將表現載體之文庫轉染至細胞系中，從而獲得多株細胞系。或者，可將表現載體之集合個別地轉染至宿主細胞中，從而產生個別細胞系之集合（各細胞系產生具有特定特異性之抗體）。隨後針對位點特異性整合物對轉染後產生之細胞系（個別或多株）進行選擇，且使其適合於生長於懸浮液及無血清培養基中，此係在該等細胞系在轉染之前尚未具有該等特性時進行。若個別地執行轉染，則進一步對個別細胞系之生長特性及抗體產生進行分析。較佳地，選擇具有類似增殖速率及抗體表現量之細胞系以供產生多株細胞系。隨後藉由以預定比率混合個別細胞系來產生多株細胞系。一般而言，由該多株細胞系製得多株主細胞庫（polyclonal master cell bank, pMCB）、多株研究細胞庫（polyclonal research cell bank, pRCB）及/或多株工作細胞庫（polyclonal working cell bank, pWCB）。多株細胞系係藉由以預定比率混合個別細胞系來產生。將多株細胞系分配至安瓿中，從而產生多株研究細胞庫（pRCB）或多株主細胞庫（pMCB），多株工作細胞庫（pWCB）可由 pRCB 或 pMCB 藉由擴增研究或主細胞庫之細胞而產生。研究細胞庫主要用於構想研究之證明，其中多株細胞系可能不包含與主細胞庫中之多株細胞系同樣多之個別抗體。通常，進一步擴增 pMCB 以製備用於製造目的之 pWCB。在 pWCB 用完後，可擴增來自 pMCB 之新安瓿以製備新 pWCB。

本發明之一項具體實例為能夠表現本發明之重組抗

EGFR 抗體組成物的多株細胞系。

本發明之另一項具體實例為各個別細胞能夠表現單一 V_H 及 V_L 編碼對之多株細胞系，且該多株細胞系整體上能夠表現 V_H 及 V_L 編碼對之集合，其中各 V_H 及 V_L 對編碼抗 EGFR 抗體。較佳地， V_H 及 V_L 編碼對之集合為根據本發明之方法產生之同源對。

本發明之重組抗體組成物可藉由將來自 pWCB 之一個安瓿在適當培養基中培養允許抗體充分表現且多株細胞系能保持穩定之一段時間（範圍大致介於 15 日與 50 日之間）來製備。可使用諸如補料分批或灌注之培養法。重組抗體組成物係自培養基獲得且藉由習知純化技術來純化。對於 IgG 之純化常常使用與諸如離子交換層析法、疏水相互作用及凝膠過濾之後續純化步驟組合之親和力層析法。在純化之後，例如藉由離子交換層析法評估多株抗體組成物中所有個別成員之存在。該類抗體組成物之特性化詳細描述於 WO 2006/007853（以引用的方式併入本文中）中。

在重組宿主中表現抗體混合物之替代方法描述於 WO 2004/009618 中。此方法自單一細胞系產生具有與同一輕鏈結合之不同重鏈之抗體。若由組合文庫產生抗 EGFR 抗體組成物，則此方法可為適用的。

治療組成物

本發明之另一個方面為一種包含本發明之抗 EGFR 抗體組成物或抗 EGFR 重組 Fab 或另一抗 EGFR 重組抗體片段組成物或雙特異性結合分子作為活性成份的醫藥組成物。

較佳地，該類組成物之活性成份為如本發明中所述之抗 EGFR 重組抗體組成物。該等組成物意欲用於改善及/或預防及/或治療癌症。較佳地，向人類、家畜或寵物投予該醫藥組成物。

醫藥組成物進一步包含醫藥學上可接受之賦形劑。

抗 EGFR 抗體組成物或其抗體片段可以於醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑中之單位劑型投予。可使用習用醫藥操作法來提供適合於投予癌症患者之調配物或組成物。在一項較佳具體實例中，投藥為治療性的，此意謂在已診斷出癌症病狀後投藥。可使用任何合適之投藥途徑，例如投藥方式可為非經腸、靜脈內、動脈內、皮下、肌肉內、腹膜內、鼻內、氣溶膠、栓劑或經口投藥。舉例而言，醫藥調配物可呈液體溶液或懸浮液形式。對於口服投藥而言，需要防止胃內降解。對於鼻內調配物而言，抗體可以散劑、滴鼻劑或氣溶膠形式投予。

本發明之醫藥組成物係以本身已知之方式製備，例如藉助於習知溶解、凍乾、混合、造粒或調製方法來達成。該等醫藥組成物可根據習用醫藥操作法（參看例如，Remington: The Science and Practice of Pharmacy (第 20 版), A.R. Gennaro 編，2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, J. Swarbrick 及 J. C. Boylan 編，1988-1999, Marcel Dekker, New York, NY) 調配。

較佳地，使用活性成份之溶液或懸浮液，且尤其使用

其等張水性溶液或懸浮液來製備本發明之醫藥組成物。在僅包含活性成份或包含活性成份以及載劑（例如甘露糖醇）之凍乾組成物的情況下，若有可能，則可在使用之前製備該等溶液或懸浮液。該等醫藥組成物可經滅菌且/或可包含賦形劑，例如防腐劑、穩定劑、濕潤劑及/或乳化劑、增溶劑、用於調節滲透壓之鹽及/或緩衝劑，且係以本身已知之方式製備，例如藉助於習知溶解或凍乾方法來達成。該等溶液或懸浮液可包含增黏物質，諸如羧甲基纖維素鈉、羧甲基纖維素、聚葡萄糖、聚乙烯吡咯啉酮或明膠。

注射組成物係以慣用方式在無菌條件下製備；該等無菌條件亦應用於將組成物引入安瓿或小瓶中及密封容器。

醫藥組成物包含約 1% 至約 95%、較佳約 20% 至約 90% 之活性成份。本發明之醫藥組成物可例如呈單位劑型，諸如呈安瓿、小瓶、栓劑、錠劑、丸劑或膠囊之形式。調配物可以治療或預防有效量（例如可預防、消除或降低病理學病狀之量）向人類個體投予以提供對疾病或病狀之治療。欲投予之治療劑之較佳劑量可能視諸如以下之變數而定：癌症之嚴重程度、特定患者之總體健康狀況、化合物賦形劑之調配及其投藥途徑。

本發明之組成物之治療性用途

本發明之醫藥組成物可用於治療或改善哺乳動物之疾病。可用本發明之醫藥組成物進行治療或預防的狀況包括預防及治療患者癌症，其較佳可用本發明之醫藥組成物進行治療性治療。

本發明之一項具體實例為一種預防、治療或改善哺乳動物之一或多種與癌症有關之症狀的方法，其包含向該哺乳動物投予有效量之本發明之抗 EGFR 重組抗體組成物。

本發明之另一項具體實例為一種本發明之抗 EGFR 重組抗體組成物之用途，其係用於製備用以治療、改善或預防哺乳動物之一或多種與癌症有關之症狀的組成物。

較佳地，上述具體實例中之哺乳動物為人類、家畜或寵物。

本發明之抗體適用於治療某些實體腫瘤。根據包括 EGFR 表現量之多種因素，尤其以下腫瘤類型似乎呈現為較佳適應症：乳癌、卵巢癌、結腸癌、直腸癌、前列腺癌、膀胱癌、胰腺癌、頭頸部癌及非小細胞肺癌。

癌症之其他實例包括癌瘤及肉瘤。癌瘤至少包括以下癌瘤：

- 上皮性瘤，NOS；
- 鱗狀細胞瘤；
- 鱗狀細胞癌，NOS；
- 基底細胞瘤；
- 基底細胞癌，NOS；
- 移行細胞乳頭狀瘤及移行細胞癌；
- 腺瘤及腺癌（腺體）；
- 腺瘤，NOS；
- 腺癌，NOS；
- 皮革胃（Linitis plastica）；

胰島素瘤，NOS；
 升糖素瘤，NOS；
 胃泌素瘤，NOS；
 VIP 瘤（Vipoma）；
 膽管癌；
 肝細胞癌，NOS；
 腺樣囊性癌；
 闌尾類癌瘤，NOS；
 泌乳素瘤；
 嗜酸性腺瘤；
 何氏細胞腺瘤（Hurthle cell adenoma）；
 腎細胞癌；
 格拉維茨瘤（Grawitz tumor）；
 多發性內分泌腺瘤；
 子宮內膜樣腺瘤，NOS；
 附件瘤及皮膚附屬器瘤；
 黏液表皮樣瘤；
 囊性瘤、黏液瘤及漿液瘤；
 囊腺瘤，NOS；
 腹膜假黏液瘤；
 導管瘤、小葉瘤及髓質瘤；
 腺泡細胞瘤；
 複合上皮性瘤；
 沃辛氏瘤（Warthin's tumor）；

胸腺瘤，NOS；

特殊性腺瘤；

生殖索基質腫瘤；

泡膜細胞瘤，NOS；

粒層細胞瘤，NOS；

含睪丸細胞之卵巢腺瘤，NOS；

塞托利-萊迪希氏細胞瘤（Sertoli-Leydig cell tumor）；

副神經節瘤及血管球瘤；

副神經節瘤，NOS；

嗜鉻細胞瘤，NOS；

血管球瘤；

痣及黑色素瘤；

黑素細胞痣；

惡性黑色素瘤，NOS；

黑色素瘤，NOS；

結節性黑色素瘤；

發育不良痣；

惡性小痣黑色素瘤；

表淺散播型黑色素瘤；

惡性肢端痣樣黑色素瘤。

肉瘤之實例包括。根據肉瘤所源自之組織類型，給予肉瘤許多不同名稱。舉例而言，骨肉瘤源自骨骼，軟骨肉瘤源自軟骨，且平滑肌肉瘤源自平滑肌。諸如平滑肌肉瘤、軟骨肉瘤及胃腸基質腫瘤（GIST）之軟組織肉瘤在成人中

比在兒童中更常見。

就此等適應症中之每一者而言，三種臨床路徑似乎提供獨特的臨床成功可能性：

輔助療法：在輔助療法中，將用本發明之抗體與化療劑或抗腫瘤劑及/或放射療法之組合對患者進行治療。以上所列之原發性標靶將按照方案藉由向標準第一線及第二線療法或第三線療法添加本發明之抗體來進行治療。方案設計將著手解決如根據腫瘤塊減小以及降低標準化學療法常用劑量之能力所評估的有效性。此等劑量上的降低由於降低化療劑之劑量相關毒性而使得可進行額外及/或長期治療。先前技術之抗 EGFR 抗體已與或正與以下化療劑或抗腫瘤劑組合用於若干輔助臨床試驗中：阿德力黴素（爾必得舒：晚期前列腺癌）、順鉑（爾必得舒：晚期頭頸部癌及肺癌）、紫杉醇（爾必得舒：乳癌）及多柔比星（爾必得舒）。

本發明提供醫藥物品，其包含以組合形式用於在癌症療法中同時、單獨或依次投藥的本發明之抗體組成物及至少一種能夠誘導癌細胞分化之化合物。藉由將本發明之抗體組成物與已知可誘導癌細胞終末分化之藥劑組合可進一步改良其功效。

該至少一種化合物可選自由以下者所組成之群組：視網酸（retinoic acid）、反式視網酸、順式視網酸、苯基丁酸鹽、神經生長因子、二甲亞碲、活性形式之維生素 D(3)、過氧化體增殖物激活型受體 γ 、12-O-四癸酰基佛波醇 13-乙酸酯、六亞甲基-雙-乙酰胺、轉型生長因子 β 、丁酸、環

狀 AMP 及維司力農 (vesnarinone)。較佳地，該化合物係選自由以下者所組成之群組：視網酸、苯基丁酸鹽、所有反式視網酸、活性形式之維生素 D。

包含本發明之抗體組成物及至少一種化療化合物或抗腫瘤化合物之醫藥物品可以組合形式用於在癌症療法中同時、單獨或依次投藥。該化療化合物可選自由以下者所組成之群組：阿德力黴素、順鉑、紫杉醇、多柔比星、拓朴替康、氟嘧啶、奧沙利鉑及伊立替康。

單一療法：就本發明之抗體在腫瘤之單一療法中之用途而言，可在無化療劑或抗腫瘤劑之情況下向患者投予該等抗體。經由使用本發明之抗體產生且在本文中討論之臨床前結果已顯示作為獨立療法之陽性結果。

成像劑：經由使放射性核種（例如釔 (^{90}Y)）與本發明之抗體結合，可預期本發明之放射性標記抗體能用作診斷、成像劑。在該類作用中，本發明之抗體將定位於實體腫瘤以及表現 EGFR 之細胞的轉移性病灶。就本發明之抗體作為成像劑之用途而言，該等抗體可在實體腫瘤之輔助外科手術治療中用作手術前篩選以及手術後跟蹤以確定哪些腫瘤殘餘及/或復發。 (^{111}In) -爾必得舒抗體已在具有不可切除鱗狀細胞肺癌瘤之患者的 I 期人類臨床試驗中用作成像劑。(Divgi 等人, J. Natl. Cancer Inst. 83:97-104 (1991))。用標準前部及後部 γ 照相機跟蹤患者。初步資料表明鑑別出所有原發性病灶及大型轉移性病灶，而僅偵測出一半小型轉移性病灶（不到 1 cm）。

酪胺酸激酶抑制劑 (TKI) 為主要衍生自喹唑啉之合成低分子量分子，其與受體之細胞內酪胺酸激酶域相互作用且藉由競爭細胞內 Mg-ATP 結合位點來抑制配位體誘導之受體磷酸化。臨床開發中之若干 TKI 靶向 EGFR，該等 TKI 包括吉非替尼 (Gefitinib) (易瑞沙 (Iressa), ZD1839)、埃羅替尼 (Erlotinib) (它賽瓦 (Tarceva), OSI-774)、拉帕替尼 (Lapatinib) (泰克布 (Tykerb), GW572016)、卡奈替尼 (Canertinib) (CI-1033)、EKB-569 及 PKI-166。TKI 與抗 EGFR 之組合治療已顯示在活體內與試管內針對 EGFR 依賴性癌細胞均為有益的。包含本發明之抗體組成物及至少一種靶向 EGFR 之 TKI 的醫藥物品可以組合形式用於在癌症療法中同時、單獨或依次投藥。其他小分子抑制劑包括：索拉非尼 (Sorafinib) (raf 及多種 RTK)、舒尼替尼 (Sunitinib) (多種 RTK)、西羅莫司 (Temsirolimus) (mTOR)、RAD001 (mTOR) 及 AZD217 (VEGFR2)。

在其他具體實例中，本發明之抗體組成物與其他抗體治療劑組合使用。此等抗體治療劑之實例包括例如針對 HER2 之抗體 (赫賽汀, Herceptin) 及針對 VEGF 之抗體 (阿瓦斯丁, avastin)。在其他具體實例中，本發明之抗體組成物與已知可刺激免疫系統之細胞的藥劑組合使用，該組合治療使得免疫介導的本發明之抗體組成物之功效增強增大。該等免疫刺激劑之實例包括 (但不限於) 重組介白素 (例如 IL-21 及 IL-2)。

投藥之劑量及途徑

雖然本發明之抗體的特定劑量尚未確定，但某些劑量考慮因素可經由與已經核準之類似產品（ImClone C225（爾必得舒））相比較來確定。C225 抗體典型的是以在 5 mg/m^2 至 400 mg/m^2 範圍內之劑量投予，其中關於安全性研究，僅使用較低劑量。因此，可預期在患者體內本發明抗體之劑量可在此範圍內或更低，或許在 50 mg/m^2 至 300 mg/m^2 範圍內，且仍然有效。與以 mg/kg 計之習知劑量量度不同，以 mg/m^2 計之劑量為基於表面積之量度且為經設計成包括自嬰兒至成人之所有體型之患者的適宜劑量量度。

可用於爾必得舒（西妥昔單抗）之處方資訊包括初始 120 分鐘靜脈內（IV）輸注 400 mg/m^2 ，繼而每週 60 min 輸注 250 mg/m^2 。此等劑量被推薦用於獨立治療以及與放射療法組合。對於維克替比（帕尼單抗），推薦劑量為每 14 日經 60 分鐘投予 6 mg/kg 。

Genmab 之 HuMaxEGFr 抗體（紫妥木單抗）之預期臨床劑量為 8 mg/kg HuMax-EGFr 之初始劑量，繼而每週輸注維持劑量直至疾病進展。該維持劑量應視需要進行調整直至患者顯現出劑量限制性皮疹，至多為 16 mg/kg HuMax-EGFr 之最大劑量（關鍵 III 期研究（pivotal Phase III study）之劑量，可由 Genmab 之產品說明得知）。

如就現今臨床所用之單株抗 EGFR 抗體（爾必得舒及維克替比）所觀察到，本發明之抗體組成物之臨床劑量可能受皮疹程度限制。獼猴之六週毒理學研究之資料展示，當以等同於用臨床中所用之單株抗體之一治療時之用量的劑

量投予本發明之抗體組成物時無皮疹跡象（實施例 20）。因此，本發明之抗體組成物可靜脈內投予且每週給予 250 mg/m²（對於體表面積為 1.8 m² 且體重為 60 kg 之人，折算為 7.5 mg/kg）。此外，可給予 400 mg/m²（對於體表面積為 1.8 m² 且體重為 60 kg 之人，折算為 12 mg/kg）之初始負荷劑量，隨後為後續每週給藥。

可預期三種獨特的傳遞方法適用於傳遞本發明之抗體。習知靜脈內傳遞估計可能為用於大多數腫瘤之標準傳遞技術。然而，就腹膜腔中之腫瘤（諸如卵巢、膽管、其他管道及其類似組織之腫瘤）而言，腹膜內投藥可證實有利於在腫瘤處獲得高劑量之抗體且使抗體清除率減至最低程度。以類似方式，某些實體腫瘤具有適合於局部灌注之血管結構。局部灌注將使得可於腫瘤部位處獲得高劑量之抗體且可使抗體之短期清除率減至最低程度。

如同任何基於蛋白質或抗體輸注之療法一般，安全性問題主要與以下項有關：(i) 細胞激素釋放症候群，亦即低血壓、發燒、顫抖、寒戰；(ii) 對物質之免疫原性反應之產生（亦即，患者產生針對治療性抗體之人類抗體，或 HAMA 或 HACA 反應）；及 (iii) 對表現 EGF 受體之正常細胞（例如表現 EGFR 之肝細胞）之毒性。標準測試及跟蹤研究將用於監測此等安全性問題中之每一者。詳言之，將在臨床試驗期間頻繁地監測肝功能以便評估對肝之損害（若存在時）。

診斷用途

本發明之另一項具體實例係針對診斷套組。本發明之套組包含根據本發明製備之抗 EGFR 抗體組成物，其蛋白質可以可偵測標記進行標記或不經標記以供無標記偵測。該套組可用於鑑別罹患與 EGFR 過度表現有關之癌症的個體。

實施例

實施例 1：抗 EGFR 抗體之選殖

免疫

使用雌性 BALB/c 品系 A 或 C57B16 小鼠(8-10 週齡)，藉由注射除 EGFR 過度表現細胞外之不同經純化蛋白質進行免疫。

對於一些免疫使用市售 EGFR 蛋白質 (R&D systems，目錄號 1095-ER 或 Sigma #E3641)。對於其他免疫而言，使用以融合蛋白質形式產生之重組人類 EGFR 及 EGFRvIII，其由 EGFR 或 EGFRvIII 之 ECD 與人類生長激素 (hGH) 組成，除實施例 10b 中所述之 His 標籤外，亦包括煙草蝕刻病毒 (Tobacco Etch Virus, TEV) 裂解位點。在一些情況下，藉由 TEV 蛋白酶裂解且隨後經鎳管柱純化來分離 EGFR 之 ECD。

使用每個細胞表現約 10^7 個受體之人類頭頸部癌細胞系 HN5 (Easty DM, Easty GC, Carter RL, Monaghan P, Butler LJ. Br J Cancer, 1981 年 6 月; 43(6):772-85. Ten human carcinoma cell lines derived from squamous carcinomas of the head and neck) 進行基於細胞之免疫。將細胞培養於補充有 10% FBS(胎牛血清)、3 mM 甘油、5 mM

丙酮酸鈉及 1% 青黴素鏈黴素之 DMEM 培養基中。在各免疫之前，用 PBS 洗滌細胞，用 TrypLE 進行胰蛋白酶化且再懸浮於生長培養基中。隨後藉由以 $250\times g$ 離心 5 min，移出且再懸浮於 15 ml 無菌 PBS 中而用 PBS 洗滌細胞懸浮液兩次。

用 PBS 稀釋細胞或抗原且隨後與弗氏佐劑 (Freund's Adjuvant) 以 1:1 混合。使用佐劑來增強且調節免疫反應。對於第一次免疫使用完全弗氏佐劑 (Complete Freund's Adjuvant, CFA)，而對於後續免疫使用不完全弗氏佐劑 (Incomplete Freund's Adjuvant, IFA)。IFA 為由礦物油所組成之水包油乳液，且 CFA 為添加有經熱殺死、乾燥之分枝桿菌 (*Mycobacterium*) 物種之 IFA。兩種佐劑皆具有儲存效應 (depot effect)。CFA 使免疫反應長期持久且用於第一次免疫以增強免疫反應，且使用 IFA 進行後續免疫。藉由在具有水之玻璃表面上添加一液滴來測試該等乳液。若該液滴保持為一液滴，則乳液為穩定的且可執行注射。僅向小鼠投予穩定乳液。

視時程 (參見表 2) 而定，對於各注射使用 25-100 μg 抗原或 10^7 個細胞。小鼠總共接受 4 次注射。所有小鼠均被注射 300 μl 或 200 μl 乳液。視時程而定，執行皮下 (s.c)、腹膜內 (i.p) 或靜脈內 (i.v) 注射。

結束時，藉由頸部脫臼殺死小鼠，且移取脾臟並轉移至 74 μm 細胞過濾網 (cell strainer, Corning#136350-3479) 中。經由過濾器分離細胞，再懸浮於具有 10% FBS 之冷 RPMI 1640 中且以 $300\times g$ 離心 5 分鐘。將細胞球粒再懸浮於

具有 1% FBS 之 RPMI 1640 中，經由 50 μ m 注射過濾器 (BD# 340603) 過濾且藉由離心收集。將細胞球粒再懸浮於具有 10% DMSO 之 FCS 中，隨後冷藏，且將冷凍之細胞儲存於 -80°C 下直至 FACS 分選。

鼠類漿細胞之 FACS 分選

將具有冷凍脾細胞之小瓶於 37°C 下解凍且在冰仍存在之情況下轉移至 15 ml 試管中。在渦旋的同時將 10 ml 冰冷 RPMI、10% FBS (胎牛血清) 逐滴添加至該試管中。在以 10 ml FACS PBS 洗滌一次後，添加 5 ml FCS PBS，隨後經由 50 μ m Filcon 過濾細胞。隨後使細胞成粒且再懸浮於 1 ml (最終體積) 具有 2% FBS 之 PBS 中，且根據特定稀釋度以抗 CD43-FITC 及抗 CD138-PE 染色至最終濃度為約 5 μ g/ml。於 4°C 下在黑暗中培養細胞 20 min。隨後，用 2 ml FACS 緩衝液洗滌細胞 2 次。添加達 15 ml 之 FACS PBS。以 1:100 添加碘化丙錠 (PI) (1 份 PI 對比 100 份 FACS PBS 緩衝液)，且隨後將細胞分選至含有 PCR 反應緩衝液 (參見下文) 之 96 孔 PCR 板中，且以 400 $\times$ g 離心 2 min，隨後將該等板於 -80°C 下冷凍。如圖 1 所示，將漿細胞以 CD43 陽性/CD138 陽性設門。

同源 V_H 及 V_L 對之連接

對以漿細胞設門之單細胞執行 V_H 及 V_L 編碼序列之連接，此有利於 V_H 及 V_L 編碼序列之同源配對。該程序使用基於單步多路重疊延伸 RT-PCR 繼而巢式 PCR 之兩步 PCR 程序。本發明之實施例中所用之引子混合物僅擴增 κ 輕鏈。

然而，必要時，可將能夠擴增 λ 輕鏈之引子添加至多路引子混合物及巢式 PCR 引子混合物中。若添加 λ 引子，則應對分選程序進行調適以使 λ 陽性細胞不被排除。同源 V_H 及 V_L 序列連接之原理示於圖 2 中。

將所準備之 96 孔 PCR 板解凍且所分選之細胞充當用於多路重疊延伸 RT-PCR 之模板。在單細胞分選之前添加至各孔中之分選緩衝液含有反應緩衝液（單步 RT-PCR 緩衝液；Qiagen）、RT-PCR 之引子（參見表 3）及 RNase 抑制劑（RNasin，Promega）。此分選緩衝液補充有單步 RT-PCR 酶混合物（25 倍稀釋液；Qiagen）及 dNTP 混合物（各 200 μ M）以在 20 μ l 反應體積中獲得給定最終濃度。於 55°C 下培養板 30 分鐘以允許自各細胞反轉錄 RNA。在 RT 後，使板經受以下 PCR 循環：94°C 下 10 min，35 $\times$ （94°C 下 40 sec，60°C 下 40 sec，72°C 下 5 min），72°C 下 10 min。

在具有利於高通量處理之用於 24 個 96 孔板之剝離密封框（Peel Seal Basket）的 H20BIT 熱循環器（ABgene）中執行 PCR 反應。在循環後，將該等 PCR 板儲存於 -20°C 下。

對於巢式 PCR 步驟而言，準備 96 孔 PCR 板，其中各孔（20 μ l 反應物）中具有以下混合物以獲得給定最終濃度：1 $\times$ FastStart 緩衝液（Roche）、dNTP 混合物（各 200 μ M）、巢式引子混合物（參見表 4）、Phusion DNA 聚合酶（0.08 U；Finnzymes）及 FastStart 高保真酶摻合物（0.8 U；Roche）。自多路重疊延伸 PCR 反應物轉移 1 μ l 作為巢式 PCR 之模板。使巢式 PCR 板經受以下熱循環：35 $\times$ （95°C 下 30 sec，

60°C 下 30 sec, 72°C 下 90 sec), 72°C 下 10 min。

以 1%瓊脂糖凝膠分析隨機選擇之反應物以證實具有約 890 個鹼基對 (bp) 之重疊延伸片段之存在。

將板儲存於 -20°C 下直至進一步加工該等 PCR 片段。

將來自巢式 PCR 之已連接的 V_H 及 V_L 編碼對之庫在不將來自不同供體之對混合的情況下彙集, 且藉由製備型 1%瓊脂糖凝膠電泳純化。藉由重疊延伸將人類 κ 恆定輕鏈編碼序列剪接至已連接的 V_H 及 V_L 編碼對之彙集 PCR 產物之 V_L 編碼區 (圖 3)。在含有以下各物之反應物中自含有具有 κ 輕鏈之人類抗體之編碼序列的質體擴增人類 κ 恆定輕鏈編碼序列: Phusion 酶 (2U; Finnzymes)、1×Phusion 緩衝液、dNTP 混合物 (各 200 μ M)、hKCforw-v2 引子與 κ 3'引子 (表 5) 及質體模板 pLL138 (10 ng/ μ l), 總體積為 50 μ l。使反應物經受以下熱循環: 25×(95°C 下 30 sec, 55°C 下 30 sec, 72°C 下 45 sec), 72°C 下 10 min。藉由製備型 1%瓊脂糖凝膠電泳純化所得 PCR 片段。

藉由隨後經由含有以下之重疊延伸 PCR (總體積為 50 μ l) 進行剪接使各庫之經純化彙集之 PCR 片段剪接至經擴增及純化之人類 κ 恆定編碼區 (附錄 2) 之 PCR 片段: 人類 κ 恆定編碼區片段 (1.4 ng/ μ l)、經純化彙集之 PCR 片段 (1.4 ng/ μ l)、Phusion DNA 聚合酶 (0.5 U; Finnzymes) 及 FastStart 高保真酶摻合物 (0.2 U; Roche)、1×FastStart 緩衝液 (Roche)、dNTP 混合物 (各 200 μ M)、mhKCrev 引子及 mJH 組引子 (參見表 5)。使反應物經受以下熱循環: 95°C

消化之雙向哺乳動物啟動子-前導序列片段插入 *AscI* 及 *NheI* 限制性位點中。將已接合之載體在大腸桿菌中擴增且使用標準方法純化質體。藉由習知程序將所產生之篩選載體庫轉型至大腸桿菌中。將所獲得之群落固定於 384 孔母板中且儲存。所排列之群落的數目超過所引入 PCR 產物之數目至少 3 倍，由此對於所獲得之所有獨有 V 基因對均存在具有 95% 的可能性。

針對與 EGFR 細胞外域之結合進行篩選

一般而言，以兩步程序進行該篩選。在 ELISA 中針對對重組 EGFR 蛋白質之活性篩選抗體文庫，在此之後使用 FMAT (FLISA) 作為基於細胞之方法，使用 NR6wtEGFR 細胞系，來偵測 EGFR-抗體與細胞表面表現之 EGFR 的結合。對於 101 及 108/109 文庫 (表 2)，使用代表 EGFR 細胞外域之重組 EGFR 執行 ELISA。

簡言之，對於 ELISA，於 4°C 下用以 PBS 稀釋之 1 µg/ml 蛋白質 (室內製備) 塗佈 Nunc maxisorb 板 (目錄號 464718) 隔夜。在以 50 µl 2%-牛奶-PBS-T 阻斷之前，用 PBS + 0.05% 吐溫 (Tween) 20 (PBS-T) 洗滌該等板一次。用 PBS-T 洗滌板一次，添加 20 µl 2%-牛奶-PBS-T 及 5 µl 來自 FreeStyle CHO-S 轉染物 (參見下文) 之上清液，且於室溫下培養 1.5 小時，在此之後用每孔 20 µl PBS-T 洗滌板一次。添加用 2% 牛奶-PBS-T 以 1:10000 稀釋之二級抗體 (HRP-山羊-抗人類 IgG, Jackson, 目錄號 109-035-097) 以偵測與孔結合之抗體且於室溫下培養 1 小時。用 PBS-T 洗滌板一次，隨後添

下 2 min, 25×(95°C 下 30 sec, 55°C 下 30 sec, 72°C 下 1 min), 72°C 下 10 min。藉由製備型 1%瓊脂糖凝膠電泳純化所得 PCR 片段 (約 1070 個 bp)。

將同源 V_H 及 V_L 編碼對插入篩選載體中

為鑑別具有針對 EGFR 之結合特異性之抗體, 將所獲得之 V_H 及 V_L 編碼序列表現為全長抗體。此包括將 V_H 及 V_L 編碼對之庫插入表現載體中且轉染至宿主細胞中。

使用兩步選殖程序來產生含有已連接的 V_H 及 V_L 編碼對之表現載體之庫。在統計學上, 若表現載體之庫所含重組質體多達用於產生篩選庫之同源配對 V_H 及 V_L PCR 產物之數目的十倍, 則所有獨有基因對均得以呈現的可能性為 99%。因此, 若獲得 400 個重疊延伸 V 基因片段, 則產生至少 4000 個純系之庫用於篩選。

簡言之, 在引入 PCR 產物末端之識別位點處用 *XhoI* 及 *NotI* DNA 核酸內切酶裂解已連接的 V_H 及 V_L 編碼對之庫的剪接至人類 κ 恆定編碼區之經純化的 PCR 產物。藉由標準接合程序將經裂解及純化之片段接合至經 *XhoI/NotI* 消化之哺乳動物 IgG 表現載體 OO-VP-002 (圖 4) 中。將接合混合物電穿孔至大腸桿菌中且添加至含有適當抗生素之 2×YT 板中, 並於 37°C 下培養隔夜。使用標準 DNA 純化法 (Qiagen) 將經擴增之載體庫自板中所回收之細胞純化。製備質體以供藉由使用 *AscI* 及 *NheI* 核酸內切酶裂解來插入啟動子-前導序列片段。此等酶之限制性位點位於 V_H 與 V_L 編碼基因對之間。在純化載體後, 藉由標準接合程序將經 *AscI-NheI*

加 25 μ l 受質 (Kem-en-tec Diagnostics, 目錄號 4390), 培養 5 min。培養後添加 25 μ l 1 M 硫酸以終止反應。用 ELISA 讀取器於 450 nm 下偵測特定信號。

對於抗 EGFR 抗體之基於細胞之 FMAT 偵測, 在所述生長培養基中培養 SKBR-3 (ATCC #HTB-30) 或 NR6wtEGFR (Welsh 等人, 1991, J Cell Biol, 114, 3, 533-543) 細胞。對細胞進行計數且用以 1:40,000 稀釋之結合 Alexa-647 之山羊-抗人類 IgG (H-L) 抗體 (分子探針第 A21445 號, 批號 34686A) 稀釋至每毫升 125,000 個細胞。將總共 20 μ l 此懸浮液轉移至 384 孔透明底 Nunc 板中。隨後將 10 μ l 轉染上清液添加至細胞中。在培養 6-10 小時後, 量測反應物之 FMAT 信號。

篩選資料表明, 在 ELISA 中總純系中之 221 個 (4.8%) 為陽性。在 FMAT 中該等純系中之 93 個 (2.0%) 亦為陽性。在 FMAT 中該等純系中之總共 220 個 (4.8%) 為陽性, 且其中 127 (220-93) 個僅對於細胞表面抗原為陽性。以類似方式篩選 111 文庫, 但由於免疫程序使得產生對於缺失突變 EGFR 受體 EGFRvIII 具有特異性之抗體, 故 ELISA 篩選包括偵測野生型 EGFR 與 EGFRvIII 之檢定。在 ELISA 中鑑別出七個純系對於 EGFRvIII 具有特異性, 且有趣的是, 在 FMAT 中, 該等純系對於 wtEGFR 表現性細胞之染色為陰性。在 FMAT 及 ELISA 中鑑別出 13 個純系對於 wtEGFR 為陽性, 但對於 EGFRvIII 不為陽性, 與 101 及 108/109 文庫相比, 此情況為此文庫所獨有。選擇所有 ELISA 陽性純系

用於進一步分析。

序列分析及純系選擇

自初始母板(384孔格式)回收在ELISA中鑑別為EGFR特異性之純系且固定至新板中。自該等純系分離DNA，且提交用於V基因之DNA定序。排比序列且選擇所有獨有純系。所得序列之多重排比揭示各特定純系之獨有性且使得可鑑別獨有抗體。根據220個純系之序列分析，鑑別出70個遺傳上獨特之抗體序列聚類。相關序列之各聚類可能經由通用前軀純系之體細胞超突變衍生出。總體上，選擇各聚類中之一至兩個純系用於驗證序列及特異性。所選抗體可變序列之序列展示於附錄1中。核苷酸序列包括兩端之限制位點。因此，根據IMGT定義(Lefranc等人，(2003) IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. Dev. Comp Immunol 27, 55-77)，相應轉譯之胺基酸序列(使用DNA序列之第三閱讀構架)在N末端包括並不形成 V_H 及 V_L 序列之部分的兩個胺基酸。全部展示之 V_L 序列包括相同人類 κ 恆定區，其以胺基酸-TVAAP-起始，且在C末端以-NRGEC結束。出於本發明之目的，術語 V_L 序列當指特異性抗體時不包括 κ 恆定區及兩個N末端胺基酸(LA-)。術語 V_H 序列當指特異性抗體時不包括兩個N末端胺基酸(RA-)。

序列及特異性驗證

為驗證編碼抗體之純系，製備DNA質體且以2 ml規模

執行 FreeStyle CHO-S 細胞 (Invitrogen) 之轉染以供表現。轉染後 96 小時收集上清液。用標準抗 IgG ELISA 估算表現量且藉由 EGFR 及 EGFRvIII 特異性 ELISA 測定特異性。顯示 85% 的純系具有正確的特異性及序列。

針對抗增殖效應之篩選

細胞損傷將不可避免地導致細胞保持代謝細胞功能及生長且為代謝細胞功能及生長提供能量的能力之損失。代謝活性檢定基於此前提。通常其量測線粒體活性。細胞增殖試劑 WST-1 (Roche 目錄號 11 644 807 001) 為量測活細胞代謝活性之即用受質。隨後假定代謝活性與活細胞數目有關。在本實施例中，使用 WST-1 檢定來量測用含有不同抗 EGFR 抗體之細胞培養物上清液處理後代謝活性細胞之數目。

在執行 WST-1 檢定之前，將 2 ml 上清液中之不同體積 (0、10、25、50 及 150 μ l) 轉移至 96 孔板之適當孔中。

隨後用 1 $\times$ PBS 洗滌 HN5 細胞且藉由用 3 ml 胰蛋白酶溶液胰蛋白酶化來分離。隨後添加 17 ml 完全培養基且將該等細胞以 300 $\times$ g (1200 rcf) 離心 5 min。移除上清液且使細胞再懸浮於 DMEM + 0.5% FBS 中。對細胞進行計數且調整其濃度，且將 1500 個細胞添加至具有上清液之孔中以便各孔總共含有 200 μ l 培養基。在含濕氣恆溫箱中於 37 $^{\circ}$ C 下培養板 4 日。隨後每孔添加 20 μ l WST-1 試劑且於 37 $^{\circ}$ C 下培養板 1 小時。隨後將板轉移至回轉式盤震盪器中且再保持 1 小時。用 ELISA 讀取器量測 450 及 620 nm (參考波長) 下之

吸光度。代謝活性細胞 (MAC) 含量之差值經如下計算為對照組上清液之百分比：

$$\%MAC = \left(1 - \frac{(OD_{\text{實驗}} - OD_{\text{培養基}})}{(OD_{\text{未經處理}} - OD_{\text{培養基}})} \right) \times 100。$$

隨後使用此等值作為使用免費軟體 Cluster 及 TreeView 執行之受監督分級聚類分析 (基於在 ELISA 中之活性進行分類) 之基礎。

較佳能夠在抗體選擇過程之早期篩選功能性抗體。在使用於 0.5% FBS 中之 HN5 細胞執行之增殖檢定中，使用 83 個 2 ml 轉染之培養物上清液來針對生長抑制功能進行篩選。藉由簡單分級聚類分析顯像結果。如聚類分析 (圖 5) 中可見，發現多種上清液以濃度依賴性方式減少代謝活性 HN5 細胞之數目 (深灰色) (聚類 2)。類似地，一些上清液以濃度依賴性方式增加代謝活性 HN5 細胞之數目 (淡灰色) (聚類 1、3 及 4)。有趣的觀察結果為降低代謝活性 HN5 細胞數目之上清液具有活性 2 (黑色箭頭)，而增加代謝活性 HN5 細胞數目之上清液具有活性 1 (灰色箭頭)。具有活性 2 之上清液在 wtEGFR 與 EGFRvIII ELISA 中均為陽性，而具有活性 1 之上清液僅對 wtEGFR 具有活性。因此，該等分析可提供 ELISA 中之抗體活性與細胞檢定中之功能性之間的關係。

純系修復

當使用多重 PCR 方法時，由於引子簡併性及高度同源

性，可預期存在某種程度之 V 基因家族內及 V 基因家族間的交叉啟動 (cross-priming)。該交叉啟動引入並非天然存在於免疫球蛋白構架中之胺基酸，伴隨產生若干潛在後果，例如結構變化及免疫原性增加，所有均導致治療活性降低。

為消除此等缺陷且確保所選純系反映天然體液免疫反應，在稱為純系修復之過程中校正交叉啟動突變。

在純系修復程序之第一步驟中，用含有對應於相關純系所源自之 V_H 基因之序列的引子組對 V_H 序列進行 PCR 擴增，從而校正由交叉啟動引入之任何突變。用 *XhoI* 及 *AscI* 消化 PCR 片段，且使用習知接合程序接合回經 *XhoI/AscI* 消化之哺乳動物表現載體 (圖 4) 中。將接合之載體在大腸桿菌中擴增且藉由標準方法純化質體。對 V_H 序列進行定序以證實校正且用 *NheI/NotI* 消化載體以製備其以供插入輕鏈。

在第二步驟中，用含有對應於相關純系所源自之 V_L 基因之序列的引子組對完整輕鏈進行 PCR 擴增，從而校正由交叉啟動引入之任何突變。用 *NheI/NotI* 消化 PCR 片段且接合至以上所製備之含有 V_H 的載體中。將接合產物在大腸桿菌中擴增且藉由標準方法純化質體。隨後，對輕鏈進行定序以證實校正。

在所選純系之 K 恆定區含有基因擴增期間所引入之突變的情況下，將該 K 恆定區替換為未突變恆定區。此以重疊 PCR 進行，其中將經修復之 V_L 基因 (在無恆定區之情況

下擴增) 與具有正確序列之恆定區 (以獨立 PCR 獲得) 融合。擴增整個序列且選殖至上述含有 V_H 之載體中並對經修復之輕鏈進行定序以證實校正。

表 2 用於產生抗 EGFR 選殖之起始物質的免疫時程

時程， 小鼠組	品系	注射 1	注射 2	注射 3	注射 4	終點
101	Balb/c	第 1 日 25 μ g rhEGFR (R&D systems , 1095-ER) CFA s.c.	第 35 日 25 μ g rhGH-EGFR (Symphogen) IFA s.c.	第 56 日 25 μ g rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c.	第 70 日 25 μ g rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c.	第 73 日
108	Balb/c	第 1 日 1×10^7 個 HN5 細 胞 CFA i.p.	第 28 日 25 μ g rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c.	第 42 日 1×10^7 個 HN5 細胞 IFA i.p.	第 56 日 25 μ g rhEGFR* , (Symphogen) IFA s.c.	第 59 日
109	Balb/c	第 1 日 1×10^7 個 HN5 細 胞 CFA i.p.	第 28 日 25 μ g rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c.	第 42 日 1×10^7 個 HN5 細胞 IFA i.p.	第 56 日 25 μ g rhEGFR* (Symphogen) PBS i.v.	第 59 日
111	Balb/c	第 1 日 25 μ g rhEGFR* (Symphogen) CFA s.c.	第 28 日 25 μ g rhEGFR+ rhEGFRvIII** (Symphogen) IFA s.c.	第 42 日 25 μ g rhEGFR+ rhEGFRvIII** (Symphogen) IFA s.c.	第 56 日 25 μ g rhEGFR+ rhEGFRvIII** (Symphogen) IFA s.c.	第 59 日
118	Balb/c	第 1 日 1×10^7 個 HN5 細 胞 CFA i.p.	第 29 日 100 μ g rhGH-EGFR (Symphogen) IFA s.c.	第 44 日 1×10^7 個 HN5 細胞 IFA i.p.	第 58 日 25 μ g rhEGFR , (Sigma E3641) IFA s.c.	第 61 日
119	C57B	第 1 日 1×10^7 個 HN5 細 胞 CFA i.p.	第 29 日 100 μ g rhGH-EGFR (Symphogen) IFA s.c.	第 44 日 1×10^7 個 HN5 細胞 IFA i.p.	第 58 日 25 μ g rhEGFR , (Sigma E3641) IFA s.c.	第 61 日

表 3 RT-PCR 多路重疊延伸引子混合物

引子名稱	濃度 (nM)	序列	SEQ ID
mHCrev1	0.2	GACSGATGGGCCCTTGGTGG	1
mKapparl	0.2	GCTGTAGGTGCTGTCTTTGC	2
mVH set			
mVH A	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCSAGGTCCARCTGCARCAGYCTG	3
mVH B	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCGARGTGMAGCTKGTKGAGTC	4
mVH C	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCSAGGTGCAGCTKMAGGAGTC	5
mVH 8	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCCAGGTTACTCTGAAAGAGTC	6
mVH 9	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTG	7
mVK set			
mVK D	0.04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGAYATCCAGATGACHCARWCT	8
mVK E	0.04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCRACATTGTGMTGACHCAGTC	9
mVK F	0.04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCSAMATTGTKCTSACCCARTCTC	10
mVK 1-2	0.04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGATRTTGTGATGACBCARRCT	11

$W = A/T$, $R = A/G$, $S = G/C$, $Y = C/T$, $K = G/T$, $M = A/C$, $H = ACT$, $B = GCT$; Conc. -

最終濃度。

表 4 巢式引子組

引子名稱	濃度 (nM)	序列	SEQ ID
mHCrev1-ext	0.2	GGACAGGGMTCCAAGTTCCADKT	16
hmJK set			
hmJK1-v2	0.2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATTTCCAGCTTGGTG	17
hmJK2-v2	0.2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTATTTCCAGCTTGGTC	18
hmJK4-v2	0.2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTATTTCCAACCTTGTGTC	19
hmJK5-v2	0.2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTC	20

$K = G/T$, $M = A/C$, $D = AGT$; Conc. - 最終濃度。

表 5 κ 恆定剪接引子組

引子	濃度 (nM)	序列	SEQ ID
人類 κ 恆定擴增			
hKCforw-v2	0.2	GAAGTGTGGCTGCACCATCTGTC	21
Kappa3'	0.2	ACCGCCTCCACCGGCGGCCGCTTATTAACACTCTCCCCTGTTG	22
重疊延伸剪接			
mhKCrev	0.2	ACCGCCTCCACCGGCGGCCGCTTATTAACACTCTCCCCTGTTGA AGCTCTT	23
mJH 組			
mJH1	0.2	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACCGTGGTCCC	12
mJH2	0.2	GGAGGCGCTCGAGACTGTGAGAGTGGTGCC	13
mJH3	0.2	GGAGGCGCTCGAGACAGTGACCAGAGTCCC	14
mJH4	0.2	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACTGAGGTTCC	15

實施例 2：抗 EGFR 抗體之哺乳動物製造

對於抗 EGFR 抗體之短暫表現使用 FreeStyle MAX CHO 表現系統 (Invitrogen)。抗體係以 200-2000 ml 體積表現。

在轉染前約 24 小時，將 CHO-S 細胞繼代培養以達到每毫升 0.5×10^6 個細胞之細胞濃度。將質體（每毫升細胞培養基 1.25 μ g）稀釋於 OptiPro 無血清培養基中且與由供應商推薦之 FreeStyle MAX 轉染試劑之溶液混合。將該等轉染試劑轉移至細胞培養物中且 6 日後收集上清液。

使用親和力層析步驟，採用用於純化 IgG1 分子之蛋白質 A-瓊脂糖管柱 (MabSelect Sure, GE Health Care) 將所表現之抗體自培養物上清液純化。使用 0.1 M 甘胺酸 (2.7) 自管柱洗提抗體。彙集藉由於 280 nm 下量測吸光度所確定之含有抗體的洗提份且用 5 mM 乙酸鈉、150 mM NaCl (pH 5) 透析。藉由 LAL 檢定測試經純化之抗體樣本中內毒素的存在。

實施例 3：測定抗原決定基特異性

使用參考抗體之競爭 ELISA

藉由使用如公開於 (J.R. Cochran 等人, JIM 2004 : 287; 147-158) 中的與 EGFR 之已知域結合之參考抗體：開發出競爭 ELISA，其可藉由與對抗 EGFR 抗體之人類 Fc 區具有特異性且對小鼠或大鼠 IgG Fc 展現出無交叉反應性之二級試劑一起培養來辨別抗 EGFR 抗體之結合抗原決定基。該 ELISA 係根據公開於 Ditzel 等人，1995, The Journal of Immunology, 第 154 卷，第 2 期 893-906 中之描述修改而來。

藉由用 PBS 將全長 EGFR 受體抗原稀釋至 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ；且於 4°C 下每個 ELISA 孔塗佈 50 μl 隔夜來執行抗原決定基阻斷 ELISA。次日早晨用 PBS-T 洗滌該等孔兩次且於室溫下用 PBS-T-1% BSA 阻斷 1 小時，繼而用 PBS-T 洗滌兩次。隨後將 25 μl 鼠類或大鼠參考 mAb 以先前實驗中已知之稀釋度添加至獨立 ELISA 孔中以產生 200 倍最大抗原結合。15 min 後，將 25 μl 抗 EGFR 抗體以 2 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度添加至與參考抗體一起預培養之孔或含有 25 μl PBS 之孔中。混合後此產生 1 $\mu\text{g/ml}$ 抗 EGFR 抗體之最終濃度及參考抗體之 100 倍最大抗原結合。於室溫下培養抗體 45 min，在此之後用 PBS-T 洗滌孔四次。以 1:3000 稀釋二級山羊-抗人類 IgG HRP 結合物，且添加 50 μl 至各孔中，繼而於室溫下培養 30 min。最終，用 PBS-T 洗滌孔四次，且藉由每孔添加 50 μl TMB 使板顯色且於 620 nm 下每 5-15-30 min 進行讀取。由下式計算抑制程度：抑制 % = $(1 - (\text{OD 競爭} / \text{OD 無競爭})) \times 100$

(PBS))) $\times 100$ 。

ELISA 試劑：

- 1) 塗佈緩衝液：1 $\times$ PBS；Gibco 目錄號：20012-019；
- 2) 抗原：自 A431 細胞純化之野生型全長 EGFR；Sigma E3641；
- 3) ELISA 板：NUNC Maxisorp；目錄號：442404；
- 4) 阻斷/稀釋緩衝液：於 PBS-T 中之 1% BSA(PBS-T-1% BSA)；
- 5) 洗滌緩衝液：1 $\times$ PBS/0.05%吐溫 20 (PBS-T)；
- 6) 陽性對照組：爾必得舒 (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany, 目錄號：018964；西妥昔單抗)、維克替比 (Amgen Inc, One Amgen Center Drive, Thousand Oaks CA 91320-1799, USA, 目錄號 241400；帕尼單抗)；
- 7) 參考抗體：
 - ICR10 (大鼠)，Abcam，Ab231；
 - 199.12 (鼠類)，Lab Vision Ab-11，MS-396-PABX；
 - EGFR.1 (鼠類)，Lab Vision Ab-3，MS-311-PABX；
 - H11 (鼠類)，Lab Vision Ab-5，MS-316-PABX；
 - B1D8 (鼠類)，Lab Vision Ab-16，MS-666-PABX；
 - 111.6 (鼠類)，Lab Vision Ab-10，MS-378-PABX；
 - 225 (鼠類)，Lab Vision Ab-2，MS-269-PABX；
 - 528 (鼠類)，Lab Vision Ab-1，MS-268-PABX；
- 8) 山羊-抗人類 IgG HRP 結合物；Serotec, Star 106P；
- 9) TMB Plus；KemEnTec，目錄號 4390L；

10) 1 M H_2SO_4 。

競爭 ELISA 之結果展示於圖 6 中。ELISA 競爭檢定係用於根據所用的針對 EGFR 細胞外域產生之參考抗體之域特異性將抗 EGFR 抗體上清液分級。吾人認為 50-100% 之抑制率值指示結合抗原上之重疊抗原決定基或緊挨抗原決定基之抗體對之間的顯著競爭，而低於 50% 之抑制率值指示由該等抗體對識別之抗原決定基不緊挨著，此使得位阻減小。發現抗 EGFR 抗體結合包括域 I、II 及 III 之 EGFR ECD 上的多個抗原決定基。對於一些抗體而言，此分析不能辨別特異性 mAb 是否針對域 I 或域 II。該等特異性係針對經標記之域 I/II。其他一些抗體似乎結合不能以所用之競爭 ELISA 進一步推斷出之獨有抗原決定基（例如純系 1229 及 1320，圖 6）。有可能此等抗體中之一些係針對域 IV，對於該域 IV，任何參考抗體均不具有活性。有趣的是，域 III 抗體可基於由所測試之針對此域之鼠類參考抗體獲得的不同競爭模式而進一步分成四個亞組。組 I 僅由 mAb 992 組成，發現該 mAb 992 與參考抗體 Ab1 及 Ab2 競爭結合。組 II 由 mAb 1024 及 1042 組成，二者皆來源於相同 Ig 重排且因此在 DNA 及胺基酸層面上展示非常接近之序列同源性。發現此兩種抗體僅與 Ab2 競爭結合。組 III 由 mAb 1030、1208 及 1277 組成，後三者與參考抗體 Ab1、Ab5 及 Ab10 競爭結合。最後，組 IV 由 mAb 1254 組成，後者與所有所用之域 III 參考抗體 Ab1、Ab2、Ab5 及 Ab10 競爭結合。

使用表面電漿共振技術進行獨特抗原決定基與參考或

同物種抗體之競爭分析

在含有四個流動單元之 Biacore 3000 機器上執行 SPR 分析。根據製造商之說明書，將 CM5 Biacore 晶片與 10,000 共振單位 (Ru) 多株抗 His 抗體與流動單元 1-4 結合。使用 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流速，以 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之濃度注入 15 μl 6 $\times$ His EGFR ECD，且使其捕獲於已結合有抗 His 多株抗體之全部四個流動單元上。在參考實驗期間，在抗原注射後即刻在各流動單元中建立抗 EGFR mAb 之無競爭的最大結合。簡言之，以 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之濃度將 5 μl 抗體注射於具有所捕獲之 EGFR 的全部流動單元上，繼而以低 pH 值之酸性洗滌液洗去抗體/抗原複合物（與 10 mM 甘胺酸-HCl (pH 2) 接觸 10 秒時間）。測定抗 EGFR 抗體與各流動單元之最大結合後，在相同 Biacore 循環中執行競爭實驗。首先用 EGFR ECD 抗原使流動單元飽和，繼而將不同參考抗體或抗 EGFR 抗體注入使用與上述相同之抗原飽和條件之獨立流動單元中。此步驟之後立即第二次將抗 EGFR 抗體注射於用 EGFR 抗原及競爭抗體飽和之流動單元上以使抗原或阻斷抗體之解離最小。隨後以低 pH 值之酸性洗滌液洗去抗體/抗原複合物（與 10 mM 甘胺酸-HCl (pH 2) 接觸 10 秒時間）且用新的抗 EGFR 抗體重複整個以參考實驗開始之循環。藉由引入在注入各樣本前後兩秒所記錄之報導點比較個別抗 EGFR 抗體競爭前後之 Ru 最大值來測定所測試之抗 EGFR 抗體之抑制程度。一個 Biacore 循環之實施例展示於圖 7 中。

試劑：

1. CM5 晶片 ; Biacore , 目錄號 BR-1000-14 ;
2. NHS ; Biacore BR-1000-50 ;
3. EDC ; Biacore BR-1000-50 ;
4. 10 mM 乙酸鹽緩衝液 (pH 4.5) ; Biacore , 目錄號 BR-1003-50 ;
5. Tetra-His 抗體 (不含 BSA) ; Qiagen , 目錄號 34670 ;
6. 乙醇胺 , 1.0 M , pH 8.5 ; Biacore BR-1000-50 ;
7. 10×HBS-EP 電泳緩衝液 : 0.01 M HEPES (pH 7.4) 、 0.15 M NaCl 、 3 mM EDTA 、 0.005% v/v 界面活性劑 P20 ;
8. 抗原 : 具有 6×His 之室內製造之重組人類 EGFR 細胞外域 ;
9. 10 mM 甘胺酸 HCl (pH 2.0) ;
10. 參考抗體 :
 - ICR10 (大鼠) , Abcam , Ab231 ;
 - 199.12 (鼠類) , Lab Vision Ab-11 , MS-396-PABX ;
 - EGFR.1 (鼠類) , Lab Vision Ab-3 , MS-311-PABX ;
 - H11 (鼠類) , Lab Vision Ab-5 , MS-316-PABX ;
 - B1D8 (鼠類) , Lab Vision Ab-16 , MS-666-PABX ;
 - 111.6 (鼠類) , Lab Vision Ab-10 , MS-378-PABX ;
 - 225 (鼠類) , Lab Vision Ab-2 , MS-269-PABX ;
 - 528 (鼠類) , Lab Vision Ab-1 , MS-268-PABX .

為確認競爭 ELISA 中所獲得之抗原決定基分析且為藉

由同物種抗 EGFR 抗體對之間的競爭執行進一步抗原決定基分析，建立基於由表面電漿共振即時量測之抗體結合的競爭檢定。針對參考抗體組測試之抗 EGFR 純系所獲得之抗原決定基定位展示於下圖 8 中。吾人認為 50-100%之抑制率值可指示結合抗原上之重疊抗原決定基或緊挨抗原決定基之抗體對之間的顯著競爭，而低於 50%之抑制率值指示由該等抗體對識別之抗原決定基不緊挨著，此使得位阻減小。低於 25%之抑制率值不包括於重疊抗原決定基之分析中，因為認為其不代表明顯之抑制。發現除 1320 以外的所有所測試之抗體均與一或多種所用參考抗體競爭，此指示 1320 係針對未知抗原決定基，對於該未知抗原決定基，任何參考抗體均不具有活性。該分析包括全人類或人類化抗體維克替比及爾必得舒且發現其結合重疊抗原決定基。自競爭 ELISA 及競爭 SPR 分析獲得之資料均對於所建立之抗 EGFR 抗體域特異性充分相關。然而，在兩種檢定中有時觀察到個別參考抗體之間的競賽模式之細微差異，或許歸因於 ELISA 競爭檢定使用全長 EGFR 受體抗原而 SPR 競爭檢定使用重組細胞外域 EGFR 之事實。

在兩種不同競爭檢定中證實抗 EGFR 抗體之抗原決定基定位後，研究抗 EGFR 抗體對之同物種組合之競爭分析以解決哪組抗體對識別獨特抗原決定基及是否識別重疊抗原決定基之抗體對可進一步分成抗原決定基聚類。此分析之結果展示於圖 9 中。又，在此分析中認為 50-100%之抑制率值可指示結合重疊抗原決定基之抗體對之間顯著競爭。此標

準似乎有效，因為所測試之抗體與自身競爭，且因此識別全部重疊抗原決定基使得值介於 70%-100 抑制%之間，如圖 9 所示。此外，此觀察結果說明分析期間抗原或抗體對之解離似乎並不影響所測試抗體之實驗結果。藉由根據先前部分中所確定之假定 EGFR ECD 域特異性將抗體分組，發現僅結合域 I 或域 I 或 II (I/II) 之抗體主要與具有相同特異性之抗體成員成同一聚類，而不與識別域 III 之抗體成員成同一聚類。同樣，發現域 III 抗體僅與識別域 III 之抗體成員競爭結合，而不與識別 EGFR 域 I 或 I/II 之抗體競爭。雖然發現來源於相同 Ig 重排之兩種域 III 抗體 1024 及 1042 識別重疊抗原決定基，但重要的是未發現 1024 或 1042 與 992 或 1030 之成對組合產生顯著競爭。因此，推斷抗體 992、1030 及 1024/1042 識別 EGFR ECD 之域 III 上的三個非重疊抗原決定基。最終，發現 mAb 1320 與均針對域 III 之 mAb 1024 及 1449 競爭結合，且不與其他所測試之域 III 抗體競爭（未確定 1320 與 1042 之競爭）。因此，假定 mAb 1320 結合在 EGFR 細胞外域之域 III 周圍。抗原決定基特異性之概要可見於圖 10 中，其中說明針對 EGFR ECD 域 I、I/II 或 III 之抗體之抗原決定基定位。

如由 SPR 所測定發現 992、1030 及 1024/1042 之成對組合並不產生顯著抗體競爭後，設計新的 Biacore 實驗以檢驗可同時與受體抗原結合之抗體的數量。首先研究用三種抗體 992、1024 及 1030 飽和域 III 對於針對不為域 III 之其他 EGFR 特異性之抗體的結合有何影響。此分析之結果展示

於圖 11A 中。單一抗體之抑制係藉由以與單一抗體或在各 Biacore 循環中依次添加一種額外抗體所產生之至多三種抗體之抗體混合物之組合形式測試該等抗體而確定。為確保完全阻斷所識別之抗原決定基，以 40 $\mu\text{g/ml}$ 之個別濃度測試抗體。如圖 11A 中所示，發現三種域 III 抗體 992、1024 及 1030 同時與受體結合而無任何結合抑制。所觀察到的對於所添加之各抗體增加之負抑制值進一步表明對於隨後所添加之抗體的結合協同作用。重要的是，在將域 III 與該三種抗體一起培養後，針對域 I/II (mAb 1261)、域 I (1347) 或未知特異性 (1361) 之非重疊抗原決定基的其他抗體似乎可結合而無來自三種 mAb 混合物之抗原決定基阻斷。此外，此等所測試抗體具有較小負抑制率值，表明其在用三種 mAb 混合物飽和受體後結合良好。因此，此實驗表明該等六種所測試抗體可同時與 EGFR 之 ECD 結合。為進一步測試此所觀察到之現象，製備由所有測試抗體 (1261、1347、992、1024、1030 及 1361) 所組成之抗體混合物且針對該混合物中各個別樣本抗體之抑制進行測試。亦測試不包括所測試樣本抗體之抗體混合物以充當陽性對照組。如圖 11B/C 中所示，發現當對於與抗體之完全混合物一起培養之 EGF 受體之結合進行測試時，所有六種測試抗體均被抑制 80-116%。然而，當自此混合物移除個別樣本抗體時，未發現該特定樣本抗體之顯著抑制，此說明該混合物中之抗體僅由自身阻斷與 EGF 受體之結合。此實驗清晰地說明至少六種識別非重疊抗原決定基之抗體可同時與

EGFR 結合。最後之實驗對於以下問題進行研究：是否針對域 I (1284)、I/II (1257) 之其他抗體或未知特異性聚類 (1183、1255) 可與 EGFR 在其與該等六種抗體混合物一起培養時結合。如圖 11D 中所示，在將 EGFR 與該六種抗體混合物一起培養後，所測試抗體均不能顯著地與 EGFR 結合。此可能由於抗體集合並不包括針對六種已結合抗體未佔據之位點中之任一者的抗體。或者，有可能實際上所測試域上之所有位點均被抗體阻斷。

表 6 具有經證明之針對 EGFR 細胞外域之特異性的市售抗體

純系	物種	域 I	域 II	域 III
ICR10	大鼠	X		
199.12 / Ab11	小鼠	X		
EGFR.1 / Ab3	小鼠		X	
H11 / Ab5	小鼠			X
111.6 / Ab10	小鼠			X
528 / Ab-1	小鼠			X
225 / Ab-2	小鼠			X

實施例 4：EGFR 活化抑制

藉由競爭 ELISA 測定抗體介導之 EGF 配位體與 EGFR 受體結合之阻斷

為證實所測試抗 EGFR 抗體與 EGFR 受體結合且同時阻斷生物素化 EGF 配位體之結合，於 4°C 下用每孔 80 μ l 於 PBS 中之 0.5 μ g/ml 濃度之全長 EGFR 塗佈 ELISA 孔隔夜。次日早晨用 PBS-T 洗滌孔兩次且於室溫下用 150 μ l PBS-T-1% BSA 阻斷 1 小時，繼而用 PBS-T 洗滌兩次。隨後將 80 μ l

連續稀釋之抗 EGFR 抗體及對照抗體添加至孔中且於室溫下培養 30 min。培養抗體後，將 20 μ L 生物素化 EGF 配位體以 0.5 μ g/ml 之濃度添加至含有抗 EGFR 抗體稀釋液之所有孔中或僅含有 PBS-T 1% BSA 之孔中，且於室溫下培養 1 小時。隨後用 PBS-T 洗滌孔五次，繼而與每孔 100 μ l 用阻斷緩衝液以 1:1000 稀釋之鏈黴抗生物素蛋白-HRP 二級試劑一起培養且於室溫下培養 30 min。最終用 PBS-T 洗滌孔五次且藉由每孔添加 100 μ L TMB 受質且培養 60 min 使板顯色。培養後，藉由每孔添加 100 μ l 1 M H_2SO_4 使反應終止；且於 OD 450 nm 下讀取板。

ELISA 試劑：

- 1) 塗佈緩衝液：1 $\times$ PBS；Gibco 目錄號 20012-019；
- 2) 抗原：自 A431 細胞純化之野生型全長 EGFR；Sigma E2645；
- 3) ELISA 板：NUNC Maxisorp；目錄號 442404；
- 4) 阻斷/稀釋緩衝液：於 PBS-T 中之 1% BSA (PBS-T-1% BSA)；
- 5) 洗滌緩衝液：1 $\times$ PBS/0.05%吐溫 20 (PBS-T)；
- 6) 陽性對照組：爾必得舒、維克替比；
- 7) 陰性對照組：西那吉斯 (Synagis) (Medimmune Inc, 帕利珠單抗 (Palivizumab)，目錄號 NDC 60574-4111-1)；
- 8) 生物素化 EGF 配位體；Invitrogen，目錄號 E3477；
- 9) 鏈黴抗生物素蛋白-HRP，超敏：Sigma S 2438；
- 10) TMB Plus；KemEnTec，目錄號 4390L；

11) 1 M H₂SO₄。

使用 ELISA 競爭檢定將抗 EGFR 抗體抑制生物素化 EGF 配位體與塗佈至 ELISA 孔之全長 EGFR 受體結合之能力分級。如圖 12 中所示，爾必得舒與維克替比似乎皆極有效地阻斷 EGF 配位體結合，而不針對 EGFR 之陰性對照抗體西那吉斯並不抑制 EGF 配位體結合。如圖 12A 中所示，對針對域 III 且識別非重疊抗原決定基之三種抗體 992、1030 及 1042 單獨或以等莫耳混合物形式測試其抑制 EGF 配位體結合之能力。當與爾必得舒及維克替比相比時，三種所測試抗體中僅 mAb 1030 展示適度 EGF 配位體抑制活性。mAb 992、1030 與 1042 之等莫耳混合物在抑制 EGF 配位體結合方面似乎比單獨測試之單一抗體有效。發現 1 μg/ml 之總 IgG 濃度的等莫耳混合物比單獨測試之 mAb 1030 抑制 EGF 配位體結合有效兩倍，且比單獨測試之 mAb 992 及 1042 有效四倍，證明混合識別非重疊抗原決定基之三種域 III 抗體之協同效應。如圖 12B 中所示，在此檢定中亦測試抗 EGFR 純系 1208、1260、1277 及 1320。當與爾必得舒對照物相比時，此四種純系能夠以劑量依賴方式抑制 EGF 配位體結合，該方式比對於純系 992、1030 及 1042 所觀察到者有效。高於 0.33 μg/ml 之濃度的抗 EGFR 純系 1208、1260、1277 及 1320 似乎正如以相同濃度測試之爾必得舒在阻斷 EGF 配位體結合方面同樣有效。

抑制 HN5 細胞中 EGF 誘導之 EGFR 磷酸化的能力

以細胞內西方分析 (in cell western analysis) 測試抗

EGFR 抗體對於 EGFR 磷酸化之活性。該細胞內西方案序使得能夠偵測同一樣本中之 EGFR 及磷酸化 EGFR (pEGFR)，此又使得有可能比較各抗體處理中之 EGFR 與 pEGFR 表現之比率及數據組。根據 ATCC 所提供之說明，將 HN5 細胞培養於補充有 10% FCS 及 pen/strep 之 DMEM 中。將 43,000 個 HN5 細胞接種於 Nunc 之 96 孔板 (目錄號 167008) 中，24 h 後使其饑餓。將細胞在 DMEM 中饑餓 16 h，隨後添加抗體。添加 200 μ l 於 DMEM 中最終濃度為 10 μ g/ml 之抗體且將混合物上下抽吸至少五次以便混合。抗體處理 30 分鐘後，以 50 μ g/ml 之濃度添加 EGF 至適當孔中且保持 7.5 min。基本上按照由細胞內西方套組製造商 (Odyssey, LI-COR biosciences) 所提供之說明執行細胞內西方法。

EGF 刺激後，將細胞於 3.7% 甲醛 (Sigma F-8775，批號 71K500，含有約 1% 甲醇) 中固定 20 分鐘。使用 PBS-Triton X-100 (0.1%) 洗滌五次，每次 5 min 以使細胞膜可滲透，隨後於 LI-COR 阻斷緩衝液 (927-40000) 中阻斷。以對應於所提供說明之濃度添加初級抗體，且在溫和震盪情況下於室溫下培養 2.5 h (總 EGFR 小鼠，1:500 稀釋液，biosource international，目錄號 AHR5062，及磷酸 EGFR Tyr1173，兔 1:100 稀釋液，biosource，目錄號 44-794G)。

與初級抗體一起培養後，用 PBS-T (0.1% 吐溫 20) 洗滌細胞五次歷時五分鐘，在此之後添加二級抗體 (山羊-抗兔 IRDye 680，1:200 稀釋液，LI-COR 目錄號 926-32221，及山羊-抗小鼠，IRDye 800CW 1:800 稀釋液；LI-COR 目錄

號 926-32210) 且在溫和震盪以鋁箔覆蓋之板的情況下於室溫下培養 1 h。

以 Tecan 螢光讀取器量測之前，以 PBS-T 洗滌板五次歷時五分鐘。藉由突然中斷板之投擲運動，向下開孔以去除洗滌液，繼而與紙巾相抵敲擊該板來終止所有洗滌。(與 ELISA 板之處理相同，其重要之處在於應注意：細胞在此處理期間保持在板上，且洗滌液可藉由此程序而非藉由擾亂細胞單層完全性之抽吸移除)。藉由在孔側以多道吸管平緩抽吸移除最後洗滌所剩之任何殘餘洗滌液。對於 680 nm 通道 (激發 675 nm 且發射 705 nm，兩者頻寬皆為 10 nm) 且對於 800 nm 通道 (激發 762 nm 且發射 798 nm，兩者頻寬皆為 10 nm) 量測螢光信號。

使用細胞內西方分析，很明顯三種抗體顯著地 ($p < 0.05$) 影響 HN5 細胞之 pEGFR 狀態；1208、1277 及 1320 抗體 (圖 13)。

測試抗 EGFR 抗體之抗 EGFR 混合物 (992、1030 及 1042) 及其中個別抗體在抑制 EGF 誘導之 EGFR 磷酸化的細胞內西方分析中之效應。如圖 14 中可見，992 及 1030 及抗 EGFR 抗體混合物顯著抑制 EGF 誘導之 EGFR 磷酸化 ($p < 0.05$)。

實施例 5：A431NS 細胞中 EGF 受體之內化

使用 TrypLE 自 80-90% 匯合 T175 培養瓶將 A431NS 細胞 (ATCC# CRL-2592) 胰蛋白酶化。用 PBS 洗滌所分離之細胞且懸浮於無血清之 DMEM 中。將細胞分成 1-2 ml 之部

分且在冰上與所檢驗之抗體一起培養 30 min。抗體濃度為 10 $\mu\text{g/ml}$ 。用 DMEM (250 g, 4 min, 4°C) 洗滌細胞三次且再懸浮於 1.8 ml DMEM 中。將各部分分至六個 FACS 管中，各含有 300 μl 細胞懸浮液。將各部分之三個管置於 37°C 水浴中恰好 40 min 且將其他三個管立即置於冰上。培養後，以 (250 g, 4 min, 4°C) 洗滌細胞兩次且將球粒再溶解於 100 μl DMEM 中之兔抗人類 IgG Fc γ F(ab')₂-FITC 中。於 4°C 下培養細胞 30 min，隨後用 4°C DMEM 洗滌三次，且用 FACSCalibur 分析。

結果展示於圖 15 中。使用爾必得舒及維克替比培養展示約 30% 之同等程度之受體內化，保持 70% 之初始表面染色。單獨使用 992 培養產生約 45% 受體下調。使用含有結合非重疊抗原決定基之兩種額外抗體之抗體混合物培養使受體下調增加：992 + 1024, 74%；992 + 1024 + 1030, 83%。

添加額外抗體並不使受體內化進一步增加。因此，似乎需要至少三種抗體來達成 A431 細胞中最大程度之內化。

實施例 6：增殖檢定

細胞損傷將不可避免地引起細胞保持及提供用於代謝細胞功能及生長之能量的能力的喪失。代謝活性檢定基於此前提。通常其量測線粒體活性。細胞增殖試劑 WST-1 (Roche 目錄號 11 644 807 001) 為量測活細胞代謝活性之即用受質。隨後假定代謝活性與活細胞數目有關。在本實施例中，使用 WST-1 檢定來量測用不同濃度之不同抗體處理後代謝活性細胞之數目。

在執行 WST-1 檢定之前，用補充有 0.5% FBS 及 1% P/S 之 DMEM 將適當抗體及抗體混合物稀釋至 20 $\mu\text{g/ml}$ 之最終總抗體濃度，在具有最高抗體濃度之孔中產生 10 $\mu\text{g/ml}$ 之最終抗體濃度。隨後將 150 μl 此等溶液添加至 96 孔板之第 2 行孔中，且向下直至第 9 行進行三倍連續稀釋以使各孔含有 100 μl 抗體溶液。將 100 μl 培養基添加至第 11 行中。將 200 μl 培養基添加至第 1 列及第 8 列以及第 1 行及第 12 行中以降低實驗孔中培養基蒸發之影響。

隨後用 1 $\times$ PBS 洗滌 A431-NS 細胞且藉由用 3 ml 胰蛋白酶溶液胰蛋白酶化來分離。隨後添加 17 ml 完全培養基且將該等細胞以 300 $\times$ g (1200 rcf) 離心 5 min。移除上清液且使細胞再懸浮於 DMEM + 0.5% FBS 中。對細胞進行計數且將其濃度調整至每毫升 15,000 個細胞。隨後將 100 μl 細胞懸浮液（每孔 1500 個細胞）添加至第 2-11 行中之實驗孔中。在含濕氣恆溫箱中於 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培養板 4 日。隨後每孔中添加 20 μl WST-1 試劑且於 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培養板 1 小時。隨後將板轉移至回轉式盤震盪器中且再保持 1 小時。用 ELISA 讀取器量測 450 及 620 nm（參考波長）下之吸光度。代謝活性細胞（MAC）之量經如下計算為佔未經處理之對照組的百分比：

$$\%MAC = \left(\frac{(OD_{\text{實驗}} - OD_{\text{培養基}})}{(OD_{\text{未經處理}} - OD_{\text{培養基}})} \right) \times 100$$

對於 EGF 滴定研究，將配位體用 DMEM + 0.5% FBS 稀釋至 20 nM/ml 之濃度，在具有最高 EGF 濃度之孔中產生

10 nM/ml 之最終濃度。隨後將 150 μ l 此溶液添加至 96 孔板之第 2 行孔中，且向下直至第 9 行進行三倍連續稀釋以使各孔含有 100 μ l EGF 溶液。將 100 μ l 培養基添加至第 11 行中。將 200 μ l 培養基添加至第 1 列及第 8 列以及第 1 行及第 12 行中以降低實驗孔中培養基蒸發之影響。用補充有 0.5% FBS 及 1% P/S 之 DMEM 將適當抗體及抗體混合物稀釋至 40 μ g/ml 之最終總抗體濃度，在孔中產生 10 μ g/ml 之最終抗體濃度。隨後將 50 μ l 此等溶液添加至 96 孔板中第 2-9 行之孔中。

隨後用 1×PBS 洗滌 A431-NS 細胞且藉由用 3 ml 胰蛋白酶溶液胰蛋白酶化來分離。隨後添加 17 ml 完全培養基且將該等細胞以 300×g (1200 rcf) 離心 5 min。移除上清液且使細胞再懸浮於 DMEM + 0.5% FBS 中。對細胞進行計數且將其濃度調整至每毫升 40,000 個細胞。隨後將 50 μ l 細胞懸浮液（每孔 2000 個細胞）添加至第 2-11 行之實驗孔中。在含濕氣恆溫箱中於 37°C 下培養板 4 日。隨後每孔添加 20 μ l WST-1 試劑且於 37°C 下培養板 1 小時。隨後將板轉移至回轉式盤震盪器中且再保持 1 小時。用 ELISA 讀取器量測 450 及 620 nm（參考波長）下之吸光度。代謝活性細胞之量藉由 450 nm 下之吸光度減去 620 nm 之參考波長下之吸光度來指示。

代謝活性細胞（MAC）之量經如下計算為佔未經處理之對照組的百分比：

$$\%MAC = \left(\frac{(OD_{\text{實驗}} - OD_{\text{培養基}})}{(OD_{\text{未經處理}} - OD_{\text{培養基}})} \right) \times 100。$$

結果

為證明結合域 III 內之非重疊抗原決定基之三種抗 EGFR 抗體的混合物優於單一抗體，執行研究對 A431-NS 生長之抑制之實驗。如圖 16A 中可見，該等抗體單獨為 A431-NS 生長之不良抑制劑，但在組合時可獲得對 431-NS 生長之協同抑制效應。儘管 992 與 1042 或 1030 之混合物亦極有效，但所有三種之混合物在所有抗體濃度範圍上均優於此等混合物。

研究個別抗體及抗體混合物對用不同濃度 EGF 刺激之 A431-NS 細胞生長之效應，且結果展示於圖 17 中。如圖 17 中可見，在不存在抗體之情況下，高於 0.1 nM 之 EGF 濃度對於細胞具有毒性。然而，顯然結合 EGFR 域 III 內之非重疊抗原決定基之三種抗體（992、1030 及 1042）的混合物協同發揮作用抑制存在 EGF（當測試達至少 0.3 nM EGF 時）的情況下 A431-NS 細胞之生長，且混合物優於所有單株抗體。

隨後證明亦可藉由將結合 EGFR 域 III 中之非重疊抗原決定基的兩種抗體與結合 EGFR 域 I 或域 II 中之抗原決定基的抗體組合獲得對 A431-NS 生長之協同抑制效應。如圖 18 中可見，均為 EGFR 域 III 抗體之抗體 992 及 1024 與對 EGFR 域 I 具有活性之抗體（1284）或對 EGFR 域 I/II 具有活性之抗體（1434）的組合如與 EGFR 域 III 內之非重疊抗

原決定基反應之三種抗體（992+1024 + 1030）一樣有效。另外，此等抗體混合物比治療性抗 EGFR 抗體爾必得舒及維克替比在抑制 A431-NS 生長方面更有效。

使用兩種其他癌細胞系 DU145（ATCC#HTB-81）及 MDA-MB-468（ATCC#HTB-132）執行類似檢定。此等增殖檢定之結果展示於圖 16B 及 16C 中。在兩種情況下，三種抗體（992、1030 及 1042）之混合物均優於兩種抗體之混合物及單一抗體。在 DU145 細胞中，三種抗體之混合物在所有濃度下均優於維克替比，且在 MDA-MB-468 中，在高濃度下優於維克替比。

使用類似於上述方法之方法測試三種抗 EGFR 抗體之不同組合。

結果

在 A431NS 細胞系中研究三種抗體之不同組合的效應。其中二十個最有效者之生長抑制活性展示於圖 37 中。與未經處理之對照組相比，所有該等組合抑制 A431NS 細胞系之增殖大於 60%。另一有趣之觀察結果為除組合（992+1024+1254 及 992+1024+1320 及 992+1277+1320）外，該等組合含有結合非重疊抗原決定基之抗體。由此可見，有可能設計結合獨特抗原決定基之三種抗體的若干組合。

實施例 7：凋亡

凋亡為引起細胞死亡之生物機制。先前已藉由使用抗 EGFR 抗體（諸如爾必得舒）報導過此機制（Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy-focus on cetuximab.

Eur J Cancer. 2001 年 9 月:37, 增刊 4:S16-22)。其因此研究至以下程度，個別抗 EGFR 抗體 992、1042 及 1030 以及其混合物（992+1042+1030）能夠誘導凋亡。

在三重測定中將 1×10^4 個 A431NS 細胞在 96 孔培養板中補充有 0.5% FBS 及抗生素之 DMEM 中，在 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 至 10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度範圍內之 EGFR 混合物（相等份數之 992、1030、1042）、992、1030、1042、爾必得舒或維克替比存在下培養。培養細胞及抗體 22 h。隨後收集上清液且以來自 Roche，目錄號：11774425001 之 ELISA 套組（Basel, Switzerland）量測組蛋白質-DNA 複合物之存在。

使用 A431NS 細胞來比較混合物與單獨單株抗體中之每一者以及與參考抗體維克替比及爾必得舒之效應（結果參見圖 19）。以 10 倍稀釋液測試該等抗體。當以 1 $\mu\text{g/ml}$ 及 10 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度測試時，與個別單株抗體以及維克替比相比混合物顯著（ $P < 0.05$ ）更有效。在 1 $\mu\text{g/ml}$ 下，與爾必得舒相比，混合物在統計上顯著（ $p < 0.05$ ）增加凋亡。

實施例 7b

除實施例 7 外，根據與實施例 7 中所述相同之方法對於 992+1024 之混合物以及 992+1024+1030 之混合物的凋亡活性進行研究（圖 35）。實際凋亡程度與最大陽性對照組有關。使用 A431NS 細胞，以 1 $\mu\text{g/ml}$ ，將該兩種混合物與爾必得舒及個別單株抗體 992、1024 及 1030 以及對照抗體相比較。992+1024 之混合物顯著優於爾必得舒及個別單株抗體（所有 $P < 0.05$ ）。

實施例 8：活體內功效

對於由抗體 992、1030 及 1042 所組成之抗 EGFR 混合物在使用 A431NS 細胞之裸鼠異種移植模型中研究其活體內功效。此為廣泛使用之用於研究單株抗癌症抗體（包括抗 EGFR 抗體）之效力的模型。裸鼠免疫功能不全且缺乏 T 細胞。此使得人類細胞可生長於該小鼠中。

向兩組 6-8 週裸鼠皮下注射 1×10^6 個 A431NS 細胞。當平均腫瘤尺寸達到 100 mm^3 時開始處理。使小鼠以 2-3 日間隔接受腹膜內注射 1 mg 抗體五次。使用數位測徑器以兩個直徑量測腫瘤尺寸，且使用下式計算體積：腫瘤體積 (mm^3) = $L \times W^2 \times 0.5$ ，其中 L 為最長直徑且 W 為最短直徑（Teicher BA, Tumor Models in Cancer Research. Humana Press, NJ, USA 2002; 第 596 頁）。實驗結束時，切除腫瘤且稱重。

將西那吉斯用作對照抗體。該實驗亦包括使用與抗 EGFR 混合物（抗體 992、1030 與 1024）相同之時程以相同量之爾必得舒及維克替比處理。

如圖 20 中可見，992、1030 與 1042 之混合物顯著抑制 A431NS 之腫瘤生長 ($P < 0.05$)。平均重量展示於圖 21 中。結果與所量測之腫瘤尺寸相關。處理組與對照組之間存在顯著差異。

實施例 8b：活體內功效

除實施例 8 中所述之活體內實驗外，在上述 A431NS 異種移植模型中研究 992+1024 及 992+1024+1030 之混合物（圖 36）。向每組有 9 隻 6-8 週裸鼠之四個組皮下注射 1×10^6

個 A431NS 細胞。當平均腫瘤尺寸達到 100 mm^3 時，小鼠接受第一次抗體注射。三個組接受 992+1024、992+1024+1030 之混合物、爾必得舒或對照抗體西那吉斯。小鼠總共接受 17 次 0.5 mg 注射，一週 4 次。第一次注射在第 8 日給予且最後一次注射在第 34 日給予。量測腫瘤尺寸歷時 56 日。終止抗體處理後，接受爾必得舒之小鼠腫瘤之尺寸開始擴大，而對於接受 992+1024 或 992+1024+1030 之混合物之兩組中之小鼠而言，腫瘤尺寸繼續減小。對於 992+1024 組，在第 91 日（終止處理後 57 日）未觀察到腫瘤尺寸擴大。在第 56 日，992+1024 之組合的平均腫瘤尺寸顯著 ($P < 0.01$) 小於接受爾必得舒之小鼠的平均腫瘤尺寸。

亦監測該實驗中小鼠之存活率。當腫瘤達到最大允許尺寸時將小鼠記為死亡。下表展示接種腫瘤細胞後 56 日存活小鼠之數目。與爾必得舒相比，兩個組合皆可見提高之存活率。

組	992+1024	992+1024+1030	爾必得舒	對照抗體
初始小鼠數目	9	9	9	9
在第 56 日剩餘之小鼠	9	9	2	0

其他實驗

實施例 8 中所述之異種移植實驗之腫瘤溶胞物的初步資料展示 992+1042+1030 之組合誘導 A431NS 產生 VEGF 的有效下調，VEGF 為血管生成之重要介體。血管形成增加為許多實體腫瘤中可見之現象，其為一種參與持續提供養

分等之機制，從而影響存活條件。

此外，其他初步資料展示，當與爾必得舒及維克替比相比時，實施例 8 中所述之異種移植實驗之腫瘤溶胞物中可觀察到 992+1042+1030 之抗體組合量增加。

實施例 8c：增強之活體內腫瘤細胞分化

細胞之終末分化為包括細胞類型特異性基因表現程式活化之複雜過程，其引入使細胞增殖能力不可逆喪失之多步過程。在惡性疾病中，癌細胞通常處於特徵為增殖速率增加之去分化狀態，且提示能夠誘導癌細胞終末分化之藥物能夠去除惡性細胞且重建正常細胞體內平衡 (Pierce GB, Speers WC : Tumors as caricatures of the process of tissue renewal : prospects for therapy by directing differentiation. Cancer Res 48:1996-2004, 1988)。在某些實驗條件下，先前已報導抗 EGFR 單株抗體能夠使作為異種移植腫瘤在免疫受損小鼠中生長之人類鱗狀癌細胞終末分化之速率增加 (Milas L, Mason K, Hunter N, Petersen S, Yamakawa M, Ang K, Mendelsohn J, Fan Z: In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 antiepidermal growth factor receptor antibody. Clin Cancer Res 6:701-8, 2000 ; Modjtahedi H, Eccles S, Sandle J, Box G, Titley J, Dean C: Differentiation or immune destruction: two pathways for therapy of squamous cell carcinomas with antibodies to the epidermal growth factor receptor. Cancer Res 54:1695-701, 1994)。

吾人以組織學方式檢驗抗 EGFR 處理之作為異種移植

物在小鼠中生長之 A431NS 細胞的終末分化程度。該組織學研究包括自實施例 8 中所述之實驗的四個實驗組中之每一者隨機選擇之 3 個小鼠異種移植腫瘤。

將組織剖開且瞬間冷凍，隨後與 Tissue-Tek 一起安裝於低溫切片機（Leitz，型號 1720）上，切成 5 μm 之切片且在 superfrost plus 載玻片上製成樣本，隨後經處理以供蘇木素（hematoxylin）/伊紅（eosin）染色。隨後兩個獨立觀察者以不知情方式進行所有組織切片之顯微鏡檢驗，對角質化區域（「角質珠」）評分作為終末分化程度之量度（Modjtahedi 等人，1994）。表 7 列出所獲得之結果。與用參考抗體爾必得舒及維克替比處理之小鼠（分別為第 2 組及第 3 組）相比，用三種抗 EGFR 抗體之混合物處理之小鼠（992+1024+1030，第 1 組）具有顯著較大且較多之終末分化癌細胞之集中區（foci）。在接受 PBS 替代抗體之對照組（第 4 組）中未偵測到終末分化。

使用裝備有數位相機之顯微鏡獲得代表性顯微圖像，參見圖 26。

總之，與爾必得舒及維克替比單株抗體相比，結合域 III 內之非重疊抗原決定基之三種抗 EGFR 抗體（純系 992、1030 及 1042）之組合展示對活體內腫瘤細胞出乎意外之增強之分化誘導效應。所觀察到之對終末分化之效應得出以下結論：本發明之抗體組成物可用於與其他分化誘導劑（諸如視網酸、4-丁酸苯酯）之組合療法中。

表 7

組	腫瘤數目	角質珠數目之評分	註解
1	16	++++	大角質珠
1	17	+++	大角質珠
1	54	++++	大角質珠
2	14	++	小角質珠
2	45	++	小角質珠
2	49	++	小角質珠
3	11	++	小角質珠
3	34	++	小角質珠
3	56	++	小角質珠
4	43	-	
4	60	-	
4	31	-	

實施例 8d：本發明之抗體組成物之持續生長抑制效應

重複執行實施例 8 及 8b 中所提供之腫瘤異種移植實驗以研究 992+1024 抗體混合物之活體內功效。簡言之，向 BALB/c *nu/nu* 小鼠皮下注射 10^6 個 A431NS 細胞至側腹 (flank) 中。允許腫瘤異種移植物生長至 100 mm^3 之平均腫瘤尺寸 (第 7 日)，此時將小鼠隨機分成五組，每組九隻動物，且開始抗體處理。該等五組接受高劑量 (每週 2 mg) 或低劑量 (每週 1 mg) 之 992+1024 混合物或參考抗體爾必得舒，或高劑量 (每週 2 mg) 之對照抗體西那吉斯。所有小鼠總共接受 9 次 0.5 或 1 mg 抗體注射，每週兩次，在第 7 日開始且在第 33 日結束。

當與爾必得舒相比時，高劑量 (每週 2 mg) 992+1024 混合物在控制初始腫瘤生長及誘導長期腫瘤消退方面極有效 ($P = 0.0002$ ，圖 38)。每週接受 2 mg 992+1024 混合物

之動物在研究期間（實驗開始後 118 日，圖 38 及 39）均未死亡，與第 60 日僅九分之一動物剩餘之高劑量（每週 2 mg）爾必得舒組相比為顯著較佳之結果（ $P = 0.0008$ ，圖 39）。此證明 992+1024 處理對長期存活之持續效應。儘管不及高劑量有效，但低劑量 992+1024 混合物（每週 1 mg）亦能夠控制腫瘤生長，且與高劑量（每週 2 mg）爾必得舒相比當考慮腫瘤抑制（ $P = 0.0135$ ，圖 38）與存活率（ $P = 0.0087$ ，圖 39）時均顯著較佳。此等結果證明 992+1024 組合甚至在低劑量下當與爾必得舒相比時具有優良的效力。與已獲准之單株抗體相比，該等結果亦證明由 992+1024 組合產生之持續生長抑制。

實施例 9：球狀體生長

為進行球狀體研究，向圓底 96 孔板中添加 35 μ l 120 mg/ml 聚 HEMA 溶液且使其在流動通風櫃中蒸發隔夜。聚 HEMA 預防細胞黏附。對 A431-NS 細胞進行如上處理、計數，且將其濃度調整為每毫升 100,000 個細胞。隨後將 50 μ l 細胞懸浮液（每孔 5,000 個細胞）以及 50 μ l 5% 瑪崔膠（matrigel）溶液添加至第 2-11 行之實驗孔中。將 200 μ l 培養基添加至第 1 列及第 8 列以及第 1 行及第 12 行中以降低實驗孔中培養基蒸發之影響。將板以 300 $\times$ g 離心 5 分鐘且使其在含濕氣恆溫箱中於 37°C 下成型（form）隔夜。次日將適當抗體及抗體混合物在空 96 孔板中稀釋至 20 μ g/ml 之最終總抗體濃度。在補充有 0.5% FBS 及 1% P/S 之 DMEM 中進行此操作，在具有最高抗體濃度之孔中產生 10 μ g/ml

之最終抗體濃度。隨後將 150 μ l 此等溶液添加至 96 孔板之第 2 行孔中，且向下直至第 9 行進行三倍連續稀釋以使各孔含有 100 μ l 抗體溶液。將 100 μ l 培養基添加至第 11 行中。隨後將 100 μ l 此等溶液轉移至含有球狀體之板中且使其培養 7 日。隨後每孔添加 20 μ l WST-1 試劑，且於 37°C 下培養板 1 小時。隨後將板轉移至回轉式盤震盪器中且再保持 1 小時。用 ELISA 讀取器量測 450 及 620 nm (參考波長) 下之吸光度。代謝活性細胞 (MAC) 之量經如下計算為佔未經處理之對照組的百分比：

$$\%MAC = \left(\frac{(OD_{\text{實驗}} - OD_{\text{培養基}})}{(OD_{\text{未經處理}} - OD_{\text{培養基}})} \right) \times 100。$$

結合域 III 內之非重疊抗原決定基之三種抗體的混合物 (992+1030+1042) 有效抑制 A431-NS 球狀體之生長，且比單株治療性抗 EGFR 抗體爾必得舒及維克替比更有效 (圖 22)。

實施例 10：與獼猴 EGFR ECD 之結合

獼猴 EGFR 細胞外域之選殖

由自表皮分離之獼猴 cDNA，藉由使用巢式 PCR 及來源於公開之全長人類 EGFR 序列之序列特異性引子 (GENBANK X00588，Ullrich, A. 等人，Nature 309(5967), 418-425(1984)) 選殖不包括信號肽之獼猴 EGFR 細胞外域。

PCR 試劑：

自正常皮膚表皮分離之獼猴 cDNA: CytoMol Unimed, 目錄號: ccy34218, 批號: A711054。

Phusion 反應緩衝液 (5×): Finnzymes, 目錄號: F-518, 批號: 11。

Phusion 酶: Finnzymes, F-530S (2 U/μL)。

dNTP 25 mM: Bioline, 目錄號: BIO-39029, 批號: DM-103F。

用於擴增包括部分信號序列及跨膜域之獼猴 EGFR ECD 之引子:

5' ATG 引子: 5'-TCTTCGGGAAGCAGCTATGC-3' (SEQ ID NO 135);

3' Tm 2 引子: 5'-TTCTCCACTGGGCGTAAGAG-3' (SEQ ID NO 136)。

用於巢式 PCR 擴增獼猴 EGFR ECD Bp1-1863 且在跨膜域之前併入 XbaI、MluI 限制性位點及終止密碼子之引子:

5' EGFR XbaI:

5'-ATCTGCATTCTAGACTGGAGGAAAAGAAAGTTTGCCAA GGC-3' (SEQ ID NO 137);

3' EGFR MluI:

5'-TACTCGATGACGCGTTTAGGATGGGATCTTAGGCCCGT TCC-3' (SEQ ID NO 138)。

PCR 條件:

30 個循環: 98°C/30 sec 解鏈, 55°C/30 sec 退火, 72°C/60 sec 延伸。30 個循環後, 使 PCR 產物再延伸 5 min。

使用 1 μ l 模板及 2 單位 Phusion 酶在總體積為 50 μ L 之含有 0.2 mM dNTP、0.5 μ M 引子之反應緩衝液中執行 PCR 反應。

獲得具有約 1800-1900 Bp 之表觀長度的最終 PCR 條帶，且選殖至表現載體中。所選殖之獼猴 EGFR 細胞外域之 DNA 及蛋白質序列展示於圖 23 中，且與人類 EGFR ECD 排比之獼猴 EGFR ECD 蛋白質序列展示於圖 24 中。人類 EGFR ECD 與獼猴 EGFR ECD DNA 序列之排比展示 97.6% 之序列一致性，而相應蛋白質序列排比展示 98.6% 之序列一致性。

ELISA 中人類與獼猴 EGFR 之細胞外域之間的抗體交叉反應性之證明

為證實所測試抗 EGFR 抗體與人類及獼猴 EGFR ECD 之結合同樣良好且因此批准獼猴中之毒理學研究，藉由 ELISA 針對與重組人類及獼猴 EGFR ECD 蛋白質之結合測試自 1 μ g/ml 開始連續四倍稀釋之抗體。認為在此檢定中展示相同結合特徵之抗體為良好物種 EGFR 交叉反應性之指示。於 4°C 下用每孔 50 μ l 於 PBS 中濃度為 1 μ g/ml 之全長 EGFR 塗佈 ELISA 孔隔夜。次日早晨用 PBS-T 洗滌孔兩次且於室溫下用 100 μ l PBS-T-1% BSA 阻斷 1 小時，繼而用 PBS-T 洗滌兩次。隨後將 50 μ l 連續稀釋之抗 EGFR 抗體及對照抗體添加至孔中且於室溫下培養 1 小時。抗體培養後，用 PBS-T 洗滌孔五次，繼而與每孔 50 μ l 用阻斷緩衝液以 1:3000 稀釋之鏈黴抗生物素蛋白-HRP 二級試劑一起培養且於室溫下培養 30 min。最終用 PBS-T 洗滌孔五次且藉由每

孔添加 50 μ L TMB 受質且於室溫下培養使板顯色。培養後，藉由每孔添加 100 μ l 1 M H_2SO_4 使反應終止；且於 OD 450nm 下讀取板。

ELISA 試劑：

1. ELISA 板：NUNC Maxisorp；目錄號：442404；
2. 抗原：人類 rEGFR ECD；獼猴 rEGFR ECD；
3. 塗佈緩衝液：1 $\times$ PBS；Gibco 目錄號 20012-019；
4. 洗滌緩衝液：1 $\times$ PBS/0.05%吐溫 20 (PBS-T)；
5. 阻斷/稀釋緩衝液：於 PBS-T 中之 1% BSA；
6. 山羊-抗人類 IgG HRP 結合物：Serotec, Star 106P；
7. TMB Plus (KemEnTec 目錄號 4390L)；
8. (1 M H_2SO_4)。

如圖 25 中所示，所述 ELISA 檢定可辯別交叉反應之人類及獼猴抗 EGFR ECD 抗體（圖 25 A）與僅識別小鼠免疫所用之人類 EGFR ECD 之物種特異性抗體（圖 25B）。

實施例 11：活動力之抑制

大多數癌症死亡係源於腫瘤細胞之播散及於遠處位置中之後續生長。局部侵襲相鄰正常組織損害體內平衡功能且妨礙腫瘤之手術或放射性切除。最近的研究已指出誘導出之活動力在促進此擴散中所發揮的主要作用。已知 EGFR 促進細胞活動力及擴散，且因此抑制 EGFR 介導之活動力為 EGFR 靶向藥物之重要機制。

研究兩種抗體 992 與 1024 之混合物對頭頸部癌細胞系活動力之效應。如實施例 9 中所述製備由 10,000 個細胞所

組成之球狀體隔夜。隨後將球狀體轉移至 NUNC T25 細胞培養瓶中且使其黏附隔夜。隨後添加 10 $\mu\text{g/ml}$ 抗體混合物 992+1024 或陰性對照抗體，且將球狀體再培養 24 小時。在 40 倍放大率下採集圖像且使用軟體 Image J 量測由細胞覆蓋之面積。

結果：如圖 27A 中可見，添加 EGFR 特異性抗體 992 與 1024 使由腫瘤細胞覆蓋之面積顯著減小。在圖 27B 中將活動力定量，該圖展示，與陰性對照抗體相比，活動力降低約 60%。此活動力降低為高度顯著的 $p < 0.01$ 。

因此，抗體 992 與 1024 之組合有效抑制 EGFR 介導之腫瘤細胞活動力，其表明抗 EGFR 抗體之組合可用於治療播散性疾病。

實施例 12：Sym004 抗體組成物對套膜蛋白之上調

套膜蛋白為早期鱗狀細胞分化之標記且為參與角質化外殼形成之蛋白質。因此套膜蛋白含量可用作已分化腫瘤細胞之數目的量度。使用市售套膜蛋白 ELISA 套組 (Biomedical Technologies) 來估算在來自未經處理或用爾必得舒、維克替比或抗體 992+1030+1042 之混合物處理之 A431NS 異種移植腫瘤之蛋白質溶胞物中的套膜蛋白之含量。藉由使用 Qiagen 之 TissueLyzer 使 30-40 mg 腫瘤組織在 1 ml RIPA 緩衝液中均質化來製備腫瘤溶胞物。使用 Pierce 之 BCA 蛋白質檢定套組測定各澄清溶胞物中之蛋白質濃度，且使用 ELISA 檢定估算在各樣本之 0.4 μg 蛋白質中套膜蛋白之含量。

結果：如圖 27 中可見，與陰性對照組及爾必得舒或維克替比處理組相比，發現 992+1030+1042 處理組中之套膜蛋白含量顯著較高。因此抗體 992、1030 及 1042 之組合提高 A431NS 異種移植腫瘤中套膜蛋白之含量，且因此可能誘導較高程度之 A431NS 分化。該結果與此特定處理組中所發現之大量角質珠（參見實施例 8）充分一致。

實施例 13：Sym004 抗體組成物使 EGFR 內化

一些抗體藉由誘導其表面標靶之內化而發揮功能。已知 EGFR 在被諸如 EGF 之配位體活化時經歷內化。

使用共聚焦顯微鏡術研究兩種抗體 992 與 1024 之混合物誘導 EGFR 內化之能力。將 A431NS 及 HN5 細胞接種於 LabTek 之 8 孔腔室載玻片中，且在含有 0.5% FBS 之 DMEM 中培養隔夜。隨後向細胞添加 10 $\mu\text{g/ml}$ 經 Alexa-488 標記之 992+1024 抗體混合物或對照抗體爾必得舒，且隨後培養不同時段。隨後使用具有大針孔或小針孔之 Biorad 共聚焦顯微鏡在 60 倍放大率下採集圖像。

結果：如圖 29A 中所示，添加經 Alexa-488 標記之 EGFR 特異性抗體 992 及 1024 歷時 2 小時使得抗體在 A431NS 與 HN5 細胞系之細胞內小泡中累積。相比之下，爾必得舒主要存在於細胞表面。圖 29B 展示使用較小針孔獲得之 A431NS 細胞圖像，該較小針孔產生較薄細胞切片之圖像。由此等圖像很明顯，抗體 992+1024 位於細胞內而爾必得舒主要存在於細胞表面。圖 30 展示 992+1024 介導之內化的時間範圍，且早在添加抗體後 30 分鐘，可在細胞內小泡中

發現該等抗體。4 小時後，幾乎所有抗體 992+1024 均在細胞內發現，而表面染色較低或較弱。相比之下，爾必得舒保留於細胞表面。亦獲得證據展示由 992+1024 誘導之內化使得細胞中之 EGFR 持續降解且移除。

因此抗體 992 與 1024 之組合迅速且有效地誘導 EGFR 內化，而爾必得舒不能。

實施例 14：使用表面電漿共振量測抗體親和力。

Sym004 IgG 抗體針對重組可溶性 EGFR ECD 之單價親和力 (monovalent affinity) 之量測。

在 BIAcore 2000 上使用如 Canziani, Klakamp 等人，2004, Anal. Biochem, 325:301-307 中所述之檢定執行本發明之全長 IgG 抗體之動力學分析，使得可量測完整 IgG 分子針對可溶性抗原之單價親和力。簡言之，根據製造商說明使約 10,000 Ru 之多株抗人類 IgG Fc 抗體與 CM5 晶片表面結合，繼而在抗 Fc 晶片表面上捕獲 25 µg 本發明之個別抗 EGFR 抗體或西那吉斯陰性對照組。對於各純系優化捕獲之 IgG 之密度，以使該檢定中所使用之最高抗原濃度之結合不超過 25 Ru。隨後將 250 µL 先前藉由凝膠排阻層析法展示僅含有單價蛋白質之可溶性人類 EGFR ECD 以 25 µL/min 之流速以 HBS-EP 緩衝液中之連續兩倍稀釋液注射以產生反應曲線。在循環之間藉由 10 秒注射 100 mM H₃PO₄ 去除所捕獲之抗體/抗原複合物使晶片表面再生。藉由首先減去含有陰性對照抗體西那吉斯之流動單元的反應，繼而減去由僅注射 HBS-EP 緩衝液產生之反應，執行動力學分析

(「雙重參考」, double referencing)。由所產生之感應圖 (sensogram) 使用製造商所提供之 BIA 評估軟體 4.1 全面評估締合速率常數 (k_a) 及解離常數 (k_d)。

試劑：

1. CM5 晶片：Biacore，目錄號 BR-1000-14；
2. NHS：Biacore BR-1000-50；
3. EDC：Biacore BR-1000-50；
4. 10 mM 乙酸鹽緩衝液 (pH 4.5)：Biacore，目錄號 BR-1003-50；
5. 山羊抗人類 IgG Fc：Caltag，目錄號 H10500；
6. 乙醇胺，1.0 M，pH 8.5：Biacore BR-1000-50；
7. 10×HBS-EP 電泳緩衝液：0.01 M HEPES (pH 7.4)、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.005% v/v 界面活性劑 P20；
8. 抗原：具有 6×His 之人類 EGFR 細胞外域；
9. 100 mM H_3PO_4 。

所計算出之本發明之全長 IgG 針對可溶性人類 EGFR ECD 的單價親和力展示於下表 8 中。

表 8. 所量測出之抗 EGFR IgG 抗體針對可溶性受體之親和力。抗體量測係藉由在 Biacore 2000 上使用製造商所提供之評估軟體作表面電漿共振分析而執行。*992 之親和力係藉由 Scatchard 分析來測定。NA：不適用。

IgG	k_{ON} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	K_D (nM)
992*	NA	NA	0.2	170.0
1024	1.8E+05	4.9E-03	2.4	26.7
1030	1.3E+04	3.7E-04	31.1	29.2
1254	8.1E+04	1.0E-03	11.3	12.7
1260	3.7E+04	1.6E-04	74.1	4.2
1261	1.7E+05	3.2E-03	3.6	18.6
1277	1.3E+05	5.3E-05	217.6	0.4
1284	3.2E+04	1.5E-04	78.1	4.6
1320	1.2E+05	2.8E-03	4.1	24.2
1347	2.4E+04	5.0E-04	22.9	21.4

大多數所測試之 Sym004 抗體以在 10-20 nM 範圍內之親和力識別可溶性人類 EGFR ECD，除 1260、1277 及 1284 分別具有 4.2 nM、0.4 nM 及 4.6 nM 之較高親和力以外。最終發現 992 以比其他所測試抗體低得多的親和力結合可溶性 EGFR ECD。因此，此抗體之動力學分析須藉由 Scatchard 分析測定，該分析揭示針對可溶性人類 EGFR ECD 之 170 nM 之親和力。

Sym004 Fab 抗體針對經固定重組 EGFR ECD 之親和力的量測

為研究以可溶性與固定形式存在之 EGFR ECD 之間的抗原呈現之可能差異，對稱為 EGFR-Fc 之由融合至人類 IgG Fc 之人類 EGFR ECD 所組成之經固定嵌合 EGFR 受體抗原 (R&D Systems, 344-ER) 執行一種新的親和力量測。出於此目的，產生 IgG 抗體 992、1024 及 1030 之 Fab 片段以使得可量測單價親和力。

Fab 產生：

使用 Pierce 之 Fab 製備套組且根據製造商說明藉由木瓜蛋白酶消化產生 992、1024 及 1030 之 Fab 片段。簡言之，根據製造商說明，在 NAP-5 管柱 (Amersham Biosciences) 上用新鮮製備之含有 20 mM 半胱氨酸-HCl 之消化緩衝液 (pH 7.0) 對 2 mg 各 IgG 抗體進行緩衝液更換。隨後用相同消化緩衝液將木瓜蛋白酶珠粒之 350 μ l 漿液洗滌兩次，隨後將該等珠粒離心且棄去上清液。藉由將 1 ml 經緩衝液更換之 IgG 抗體添加至珠粒中，且於 37°C 下以 1000 rpm 震盪之情況下培養隔夜來消化抗體。次日早晨，藉由以 HiTrap Protein A 管柱 (GE Healthcare) 去除全長 IgG 將未消化之 IgG 自粗 Fab 分離。最終用 PBS 將所產生之 Fab 透析隔夜且用 SDS-PAGE 在還原及非還原條件下分析。認為非還原條件下約 50 kDa 之蛋白質條帶為 Fab 成功產生之指示。

試劑：

1. ImmunoPure Fab 製備套組；Pierce；目錄號 44885；
2. NAP5 脫鹽管柱；Amersham，目錄號 17-0853-02；
3. PBS (pH 7.2)；Gibco；#20012-019；
4. HiTrap Protein A HP，1 ml 管柱；GE Healthcare；#17-0402-01；
5. NuPAGE 4-12% Novex Bis-Tris 凝膠；Invitrogen；#NP0322BOX；
6. 分子標記；Seeblue Plus 2；Invitrogen；#LC5925；
7. 抗 EGFR 抗體 - 各 2.0 mg。

本發明之 Fab 抗體之動力學分析係以 Biacore 2000 使用以極低密度固定於感應器表面上之重組抗原以避免成群轉移 (mass transport) 之限制來執行。簡言之，根據製造商之說明書，使總共 285 Ru 重組 EGFR ECD-Fc 嵌合體 (R&D Systems，目錄號 344-ER) 與 CM5 晶片表面結合。隨後將來源於本發明之抗體的 Fab 片段以起始於經優化濃度之連續兩倍稀釋液測試，當在具有經固定 EGFR 晶片上測試時該經優化濃度不產生高於 25 之 Ru 最大值。藉由首先減去由僅注射 HBS-EP 緩衝液產生之反應執行動力學分析。由所產生之感應圖使用製造商所提供之 BIA 評估軟體 4.1 全面評估締合速率常數 (ka) 及解離常數 (kd)。

所計算出之本發明之所測試 Fab 片段針對經固定人類 EGFR ECD 的親和力展示於下表 9 中。

表 9：所量測出之抗 EGFR Fab 抗體針對經固定受體之親和力。抗體量測係藉由在 BIAcore 2000 上使用製造商所提供之評估軟體作表面電漿共振分析而執行。*992 之親和力係藉由 Scatchard 分析來測定。NA：不適用。

Fab	k _{ON} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (1/s)	t _{1/2} (min)	K _D (nM)
Fab 992*	N.A.	N.A.	0.2	150.0
Fab 1024	1.9E+05	4.9E-03	2.3	25.6
Fab 1030	8.7E+04	2.0E-04	57.5	2.3

如以上表 9 中所呈現，發現 992 及 1024 之 Fab 片段分別具有與先前實施例中所呈現之親和力一致的 150 nM 及 26 nM 之親和力，此說明對於此兩種抗體而言，針對可溶性

及固定 EGFR 之抗體識別存在較小差異。然而，與可溶性受體相比，抗體 1030 針對固定抗原展現 2.3 nM 之高十倍的親和力，且因此優先識別暴露於固定抗原上之抗原決定基。

實施例 15：EGFR 抗原呈現呈現研究及對 A431-NS 細胞之功能性親和力之分級。

A431-NS 細胞與經純化全長 EGFR 受體之抗原呈現之間的比較。

由於動力學分析揭示抗體 992 以 150-170 nM 之間的親和力識別重組 EGFR ECD，故研究是否該弱親和力歸因於與自 A431 細胞純化之重組 EGFR ECD 或全長 EGFR 上所呈現之構形相比，mAb 992 優先結合表現於 A431-NS 細胞上之 EGFR 之天然構形之事實。為研究 EGF 受體抗原呈現差異，使用 Fab 片段執行本發明之抗體亞群的同步 ELISA 結合研究以避免對所測試 A431-NS 細胞及來自相同細胞之經純化全長 EGFR 之親和力影響。

Fab 產生：如實施例 14 中所述執行 Fab 片段之產生。

間接 ELISA：為進行間接 ELISA，於 4°C 下以於碳酸酯緩衝液中之 1 µg/ml（每孔 50 µl）塗佈全長 EGFR（Sigma E2645）隔夜。次日早晨用 PBS-T 洗滌孔兩次且於室溫下用含有 1% BSA 之 PBS-T 阻斷 1 小時，繼而用 PBS-T 洗滌兩次。隨後將 50 µl Fab 抗體於含有 1% BSA 之 DMEM 中之連續稀釋液添加至獨立 ELISA 孔中且於室溫下培養 1 小時，在此之後用 PBS-T 洗滌孔四次。隨後添加 50 µl 用含有 1% BSA 之 DMEM 以 1:5000 稀釋的二級山羊-抗人類（Fab 特異

性) HRP 結合物，且在冰上培養 30 min。最終，用 PBS-T 洗滌孔四次，且藉由每孔添加 50 μ l TMB 受質使板顯色，且於 620 nm 下每 5-15-30 min 進行讀取。與受質一起培養後，藉由添加 1 M H_2SO_4 終止反應，且於 450 nm 下讀取吸光度。

試劑，間接 ELISA：

- 1) 塗佈緩衝液：50 mM 碳酸酯緩衝液，pH 9.8；
- 2) 抗原：自 A431 細胞純化之野生型全長 EGFR；Sigma E2645；
- 3) ELISA 板：NUNC Maxisorp；目錄號：442404；
- 4) 洗滌緩衝液：1 $\times$ PBS/0.05%吐溫 20 (PBS-T)；
- 5) 阻斷/稀釋緩衝液：於 PBS-T 中之 1% BSA(PBS-T-1% BSA)；
- 6) 抗體稀釋緩衝液：含有 1% BSA 之 DMEM；
- 7) 山羊-抗人類 (Fab 特異性) HRP 結合物：Jackson，目錄號 109-035-097；
- 8) TMB Plus 受質：KemEnTec，目錄號 4390L；
- 9) 1 M H_2SO_4 。

細胞 ELISA：藉由對 A431-NS 細胞進行抗體滴定測定定義為產生半數最大 OD (ED50) 之莫耳濃度的相對結合親和力。簡言之，使 10,000 個 A431-NS 細胞於 37°C 下 5% CO_2 下在含有添加有 0.5% FCS 及 1% P/S 的 DMEM 之 96 孔 ELISA 板中生長隔夜。次日早晨用 PBS 洗滌匯合細胞（每孔約 20,000 個）兩次，且藉由於室溫下與 1% 三聚甲醛溶液

一起培養 15 min 固定，繼而用 PBS 洗滌四次。隨後，將所測試之 EGFR 抗體及陰性對照抗體西那吉斯在含有 1% BSA 之 DMEM 中連續稀釋，且將 50 μ l 各稀釋液添加至孔中且於室溫下培養 1 小時，在此之後用 PBS 洗滌孔四次。隨後添加 50 μ l 用含有 1% BSA 之 DMEM 以 1:5000 稀釋的二級山羊-抗人類 (Fab 特異性) HRP 結合物，且在冰上培養 30 min。最終，用 PBS-T 洗滌孔四次，且藉由每孔添加 50 μ l TMB Plus 受質使板顯色，且於 620 nm 下每 5-15-30 min 進行讀取。與受質一起培養後，藉由添加 1 M H_2SO_4 終止反應，且於 450 nm 下讀取吸光度。藉由減去僅與二級試劑結合之平均本底，繼而藉由繪製相對於所測試之各抗體之最大結合%校正結合曲線來計算表示為 ED50 值之功能性親和力。

試劑，細胞 ELISA：

- 1) DMEM 培養基：Gibco，目錄號 41966-029；
- 2) FCS：Gibco，目錄號 10099-141；
- 3) Pen strep (P/S)：Gibco，目錄號 15140-122；
- 4) ELISA 板：Costar，目錄號 3595；
- 5) 洗滌緩衝液 (PBS)：Gibco 目錄號 20012-019；
- 6) 抗體稀釋緩衝液：含有 1% BSA 之 DMEM；
- 7) 細胞固定液：BD Biosciences，目錄號 340181；
- 8) 山羊-抗人類 (Fab 特異性) HRP 結合物：Jackson，目錄號 109-035-097；
- 9) TMB Plus 受質：KemEnTec，目錄號 4390L；

10) 1 M H_2SO_4 。

用同步 ELISA 結合研究，使用相同二級抗體試劑及培養時間來測定 A431-NS 細胞上所表現之 EGF 受體與來自相同細胞之經純化受體之抗原呈現差異。結果展示於圖 31 中。該實驗清楚展示當與相同濃度之 Fab 1030 之結合相比時，Fab 抗體 992 及 1024 與塗佈於 ELISA 孔中之經純化全長 EGFR 結合較弱。然而，當用所有三種 Fab 均對其展示強結合活性之 A431-NS 細胞測試抗體時，992 及 1024 之此弱結合活性得以恢復。兩種不同 ELISA 之比較說明與 ELISA 孔中經純化抗原所呈現之構形不同，Fab 992 及 1024 優先結合表現於細胞表面上之天然 EGFR 構形。該結果亦提示表面電漿共振所量測出之 992 對於重組可溶性及經固定 EGFR ECD 之表觀較弱親和力歸因於測試系統中 992 抗體抗原決定基之不利呈現。

對 A431-NS 細胞之功能性親和力之分級

使用如上述執行之細胞 ELISA 藉由計算表示為 ED50 值之半數最大 OD 值將 992、1024、1030、維克替比及爾必得舒之 IgG 及 Fab 片段之功能性親和力分級。此分析之結果展示於圖 32 中，且所計算出之 ED50 值呈現於下表 10 中。

表 10：表示為 ED50 值之功能性親和力基於 IgG 之親和性效應或 Fab 之單價親和力的分級。藉由對 A431-NS 細胞之連續抗體滴定來測定 ED50 值。SD：曲線擬合之標準偏差。

IgG 親和性

IgG	Log ED50	ED50 nM	SD
992	-0.56	0.3	0.04
1024	-0.49	0.3	0.05
1030	0.17	1.5	0.02
維克替比	-0.15	0.7	0.04
爾必得舒	-0.23	0.6	0.04

Fab 親和力

Fab	Log ED50	ED50 nM	SD
992	1.00	9.9	0.11
1024	0.30	2.0	0.02
1030	0.27	1.8	0.05
維克替比	0.08	1.2	0.04
爾必得舒	-0.07	0.8	0.06

該實驗清楚展示當考慮親和性效應時，IgG 992 及 1024 似乎以高於爾必得舒與維克替比之親和性結合 A431-NS 細胞，而 IgG 1030 在所測試之 IgG 抗體中具有最低親和力。然而，當使用 Fab 片段測定細胞之單價親和力時，992 具有約 10 nM 之最低親和力。儘管如此，該單價功能性親和力仍為用 BIAcore 測試的至多 1/15。

實施例 16：抗體誘導之結合增強之研究。

對本發明之抗體對執行之 BIAcore 競爭實驗揭示，992 及 1024 之結合在此等抗體針對彼此雙向測試時分別增強約 55% 及 58% (圖 9A)。為進一步研究此現象，設計使用未固定細胞之細胞 ELISA 以研究在預先用結合非重疊抗原決定基之抗體的 Fab 片段飽和受體後一種抗體純系之 IgG 結合之效應。

細胞 ELISA：ELISA 基本上係如實施例 15 中所述加以修改而執行。細胞不經固定以在添加抗體後允許構形 EGFR 可撓性。簡言之，使 10,000 個 A431-NS 細胞於 37°C 下 5% CO₂ 下在含有添加有 0.5% FCS 及 1% P/S 的 DMEM 之 96 孔 ELISA 板中生長隔夜。次日早晨用 PBS 洗滌匯合細胞（每

孔約 20,000 個) 兩次，且將用於研究抗體誘導之結合增強之孔與先前展示產生飽和結合之 25 μ l 40 nM 992、1024 或 1030 之單一 Fab 片段，或 12.5 μ l 呈雙重組合形式之 80 nM 各單一 Fab 一起預培養。將 25 μ l 含有 1% BSA 之 DMEM 添加至用於測試不添加 Fab 片段之 IgG 抗體之孔中。添加 Fab 及培養基之後，於室溫下培養 ELISA 孔 30 min，在此之後將 25 μ l 以 360 nM 濃度開始之本發明之 IgG 或西那吉斯陰性對照組之連續三倍稀釋液添加至孔中且在冰上培養 1 小時。隨後，用 PBS 洗滌孔四次，且添加 50 μ l 用含有 1% BSA 之 DMEM 以 1:5000 稀釋的二級單株小鼠-抗人類 (Fc 特異性) HRP 結合物且在冰上培養 30 min。最終，用 PBS-T 洗滌孔四次，且藉由每孔添加 50 μ l TMB 受質使板顯色，且於 620 nm 下每 5-15-30 min 進行讀取。與受質一起培養後，藉由添加 1 M H_2SO_4 終止反應，且於 450 nm 下讀取吸光度。藉由減去僅與二級試劑結合之平均本底，繼而藉由繪製相對於所測試之各抗體之最大結合%校正結合曲線來計算表示為 ED50 值之功能性親和力。

試劑，細胞 ELISA：

- 1) DMEM 培養基：Gibco，目錄號 41966-029；
- 2) FCS：Gibco，目錄號 10099-141；
- 3) Pen strep (P/S)：Gibco，目錄號 15140-122；
- 4) ELISA 板：Costar，目錄號 3595；
- 5) Wash 緩衝液 (PBS)：Gibco 目錄號 20012-019；
- 6) 抗體稀釋緩衝液：含有 1% BSA 之 DMEM；

7) 小鼠-抗人類 (Fc 特異性) HRP 結合物 : Ab-direct ,
目錄號 MCA647P ;

8) TMB Plus 受質 : KemEnTec , 目錄號 4390L ;

9) 1 M H_2SO_4 。

藉由同步 ELISA 結合研究 , 使用相同二級抗體試劑及
培養時間測定抗體誘導之結合增強之研究。該研究之結果
展示於圖 33 中且所計算出之 ED50 值展示於下表 11 中。

表 11: 表示為 ED50 值之功能性親和力基於預先用或未用所
列 Fab 片段飽和受體之 IgG 之親和性效應的分級。藉由對
A431-NS 細胞之連續抗體 IgG 滴定來測定 ED50 值。SD : 曲
線擬合之標準偏差。

IgG	Log ED50	ED50 nM	SD
IgG 992	-0.24	0.6	0.07
IgG 992/Fab 1024	-0.31	0.5	0.02
IgG 992/Fab 1030	-0.38	0.4	0.05
IgG 992/Fab 1024 及 1030	-0.34	0.5	0.04

IgG	Log ED50	ED50 nM	SD
IgG 1024	-0.01	1.0	0.01
IgG 1024/Fab 992	-0.05	0.9	0.04
IgG 1024/Fab 992 及 1030	-0.08	0.8	0.02

IgG	Log ED50	ED50 nM	SD
IgG 1030	0.33	2.2	0.06
IgG 1030/Fab 992	0.20	1.6	0.03
IgG 1030/Fab 992 及 1024	0.34	2.2	0.06

如圖 33 及以上表 11 中所呈現 , 在預先用 1024 或 1030

或 1024 以及 1030 之 Fab 片段飽和受體後，IgG 992 展示明顯增強之結合。與當單獨測試 IgG 992 時之 0.6 nM 相比，與 Fab 片段一起培養產生分別為 0.5、0.4 及 0.5 nM 之減小之 ED50 值。同樣，當首先用 Fab 992 飽和細胞時 IgG 1024 及 1030 亦展示增加之結合，且僅 1024 在 Fab 992 與 1030 在 IgG 之前均添加至細胞中時展示增加之結合。此結果無疑說明具有一種以上針對相同靶受體上之非重疊抗原決定基之抗體的益處。

與實施例 2 相比，在此實驗中測出略低之功能性親和力。此結果可能歸因於在本實施例中使用不同的二級試劑且將所測試 IgG 與未固定細胞在冰上一起培養以避免內化之事實。

實施例 16B：全長獼猴 EGFR 之選殖。

由自表皮分離之獼猴 cDNA，藉由使用巢式 PCR 及來源於公開之全長人類 EGFR 序列之序列特異性引子（GENBANK X00588，Ullrich, A. 等人，Nature 309(5967), 418-425(1984)）選殖包括信號肽之全長獼猴 EGFR。

PCR 試劑：

自正常皮膚表皮分離之獼猴 cDNA：CytoMol Unimed，目錄號：ccy34218，批號：A711054。

FastStart 反應緩衝液（10×）：Roche，目錄號：03 553 361 001；

FastStart 酶：Roche，Roche，目錄號：03 553 361 001；

Phusion 酶：Finnzymes，F-530S (2 U/ μ L)；

dNTP 25 mM：Bioline，目錄號：BIO-39029。

用於擴增包括信號序列之全長獼猴 EGFR 之引子：

5' ATG 引子：5'-TCTTCGGGAAGCAGCTATGC-3' (SEQ ID NO 135)；

3' STOP 引子：5'-TCATGCTCCAATAAATTCAGT-3' (SEQ ID NO 139)。

PCR 條件：

95°C/2 min，40 個循環：95°C/30 sec，55°C/30 sec，72°C/3 min 30 sec，最終於 72°C 下培養 5 min。

用於巢式 PCR 擴增全長獼猴 EGFR 且併入 Not 及 Xho 限制性位點之引子：

E579 Cyn Not5'：

5'-GGAGTCGGCGGCCGACCATGCGACCCTCCGGGACGG-3 (SEQ ID NO 140)；

E580 Cyn Xho5'：

5'-GCATGTGACTCGAGTCATGCTCCAATAAATTCAGTGC-3 (SEQ ID NO 141)。

PCR 條件：

95°C/2 min，隨後 30 個循環：95°C/30 sec 解鏈，55°C/30 sec 退火，72°C/3 min 延伸。30 個循環後，再使 PCR 產物延伸 10 min。

使用 0.5 μ l 模板及 0.1 μ l Phusion 酶、0.4 μ l FastStart 酶，在總體積為 50 μ L 的最終濃度為 1 $\times$ FastStart 緩衝液、

0.2 mM dNTP 及 0.2 μ M 各引子的反應物緩衝液中執行 PCR 反應。

獲得表觀長度為約 4000 bp 之 PCR 片段且使用 TOPO TA 選殖套組 (Invitrogen, Part No. 4506-41) 進行選殖且定序。所選殖獼猴 EGFR 之 DNA 及蛋白質序列展示於圖 34 中。人類 EGFR 與獼猴 EGFR 蛋白質序列之排比展示 99.2% 之序列一致性。

藉由 FACS 分析證明全長人類與獼猴 EGFR 之間的抗體交叉反應性

藉由穩定轉染使全長人類及獼猴 EGFR 表現於 CHO 細胞表面上，且藉由 FACS 分析測試細胞與一組連續稀釋之 EGFR 抗體之結合。在 K_D 依賴性條件下，藉由在所有抗體連續稀釋液中保持莫耳過量之抗體進行測定，該莫耳過量之抗體為表現於固定數目細胞之細胞表面上之 EGFR 抗原分子數的至少 5 倍。此設置允許對於所有所測試抗體濃度在完全受體飽和下進行抗體結合之 FACS 分析。

簡言之，用 BD FACS 陣列生物分析儀系統 (BD FACS array Bioanalyzer System) 執行定量 FACS 分析以測定表現於用人類或獼猴全長 EGFR 轉染之 CHO 細胞表面上之 EGFR 分子的數目。該分析藉由滴定細胞上經 PE 標記之爾必得舒 IgG 來執行，且藉由與由具有已知 PE 密度之 Rainbow 校準粒子製成之標準曲線比較來測定等效 PE 之分子數目。定量分析揭示經 EGFR 轉染之 CHO 細胞在各細胞表面上呈現約 350,000 個分子。隨後，以 5 nM 開始連續 5 倍稀釋之

本發明之抗體藉由與 10,000 個經 EGFR 轉染之 CHO 細胞以增加之體積一起培養進行比較，該增加之體積允許在各測定中具有比表面呈現之 EGFR 抗原至少 5 倍莫耳過量之抗體。將抗體與細胞一起在震盪器上培養 14 小時以促進在所有所測試抗體濃度下之完全抗原飽和，同時向 FACS 緩衝液中添加 0.02% NaN_3 且將溫度保持於 4°C 下以防止受體內化。培養後，於 4°C 下在 1200 RPM 下使細胞成粒 5 min 且再懸浮於 200 μl FACS 緩衝液中。隨後用稀釋至 1:500 之二級山羊 F(ab')_2 抗人類 IgG $\text{Fc}\gamma$ PE 將細胞染色且於 4°C 下在震盪器上培養 30 min。最後，用 FACS 緩衝液洗滌細胞兩次且用 BD FACS 陣列生物分析儀分析，其中對呈現均勻前向/側向散射特性之 EGFR 表現 CHO 細胞進行設門。

FACS 試劑：

Rainbow 校準粒子：BD，目錄號：559123；

FACS 緩衝液：1×PBS + 2%FCS + 0.02% NaN_3 ；

山羊 F(ab')_2 抗人類 IgG $\text{Fc}\gamma$ PE：Jackson ImmunoResearch，目錄號 109-116-170。

使用所述 FACS 結合檢定來測定 EGFR 抗體 IgG 992 及 1024 之交叉反應性，且與不與獼猴 EGFR 交叉反應之對照抗體 IgG 1320 相比較。如以下圖 40 中所示，所述 FACS 檢定可極好地用於辯別展現人類與獼猴全長 EGFR 之間的良好交叉反應性之抗體(圖 40A, IgG 992 及圖 40B, IgG 1024)以及僅識別全長人類 EGFR 之物種特異性抗體(圖 40C, IgG 1320)。由此分析可推斷出，IgG 992 與 1024 皆展現針對表

現於經穩定轉染之 CHO 細胞表面上之人類與獼猴全長 EGFR 的極佳交叉反應性。鑒於高度序列相似性，獼猴與人類 EGFR 之間的結合差異令人吃驚，且突顯出針對與用於臨床前毒理學研究之動物體內的確切靶序列結合之測試抗體的重要性。

實施例 17：與 992、1024 及 1030 同源之純系

基於免疫吸附檢定(ELISA 及基於細胞之檢定)之 EGFR 結合抗體純系之篩選使得可鑑別如先前實施例中所述之純系 992、1024、1030。亦鑑別與 992、1024、1030 同源之 EGFR 特異性純系（表 12）。

預期屬於相同聚類之純系具有相同結合特異性但可能以不同親和力結合。因此，在本發明之抗體組成物中聚類中之純系可彼此替換，其限制條件為該等純系之結合親和力不相差過多。

表 12	IGHV	IGHV 純系名稱					IGHV 基因	IGHJ 基因	CDR3	SEQ ID NO	體細胞 突變數目	體細胞突變	
992	1209	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CTRNGDYVYSSGDAMDYW	110	4	H46P,G61R,G76A,H90Q	
	1204	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CTRNGDYVYSSGDAMDYW	111	5	H46P,G59D,G61R,G76A,H90Q	
	992	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CTRNGDYVYSSGDAMDYW	111	4	H46P,G61R,G76A,H90Q	
	996	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CTRNGDYVYSSGDAMDYW	111	4	H46P,G61R,G76A,H90Q	
	1033	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CTRNGDYVYSSGDAMDYW	111	4	H46P,G61R,G76A,H90Q	
	1220	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CTRNGDYVYSSGDAMDYW	111	4	H46P,G61R,G76A,H90Q	
1030	1195	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	12	K14R,M39L,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I	
	1030	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	12	M39L,K48R,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I	
	1034	IGHV5S12*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	12	M39L,T55S,I56T,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I	
	1194	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	12	M39L,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,D69G,I78M,K84R,T86I	
	980	IGHV5S12*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	11	M39L,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I	
	981	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	11	M39L,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I	
	1246	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	11	M39L,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I	
	1223	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	12	S32N,M39L,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I	
1024	1031	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CARYYGYDDAMDYW	113	6	Y33H,K43Q,N57H,S74N,S84P,P94L	
	1036	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CARYYGYDDAMDYW	113	6	Y33H,K43Q,N57H,S74N,S84P,P94L	
	1042	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CARYYGYDDAMDYW	113	6	Y33H,K43Q,N57H,S74N,S84P,P94L	
	984	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CARYYGYDDAMDYW	113	7	Y33H,K43Q,N57H,S74N,T79A,S84P,P94L	
	1024	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CVRYGYDEAMDYW	114	7	K14E,A17G,Y33H,N60S,T63N,L91F,P94L	
	1210	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CVRYYGYDEVMDYW	115	7	K14E,A17G,Y33H,N60S,T63N,L91F,P94L	
	1217	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CVRYYGYDEVMDYW	115	7	K14E,A17G,Y33H,N60S,T63N,L91F,P94L	
	1221	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	IGHJ4*01	CVRYYGYDEVMDYW	115	7	K14E,A17G,Y33H,N60S,T63N,L91F,P94L	

表 12 續	IGKV							
聚類	純系名稱	IGKV 基因	IGKJ 基因	CDR3	SEQ ID No	體細胞 突變數目	體細胞突變	
992	1209	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTPPTF	116	6	A25T,S30G,Y87F,S92N,L94V,I99V	
	1204	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTPPTF	116	6	A25T,S30G,Y87F,S92N,L94V,I99V	
	992	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTPPTF	116	6	A25T,S30G,Y87F,S92N,L94V,I99V	
	996	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTPPTF	116	7	T8A,A25T,S30G,Y87F,S92N,L94V,I99V	
	1033	IGKV10-94*03	IGKJ2*01	CQQFTTSPFTF	117	8	A25T,I29V,S30G,Y87F,N93S,L94M,P96Q,I99V	
	1220	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTPPTF	118	6	A25T,S30G,Y87F,S92N,L94V,I99V	
	1030	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	3	K27Q,Y36F,Q44L	
	1030	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L	
	1034	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L	
	1194	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L	
	980	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	3	Y36F,Q44L,Q48R	
	981	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	3	Y36F,Q44L,H92Y	
	1246	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L	
	1223	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L	
	1024	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLLEPYTF	120	0		
	1036	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLLEPYTF	120	1	T85A	
	1042	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLLEPYTF	120	1	G84R	
	984	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLLEPYTF	120	0		
	1024	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLLEPYTF	120	0		
	1210	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLLEPYTF	120	1	T17A	
	1217	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLLEPYTF	120	0		
	1221	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLLEPYTF	120	1	S32N	
	1218	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLLEPYTF	120	0		

實施例 18：抗體 922 及 1024 之人類化

所有抗體含有引發人類抗抗體反應之潛力。該反應在某種程度上與所用治療性抗體之「人源性」程度相關聯。不可能預測免疫原性且從而不能預測人類抗抗體，但對於臨床使用存在優選具有高度人源性之抗體的趨勢。本發明中所述之抗體之人源性可藉由人類化處理 [Reichert JM. Monoclonal antibodies in the clinic. *Nature Biotechnol*, 2001;19:819-822; Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB 及 Dewitz MC, Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nature Biotechnol*, 2005;23:1073-1078] 增強。

鼠類 mAb 之人類化原則上係藉由通常稱為 CDR 移植之程序將互補決定區 (CDR) 移植於具有密切相關序列之 IGHV 及 IGKV 域之人類構架區 (FR) 上來達成 (Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS 及 Winter G, Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 1986;321:522-525)。然而，僅超變區之簡單 CDR 移植會使親和力降低，因為一些構架胺基酸或區域產生與抗原之重要接觸或支持抗原結合 CDR 環之構形 [Queen C, Schneider WP, Selick HE, Payne PW, Landolfi NF, Duncan JF, Avdalovic NM, Levitt M, Junghans RP 及 Waldmann TA, A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989;86:10029-10033; Al-Lazikani B, Lesk AM 及 Chothia C, Standard conformations for the canonical

structures of immunoglobulins. J Mol Biol, 1997;273:927-948]。因此，抗體人類化應包括將源於鼠類可變區之 CDR 環移植於密切同源之人類構架上，同時保留對抗原結合活性具有已證明之影響的關鍵鼠類構架殘基 (Winter, G. 及 W. J. Harris. 「Humanized antibodies.」 Immunol.Today 14.6 (1993): 243-46)。已開發出若干方法且成功應用於達成人類化同時保留抗體親和力及功能 (Almagro, J. C. and J. Fransson. 「Humanization of antibodies.」 Front Biosci. 13 (2008): 1619-33 中所綜述)。人類化可藉由合理方法達成，該等方法例如 CDR 移植、表面重塑、超人類化、人類序列含量優化(human string content optimization)，其均依賴於建構數個人類化抗體候選者。候選者之胺基酸序列基於對抗體結構及個別胺基酸直接與間接經由穩定抗原相互作用區域之整體結構對於抗原結合之貢獻的洞察及預測。通常候選者須經改進且使一些胺基酸回復突變為初始鼠類殘基，因為各抗體具有一些未預見之個別限制條件。通常對於該等方法可能需要數輪連續設計、測試及再設計以保留親和力及功能。替代方法為較經驗之方法，其中產生大型組合文庫，且具有所需特徵之抗體藉由諸如酵母或噬菌體呈現或替代性篩選法之方法進行選擇而自變異體池富集。

本發明所述之抗 EGFR 抗體可藉由 CDR 移植於人類 V 區域中來人類化。在較佳方案中，基於與初始鼠類 V 區域之同源性選擇人類 V 區域。亦可使用具有其他所要特徵(諸

如低免疫原性) 之人類 V 基因區域。本實施例描述欲用於人類化 992 與 1024 抗 EGFR 嵌合抗體之方法。圖 41A 中所給出之人類化序列係藉由將 IMGT 定義之來自 992 IGHV 之 CDR 區域移植於 IGHV1-46/IGHJ4 中且將 992 IGKV 之 CDR 區域移植於 IGKV1-27/IGKJ1-01 中得以產生。圖 41B 中所給出之胺基酸序列係藉由將 IMGT 定義之來自 1024 IGHV 之 CDR 區域移植於 IGHV1-2*02/IGHJ6*02 中且將 1024 IGKV 之 CDR 區域移植於 IGKV2-28*01/IGKJ2*01 中電腦輔助 (in silico) 產生。合成編碼所指定人類化抗體之人工基因且插入哺乳動物表現載體中。如實施例 3 中所述進行抗體之表現、純化及活性測試。初始測試後，可如實施例 14 中所述藉由表面電漿共振測定人類化抗體之結合動力學。類似地，可如實施例 15 中所述測定與表現於細胞表面上之 hEGFR 之結合。

若人類化胺基酸之結合活性顯著低於對於初始抗體所觀察到之結合活性，則可由位於游標區 (Vernier zone) 之人類化構架殘基或所提出的支持 CDR 區域結構之殘基開始使用依次回復突變方案來使親和力再生 (Foote, J. 及 G. Winter. 「Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops.」 J Mol.Biol. 224.2 (1992): 487-99; Padlan, E. A. 「Anatomy of the antibody molecule.」 Mol.Immunol 31.3 (1994): 169-217)。在 IMGT 編號中，此等殘基對於 992 IGHV 為胺基酸 13、45 及 80；對於 992 IGKV 為胺基酸 25；對於 1024 IGHV 為胺

基 酸 13、45、80 及 82；對於 1024 IGKL 為 胺 基 酸 78。可藉由使用標準分子生物學方法使用 PCR 介導之位點定向誘變來建構此等突變。如上述測試所建構之突變。預期此等組之候選者將產生具有保留抗原結合特性之人類化抗體。然而藉由在 CDR 區中藉由位點定向誘變引入胺基酸取代獲得之其他回復突變或親和力成熟不能去除。

實施例 19：雙可變域抗體

雙重可變域 (DVD) 抗體蛋白質係藉由以 6 個胺基酸之連接子 (ASTKGP) 將 992 與 1024 之 IGHV 域串接融合且以 5 個胺基酸之連接子 (TVAAP) 將 992 與 1024 之 IGKV 域串接融合來工程改造 [Wu C, Ying H, Grinnell C, Bryant S, Miller R, Clabbers A, Bose S, McCarthy D, Zhu RR, Santora L, vis-Taber R, Kunes Y, Fung E, Schwartz A, Sakorafas P, Gu J, Tarcsa E, Murtaza A 及 Ghayur T. Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin. *Nature Biotechnol*, 2007;25:1290-1297]。雙重 IGHV 與 IGKV 域融合後繼而分別進行 IGHC 與 IGKC 域之融合。在一種全長 DVD 抗體 (992L1024) 中，992 IGHV 及 IGKV 為 N 末端，繼而分別為連接子及 1024 IGHV 及 IGKV。在第二種全長 DVD 抗體 (1024L992) 中，1024 IGHV 及 IGKV 為 N 末端，繼而分別為連接子及 992 IGHV 及 IGKV。將編碼 992 及 1024 抗體之質體 DNA 用作介導建構 DVD 編碼基因之兩步 PCR 之模板。首先分別擴增 IGHV 及 IGKV 之兩個可變域編碼區域，

以使其在連接子編碼區之位置處含有重疊延伸區域（對於模板與引子組合參見表 13 及表 14）。擴增編碼 C 末端鄰近可變域的 IGKV 基因以使人類輕鏈恆定域編碼基因（IGKC）包括於編碼序列中。雙可變域抗體亞單元之編碼序列及胺基酸序列展示於附錄 3 中。

準備第一 PCR，其中在各管（50 μ l 反應物）中具有以下混合物以獲得所給最終濃度：1 $\times$ FastStart 緩衝液（Roche）、dNTP 混合物（各 200 μ M）、引子（各 10 pmol）（參見表 14）、FastStart 高保真酶摻合物（2.2 U；Roche）及 100 ng 質體模板（參見表 14）。使 PCR 經受以下熱循環：95 $^{\circ}$ C 下 2 min，20 $\times$ （95 $^{\circ}$ C 下 30 sec，55 $^{\circ}$ C 下 30 sec，72 $^{\circ}$ C 下 1 min），72 $^{\circ}$ C 下 10 min。將來自第一 PCR 反應之具有正確大小之所得 PCR 產物（參見表 14）藉由製備型瓊脂糖凝膠電泳純化，且用於藉由重疊延伸 PCR 剪接兩個可變域之第二步驟中。準備藉由重疊延伸 PCR 剪接 DNA 片段之第二 PCR，其中在各管（50 μ l 反應物）中具有以下混合物以獲得所給最終濃度：1 $\times$ FastStart 緩衝液（Roche）、dNTP 混合物（各 200 μ M）、引子（各 10 pmol，參見表 15）、FastStart 高保真酶摻合物（2.2 U；Roche）及模板（100 ng PCR 片段，參見表 15）。使 PCR 經受如上所定義之熱循環。將來自第二 PCR 步驟之所得產物藉由製備型瓊脂糖凝膠電泳純化，且以限制酶處理，*Asc*I 及 *Xho*I 用於雙重 IGHV，且 *Nhe*I 及 *Not*I 用於雙重 IGKV（包括 IGKC）。將該等片段藉由標準限制酶消化及接合程序連續地接合至哺乳動物 IgG 表現

載體 OO-VP-002 (圖 4) 中。將所得表現質體載體在大腸桿菌中擴增且將質體製備物藉由標準方法純化。將 DVD 抗體如實施例 2 中進行表現及純化，且如實施例 3-13 中對活性進行特性化。

若所得抗體展示與標靶 hEGFr 之結合降低或不與標靶 hEGFr 結合，則可測試其他連接子。

表 13 用於自 992 與 1024 建構 DVD 抗體之引子

SEQ ID NO	引子名稱	序列
121	3'JH	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACTGAGGTTTCCTTGAC
122	992_5'VH	CCAGCCGGGGCGCGCCGAGGTCCAAGTGCAGCAACCTGGGTCTGAGCTGGTG
123	1024_5'VH	CCAGCCGGGGCGCGCCCAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTG
124	992_5'VK	catgggaatagtagccGACATTCAGATGACTCAGACTACATCCTCCCTG
125	1024_5'VK	catgggaatagtagccGACATCGTGATGACACAAGCTGCATTCTCCAATC
126	Kappa3'	ACCGCCTCCACCGGCGGCCGCTTATTAACACTCTCCCCTGTTG
127	992H_O3'	CTGGGGGCCCTTGCTGCTGGCTGACGAGACGGTGACTGAGGTTT
128	1024H_O5'	GCCAGCACCAAGGGCCCCCAGGTCCAAGTGCAGCAGC
129	1024H_O3'	CGGGGCCCTTGCTGCTGGCTGACGAGACGGTGACTGAG
130	992H_O5'	GCCAGCACCAAGGGCCCCGAGGTCCAAGTGCAGCAAC
131	992K_O3'	GTCTGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATTTCCAGCTTGGTG
132	1024K_O5'	CGAACTGTGGCTGCACCAGACATCGTGATGACACAAGC
133	1024K_O3'	GTCTGGTGCAGCCACAGTTCGTTTATTTCCAGCTTGGTCC
134	992K_O5'	CGAACTGTGGCTGCACCAGACATTCAGATGACTCAGACTAC

表 14 用於自 992 及 1024 建構 DVD 編碼基因之第一 PCR 步驟的引子與模板組合

DVD	PCR 模板	用於 IGHV 基因擴增之引子		用於 IGKV 基因擴增之引子	
		第一 PCR 步驟	第一 PCR 產物 (尺寸: bp)	第一 PCR 步驟	第一 PCR 產物 (尺寸: bp)
992L1024	992	992_5'VH 992H_O3'	992HO (406 bp)	992_5'VK 992K_O3'	992KO (359 bp)
	1024	1024H_O5' 3' JH	HO1024 (381 bp)	1024K_O5' Kappa3'	KO1024* (702 bp)
1024L992	992	992H_O5' 3'JH	HO992 (393 bp)	992K_O5' Kappa3'	KO992 (687 bp)
	1024	1024_5'VH 1024H_O3'	1024HO (392 bp)	1024_5'VK 1024K_O3'	1024KO* (374 bp)

*所擴增之編碼序列包括 IGKC 基因

表 15 用於自 992 及 1024 建構 DVD 編碼基因之第二 PCR 步驟 (重疊延伸剪接) 的引子與模板組合

DVD	IGHV			IGKV		
	模板	引子	產物(bp)	模板	引子	產物 (bp)
992L1024	992HO	992_5'VH	766	992KO	992_5'VK	1040
	HO1024	3'JH		KO1024	Kappa3'	
1024L992	HO992	1024_5'VH	766	KO992	1024_5'VK	1040
	1024HO	3'JH		1024KO	Kappa3'	

實施例 20：在獼猴中與爾必得舒組合之 6 週靜脈內投藥毒性研究

研究目的：該研究之目的在於測定在向獼猴每週一次靜脈內投藥 6 週後測試製品 (992+1024) 之毒性。

由於在使用 EGFR 抑制劑 (如爾必得舒及維克替比) 之臨床實踐中毒性為劑量限制因素，故認為在早期評估臨床

相關劑量之 992+1024 之耐受性很重要。此係因 992+1024 似乎藉由不同於其他靶向 EGFR 之產品之機制發揮作用的事實而突出。其可潛在地產生新的不利效應或比使用其他 EGFR 抑制劑所見之效應更加嚴重。

將三隻雌性獼猴之組用 4/2.7 mg/kg 及 12/8 mg/kg 992+1024 及 12/8 mg/kg 爾必得舒之每週靜脈內劑量處理 6 週。第一劑量 4 mg/kg 及 12 mg/kg 為負荷劑量且 2.7 mg/kg 及 8 mg/kg 為投予 5 次之維持劑量。12/8 mg/kg 劑量相當於臨床實踐中所投予之爾必得舒之人類臨床劑量。

研究設計

組 編號	組 說明	劑量濃度 (每日 mg/kg)	劑量體積 (mL/kg)	動物編號 雌性
1	對照組	0	19 / 12#	1-3
2	992+1024 低	4.2 / 2.7#	19 / 12#	4-6
3	992+1024 高	12.6 / 8#	19 / 12#	7-9
4	爾必得舒	12.6 / 8#	19 / 12#	10-12

#第一劑量濃度用作負荷劑量，第二劑量濃度用於自第 8 日起投藥

在研究期間跟蹤以下參數：死亡率、臨床跡象、體重、食物消耗、血液學、臨床化學、器官重量、宏觀發現 (Macroscopic finding)。

結果

死亡率：在研究過程中無意外死亡。

臨床跡象：無治療相關之不利臨床觀察結果。

體重：用 992+1024 或爾必得舒治療對體重無影響。

食物消耗：對食物消耗無明顯影響。

血液學：對可表明用 992+1024 或爾必得舒治療之作用的血液學參數無影響。

臨床化學：在可表明用任一測試物品治療之作用的臨床化學參數方面無變化。

在第 4 週，每日給予 4.2/2.7 mg/kg 992+1024 之一隻動物的天冬胺酸轉胺酶及丙胺酸轉胺酶含量與處理前之值相比有所增加。此等含量至第 6 週回到正常範圍。由於在其他經處理動物中無類似效應，故肝臟酶之該增加之毒理學意義為未知的。

器官重量：經處理動物與對照組動物之間的器官重量之毒理學意義無差異。

宏觀發現：屍檢時未注意到可表明 992+1024 或爾必得舒之作用的一致之觀察結果。

初步結論：初步資料展示 992+1024 在所測試劑量下耐受性良好且未觀察到與治療相關之不利效應。

實施例 21：肺細胞癌株之生長抑制

已知肺癌細胞系表現酪胺酸激酶域中具有突變之 EGFR (Steiner 等人, Clin Cancer Res 13.5 (2007): 1540-51)。藉由類似於實施例 6 中所用之方法，研究兩種抗體 992 與 1024 之組合抑制具有不同 EGFR 突變之肺癌細胞系 HCC827 及 H1975 生長之能力。

結果

如表 16 及表 17 中可見，992 與 1024 之組合能夠抑制

兩種細胞系之生長。該組合優於單株抗體 992 及 1024 且優於維克替比。

表 16 所指定抗體針對 HCC827 細胞系之 IC_{50} 值及最大生長抑制

HCC827	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	最大抑制
爾必得舒	0.013	80 %
維克替比	0.100	60 %
992	0.050	80 %
1024	0.034	40 %
992+1024	0.031	80 %

表 17 所指定抗體針對 H1975 細胞系之 IC_{50} 值及最大生長抑制

H1975	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	最大抑制
爾必得舒	0.010	30 %
維克替比	0.141	30 %
992	0.056	30 %
1024	-	0 %
992+1024	0.024	30 %

實施例 21：對爾必得舒抗性細胞之功效。

為研究具有抗體 992+1024 之抗體組成物是否可抑制爾必得舒抗性細胞，藉由使親本 HN5 細胞連續接觸遞增含量之爾必得舒來產生爾必得舒抗性 HN5 細胞。在產生爾必得舒抗性細胞池後，使用 WST-1 生存力檢定來測試爾必得舒、維克替比及具有抗體 992+1024 之抗體組成物的抑制效應。

方法

藉由經 6 個月長時期接觸遞增濃度之爾必得舒而由爾必得舒（西妥昔單抗）敏感性人類頭頸部細胞系 HN5 產生爾必得舒抗性 HN5 細胞。以對應於西妥昔單抗之 IC_{50} ($0.05 \mu\text{g/ml}$) 起始劑量開始，逐漸增加接觸劑量直至細胞在含有 $10 \mu\text{g/ml}$ 爾必得舒之培養基中成功地增殖。使該等細胞在補充有 10% FBS 及適當濃度之爾必得舒的 DMEM 中生長，且每週繼代培養兩次。

細胞增殖試劑 WST-1 為量測活細胞之代謝活性的即用受質，且假定該代謝活性與活細胞之數目有關。在本實施例中，使用 WST-1 檢定來量測用不同濃度之不同抗體處理後代謝活性細胞之數目。

在執行 WST-1 檢定之前，用補充有 0.5% FBS 及 1% P/S 之適當培養基將適當抗體及抗體混合物稀釋至 $20 \mu\text{g/ml}$ 之最終總抗體濃度，在含有最高抗體濃度之孔中產生 $10 \mu\text{g/ml}$ 之最終抗體濃度。隨後將 $150 \mu\text{l}$ 此等溶液添加至 96 孔板之第 2 行孔中，且進行三倍連續稀釋並添加至後續行之孔中直至第 9 行以使各孔含有 $100 \mu\text{l}$ 抗體溶液。將 $100 \mu\text{l}$ 培氧基添加至第 11 行中。將 $200 \mu\text{l}$ 培氧基添加至第 1 列及第 8 列以及第 1 行及第 12 行中以降低實驗孔中培氧基蒸發之影響。

隨後將 HN5 親本及 HN5 抗性細胞用 $1\times\text{PBS}$ 洗滌且藉由用 3 ml 胰蛋白酶溶液胰蛋白酶化來分離。隨後添加 17 ml 完全培養基且將該等細胞以 $300\times g$ (1200 rcf) 離心 5 min。

移除上清液且使細胞再懸浮於 DMEM + 0.5% FBS 中。對細胞進行計數且將其濃度調整至每毫升 15,000 個細胞。隨後將 100 μ l 細胞懸浮液（每孔 1500 個細胞）添加至第 2-11 行之實驗孔中。在含濕氣恆溫箱中於 37°C 下培養板 4 日。隨後每孔中添加 20 μ l WST-1 試劑且於 37°C 下培養板 1 小時。隨後將板轉移至回轉式盤震盪器中歷時 1 小時。使用 ELISA 讀取器量測 450 及 620 nm（參考波長）下之吸光度。使用與實施例 6 中所用相同之式將代謝活性細胞（MAC）之量計算為佔未經處理之對照組的百分比。

使用 GraphPad Prism，藉由使滴定曲線與以下方程式擬合來計算各混合物之 IC_{50} ： $Y = \text{最低值} + (\text{最高值} - \text{最低值}) / (1 + 10^{((\text{Log}IC_{50} - X) * \text{斜率}))}$ 。

結果

圖 43 中展示 HN5 親本細胞與爾必得舒抗性細胞之滴定結果。顯然爾必得舒之效能及功效在爾必得舒抗性細胞中比在親本細胞中顯著降低。爾必得舒及維克替比之功效降低約 50% 且 IC_{50} 增加 10 倍以上（表 18）。相比之下，具有抗體 992+1024 之抗體組成物（Sym004）的效能僅降低 43% 且 IC_{50} 增加 2 倍。此等結果顯示具有抗體 992+1024 之抗體組成物更有效且抑制爾必得舒抗性 HN5 細胞生長之功效高於爾必得舒及維克替比。

表 18. 所指定抗體抑制 HN5wt 及 HN5 爾必得舒抗性細胞之 IC_{50} 值及功效。ND：未測定

	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		功效 (佔未經處理之百分比)	
	HN5 親本	HN5 爾必得舒抗性	HN5 親本	HN5 爾必得舒抗性
爾必得舒	0.050	0.750	88.1%	34.4%
維克替比	0.035	0.500	88.3%	32.3%
992	0.420	ND	85.5%	1.7%
1024	0.048	ND	84.8%	1.3%
992+1024 (Sym004)	0.053	0.110	88.2%	45.0%

實施例 22：使用具有抗體 992+1024 之抗體組成物進行活體內再處理

方法

在 6-8 週齡 BALB/c nu/nu 雌性小鼠之右側腹皮下注射 1×10^6 個 A431NS 細胞。用測徑器量測腫瘤，每週一至三次，且使用下式計算腫瘤體積 (V)： $V = (\text{寬度})^2 \times (\text{長度}) \times 0.5$ 。當腫瘤達到約 100 mm^3 之平均腫瘤體積時，開始處理，且用 1 mg 抗體 992+1024 經腹膜內處理小鼠，每週兩次總共注射 9 次。初始處理期後，跟蹤研究小鼠 159 日。若在此期間偵測腫瘤生長，則用 1 mg 抗體 992+1024 再處理小鼠，每週兩次直至研究結束。

結果

所有腫瘤均對初始 4 週療法起反應 (圖 44)。指數腫瘤生長停止且腫瘤消退至介於 0 mm^3 與約 200 mm^3 之間的腫瘤體積。此後，腫瘤體積再穩定 85 日，隨後 9 個腫瘤中之 3 個再次開始生長。用 1 mg 抗體 992+1024 處理在起始第二輪處理之前尺寸發生變化之 3 個腫瘤，每週兩次歷時餘下

的研究期。在所有三種情況下，再處理使得腫瘤立即消退，此指示腫瘤在用具有抗體 992+1024 之抗體組成物進行初始 4 週處理後未變成抗性處理。

實施例 23：使用具有抗體 992+1024 之抗體組成物活體內處理部分爾必得舒反應者

方法

在 6-8 週齡 BALB/c nu/nu 雌性小鼠之右側腹皮下注射 1×10^6 個 A431NS 細胞。用測徑器量測腫瘤，每週三次，且使用下式計算腫瘤體積 (V)： $V = (\text{寬度})^2 \times (\text{長度}) \times 0.5$ 。當腫瘤達到約 130 mm^3 之平均腫瘤體積時，將小鼠分為 10 隻及 30 隻動物之兩組。用對照抗體處理 10 隻動物之組，而用 1 mg 爾必得舒處理 30 隻動物之組，總共 3 劑。此時，將經爾必得舒處理之組隨機化為兩組均衡的 12 隻動物，其平均腫瘤尺寸為 500 mm^3 。每週兩次用 1 mg 抗體 992+1024 處理兩組動物或繼續爾必得舒處理。自研究中取出 6 個異常值。

結果

初始爾必得舒處理部分抑制 A431NS 腫瘤生長 (圖 45)。爾必得舒處理 11 日後，將一半動物轉變為用具有抗體 992+1024 之抗體組成物 (圖注中之 Sym004) 處理。在轉換為用抗體 992+1024 處理之小鼠組中，與繼續爾必得舒處理之組相比，觀察到腫瘤明顯消退。具有抗體 992+1024 之抗體組成物對經爾必得舒預處理之大腫瘤的此明確作用表明，在 A431NS 模型中具有抗體 992+1024 之抗體組成物比

爾必得舒更有效且具有抗體 992+1024 之抗體組成物可為爾必得舒部分反應者之治療選擇。

實施例 24：活體內處理爾必得舒抗性細胞

為進一步研究 Sym004 藥物候選者是否可抑制爾必得舒抗性細胞，自爾必得舒抗性 HN5 細胞池產生爾必得舒抗性 HN5 純系。藉由有限稀釋法產生純系且在產生爾必得舒抗性純系後，使用 WST-1 生存力檢定測試爾必得舒、維克替比及 Sym004 之抑制效應。

方法

藉由有限稀釋法，自爾必得舒抗性細胞池（參見實施例 21）產生爾必得舒抗性 HN5 純系。藉由限制稀釋法進行選殖為基於以下假設來分離細胞之程序：若用足夠培養基稀釋細胞懸浮液，則將產生使得精確量測體積之稀釋懸浮液含有 1 個細胞之細胞濃度。當將此體積之稀釋懸浮液置於 96 孔板之單獨孔中時，各孔應接受每孔 1 個細胞。若此細胞仍活著（由於每孔 1 個細胞之明顯低的細胞密度，故通常需要餵養細胞層及/或「改良」培養基）且增殖，則將在孔中形成細胞之分離純系。使該等細胞在補充有 10% FBS 及適當濃度之爾必得舒之 DMEM 中生長。

細胞增殖試劑 WST-1 為量測活細胞之代謝活性的即用受質，且假定該代謝活性與活細胞之數目有關。在本實施例中，使用 WST-1 檢定來量測繼用不同濃度之不同抗體處理後代謝活性細胞之數目。

在執行 WST-1 檢定之前，用補充有 0.5% FBS 及 1% P/S

之適當培養基將適當抗體及抗體混合物稀釋至 20 $\mu\text{g/ml}$ 之最終總抗體濃度，在含有最高抗體濃度之孔中產生 10 $\mu\text{g/ml}$ 之最終抗體濃度。隨後將 150 μl 此等溶液添加至 96 孔板之第 2 行孔中，且進行三倍連續稀釋並添加至後續行之孔中直至第 9 行以使各孔含有 100 μl 抗體溶液。將 100 μl 培氧基添加至第 11 行中。將 200 μl 培氧基添加至第 1 列及第 8 列以及第 1 行及第 12 行中以降低實驗孔中培氧基蒸發之影響。

隨後用 1×PBS 洗滌 HN5 親本及 HN5 抗性細胞且藉由用 3 ml 胰蛋白酶溶液胰蛋白酶化來分離。隨後添加 17 ml 完全培養基且將該等細胞以 300×g (1200 rcf) 離心 5 min。移除上清液且使細胞再懸浮於 DMEM + 0.5% FBS 中。對細胞進行計數且將其濃度調整至每毫升 15,000 個細胞。隨後將 100 μl 細胞懸浮液 (每孔 1500 個細胞) 添加至第 2-11 行之實驗孔中。在含濕氣恆溫箱中於 37°C 下培養板 4 日。隨後每孔中添加 20 μl WST-1 試劑且於 37°C 下培養板 1 小時。隨後將板轉移至回轉式盤震盪器中歷時 1 小時。使用 ELISA 讀取器量測 450 及 620 nm (參考波長) 下之吸光度。代謝活性細胞 (MAC) 之量經如下計算為佔未經處理之對照組的百分比：

$$\%MAC = \left(\frac{(OD_{\text{實驗}} - OD_{\text{培養基}})}{(OD_{\text{未經處理}} - OD_{\text{培養基}})} \right) \times 100。$$

使用 GraphPad Prism，藉由使滴定曲線與以下方程式擬

合來計算各混合物之 IC_{50} : $Y = \text{最低值} + (\text{最高值} - \text{最低值}) / (1 + 10^{((\text{Log}IC_{50} - X) * \text{斜率}))}$ 。

結果

圖 46 中展示四個代表性純系之滴定結果。顯然該等純系具有不同程度之爾必得舒抗性。然而，Sym004 在抑制所有四個純系之生長方面優於爾必得舒及維克替比。該優勢之證據為功效增加（純系 #7、#11 及 #14）及/或效能增加（純系 #8、#11 及 #14）（表 19）。

表 19. 所指定抗體抑制四個爾必得舒抗性 HN5 純系之 IC_{50} 值及功效。*由於最大抑制程度存在差異，故不能比較 IC_{50} 值。

		效能 IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)			
	HN5 親本	純系#7	純系#8	純系#11	純系#14
爾必得舒	0.050	0.016*	1.06	0.366*	0.314*
維克替比	0.035	0.023*	2.70	0.311*	0.190*
Sym004	0.053	0.029*	0.33	0.267*	0.110*
		功效（最大抑制%）			
	HN5 親本	純系#7	純系#8	純系#11	純系#14
爾必得舒	88.1%	60.9%	42.5%	35.7%	32.0%
維克替比	88.3%	61.1%	51.3%	28.6%	33.7%
Sym004	88.2%	70.3%	57.5%	38.9%	43.5%

實施例 25：使用爾必得舒及具有抗體 992+1024 之抗體組成物活體內處理爾必得舒抗性 HN5 細胞

方法

將 5×10^6 個爾必得舒抗性 HN5 純系 #7 細胞皮下注射至 6-8 週齡雌性無胸腺裸小鼠之右側腹中。用測徑器量測腫

瘤，每週兩次，且根據下式計算腫瘤體積(mm^3): $(\text{寬度})^2 \times (\text{長度}) \times 0.5$ 。當腫瘤達到約 650 mm^3 之平均尺寸時，依序開始處理。藉由腹膜內注射，用 50 mg/kg Sym004 或爾必得舒處理小鼠，每週兩次，持續 3 週。在 3 週處理期後，跟蹤研究小鼠 5 週。

結果

在 3 週 Sym004 療法後，Sym004 組之兩個腫瘤皆被完全消除（圖 47）。在爾必得舒組中 3 隻經處理之小鼠中的 2 隻僅對處理起部分反應。此指示對爾必得舒處理具有部分抗性/不起反應之腫瘤可用 Sym004 有效地治療。因此，針對爾必得舒之後天抗性機制並不影響 Sym004 之功效。

附錄 1. 抗體可變區序列

>992VH (Seq. no. 24)

cgcgccgaggtccaactgcagcaacctgggtctgagctggtagggcctggagcttcagtgaagctgtcct
gcaaggcttctggctacacattcaccagctactggatgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggcct
tgagtggattgggaatatccctcctggtagtcgtagtactaactacgatgagaagttcaagagcaaggcc
aactgactgtagacacatccctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaggactctg
cggctctattactgtacaagaaatggggattactacgttagtagcggggatgctatggactactgggggtca
aggaacctcagtcaccgtctcg

>1024VH (Seq. no. 25)

cgcgcccaggtccaactgcagcagcctggggctgaactggtagggcctgggggttcagtgaagctgtcct
gcaaggcttctggctacaccttcaccagtcactggatgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggcct
tgagtggataggtgagattaatccctagcagcggtcgtaataactacaatgagaagttcaagagtaaggcc
aactgactgtagacaaaatccctccagcacagcctacatgcaattcagcagcctgacatctgaggactctg
cggctctattattgtgtaagatactatggttacgacgaagctatggactactgggggtcaaggaacctcagt
caccgtctcg

>1030VH (Seq. no. 26)

cgcgccgaagtgcagctggtaggtctgggggaggcttagtgaagcctggaggggtccctgaaactctcct
gtgcagcctctggattcactttcagtagttatgccctgtcttgggttcgccagactccagagaggaggct
ggagtgggtcgcatccattagtggtgttgtagcacctactttccagacagtgtgaagggccggtttcacc
atgtccagagataatgccaggaacatccctgtacctccaaatgagcagctctgaggtctgaggacacggcca
tgtattactgtgcaagaggttctgatggttacttctatgctatggactactgggggtcaaggaacctcagt
caccgtctcg

>1042VH (Seq. no. 27)

cgcgcccaggtgcagcttcagcagcctggggctgaactggtagggcctgggggttcagtgaagctgtcct
gtaaggcttctggctacaccttcaccagccactggatgcactgggtgcagcagaggcctggacaaggcct
tgagtggattggagagattcatccctagcaacggtcgtagtactaactacaatgagaagttcaagaacaaggcc
aactgactgtagacaaaatctcccagcacagcctacatgcaactcagcagtttgacatctgaggactctg
cggctctattactgtgcaagatactatggttacgacgatgctatggactactgggggtcaaggaacctcagt
caccgtctcg

>1208VH (Seq. no. 28)

cgcgccgaagtgcagctggtaggtctgggggaggcttagtgaagcctggaggggtccctgaaactctcct
gtgcagcctctggattcgctttcagtagctatgacatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggct
ggagtgggtcgcatatctggtagtggtgatgataataccactatccagactctgtgaagggccgattc
accatctccagacacaatgccaaaaacaccctatacctgcaaatgagcagctctgaagctctgaggacacag
ccatgtattactgtgcaagacagaagtatggtaactacggggacactatggactactgggggtcaaggaac
ctcagtcaccgtctcg

>1229\ VH (Seq. no. 29)

cgcgcccaggttcagctgaaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccatcactt
gctctgtctctgggtttttcattaaccatctatggtgtacactgggttcgccagcctccaggaaagggct
ggagtgggtgggagttatgtgggctggtggaatacagattataattcggctctcatgtccagactgaac
atcagcaaggacaattccaagagccaagttttcttaaaagtgaacagctctacaaactgatgacacagcca
tgtactattgtaccagagatcccgatggttactacgtgggggtggttcttcgatgtctggggcgcggggac
cacggtcacccgtctcg

>1254VH (Seq. no. 30)

cgcgccgaagtgcagctggtggagtctgggggaggcttagtgaagcctggaggggtccctgaaactctcct
gtgcagcctctggattcgcttacagtacctatgacatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggct
ggagtgggtcgcatacattagtagtggtggtgatgccgcctactatcccgacactgtgaagggccgattc
accatctccagagacaatgccaaaaacaccctatacctgcaaattgagcagctctgaagtctgaggacacag
ccatgtattactgtgagaggtctcgctatggaaactacggggacgctatggactactgggggtcaaggaac
ctcagtcacccgtctcg

>1257VH (Seq. no. 31)

cgcgccgaggtccagctgcaacagctctggacctgagctggtgaaacctgggggttcagtgaagataccct
gcaagacttctggatacactttcactgactacaacatggcctgggtgaagcagagccatggaaagagcct
tgagtggattggagatattattcctaacaatggtggtgctatctacaaccagaaattcaagggcaaggcc
actttgactgtagacaaatcctccagtacagcctccatggagctccgcagcctgacatctgaggacactg
cagtctatttctgtgcaagaaagaatatctactataggtacgacggggcaggtgctctggactactgggg
tcaaggaacctcagtcacccgtctcg

>1260VH (Seq. no. 32)

cgcgcccaggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccatcactt
gcactgtctctgggtttttcattaaccacctatggggtacactgggttcgccagcctccaggaaagggct
ggagtgggtgggagtaatatgggctggtggaagcacaattataattcggctctcatgtccagactgagc
atcaagaaagacaactccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagctctgcaaactgatgacacagcca
tgtactactgtgccagagcctatggttacaactttgactattggggccaaggcaccactctcacagtctc
g

>1261VH (Seq. no. 33)

cgcgccgaagtgcagctggtggagtctgggggaggcttagtgaagcctggaggggtccctgaaactctcct
gtgcagctctctggattcactttcagtagctatgtcatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggct
ggagtgggtcgcaaccattactagtgggtggttaggaacatctactatctagacagtggaagggggcgattc
actatctccagagacaatgccaagaacaccctgtacctgcaaattgagcagctctgaggtctgaggacacgg
ccatgtattactgtgcaagacatgaggactataggtacgacgggttactatgctatggactactgggggtca
aggaacctcagtcacccgtctcg

>1277VH (Seq. no. 34)

cgcgccgaagtgcagctggtggagtctgggggaggcttagtgaagcctggagagtccttgaaactctcct
gtgcagcctctggattcgctttcagttactctgacatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggct
ggagtgggtcgcatacatgagtagtgctggtgatgtcaccttctattcagacactgtgaagggccgattc

accatctccagagacaatgccagaacaccctgtatctgcaagtgagcagtctgaagtctgaggacacag
ccatatattactgtgtaagacaccgggacgtggctatggactactggggcaaggaacctcagtcaccgt
ctcg

>1284VH (Seq. no. 35)

cgcgcccagggtccaactgcagcagcctggggctgaactgggtgaagcctggggcttcagtgaagctgtcct
gcaaggcttctggctacaccttcaccagcagctggatgcactggatgaaacagaggcctggacaaggcct
tgagtggattggagagattaatcctagtaacggtcgctctagctacaatgagaagttcaagagcaaggcc
aactgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcaactcagcagcctgacatctgaggactctg
cggctctattactgtgcaagaataggtgggtatctacgtggagacttactggggccaagggactctggtcac
tgtctcg

>1308VH (Seq. no. 36)

cgcgcccagggtccagcttcagcagctctggagctgagctgggtgaggcctgggtcctcagtgaagatttcct
gcaaggcttctggctatgcattcagtagctactggatgaactgggtgaggcagaggcctggacagggctct
tgagtggattggacagatttatcctggagatgggtgataactacaatggaaagttcaagggtagagcc
aactgactgcaaaacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctaactctgaggactctg
cggctctatttctgtgcaagaagggtatcttccctctatgatgtttaccctactactttgactactgggg
ccaaggcaccactctcacagtctcg

>1320VH (Seq. no. 37)

cgcgcccagggtccaactgcagcagcctggggctgaactgggtgaagcctggggcttcaatgaagctgtcct
gcaaggcttctggctacaccttcaccaactactggatgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggcct
tgaatggattggagaaattaatcctagcaacggtcgtaactaattacaatgagaagttcaagagcaaggcc
aactgactgtagacaaatcgtccagcacagcctacatgcaactcagcagcctgacatctgaggactctg
gggtctattactgtgcaaaaggggggaactactatgattacgactgggactactggggccaaggcaccac
tctcacagtctcg

>1344VH (Seq. no. 38)

cgcgcccagggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctgggtggcgccctcacagagcctgtccatcactt
gcactgtctctgggttttcatcattacatctatgggtgtacactgggttcgccagcctccaggaaagggctct
ggagtggctgggagtaatatgggctgggtggaaacacaaattataattcggtctctcatgtccagactgagc
atcagcaaagacaactccaagagtcaagttttcttaaaaatgaacagtctgcaaactgatgacacagcca
tgtacttctgtgccagaggctatggctacaatttagactattggggccaaggcaccactctcacagtctc
g

>1347VH (Seq. no. 39)

cgcgcccagggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctgggtggcgccctcacagagcctgtccatcacat
gcaccgtctcaggattctcattacccggccatgggtgtaaactgggttcgccagcctccaggaaagggctct
ggagtggctgggaatgatatgggggtgatggaagcacggactataattcaactctcaaactccagactgagt
atcagcaaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagtctgcagactgatgacaccgcca
gggtactactgtgccagaggctacggctacctttactactttgactactggggccaaggcaccactctcac
agtctcg

>992VH (Seq. no. 40)

RAEVQLQQPGSELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGQLEWIGNIYPGSRST
 NYDEKFKSKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRNGDYVSSGDAMDYWGQGTS
 VTVS

>1024VH (Seq. no. 41)

RAQVQLQQPGAELVEPGGSVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQRPQGQLEWIGEINPSSGRN
 NYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCVRYGYDEAMDYWGQGTSVTVS

>1030VH (Seq. no. 42)

RAEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYALSWVRQTPERRLEWVASISGVGSTY
 FPDSVKGRFTMSRDNARNILYLQMSSLRSEDAMYYCARGSDGYFYAMDYWGQGTSVTVS

>1042VH (Seq. no. 43)

RAQVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQRPQGQLEWIGEIHPSNGRT
 NYNEKFKNKATLTVDKSPSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYGYDDAMDYWGQGTSVTVS

>1208VH (Seq. no. 44)

RAEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFASFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYIGSGDDNT
 HYPDSVKGRFTISRHNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARQKYGNYGDTMDYWGQGTSVT
 VS

>1229VH (Seq. no. 45)

RAQVQLKESGPGLVAPSQSL SITCSVSGFSLTIYGVHWVRQPPGKGLEWLGVMWAGGNTD
 YNSALMSRLNISKDNSKSQVFLKVNLSLTDDTAMYYCTRDPDGYVGVWFFDVWGAGTTVT
 VS

>1254VH (Seq. no. 46)

RAEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAYSTYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGDAA
 YYPDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARSRYGNYGDMAMDYWGQGTSVT
 VS

>1257VH (Seq. no. 47)

RAEVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKTSGYTFTDYNMAWVKQSHGKSLEWIGDIIPNNGGA
 IYNQKFKGKATLTVDKSSSTASMELRSLTSED TAVYFCARKNIYYRYDGAGALDYWGQGT
 SVTVS

>1260VH (Seq. no. 48)

RAQVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTTYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTN
 YNSALMSRLSIKDNSKSQVFLKMNSLTDDTAMYYCARAYGYNFDYWGQGTTLTVS

>1261VH (Seq. no. 49)

RAEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAVSGFTFSSYVMSWVRQTPEKRLEWVATITSGGRNI
YYLDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDAMYYCARHEDYRYDGYAMDYWGQGTS
VTVS

>1277VH (Seq. no. 50)

RAEVQLVESGGGLVKPGESLKLSCAASGFAFSYSDMSWVRQTPEKRLEWVAYMSSAGDVT
FYSDTVKGRFTISRDNKNTLYLQVSSLKSEDTAIYYCVRHRDVAMDYWGQGTSVTVS

>1284VH (Seq. no. 51)

RAQVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSDWMHWMKQRPQGQLEWIGEINPSNGRS
SYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARIGGIYVETYWGQGTTLTVS

>1308VH (Seq. no. 52)

RAEVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVRQRPQGQLEWIGQIYPGDGDT
NYNGKFKGRATLTANKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRASSLYDVYPYFDYWGQGT
TLTVS

>1320VH (Seq. no. 53)

RAQVQLQQPGAELVKPGASMKLSCKASGYTFTNYWMHWVKQRPQGQLEWIGEINPSNGRT
NYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSGVYYCAKGGNYDYDWDYWGQGTTLTV
S

>1344VH (Seq. no. 54)

RAQVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTIYGVHWVRQPPGKGLEWLGVWAGGNTN
YNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYFCARGYGYNLDYWGQGTTLTVS

>1347VH (Seq. no. 55)

RAQVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTGHGVNWVRQPPGKGLEWLGMWGDGSTD
YNSTLKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTARYYCARGYGYLYYFDYWGQGTTLTVS

>992VL (Seq. no. 56)

ctagccgacattcagatgactcagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatca
gttgaggacaagtcaggacattggcaattatttaaactggatcagcagaaaccagatggaactgttaa
actcctgatctactacacatcaagattacactcaggagtcacatcaagggttcagtgaggagtggtctgga
acagatttttctctcaccattaacaacgtggagcaagaggatgttgccacttacttttgccaacactata
atacgggttcctccgacgttcgggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgt
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataac
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcaga
ctacgagaaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagc
ttcaacaggggagagtg

>1024VL (Seq. no. 57)

ctagccgacatcgtgatgacacaagctgcattctccaatccagtcactcttggaacatcagcttccatct
cctgcaggtctagtaagagtctcctacatagtaatggcatcacttatttgatttggtatctgcagaagcc
aggccaggtctcctcagctcctgatttatcagatgtccaaccttgccctcaggagtcacagacaggttcagt
agcagtgggtcaggaactgatttcacactgagaatcagcagagtggaggctgaggatgtgggtgtttatt
actgtgctcaaaatctagaacttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactgt
ggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtg
tgctgtgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctccaatcgg
gtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgac
gctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtacccatcagggcctgagctcg
cccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

>1030VL (Seq. no. 58)

ctagccgacattgtgctgactcagtcctcctgcttcttagctgtatctctggggcagagggccaccattt
catgcagggccagcaaaagtgtcagtaacatctggctatagttttatgcactggtaccaactgaaaccagg
acagccacccaaactcctcatctatcttgcatccaacctagaatctggggtccctgccaggttcagtggc
agtgggtctgggacagacttcaccctcaacatccatcctgtggaagaggaggatgctgcaacctattact
gtcagcacagtagggagtttccgttaacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactgtggc
tgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctccaatcgggta
actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgct
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtacccatcagggcctgagctcgccc
gtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

>1042VL (Seq. no. 59)

gatattgtgatgactcaggtgcattctccaatccagtcactcttggaacatcagcttccatctcctgca
ggcttagtaagagtctcctacatagtaatggcatcacttatttgatttggtatctgcagaagccaggcca
gtctcctcagctcctgatttatcagatgtccaaccttgccctcaggagtcacagacaggttcagtagcagt
gggtcaagaactgatttcacactgagaatcagcagagtggaggctgaggatgtgggtgtttattactgtg
ctcaaaatctagaacttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactgtggctgc
accatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctg
ctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctccaatcgggtaact
cccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgag
caaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtacccatcagggcctgagctcgcccgtc
acaaagagcttcaacaggggagagtgt

>1208VL (Seq. no. 60)

ctagccgatgttgtgatgactcagactccactctccctgcctgtcagtccttgagatcaagcctccatct
cttgcatcttagtcagagccttgtagacagtaatggaaacacctatttacatttggtacctgcagaagcc
aggccaggtctccaaaactcctgatctacaaagtttccaaccgattttctgggggtccagacaggttcagt
ggcagtggtcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtggaggctgaggatctgggagtttatt
tctgtctcaaaagtacacatgttcccacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactgtggc
tgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctccaatcgggta

actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgct
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgccc
gtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

>1229VL (Seq. no. 61)

ctagccgacattgtgatgacccagtctcacaattcatgtccacatcagtgggagacaggggtcagcatca
cctgcaaggccagtccaggtgtgactaatgccgtagcctgggtatcaacaaaaaccaggacaatctcctaa
actactgatttactgggcatccatccgacacactggagtccttgatcgcttcacaggcagtagatctggg
acagattatactctcaccatcaacagtgtgcaggctgaagacctggccctttattattgtcagcaacatt
ataacactccgctcacgttcgggtgctgggaccaagctggaaataaaaacgaactgtggctgcaccatctgt
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgtgcctgctgaataac
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccggtcacaaagagc
ttcaacaggggagagtgt

>1254VL (Seq. no. 62)

ctagccgatgttgatgacacagactccactctccctgcctgtcagtcttgagatcaagcctccatct
cttgagatctagtccagccttgtagacagtaatggtaacacctatttacattgggtacctgcagaagcc
aggccagtctcaaagctcctgctctacaaagtttccaaccgattttctgggggtcccagacaggttcagt
ggcagtggtcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtggagtcctgaggatctgggagtttatt
tctgctctcaaaatacacatgtgtacacgttcggaggggggacaaagtggaaataaaaacgaactgtggc
tgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgc
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggta
actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgct
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgccc
gtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

>1257VL (Seq. no. 63)

ctagcccaaattgtgctcacacagtctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggtcaccatga
cctgcagtgccagctcaagtgttaagttacatttactgggtaccagcagaagccaggatcctccccagact
cctgatttatgacgcatccaacctggcttctggagtcctgttcgcttcagtggcagtggtctgggacc
tcttactctctcacaatcagccgaatggaggctgaagatgctgccacttattactgccagcagtgaggca
gttacccaatcacgttcggctcggggacaaagttggaaataaaaacgaactgtggctgcaccatctgtctt
catcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgtgcctgctgaataacttc
tatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgt
tcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagacta
cgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccggtcacaaagagcttc
aacaggggagagtgt

>1260VL (Seq. no. 64)

ctagccgatatccagatgactcagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcccatca
gttgagtgcaagtcagggcattaccaattatttaaactgggtatcagcagaaaccagatggaaactgttaa

actcctgatctattactcatcaagtttacactcaggagtcctcatcaagggtcagtgaggagtggtctggg
acagattattctctcaccatcagcaacctggaacctgaagatattgccacttactattgtcagcagtata
gtgagattccgtacacgttcggaggggggaccaagctggagctgaaacgaactgtggctgcaccatctgt
cttcattctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgctcacaagagc
ttcaacaggggagagtgt

>1261VL (Seq. no. 65)

ctagcccaaattgtgctgacctcctcagcaatcatgtctgcattctcaggggagaagggtcaccataa
cctgcagtgccagctcaagtgttaagttacatgcactgggtccagcagaagccaggcacttctccaaact
ctggatttatagtagcatccaacctggcttctggagtcctgctcgttcagtggcagtggtctgggacc
tcttactctctcacaatcagccgaatggaggctgaagatgctgccacttattactgccagcaaaggagta
gttaccatacacgttcggaggggggaccaagctggagctgaaacgaactgtggctgcaccatctgtctt
catcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttc
tatcccagagaggccaaagtacagtggagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagt
tcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagacta
cgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgctcacaagagcttc
aacaggggagagtgt

>1277VL (Seq. no. 66)

ctagccgatgttgtgatgacctcactctcctgctcagtccttgagatcaagcctccatct
cttgcatctagtacagccttgtagacagtaatggaaacacctatttacattggtacctgcagaagcc
aggccagctctccaaagctcctgatctacaaagttccaaccgattttctgggggtcccagacaggttcagt
ggcagtggtcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtggaggctgaggatctgggagtttatt
tctgctctcaaagtacacatgttccgacgttcggtggaggccaccaagctggaaatcaaacgaactgtggc
tgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggagggtggataacgccctccaatcgggta
actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgct
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccc
gtcacaagagcttcaacaggggagagtgt

>1284VL (Seq. no. 67)

ctagccgacattgtgtgaacacagtcctcctgcttcttagctgtatctctggggcagagggccaccatct
catgcagggccagccaaagtgtcagtacatctacctatagttatatgcactgggtatcaacagaaatcagg
acagccacccaaactcctcatcaagtatgcacccaacctagagctctgggggtccctgccaggttcagtggc
agtgggtctgggacagacttcacctcaacatccatcctgtggaggaggaggatactgcaacatattact
gtcagcacagttgggagattccgtggacgttcggtggaggccaccaagctggaaatcaaacgaactgtggc
tgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggagggtggataacgccctccaatcgggta
actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgct
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccc
gtcacaagagcttcaacaggggagagtgt

gtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

>1308VL (Seq. no. 68)

ctagccgacatccagatgacacaaactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatca
gttgcagggcaagtcaggacattagcaattatTTAAactggatcagcagaaaccagatggaactgttaa
agtcctgatctactacacatcaagattacactcaggagtcctcatcaagggttcagtggcagtggtctgga
acagattattctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttgccaacagggta
atacgccttcgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactgtggctgcaccatctgt
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagc
ttcaacaggggagagtgt

>1320VL (Seq. no. 69)

ctagccgacattcagatgacccagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatca
gttgcagtgcaagtcaggacattagcaattatTTAAactggatcagcagaaaccagatggaactgttaa
actcctgatctatcacacatcaactttacactcaggagtcctcatcaagggttcagtggcagtggtctggg
acagattattctctcaccatcagcaacctggaacctgaagatattgccacttactattgtcagcaatata
gtaagcttccgtggacgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgt
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagc
ttcaacaggggagagtgt

>1344VL (Seq. no. 70)

ctagccgacattcagatgacacagactacttctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatta
gttgcagtgcaagtcagggcattagtaattatTTAAactggatcagcagaaaccagatggaactgttaa
actcctgatctattacacatcaagtttacactcaggagtcctcatcaagggttcagtggcagtggtctggg
acagattattctctcaccatcagcaacctggaacctgaagatattgccacttactattgtcagcagtata
gtaagcttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgt
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagc
ttcaacaggggagagtgt

>1347VL (Seq. no. 71)

ctagccgaaaatgtgctgactcagtcctccagcaatcatgtctgcatctccaggggaaaaggtcaccatga
cctgcagggccagctcaagtgttaagttccagttacttgcaactggtagcagcaaaagttaggtgcctcccc
caaactctggatttatagcacatccaacttggtctctggagtcctctgctcgcttcagtggcagtggtct
gggacctcttactctctcacagtcacagtggtggagactgaagatgctgccacttattactgccaccagt

acagtgggtttccattcacgttcggctcggggaccaagctggagctgaaacgaactgtggctgcaccatc
tgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctgctgaat
aacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccagg
agagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagc
agactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaag
agcttcaacaggggagagtgt

>992VL (Seq. no. 72)

LADIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGV
PSRFGSGSGTDFSLTINNVEQEDVATYFCQHYNTVPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSST
LTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1024VL (Seq. no. 73)

LADIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSN
LASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVIYCAQNLELPYTFGGGKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY
SLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1030VL (Seq. no. 74)

LADIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSFMHWYQLKPGQPPKLLIYLASN
ESGVPARFSGSGSGTDFTLRIHPVEEEDAATYYCQHSREFPLTFGGGKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
LSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1042VL (Seq. no. 75)

DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA
SGVPDRFSSSGSRTDFTLRISRVEAEDVGVIYCAQNLELPYTFGGGKLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
SSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1208VL (Seq. no. 76)

LADVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPTFGGGKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
LSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1229VL (Seq. no. 77)

LADIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVTNAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASIRHTGV
PDRFTGSRSGTDYTLTINSVQAEDLALYYCQQHYNTPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSST
LTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1254VL (Seq. no. 78)

LADVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLLYKVSN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYFCSQNTHVYTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1257VL (Seq. no. 79)

LAQIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYIYQYQKPGSSPRLLIYDASNLAGV
VRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEADAATYYCQWSSYPITFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1260VL (Seq. no. 80)

LADIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGITNYLNWYQKPDGTVKLLIYSSSLHSGV
PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQYSEIPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1261VL (Seq. no. 81)

LAQIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLAGV
ARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEADAATYYCQQRSSYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1277VL (Seq. no. 82)

LADVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1284VL (Seq. no. 83)

LADIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSTYSYMHWFQKSGQPPKLLIKYASNL
ESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDATYYCQHSWEIPWTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1308VL (Seq. no. 84)

LADIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQKPDGTVKVLIIYTSRLHSGV
PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQGNLTPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1320VL (Seq. no. 85)

LADIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSTLHSGV
 PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST
 LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1344VL (Seq. no. 86)

LADIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGV
 PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST
 LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1347VL (Seq. no. 87)

LAENVLTQSPAISASPGKVTMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGASPKLWIYSTSNLASG
 VPARFSGSGSGTSYSLTVNSVETEDAATYYCHQYSGFPFTFGSGTKLELKRTVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST
 TLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

附錄 2. 抗體恆定區序列

>人類 IGKC 區 (Seq. no. 88)

```
ttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgcctgctgaataact
tctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgcctccaatcgggtaactcccaggagag
tgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagac
tacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagct
tcaacaggggagagtggttaataagcgggccgcggtggaggcggt
```

>人類 IGKC 區 (Seq. no. 89)

```
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
```

外顯子 1 1..298

內含子 299..689

外顯子 2 690..734

內含子 735..852

外顯子 3 853..1182

內含子 1183..1279

外顯子 4 1280..1602

>人類 IGHG1 恆定域基因組序列 (Seq. no. 90)

```
agtgcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacag
cggccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaactcaggcgccct
gaccagcggcgtgcacaccttcccggtgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtg
accgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacca
aggtggacaagagagttggtgagaggccagcacagggagggaggggtgtctgctggaagccaggctcagcg
ctcctgcttggacgcatcccggtatgcagtcacagtcacagggcagcaaggcaggccccgtctgcctctt
cacccgaggcctctgcccgcctactcatgctcaggagaggggtcttctggctttttccccaggctctg
ggcaggcacaggctaggtgcccctaaccagggccctgcacacaaaggggcagggtgctgggctcagacctg
ccaagagccatatccgggaggaccctgcccctgacctaaagccaccccaaaggccaaactctccactccc
tcagctcggacaccttctctcctcccagattccagtaactcccaatcttctctctgcagagcccaaactct
tgtgacaaaactcacacatgccaccgtgcccaggtaagccagccaggcctcgccctccagctcaaggc
gggacagggtgccctagagtagcctgcacccagggacagggccccagccgggtgctgacacgtccacctcca
tctcttctcagcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttctcttccccccaaaaccaaggacac
cctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtgggtggtagcgtgagccacgaagaccctgaggtc
aagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtaga
acagcacgtaccgtgtgggtcagcgtcctcacgcctcgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaa
gtgcaaggctctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaacccatctccaaagccaaagggtgggacc
cgtgggggtgcgaggggccacatggacagaggccgggtcgggccaccctctgccctgagagtgaccgctgta
ccaacctctgtccctacagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgaggagaga
tgaccaagaaccagggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtg
ggagagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacgggtccttc
```

ttcctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtga
tgcattgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaata

>IGHG1 (Seq. no. 91)

SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

附錄 3. 雙可變域抗體序列

>992L1024\IGHV (Seq. no. 92)

ggcgcgccgaggtccaactgcagcaacctgggtctgagctggtaggcctggagcttcagtgaagctgtc
ctgcaaggcttctggctacacattcaccagctactggatgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggc
cttgagtggattgggaatatttatcctggtagtcgtagtactaactacgatgagaagttcaagagcaagg
ccacactgactgtagacacatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaggactc
tgcgggtctattactgtacaagaaatggggattactacgttagtagcggggatgctatggactactgggg
caaggaacctcagtcaccgtctcgtcagccagcaccaagggccccaggtccaactgcagcagcctgggg
ctgaactggtaggcctgggggttcagtgaagctgtcctgcaaggcttctggctacaccttcaccagtc
ctggatgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggccttgagtggataggtgagattaatcctagcagc
ggtcgtaataactacaatgagaagttcaagagtaaggccacactgactgtagacaaatcctccagcacag
cctacatgcaattcagcagcctgacatctgaggactctgcgggtctattattgtgtaagatactatgggta
cgacgaagctatggactactgggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcgag

>992L1024\IGKV (Seq. no. 93)

gctagccgacattcagatgactcagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatc
agttgcaggacaagtgcaggacattggcaattatttaaactgggtatcagcagaaaccagatggaactgtta
aactcctgatctactacacatcaagattacactcaggagtcctcatcaagggttcagtggcagtggtctgg
aacagatttttctctcaccattaacaacgtggagcaagaggatgttgccacttacttttgccaacactat
aatacgggttctccgacgttcgggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcaccagaca
tcgtgatgacacaagctgcattctccaatccagtcactcttggaacatcagcttccatctcctgcaggtc
tagtaagagtctcctacatagtaatggcatcacttatttgtatttggtatctgcagaagccaggccagtct
cctcagctcctgatttatcagatgtccaaccttgccctcaggagtcctcagacaggttcagttagcagtggt
caggaactgatttcacactgagaatcagcagagtgagggtgaggatgtgggtgtttattactgtgctca
aaatctagaacttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaaacgaactgtggctgcacca
tctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctgctga
ataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtggataacgccctccaatcgggtaactccca
ggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaa
gcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaa
agagcttcaacaggggagagtgttaataagcgggccgc

>1024L992\IGHV (Seq. no. 94)

ggcgcgcccaggtccaactgcagcagcctggggctgaactggtaggcctgggggttcagtgaagctgtc
ctgcaaggcttctggctacaccttcaccagtcactggatgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggc
cttgagtggataggtgagattaatcctagcagcggtcgtaataactacaatgagaagttcaagagtaagg
ccacactgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcaattcagcagcctgacatctgaggactc
tgcgggtctattattgtgtaagatactatgggttacgacgaagctatggactactgggggtcaaggaacctca
gtcaccgtctcgtcagccagcaccaagggccccaggtccaactgcagcaacctgggtctgagctgggtga
ggcctggagcttcagtgaagctgtcctgcaaggcttctggctacacattcaccagctactggatgcactg
ggtagagcagaggcctggacaaggccttgagtggattgggaatatttatcctggtagtcgtagtactaac
tacgatgagaagttcaagagcaaggccacactgactgtagacacatcctccagcacagcctacatgcagc
tcagcagcctgacatctgaggactctgcgggtctattactgtacaagaaatggggattactacgttagtag

cggggatgctatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcgag

>1024L992\IGKV (Seq. no. 95)

gctagccgacatcgtgatgacacaagctgcattctccaatccagtcactcttggaacatcagcttccatc
tctcgagggtctagtaagagtctcctacatagtaatggcatcacttatttgatttggtatctgcagaagc
caggccagtctcctcagctcctgatttatcagatgtccaaccttgccctcaggaggtcccagacagggttcag
tagcagtgggtcaggaactgatttcacactgagaatcagcagagtggagggtgaggatgtgggtgtttat
tactgtgctcaaaatctagaacttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactg
tggtgcaccagacattcagatgactcagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcac
catcagttgcaggacaagtgcaggacattggcaattatttaaactgggtatcagcagaaaccagatggaact
gttaaaactcctgatctactacacatcaagattacactcaggaggtcccatcaagggttcagtggcagtggggt
ctggaacagatttttctctcaccattaacaacgtggagcaagaggatggtgccacttacttttgccaaca
ctataatacgggttctcctccgacgttcgggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgaactgtgggtgcacca
tctgtcttcatcttccccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctga
ataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaagggtggataacgccctccaatcgggtaactccca
ggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaaa
gcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaa
agagcttcaacaggggagagtgttaataagcgccgc

>992L1024\IGHV (Seq. no. 96)

RAEVQLQQPGSELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGLEWIGNIYPGSRST
NYDEKFKSKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRNGDYVSSGDAMDYWGQGTS
VTVSSASTKGPKVQLQQPGAELVEPGGSVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQRPQGLEWIG
EINPSSGRNNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCVRYGYDEAMDYW
GQGTSVTVS

>992L1024\IGKV (Seq. no. 97)

LADIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGV
PSRFGSGSGTDFSLTINNVEQEDVATYFCQHYNTVPPTFGGGTKLEIKRTVAAPDIVMT
QAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYLYWLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDP
RFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDGVVYCAQNLELPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1024L992\IGHV (Seq. no. 98)

RAQVQLQQPGAELVEPGGSVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQRPQGLEWIGEINPSSGRN
NYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCVRYGYDEAMDYWGQGTSVTVS
SASTKGPEVQLQQPGSELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGLEWIGNIYP
GSRSTNYDEKFKSKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRNGDYVSSGDAMDYW
GQGTSVTVS

>1024L992\IGKV (Seq. no. 99)

LADIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSN
LASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKLEIKRTVAAP
DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDFTSLTINNVEQEDVATYFCQHYNTVPPTFGGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【圖式簡單說明】

圖 1：脾細胞之分選（關於細節，參見實施例 1）。設定（描述）以下門：

- 門 1：活細胞（FSC/碘化丙錠圖）。（左下圖）
- 門 2：漿細胞經門控為 CD43 陽性/CD138 陽性。（右下圖）
- 門 3：成對辨別（右上圖）

圖 2：鼠類-mSymplex™ PCR。用於擴增及同源連接來自單一細胞之重鏈及輕鏈抗體基因的多路重疊延伸 RT-PCR。關於細節，參考實施例 1。

圖 3：鼠類庫選殖。藉由重疊延伸藉由剪接將來自單一漿細胞之編碼 V_H/V_L 基因對之 mSymplex™ PCR 產物池剪接成編碼人類 κ 恆定輕鏈之基因。將編碼完全人類-小鼠嵌合抗體之基因池插入表現載體中，繼而插入雙向啟動子匣（ $2 \times \text{CMV}$ ）。

圖 4：哺乳動物全長抗體表現載體 00-VP-002 之示意圖。Amp 及 Amp pro，胺苄青黴素抗性基因及其啟動子；pUC 起點，pUC 複製起點；CMV，驅動輕鏈及重鏈表現之哺乳動物啟動子；IGHV 前導序列，基因組人類重鏈前導序列；H 填充片段，交換重鏈可變區編碼序列之插入物；IGHG1，編碼基因組免疫球蛋白同型 G1 重鏈恆定區之序列（序列展示於附錄 2 中）；兔 B-血球蛋白 A，兔 β -血球蛋白 polyA 序列；IGKV 前導序列，鼠類 κ 前導序列；L 填充片段，交換輕鏈編碼序列之插入物；SV40 term，猿猴病毒 40 終止子序

列；FRT，Flp 識別目標位點；Neo，新黴素抗性基因；SV40 poly A，猿猴病毒 40 poly A 信號序列。

圖 5：於 450-620 nm 之吸光度差異之聚類分析。根據活性將上清液聚類，如由純系編號後之數字（1 至 4）所指示的。深灰色指示代謝活性細胞數目減少，而淡灰色指示代謝活性細胞數目增加。黑色指示上清液對於代謝活性細胞之數目無影響。

圖 6：以競爭 ELISA 所測定之抗 EGFR 抗體對所列之針對特定 EGFR 域之參考抗體的抑制程度。A) 計算抑制率。B) 如下對抑制率評分：25-49%：中度競爭（+）；50-74%：強烈的競爭（++）；75-100%：極強烈的競爭（+++）。顯示顯著抑制（50-100%）之框加有灰色陰影。以二重複展示爾必得舒及維克替比（四次獨立實驗）以說明檢定之再現性。Ab2 (225) 為產生爾必得舒之鼠類前軀物。

圖 7：在 Biacore 3000 SPR 機器上執行之單一抗原決定基定位循環之圖示，其中樣本 mAb 與四種不同參考抗體競爭結合 EGFR 細胞外域。

圖 8：藉由競爭分析使用 SPR 技術所測定之抗 EGFR 抗體對所列的針對特定 EGFR 域之參考抗體的抑制程度。A) 計算抑制率。B) 如下對抑制率評分：25-49%：中度競爭（+）；50-74%：強烈的競爭（++）；75-100%：極強烈的競爭（+++）。顯示顯著抑制（50-100%）之格子加有灰色陰影。標有*標記之純系 1229 在 Biacore 檢定中未結合。

圖 9：藉由抗 EGFR 抗體對之 SPR 競爭分析對抗 EGFR

抗體庫內抗原決定基聚類之測定。將抗體根據假定之 EGFR 域識別分組。將有如下發現之格子加上灰色陰影：抗體組合結合重疊抗原決定基從而產生大於 50% 之抑制率。將未進行測定之格子加上黑色。A) 計算抑制率。B) 如下對抑制率評分：25-49%：中度競爭 (+)；50-74%：強烈的競爭 (++)；75-100%：極強烈的競爭 (+++)。

圖 10：藉由 Biacore 分析所測定之針對 EGFR 細胞外域之參考抗體及抗 EGFR 抗體的抗原決定基定位。A) 針對 EGFR 細胞外域 (ECD) 之域 I 或域 I/II 的抗體之抗原決定基定位。B) 針對 EGFR ECD 之域 III 的抗體之抗原決定基定位。

圖 11：針對 EGFR 上之非重疊抗原決定基的抗體之寡選殖混合物之同時結合的研究。A) 依次添加針對域 III、域 I 或未知特異性之抗體。單一樣本 mAb 相對於不同 mAb 混合物或單一 mAb 所測得之抑制率值展示於加有陰影之框中。亦展示用於計算抑制率之 R_u 最大值。B) 針對 EGFR 上之非重疊抗原決定基之六種獨特樣本 mAb 與含有該六種所測試抗體之抗體混合物的競爭分析。不包括所測試之樣本抗體的抗體混合物充當陽性對照組。單一樣本 mAb 相對於不同 mAb 混合物所測得之抑制率值展示於加有陰影之框中。亦展示用於計算抑制率之 R_u 最大值。C) 來自 B 中之分析的相應感應圖 (sensogram)，其說明抗體阻斷且在某些情況下抗體增強結合。D) 相對於六種 mAb 抗體混合物針對域 I、I/II 及未知特異性之其他抗體之測試。

圖 12：藉由對全長 EGFR 進行抗體滴定及偵測與鏈黴抗生物素蛋白 HRP 試劑結合的生物素化 EGF 配位體來測定抗體介導之 EGF 配位體阻斷。分別將爾必得舒、維克替比及西那吉斯 IgG（帕利珠單抗）用作陽性及陰性對照組。在用測試抗體阻斷所識別之抗體抗原決定基後，藉由添加用於偵測之 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 生物素化 EGF 配位體及二級鏈黴抗生物素蛋白-HRP 結合物來顯像 EGF 配位體競爭程度。

圖 13：使用所指定抗體預處理對 HN5 細胞中 EGF（ 50 ng/ml ）誘導之 EGFR 磷酸化的影響。將圖中所指之抗體（ $10 \mu\text{g/ml}$ ）與細胞一起培養 30 分鐘，隨後添加 EGF 歷時 7.5 min。標有*標記之數據組明顯不同於對照組（陰性對照組）數據組（ $p < 0.05$ ）。A. 1208 對 EGFR 磷酸化具有明顯的保護效應。B. 1277 及 1320 顯著地防止 EGF 誘導之磷酸化。誤差條表示三個獨立實驗之標準偏差。

圖 14：HN5 細胞中之磷酸化 EGFR（pEGFR）及 EGFR 的細胞內西方分析。混合物表示 992、1030 與 1042 之最終濃度為 $10 \mu\text{g/ml}$ 之等莫耳混合物，其他抗體各自係以 $10 \mu\text{g/ml}$ 之濃度使用。添加 $50 \mu\text{g/ml}$ EGF 歷時 7.5 min，隨後固定以刺激 EGFR 磷酸化。誤差條表示 6 個獨立（ctrl-）或 3 個獨立數據點（992、1030、1042、混合物或爾必得舒）之標準偏差。992、1030、混合物及爾必得舒對於磷酸化具有明顯的（ $* = p < 0.05$ ）保護效應。

圖 15：抗體之培養對 EGFR 內化的影響。數據係以自細胞表面移除之受體相對於初始染色之百分比展示。誤差

條對應於 SEM。

圖 16：A431-NS 細胞在不同濃度之抗體 992、1030 及 1042 及其混合物存在下的生長曲線，其係藉由相較於未經處理之對照組的代謝活性細胞百分比測量。1001 為用作陰性對照之具有類似同型之非功能性抗體。

圖 17：A431-NS 細胞在 10 $\mu\text{g/ml}$ 抗體 992、1030 及 1042 及其混合物以及不同濃度之 EGFR 配位體 EGF 存在下的生長曲線，其係藉由於 450 nm 之吸光度測量。1001 為用作陰性對照之具有類似同型之非功能性抗體。

圖 18：A431-NS 細胞在不同濃度之抗體 992 及 992 與具有存在於域 I、II 或 III 中之非重疊抗原決定基之抗體的混合物存在下之生長曲線。1001 為用作陰性對照之具有類似同型之非功能性抗體。

圖 19：A431NS 細胞之凋亡。以 10 倍稀釋測試 EGFR-混合物、個別單株抗體、爾必得舒及維克替比。使用來自 Roche 之 ELISA 套組量測來自凋亡細胞之組蛋白-DNA 複合物。

圖 20：向四組 10 隻裸 Balb/C Nu/Nu 小鼠接種 1×10^6 個 A431NS 細胞。當腫瘤為約 100 mm^3 時，開始處理。如箭頭所指示，在實驗期間向各組注射 1 mg/ml 抗體五次。用數位測徑器量測腫瘤直徑。結果係以平均腫瘤體積 ($\pm$ SEM) 展示。

圖 21：當個別小鼠在圖 20 中所示之實驗中被殺死時，切取腫瘤且稱重。展示平均值 $\pm$ SEM。星號指示顯著性為

$P < 0.05$ 。

圖 22：A431-NS 球狀體在 10 $\mu\text{g/ml}$ 抗體 1001、爾必得舒、維克替比及具有非重疊抗原決定基之三種抗體之混合物 992+1030+1042 存在下的生長。1001 為用作陰性對照之具有類似同型之非功能性抗體。

圖 23：自源於獼猴皮膚表皮之 cDNA 選殖之獼猴 EGFR 細胞外域的 DNA (SEQ ID NO 100) 及蛋白質序列 (SEQ ID NO 101)。

圖 24：所獲得之獼猴 EGFR ECD 蛋白質序列 (SEQ ID NO 101) 與自 GENBANK 編號 X00588 獲得之人類 EGFR ECD (SEQ ID NO 108) 的排比。亦展示一致序列 (SEQ ID NO 109)。

圖 25：在結合人類或獼猴 EGFR ECD 或兩者之交叉反應性與物種特異性抗體之間的 ELISA 檢定辨別的實例。

圖 26：來自異種移植小鼠之四個實驗組中之每一者的代表性腫瘤切片的顯微照片。在 200 倍放大率，箭頭指向活體內 A431 細胞終末分化之集中區。注意在用三種抗 EGFR 純系之混合物 (992+1030+1042) 處理之腫瘤中終末分化之集中區明顯較大且數目較多 (上面兩張圖)。

圖 27：A) 在添加 10 $\mu\text{g/ml}$ 對照抗體 (利妥昔單抗 (Rituximab)，抗 CD-20) 或 992 與 1024 之抗 EGFR 抗體混合物後 24 小時在 40 倍放大率取得之 HN5 球狀體之影像。B) 使用軟體 Image J 定量由細胞覆蓋之面積 (* $p < 0.01$)。

圖 28：以佔未經處理之對照組的百分比形式展示四個處理組之套膜蛋白含量的圖（分別與爾必得舒、維克替比及陰性對照組相比較， $*p<0.005$ ）。

圖 29：A) 在 60 倍放大率取得的與 10 $\mu\text{g/ml}$ Alexa-488 標記之爾必得舒或 992+1024 一起培養 2 小時之 HN5 及 A431NS 細胞之影像。B) 在 60 倍放大率使用小針孔取得的與 10 $\mu\text{g/ml}$ Alexa-488 標記之爾必得舒或 992+1024 一起培養 2 小時之 A431NS 細胞的影像。

圖 30：A) 在 60 倍放大率取得的與 10 $\mu\text{g/ml}$ Alexa-488 標記之爾必得舒或 992+1024 一起培養所指定時段之 HN5 細胞的影像。

圖 31：藉由在 ELISA 中對 A431-NS 細胞及經純化全長 EGFR 作連續抗體滴定來測定 Fab 992、1024 及 1030 之抗原呈現特異性。利用二級山羊抗人類 Fab 特異性 HRP 結合物來顯像所結合之 Fab 抗體。A) 針對來自 A431 細胞之經純化全長 EGFR 測試之 Fab 抗體。B) 針對表現於 A431-NS 細胞表面上之 EGFR 測試之 Fab 抗體。

圖 32：藉由在 ELISA 中對以三聚甲醛固定之 A431-NS 細胞作連續滴定來測定抗體 992、1024、1030、爾必得舒及維克替比之 IgG 及 Fab 片段之功能性親和力。利用二級山羊抗人類 Fab 特異性 HRP 結合物來顯像所結合之 Fab 及 IgG 抗體。抗 RSV 蛋白質 F 抗體西那吉斯被用作陰性對照抗體，且在所用之 ELISA 檢定中不展示任何結合。A) IgG 抗體與 A431-NS 細胞之功能性結合。B) Fab 抗體與 A431-NS 細胞

之功能性結合。

圖 33：在預先用結合非重疊抗原決定基之 Fab 片段飽和受體後對 IgG 與 A431-NS 細胞上之 EGFR 結合之增強的測定。使所指定 Fab 片段飽和 A431-NS 細胞上所識別之 EGFR 抗原決定基 30 min，在此之後連續滴定特定 IgG 抗體，且在添加或不添加 Fab 之情況下所結合之 IgG 係藉由二級小鼠抗人類 Fc HRP 結合物來顯像。A) 在預先用或未用所指定 Fab 片段飽和受體之情況下 IgG 992 與 A431-NS 細胞之結合特徵。B) 在預先用或未用所指定 Fab 片段飽和受體之情況下 IgG 1024 與 A431-NS 細胞之結合特徵。C) 在預先用或未用所指定 Fab 片段飽和受體之情況下 IgG 1030 與 A431-NS 細胞之結合特徵。

圖 34：獼猴全長 EGFR cDNA(圖 34A; SEQ ID NO 102) 及所編碼之蛋白質 (圖 34B; SEQ ID NO 103)。

圖 35：A431NS 中用 1 μ g/ml 所指定抗體/組合獲得之凋亡。以來自 Roche 之 ELISA 套組偵測組蛋白-DNA 複合物。凋亡程度與陽性對照組 (最大凋亡) 相比。

圖 36：向 Balb/C nu/nu 小鼠注射 1×10^6 個 A431NS 細胞。當腫瘤平均為約 100 mm³ 時，開始處理。小鼠接受 17 次抗體注射。第一次處理於第 8 日開始且最後一次在第 34 日。抗體/組成物係以每劑 0.5 mg 或每劑 0.17 mg 注射。展示腫瘤體積之平均值 $\pm$ SEM。

圖 37：A431NS 增殖之抑制。X 軸展示本發明之 3 種抗體之不同代表性組合。Y 軸展示以佔未經處理之對照組 (對

照組)之百分比表示的代謝活性。誤差條表示 $\pm$ SEM。關於其他細節，參見實施例 6。

圖 38: 兩種不同劑量之 992+1024 混合物與爾必得舒相比在 A431NS 人類腫瘤異種移植物中之生長抑制效應。向 BALB/c nu/nu 小鼠接種 10^6 個 A431NS 細胞。當腫瘤達到 100 mm^3 之平均尺寸(第 8 日)時，將小鼠隨機分成每組 9 隻之組且開始處理。將所指定抗體以每劑 0.5 mg 或每劑 1 mg 注射，每週兩次總共 9 次注射。圖上之淡灰色區域指示處理期。虛線之開始指明給定組中第一隻小鼠由於腫瘤尺寸過大而被施以安樂死時之時間點。在第 60 日計算每週 2 mg 992+1024 相對於每週 2 mg 爾必得舒以及每週 1 mg 992+1024 相對於每週 2 mg 爾必得舒之間的統計學顯著差異性，其中除每週 2 mg 992+1024 之組以外，所有組均終止。完成在第 60 日之前排除之動物之腫瘤尺寸，因此，該圖展示給定組中所有小鼠之累計腫瘤體積。展示平均值 $\pm$ SEM。

圖 39: 用 992+1024 抗體混合物、爾必得舒或對照抗體處理(與圖 38 中所示者相同之實驗)之小鼠之存活率的卡普蘭-邁耶圖(Kaplan-Meyer plot)。結果係以經處理小鼠之存活率百分比呈現。當比較 992+1024 與爾必得舒時，觀察到在高劑量(每週 2 mg, $P = 0.0008$)與低劑量(每週 1 mg, $P = 0.0004$)組中小鼠存活率百分比之間的差異顯著。又，當與高劑量爾必得舒相比時，低劑量 992+1024 顯著較佳($P = 0.0087$)。使用對數等級(曼特爾-庫克斯)檢定(Log-rank

(Mantel-Cox) test) 計算統計學差異性。

圖 40：藉由 FACS 分析之 IgG 992、1024 及 1320 針對經全長人類與獼猴 EGFR 轉染之 CHO 細胞的交叉反應性之分析。用 PE 標記之山羊 F(ab')₂ 抗人類 IgG FC 偵測所結合之抗體。對表現 EGFR 之均勻細胞 (SCC/FCS 特性) 進行設門。結合係以 1 nM 濃度之最大抗體結合 % 表示。

圖 41：992 (A) 及 1024 (B) 之重鏈與輕鏈兩者之鼠類 (chi) 與人類化 (hu) 候選可變區的可變區胺基酸序列之 Clustalw2 排比。將如以 IMGT 所定義之 CDR 區域劃底線；間隙係以 (-) 表示，相同胺基酸係以 (*) 表示，保守突變係以 (:) 表示，半保守突變係以 (.) 表示。粗體胺基酸指示如下特徵之胺基酸位置：若全人類構架變異體顯示降低之結合親和力時，則將進行回復突變以成為初始鑑別出之鼠類殘基。序列 ID 編號如下：人類化 992 V_H (SEQ ID NO 104)；人類化 992 V_L (SEQ ID NO 105)；人類化 1024 V_H (SEQ ID NO 106)；人類化 1024 V_L (SEQ ID NO 107)；嵌合 992 V_H (SEQ ID NO 40 之 aa 3-124)；嵌合 992 V_L (SEQ ID NO 72 之 aa 3-109)；嵌合 1024 V_H (SEQ ID NO 41 之 aa 3-120)；嵌合 1024 V_L (SEQ ID NO 73 之 aa 3-114)。

圖 42A：992L1024 之雙重可變域編碼基因之示意圖；992L1024 IGHV (751bp) 如下展示：自 5' *Asc*I 限制性位點開始，繼而為 992 IGHV、ASTKGP 連接子、1024 IGHV，且終止於 3' *Xho*I 限制性位點；992L1024 IGKV (1071bp) 如下展示：其自 5' *Nhe*I 限制性位點開始，繼而為 992

IGKV、TVAAP 連接子、1024 IGKV、IGKC 且終止於 3' *NotI* 限制性位點。

圖 42B：1024L992 之雙重可變域編碼基因之示意圖；1024L992 IGHV (751bp) 如下展示：自 5' *AscI* 限制性位點開始，繼而為 1024 IGHV、ASTKGP 連接子、992 IGHV，且終止於 3' *XhoI* 限制性位點；1024L992 IGKV (1071bp) 如下展示：自 5' *NheI* 限制性位點開始，繼而為 1024 IGKV、TVAAP 連接子、992 IGKV、IGKC 且終止於 3' *NotI* 限制性位點。

圖 43：在不同濃度之所指定抗體存在下於 0.5% FBS 中之 HN5wt 細胞（上圖）及爾必得舒抗性 HN5 細胞（下圖）的代謝活性。圖注：抗體 992 及 1024 係如本申請案中所定義。Sym004 為具有抗體 992 及 1024 之抗體組成物。

圖 44：個別 A431NS 腫瘤在用 1 mg 具有抗體 992+1024 之抗體組成物作初始處理（總共注射 9 次）後的腫瘤生長曲線（左側灰色框）。所有腫瘤均對該療法起反應，但在處理後超過 80 日，3 個腫瘤再次開始生長。用具有抗體 992+1024 之抗體組成物再處理此等腫瘤可促使腫瘤消退（右側灰色框）。

圖 45：用爾必得舒預處理具有 A431NS 異種移植腫瘤之 BALB/c nu/nu 小鼠且隨後隨機化以繼續爾必得舒處理或當腫瘤之平均腫瘤尺寸為約 500 mm³ 時轉換為具有抗體 992+1024 之抗體組成物（圖注中之 Sym004）處理。與繼續爾必得舒處理之組相比，在轉換為具有抗體 992+1024 之抗

體組成物處理的組中，觀察到腫瘤負荷顯著降低。

圖 46：在不同濃度之所指定抗體存在下於 0.5% FBS 中之爾必得舒抗性 HN5 純系的代謝活性。

圖 47：經 50 mg/kg Sym004 或爾必得舒處理之爾必得舒抗性 HN5 純系 #7 腫瘤異種移植物的生長。圖上標出平均值之標準誤差。

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110>	賽門弗鎮公司 彼得森, 米克 W 葛雷, 麥可 黑, 亞當 S 傑克柏森, 海爾	
<120>	重組抗表皮生長因子受體抗體組成物	
<130>	P122PC00	
<160>	141	
<170>	PatentIn 3.5版	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	1 gacsgatggg cccttggtgg	20
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	2 gctgtaggtg ctgtctttgc	20
<210>	3	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	3 tattcccatg gcgcgccsag gtccarctgc arcagyctg	39
<210>	4	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	4 tattcccatg gcgcgccgar gtgmagctkg tkgagtc	37
<210>	5	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	PCR引子	

<400> 5	
tattcccatg gcgcgccsag gtgcagctkm aggagtc	37
<210> 6	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> PCR引子	
<400> 6	
tattcccatg gcgcgccag gttactctga aagagtc	37
<210> 7	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> PCR引子	
<400> 7	
tattcccatg gcgcgccag atccagttgg tgcagtctg	39
<210> 8	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> PCR引子	
<400> 8	
ggcgcgccat gggaatagct agccgayatc cagatgachc arwct	45
<210> 9	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> PCR引子	
<400> 9	
ggcgcgccat gggaatagct agccracatt gtgmtgachc agtc	44
<210> 10	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> PCR引子	
<400> 10	
ggcgcgccat gggaatagct agccsamatt gtketsaccc artctc	46
<210> 11	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	

<223> PCR引子

<400> 11
ggcgcgccat gggaatagct agccgatrtt gtgatgacbc arrct 45

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 12
ggaggcgctc gagacggtga ccgtggtccc 30

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 13
ggaggcgctc gagactgtga gagtgggtgcc 30

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 14
ggaggcgctc gagacagtga ccagagtccc 30

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 15
ggaggcgctc gagacggtga ctgaggttcc 30

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 16
ggacagggmt ccakagttcc adkt 24

<210> 17
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 17
gacagatggg gcagccacag ttcgtttgat ttccagcttg gtc 43

<210> 18
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 18
gacagatggg gcagccacag ttcgttttat ttccagcttg gtc 43

<210> 19
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 19
gacagatggg gcagccacag ttcgttttat ttccaacttt gtc 43

<210> 20
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 20
gacagatggg gcagccacag ttcgtttcag ctccagcttg gtc 43

<210> 21
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 21
gaactgtggc tgcaccatct gtc 23

<210> 22
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 22
accgcctcca ccggcggccg cttattaaca ctctcccctg ttg 43

<210> 23
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 23
accgcctcca cggcgggccg cttattaaca ctctccctg ttgaagctct t 51

<210> 24
<211> 372
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 24
cgcgccgagg tccaactgca gcaacctggg tctgagctgg tgaggcctgg agcttcagtg 60
aagctgtcct gcaaggcttc tggctacaca ttcaccagct actggatgca ctgggtgaag 120
cagaggcctg gacaaggcct tgagtggatt gggaatattt atcctggtag tcgtagtact 180
aactacgatg agaagttcaa gagcaaggcc aactgactg tagacacatc ctccagcaca 240
gcctacatgc agctcagcag cctgacatct gaggactctg cggctctatta ctgtacaaga 300
aatggggatt actacgttag tagcggggat gctatggact actgggggtca aggaacctca 360
gtcaccgtct cg 372

<210> 25
<211> 360
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 25
cgcgcccagg tccaactgca gcagcctggg gctgaactgg tggagcctgg gggttcagtg 60
aagctgtcct gcaaggcttc tggctacacc ttcaccagtc actggatgca ctgggtgaag 120
cagaggcctg gacaaggcct tgagtggata ggtgagatta atcctagcag cggtcgtaat 180
aactacaatg agaagttcaa gagtaaggcc aactgactg tagacaaatc ctccagcaca 240
gcctacatgc aattcagcag cctgacatct gaggactctg cggctctatta ttgtgtaaga 300
tactatgggtt acgacgaagc tatggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcg 360

<210> 26
<211> 360
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 26
cgcgccgaag tgcaactggg ggagctctgg ggaggcttag tgaagcctgg agggtcctg 60
aaactctcct gtgcagcctc tggattcact ttcagtagtt atgccctgtc ttgggttcgc 120
cagactccag agaggaggct ggagtgggtc gcatccatta gtggtgttgg tagcacctac 180
tttccagaca gtgtgaaggg ccgtttcacc atgtccagag ataatgccag gaacatcctg 240
tacctccaaa tgagcagtct gaggtctgag gacacggcca tgtattactg tgcaagaggt 300
tctgatgggtt acttctatgc tatggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcg 360

<210> 27
<211> 360
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 27
cgcgcccagg tgcagcttca gcagcctggg gctgaactgg tgaagcctgg ggcttcagtg 60
aagctgtcct gtaaggcttc tggctacacc ttcaccagcc actggatgca ctgggtgcag 120
cagaggcctg gacaaggcct tgagtggatt ggagagattc atcctagcaa cggtcgtact 180
aactacaatg agaagttcaa gaacaaggcc acactgactg tagacaaatc tcccagcaca 240
gcctacatgc aactcagcag tttgacatct gaggactctg cggctctatta ctgtgcaaga 300
tactatgggtt acgacgatgc tatggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcg 360

<210> 28
<211> 366
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 28
cgcgccgaag tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttag tgaagcctgg aggggtccctg 60
aaactctcct gtgcagcctc tggattcgct ttcagtagct atgacatgct ttgggttcgc 120
cagactccgg agaagaggct ggagtgggtc gcatacattg gtagtgggtga tgataatacc 180
cactatccag actctgtgaa gggccgattc accatctcca gacacaatgc caaaaacacc 240
ctatacctgc aaatgagcag tctgaagtct gaggacacag ccatgtatta ctgtgcaaga 300
cagaagtatg gtaactacgg ggacactatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 360
gtctcg 366

<210> 29
<211> 366
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 29
cgcgcccagg ttcagctgaa ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg 60
tccatcactt gctctgtctc tggtttttca ttaaccatct atgggtgtaca ctgggttcgc 120
cagcctccag gaaagggctc ggagtggctg ggagttatgt gggctgggtg aaatacagat 180
tataattcgg ctctcatgct cagactgaac atcagcaagg acaattccaa gagccaagtt 240
ttcttaaaag tgaacagtct acaaactgat gacacagcca tgtactattg taccagagat 300
cccgatgggtt actacgtggg gtggttcttc gatgtctggg gcgcggggac cacggtcacc 360
gtctcg 366

<210> 30
<211> 366
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 30
cgcgccgaag tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttag tgaagcctgg aggggtccctg 60
aaactctcct gtgcagcctc tggattcgct tacagtacct atgacatgct ttgggttcgc 120
cagactccgg agaagaggct ggagtgggtc gcatacatta gtagtgggtg tgatgccgcc 180
tactatcccg acactgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaatgc caaaaacacc 240

```

ctatacctgc aaatgagcag tctgaagtct gaggacacag ccatgtatta ctgtgcgagg      300
tctcgctatg gaaactacgg ggacgctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc      360
gtctcg                                          366

```

```

<210> 31
<211> 375
<212> DNA
<213> 智慧人

```

```

<400> 31
cgcgccgagg tccagctgca acagtctgga cctgagctgg tgaaacctgg ggcttcagtg      60
aagataccct gcaagacttc tggatacact ttcactgact acaacatggc ctgggtgaag      120
cagagccatg gaaagagcct tgagtggatt ggagatatta ttcctaaciaa tgggtggtgct      180
atctacaacc agaaattcaa gggcaaggcc actttgactg tagacaaatc ctccagtaca      240
gcctccatgg agctccgcag cctgacatct gaggacactg cagtctatct ctgtgcaaga      300
aagaatatct actataggta cgacggggca ggtgctctgg actactgggg tcaaggaacc      360
tcagtcaccg tctcg                                          375

```

```

<210> 32
<211> 351
<212> DNA
<213> 智慧人

```

```

<400> 32
cgcgcccagg tgcagctgaa ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg      60
tccatcactt gcactgtctc tgggttttca ttaaccacct atgggggtaca ctgggttcgc      120
cagcctccag gaaaggggtct ggagtggctg ggagtaatat gggctggtgg aagcaciaat      180
tataattcgg ctctcatgtc cagactgagc atcaagaaaag acaactccaa gagccaagtt      240
ttcttaaaaa tgaacagtct gcaaactgat gacacagcca tgtactactg tgccagagcc      300
tatggttaca actttgacta ttggggccaa ggcaccactc tcacagtctc g          351

```

```

<210> 33
<211> 372
<212> DNA
<213> 智慧人

```

```

<400> 33
cgcgccgaag tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttag tgaagcctgg agggtccttg      60
aaactctcct gtgcagtctc tggattcact ttcagtagct atgtcatgtc ttgggttcgc      120
cagactccgg agaagaggct ggagtgggtc gcaaccatta ctagtgggtg taggaacatc      180
tactatctag acagtgtgaa ggggcgattc actatctcca gagacaatgc caagaacacc      240
ctgtacctgc aaatgagcag tctgaggtct gaggacacgg ccatgtatta ctgtgcaaga      300
catgaggact ataggtacga cggttactat gctatggact actggggtca aggaacctca      360
gtcaccgtct cg                                          372

```

```

<210> 34
<211> 354
<212> DNA

```

<213> 智慧人

<400> 34

cgcgccgaag	tgcaagctgg	ggagctctggg	ggaggcttag	tgaagcctgg	agagtccttg	60
aaactctcct	gtgcagcctc	tggattcgct	ttcagttact	ctgacatgtc	ttgggttcgc	120
cagactccgg	agaagaggct	ggagtgggtc	gcatacatga	gtagtgcctg	tgatgtcacc	180
ttctattcag	acactgtgaa	gggccgattc	accatctcca	gagacaatgc	caagaacacc	240
ctgtatctgc	aagtgaagcag	tctgaagtct	gaggacacag	ccatatatta	ctgtgtaaga	300
caccgggacg	tggctatgga	ctactggggg	caaggaacct	cagtcaccgt	ctcg	354

<210> 35

<211> 357

<212> DNA

<213> 智慧人

<400> 35

cgcgcccagg	tccaactgca	gcagcctggg	gctgaactgg	tgaagcctgg	ggcttcagtg	60
aagctgtcct	gcaaggcttc	tggctacacc	ttcaccagcg	actggatgca	ctggatgaaa	120
cagaggcctg	gacaaggcct	tgagtggatt	ggagagatta	atcctagtaa	cggtcgctct	180
agctacaatg	agaagttcaa	gagcaaggcc	acactgactg	tagacaaatc	ctccagcaca	240
gcctacatgc	aactcagcag	cctgacatct	gaggactctg	cggtctatta	ctgtgcaaga	300
ataggtggta	tctacgtgga	gacttactgg	ggccaaggga	ctctgggtcac	tgtctcg	357

<210> 36

<211> 375

<212> DNA

<213> 智慧人

<400> 36

cgcgccgagg	tccagcttca	gcagtctgga	gctgagctgg	tgaggcctgg	gtcctcagtg	60
aagatttcct	gcaaggcttc	tggctatgca	ttcagtagct	actggatgaa	ctgggtgagg	120
cagaggcctg	gacagggctc	tgagtggatt	ggacagattt	atcctggaga	tggtgatact	180
aactacaatg	gaaagttcaa	gggtagagcc	acactgactg	caaacaaatc	ctccagcaca	240
gcctacatgc	agctcagcag	cctaacatct	gaggactctg	cggtctatct	ctgtgcaaga	300
agggcacctt	ccctctatga	tgtttacccc	tactactttg	actactgggg	ccaaggcacc	360
actctcacag	tctcg					375

<210> 37

<211> 363

<212> DNA

<213> 智慧人

<400> 37

cgcgcccagg	tccaactgca	gcagcctggg	gctgaactgg	tgaagcctgg	ggcttcaatg	60
aagctgtcct	gcaaggcttc	tggctacacc	ttaccaact	actggatgca	ctgggtgaag	120
cagaggcctg	gacaaggcct	tgaatggatt	ggagaaatta	atcctagcaa	cggtcgtact	180
aattacaatg	agaagttcaa	gagcaaggcc	acactgactg	tagacaaatc	gtccagcaca	240
gcctacatgc	aactcagcag	cctgacatct	gaggactctg	gggtctatta	ctgtgcaaaa	300

ggggggaact actatgatta cgactgggac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc 360
tcg 363

<210> 38
<211> 351
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 38
cgcgcccagg tgcagctgaa ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg 60
tccatcactt gcactgtctc tgggttttca ttaaccatct atggtgtaca ctgggttcgc 120
cagcctccag gaaaggggtct ggagtggtg ggagtaatat gggctgggtg aaacacaaat 180
tataattcgg ctctcatgtc cagactgagc atcagcaaag acaactccaa gagtcaagtt 240
ttcttaaaaa tgaacagtct gcaaactgat gacacagcca tgtacttctg tgccagaggc 300
tatggctaca atttagacta ttggggccaa ggcaccactc tcacagtctc g 351

<210> 39
<211> 357
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 39
cgcgcccagg tgcagctgaa ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg 60
tccatcacat gcaccgtctc aggattctca ttaaccggcc atggtgtaaa ctgggttcgc 120
cagcctccag gaaaggggtct ggagtggtg ggaatgatat ggggtgatgg aagcacggac 180
tataattcaa ctctcaaadc cagactgagt atcagcaagg acaactccaa gagccaagtt 240
ttcttaaaaa tgaacagtct gcagactgat gacaccgcca ggtactactg tgccagaggc 300
tacggctacc ttactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcg 357

<210> 40
<211> 124
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 40

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

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

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

Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Arg Ser Thr Asn Tyr Asp Glu
50 55 60

Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Arg Asn Gly Asp Tyr Tyr Val Ser Ser Gly Asp Ala Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115 120

<210> 41
<211> 120
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 41

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

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

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

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Asn Asn Tyr Asn Glu
50 55 60

Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Val Arg Tyr Tyr Gly Tyr Asp Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115 120

<210> 42
<211> 120
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 42

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

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

Ser Tyr Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Arg Leu Glu
35 40 45

Trp Val Ala Ser Ile Ser Gly Val Gly Ser Thr Tyr Phe Pro Asp Ser

```

      50              55              60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu
65              70              75              80

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

Cys Ala Arg Gly Ser Asp Gly Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
      100              105              110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
      115              120

<210> 43
<211> 120
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 43

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

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

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

Trp Ile Gly Glu Ile His Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu
      50              55              60

Lys Phe Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Pro Ser Thr
65              70              75              80

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

Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Gly Tyr Asp Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly
      100              105              110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
      115              120

<210> 44
<211> 122
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 44

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

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser
      20              25              30

```

Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu
35 40 45

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ala Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Gln Lys Tyr Gly Asn Tyr Gly Asp Thr Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115 120

<210> 45
<211> 122
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 45

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

Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
20 25 30

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

Trp Leu Gly Val Met Trp Ala Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala
50 55 60

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

Phe Leu Lys Val Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
85 90 95

Cys Thr Arg Asp Pro Asp Gly Tyr Tyr Val Gly Trp Phe Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 46
<211> 122
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 46

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

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Tyr Ser
20 25 30

Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu
35 40 45

Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Asp Ala Ala Tyr Tyr Pro Asp
50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Ser Arg Tyr Gly Asn Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115 120

<210> 47
<211> 125
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 47

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

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

Asp Tyr Asn Met Ala Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Ile Pro Asn Asn Gly Gly Ala Ile Tyr Asn Gln
50 55 60

Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr
65 70 75 80

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

Phe Cys Ala Arg Lys Asn Ile Tyr Tyr Arg Tyr Asp Gly Ala Gly Ala
100 105 110

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115 120 125

<210> 48
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 智慧人

<400> 48

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

Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 20 25 30

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

Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala
 50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Ala Tyr Gly Tyr Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser
 115

<210> 49
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 智慧人

<400> 49

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

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

Ser Tyr Val Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu
 35 40 45

Trp Val Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Arg Asn Ile Tyr Tyr Leu Asp
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg His Glu Asp Tyr Arg Tyr Asp Gly Tyr Tyr Ala Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115 120

<210> 50
<211> 118
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 50

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

Gly Glu Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser
20 25 30

Tyr Ser Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu
35 40 45

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

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

Leu Tyr Leu Gln Val Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Arg Asp Val Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser
115

<210> 51
<211> 119
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 51

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

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

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

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Ser Ser Tyr Asn Glu
50 55 60

Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr

65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Ile Gly Gly Ile Tyr Val Glu Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 52
<211> 125
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 52

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

Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser
20 25 30

Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly
50 55 60

Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asn Lys Ser Ser Ser Thr
65 70 75 80

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

Phe Cys Ala Arg Arg Ala Ser Ser Leu Tyr Asp Val Tyr Pro Tyr Tyr
100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
115 120 125

<210> 53
<211> 121
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 53

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

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

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

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu
50 55 60

Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr
65 70 75 80

Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Gly Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Asn Tyr Tyr Asp Tyr Asp Trp Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
115 120

<210> 54
<211> 117
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 54

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

Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
20 25 30

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

Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Ser Ala
50 55 60

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser
115

<210> 55
<211> 119
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 55

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

Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
20 25 30

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

Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Thr
50 55 60

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

Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr
85 90 95

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
115

<210> 56
<211> 648
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 56
ctagccgaca ttcagatgac tcagactaca tcctccctgt ctgcctctct gggagacaga 60
gtcaccatca gttgcaggac aagtcaggac attggcaatt atttaaactg gtatcagcag 120
aaaccagatg gaactgttaa actcctgac tactacacat caagattaca ctcaggagtc 180
ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctgga acagattttt ctctcaccat taacaacgtg 240
gagcaagagg atgttgccac ttacttttgc caaactata atacggttcc tccgacgttc 300
ggtggaggca ccaagctgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 360
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtgata acgccctcca atcgggtaac 480
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600
cagggcctga gctcgcccggt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt 648

<210> 57
<211> 663
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 57
ctagccgaca tcgtgatgac acaagctgca ttctccaatc cagtcactct tggaacatca 60
gcttccatct cctgcaggtc tagtaagagt ctctacata gtaatggcat cacttatctg 120
tattggtatc tgcagaagcc aggccagtct cctcagctcc tgatttatca gatgtccaac 180
cttgccctcag gagtcccaga caggttcagt agcagtgggt caggaaactga tttcacactg 240

```

agaatcagca gagtggaggc tgaggatgtg ggtgtttatt actgtgctca aaatctagaa      300
cttccgtaca cgttcggagg ggggaccaag ctggaaataa aacgaactgt ggctgcacca      360
tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg      420
tgcctgtctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc      480
ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac      540
agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc      600
tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag      660
tgt                                                                 663

```

```

<210> 58
<211> 660
<212> DNA
<213> 智慧人

```

```

<400> 58
ctagccgaca ttgtgctgac tcagtctcct gcttccttag ctgtatctct ggggcagagg      60
gccaccattt catgcagggc cagcaaaagt gtcagtacat ctggctatag ttttatgcac      120
tggtaccaac tgaaccagg acagccaccc aaactcctca tctatcttgc atccaaccta      180
gaatctgggg tcctgccag gttcagtggc agtgggtctg ggacagaact caccctcaac      240
atccatcctg tggaagagga ggatgctgca acctattact gtcagcacag tagggagttt      300
ccgttaacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac gaactgtggc tgcaccatct      360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc      420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc      480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc      540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc      600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt      660

```

```

<210> 59
<211> 657
<212> DNA
<213> 智慧人

```

```

<400> 59
gatattgtga tgactcaggc tgcattctcc aatccagtca ctcttgaac atcagcttcc      60
atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta catagtaatg gcatcactta tttgtattgg      120
tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcttgattt atcagatgtc caaccttgcc      180
tcaggagtcc cagacagggt cagtagcagt gggtaagaa ctgatttcac actgagaatc      240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg      300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc      360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg      420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa      480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc      540

```

agcagcacc c tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
gtcaccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 60
<211> 660
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 60
ctagccgatg ttgtgatgac tcagactcca ctctccctgc ctgtcagtct tggagatcaa 60
gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc cttgtacaca gtaatggaaa cacctattta 120
catttggtacc tgcagaagcc aggccagtct caaaaactcc tgatctacaa agtttccaac 180
cgattttctg ggggccaga caggttcagt ggcagtggat cagggacaga ttccacactc 240
aagatcagca gagtggaggc tgaggatctg ggagtttatt tctgctctca aagtacacat 300
gttcccacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtga taacgccctc 480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660

<210> 61
<211> 648
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 61
ctagccgaca ttgtgatgac ccagtctcac aaattcatgt ccacatcagt gggagacagg 60
gtcagcatca cctgcaaggc cagtcaggat gtgactaatg ccgtagcctg gtatcaacaa 120
aaaccaggac aatctcctaa actactgatt tactgggcat ccatccgaca cactggagtc 180
cctgatcgct tcacaggcag tagatctggg acagattata ctctcaccat caacagtgtg 240
caggctgaag acctggccct ttattattgt cagcaacatt ataacactcc gctcacgttc 300
gggtgctggga ccaagctgga aataaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 360
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420
ttctatccca gagaggcaa agtacagtgg aagggtgata acgccctcca atcgggtaac 480
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600
cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt 648

<210> 62
<211> 660
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 62
ctagccgatg ttgtgatgac acagactcca ctctccctgc ctgtcagtct tggagatcaa 60


```

gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc cttgtacaca gtaatggtaa cacctattta      120
cattggtacc tgcagaagcc aggccagtct ccaaagctcc tgctctacaa agtttccaac      180
cgattttctg ggggtcccaga caggttcagt ggagtggtat cagggacaga tttcacactc      240
aagatcagca gagtggagtc tgaggatctg ggagtttatt tctgctctca aaatacacat      300
gtgtacacgt tcggaggggg gacaaagttg gaaataaaac gaactgtggc tgcaccatct      360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc      420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc      480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc      540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc      600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gttcaacag gggagagtgt      660

```

<210> 63
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> 智慧人

```

<400> 63
ctagcccaaa ttgtgtcac acagtctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag      60
gtcaccatga cctgcagtgc cagctcaagt gtaagttaca ttactggta ccagcagaag      120
ccaggatcct ccccagact cctgatttat gacgcatcca acctggcttc tggagtcctt      180
gttcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag ccgaatggag      240
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagca gttaccaat cacgttcggc      300
tcggggacaa agttggaaat aaaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg      360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc      420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc      480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg      540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag      600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtt      645

```

<210> 64
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> 智慧人

```

<400> 64
ctagccgata tccagatgac tcagactaca tcctccctgt ctgcctctct gggagacaga      60
gtcaccatca gttgcagtgc aagtcagggc attaccaatt atttaaactg gtatcagcag      120
aaaccagatg gaactgttaa actcctgac tattactcat caagtttaca ctcaggagtc      180
ccatcaagggt tcagtggcag tgggtctggg acagattatt ctctcaccat cagcaacctg      240
gaacctgaag atattgccac ttactattgt cagcagtata gtgagattcc gtacacgttc      300
ggagggggga ccaagctgga gctgaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc      360
ccgcatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac      420
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac      480

```

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600
cagggcctga gctcgcccggt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt 648

<210> 65
<211> 645
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 65
ctagcccaaa ttgtgctgac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag 60
gtcaccataa cctgcagtgc cagctcaagt gtaagttaca tgcactggtt ccagcagaag 120
ccaggcactt ctcccaaact ctggatttat agtacatcca acctggcttc tggagtccct 180
gctcgcttca gtggcagtgg atctgggacc tcttactctc tcacaatcag ccgaatggag 240
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag caaaggagta gttaccata cacgttcgga 300
ggggggacca agctggagct gaaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 66
<211> 660
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 66
ctagccgatg ttgtgatgac ccagactcca ctctccctgc ctgtcagtct tggagatcaa 60
gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc cttgtacaca gtaatgaaa cacctattta 120
catttggtacc tgcagaagcc aggccagtct ccaaagctcc tgatctacaa agtttccaac 180
cgattttctg ggggtcccaga caggttcagt ggcagtggat cagggacaga ttacactc 240
aagatcagca gagtggaggc tgaggatctg ggagtttatt tctgctctca aagtacacat 300
gttccgacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660

<210> 67
<211> 660
<212> DNA
<213> 智慧人

```

<400> 67
ctagccgaca ttgtgctaac acagtctcct gcttccttag ctgtatctct ggggcagagg      60
gccaccatct catgcagggc cagccaaagt gtcagtacat ctacctatag ttatatgcac      120
tggtatcaac agaaatcagg acagccaccc aaactcctca tcaagtatgc atccaaccta      180
gagtctgggg tccctgccag gttcagtggc agtgggtctg ggacagactt caccctcaac      240
atccatcctg tggaggagga ggatactgca acatattact gtcagcacag ttgggagatt      300
ccgtggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gaactgtggc tgcaccatct      360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc      420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtga taacgccctc      480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc      540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc      600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt      660

```

```

<210> 68
<211> 648
<212> DNA
<213> 智慧人

```

```

<400> 68
ctagccgaca tccagatgac acaaactaca tcctccctgt ctgcctctct gggagacaga      60
gtcaccatca gttgcagggc aagtcaggac attagcaatt atttaaactg gtatcagcag      120
aaaccagatg gaactgttaa agtcctgata tactacacat caagattaca ctcaggagtc      180
ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctgga acagattatt ctctcaccat tagcaacctg      240
gagcaagaag atattgccac ttacttttgc caacagggtg atacgcttcc gtacacgttc      300
ggagggggga ccaagctgga aataaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc      360
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac      420
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtgata acgccctcca atcgggtaac      480
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc      540
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat      600
cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt      648

```

```

<210> 69
<211> 648
<212> DNA
<213> 智慧人

```

```

<400> 69
ctagccgaca ttcagatgac ccagactaca tcctccctgt ctgcctctct gggagacaga      60
gtcaccatca gttgcagtgc aagtcaggac attagcaatt atttaaactg gtatcagcag      120
aaaccagatg gaactgttaa actcctgata tatcacacat caactttaca ctcaggagtc      180
ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctggg acagattatt ctctcaccat cagcaacctg      240
gaacctgaag atattgccac ttactattgt cagcaatata gtaagcttcc gtggacgttc      300
ggtggaggga ccaagctgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc      360

```

ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggtaac 480
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600
cagggcctga gctcgcccg tcaaaagagc ttcaacaggg gagagtgt 648

<210> 70
<211> 648
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 70
ctagccgaca ttcagatgac acagactact tcctccctgt ctgcctctct gggagacaga 60
gtcaccatta gttgcagtgc aagtcagggc attagtaatt atttaaactg gtatcagcag 120
aaaccagatg gaactgttaa actcctgatc tattacacat caagtttaca ctcaggagtc 180
ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctggg acagattatt ctctcaccat cagcaacctg 240
gaacctgaag atattgccac ttactattgt cagcagtata gtaagcttcc gtacacgttc 300
ggagggggga ccaagctgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 360
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggtaac 480
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600
cagggcctga gctcgcccg tcaaaagagc ttcaacaggg gagagtgt 648

<210> 71
<211> 651
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 71
ctagccgaaa atgtgctgac tcagtctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggaaaag 60
gtcaccatga cctgcagggc cagctcaagt gtaagttcca gttacttgca ctggtaccag 120
caaaagtcag gtgcctcccc caaactctgg atttatagca catccaactt ggcttctgga 180
gtccctgctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac agtcaacagt 240
gtggagactg aagatgctgc cacttattac tgccaccagt acagtggttt ccatttcacg 300
ttcggctcgg ggaccaagct ggagctgaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac 360
ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttggtg cctgctgaat 420
aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480
aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540
accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600
catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg t 651

<210> 72
<211> 216

<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 72

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

Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Gly
20 25 30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu
35 40 45

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

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

Glu Gln Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Tyr Asn Thr Val
85 90 95

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

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

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

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

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

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

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 73
<211> 221
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 73

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

Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu
20 25 30

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

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly
50 55 60

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

Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
100 105 110

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
115 120 125

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
130 135 140

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

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

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

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
195 200 205

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

<210> 74
<211> 220
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 74

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

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

Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His
85 90 95

Ser Arg Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

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

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

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

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

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

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

<210> 75
<211> 219
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 75

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

Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 76
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> 智慧人
 <400> 76
 Leu Ala Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser
 1 5 10 15
 Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val
 20 25 30
 His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
 35 40 45
 Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 65 70 75 80
 Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser
 85 90 95
 Gln Ser Thr His Val Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

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

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

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

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

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

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

<210> 77
<211> 216
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 77

Leu Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser
1 5 10 15

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

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

Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 78
<211> 220
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 78

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

Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val
20 25 30

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

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

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

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ser Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser
85 90 95

Gln Asn Thr His Val Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

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

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

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

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

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

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

<210> 79
<211> 215
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 79

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

Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 80
<211> 216
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 80

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

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

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

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

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

Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val
100 105 110

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

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

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

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

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

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 81
<211> 215
<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 81

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

Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30

Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 82

<211> 220

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 82

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

Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val
20 25 30

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

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

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

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser
85 90 95

Gln Ser Thr His Val Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

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

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

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

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

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

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

<210> 83
<211> 220
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 83

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

Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
20 25 30

Thr Ser Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn
 65 70 75 80
 Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His
 85 90 95
 Ser Trp Glu Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220
 <210> 84
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 智慧人
 <400> 84
 Leu Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Val
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu
 65 70 75 80

Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu
 85 90 95
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 85
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 智慧人
 <400> 85
 Leu Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Thr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu
 65 70 75 80
 Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu
 85 90 95
 Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110


```

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

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

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

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

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

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
  195                      200                      205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
  210                      215

```

```

<210> 86
<211> 216
<212> PRT
<213> 智慧人

```

<400> 86

```

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

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

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu
  35           40           45

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

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

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

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

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

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

```

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

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

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

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 87
<211> 217
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 87

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

Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30

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

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

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Val Asn Ser
65 70 75 80

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

Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 88
<211> 324
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 88
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 60
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggga aggtggataa cgccctccaa 120
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 180
agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 240
gtcacccatc agggcctgag ctgccccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttaa 300
taagcggccg ccggtggagg cggg 324

<210> 89
<211> 106
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 89

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

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

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

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

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

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

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

<210> 90
<211> 1602
<212> DNA
<213> 智慧人

<220>
<221> 外顯子
<222> (1)..(298)

<220>
<221> 內含子
<222> (299)..(689)

<220>
<221> 外顯子
<222> (690)..(734)

<220>
<221> 內含子
<222> (735)..(852)

<220>
<221> 外顯子
<222> (853)..(1182)

<220>
<221> 內含子
<222> (1183)..(1279)

<220>
<221> 外顯子
<222> (1280)..(1602)

<400>	90	
agt gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc		48
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser		
1 5 10 15		
aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac		96
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp		
20 25 30		
tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc		144
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr		
35 40 45		
agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac		192
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr		
50 55 60		
tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag		240
Ser Leu Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln		
65 70 75 80		
acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac		288
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp		
85 90 95		
aag aga gtt g gtgagaggcc agcacaggga gggagggtgt ctgctggaag		338
Lys Arg Val		
ccaggctcag cgctcctgcc tggacgcac ccggctatgc agtcccagtc cagggcagca		398
aggcaggccc cgtctgcctc ttcacccgga ggccctctgcc cgccccactc atgctcaggg		458
agagggctctt ctggcttttt ccccaggctc tgggcaggca caggctaggt gccctaacc		518
caggccctgc acacaaaggg gcaggtgctg ggctcagacc tgccaagagc catatccggg		578
aggaccctgc ccctgaccta agcccacccc aaaggccaaa ctctccactc cctcagctcg		638
gacaccttct ctctccag attccagtaa ctcccaatct tctctctgca g ag ccc		694
Lys Arg Val		

```

-   aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca g gtaagccagc      744
    Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
        105                110

    ccaggcctcg ccctccagct caaggcggga caggtgccct agagtagcct gcatccaggg      804

-   acaggcccca gccgggtgct gacacgtcca cctccatctc ttcctcag ca cct gaa      860
                                Ala Pro Glu

    ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac      908
    Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        120                125                130

    acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac      956
    Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        135                140                145

    gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc      1004
    Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
        150                155                160                165

    gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac      1052
    Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
        170                175                180

    agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg      1100
    Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
        185                190                195

    ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca      1148
    Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
        200                205                210

    gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa g gtgggacccg      1192
    Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
        215                220

    tggggtgcga gggccacatg gacagaggcc ggctcggccc accctctgcc ctgagagtga      1252

    ccgctgtacc aacctctgtc cctacag gg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac      1305
                                Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
                                    230

    acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg      1353
    Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        235                240                245

    acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg      1401
    Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
        250                255                260                265

    gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg      1449
    Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
        270                275                280

    ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac      1497
    Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
        285                290                295

    aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat      1545
    Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
        300                305                310

    gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg      1593
    Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        315                320                325

    ggt aaa tga      1602
    Gly Lys

```

330

<210> 91
<211> 331
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 91

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

245 250 255

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

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

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

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

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

<210> 92
<211> 751
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成的建構體

<400> 92
ggcgcgccga ggtccaactg cagcaacctg ggtctgagct ggtgaggcct ggagcttcag 60
tgaagctgtc ctgcaaggct tctggctaca cattcaccag ctactggatg cactgggtga 120
agcagaggcc tggacaaggc cttgagtgga ttgggaatat ttatcctggt agtcgtagta 180
ctaactacga tgagaagttc aagagcaagg ccacactgac tgtagacaca tcctccagca 240
cagcctacat gcagctcagc agcctgacat ctgaggactc tgcggtctat tactgtacaa 300
gaaatgggga ttactacgtt agtagcgggg atgctatgga ctactggggt caaggaacct 360
cagtcaccgt ctcgtcagcc agcaccaagg gccccaggt ccaactgcag cagcctgggg 420
ctgaactggg ggagcctggg ggttcagtga agctgtcctg caaggcttct ggctacacct 480
tcaccagtca ctggatgcac tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt gagtggatag 540
gtgagattaa tcctagcagc ggtcgttaata actacaatga gaagttcaag agtaaggcca 600
cactgactgt agacaaatcc tccagcacag cctacatgca attcagcagc ctgacatctg 660
aggactctgc ggtctattat tgtgtaagat actatgggta cgacgaagct atggactact 720
ggggtaagg aacctcagtc accgtctcga g 751

<210> 93
<211> 1017
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成的建構體

<400> 93
gctagccgac attcagatga ctgagactac atcctccctg tctgcctctc tgggagacag 60
agtcaccatc agttgcagga caagtcagga cattggcaat tatttaaact ggtatcagca 120

gaaaccagat ggaactgtta aactcctgat ctactacaca tcaagattac actcaggagt 180
cccatcaagg ttcagtggca gtgggtctgg aacagatttt tctctcacca ttaacaacgt 240
ggagcaagag gatgttgcca cttacttttg ccaacactat aatacggttc ctccgacgtt 300
cggtggaggc accaagctgg aaatcaaacg aactgtggct gcaccagaca tcgtgatgac 360
acaagctgca ttctccaatc cagtcactct tggaacatca gcttccatct cctgcaggtc 420
tagtaagagt ctctacata gtaatggcat cacttatttg tattggtatc tgcagaagcc 480
aggccagtct cctcagctcc tgatttatca gatgtccaac cttgcctcag gagtcccaga 540
caggttcagt agcagtgggt caggaactga tttcacactg agaatcagca gagtggaggc 600
tgaggatgtg ggtgtttatt actgtgctca aaatctagaa cttccgtaca cggtcggagg 660
ggggaccaag ctggaaataa aacgaactgt ggctgcacca tctgtcttca tcttcccgcc 720
atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttggtg tgctgctga ataacttcta 780
tccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc ctccaatcgg gtaactccca 840
ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca gcaccctgac 900
gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgccaagtca cccatcaggg 960
cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag tgtaataag cggccgc 1017

<210> 94
<211> 751
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成的建構體

<400> 94
ggcgcgccca ggtccaactg cagcagcctg gggctgaact ggtggagcct gggggttcag 60
tgaagctgtc ctgcaaggct tctggctaca cttcaccag tcaactggatg cactgggtga 120
agcagaggcc tggacaaggc cttgagtgga taggtgagat taatcctagc agcggtcgta 180
ataactacaa tgagaagtgc aagagtaagg ccacactgac tgtagacaaa tctccagca 240
cagcctacat gcaattcagc agcctgacat ctgaggactc tgcgggtctat tattgtgtaa 300
gatactatgg ttacgacgaa gctatggact actgggggtca aggaacctca gtcaccgtct 360
cgctcagccag caccaagggc cccgaggtcc aactgcagca acctgggtct gagctgggtga 420
ggcctggagc ttcagtgaag ctgtcctgca aggccttctg ctacacattc accagctact 480
ggatgcactg ggtgaagcag aggcctggac aaggccttga gtggattggg aatatttatc 540
ctggtagtcg tagtactaac tacgatgaga agttcaagag caaggccaca ctgactgtag 600
acacatcctc cagcacagcc tacatgcagc tcagcagcct gacatctgag gactctgcgg 660
tctattactg tacaagaaat ggggattact acgttagtag cggggatgct atggactact 720
gggggtcaagg aacctcagtc accgtctcga g 751

<210> 95
<211> 1017
<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成的建構體

<400> 95

```

gctagccgac atcgtgatga cacaagctgc attctccaat ccagtcactc ttggaacatc      60
agcttccatc tcctgcaggt ctagtaagag tctcctacat agtaatggca tcacttattt    120
gtattggtat ctgcagaagc caggccagtc tcctcagctc ctgatttatc agatgtccaa    180
ccttgccctca ggagtcccag acaggttcag tagcagtggg tcaggaactg atttcacact    240
gagaatcagc agagtggagg ctgaggatgt ggggtgtttat tactgtgctc aaaatctaga    300
acttccgtac acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgaactg tggctgcacc    360
agacattcag atgactcaga ctacatcctc cctgtctgcc tctctgggag acagagtcac    420
catcagttgc aggacaagtc aggacattgg caattattta aactggtatc agcagaaacc    480
agatggaact gttaaactcc tgatctacta cacatcaaga ttacactcag gagtcccatc    540
aaggttcagt ggcagtgggt ctggaacaga tttttctctc accattaaca acgtggagca    600
agaggatgtt gccacttact tttgccaaca ctataatacg gttcctccga cgttcggtgg    660
aggcaccaag ctggaaatca aacgaactgt ggctgcacca tctgtcttca tcttcccgcc    720
atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg tgctgtctga ataacttcta    780
tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc ctccaatcgg gtaactccca    840
ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca gcaccctgac    900
gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg    960
cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag tgttaataag cggccgc     1017

```

<210> 96

<211> 249

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成的建構體

<400> 96

```

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

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

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

Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Arg Ser Thr Asn Tyr Asp Glu
50          55          60

Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr
65          70          75          80

```

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

Tyr Cys Thr Arg Asn Gly Asp Tyr Tyr Val Ser Ser Gly Asp Ala Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Glu
130 135 140

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

Thr Ser His Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Asn Asn Tyr Asn
180 185 190

Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
195 200 205

Thr Ala Tyr Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Tyr Gly Tyr Asp Glu Ala Met Asp Tyr Trp
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
245

<210> 97
<211> 334
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成的建構體

<400> 97

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

Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Gly
20 25 30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Asn Asn Val

```

      65              70              75              80

Glu Gln Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Tyr Asn Thr Val
      85              90              95

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

Ala Ala Pro Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val
      115             120             125

Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu
      130             135             140

Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
      145             150             155             160

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser
      165             170             175

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
      180             185             190

Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
      195             200             205

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
      210             215             220

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
      225             230             235             240

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
      245             250             255

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
      260             265             270

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
      275             280             285

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
      290             295             300

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
      305             310             315             320

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      325             330

```

```

<210> 98
<211> 249
<212> PRT
<213> 人工

```

<220>

<223> 合成的建構體

<400> 98

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

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

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

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Asn Asn Tyr Asn Glu
50 55 60

Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Val Arg Tyr Tyr Gly Tyr Asp Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser
130 135 140

Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
145 150 155 160

Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
165 170 175

Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Arg Ser Thr Asn Tyr Asp Glu Lys Phe Lys
180 185 190

Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
195 200 205

Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
210 215 220

Arg Asn Gly Asp Tyr Tyr Val Ser Ser Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
245

<210> 99

<211> 334
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成的建構體

<400> 99

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

Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu
20 25 30

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

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly
50 55 60

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

Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
100 105 110

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr
115 120 125

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg
130 135 140

Thr Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
145 150 155 160

Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
165 170 175

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
180 185 190

Leu Thr Ile Asn Asn Val Glu Gln Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys
195 200 205

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

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
225 230 235 240

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
245 250 255

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
260 265 270

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
275 280 285

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
290 295 300

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
305 310 315 320

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325 330

<210> 100
<211> 1863
<212> DNA
<213> 食蟹獼猴

<400> 100
ctggaggaaa agaaagtttg ccaaggcacg agtaacaaac tcacgcagtt gggcactttt 60
gaagatcatt ttctcagcct ccagaggatg ttcaataact gtgaggtggt ccttgggaaat 120
ttggaaatta cctacgtgca gaggaattat gatctttcct tcttaaagac catccaggag 180
gtggctggtt atgtcctcat cgccctcaac acagtggagc ggattccttt ggaaaacctg 240
cagatcatca gaggaaacat gtactatgaa aattcctatg ccttagcagt cttatctaac 300
tatgatgcaa ataaaaccgg actgaaggag ctgcccataa gaaacttaca ggaaatcctg 360
catggcgccg tgcggttcag caacaaccct gccctgtgca acgtggagag catccagtgg 420
cgggacatag tcagcagcga gtttctcagc aacatgtcga tggacttcca gaaccacctg 480
ggcagctgcc aaaagtgtga tccaagctgt cccaatggga gctgctgggg tgcaggagag 540
gagaactgcc agaaactgac caaaatcatc tgtgcccagc agtgctccgg gcgctgccgc 600
ggcaagtccc ccagtgactg ctgccacaac cagtgtgccg cgggctgcac gggcccccg 660
gagagcgact gcctggtctg ccgcaaattc cgagacgaag ccacgtgcaa ggacacctgc 720
ccccactca tgctctacaa cccaccaca taccagatgg atgtgaacct cgagggcaaa 780
tacagctttg gtgccacctg cgtgaagaag tgtccccgta attatgtggt gacagatcac 840
ggctcgtgcg tccgagcctg cggggccgac agctatgaga tggaggaaga cggcgtccgc 900
aagtgtgaaga agtgcggaagg gccttgccgc aaagtgtgta atggaatagg tattggtgaa 960
tttaaagaca cactctccat aaatgctaca aatattaaac acttcaaaaa ctgcacctcc 1020
atcagtggcg atctccacat cctgccggtg gcatttaggg gtgactcctt cacacacact 1080
ccgcctctgg atccacagga actggatatt ctgaaaaccg taaaggaaat cacagggttt 1140
ttgctgattc aggcttggcc tgaaaacagg acggacctcc atgcttttga gaacctagaa 1200
atcatacgtg gcaggaccaa gcaacacggt cagttttctc ttgcggtcgt cagcctgaac 1260
ataacatcct tgggattacg ctccctcaag gagataagcg atggagatgt gataatttca 1320

~ ggaaacaaaa atttgtgcta tgcaaataca ataaactgga aaaaactggt tgggacctcc 1380
agtcagaaaa ccaaaattat aagcaacaga ggtgaaaaca gctgcaaggc cacgggccag 1440
gtctgccatg ccttgtgctc ccccgagggc tgctggggcc cgagagcccag ggactgcgtc 1500
- tcctgccaga atgtcagccg aggcagagaa tgcgtggaca agtgcaacat cctggagggc 1560
gagccaaggg agtttgtgga gaactctgag tgcatacagt gccaccaga atgcctgccc 1620
· caggtcatga acatcacctg cacaggacgg ggaccagaca actgtatcca gtgtgcccac 1680
tacattgacg gccccactg cgtcaagacc tgcccagcag gagtcatggg agaaaacaac 1740
accctggtct ggaagtacgc agacgccggc cacgtgtgcc acctgtgcca tccaaactgc 1800
acctacggat gcaactgggcc aggtcttgaa ggctgtgcaa ggaacgggcc taagatccca 1860
tcc 1863

<210> 101
<211> 621
<212> PRT
<213> 食蟹獼猴

<400> 101

Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln
1 5 10 15

Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn
20 25 30

Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg
35 40 45

Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr
50 55 60

Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu
65 70 75 80

Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala
85 90 95

Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro
100 105 110

Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn
115 120 125

Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val
130 135 140

Ser Ser Glu Phe Leu Ser Asn Met Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu
145 150 155 160

Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp
165 170 175

Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala
 180 185 190
 Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys
 195 200 205
 His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys
 210 215 220
 Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys
 225 230 235 240
 Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn
 245 250 255
 Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro
 260 265 270
 Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly
 275 280 285
 Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys
 290 295 300
 Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu
 305 310 315 320
 Phe Lys Asp Thr Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys
 325 330 335
 Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe
 340 345 350
 Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu
 355 360 365
 Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln
 370 375 380
 Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu
 385 390 395 400
 Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val
 405 410 415
 Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile
 420 425 430
 Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala
 435 440 445
 Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Ser Gln Lys Thr

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

<210> 102
 <211> 3633
 <212> DNA
 <213> 食蟹獼猴

<400> 102	
atgcgaccct cggggacggc cggggccgcg ctccctggcg tgctggctgc gctttgcccc	60
gcgagtcggg ctctggagga aaagaaagt tgccaaggca cgagtaacaa actcacgcag	120
ttgggcactt ttgaagatca ttttctcagc ctccagagga tgttcaataa ctgtgaggtg	180
gtccttgagg atttggaaat tacctacgtg cagaggaatt atgatctttc cttcttaaag	240
accatccagg aggtggctgg ttatgtcctc atcgccctca acacagtga gcggattcct	300
ttggaaaacc tgcagatcat cagaggaaac atgtactatg aaaattccta tgccttagca	360
gtcttatcta actatgatgc aaataaaacc ggactgaagg agctgccccat gagaaactta	420
caggaaatcc tgcattggcg cgtgcggttc agcaacaacc ctgccctgtg caacgtggag	480
agcatccagt ggcgggacat agtcagcagc gagtttctca gcaacatgtc gatggacttc	540
cagaaccacc tgggcagctg ccaaaagtgt gatccaagct gtcccaatgg gagctgctgg	600
ggtgcaggag aggagaactg ccagaaaactg accaaaaatca tctgtgccca gcagtgtcc	660

gggcgctgcc	gcggcaagtc	ccccagtgac	tgtgtccaca	accagtggtc	cgcgggctgc	720
acgggcccc	gggagagcga	ctgcctggtc	tgccgcaa	tccgagacga	agccacgtgc	780
aaggacacct	gccccccact	catgctctac	aacccaccca	cataccagat	ggatgtgaac	840
cccagaggca	aatacagctt	tggtgccacc	tgcgtgaaga	agtgtccccg	taattatgtg	900
gtgacagatc	acggctcgtg	cgtccgagcc	tgcggggccg	acagctatga	gatggaggaa	960
gacggcgctc	gcaagtgtaa	gaagtgcgaa	gggccttgcc	gcaaagtgtg	taatggaata	1020
ggtattgggtg	aatttaaaga	cacactctcc	ataaatgcta	caaataataa	acacttcaaa	1080
aactgcacct	ccatcagtgg	cgatctccac	atcctgccgg	tggcatttag	gggtgactcc	1140
ttcacacaca	ctccgcctct	ggatccacag	gaactggata	ttctgaaaac	cgtaaaggaa	1200
atcacaggtg	ttttgctgat	tcaggcttgg	cctgaaaaca	ggacggacct	ccatgctttt	1260
gagaacctag	aaatcatacg	tggcaggacc	aagcaacacg	gtcagttttc	tcttgcggtc	1320
gtcagcctga	acataacatc	cttgggatta	cgctccctca	aggagataag	cgatggagat	1380
gtgataat	caggaaacaa	aaatttgtgc	tatgcaaata	caataaactg	gaaaaaactg	1440
tttgggacct	ccagtcagaa	aacaaaaatt	ataagcaaca	gaggtgaaaa	cagctgcaag	1500
gccacggggc	aggctctgcca	tgccttgtgc	tccccgagg	gctgctgggg	cccggagccc	1560
agggactgcg	tctcctgtca	gaatgtcagc	cgaggcagag	aatgcgtgga	caagtgcaac	1620
atcctggagg	gcgagccaag	ggagtttgtg	gagaactctg	agtgcataca	gtgtcaccca	1680
gaatgcctgc	cccaggtcat	gaacatcacc	tgcacaggac	ggggaccaga	caactgtatc	1740
cagtggtgcc	actacattga	cgccccccac	tgcgtcaaga	cctgcccagc	aggagtcatg	1800
ggagaaaaca	acaccctggt	ctggaagtac	gcagacgccg	gccacgtgtg	ccacctgtgc	1860
catccaaact	gcacctacgg	atgcactggg	ccaggctctt	aaggctgtgc	aaggaacggg	1920
cctaagatcc	catccatcgc	cactgggatg	gtggggggcc	tcctcttgct	gctggtggtg	1980
gccctgggga	tcggcctctt	catgcgaagg	cgccacatcg	ttcggaagcg	cacactgcgg	2040
aggctgctgc	aggagaggga	gcttgtggag	cctcttacgc	ccagtggaga	agctcccaac	2100
caagctctct	tgaggatctt	gaaggaaact	gaattcaaga	agatcaaagt	gctgggctcc	2160
ggtgcgttcg	gaactgtgta	taagggactc	tggatcccag	aagggtgagaa	agttaaaatt	2220
cccgtcgcta	tcaaggaatt	aagagaagca	acatctccga	aagccaacaa	ggaaatcctc	2280
gatgaagcct	acgtgatggc	cagcgtggac	aacccccatg	tgtgccgcct	gctgggcatc	2340
tgcctcacct	ccaccgtgca	gtcattacg	cagctcatgc	ccttcggctg	cctcctggac	2400
tacgtccggg	aacacaagga	caatatcggc	tcccagtacc	tgctcaactg	gtgtgtgcag	2460
attgcaaagg	gcatgaacta	cttggaggac	cggcgcttgg	tgcaccgcga	cctggcagcc	2520
aggaacgtac	tggtgaaaac	gccacagcat	gtcaagatca	cagatttttg	gctggccaaa	2580
ctgctgggtg	cagaagagaa	agaataccat	gcagaaggag	gcaaagtgcc	tatcaagtgg	2640
atggcgttgg	aatcaatttt	acaccgaatt	tatacccacc	agagtgtgtg	ctggagctac	2700
ggggtgaccg	tttgggagtt	gatgaccttt	ggatccaagc	catatgacgg	aatccctgcc	2760
agcgagatct	cctccatcct	ggagaaagga	gaacgcctcc	cccagccacc	catatgtacc	2820

```

atcgatgtct acatgatcat ggtcaagtgc tggatgatag acgcagatag tcgccc aaag 2880
ttccgtgagt tgatcattga attctccaaa atggcccagag acccccagcg ctaccttggt 2940
attcaggggg atgaaagaat gcatttgcca agccctacag actccaactt ctaccgtgcc 3000
ctgatggatg aagaagacat ggacgacgtg gtggatgccg acgagtacct catcccacag 3060
caaggcttct tcagcagccc ctccacgtca cggactcccc tctgagctc tctgagtgca 3120
actagcaaca attccactgt ggcttgcat t gatagaaatg ggctgcaaag ctgttccatc 3180
aaggaagaca gcttcttaca gcgatacagc tcagacccca caggcgcctt gactgaggac 3240
agcatagacg acaccttcct cccagtgcct gaatacataa accagtctgt tcccaaaagg 3300
cccgtgggt ctgtgcagaa tcctgtctat cacaatcagc ctctgaacc tgcgccagc 3360
agagaccac actaccagga ccccccacagc accgcagtgg gcaaccccg gtatctcaac 3420
actgtccagc ccacctgtgt caacagcaca ttcgacagcc ctgctcattg ggcccagaaa 3480
ggcagccacc aaattagcct ggacaaccct gactaccagc aggacttctt tccaaggaa 3540
gccaagccaa atggcatctt taagggctcc acagctgaaa atgcagaata cctaagggtc 3600
gcaccacaaa gcagtgaatt tattggagca tga 3633

```

<210> 103
 <211> 1210
 <212> PRT
 <213> 食蟹獼猴

<400> 103

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
195 200 205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
210 215 220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
225 230 235 240

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

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
260 265 270

Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
275 280 285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
290 295 300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
305 310 315 320

Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
325 330 335

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Thr Leu Ser Ile Asn
340 345 350

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
355 360 365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
370 375 380

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
385 390 395 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
405 410 415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln

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

Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
 705 710 715 720
 Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
 725 730 735
 Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
 740 745 750
 Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
 755 760 765
 Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
 770 775 780
 Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
 785 790 795 800
 Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
 805 810 815
 Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
 820 825 830
 Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
 835 840 845
 Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
 850 855 860
 Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
 865 870 875 880
 Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
 885 890 895
 Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
 900 905 910
 Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
 915 920 925
 Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
 930 935 940
 Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys
 945 950 955 960
 Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
 965 970 975
 Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
 980 985 990

Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp
995 1000 1005

Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe
1010 1015 1020

Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu
1025 1030 1035

Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn
1040 1045 1050

Gly Leu Gln Ser Cys Ser Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg
1055 1060 1065

Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp
1070 1075 1080

Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro
1085 1090 1095

Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln
1100 1105 1110

Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro
1115 1120 1125

His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln
1130 1135 1140

Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala
1145 1150 1155

Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln
1160 1165 1170

Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys
1175 1180 1185

Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln
1190 1195 1200

Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
1205 1210

<210> 104
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成的建構體

<400> 104

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

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

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

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

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

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

Thr Arg Asn Gly Asp Tyr Tyr Val Ser Ser Gly Asp Ala Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 105

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成的建構體

<400> 105

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asn Thr Val Pro Pro
85 90 95

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

<210> 106

<211> 118
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成的建構體

<400> 106

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Asn Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Tyr Gly Tyr Asp Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser
115

<210> 107
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成的建構體

<400> 107

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 108
 <211> 621
 <212> PRT
 <213> 智慧人
 <400> 108
 Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln
 1 5 10 15
 Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn
 20 25 30
 Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg
 35 40 45
 Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr
 50 55 60
 Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu
 65 70 75 80
 Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala
 85 90 95
 Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro
 100 105 110
 Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn
 115 120 125
 Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val
 130 135 140
 Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu
 145 150 155 160
 Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp
 165 170 175
 Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala
 180 185 190
 Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys
 195 200 205
 His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys
 210 215 220

Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys
 225 230 235 240
 Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn
 245 250 255
 Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro
 260 265 270
 Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly
 275 280 285
 Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys
 290 295 300
 Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu
 305 310 315 320
 Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys
 325 330 335
 Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe
 340 345 350
 Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu
 355 360 365
 Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln
 370 375 380
 Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu
 385 390 395 400
 Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val
 405 410 415
 Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile
 420 425 430
 Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala
 435 440 445
 Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr
 450 455 460
 Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln
 465 470 475 480
 Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro
 485 490 495
 Lys Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val
 500 505 510

Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn
515 520 525

Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn
530 535 540

Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His
545 550 555 560

Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met
565 570 575

Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val
580 585 590

Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly
595 600 605

Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser
610 615 620

<210> 109

<211> 616

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 一致序列

<400> 109

Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln
1 5 10 15

Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn
20 25 30

Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg
35 40 45

Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr
50 55 60

Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu
65 70 75 80

Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala
85 90 95

Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro
100 105 110

Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn
115 120 125

```

-
Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val
130          135          140

Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu
145          150          155          160

-
Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp
165          170          175

-
Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala
180          185          190

-
Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys
195          200          205

-
His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys
210          215          220

Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys
225          230          235          240

Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn
245          250          255

Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro
260          265          270

Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly
275          280          285

Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys
290          295          300

Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu
305          310          315          320

Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys
325          330          335

Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe
340          345          350

Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu
355          360          365

Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln
370          375          380

Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu
385          390          395          400

Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val
405          410          415

```

Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile
420 425 430

Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala
435 440 445

Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gln Lys Thr Lys
450 455 460

Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val
465 470 475 480

Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Lys
485 490 495

Asp Cys Val Ser Cys Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys
500 505 510

Cys Asn Ile Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu
515 520 525

Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Met Asn Ile Thr Cys
530 535 540

Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp
545 550 555 560

Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn
565 570 575

Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu
580 585 590

Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly
595 600 605

Cys Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser
610 615

<210> 110
<211> 18
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 110

Cys Thr Arg Asn Gly Asp Tyr Tyr Ile Ser Ser Gly Asp Ala Met Asp
1 5 10 15

Tyr Trp

<210> 111
<211> 18
<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 111

Cys Thr Arg Asn Gly Asp Tyr Tyr Val Ser Ser Gly Asp Ala Met Asp
1 5 10 15

Tyr Trp

<210> 112

<211> 15

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 112

Cys Ala Arg Gly Ser Asp Gly Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
1 5 10 15

<210> 113

<211> 14

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 113

Cys Ala Arg Tyr Tyr Gly Tyr Asp Asp Ala Met Asp Tyr Trp
1 5 10

<210> 114

<211> 14

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 114

Cys Val Arg Tyr Tyr Gly Tyr Asp Glu Ala Met Asp Tyr Trp
1 5 10

<210> 115

<211> 14

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 115

Cys Val Arg Tyr Tyr Gly Tyr Asp Glu Val Met Asp Tyr Trp
1 5 10

<210> 116

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 116

Cys Gln His Tyr Asn Thr Val Pro Pro Thr Phe
1 5 10

<210> 117

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 117

Cys Gln Gln Phe Thr Thr Ser Pro Phe Thr Phe
1 5 10

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 118

Cys Gln His Tyr Asn Thr Val Pro Pro Thr Phe
1 5 10

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 119

Cys Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Leu Thr Phe
1 5 10

<210> 120

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 120

Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe
1 5 10

<210> 121

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> PCR引子

<400> 121

ggagggcgctc gagacggtga ctgaggttcc ttgac

35

<210> 122

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> PCR引子

<400> 122

ccagccgggg cgcgccgagg tccaactgca gcaacctggg tctgagctgg tg

52

<210> 123

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> PCR引子

<400> 123
ccagccgggg cgcgcccagg tccaactgca gcagcctggg gctgaactg 49

<210> 124
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 124
catgggaata gctagccgac attcagatga ctcagactac atcctccctg 50

<210> 125
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 125
catgggaata gctagccgac atcgtgatga cacaagctgc attctccaat c 51

<210> 126
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 126
accgcctcca ccggcgcccg ottattaaca ctctcccctg ttg 43

<210> 127
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 127
ctggggggccc ttggtgctgg ctgacgagac ggtgactgag gttc 44

<210> 128
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 128
gccagcacca agggccccc ggtccaactg cagcagc 37

<210> 129
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工

<220>

<223> PCR引子

<400> 129
cggggccctt ggtgctggct gacgagacgg tgactgag 38

<210> 130
<211> 37
<212> DNA
<213> PCR引子

<400> 130
gccagcacca agggccccga ggtccaactg cagcaac 37

<210> 131
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 131
gtctggtgca gccacagttc gtttgatttc cagcttggtg 40

<210> 132
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 132
cgaactgtgg ctgcaccaga catcgtgatg acacaagc 38

<210> 133
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 133
gtctggtgca gccacagttc gttttatttc cagcttggtc c 41

<210> 134
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 134
cgaactgtgg ctgcaccaga cattcagatg actcagacta c 41

<210> 135
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 135
tcttcgggaa gcagctatgc 20

<210> 136
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 136
ttctccactg ggcgtaagag 20

<210> 137
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 137
atctgcattc tagactggag gaaaagaaag ttgccaagg c 41

<210> 138
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 138
tactcgatga cgcgtttagg atgggatctt aggcccgttc c 41

<210> 139
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 139
tcatgctcca ataaattcac tg 22

<210> 140
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

<400> 140
ggagtcggcg gccgcaccat gcgaccctcc gggacgg 37

<210> 141
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PCR引子

I481412

<400> 141
gcatgtgact cgagtcatgc tccaataaat tcactgc

37

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98129193

※申請日：

98.8.31

※IPC 分類：

A61k39/395 (2006.01)

G07K16/30 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

重組抗表皮生長因子受體抗體組成物

RECOMBINANT ANTI-EPIDERMAL GROWTH

FACTOR RECEPTOR ANTIBODY COMPOSITIONS

二、中文發明摘要：

本發明係關於用於人類癌症治療之重組抗體領域。更特定言之，本發明提供對人類 EGFR 具有兩種獨特的非重疊結合特異性之抗體組成物的用途。該抗體組成物可在用其他抗 EGFR 抗體治療後有效於治療癌症，無論該癌症是否在該先前治療期間或之後顯示進展皆然。該抗體組成物亦可用於在用本發明之抗體組成物進行第一線治療後重複治療復發性腫瘤，因為該組成物不會導致抗性腫瘤選擇性。另一治療用途為使用本發明之抗體組成物治療對已知抗 EGFR 抗體具有抗性之癌症。

三、英文發明摘要：

The invention relates to the field of recombinant antibodies for use in human cancer therapy. More specifically the invention provides the use of an antibody composition with two distinct non-overlapping binding

specificities to human EGFR. The antibody composition is effecting in treating cancer following treatment with other anti-EGFR antibodies, whether the cancer shows progression during or following the prior treatment or not. The antibody composition can also be used for repeated treatment of recurrent tumours following first-line therapy with the antibody composition of the invention, as the composition does not lead to selection of resistant tumours. A further therapeutic use is the use of an antibody composition of the invention for treatment of cancer that is resistant to known anti-EGFR antibodies.

四、指定代表圖：

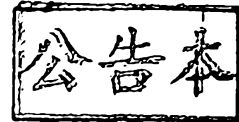
(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無



七、申請專利範圍：

1. 一種用於治療已經接受使用抗人類 EGFR 抗體之先前治療攝生法之個體中的癌症之方法中的抗體組成物，該抗體組成物包含至少一第一抗人類 EGFR 抗體分子以及一與該第一分子不同的第二抗人類 EGFR 抗體分子，

a. 其中該第一抗人類 EGFR 抗體分子係選自由以下者所組成之群組：

i) 一抗體，其輕鏈包含 SEQ ID NO: 72 之胺基酸 3-216，且其重鏈具有包含 SEQ ID NO: 40 之胺基酸 3-124 的可變域 (VH) 以及包含 SEQ ID NO: 91 之胺基酸序列的恆定區；

ii) 一抗體，其輕鏈具有包含 SEQ ID NO: 72 之胺基酸 3-109 的可變域 (VL) 且其 VH 包含 SEQ ID NO: 40 之胺基酸 3-124；與

iii) 一抗體，其具有 SEQ ID NO: 72 中的輕鏈 CDR1、CDR2、及 CDR3 與 SEQ ID NO: 40 中的重鏈 CDR1、CDR2、及 CDR3：且

b. 其中該第二抗人類 EGFR 抗體分子係選自由以下者所組成之群組：

i) 一抗體，其輕鏈包含 SEQ ID NO: 73 之胺基酸 3-221，且其重鏈具有包含 SEQ ID NO: 41 之胺基酸 3-120 的可變域 (VH) 以及包含 SEQ ID NO: 91 之胺基酸序列的恆定區；

ii) 一抗體，其 VL 包含 SEQ ID NO: 73 之胺基酸 3-114 且其 VH 包含 SEQ ID NO: 41 之胺基酸 3-120；與

iii) 一抗體，其具有 SEQ ID NO: 73 中的輕鏈 CDR1、

CDR2、及 CDR3 以及 SEQ ID NO: 41 中的重鏈 CDR1、CDR2、與 CDR3。

2.一種用於治療已經接受使用抗人類 EGFR 抗體之先前治療攝生法之個體中的癌症的抗體組成物，該抗體組成物包含一第一抗人類 EGFR 抗體分子以及一與該第一分子不同的第二抗人類 EGFR 抗體分子，

a)其中該第一抗人類 EGFR 抗體分子具有包含 SEQ ID NO: 72 之胺基酸 3-216 的輕鏈、及包含含有 SEQ ID NO: 40 之胺基酸 3-124 的 VH 與含有 SEQ ID NO: 91 之胺基酸序列的恆定區的重鏈；且

b)其中該第二抗人類 EGFR 抗體分子具有包含 SEQ ID NO: 73 之胺基酸 3-221 的輕鏈、與包含含有 SEQ ID NO: 41 之胺基酸 3-120 的 VH 與含有 SEQ ID NO: 91 之胺基酸序列的恆定區的重鏈。

3.如申請專利範圍第 1 或 2 項之組成物，其中該先前治療攝生法使用選自由以下者所組成之群組的抗人類 EGFR 抗體：西妥昔單抗 (cetuximab)、帕尼單抗 (panitumumab)、紮妥木單抗 (zalutumumab)、尼妥珠單抗 (nimotuzumab)、ICR62、mAb806、馬妥珠單抗 (matuzumab)、及能夠與任何此等抗體結合相同抗原決定基之抗體。

4.如申請專利範圍第 1 或 2 項之組成物，其中該先前治療攝生法為第一線療法。

5.如申請專利範圍第 1 或 2 項之組成物，其中該先前治療攝生法為第二線療法。

6.如申請專利範圍第 5 項之組成物，其中該第一線療法包含使用以下者的治療攝生法：

- a)化學療法；
- b)至少一種酪胺酸激酶抑制劑；
- c)至少一種血管生成抑制劑；
- d)至少一種激素；
- e)至少一種分化誘導劑；或
- f) a)-e)之任何組合。

7.如申請專利範圍第 1 或 2 項之組成物，其中該個體之癌症在該先前治療攝生法期間疾病有進展。

8.如申請專利範圍第 1 或 2 項之組成物，其中該個體之癌症在該先前治療攝生法之後疾病有進展。

9.如申請專利範圍第 1 或 2 項之組成物，其中該癌症對該先前治療攝生法具有抗性或部分抗性。

10.一種用於治療癌症之方法中的抗體組成物，其中該癌症對使用至少一種選自由以下者所組成之群組的其他抗 EGFR 抗體之治療具有抗性或部分抗性：西妥昔單抗、帕尼單抗、紮妥木單抗、尼妥珠單抗、ICR62、mAb806、馬妥珠單抗、及能夠與任何此等抗體結合相同抗原決定基之抗體；該抗體組成物包含至少一第一抗人類 EGFR 抗體分子以及一與該第一分子不同的第二抗人類 EGFR 抗體分子，

a.其中該第一抗人類 EGFR 抗體分子係選自由以下者所組成之群組：

- i)一抗體，其輕鏈包含 SEQ ID NO: 72 之胺基酸 3-216，

且其重鏈具有包含 SEQ ID NO: 40 之胺基酸 3-124 的可變域 (VH) 以及包含 SEQ ID NO: 91 之胺基酸序列的恆定區；

ii) 一抗體，其輕鏈可變域 (VL) 包含 SEQ ID NO: 72 之胺基酸 3-109 且其 VH 包含 SEQ ID NO: 40 之胺基酸 3-124；與

iii) 一抗體，其具有 SEQ ID NO: 72 中的輕鏈 CDR1、CDR2、及 CDR3 與 SEQ ID NO: 40 中的重鏈 CDR1、CDR2、及 CDR3；且

b. 其中該第二抗人類 EGFR 抗體分子係選自由以下者所組成之群組：

i) 一抗體，其輕鏈包含 SEQ ID NO: 73 之胺基酸 3-221，且其重鏈具有包含 SEQ ID NO: 41 之胺基酸 3-120 的可變域 (VH) 以及包含 SEQ ID NO: 91 之胺基酸序列的恆定區；

ii) 一抗體，其輕鏈可變域 (VL) 包含 SEQ ID NO: 73 之胺基酸 3-114 且其 VH 包含 SEQ ID NO: 41 之胺基酸 3-120；與

iii) 一抗體，其具有 SEQ ID NO: 73 中的輕鏈 CDR1、CDR2、及 CDR3 以及 SEQ ID NO: 41 中的重鏈 CDR1、CDR2、與 CDR3。

11. 如申請專利範圍第 10 項之組成物，其中該組成物係用於第一線療法。

12. 如申請專利範圍第 10 項之組成物，其中該組成物係用於繼使用以下者之治療攝生法後的第二線療法：

a) 化學療法；

- b)至少一種酪胺酸激酶抑制劑；
- c)至少一種血管生成抑制劑；
- d)至少一種激素；
- e)至少一種分化誘導劑；或
- f) a)-e)之任何組合。

13.如申請專利範圍第 10 項之組成物，其中該組成物係用於第三線療法。

14.如申請專利範圍第 10 項之組成物，其中該完全或部分的抗性已藉由檢定自該個體分離之癌細胞樣本來判定。

15.如申請專利範圍第 1、2 及 10 項中任一項之組成物，其中該癌症係選自由以下者所組成之群組：頭頸部癌、結腸癌、乳癌、腎癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、神經膠質瘤、胰腺癌、膀胱癌、非小細胞肺癌（non-small-cell-lung-carcinoma，NSCLC）、胃癌、子宮頸癌、肝細胞癌、胃食道癌、結腸直腸癌、直腸癌、上皮癌、RCC、頭頸部鱗狀細胞癌（squamous cell carcinoma of the head and neck，SCCHN）、食道癌、多形性神經膠質母細胞瘤、鱗狀細胞癌、腎臟癌、肉瘤及黑色素瘤。

16.如申請專利範圍第 1、2 及 10 項中任一項之組成物，其中該抗體組成物是用於繼手術及/或放射療法後之輔助療法。

17.如申請專利範圍第 1、2 及 10 項中任一項之組成物，其中該抗體組成物是用於組合以下者之組合療法：

- a)化學療法；

- b)至少一種酪胺酸激酶抑制劑；
- c)至少一種血管生成抑制劑；
- d)至少一種激素；
- e)至少一種分化誘導劑治療；或
- f) a)-e)之任何組合。

18.如申請專利範圍第 6、12 及 17 項中任一項之組成物，其中該血管生成抑制劑為貝伐單抗。

19.如申請專利範圍第 1、2 及 10 項中任一項之組成物，其中該組成物之第一及第二抗人類 EGFR 抗體分子並不抑制彼此與人類 EGFR 之結合。

20.如申請專利範圍第 1、2 及 10 項中任一項之組成物，其中該組成物之抗體分子中之至少一者能夠增強另一抗體對於人類 EGFR 之最大結合能力。

21.如申請專利範圍第 1、2 及 10 項中任一項之組成物，其中該組成物除了該第一及第二抗體分子外不包含其他抗體分子。

22.如申請專利範圍第 1、2 及 10 項中任一項之組成物，其中該第一抗體分子相對於該第二抗體分子之比例為 1:1。

23.如申請專利範圍第 1、2 及 10 項中任一項之組成物，其中該組成物之第一與第二抗體分子為同型 IgG1 或 IgG2。

24.一種用於治療已經接受使用抗人類 EGFR 抗體之先前治療攝生法之個體中的癌症之方法中的雙專一性結合性分子，其中該雙專一性結合性分子包含一包括 SEQ ID NO: 72 中的輕鏈 CDR1、CDR2、及 CDR3 與 SEQ ID NO: 40 中

的重鏈 CDR1、CDR2、與 CDR3 的第一抗原結合域；以及一包括 SEQ ID NO: 73 中的輕鏈 CDR1、CDR2、及 CDR3 與 SEQ ID NO: 41 中的重鏈 CDR1、CDR2、與 CDR3 的第二抗原結合域。

八、圖式：

如次頁

