



(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 I511742 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 12 月 11 日

(21)申請案號：100106952

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 02 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)**C07K16/30 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2010/03/02 美國

61/309,494

(71)申請人：艾伯維有限公司 (美國) ABBVIE INC. (US)

美國

(72)發明人：李茵群 LI, YINGCHUN (CN)；古 吉傑 詹姆士 GU, JIJIE JAMES (US)；摩根
萊普 蘇珊 MORGAN-LAPPE, SUSAN (US)；陳明鳩 CHEN, MINGJIU (US)；辛
瓊明 HSIEH, CHUNG-MING (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW 200815467

WO 01/31065A1

WO 2008/019144A2

審查人員：黃教威

申請專利範圍項數：31 項 圖式數：0 共 374 頁

(54)名稱

治療性DLL4結合蛋白

THERAPEUTIC DLL4 BINDING PROTEINS

(57)摘要

本發明描述 DLL4 結合蛋白，包括抗體、CDR 移植抗體、人類化抗體及其 DLL4 結合片段，以高親和力結合 DLL4 之蛋白質，及中和 DLL4 及/或 VEGF 活性之 DLL4 結合蛋白。DLL4 結合蛋白適用於治療或預防癌症及腫瘤，尤其適用於治療或預防腫瘤血管生成。

DLL4 binding proteins are described herein, including antibodies, CDR-grafted antibodies, humanized antibodies, and DLL4 binding fragments thereof, proteins that bind DLL4 with high affinity, and DLL4 binding proteins that neutralize DLL4 and/or VEGF activity. The DLL4 binding proteins are useful for treating or preventing cancers and tumors and especially for treating or preventing tumor angiogenesis.

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於DLL4結合蛋白之開發及用途，及其在抑制、預防及/或治療癌症、腫瘤、以異常DLL4表現或活性為特徵之其他血管生成依賴性疾病、非血管生成依賴性疾病，及黃斑變性及年齡相關之黃斑變性疾病中的用途。

本申請案主張2010年3月2日申請之美國臨時申請案第61/309,494號之優先權。

序列表

本申請案含有序列表，其已經由以ASCII格式提交且以全文引用的方式併入本文中。2011年2月24日創建之該ASCII複本命名為Generic Listing.txt且大小為111,417個位元組。

【先前技術】

許多生物過程需要細胞間通訊(Cell-to-cell communication)，諸如分化、增殖及恆定。諸多真核生物所利用之一個系統為Notch信號傳導路徑。此路徑(尤其Notch受體)對於功能性腫瘤血管生成而言亦至關重要。因而，抑制Notch受體功能、阻斷Notch受體及/或阻斷Notch信號傳導路徑為抗癌組合物及療法之可能策略。Notch受體之小分子抑制劑經證實具有毒性，因為其抑制整個體內Notch受體之野生型(正常)組織表現。因而，Notch信號傳導路徑之不同成員應視作治療劑之可能標靶。

Notch受體之一個血管結構配位體為 $\delta 4$ 或 δ 樣4(DLL4)。

DLL4主要表現於血管結構中，對於血管發育而言至關重要(Yan等人, *Clin. Cancer Res.*, 13(24): 7243-7246 (2007); Shutter等人, *Genes Dev.*, 14(11): 1313-1318 (2000); Gale等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(45): 15949-15954 (2004); Krebs等人, *Genes Dev.*, 14(11): 1343-1352 (2000))。DLL4異種接合小鼠由於血管發育中之重大缺陷而導致胚胎死亡(Gale等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(45): 15949-15954 (2004); Duarte等人, *Genes Dev.*, 18(20): 2474-2478 (2004); Krebs等人, *Genes Dev.*, 18(20): 2469-2473 (2004))。DLL4之表現可由VEGF誘導(Liu等人, *Mol. Cell Biol.*, 23(1): 14-25 (2003); Lobov等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(9): 3219-3224 (2007))。總言之，DLL4可部分地經由抑制VEGFR2並誘導VEGFR1來負向調節VEGF信號傳導(Harrington等人, *Microvasc. Res.*, 75(2): 144-154 (2008); Suchting等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(9): 3225-3230 (2007))。DLL4與VEGF之間的完美配合對於功能性血管生成而言必不可少。

除生理學作用以外，DLL4在腫瘤血管中得以上調(Gale等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(45): 15949-15954 (2004); Mailhos等人, *Differentiation*, 69(2-3): 135-144 (2001); Patel等人, *Cancer Res.*, 65(19): 8690-8697 (2005); Patel等人, *Clin. Cancer Res.*, 12(16): 4836-4844 (2006); Noguera-Troise等人, *Nature*, 444(7122): 1032-1037 (2006))。在多個模型中，阻斷DLL4可有效抑制原發性腫瘤生長

(Noguera-Troise等人, *Nature*, 444(7122): 1032-1037 (2006); Ridgway等人, *Nature*, 444(7122): 1083-1087 (2006); Scehnet等人, *Blood*, 109(11): 4753-4760 (2007))。抑制DLL4甚至可有效對抗具有抗VEGF療法抗性之腫瘤。對DLL4與VEGF兩者之組合抑制增強抗腫瘤活性。令人感興趣的是, 不同於減少腫瘤血管形成之VEGF抑制, DLL4阻斷使得腫瘤血管結構密度增加, 其中血管異常、無法支持有效血液輸送且實際上不具功能性。因而, DLL4提供癌症治療之可能標靶。

此項技術中需要能夠靶向DLL4-Notch路徑並由此抑制或甚至預防腫瘤血管生成及生長的治療劑。

【發明內容】

本發明提供結合人類DLL4之蛋白質。本發明之DLL4結合蛋白包括但不限於能夠結合人類DLL4之大鼠單株抗體、嵌合抗體、CDR移植抗體、人類化抗體、靈長類動物化抗體、親和力成熟抗體, 及其片段。本文所述之結合蛋白較佳以高親和力結合人類DLL4。本發明之結合蛋白更佳能夠中和人類DLL4。本發明亦提供製造及使用DLL4結合蛋白的方法。

本發明之一個態樣提供一種能夠結合人類DLL4之結合蛋白, 其中該結合蛋白包含至少一個選自由SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:158、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:160、SEQ ID NO:161、SEQ ID NO:162、SEQ ID NO:163及SEQ ID NO:164組成之胺基酸序列群的胺基酸序

列。

本發明之一個態樣係關於一種包含抗原結合域之結合蛋白，其中該結合蛋白能夠結合人類DLL4，該抗原結合域包含至少一或多個(亦即2、3、4、5或6個)CDR，其中：

CDR-H1係選自由以下組成之群：

X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 (SEQ ID NO:151)，其中：

X_1 為N、H或Y；

X_2 為F；

X_3 為P；

X_4 為M；

X_5 為A或S；

SEQ ID NO:157之殘基31-35 (CDR-H1 38H12)；

SEQ ID NO:161之殘基31-35 (CDR-H1 37D10)；

SEQ ID NO:163之殘基31-35 (CDR-H1 32C7)；

SEQ ID NO:165之殘基31-35 (CDR-H1 14G1)；

SEQ ID NO:167之殘基31-35 (CDR-H1 14A11)；

SEQ ID NO:169之殘基31-35 (CDR-H1 15D6)；

SEQ ID NO:171之殘基31-35 (CDR-H1 VH.1 1A11)；

SEQ ID NO:172之殘基31-35 (CDR-H1 VH.1a 1A11)；

SEQ ID NO:173之殘基31-35 (CDR-H1 VH.1b 1A11)；

SEQ ID NO:174之殘基31-35 (CDR-H1 VH.2a 1A11)；

SEQ ID NO:179之殘基31-35 (CDR-H1 VH.1 38H12)；

SEQ ID NO:180之殘基31-35 (CDR-H1 VH.1A 38H12)；

SEQ ID NO:181之殘基31-35 (CDR-H1 VH.1b 38H12)；

SEQ ID NO:182之殘基31-35 (CDR-H1 VH.2a 38H12) ;

SEQ ID NO:187之殘基31-35 (CDR-H1 h1A11VH.1) ;

SEQ ID NO:188之殘基31-35 (CDR-H1 h1A11.A6) ;

SEQ ID NO:189之殘基31-35 (CDR-H1 h1A11.A8) ;

SEQ ID NO:190之殘基31-35 (CDR-H1 h1A11.C6) ;

SEQ ID NO:191之殘基31-35 (CDR-H1 h1A11.A11) ;

SEQ ID NO:192之殘基31-35 (CDR-H1 h1A11.B5) ;

SEQ ID NO:193之殘基31-35 (CDR-H1 h1A11.E12) ;

SEQ ID NO:194之殘基31-35 (CDR-H1 h1A11.G3) ;

SEQ ID NO:195之殘基31-35 (CDR-H1 h1A11.F5) ; 及

SEQ ID NO:196之殘基31-35 (CDR-H1 h1A11.H2) ;

CDR-H2係選自由以下組成之群：

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-$

$X_{16}-X_{17}$ (SEQ ID NO:152)，其中：

X_1 為 T 或 S ；

X_2 為 I ；

X_3 為 S ；

X_4 為 S 或 G ；

X_5 為 S ；

X_6 為 D ；

X_7 為 G、A、D、S 或 E ；

X_8 為 T 或 W ；

X_9 為 T、P 或 A ；

X_{10} 為 Y、S、T 或 N ；

X₁₁ 為 Y 或 I ；

X₁₂ 為 R 或 G ；

X₁₃ 為 D ；

X₁₄ 為 S ；

X₁₅ 為 V ；

X₁₆ 為 K ； 且

X₁₇ 為 G ；

SEQ ID NO:157之殘基 50-66 (CDR-H2 38H12) ；

SEQ ID NO:161之殘基 50-66 (CDR-H2 37D10) ；

SEQ ID NO:163之殘基 50-66 (CDR-H2 32C7) ；

SEQ ID NO:165之殘基 50-66 (CDR-H2 14G1) ；

SEQ ID NO:167之殘基 50-66 (CDR-H2 14A11) ；

SEQ ID NO:169之殘基 50-66 (CDR-H2 15D6) ；

SEQ ID NO:171之殘基 50-66 (CDR-H2 VH.1 1A11) ；

SEQ ID NO:172之殘基 50-66 (CDR-H2 VH.1a 1A11) ；

SEQ ID NO:173之殘基 50-66 (CDR-H2 VH.1b 1A11) ；

SEQ ID NO:174之殘基 50-66 (CDR-H2 VH.2a 1A11) ；

SEQ ID NO:179之殘基 50-66 (CDR-H2 VH.1 38H12) ；

SEQ ID NO:180之殘基 50-66 (CDR-H2 VH.1A 38H12) ；

SEQ ID NO:181之殘基 50-66 (CDR-H2 VH.1b 38H12) ；

SEQ ID NO:182之殘基 31-35 (CDR-H1 VH.2a 38H12) ；

SEQ ID NO:187之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11VH.1) ；

SEQ ID NO:188之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.A6) ；

SEQ ID NO:189之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.A8) ；

SEQ ID NO:190之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.C6) ;
SEQ ID NO:191之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.A11) ;
SEQ ID NO:192之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.B5) ;
SEQ ID NO:193之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.E12) ;
SEQ ID NO:194之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.G3) ;
SEQ ID NO:195之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.F5) ; 及
SEQ ID NO:196之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.H2) ;

CDR-H3係選自由以下組成之群：

X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 (SEQ ID NO:153)，其中：

X_1 為 G ；

X_2 為 Y ；

X_3 為 Y ；

X_4 為 N ；

X_5 為 S ；

X_6 為 P ；

X_7 為 F ；

X_8 為 A ； 且

X_9 為 Y、F 或 S ；

SEQ ID NO:157之殘基 99-107 (CDR-H3 38H12) ;
SEQ ID NO:161之殘基 101-111 (CDR-H3 37D10) ;
SEQ ID NO:163之殘基 99-105 (CDR-H3 32C7) ;
SEQ ID NO:165之殘基 99-105 (CDR-H3 14G1) ;
SEQ ID NO:167之殘基 99-110 (CDR-H3 14A11) ;
SEQ ID NO:169之殘基 99-110 (CDR-H3 15D6) ;

SEQ ID NO:171之殘基 99-107 (CDR-H3 VH.1 1A11) ;
SEQ ID NO:172之殘基 99-107 (CDR-H3 VH.1a 1A11) ;
SEQ ID NO:173之殘基 99-107 (CDR-H3 VH.1b 1A11) ;
SEQ ID NO:174之殘基 99-107 (CDR-H3 VH.2a 1A11) ;
SEQ ID NO:179之殘基 99-107 (CDR-H3 VH.1 38H12) ;
SEQ ID NO:180之殘基 99-107 (CDR-H3 VH.1A 38H12) ;
SEQ ID NO:181之殘基 99-107 (CDR-H2 VH.1b 38H12) ;
SEQ ID NO:182之殘基 99-107 (CDR-H1 VH.2a 38H12) ;
SEQ ID NO:187之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11VH.1) ;
SEQ ID NO:188之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11.A6) ;
SEQ ID NO:189之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11.A8) ;
SEQ ID NO:190之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11.C6) ;
SEQ ID NO:191之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11.A11) ;
SEQ ID NO:192之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11.B5) ;
SEQ ID NO:193之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11.E12) ;
SEQ ID NO:194之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11.G3) ;
SEQ ID NO:195之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11.F5) ; 及
SEQ ID NO:196之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11.H2) ;

CDR-L1係選自由以下組成之群：

X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} (SEQ ID NO:154) ,

其中：

X_1 為 R ；

X_2 為 A ；

X_3 為 S ；

X₄ 為 E 或 Q ；

X₅ 為 D 或 E ；

X₆ 為 I ；

X₇ 為 Y 或 W ；

X₈ 為 S 、 I 、 Y 、 N 或 R ；

X₉ 為 N ；

X₁₀ 為 L ； 且

X₁₁ 為 A ；

SEQ ID NO:158 之 殘 基 24-34 (CDR-L1 38H12) ；

SEQ ID NO:162 之 殘 基 24-34 (CDR-L1 37D10) ；

SEQ ID NO:164 之 殘 基 24-34 (CDR-L1 32C7) ；

SEQ ID NO:166 之 殘 基 24-34 (CDR-L1 14G1) ；

SEQ ID NO:168 之 殘 基 23-37 (CDR-L1 14A11) ；

SEQ ID NO:170 之 殘 基 23-37 (CDR-L1 15D6) ；

SEQ ID NO:175 之 殘 基 24-34 (CDR-L1 VL.1 1A11) ；

SEQ ID NO:176 之 殘 基 24-34 (CDR-L1 VL.1a 1A11) ；

SEQ ID NO:177 之 殘 基 24-34 (CDR-L1 VL.1b 1A11) ；

SEQ ID NO:178 之 殘 基 24-34 (CDR-L1 VL.2a 1A11) ；

SEQ ID NO:183 之 殘 基 24-34 (CDR-L1 VL.1 38H12) ；

SEQ ID NO:184 之 殘 基 24-34 (CDR-L1 VL.1a 38H12) ；

SEQ ID NO:185 之 殘 基 24-34 (CDR-L1 VL.1b 38H12) ；

SEQ ID NO:186 之 殘 基 24-34 (CDR-L1 VL.2a 38H12) ；

SEQ ID NO:197 之 殘 基 24-34 (CDR-L1 h1A11VL.1) ；

SEQ ID NO:198 之 殘 基 24-34 (CDR-L1 h1A11.A2) ；

SEQ ID NO:199之殘基 24-34 (CDR-L1 h1A11.A12) ;
SEQ ID NO:200之殘基 24-34 (CDR-L1 h1A11.A7) ;
SEQ ID NO:201之殘基 24-34 (CDR-L1 h1A11.B4) ;
SEQ ID NO:202之殘基 24-34 (CDR-L1 h1A11.B5) ; 及
SEQ ID NO:203之殘基 24-34 (CDR-L1 h1A11.E12) ;
CDR-L2係選自由以下組成之群 :

X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 (SEQ ID NO:155), 其中 :

X_1 為 D ;

X_2 為 T ;

X_3 為 N 或 S ;

X_4 為 N、D、S、I、Y 或 V ;

X_5 為 L ;

X_6 為 A ; 且

X_7 為 D ;

SEQ ID NO:158之殘基 50-56 (CDR-L2 38H12) ;
SEQ ID NO:162之殘基 50-56 (CDR-L2 37D10) ;
SEQ ID NO:164之殘基 50-56 (CDR-L2 32C7) ;
SEQ ID NO:166之殘基 50-56 (CDR-L2 14G1) ;
SEQ ID NO:168之殘基 53-59 (CDR-L2 14A11) ;
SEQ ID NO:170之殘基 53-59 (CDR-L2 15D6) ;
SEQ ID NO:175之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.1 1A11) ;
SEQ ID NO:176之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.1a 1A11) ;
SEQ ID NO:177之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.1b 1A11) ;
SEQ ID NO:178之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.2a 1A11) ;

SEQ ID NO:183之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.1 38H12) ;
 SEQ ID NO:184之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.1a 38H12) ;
 SEQ ID NO:185之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.1b 38H12) ;
 SEQ ID NO:186之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.2a 38H12) ;
 SEQ ID NO:197之殘基 50-56 (CDR-L2 h1A11VL.1) ;
 SEQ ID NO:198之殘基 50-56 (CDR-L2 h1A11.A2) ;
 SEQ ID NO:199之殘基 50-56 (CDR-L2 h1A11.A12) ;
 SEQ ID NO:200之殘基 50-56 (CDR-L2 h1A11.A7) ;
 SEQ ID NO:201之殘基 50-56 (CDR-L2 h1A11.B4) ;
 SEQ ID NO:202之殘基 50-56 (CDR-L2 h1A11.B5) ; 及
 SEQ ID NO:203之殘基 50-56 (CDR-L2 h1A11.E12) ;

且

CDR-L3係選自由以下組成之群：

X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 (SEQ ID NO:156)，其中：

X_1 為 Q ；

X_2 為 Q ；

X_3 為 Y ；

X_4 為 N、D 或 T ；

X_5 為 N、Y 或 W ；

X_6 為 Y 或 V ；

X_7 為 P ；

X_8 為 P ； 且

X_9 為 T ；

SEQ ID NO:158之殘基 89-97 (CDR-L3 38H12) ；

SEQ ID NO:162之殘基 89-97 (CDR-L3 37D10) ;
SEQ ID NO:164之殘基 89-97 (CDR-L3 32C7) ;
SEQ ID NO:166之殘基 89-98 (CDR-L3 14G1) ;
SEQ ID NO:168之殘基 92-100 (CDR-L3 14A11) ;
SEQ ID NO:170之殘基 92-100 (CDR-L3 15D6) ;
SEQ ID NO:175之殘基 89-97 (CDR-L3 VL.1 1A11) ;
SEQ ID NO:176之殘基 89-97 (CDR-L3 VL.1a 1A11) ;
SEQ ID NO:177之殘基 89-97 (CDR-L3 VL.1b 1A11) ;
SEQ ID NO:178之殘基 89-97 (CDR-L3 VL.2a 1A11) ;
SEQ ID NO:183之殘基 89-97 (CDR-L3 VL.1 38H12) ;
SEQ ID NO:184之殘基 89-97 (CDR-L3 VL.1a 38H12) ;
SEQ ID NO:185之殘基 89-97 (CDR-L3 VL.1b 38H12) ;
SEQ ID NO:186之殘基 89-97 (CDR-L3 VL.2a 38H12) ;
SEQ ID NO:197之殘基 89-97 (CDR-L3 h1A11VL.1) ;
SEQ ID NO:198之殘基 89-97 (CDR-L3 h1A11.A2) ;
SEQ ID NO:199之殘基 89-97 (CDR-L3 h1A11.A12) ;
SEQ ID NO:200之殘基 89-97 (CDR-L3 h1A11.A7) ;
SEQ ID NO:201之殘基 89-97 (CDR-L3 h1A11.B4) ;
SEQ ID NO:202之殘基 89-97 (CDR-L3 h1A11.B5) ;
SEQ ID NO:203之殘基 89-97 (CDR-L3 h1A11.E12) 。

本發明之DLL4結合蛋白較佳包含至少一個包含選自由
以下組成之群的胺基酸序列的CDR：

SEQ ID NO:157之殘基 31-35 (CDR-H1 38H12) ; SEQ ID
NO:157之殘基 50-66 (CDR-H2 38H12) ; SEQ ID NO:157之

殘基 99-107 (CDR-H3 38H12) ;

SEQ ID NO:158之殘基 24-34 (CDR-L1 38H12) ; SEQ ID NO:158之殘基 50-56 (CDR-L2 38H12) ; SEQ ID NO:158之殘基 89-97 (CDR-L3 38H12) ;

SEQ ID NO:159之殘基 31-35 (CDR-H1 1A11) ; SEQ ID NO:159之殘基 50-66 (CDR-H2 1A11) ; SEQ ID NO:159之殘基 99-107 (CDR-H3 1A11) ;

SEQ ID NO:160之殘基 24-34 (CDR-L1 1A11) ; SEQ ID NO:160之殘基 50-56 (CDR-L2 1A11) ; SEQ ID NO:160之殘基 89-97 (CDR-L3 1A11) ;

SEQ ID NO:161之殘基 31-35 (CDR-H1 37D10) ; SEQ ID NO:161之殘基 50-68 (CDR-H2 37D10) ; SEQ ID NO:161之殘基 101-111 (CDR-H3 37D10) ;

SEQ ID NO:162之殘基 24-34 (CDR-L1 37D10) ; SEQ ID NO:162之殘基 50-56 (CDR-L2 37D10) ; SEQ ID NO:162之殘基 89-97 (CDR-L3 37D10) ;

SEQ ID NO:163之殘基 31-35 (CDR-H1 32C7) ; SEQ ID NO:163之殘基 50-66 (CDR-H2 32C7) ; SEQ ID NO:163之殘基 99-105 (CDR-H3 32C7) ;

SEQ ID NO:164之殘基 24-34 (CDR-L1 32C7) ; SEQ ID NO:164之殘基 50-56 (CDR-L2 32C7) ; SEQ ID NO:164之殘基 89-98 (CDR-L3 32C7) ;

SEQ ID NO:165之殘基 31-35 (CDR-H1 14G1) ; SEQ ID NO:165之殘基 50-66 (CDR-H2 14G1) ; SEQ ID NO:165之殘

基 99-105 (CDR-H3 14G1) ;

SEQ ID NO:166之殘基 24-34 (CDR-L1 14G1) ; SEQ ID NO:166之殘基 50-56 (CDR-L2 14G1) ; SEQ ID NO:166之殘基 89-98 (CDR-L3 14G1) ;

SEQ ID NO:167之殘基 31-35 (CDR-H1 14A11) ; SEQ ID NO:167之殘基 50-66 (CDR-H2 14A11) ; SEQ ID NO:167之殘基 99-110 (CDR-H3 14A11) ;

SEQ ID NO:168之殘基 23-37 (CDR-L1 14A11) ; SEQ ID NO:168之殘基 53-59 (CDR-L2 14A11) ; SEQ ID NO:168之殘基 92-100 (CDR-L3 14A11) ;

SEQ ID NO:169之殘基 31-35 (CDR-H1 15D6) ; SEQ ID NO:169之殘基 50-66 (CDR-H2 15D6) ; SEQ ID NO:169之殘基 99-110 (CDR-H3 15D6) ;

SEQ ID NO:170之殘基 23-37 (CDR-L1 15D6) ; SEQ ID NO:170之殘基 53-59 (CDR-L2 15D6) ; SEQ ID NO:170之殘基 92-100 (CDR-L3 15D6) ;

SEQ ID NO:171之殘基 31-35 (CDR-H1 VH.1 1A11) ;
SEQ ID NO:171之殘基 50-66 (CDR-H2 VH.1 1A11) ; SEQ ID NO:171之殘基 99-107 (CDR-H3 VH.1 1A11) ; SEQ ID NO:172之殘基 31-35 (CDR-H1 VH.1a 1A11) ; SEQ ID NO:172之殘基 50-66 (CDR-H2 VH.1a 1A11) ; SEQ ID NO:172之殘基 99-107 (CDR-H3 VH.1a 1A11) ; SEQ ID NO:173之殘基 31-35 (CDR-H1 VH.1b 1A11) ; SEQ ID NO:173之殘基 50-66 (CDR-H2 VH.1b 1A11) ; SEQ ID

NO:173 之 殘 基 99-107 (CDR-H3 VH.1b 1A11) ; SEQ ID
NO:174 之 殘 基 31-35 (CDR-H1 VH.2a 1A11) ; SEQ ID
NO:174 之 殘 基 50-66 (CDR-H2 VH.2a 1A11) ; SEQ ID
NO:174 之 殘 基 99-107 (CDR-H3 VH.2a 1A11) ; SEQ ID
NO:175 之 殘 基 24-34 (CDR-L1 VL.1 1A11) ; SEQ ID
NO:175 之 殘 基 50-56 (CDR-L2 VL.1 1A11) ; SEQ ID
NO:175 之 殘 基 89-97 (CDR-L3 VL.1 1A11) ; SEQ ID
NO:176 之 殘 基 24-34 (CDR-L1 VL.1a 1A11) ; SEQ ID
NO:176 之 殘 基 50-56 (CDR-L2 VL.1a 1A11) ; SEQ ID
NO:176 之 殘 基 89-97 (CDR-L3 VL.1a 1A11) ; SEQ ID
NO:177 之 殘 基 24-34 (CDR-L1 VL.1b 1A11) ; SEQ ID
NO:177 之 殘 基 50-56 (CDR-L2 VL.1b 1A11) ; SEQ ID
NO:177 之 殘 基 89-97 (CDR-L3 VL.1b 1A11) ; SEQ ID
NO:178 之 殘 基 24-34 (CDR-L1 VL.2a 1A11) ; SEQ ID
NO:178 之 殘 基 50-56 (CDR-L2 VL.2a 1A11) ; SEQ ID
NO:178 之 殘 基 89-97 (CDR-L3 VL.2a 1A11) ; SEQ ID
NO:179 之 殘 基 31-35 (CDR-H1 VH.1 38H12) ; SEQ ID
NO:179 之 殘 基 50-66 (CDR-H2 VH.1 38H12) ; SEQ ID
NO:179 之 殘 基 99-107 (CDR-H3 VH.1 38H12) ; SEQ ID
NO:180 之 殘 基 31-35 (CDR-H1 VH.1A 38H12) ; SEQ ID
NO:180 之 殘 基 50-66 (CDR-H2 VH.1A 38H12) ; SEQ ID
NO:180 之 殘 基 99-107 (CDR-H3 VH.1A 38H12) ; SEQ ID
NO:181 之 殘 基 31-35 (CDR-H1 VH.1b 38H12) ; SEQ ID
NO:181 之 殘 基 50-66 (CDR-H2 VH.1b 38H12) ; SEQ ID

NO:181之殘基 99-107 (CDR-H3 VH.1b 38H12) ; SEQ ID
NO:182之殘基 31-35 (CDR-H1 VH.2a 38H12) ; SEQ ID
NO:182之殘基 50-66 (CDR-H2 VH.2a 38H12) ; SEQ ID
NO:182之殘基 99-107 (CDR-H3 VH.2a 38H12) ; SEQ ID
NO:183之殘基 24-34 (CDR-L1 VL.1 38H12) ; SEQ ID
NO:183之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.1 38H12) ; SEQ ID
NO:183之殘基 89-97 (CDR-L3 VL.1 38H12) ; SEQ ID
NO:184之殘基 24-34 (CDR-L1 VL.1a 38H12) ; SEQ ID
NO:184之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.1a 38H12) ; SEQ ID
NO:184之殘基 89-97 (CDR-L3 VL.1a 38H12) ; SEQ ID
NO:185之殘基 24-34 (CDR-L1 VL.1b 38H12) ; SEQ ID
NO:185之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.1b 38H12) ; SEQ ID
NO:185之殘基 89-97 (CDR-L3 VL.1b 38H12) ; SEQ ID
NO:186之殘基 24-34 (CDR-L1 VL.2a 38H12) ; SEQ ID
NO:186之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.2a 38H12) ; SEQ ID
NO:186之殘基 89-97 (CDR-L3 VL.2a 38H12) ; SEQ ID
NO:187之殘基 31-35 (CDR-H1 h1A11VH.1) 、 SEQ ID
NO:187之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11VH.1) ; SEQ ID
NO:187之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11VH.1) ; SEQ ID
NO:188之殘基 31-35 (CDR-H1 h1A11.A6) 、 SEQ ID NO:188
之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.A6) ; SEQ ID NO:188之殘基
99-107 (CDR-H3 h1A11.A6) ; SEQ ID NO:189之殘基 31-35
(CDR-H1 h1A11.A8) 、 SEQ ID NO:189之殘基 50-66 (CDR-
H2 h1A11.A8) ; SEQ ID NO:189之殘基 99-107 (CDR-H3

h1A11.A8) ; SEQ ID NO:190 之 殘 基 31-35 (CDR-H1
h1A11.C6) 、 SEQ ID NO:190 之 殘 基 50-66 (CDR-H2
h1A11.C6) ; SEQ ID NO:190 之 殘 基 99-107 (CDR-H3
h1A11.C6) ; SEQ ID NO:191 之 殘 基 31-35 (CDR-H1
h1A11.A11) 、 SEQ ID NO:191 之 殘 基 50-66 (CDR-H2
h1A11.A11) ; SEQ ID NO:191 之 殘 基 99-107 (CDR-H3
h1A11.A11) ; SEQ ID NO:192 之 殘 基 31-35 (CDR-H1
h1A11.B5) 、 SEQ ID NO:192 之 殘 基 50-66 (CDR-H2
h1A11.B5) ; SEQ ID NO:192 之 殘 基 99-107 (CDR-H3
h1A11.B5) ; SEQ ID NO:193 之 殘 基 31-35 (CDR-H1
h1A11.E12) 、 SEQ ID NO:193 之 殘 基 50-66 (CDR-H2
h1A11.E12) ; SEQ ID NO:193 之 殘 基 99-107 (CDR-H3
h1A11.E12) ; SEQ ID NO:194 之 殘 基 31-35 (CDR-H1
h1A11.G3) 、 SEQ ID NO:194 之 殘 基 50-66 (CDR-H2
h1A11.G3) ; SEQ ID NO:194 之 殘 基 99-107 (CDR-H3
h1A11.G3) ; SEQ ID NO:195 之 殘 基 31-35 (CDR-H1
h1A11.F5) 、 SEQ ID NO:195 之 殘 基 50-66 (CDR-H2
h1A11.F5) ; SEQ ID NO:195 之 殘 基 99-107 (CDR-H3
h1A11.F5) ; SEQ ID NO:196 之 殘 基 31-35 (CDR-H1
h1A11.H2) 、 SEQ ID NO:196 之 殘 基 50-66 (CDR-H2
h1A11.H2) ; SEQ ID NO:196 之 殘 基 99-107 (CDR-H3
h1A11.H2) ; SEQ ID NO:197 之 殘 基 24-34 (CDR-L1
h1A11VL.1) 、 SEQ ID NO:197 之 殘 基 50-56 (CDR-L2
h1A11VL.1) ; SEQ ID NO:197 之 殘 基 89-97 (CDR-L3

h1A11VL.1) ; SEQ ID NO:198 之 殘 基 24-34 (CDR-L1
h1A11.A2) 、 SEQ ID NO:198 之 殘 基 50-56 (CDR-L2
h1A11.A2) ; SEQ ID NO:198 之 殘 基 89-97 (CDR-L3
h1A11.A2) ; SEQ ID NO:199 之 殘 基 24-34 (CDR-L1
h1A11.A12) 、 SEQ ID NO:199 之 殘 基 50-56 (CDR-L2
h1A11.A12) ; SEQ ID NO:199 之 殘 基 89-97 (CDR-L3
h1A11.A12) ; SEQ ID NO:200 之 殘 基 24-34 (CDR-L1
h1A11.A7) 、 SEQ ID NO:200 之 殘 基 50-56 (CDR-L2
h1A11.A7) ; SEQ ID NO:200 之 殘 基 89-97 (CDR-L3
h1A11.A7) ; SEQ ID NO:201 之 殘 基 24-34 (CDR-L1
h1A11.B4) 、 SEQ ID NO:201 之 殘 基 50-56 (CDR-L2
h1A11.B4) ; SEQ ID NO:201 之 殘 基 89-97 (CDR-L3
h1A11.B4) ; SEQ ID NO:202 之 殘 基 24-34 (CDR-L1
h1A11.B5) 、 SEQ ID NO:202 之 殘 基 50-56 (CDR-L2
h1A11.B5) ; SEQ ID NO:202 之 殘 基 89-97 (CDR-L3
h1A11.B5) ; SEQ ID NO:203 之 殘 基 24-34 (CDR-L1
h1A11.E12) 、 SEQ ID NO:203 之 殘 基 50-56 (CDR-L2
h1A11.E12) ; 及 SEQ ID NO:203 之 殘 基 89-97 (CDR-L3
h1A11.E12) 。

在一實施例中，本發明之DLL4結合蛋白包含至少3個本文所述(上文或下文)之CDR。在一非限制性實例中，本發明之DLL4結合蛋白包含3個本文所述之CDR，其中該3個CDR為如本文所述之CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3。在另一非限制性實例中，本發明之DLL4結合蛋白包含3個本文

所述之 CDR，其中該 3 個 CDR 為如本文所述之 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3。

在一實施例中，本發明之 DLL4 結合蛋白包含一或多個本文所述(上文或下文)之 CDR，諸如 1、2、3、4、5 或 6 個本文所述之 CDR。在一較佳實施例中，本發明之 DLL4 結合蛋白包含 6 個本文所述之 CDR，例如，如本文所述之 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3。

在另一實施例中，本發明之 DLL4 結合蛋白包含 3 個選自可變域 CDR 組的 3 個 CDR，其中該可變域 CDR 組係選自由以下組成之可變域 CDR 組之群：

VH 38H12 CDR 組

CDR-H1： SEQ ID NO:157 之殘基 31-35

CDR-H2： SEQ ID NO:157 之殘基 50-66

CDR-H3： SEQ ID NO:157 之殘基 99-107

VL 38H12 CDR 組

CDR-L1： SEQ ID NO:158 之殘基 24-34

CDR-L2： SEQ ID NO:158 之殘基 50-56

CDR-L3： SEQ ID NO:158 之殘基 89-97

VH 1A11 CDR 組

CDR-H1： SEQ ID NO:159 之殘基 31-35

CDR-H2： SEQ ID NO:159 之殘基 50-66

CDR-H3： SEQ ID NO:159 之殘基 99-107

VL 1A11 CDR 組

CDR-L1 : SEQ ID NO:160之殘基 24-34

CDR-L2 : SEQ ID NO:160之殘基 50-56

CDR-L3 : SEQ ID NO:160之殘基 89-97

VH 37D10 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:161之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:161之殘基 50-68

CDR-H3 : SEQ ID NO:161之殘基 101-111

VL 37D10 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:162之殘基 24-34

CDR-L2 : SEQ ID NO:162之殘基 50-56

CDR-L3 : SEQ ID NO:162之殘基 89-97

VH 32C7 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:163之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:163之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:163之殘基 99-105

VL 32C7 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:164之殘基 24-34

CDR-L2 : SEQ ID NO:164之殘基 50-56

CDR-L3 : SEQ ID NO:164之殘基 89-98

VH 14G1 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:165之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:165之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:165之殘基 99-105

VL 14G1 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:166之殘基 24-34

CDR-L2 : SEQ ID NO:166之殘基 50-56

CDR-L3 : SEQ ID NO:166之殘基 89-97

VH 14A11 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:167之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:167之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:167之殘基 99-110

VL 14A11 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:168之殘基 23-37

CDR-L2 : SEQ ID NO:168之殘基 53-59

CDR-L3 : SEQ ID NO:168之殘基 92-100

VH 15D6 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:169之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:169之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:169之殘基 99-110

VL 15D6 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:170之殘基 23-37

CDR-L2 : SEQ ID NO:170之殘基 53-59

CDR-L3 : SEQ ID NO:170之殘基 92-100

VH VH.1 1A11 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:171之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:171之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:171之殘基 99-107

VH VH.1a 1A11 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:172之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:172之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:172之殘基 99-107

VH VH.1b 1A11 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:173之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:173之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:173之殘基 99-107

VH VH.2a 1A11 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:174之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:174之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:174之殘基 99-107

VL VL.1 1A11 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:175之殘基 24-34

CDR-L2 : SEQ ID NO:175之殘基 50-56

CDR-L3 : SEQ ID NO:175之殘基 89-97

VL VL.1a 1A11 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:176之殘基 24-34

CDR-L2 : SEQ ID NO:176之殘基 50-56

CDR-L3 : SEQ ID NO:176之殘基 89-97

VL VL.1b 1A11 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:177之殘基 24-34

CDR-L2 : SEQ ID NO:177之殘基 50-56

CDR-L3 : SEQ ID NO:177之殘基 89-97

VL VL.2a 1A11 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:178之殘基 24-34

CDR-L2 : SEQ ID NO:178之殘基 50-56

CDR-L3 : SEQ ID NO:178之殘基 89-97

VH VH.1 38H12 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:179之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:179之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:179之殘基 99-107

VH VH.1a 38H12 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:180之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:180之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:180之殘基 99-107

VH VH.1b 38H12 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:181之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:181之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:181之殘基 99-107

VH VH.2a 38H12 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:182之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:182之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:182之殘基 99-107

VL VL.1 38H12 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:183之殘基 24-34

CDR-L2 : SEQ ID NO:183之殘基 50-56

CDR-L3 : SEQ ID NO:183之殘基 89-97

VL VL.1a 38H12 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:184之殘基 24-34

CDR-L2 : SEQ ID NO:184之殘基 50-56

CDR-L3 : SEQ ID NO:184之殘基 89-97

VL VL.1b 38H12 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:185之殘基 24-34

CDR-L2 : SEQ ID NO:185之殘基 50-56

CDR-L3 : SEQ ID NO:185之殘基 89-97

VL VL.2a 38H12 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:186之殘基 24-34

CDR-L2 : SEQ ID NO:186之殘基 50-56

CDR-L3 : SEQ ID NO:186之殘基 89-97

VH hA11VH.1 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:187之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:187之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:187之殘基 99-107

VH hA11.A6 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:188之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:188之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:188之殘基 99-107

VH hA11.A8 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:189之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:189之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:189之殘基 99-107

VH hA11.C6 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:190之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:190之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:190之殘基 99-107

VH hA11.A11 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:191之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:191之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:191之殘基 99-107

VH hA11.B5 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:192之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:192之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:192之殘基 99-107

VH hA11.E12 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:193之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:193之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:193之殘基 99-107

VH hA11.G3 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:194之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:194之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:194之殘基 99-107

VH hA11.F5 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:195之殘基 31-35

CDR-H2 : SEQ ID NO:195之殘基 50-66

CDR-H3 : SEQ ID NO:195之殘基 99-107

VH hA11.H2 CDR組

CDR-H1 : SEQ ID NO:196之殘基 31-35
 CDR-H2 : SEQ ID NO:196之殘基 50-66
 CDR-H3 : SEQ ID NO:196之殘基 99-107

VL h1A11VL.1 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:197之殘基 24-34
 CDR-L2 : SEQ ID NO:197之殘基 50-56
 CDR-L3 : SEQ ID NO:197之殘基 89-97

VL h1A11.A2 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:198之殘基 24-34
 CDR-L2 : SEQ ID NO:198之殘基 50-56
 CDR-L3 : SEQ ID NO:198之殘基 89-97

VL h1A11.A12 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:199之殘基 24-34
 CDR-L2 : SEQ ID NO:199之殘基 50-56
 CDR-L3 : SEQ ID NO:199之殘基 89-97

VL h1A11.A7 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:200之殘基 24-34
 CDR-L2 : SEQ ID NO:200之殘基 50-56
 CDR-L3 : SEQ ID NO:200之殘基 89-97

VL h1A11.B4 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:201之殘基 24-34
 CDR-L2 : SEQ ID NO:201之殘基 50-56
 CDR-L3 : SEQ ID NO:201之殘基 89-97

VL h1A11.B5 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:202之殘基 24-34

CDR-L2 : SEQ ID NO:202之殘基 50-56

CDR-L3 : SEQ ID NO:202之殘基 89-97

及

VL h1A11.E12 CDR組

CDR-L1 : SEQ ID NO:203之殘基 24-34

CDR-L2 : SEQ ID NO:203之殘基 50-56

CDR-L3 : SEQ ID NO:203之殘基 89-97

在一實施例中，DLL4結合蛋白包含來自上述群組中之至少兩組可變域CDR的CDR。

在另一實施例中，本發明之DLL4結合蛋白包含3個選自以上群中任何具有3個CDR之VH組的CDR及3個選自以上群中任何具有3個CDR之VL組的CDR。

在另一實施例中，本發明之DLL4結合蛋白包含來自由以下組成之群的一對VH組CDR及VL組CDR的如上文所述之具有3個CDR之VH組及如上文所述之具有3個CDR之VL組：

VH 38H12 CDR組及VL 38H12 CDR組；

VH 1A11 CDR組及VL 1A11 CDR組；

VH 37D10 CDR組及VL 37D10 CDR組；

VH 32C7 CDR組及VL 32C7 CDR組；

VH 14G1組及VL 14G1 CDR組；

VH 14A11 CDR組及VL 14A11 CDR組；

VH 15D6 CDR組及VL 15D6 CDR組；

VH VH.1 1A11 CDR組 及 VL VL.1 1A11 CDR組 ；
 VH VH.1 1A11 CDR組 及 VL VL.1a 1A11 CDR組 ；
 VH VH.1 1A11 CDR組 及 VL VL.1b 1A11 CDR組 ；
 VH VH.1 1A11 CDR組 及 VL VL.2a 1A11 CDR組 ；
 VH VH.1a 1A11 CDR組 及 VL VL.1 1A11 CDR組 ；
 VH VH.1a 1A11 CDR組 及 VL VL.1a 1A11 CDR組 ；
 VH VH.1a 1A11 CDR組 及 VL VL.1b 1A11 CDR組 ；
 VH VH.1a 1A11 CDR組 及 VL VL.2a 1A11 CDR組 ；
 VH VH.1b 1A11 CDR組 及 VL VL.1 1A11 CDR組 ；
 VH VH.1b 1A11 CDR組 及 VL VL.1a 1A11 CDR組 ；
 VH VH.1b 1A11 CDR組 及 VL VL.1b 1A11 CDR組 ；
 VH VH.1b 1A11 CDR組 及 VL VL.2a 1A11 CDR組 ；
 VH VH.2a 1A11 CDR組 及 VL VL.1 1A11 CDR組 ；
 VH VH.2a 1A11 CDR組 及 VL VL.1a 1A11 CDR組 ；
 VH VH.2a 1A11 CDR組 及 VL VL.1b 1A11 CDR組 ；
 VH VH.2a 1A11 CDR組 及 VL VL.2a 1A11 CDR組 ；
 VH VH.1 38H12 CDR組 及 VL VL.1 38H12 CDR組 ；
 VH VH.1 38H12 CDR組 及 VL VL.1a 38H12 CDR組 ；
 VH VH.1 38H12 CDR組 及 VL VL.1b 38H12 CDR組 ；
 VH VH.1 38H12 CDR組 及 VL VL.2a 38H12 CDR組 ；
 VH VH.1a 38H12 CDR組 及 VL VL.1 38H12 CDR組 ；
 VH VH.1a 38H12 CDR組 及 VL VL.1a 38H12 CDR組 ；
 VH VH.1a 38H12 CDR組 及 VL VL.1b 38H12 CDR組 ；
 VH VH.1a 38H12 CDR組 及 VL VL.2a 38H12 CDR組 ；

VH VH.1b 38H12 CDR組及 VL VL.1 38H12 CDR組；
 VH VH.1b 38H12 CDR組及 VL VL.1a 38H12 CDR組；
 VH VH.1b 38H12 CDR組及 VL VL.1b 38H12 CDR組；
 VH VH.1b 38H12 CDR組及 VL VL.2a 38H12 CDR組；
 VH VH.2a 38H12 CDR組及 VL VL.1 38H12 CDR組；
 VH VH.2a 38H12 CDR組及 VL VL.1a 38H12 CDR組；
 VH VH.2a 38H12 CDR組及 VL VL.1b 38H12 CDR組；
 VH VH.2a 38H12 CDR組及 VL VL.2a 38H12 CDR組；
 VH h1A11.A6 CDR組及 VL h1A11VL.1 CDR組；
 VH h1A11.C6 CDR組及 VL h1A11VL.1 CDR組；
 VH h1A11.A11 CDR組及 VL h1A11VL.1 CDR組；
 VH h1A11.A8 CDR組及 VL h1A11VL.1 CDR組；
 VH h1A11VH.1 CDR組及 VL h1A11.B4 CDR組；
 VH h1A11VH.1 CDR組及 VL h1A11.A7 CDR組；
 VH h1A11VH.1 CDR組及 VL h1A11.A12 CDR組；
 VH h1A11VH.1 CDR組及 VL h1A11.A2 CDR組；
 VH h1A11.B5 CDR組及 VL h1A11.B5 CDR組；
 VH h1A11.E12 CDR組及 VL h1A11.E12 CDR組；
 VH h1A11.G3 CDR組及 VL h1A11.E12 CDR組；
 VH h1A11.F5 CDR組及 VL h1A11.E12 CDR組；及
 VH h1A11.H2 CDR組及 VL h1A11.E12 CDR組。

在一較佳實施例中，DLL4結合蛋白具有包含6個CDR之DLL4抗原結合域(或結合位點)，其中CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3位於重鏈可變區(VH)中，且CDR-L1、CDR-L2及

CDR-L3位於輕鏈可變區(VL)中，且其中VH區與VL區締合形成DLL4結合蛋白之功能DLL4抗原結合域。在此實施例之另一非限制性實例中，具有兩個DLL4抗原結合域之DLL4結合蛋白包含兩組VH及VL區，且因此包含12個CDR。

在另一實施例中，DLL4結合蛋白具有包含6個CDR之DLL4抗原結合域，其中CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3位於重鏈可變區(VH)中且CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3位於輕鏈可變區(VL)中，且其中各可變區中之其餘序列構成架構(FR)區，使得各CDR位於兩個FR區序列之間，總共4個FR序列，亦即FR1、FR2、FR3及FR4。在此實施例中，FR及CDR序列在可變區中之排列為FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。在此實施例中，由VH區與VL區締合形成之結合域包含8個FR序列及6個CDR。

本發明之DLL4結合蛋白包括CDR移植抗體，其中使用此項技術中可利用之重組技術將一個物種(供體物種)抗體之VH區及/或VL區之一或多個CDR移植至另一(受體)物種抗體之VH及/或VL之相應CDR中並置換該等相應CDR。供體物種之一個實例為本文所述之大鼠抗人類DLL4單株抗體，且受體物種之一個實例為人類免疫球蛋白 γ (IgG)分子，其中人類IgG分子之VH區及VL區之人類FR序列為接受來自供體大鼠單株抗體之植入CDR的人類受體架構序列。所得CDR移植抗體之人類受體架構序列可進一步突變以改良CDR移植抗體之一或多種性質。舉非限制性實例而

言，CDR移植抗體之一或多個FR序列之一或多個殘基可突變以改良CDR移植抗體在人類個體中之DLL4結合親和力或降低其免疫原性。

在本發明之一實施例中，包含一或多個上述CDR之DLL4結合蛋白進一步包含人類受體架構序列。DLL4結合蛋白較佳包含一或多個(例如1、2、3、4、5、6、7或8個)人類受體架構序列。

本發明之DLL4結合蛋白中所存在之人類受體架構序列可包含一或多個如下胺基酸殘基，該等胺基酸殘基已反突變成結合DLL4之大鼠單株抗體中所存在之一或多個相應胺基酸殘基及/或已突變成一或多個減少或消除不需要之反應位點，例如減少或消除不需要之糖基化位點及/或不需要之N末端焦麩胺酸形成位點及/或免疫原性風險可能降低之位點的胺基酸殘基。

在一實施例中，包含一或多個上述CDR之DLL4結合蛋白進一步包含一或多個(例如任何1、2、3、4、5、6、7或8個)選自下表3及表4中之人類受體架構序列群的人類受體架構序列。本發明之DLL4結合蛋白中所存在之來自表3及表4之一或多個人類受體架構序列可進一步包含一或多個如下胺基酸殘基，該等胺基酸殘基已反突變成結合DLL4之大鼠單株抗體中所存在之一或多個相應胺基酸殘基及/或已突變成一或多個減少或消除不需要之反應位點，例如減少或消除不需要之糖基化位點及/或不需要之N末端焦麩胺酸形成位點及/或免疫原性風險可能降低之位點的胺基

酸殘基。

在另一實施例中，本發明提供一種包含一或多個上述 CDR之 DLL4 結合蛋白，其中該結合蛋白亦包含一或多個 (例如每結合域包含任意 1、2、3、4、5、6、7 或 8 個) 選自可選自由以下組成之群的可變區序列中所存在之任何架構序列的人類受體架構序列：

SEQ ID NO:171 VH.1 1A11	SEQ ID NO:180 VH.1a 38H12	SEQ ID NO:188 VH h1A11.A6	SEQ ID NO:196 VH h1A11.H2
SEQ ID NO:172 VH.1a 1A11	SEQ ID NO:181 VH.1b 38H12	SEQ ID NO:189 VH h1A11.A8	SEQ ID NO:197 VL h1A11.VL.1
SEQ ID NO:173 VH.1b 1A11	SEQ ID NO:182 VH.2a 38H12	SEQ ID NO:190 VH h1A11.C6	SEQ ID NO:198 VL h1A11.A2
SEQ ID NO:174 VH.2a 1A11	SEQ ID NO:183 VL.1 38H12	SEQ ID NO:191 VH h1A11.A11	SEQ ID NO:199 VL h1A11.A12
SEQ ID NO:175 VL.1 1A11	SEQ ID NO:184 VL.1a	SEQ ID NO:192 VH h1A11.B5	SEQ ID NO:200 VL h1A11.A7
SEQ ID NO:176 VL.1a 1A11	SEQ ID NO:185 VL.1b	SEQ ID NO:193 VH h1A11.E12	SEQ ID NO:201 VL h1A11.B4
SEQ ID NO:177 VL.1b 1A11	SEQ ID NO:186 VL.2a	SEQ ID NO:194 VH h1A11.G3	SEQ ID NO:202 VL h1A11.B5
SEQ ID NO:178 VL.2a 1A11	SEQ ID NO:187 VH h1A11.VH.1	SEQ ID NO:195 VH h1A11.F5	SEQ ID NO:203 VL h1A11.E12
SEQ ID NO:179 VH.1 38H12			

在本發明之又一實施例中，DLL4 結合蛋白進一步包含一或多個 (例如任意 1、2、3、4、5、6、7 或 8 個) 選自由以下組成之群的受體架構序列：

重鏈架構-1 (H-FR1)：

E-V-Q-L-V-E-S-G-G-G-L-V-Q-P-G-G-S-L-R-L-S-C-A-A-S-G-F-T-F-X₃₀ (SEQ ID NO:143)，其中 X₃₀ 為 S、R 或 G；

重鏈架構-2 (H-FR2) : W-V-R-Q-A-P-G-K-G-L-E-W-V-A
(SEQ ID NO:144) ;

重鏈架構-3 (H-FR3) :

R-F-T-I-S-R-D-N-A-K-X₁₁-S-L-Y-L-Q-M-N-S-L-R-A-E-
D-T-A-V-Y-Y-C-X₃₁-R (SEQ ID NO:145), 其中 :

X₁₁ 為 N 或 S ; 且

X₃₁ 為 A 或 S ;

重鏈架構-4 (H-FR4) : W-G-Q-G-T-L-V-T-V-S-S (SEQ ID
NO:146) ;

輕鏈架構-1 (L-FR1):

D-I-Q-M-T-Q-S-P-S-S-L-S-A-S-V-G-D-R-V-T-I-T-C (SEQ
ID NO:147) ;

輕鏈架構-2 (L-FR2) : W-Y-Q-Q-K-P-G-K-X₉-P-K-L-L-I-
X₁₅ (SEQ ID NO:148), 其中 :

X₉ 為 A 或 S ; 且

X₁₅ 為 F 或 Y ;

輕鏈架構-3 (L-FR3) :

G-V-P-S-R-F-S-G-S-G-S-G-T-D-X₁₅-T-L-T-I-S-S-L-Q-P-
E-D-F-A-T-Y-Y-C (SEQ ID NO:149), 其中 :

X₁₅ 為 F 或 S ; 及

輕鏈架構-4 (L-FR4) : F-G-Q-G-T-K-L-E-I-K (SEQ ID
NO:150)。

在另一實施例中, 包含一或多個上述 CDR 之 DLL4 結合
蛋白亦包含上述人類受體架構序列, 其中該人類受體架構

序列在關鍵殘基處包含至少一個架構區胺基酸取代，其中該關鍵殘基係選自由以下組成之群：與CDR相鄰之殘基、糖基化位點殘基、稀有殘基、能夠與人類DLL4相互作用之殘基、能夠與CDR相互作用之殘基、典型殘基、重鏈可變區與輕鏈可變區之間的接觸殘基、Vernier區內之殘基、及Chothia定義之可變重鏈CDR1與Kabat定義之第一重鏈架構之間重疊之區域中的殘基。

在另一實施例中，本文所述之DLL4結合蛋白之人類受體架構序列包含至少一個架構區胺基酸取代，其中該架構之胺基酸序列與人類生殖系受體架構序列具有至少65%一致性且包含至少70個與人類生殖系受體架構一致之胺基酸殘基。在另一實施例中，本發明之DLL4結合蛋白包含共同人類可變域序列。

在一實施例中，本發明提供一種包含人類受體架構序列之DLL4結合蛋白，其中該結合蛋白包含至少一個具有選自由以下組成之群的胺基酸序列的可變域：

SEQ ID NO:171 VH VH.1 1A11	SEQ ID NO:188 VH h1A11.A6
SEQ ID NO:172 VH VH.1a 1A11	SEQ ID NO:189 VH h1A11.A8
SEQ ID NO:173 VH VH.1b 1A11	SEQ ID NO:190 VH h1A11.C6
SEQ ID NO:174 VH VH.2a 1A11	SEQ ID NO:191 VH h1A11.A11
SEQ ID NO:175 VL VL.1 1A11	SEQ ID NO:192 VH h1A11.B5
SEQ ID NO:176 VL VL.1a 1A11	SEQ ID NO:193 VH h1A11.E12

SEQ ID NO:177 VL VL.1b	SEQ ID NO:194 VH h1A11.G3
SEQ ID NO:178 VL VL.2a 1A11	SEQ ID NO:195 VH h1A11.F5
SEQ ID NO:179 VH VH.1 38H12	SEQ ID NO:196 VH h1A11.H2
SEQ ID NO:180 VH VH.1a 38H12	SEQ ID NO:197 VL h1A11VL.1
SEQ ID NO:181 VH VH.1b 38H12	SEQ ID NO:198 VL h1A11.A2
SEQ ID NO:182 VH VH.2a 38H12	SEQ ID NO:199 VL h1A11.A12
SEQ ID NO:183 VL VL.1 38H12	SEQ ID NO:200 VL h1A11.A7
SEQ ID NO:184 VL VL.1a 38H12	SEQ ID NO:201 VL h1A11.B4
SEQ ID NO:185 VL VL.1b 38H12	SEQ ID NO:202 VL h1A11.B5
SEQ ID NO:186 VL VL.2a 38H12	SEQ ID NO:203 VL h1A11.E12
SEQ ID NO:187 VH h1A11VH.1	

在另一實施例中，本發明之DLL4結合蛋白包含兩個或兩個以上上述可變域。在一較佳實施例中，本發明之DLL4結合蛋白包含兩個可變域，其中該兩個可變域具有選自由以下組成之群的胺基酸序列：

SEQ ID NO:171及SEQ ID NO:175 VH.1及VL.1 1A11(表12)	SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:186 VH.1a及VL.2a(表16)
SEQ ID NO:171及SEQ ID NO:176 VH.1及VL.1a 1A11(表12)	SEQ ID NO:181及SEQ ID NO:183 VH.1b及VL.1(表16)
SEQ ID NO:171及SEQ ID NO:177 VH.1及VL.1b 1A11(表12)	SEQ ID NO:181及SEQ ID NO:184 VH.1b及VL.1a(表16)
SEQ ID NO:171及SEQ ID NO:178 VH.1及VL.2a 1A11(表12)	SEQ ID NO:181及SEQ ID NO:185 VH.1b及VL.1b(表16)
SEQ ID NO:172及SEQ ID NO:175 VH.1a及VL.1 1A11(表12)	SEQ ID NO:181及SEQ ID NO:186 VH.1b及VL.2a(表16)

SEQ ID NO:172及SEQ ID NO:176 VH.1a及VL.1a 1A11(表12)	SEQ ID NO:182及SEQ ID NO:183 VH.2a及VL.1(表16)
SEQ ID NO:172及SEQ ID NO:177 VH.1a及VL.1b 1A11(表12)	SEQ ID NO:182及SEQ ID NO:184 VH.2a及VL.1a(表16)
SEQ ID NO:172及SEQ ID NO:178 VH.1a及VL.2a 1A11(表12)	SEQ ID NO:182及SEQ ID NO:185 VH.2a及VL.1b(表16)
SEQ ID NO:173及SEQ ID NO:175 VH.1b及VL.1 1A11(表12)	SEQ ID NO:182及SEQ ID NO:186 VH.2a及VL.2a(表16)
SEQ ID NO:173及SEQ ID NO:176 VH.1b及VL.1a 1A11(表12)	SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:197 h1A11.A6 VH及h1A11VL.1 表20/21
SEQ ID NO:173及SEQ ID NO:177 VH.1b及VL.1b 1A11(表12)	SEQ ID NO:190及SEQ ID NO:197 h1A11.C6 VH及h1A11VL.1 表20/21
SEQ ID NO:173及SEQ ID NO:178 VH.1b及VL.2a 1A11(表12)	SEQ ID NO:191及SEQ ID NO:197 h1A11.All VH及h1A11VL.1 表20/21
SEQ ID NO:174及SEQ ID NO:175 VH.2a及VL.1 1A11(表12)	SEQ ID NO:189及SEQ ID NO:197 h1A11.A8 VH及h1A11 VL.1 表20/21
SEQ ID NO:174及SEQ ID NO:176 VH.2a及VL.1a 1A11(表12)	SEQ ID NO:1878及SEQ ID NO:201 h1A11VH.1及h1A11.B4 VL 表20/21
SEQ ID NO:174及SEQ ID NO:177 VH.2a及VL.1b 1A11(表12)	SEQ ID NO:187及SEQ ID NO:200 h1A11VH.1及h1All.A7 VL 表20/21
SEQ ID NO:174及SEQ ID NO:178 VH.2a及VL.2a 1A11(表12)	SEQ ID NO:187及SEQ ID NO:199 h1A11VH.1及h1All.A12 VL 表20/21
SEQ ID NO:179及SEQ ID NO:183 VH.1及VL.1 38H12(表16)	SEQ ID NO:187及SEQ ID NO:198 h1A11VH.1 VH及h1All.A2 VL 表20/21
SEQ ID NO:179及SEQ ID NO:184 VH.1及VL.1a 38H12(表16)	SEQ ID NO:192及SEQ ID NO:202 h1A11.B5 VH及h1All.B5 VL 表20/21
SEQ ID NO:179及SEQ ID NO:185 VH.1及VL.1b 38H12(表16)	SEQ ID NO:193及SEQ ID NO:203 h1A11.E12 VH及h1All.E12 VL 表20/21

SEQ ID NO:179及SEQ ID NO:186 VH.1及VL.2a 38H12(表16)	SEQ ID NO:194及SEQ ID NO:203 h1A11.G3 VH及h1A11.E12 VL 表20/21
SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:183 VH.1a及VL.1 38H12(表16)	SEQ ID NO:195及SEQ ID NO:203 h1A11.F5 VH及h1A11.E12 VL 表20/21
SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:184 VH.1a及VL.1a 38H12(表16)	SEQ ID NO:196及SEQ ID NO:203 h1A11.H2 VH及h1A11.E12 VL 表20/21
SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:185 VH.1a及VL.1b 38H12(表16)	

在一實施例中，本發明之DLL4結合蛋白包含至少一個具有選自由以下組成之群的胺基酸序列的可變域：

SEQ ID NO:157 VH 38H12	SEQ ID NO:181 VH VH.1b 38H12
SEQ ID NO:158 VL 38H12	SEQ ID NO:182 VH VH.2a 38H12
SEQ ID NO:159 VH 1A11	SEQ ID NO:182 VL VL.1 38H12
SEQ ID NO:160 VL 1A11	SEQ ID NO:184 VL VL.1a 38H12
SEQ ID NO:161 VH 37D10	SEQ ID NO:185 VL VL.1b 38H12
SEQ ID NO:162 VL 37D10	SEQ ID NO:186 VL VL.2a 38H12
SEQ ID NO:163 VH 32C7	SEQ ID NO:187 VH h1A11.VH.1
SEQ ID NO:164 VL 32C7	SEQ ID NO:188 VH h1A11.A6
SEQ ID NO:165 VH 14G1	SEQ ID NO:189 VH h1A11.A8
SEQ ID NO:166 VL 14G1	SEQ ID NO:190 VH h1A11.C6
SEQ ID NO:167 VH 14A11	SEQ ID NO:191 VH h1A11.A11
SEQ ID NO:168 VL 14A11	SEQ ID NO:192 VH h1A11.B5

SEQ ID NO:169 VH 15D6	SEQ ID NO:193 VH h1A11.E12
SEQ ID NO:170 VL 15D6	SEQ ID NO:194 VH h1A11.G3
SEQ ID NO:171 VH VH.1 1A11	SEQ ID NO:195 VH h1A11.F5
SEQ ID NO:172 VH VH.1a 1A11	SEQ ID NO:196 VH h1A11.H2
SEQ ID NO:173 VH VH.1b 1A11	SEQ ID NO:197 VL h1A11.VL.1
SEQ ID NO:174 VH VH.2a 1A11	SEQ ID NO:198 VL h1A11.A2
SEQ ID NO:175 VL VL.1 1A11	SEQ ID NO:199 VL h1A11.A12
SEQ ID NO:176 VL VL.1a 1A11	SEQ ID NO:200 VL h1A11.A7
SEQ ID NO:177 VL VL.1b	SEQ ID NO:201 VL h1A11.B4
SEQ ID NO:178 VL VL.2a 1A11	SEQ ID NO:202 VL h1A11.B5
SEQ ID NO:179 VH VH.1 38H12	SEQ ID NO:203 VL h1A11.E12
SEQ ID NO:180 VH VH.1a 38H12	

在另一實施例中，本發明之DLL4結合蛋白包含兩個可變域，其中該兩個可變域具有選自由以下組成之群的胺基酸序列：

SEQ ID NO:157及SEQ ID NO:158 38H12	SEQ ID NO:179及SEQ ID NO:186 VH.1及VL.2a 38H12(表16)
SEQ ID NO:159及SEQ ID NO:160 1A11	SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:183 VH.1a及VL.1 38H12(表16)
SEQ ID NO:161及SEQ ID NO:162 37D10	SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:184 VH.1a及VL.1a 38H12(表16)
SEQ ID NO:163及SEQ ID NO:164 32C7	SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:185 VH.1a及VL.1b 38H12(表16)

SEQ ID NO:165及SEQ ID NO:166 14G1	SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:186 VH.1a及VL.2a(表16)
SEQ ID NO:167及SEQ ID NO:168 14A11	SEQ ID NO:181及SEQ ID NO:183 VH.1b及VL.1(表16)
SEQ ID NO:169及SEQ ID NO:170 15D6	SEQ ID NO:181及SEQ ID NO:184 VH.1b及VL.1a(表16)
SEQ ID NO:171及SEQ ID NO:175 VH.1及VL.1 1A11(表11)	SEQ ID NO:181及SEQ ID NO:185 VH.1b及VL.1b(表16)
SEQ ID NO:171及SEQ ID NO:176 VH.1及VL.1a 1A11(表11)	SEQ ID NO:181及SEQ ID NO:186 VH.1b及VL.2a(表16)
SEQ ID NO:171及SEQ ID NO:177 VH.1及VL.1b 1A11(表11)	SEQ ID NO:182及SEQ ID NO:183 VH.2a及VL.1(表16)
SEQ ID NO:171及SEQ ID NO:178 VH.1及VL.2a(表11)	SEQ ID NO:182及SEQ ID NO:184 VH.2a及VL.1a(表16)
SEQ ID NO:172及SEQ ID NO:175 VH.1a及VL.1(表11)	SEQ ID NO:182及SEQ ID NO:185 VH.2a及VL.1b(表16)
SEQ ID NO:172及SEQ ID NO:176 VH.1a及VL.1a(表11)	SEQ ID NO:182及SEQ ID NO:186 VH.2a及VL.2a(表16)
SEQ ID NO:172及SEQ ID NO:177 VH.1a及VL.1b(表11)	SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:197 h1A11.A6 VH及h1A11VL.1 表20/21
SEQ ID NO:172及SEQ ID NO:178 VH.1a及VL.2a(表11)	SEQ ID NO:190及SEQ ID NO:197 h1A11.C6 VH及h1A11VL.1 表20/21
SEQ ID NO:173及SEQ ID NO:175 VH.1b及VL.1(表11)	SEQ ID NO:191及SEQ ID NO:197 h1A11.All VH及h1A11VL.1 表20/21
SEQ ID NO:173及SEQ ID NO:176 VH.1b及VL.1a(表11)	SEQ ID NO:189及SEQ ID NO:197 h1A11.A8 VH及h1A11 VL.1 表20/21
SEQ ID NO:173及SEQ ID NO:177 VH.1b及VL.1b(表11)	SEQ ID NO:187及SEQ ID NO:201 h1A11VH.1及h1A11.B4 VL 表20/21
SEQ ID NO:173及SEQ ID NO:178 VH.1b及VL.2a(表11)	SEQ ID NO:187及SEQ ID NO:200 h1A11VH.1及h1A11.A7 VL 表20/21
SEQ ID NO:174及SEQ ID NO:175 VH.2a及VL.1(表11)	SEQ ID NO:187及SEQ ID NO:199 h1A11VH.1及h1A11.A12 VL 表20/21

SEQ ID NO:174及SEQ ID NO:176 VH.2a及VL.1a(表11)	SEQ ID NO:187及SEQ ID NO:198 h1A11VH.1 VH及h1A11.A2 VL 表20/21
SEQ ID NO:174及SEQ ID NO:177 VH.2a及VL.1b(表11)	SEQ ID NO:192及SEQ ID NO:202 h1A11.B5 VH及h1A11.B5 VL 表20/21
SEQ ID NO:174及SEQ ID NO:178 VH.2a及VL.2a(表11)	SEQ ID NO:193及SEQ ID NO:203 h1A11.E12 VH及h1A11.E12 VL 表20/21
SEQ ID NO:179及SEQ ID NO:183 VH.1及VL.1 38H12 (表16)	SEQ ID NO:194及SEQ ID NO:203 h1A11.G3 VH及h1A11.E12 VL 表20/21
SEQ ID NO:179及SEQ ID NO:184 VH.1及VL.1a 38H12 (表16)	SEQ ID NO:195及SEQ ID NO:203 h1A11.F5 VH及h1A11.E12 VL 表20/21
SEQ ID NO:179及SEQ ID NO:185 VH.1及VL.1b 38H12 (表16)	SEQ ID NO:196及SEQ ID NO:203 h1A11.H2 VH及h1A11.E12 VL 表20/21

在一實施例中，本發明之DLL4結合蛋白包含具有選自由以下組成之群的胺基酸序列的兩個可變域：

SEQ ID NO:188 (h1A11.A6 VH) 及 SEQ ID NO:197 (h1A11VL.1)；

SEQ ID NO:190 (h1A11.C6 VH) 及 SEQ ID NO:197 (h1A11VL.1)；及

SEQ ID NO:191 (h1A11.A11 VH) 及 SEQ ID NO:197 (h1A11.VL.1)。

在一實施例中，本發明之DLL4結合蛋白包含具有胺基酸序列SEQ ID NO:181 (VH.1b **38H12**)及SEQ ID NO:185 (VL.1b **38H12**)的兩個可變域。

根據本發明，本文所述之任何DLL4結合蛋白之可變重鏈(VH)域及可變輕鏈(VL)域亦可使用此項技術中可利用之

重組技術進行改組以產生並選擇包含本文所述之VH及VL域之不同組合的其他DLL4結合蛋白。

在一實施例中，本發明之DLL4結合蛋白結合人類DLL4 (hu DLL4)及至少一個其他物種之DLL4。本文所述之DLL4結合蛋白更佳結合人類DLL4及選自由以下組成之群的DLL4：獼猴DLL4 (cyno DLL4)、小鼠DLL4 (mu DLL4)、大鼠DLL4及其組合。

在另一實施例中，本文所述之DLL4結合蛋白能夠阻斷DLL4與Notch蛋白之相互作用。Notch蛋白較佳係選自由Notch-1、Notch-2、Notch-3、Notch-4及其組合組成之群。

在一實施例中，本文所述之DLL4結合蛋白能夠調節、抑制或中和人類DLL4之一或多種生物功能。本發明之DLL4結合蛋白更佳能夠調節、抑制或中和選自由人類DLL4、獼猴DLL4、猴DLL4、大鼠DLL4及其組合組成之群的DLL4之活性。

在另一實施例中，本文所述之DLL4結合蛋白能夠抑制VEGFR2活性、VEGFR1活性或VEGFR2及VEGFR1活性二者。

在一實施例中，本文所述之DLL4結合蛋白能夠抑制正常血管生成。

在一實施例中，本發明之DLL4結合蛋白對DLL4之締合速率常數(K_{on})為至少約 $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ；至少約 $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ；至少約 $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ；至少約 $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ；或至少約 $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，如藉

由表面電漿子共振所量測。本發明之結合蛋白質對DLL4之締合速率常數(K_{on})較佳為 $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 至 $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ； $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 至 $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ； $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 至 $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ；或 $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 至 $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，如藉由表面電漿子共振所量測。

在另一實施例中，本發明之DLL4結合蛋白對DLL4之解離速率常數(K_{off})為至多約 10^{-3} s^{-1} ；至多約 10^{-4} s^{-1} ；至多約 10^{-5} s^{-1} ；或至多約 10^{-6} s^{-1} ，如藉由表面電漿子共振所量測。本發明之結合蛋白質對DLL4之解離速率常數(K_{off})較佳為 10^{-3} s^{-1} 至 10^{-4} s^{-1} ； 10^{-4} s^{-1} 至 10^{-5} s^{-1} ；或 10^{-5} s^{-1} 至 10^{-6} s^{-1} ，如藉由表面電漿子共振所量測。

在另一實施例中，本發明之DLL4結合蛋白對DLL4之解離常數(K_D)為至多約 10^{-7} M ；至多約 10^{-8} M ；至多約 10^{-9} M ；至多約 10^{-10} M ；至多約 10^{-11} M ；至多約 10^{-12} M ；或至多約 10^{-13} M 。本發明之結合蛋白質對DLL4之解離常數(K_D)較佳為 10^{-7} M 至 10^{-8} M ； 10^{-8} M 至 10^{-9} M ； 10^{-9} M 至 10^{-10} M ； 10^{-10} 至 10^{-11} M ； 10^{-11} M 至 10^{-12} M ；或 10^{-12} M 至 10^{-13} M 。

在一實施例中，本發明提供一種抗體構築體，其包含上述DLL4結合蛋白及連接子多肽或免疫球蛋白恆定域。在一較佳實施例中，本發明之抗體構築體係選自由以下組成之群：免疫球蛋白分子、單株抗體、嵌合抗體、CDR移植抗體、人類化抗體、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、二硫鍵連接之Fv、scFv、單域抗體、雙功能抗體、多特異性抗體、雙重特異性抗體及雙特異性抗體。

在一較佳實施例中，本發明之抗體構築體包含選自由人類IgM恆定域、人類IgG1恆定域、人類IgG2恆定域、人類IgG3恆定域、人類IgG4恆定域、人類IgE恆定域及人類IgA恆定域組成之群的重鏈免疫球蛋白恆定域。

在另一實施例中，本發明之抗體構築體包含選自由以下組成之群的免疫球蛋白恆定區：免疫球蛋白 γ -1(IgG-1)重鏈恆定區(諸如SEQ ID NO:3)、突變IgG-1重鏈恆定區(諸如SEQ ID NO:4)、免疫球蛋白 κ 輕鏈恆定區(諸如SEQ ID NO:5)、免疫球蛋白 λ 輕鏈恆定區(諸如SEQ ID NO:6)及其組合。

在另一實施例中，抗體構築體經糖基化。糖基化較佳為人類糖基化模式。

在一實施例中，本發明提供一種包含本文所述之抗體構築體結合至藥劑的抗體結合物。該藥劑較佳係選自由以下組成之群：顯影劑、治療劑、細胞毒性劑及免疫黏附分子。在一較佳實施例中，顯影劑係選自由放射性標記、酶、螢光標記、發光標記、生物發光標記、磁性標記及生物素組成之群。顯影劑更佳為選自由以下組成之群的放射性標記： ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 及 ^{153}Sm 。在一較佳實施例中，治療劑或細胞毒性劑係選自由以下組成之群：抗代謝物、烷化劑、抗生素、生長因子、細胞激素、抗血管生成劑、抗有絲分裂劑、蒽環黴素(anthracycline)、毒素及細胞凋亡劑。

在另一實施例中，上述DLL4結合蛋白、抗體構築體或

抗體結合物係以晶體形式存在。晶體較佳為無載體控制釋放醫藥晶體。在另一實施例中，該結晶結合蛋白、結晶抗體構築體或結晶抗體結合物之活體內半衰期比其可溶性對應物更長。在一較佳實施例中，結晶結合蛋白、結晶抗體構築體或結晶抗體結合物在結晶後保留可溶性或非晶體形式之結合蛋白、抗體構築體或抗體結合物的生物活性。

在一實施例中，本發明提供一種編碼本文所述之DLL4結合蛋白(包括任何抗體構築體或抗體結合物)之一或多個胺基酸序列的經分離核酸。

在一較佳實施例中，本發明提供一種編碼選自由以下組成之群的多肽之經分離核酸：包含重鏈可變域之多肽，其中該重鏈可變域包含如上文所述之CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3中之一或多者；包含輕鏈可變域之多肽，其中該輕鏈可變域包含如上文所述之CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3中之一或多者；及兩種多肽之組合。

本發明之一個態樣係關於一種編碼DLL4結合蛋白質、抗體構築體、DLL4結合抗體結合物或其DLL4結合部分之經分離核酸。編碼選自由以下組成之群之多肽的經分離核酸尤佳：包含重鏈可變域之多肽，其中該重鏈可變域包含上述CDR-H1、CDR-H2或CDR-H3；包含輕鏈可變域之多肽，其中該輕鏈可變域包含如上所述之CDR-L1、CDR-L2或CDR-L3；或兩種多肽之組合。

另一實施例提供包含上述經分離核酸的載體。在一較佳實施例中，載體係選自由以下組成之群：pcDNA、pTT

(Durocher 等人, *Nucl. Acids Res.*, 30(2e9): 1-9 (2002))、pTT3(具有其他多選殖位點之 pTT)、pEFBOS(Mizushima 等人, *Nucl. Acids. Res.*, 18 (17): 5322 (1990))、pBV、pJV 及 pBJ。

在本發明之另一態樣中，提供一種用上述載體轉型的宿主細胞。該宿主細胞可為原核生物或真核生物細胞。較佳原核生物宿主細胞為大腸桿菌(*Escherichia coli*)。真核生物細胞較佳係選自由以下組成之群：原生生物細胞、動物細胞、植物細胞及真菌細胞。宿主細胞更佳為哺乳動物細胞，包括但不限於 CHO 及 COS 細胞。較佳真菌細胞為釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。較佳昆蟲細胞為 Sf9 細胞。

在本發明之另一態樣中，提供一種產生結合人類 DLL4 之結合蛋白的方法，該方法包括於培養基中，在足以產生結合人類 DLL4 之結合蛋白的條件下培養任一種上述宿主細胞的步驟。

一個實施例提供一種釋放本發明之 DLL4 結合蛋白的組合物，其中該組合物包含一種調配物，該調配物包含如上文所述之結晶 DLL4 結合蛋白、結晶抗體構築體或結晶抗體結合物及一種成分且另外包含至少一種聚合載劑。該聚合載劑較佳為選自由以下組成之群中之一或多者的聚合物：聚(丙烯酸)、聚(氰基丙烯酸酯)、聚(胺基酸)、聚(酸酐)、聚(縮肽)、聚(酯)、聚(乳酸)、聚(乳酸-共-乙醇酸)或 PLGA、聚(b-羥基丁酸酯)、聚(己內酯)、聚(二氧雜環己

酮)；聚(乙二醇)、聚((羥丙基)甲基丙烯鹽胺)、聚[(有機)磷氮烯]、聚(原酸酯)、聚(乙烯醇)、聚(乙烯基吡咯啉酮)、順丁烯二酸酐-烷基乙烯基醚共聚物、普洛尼克多元醇(pluronic polyols)、白蛋白、海藻酸鹽、纖維素及纖維素衍生物、膠原蛋白、血纖維蛋白、明膠、玻尿酸、寡糖、葡糖胺聚糖、硫酸化多糖、其摻合物及共聚物。該成分較佳係選自由白蛋白、蔗糖、海藻糖、乳糖醇、明膠、羥丙基- β -環糊精、甲氧基聚乙二醇及聚乙二醇組成之群。

另一實施例提供一種治療哺乳動物之方法，該方法包括對該哺乳動物投與有效量之包含上述結晶DLL4結合蛋白、結晶抗體構築體或結晶抗體結合物之組合物的步驟。

本發明亦提供一種醫藥組合物，其包含如上文所述之DLL4結合蛋白(包括如上文所述之抗體構築體或抗體結合物)及醫藥學上可接受之載劑。在另一實施例中，該醫藥組合物包含至少一種其他藥劑。該其他藥劑可為治療因DLL4而受害之病症的治療劑。本發明之醫藥組合物較佳包含選自由以下組成之群的其他藥劑：治療劑；顯影劑；抗腫瘤劑；化學治療劑；血管生成抑制劑；抗VEGF抗體；抗EGFR抗體；抗cMet抗體；抗ErbB3抗體；抗HER2抗體；抗CD20抗體；VEGF捕獲分子；激酶抑制劑；共刺激分子阻斷劑；抗B7.2抗體；CTLA4-Ig；黏著分子阻斷劑；抗E選擇蛋白抗體；抗L選擇蛋白抗體；抗細胞激素抗體或其功能片段；抗IL-18抗體；抗TNF抗體；抗IL-6抗體；甲胺喋呤(methotrexate)；皮質類固醇；環孢素

(cyclosporin)；雷帕黴素(rapamycin)；FK506；DNA烷化劑；順鉑(cisplatin)、卡鉑(carboplatin)；抗微管蛋白劑；太平洋紫杉醇(paclitaxel)；歐洲紫杉醇(docetaxel)；小紅莓(doxorubicin)；吉西他濱(gemcitabine)；健擇(gemzar)；蔥環黴素；阿黴素(adriamycin)；拓撲異構酶I抑制劑；拓撲異構酶II抑制劑；5-氟尿嘧啶(5-FU)；甲醯四氫葉酸(leucovorin)；伊立替康(irinotecan)；受體酪胺酸激酶抑制劑；細胞凋亡抑制劑；Bcl2/Bclx抑制劑；埃羅替尼(erlotinib)；吉非替尼(gefitinib)；COX-2抑制劑；塞內昔布(celecoxib)；環孢素；雷帕黴素；可偵測標記或報導分子；TNF拮抗劑；抗風濕藥；肌肉鬆弛劑；麻醉藥(narcotic)；止痛劑；麻醉劑(anesthetic)；鎮靜劑；局部麻醉劑；神經肌肉阻斷劑；抗微生物劑；抗牛皮癬劑；皮質類固醇；同化類固醇；紅血球生成素；免疫；免疫球蛋白；免疫抑制劑；生長激素；激素替代藥物；放射性醫藥藥物；抗抑鬱劑；抗精神病藥；刺激劑；哮喘藥； β 促效劑；吸入型類固醇；腎上腺素；腎上腺素類似物；細胞激素；及細胞激素拮抗劑。

在另一態樣中，本發明提供一種抑制人類DLL4活性之方法，該方法包含使人類DLL4與上文所揭示之結合蛋白質接觸而抑制或中和人類DLL4。在一相關態樣中，本發明提供一種抑制罹患因DLL4而受害之病症的人類個體中DLL4活性的方法，該方法包含對該人類個體投與上文所揭示之結合蛋白質而抑制該人類個體之人類DLL4並達成

治療。該病症較佳選自包含以下之群：原發性癌症及轉移性癌症，包括乳癌、結腸癌、直腸癌、肺癌、口咽癌、下咽癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、肝癌、膽囊癌及膽管癌、小腸癌、泌尿道癌(包括腎癌、膀胱癌及尿道上皮癌)、女性生殖道癌(包括子宮頸癌、子宮癌及卵巢癌以及絨毛膜癌及妊娠滋養層細胞疾病)、男性生殖道癌(包括前列腺癌、精囊癌、睪丸癌及生殖細胞腫瘤)、內分泌腺癌(包括甲狀腺癌、腎上腺癌、及腦下垂腺癌)及皮膚癌，以及血管瘤、黑素瘤、肉瘤(包括骨及軟組織發生之肉瘤以及卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma))、腦腫瘤、神經腫瘤、眼腫瘤及腦脊膜腫瘤(包括星形細胞瘤、膠質瘤、膠質母細胞瘤、視網膜母細胞瘤、神經瘤、神經母細胞瘤、神經鞘瘤及腦脊膜瘤)，造血惡性病所致之實體腫瘤，諸如白血病及淋巴瘤(霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)及非霍奇金氏淋巴瘤)，腫瘤轉移、眼部新血管生成(包括糖尿病性失明、視網膜病、年齡所致之黃斑變性及虹膜紅變)、水腫、類風濕性關節炎、動脈粥樣硬化斑、難治性腹水、牛皮癬、胰腺炎、多囊卵巢病(POD)、子宮內膜異位症、子宮纖維瘤、良性前列腺肥大、T細胞急性淋巴母細胞白血病(T-ALL)、大腦體染色體顯性動脈病伴隨皮質下梗塞及腦白質病(CADASIL)、多發性硬化(MS)、法洛氏四聯症(tetralogy of Fallot；TOF)、阿拉吉歐症候群(Alagille syndrome；AS)、黃斑變性及年齡相關之黃斑變性病，及以異常DLL4表現或活性為特徵之其他血管生成非依賴性

及依賴性疾病。

在另一態樣中，本發明提供一種治療罹患人類DLL4而受害病症之患者的方法，該方法包含在投與治療有效量之第二藥劑之前、同時或之後投與上文所揭示之任一種結合蛋白的步驟。在一個較佳實施例中，第二藥劑係選自由以下組成之群：放射性治療劑；抗腫瘤劑；化學治療劑；DNA烷化劑；順鉑；卡鉑；抗微管蛋白劑；太平洋紫杉醇；歐洲紫杉醇；紫杉醇(taxol)；小紅莓；吉西他濱；健擇；蔥環黴素；阿黴素；拓撲異構酶I抑制劑；拓撲異構酶II抑制劑；5-氟尿嘧啶(5-FU)；甲醯四氫葉酸；伊立替康；受體酪胺酸激酶抑制劑；細胞凋亡抑制劑；Bcl2/Bclx抑制劑；埃羅替尼；吉非替尼；COX-2抑制劑；塞內昔布；激酶抑制劑；血管生成抑制劑；抗VEGF抗體；抗EGFR抗體；抗cMet抗體；抗ErbB3抗體；抗HER2抗體；抗CD20抗體；VEGF捕捉劑(阿柏西普(aflibercept))；共刺激分子阻斷劑；抗B7.1抗體；抗B7.2抗體；CTLA4-Ig；黏著分子阻斷劑；抗LFA-1抗體；抗E選擇蛋白抗體；抗L選擇蛋白抗體；小分子抑制劑；抗細胞激素抗體或其功能片段；抗IL-18抗體；抗TNF抗體；抗IL-6抗體；抗細胞激素受體抗體；甲胺喋呤；環孢素；雷帕黴素；FK506；可偵測標記或報導分子；TNF拮抗劑；抗風濕藥；肌肉鬆弛劑；麻醉藥；非類固醇消炎藥(NSAID)；止痛劑；麻醉劑；鎮靜劑；局部麻醉劑；神經肌肉阻斷劑；抗微生物劑；抗牛皮癬藥物；皮質類固醇；同化類固醇；紅血球生

成素；免疫；免疫球蛋白；免疫抑制劑；生長激素；激素替代藥物；放射性藥物；抗抑鬱劑；抗精神病藥；刺激劑；哮喘藥； β 促效劑；吸入型類固醇；腎上腺素；腎上腺素類似物；細胞激素；及細胞激素拮抗劑。

在一較佳實施例中，上文所揭示之醫藥組合物係藉由至少一種選自由以下組成之群之方式投與個體：非經腸、皮下、肌肉內、靜脈內、動脈內、關節內、支氣管內、腹內、囊內、軟骨內、腔內、體腔內、小腦內、腦室內、結腸內、頸管內、胃內、肝內、心肌內、骨內、骨盆內、心包內、腹膜內、胸膜內、前列腺內、肺內、直腸內、腎內、視網膜內、脊柱內、滑膜內、胸內、子宮內、膀胱內、快速注射(bolus)、經陰道、經直腸、經頰、舌下、鼻內及經皮。

本發明之另一態樣提供至少一種針對至少一種本發明之DLL4結合蛋白的DLL4抗個體基因型抗體。該抗個體基因型抗體包括任何含有蛋白質或肽之分子，其包含至少一部分免疫球蛋白分子，諸如但不限於重鏈或輕鏈或其配位體結合部分之至少一個互補決定區(CDR)、重鏈或輕鏈可變區、重鏈或輕鏈恆定區、架構區，及其可併入本發明之結合蛋白中的任何部分。

各種免疫偵測分析形式中之任一者均可適於採用本發明之DLL4結合蛋白來偵測或量測混合物、溶液或生物樣本中之DLL4。該等免疫偵測分析形式包括但不限於放射免疫分析(RIA)、免疫沈澱法、酶聯免疫吸附分析(ELISA)、

免疫墨點法(例如西方墨點法)、包含本發明之DLL4結合蛋白吸附或固定至受質之免疫試紙條(例如免疫量桿)、FACS及其類似方法。可在活體外使用本發明之DLL4結合蛋白對混合物、溶液或生物樣本進行DLL4偵測。可與本發明之結合蛋白接觸以偵測或量測樣本中之DLL4的生物樣本包括但不限於尿、唾液、口腔抹片(頰、舌或咽喉抹片)、皮膚抹片、皮膚刮落物、直腸抹片、陰道抹片、全血樣本、血漿樣本、血清樣本、活組織切片，及藉由此項技術已知之程序自個體獲得的任何其他樣本。在另一實施例中，DLL4結合蛋白可用於偵測活體內DLL4，諸如各種斷層攝影法及掃描法，包括但不限於X射線電腦輔助斷層攝影法(CT)、磁共振成像(MRI)及正電子發射斷層攝影法(PET)。

【實施方式】

本發明係關於DLL4結合蛋白，尤其抗DLL4抗體或其結合DLL4之抗原結合部分。人類DLL4之胺基酸序列(SEQ ID NO:1)以及相應DLL4核苷酸編碼序列(SEQ ID NO:2)示於表1中。本發明之各種態樣係關於抗體及抗體片段及其醫藥組合物，以及用於製造該等抗體及片段之核酸、重組表現載體及宿主細胞。本發明亦涵蓋使用本發明之抗體偵測人類DLL4或鼠類DLL4之方法、抑制人類或小鼠DLL4及/或人類或小鼠VEGFR2或VEGFR1活性之方法(活體外或活體內)及調節基因表現之方法。

表 1. 人類 DLL4 之胺基酸序列及核苷酸編碼序列

序列種類	序列識別符	序列
		123456789012345678901234567890
人類DLL4胺基酸序列	SEQ ID NO:1	MAAASRSASGWALLLLVALWQORAAGSGVF QLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRV CLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFA VRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIE AWHAPGDDLPEALPPDALISKIAIQGSLA VGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYY GDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLP GWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECL CRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCSTPWQC TCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSCKNGATC SNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCELELSECD NPCRNNGGSKDQEDGYHCLCPPGYGLHCE HSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANACEC PPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNR GPSRMCRCRPGFTGTCELHVSDCARNPCA HGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEVRTS IDACASSPCFNATCYTDLSTDTFVCNCPY GFVGSRCFFPVGLPPSFPWVAVSLGVGLAV LLVLLGMVAVAVRQLRLRRPDDGSREAMNN LSDFQKDNLI PAAQLKNTNQKKELEVDCGL DKSNCGKQQNHTLDYNLAPGPLGRGTMPGK FPHSDKSLGEKAPLRLHSEKPECRISAICS PRDSMYQSVCLISEERNECVIATEV
人類DLL4核苷酸編碼序列	SEQ ID NO:2	atggcggcagcgtcccggagcgcctctggc tgggcgctactgctgctggtggcactttgg cagcagcgcgcggccggctccggcgtcttc cagctgcagctgcaggagttcatcaacgag cgcggcgtactggccagtgggcggccttgc gagcccggctgccggactttcttcgcgctc tgccttaagcacttccaggcggctcgtctcg cccggaccctgcaccttcgggaccgtctcc acgccggtattgggcaccaactccttcgct gtccgggacgacagtagcggcggggggcgc aaccctctccaactgcccttcaatttcacc tggccgggtaccttctcgctcatcatcgaa gcttggcacgcgccaggagacgacctgcgg ccagaggccttgccaccagatgcactcatc agcaagatcgccatccagggtccctagct gtgggtcagaactggttattggatgagcaa accagcaccctcacaaggctgcgctactct taccgggtcatctgcagtgcactactat ggagacaactgctccgcctgtgcaagaag cgcaatgaccacttcggccactatgtgtgc cagccagatggcaacttgtcctgcctgcc ggttggactggggaatattgccaacagcct atctgtctttcgggctgtcatgaacagaat ggctactgcagcaagccagcagagtgcctc tgccgccaggctggcagggccggctgtgt aacgaatgcacccccacaatggctgtcgc cacggcacctgcagcactccctggcaatgt



序列種類	序列識別符	序列
		123456789012345678901234567890
		acttgatgatgagggctggggaggcctgttt tgtgaccaagatctcaactactgcacccac cactcccatgcaagaatggggcaacgtgc tccaacagtgggcagcgaagctacacctgc acctgtcgcccaggctacactggtgtggac tgtgagctggagctcagcgagtgtgacagc aaccctgtcgcaatggaggcagctgtaag gaccaggaggatggctaccactgcctgtgt cctccgggtactatggcctgcattgtgaa cacagcaccttgagctgcgccgactcccc tgcttcaatgggggctcctgccgggagcgc aaccagggggccaactatgcttgtgaatgt ccccccaacttcaccggctccaactgcgag aagaaagtggacaggtgcaccagcaacccc tgtgccaacgggggacagtgcctgaaccga ggtccaagccgcatgtgccgctgccgtcct ggattcacgggcacctactgtgaactccac gtcagcgactgtgccgtaacccttgccgc cacggtggcacttgccatgacctggagaat gggctcatgtgcacctgccctgccggcttc tctggccgacgctgtgaggtgcggacatcc atcgatgcctgtgcctcgagtccctgcttc aacagggccacctgctacaccgacctctcc acagacacctttgtgtgcaactgcccttat ggctttgtgggcagccgctgcgagttcccc gtgggcttgccgcccagcttcccctgggtg gccgtctcgtgggtgtggggctggcagtg ctgctggtactgctgggcatggtggcagtg gctgtgcggcagctgcggcttcgacggccg gacgacggcagcaggggaagccatgaacaac ttgtcggacttccagaaggacaacctgatt cctgccgcccagcttaaaaacacaaaccag aagaaggagctggaagtggactgtggcctg gacaagtccaactgtggcaaacagcaaaac cacacattggactataatctggccccaggg cccctggggcgggggacctgcccaggaaag tttccccacagtgacaagagcttaggagag aaggcgccactgcggttacacagtgaaaag ccagagtgtcggatatcagcgatatgtctcc cccagggactccatgtaccagtctgtgtgt ttgatatcagaggagaggaatgaatgtgtc attgccacggaggtataa

除非本文中另外定義，否則結合本發明使用之科學及技術術語應具有一般熟習此項技術者通常所瞭解之含義。該等術語之含義及範疇應為清晰的，然而，若存在任何潛在歧義，則本文提供之定義優先於任何詞典定義或外來定義。此外，除非上下文另有需要，否則單數術語應包括複

數且複數術語應包括單數。在本申請案中，除非另外說明，否則使用「或」意謂「及/或」。此外，使用術語「包括」不具限制性。再者，除非另外特別說明，否則諸如「元件」或「組分」之術語涵蓋包含一個單元之元件及組分以及包含一個以上子單元之元件及組分。

一般而言，本文所述之細胞及組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學及蛋白質與核酸化學及雜交所結合使用之命名法及其技術為此項技術中所熟知且常用。除非另有所示，否則一般根據此項技術中所熟知之習知方法且如本說明書通篇所引用及論述之各種一般及較為具體之參考文獻中所描述來執行本發明之方法及技術。酶促反應及純化技術係根據製造商之說明書，如此項技術中通常所實現或如本文中所述來執行。本文所述之分析化學、合成有機化學及醫藥化學所結合使用之命名法以及其實驗室程序及技術為此項技術中所熟知且常用。使用標準技術進行化學合成、化學分析、醫藥製備、調配及遞送，以及患者治療。

為了使本發明可更易於理解，所選擇之術語定義如下。

如本文中所使用之術語「多肽」係指任何胺基酸聚合鏈。術語「肽」及「蛋白質」可與術語多肽互換使用且亦指胺基酸聚合鏈。術語「多肽」涵蓋天然或人工蛋白質、蛋白質片段及蛋白質序列之多肽類似物。多肽可為單體或聚合體。除非另外說明，否則本文中使用「多肽」意欲涵蓋多肽及其片段及變異體(包括變異體之片段)。對於抗原

性多肽，多肽之片段視情況含有多肽之至少一個相連或非線性抗原決定基。該至少一個抗原決定基片段之精確邊界可使用此項技術中之一般技能來確定。片段包含至少約5個相連胺基酸，諸如至少約10個相連胺基酸、至少約15個相連胺基酸，或至少約20個相連胺基酸。多肽之變異體如本文所述。

術語「經分離蛋白質」或「經分離多肽」為由於其衍生起源或來源而不與其天然狀態時伴隨其之天然締合組分締合；實質上不含來自同一物種之其他蛋白質；由不同物種之細胞表現；或自然界中不存在之蛋白質或多肽。因而，化學合成或在不同於其天然起源細胞的細胞系統中合成的多肽將與其天然締合組分「分離」。亦可使用此項技術中熟知之蛋白質純化技術藉由分離亦可使蛋白質實質上不含天然締合組分。

如本文中所使用之術語「回收」係指(例如)使用此項技術中熟知之蛋白質純化技術藉由分離使諸如多肽之化學物質實質上不含天然締合組分的過程。

如本文所使用之術語「人類DLL4」(本文中縮寫為「hDLL4」或「huDLL4」)包括若干EGF樣結構域及受體結合所需之DSL域。該術語包括包含約74至75 kDa之蛋白質。人類DLL4之結構以及推斷DNA及蛋白質序列另外描述於例如 Shutter等人, Genes & Dev., 4: 1313-1318 (2000) 中。術語「人類DLL4」意欲包括重組人類DLL4(rh DLL4)，其可藉由標準重組表現法製備。

如本文中關於DLL4所使用之「生物活性」係指DLL4之所有固有生物性質。DLL4之生物性質包括但不限於結合Notch受體、活化Notch受體、負向調節VEGF信號傳導、抑制VEGFR2及誘導VEGR1。

如本文中關於抗體、蛋白質或肽與第二化學物質之相互作用所使用之術語「特異性結合」意謂該相互作用依賴於化學物質上特定結構(例如，抗原決定子或抗原決定基)之存在；例如，抗體識別並結合至特異性蛋白質結構而非一般蛋白質。若抗體對抗原決定基「A」具有特異性，則在含經標記之「A」及該抗體之反應中存在含抗原決定基A(或未經標記之游離A)之分子將減少結合至該抗體之經標記之A的量。

「結合蛋白」為與結合搭配物結合且與結合搭配物形成複合物的單體或多聚體蛋白質，結合搭配物可為多肽、抗原、化合物或其他分子、或任何種類之受質。結合蛋白特異性結合結合搭配物。結合蛋白包括抗體及包含一或多個與抗原分子或抗原分子上之特定位點(抗原決定基)結合之抗原結合域的其他分子。結合蛋白包括抗體或其任何抗原結合片段，以及此項技術中已知及下文所述之抗體的各種形式及衍生物。因此，結合蛋白包括但不限於抗體、四聚體免疫球蛋白、IgG分子、IgG₁分子、單株抗體、嵌合抗體、CDR移植抗體、人類化抗體、親和力成熟抗體及任何該等抗體之保留結合抗原之能力的片段。

如本文中所使用之術語「抗體」泛指包含4條多肽鏈(即

2條重(H)鏈及2條輕(L)鏈)之任何免疫球蛋白(Ig)分子或其保留Ig分子之必需抗原決定基結合特徵的任何功能片段、突變體、變異體或衍生物。該等突變、變異或衍生抗體形式在此項技術中為已知的。下文論述其非限制性實施例。

在全長抗體中，每條重鏈包含重鏈可變區(本文中縮寫為HCVR或VH)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個結構域，即CH1、CH2及CH3。每條輕鏈包含輕鏈可變區(本文中縮寫為LCVR或VL)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個結構域，即CL。VH及VL區可進一步再分為與較為保守的稱作架構區(FR)之區域交替的稱作互補決定區(CDR)之高變區。各VH及VL係由3個CDR及4個FR構成，其自胺基末端至羧基末端按以下順序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。免疫球蛋白分子可為任何類型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、類別(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或亞類。

使用術語「Fc區」來定義免疫球蛋白重鏈之C-末端區，其可藉由完整抗體之木瓜蛋白酶消化來產生。Fc區可為天然序列Fc區或變異體Fc區。免疫球蛋白之Fc區一般包含2個恆定域(CH2域及CH3域)且視情況包含CH4域。置換Fc部分中之胺基酸殘基以改變抗體效應功能在此項技術中為已知的(美國專利第5,648,260號及第5,624,821號)。抗體之Fc部分介導若干重要效應功能，例如細胞激素誘導、ADCC、吞噬作用、補體依賴性細胞毒性(CDC)，以及抗體及抗原-抗體複合物之半衰期/清除速率。視治療目標而

定，在一些情況下此等效應功能為治療用抗體所要的，而在其他情況下可能為不必要的或甚至有害的。某些人類IgG同型(尤其IgG1及IgG3)分別經由結合至Fc γ R及補體C1q來介導ADCC及CDC。新生兒Fc受體(FcRn)為決定抗體之循環半衰期的重要組分。在又一實施例中，置換抗體恆定區(例如抗體Fc區)中之至少一個胺基酸殘基，從而改變抗體之效應功能。免疫球蛋白之兩條相同重鏈之二聚係由CH3域之二聚介導，且由鉸鏈區內之二硫鍵穩定(Huber等人, *Nature*, 264: 415-420 (1976); Thies等人, *J. Mol. Biol.*, 293: 67-79 (1999))。阻止重鏈-重鏈二硫鍵形成的鉸鏈區內半胱胺酸殘基突變將使得CH3域之二聚不穩定。已鑑別出負責CH3二聚之殘基(Dall'Acqua, *Biochem.*, 37: 9266-9273 (1998))。因此，可產生單價半Ig。有趣的是，在自然界中已發現IgG及IgA亞類之此等單價半Ig分子(Seligman, *Ann. Immunol.*, 129: 855-70 (1978); Biewenga等人, *Clin. Exp. Immunol.*, 51: 395-400 (1983))。已測定FcRn:Fc區Ig之化學計量為2:1(West等人, *Biochem.*, 39: 9698-9708 (2000))，且半Fc足以介導FcRn結合(Kim等人, *Eur. J. Immunol.*, 24: 542-548 (1994))。破壞CH3域二聚之突變可能不會對其FcRn結合具有較大副作用，因為對於CH3二聚而言重要之殘基位於CH3 b摺疊結構之內界面上，而負責FcRn結合之區域位於CH2-CH3域之外界面上。然而，半Ig分子在組織穿透方面可能具有某些優勢，因為其與常規抗體相比尺寸較小。在一個實施例中，置換本發明之結合蛋白之恆定區

(例如Fc區)中的至少一個胺基酸殘基，以便破壞重鏈二聚，從而產生半Ig分子。IgG之消炎活性完全依賴於IgG Fc片段之N-連接聚糖之唾液酸化。已確定消炎活性之精確聚糖需要量，從而可產生適當IgG1 Fc片段，藉此產生效能大大增強的經唾液酸化之完全重組IgG1 Fc(Anthony等人, *Science*, 320: 373-376 (2008))。

如本文所使用之術語抗體之「抗原結合部分」(或簡稱為「抗體部分」)係指保留特異性結合至抗原(亦即結合至抗原之特定抗原決定基，諸如DLL4之抗原決定基)之能力之一或多個抗體片段。已顯示，抗體之抗原結合功能可由全長抗體之片段執行。該等抗體實施例亦可為雙特異性、雙重特異性或多特異性形式；特異性結合至兩個或兩個以上不同抗原(或相同抗原之兩個或兩個以上不同抗原決定基)。術語抗體之「抗原結合部分」內所涵蓋之結合片段的實例包括：(i)Fab片段，一種由VL、VH、CL及CH1結構域組成之單價片段；(ii)F(ab')₂片段，一種包含於鉸鏈區由二硫橋連接之兩個Fab片段的二價片段；(iii)Fd片段，其由VH及CH1結構域組成；(iv)Fv片段，其由抗體之單一臂之VL及VH結構域組成；(v)dAb片段(Ward等人, *Nature* 341:544-546 (1989)；PCT公開案第WO 90/05144 A1號)，其包含單一可變結構域；及(vi)經分離互補決定區(CDR)。此外，雖然Fv片段之兩個結構域VL及VH係由獨立基因編碼，但其可使用重組法經由能將其形成單一蛋白質鏈之合成連接子接合，在該單一蛋白質鏈中VL與VH區配對形成

單價分子(稱為單鏈Fv(scFv); 參看例如Bird等人, *Science*, 242:423-426 (1988); Huston等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988))。該等單鏈抗體亦意欲涵蓋於術語抗體之「抗原結合部分」內。亦涵蓋單鏈抗體之其他形式, 諸如雙功能抗體。雙功能抗體為二價雙特異性抗體, 其中VH及VL域表現於單一多肽鏈上, 但所使用之連接子過短而不能使同一鏈上的兩個結構域之間配對, 從而迫使該等結構域與另一鏈之互補域配對並產生兩個抗原結合位點(參看例如Holliger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993); Poljak R.J., *Structure*, 2:1121-1123 (1994))。該等抗體結合部分在此項技術中為已知的(參看Kontermann及Dubel編, **Antibody Engineering** (Springer-Verlag. New York, 2001), 第790頁(ISBN 3-540-41354-5))。另外, 單鏈抗體亦包括包含一對串聯Fv區段(VH-CH1-VH-CH1)之「線性抗體」, 其與互補輕鏈多肽一起形成一對抗原結合區(Zapata等人, *Protein Eng.*, 8(10): 1057-1062 (1995); 及美國專利第5,641,870號)。

如本文中所使用之術語「抗體構築體」(或「DLL4抗體構築體」)係指包含一或多個本發明之抗原結合部分連接至連接子多肽或免疫球蛋白恆定域的多肽。連接子多肽包含由肽鍵接合之兩個或兩個以上胺基酸殘基且用於連接一或多個抗原結合部分。該等連接子多肽在此項技術中為熟知的(參看例如Holliger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993); Poljak, R.J., *Structure*, 2:1121-1123

(1994))。免疫球蛋白恆定域係指重鏈或輕鏈恆定域。人類 IgG 重鏈及輕鏈恆定域胺基酸序列在此項技術為已知的且呈示於表 2 中。

表 2：人類 IgG 重鏈恆定域及輕鏈恆定域之序列

蛋白質	序列識別符	序列
		12345678901234567890123456789012
Ig γ -1 恆定區	SEQ ID NO:3	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Ig γ -1 恆定區突變體	SEQ ID NO:4	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Ig κ 恆定區	SEQ ID NO:5	TVAAPSVEFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
Ig λ 恆定區	SEQ ID NO:6	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

此外，抗體或其抗原結合部分可為藉由抗體或抗體部分與一或多個其他蛋白質或肽共價或非共價締合所形成之較大免疫黏著分子的一部分。該等免疫黏著分子之實例包括使用抗生蛋白鏈菌素核心區形成四聚體 scFv 分子 (Kipriyanov 等人, *Human Antibodies and Hybridomas*, 6:93-

101(1995))及使用半胱胺酸殘基、標記肽及C-末端聚組胺酸標籤形成二價且經生物素標記之scFv分子(Kipriyanov等人, *Mol. Immunol.*, 31: 1047-1058 (1994))。諸如Fab及F(ab')₂片段之抗體部分可由完整抗體使用習知技術, 分別諸如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化完整抗體來製備。此外, 可使用如本文中所述及此項技術中已知之標準重組DNA技術獲得抗體、抗體部分及免疫黏著分子。

本文中所使用之「經分離抗體」意欲指實質上不含具有不同抗原特異性之其他抗體的抗體(例如特異性結合hDLL4之經分離抗體實質上不含特異性結合不同於hDLL4之抗原的抗體)。然而, 特異性結合hDLL4之經分離抗體可對其他抗原(諸如來自其他物種之DLL4分子, 例如muDLL4)具有交叉反應性。此外, 經分離抗體可實質上不含其他細胞物質及/或化學物質。

如本文所用之術語「單株抗體」及縮寫「Mab」及「mAb」係指自實質上相似之抗體群體所獲得之抗體, 亦即構成此群體之個別抗體除可少量存在之可能天然存在之突變外為相同的。單株抗體具有針對單一抗原之高度特異性。此外, 與通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑不同, 各mAb針對抗原上之單一決定子。修飾語「單株」不應視為需要藉由任何特定方法製造抗體。

如本文中所使用之術語「人類抗體」意欲包括具有源自人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區的抗體。本

發明之人類抗體可包括不由人類生殖系免疫球蛋白序列編碼之胺基酸殘基(例如，藉由活體外隨機或位點特異性突變誘發或藉由活體內體細胞突變引入之突變)，例如在CDR中且尤其在CDR3中。然而，如本文中所使用之術語「人類抗體」不意欲包括源自另一哺乳動物物種(諸如小鼠)之生殖系之CDR序列已移植於人類架構序列上之抗體。

如本文所使用之術語「重組人類抗體」意欲包括藉由重組方式製備、表現、產生或分離之所有人類抗體，諸如使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體表現之抗體、自重組組合人類抗體庫分離之抗體(Hoogenboom, *Trends Biotechnol.*, 15:62-70 (1997); Azzazy及Highsmith, *Clin. Biochem.*, 35: 425-445 (2002); Gavilondo及Larrick, *BioTechniques*, 29: 128-145 (2000); Hoogenboom及Chames, *Immunol. Today*, 21: 371-378 (2000))、自轉殖人類免疫球蛋白基因之動物(例如小鼠)分離之抗體(參看Taylor等人, *Nucl. Acids Res.*, 20: 6287-6295 (1992); Kellermann及Green, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13: 593-597 (2002); Little等人, *Immunol. Today*, 21: 364-370 (2000))，或藉由涉及將人類免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列之任何其他方式製備、表現、產生或分離之抗體。該等重組人類抗體具有源自人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區。然而，在某些實施例中，對該等重組人類抗體進行活體外突變誘發(或，當使用轉殖人類Ig序列之動物時，進行活體內體細胞

突變誘發)且因而，重組抗體之VH及VL區之胺基酸序列為雖然源自人類生殖系VH及VL序列並與其相關但可能並非天然存在於活體內人類抗體生殖系譜系中的序列。

術語「嵌合抗體」係指包含來自一個物種之重鏈及輕鏈可變區序列及來自另一物種之恆定區序列的抗體，例如具有連接至人類恆定區之鼠類重鏈及輕鏈可變區的抗體。

如本文中所使用之術語「CDR」係指抗體可變序列內之互補決定區。重鏈及輕鏈之各可變區中存在3個CDR，各可變區之3個CDR命名為CDR1、CDR2及CDR3。如本文中所使用之術語「CDR組」係指存在於單一可變區中之結合抗原之3個CDR之群。此等CDR之確切邊界已根據不同系統不同地加以界定。Kabat (Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987)及(1991))所述之系統不僅提供適用於抗體之任何可變區的明確殘基編號系統，且亦提供界定3個CDR之精確殘基邊界。此等CDR可稱為「Kabat CDR」。Chothia及其同事(Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987); Chothia等人, *Nature*, 342:877-883 (1989))發現Kabat CDR內之某些子部分雖然在胺基酸序列層面上具有極大多樣性，但仍採用幾乎相同的肽主鏈構形。此等子部分稱為「L1」、「L2」及「L3」，或「H1」、「H2」及「H3」，其中「L」及「H」分別指輕鏈及重鏈區。此等區域可稱為「Chothia CDR」，其具有與Kabat CDR重疊之邊界。Padlan, *FASEB J.*, 9:133-139

(1995)及MacCallum, *J. Mol. Biol.*, 262(5):732-745 (1996)) 已描述界定與Kabat CDR重疊之CDR的其他邊界。其他CDR邊界定義可能不嚴格遵循本文系統中之一者，但仍會與Kabat CDR重疊，但根據特定殘基或殘基群或甚至整個CDR不顯著影響抗原結合之預測或實驗結果，其可縮短或延長。雖然本文中所用之方法可利用根據任何此等系統所定義之CDR，但某些實施例使用Kabat或Chothia定義之CDR。

術語「Kabat編號」、「Kabat定義」及「Kabat標記」在本文中可互換使用。此項技術中公認之此等術語係指在抗體或其抗原結合部分之重鏈及輕鏈可變區中比其他胺基酸殘基更可變(亦即高變))之胺基酸殘基的編號系統(Kabat等人, *Ann. NY Acad. Sci.*, 190: 382-391 (1971)及Kabat等人, **Sequences of Proteins of Immunological Interest**, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH公開號91-3242 (1991))。對於重鏈可變區(VH)，高變區CDR1在胺基酸位置31至35範圍內，CDR2在胺基酸位置50至65範圍內，且CDR3在胺基酸位置95至102範圍內。對於輕鏈可變區(VL)，高變區CDR1在胺基酸位置24至34範圍內，CDR2在胺基酸位置50至56範圍內，且CDR3在胺基酸位置89至97範圍內。

過去20年中重鏈及輕鏈可變區之胺基酸序列之廣泛公開資料庫之增長及分析提供了對可變區序列內之架構區(FR)與CDR序列之間的典型邊界的瞭解，並使熟習此項技術者

能夠根據Kabat編號系統、Chothia編號系統或其他系統準確地確定CDR。參看例如Martin, 「Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains」, Kontermann及Dübel編, **Antibody Engineering** (Springer-Verlag, Berlin, 2001), 第31章, 第432-433頁。下文提供適用於確定重鏈可變區(VH)及輕鏈可變區(VL)之胺基酸序列內Kabat CDR之胺基酸序列以及由此確定Kabat FR序列的方法：

鑑別CDR-L1胺基酸序列：

自VL區之胺基末端約24個胺基酸殘基處起始；

CDR-L1序列前之殘基始終為半胱胺酸(C)；

CDR-L1序列後之殘基始終為色胺酸(W)，通常為Trp-Tyr-Gln (W-Y-Q)，但亦可為Trp-Leu-Gln (W-L-Q)、Trp-Phe-Gln (W-F-Q)，及Trp-Tyr-Leu (W-Y-L)；

長度通常為10至17個胺基酸殘基。

鑑別CDR-L2胺基酸序列：

始終於CDR-L1之末端後16個殘基處起始；

CDR-L2序列前之殘基一般為Ile-Tyr(I-Y)，但亦可為Val-Tyr(V-Y)、Ile-Lys(I-K)及Ile-Phe(I-F)；

長度始終為7個胺基酸殘基。

鑑別CDR-L3胺基酸序列：

始終於CDR-L2之末端後33個胺基酸處起始；

CDR-L3胺基酸序列前之殘基始終為半胱胺酸(C)；

之後之殘基始終為Phe-Gly-X-Gly(F-G-X-G)(SEQ ID

NO:7)，其中X為任何胺基酸；

長度通常為7至11個胺基酸殘基。

鑑別CDR-H1胺基酸序列：

自VH區之胺基末端約31個胺基酸殘基處且始終於半胱胺酸(C)後之9個殘基處起始；

之前之殘基始終為Cys-X-X-X-X-X-X-X-X (SEQ ID NO:8)，其中X為任何胺基酸；

之後之殘基始終為Trp(W)，通常為Trp-Val (W-V)，但亦可為Trp-Ile (W-I)及Trp-Ala (W-A)；

長度通常為5至7個胺基酸殘基。

鑑別CDR-H2胺基酸序列：

始終於CDR-H1末端後15個胺基酸殘基處起始；

之前之殘基通常為Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (L-E-W-I-G)(SEQ ID NO:9)，但亦可為其他變化形式；

之後之殘基為Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala (K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A)；

長度通常為16至19個胺基酸殘基。

鑑別CDR-H3胺基酸序列：

始終於CDR-H2之末端後33個胺基酸殘基且始終於半胱胺酸(C)後3個胺基酸殘基處起始；

之前之殘基始終為Cys-X-X (C-X-X)，其中X為任何胺基酸，通常為Cys-Ala-Arg (C-A-R)；

之後之殘基始終為Trp-Gly-X-Gly (W-G-X-G)(SEQ ID NO:10)，其中X為任何胺基酸；

長度通常為3至25個胺基酸殘基。

術語「CDR移植抗體」係指包含來自一個物種之重鏈及輕鏈可變區序列但其中VH及/或VL之一或多個CDR區之序列經另一物種之CDR序列置換的抗體，諸如具有鼠類重鏈及輕鏈可變區且其中一或多個鼠類CDR(例如CDR3)已經人類CDR序列置換之抗體。

術語「人類化抗體」係指包含來自非人類物種(例如小鼠)之重鏈及輕鏈可變區序列，但其中VH及/或VL序列之至少一部分已經改變而更「似人類」，亦即更類似於人類生殖系可變序列的抗體。「人類化抗體」為免疫特異性結合至相關抗原且包含實質上具有人類抗體之胺基酸序列之架構(FR)區及實質上具有非人類抗體之胺基酸序列之互補決定區(CDR)的抗體或其變異體、衍生物、類似物或片段。如本文中在CDR情況下所使用之術語「實質上」係指CDR之胺基酸序列與非人類抗體CDR之胺基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%一致。人類化抗體包含實質上所有至少一個且通常兩個可變結構域(Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv)，其中所有或實質上所有CDR區對應於非人類免疫球蛋白(亦即，供體抗體)之彼等CDR區，且所有或實質上所有架構區為人類免疫球蛋白共同序列之彼等架構區。在一實施例中，人類化抗體亦包含免疫球蛋白恆定區(Fc)(通常為人類免疫球蛋白恆定區)之至少一部分。在一些實施例中，人類化抗體含有輕鏈以及至少重鏈可變域。抗體亦可包括重鏈之

CH1、鉸鏈區、CH2、CH3及CH4區。在一些實施例中，人類化抗體僅含有人類化輕鏈。在一些實施例中，人類化抗體僅含有人類化重鏈。在特定實施例中，人類化抗體僅含有輕鏈之人類化可變域及/或人類化重鏈。

人類化抗體可選自任何類別之免疫球蛋白，包括IgM、IgG、IgD、IgA及IgE及任何同型，包括但不限於IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。人類化抗體可包含一種以上類別或同型之序列，且可選擇特定恆定域以使用此項技術中熟知之技術優化所要效應功能。

人類化抗體之架構區及CDR不需要精確對應於親本序列，例如供體抗體CDR或共同架構可藉由取代、插入及/或缺失至少一個胺基酸殘基進行突變誘發以使得該位點處之CDR或架構殘基不對應於供體抗體或共同架構。然而，在一較佳實施例中，該等突變不為大範圍的。通常，至少80%、較佳至少85%、更佳至少90%且最佳至少95%人類化抗體殘基將對應於親本FR及CDR序列之彼等殘基。如本文中所使用之術語「共同架構」係指共同免疫球蛋白序列中之架構區。如本文中所使用之術語「共同免疫球蛋白序列」係指由相關免疫球蛋白序列家族中最頻繁出現之胺基酸(或核苷酸)所形成之序列(參看例如 Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987))。因而，「共同免疫球蛋白序列」可包含「共同架構區」及/或「共同CDR」。在免疫球蛋白家族中，共同序列中之各位置由該家族中在該位置處最頻繁出現之胺基酸佔據。若

兩個胺基酸的出現同樣頻繁，則共同序列中可包括任二者。

「親和力成熟」抗體為在其一或多個CDR中具有一或多種變化之抗體，該等變化使得該抗體對靶抗原之親和力與不具有該等變化之親本抗體相比得以改良。例示性親和力成熟抗體將對靶抗原具有奈莫耳或甚至皮莫耳之親和力。此項技術中已知產生親和力成熟抗體之各種程序。舉例而言，Marks等人，*BioTechnology*, 10: 779-783 (1992)描述藉由VH及VL域改組來實現親和力成熟。CDR及/或架構殘基之隨機突變誘發描述於下列文獻中：Barbas等人，*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91: 3809-3813 (1994)；Schier等人，*Gene*, 169: 147-155 (1995)；Yelton等人，*J. Immunol.*, 155: 1994-2004 (1995)；Jackson等人，*J. Immunol.*, 154(7): 3310-3319 (1995)；Hawkins等人，*J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992)。選擇性突變誘發位置及具有活性增強之胺基酸殘基之接觸或高變位置處的選擇性突變描述於美國專利第6,914,128 B1號中。

術語「多價結合蛋白」表示包含兩個或兩個以上抗原結合位點(本文中亦稱為「抗原結合域」)之結合蛋白。多價結合蛋白較佳經工程改造成具有3個或3個以上抗原結合位點，且其一般不為天然存在之抗體。術語「多特異性結合蛋白」係指能夠結合兩個或兩個以上相關或不相關標靶之結合蛋白，包括能夠結合同一標靶分子上之兩個或兩個以上不同抗原決定基的結合蛋白。

如本文所使用之術語「雙特異性抗體」係指藉由以下技術產生之全長抗體：四源雜交瘤(quadroma)技術(參看 Milstein等人, Nature, 305 (5934): 537-540 (1983))、藉由兩種不同單株抗體之化學結合(參看 Staerz等人, Nature, 314 (6012): 628-631 (1985))，或藉由杵入白(knob-into-hole)或在Fc區中引入突變之類似方法(參看 Holliger等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 (14): 6444-6448 (1993))，產生多個不同免疫球蛋白種類，其中僅一者為功能性雙特異性抗體。雙特異性抗體藉由分子功能在其兩個結合臂之一者(一對HC/LC)上結合一個抗原(或抗原決定基)，而在其第二臂(不同的HC/LC對)上結合不同抗原。根據此定義，雙特異性抗體具有兩個不同抗原結合臂(具有兩種特異性及CDR序列)，且對於其所結合之各抗原為單價的。

如本文所使用之術語「雙重特異性抗體」係指在其兩個結合臂之每一者(一對HC/LC)中可結合兩個不同抗原(或抗原決定基)的全長抗體(參看 PCT公開案 WO 02/02773)。因此，雙重特異性結合蛋白具有特異性相同且CDR序列相同的兩個相同抗原結合臂，且對於其所結合之各抗原為二價的。

本發明之「雙重可變域」(「DVD」)結合蛋白包含兩個或兩個以上抗原結合位點，且可為二價(兩個抗原結合位點)、四價(四個抗原結合位點)或多價結合蛋白。DVD可具單特異性，亦即，能夠結合一個抗原(或一個特異抗原決定基)；或具多特異性，亦即，能夠結合兩個或兩個以上

抗原(亦即，同一靶抗原分子之兩個或兩個以上抗原決定基，或不同標靶抗原之兩個或兩個以上抗原決定基)。較佳DVD結合蛋白包含兩個重鏈DVD多肽及兩個輕鏈DVD多肽，且稱為「DVD免疫球蛋白」或「DVD-Ig」。因而，該種DVD-Ig結合蛋白為四聚體且類似於IgG分子，但與IgG分子相比提供更多抗原結合位點。因而，四聚體DVD-Ig分子之每一半類似於IgG分子之一半，且包含重鏈DVD多肽及輕鏈DVD多肽，但不同於提供單一抗原結合域的IgG分子之一對重鏈及輕鏈，提供兩個或兩個以上抗原結合位點的DVD-Ig之一對重鏈及輕鏈。

DVD-Ig結合蛋白之各抗原結合位點係來源於供體(「親本」)單株抗體，且因而每個抗原結合位點包含具有總共6個CDR牽涉於抗原結合中的重鏈可變域(VH)及輕鏈可變域(VL)。因此，結合兩個不同抗原決定基(亦即兩個不同抗原分子之兩個不同抗原決定基或同一抗原分子之兩個不同抗原決定基)之DVD-Ig結合蛋白包含來源於第一親本單株抗體之抗原結合位點及來源於第二親本單株抗體之抗原結合位點。

DVD-Ig結合分子之設計、表現及表徵之描述提供於以下文獻中：PCT公開案第WO 2007/024715號、美國專利第7,612,181號，及Wu等人，*Nature Biotech.*, 25: 1290-1297 (2007)。該種DVD-Ig分子之較佳實例包含：包含結構式VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n之重鏈，其中VD1為第一重鏈可變域，VD2為第二重鏈可變域，C為重鏈恆定域，X1為連

接子(其限制條件為X1並非CH1)，X2為Fc區，且n為0或1，但較佳為1；及包含結構式VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n之輕鏈，其中VD1為第一輕鏈可變域，VD2為第二輕鏈可變域，C為輕鏈恆定域，X1為連接子(其限制條件為X1並非CH1)，且X2不包含Fc區，且n為0或1，但較佳為1。該種DVD-Ig可包含兩條如下重鏈及兩條如下輕鏈，其中各鏈包含以串聯方式連接之可變域且可變區之間不存在插入之恆定區，其中重鏈與輕鏈締合形成串聯功能性抗原結合位點，且一對重鏈及輕鏈可與另一對重鏈及輕鏈締合形成具有4個功能性抗原結合位點的四聚體結合蛋白。在另一實例中，DVD-Ig分子可包含各包含3個可變域(VD1、VD2、VD3)之重鏈及輕鏈，該等可變域以串聯方式連接且可變域之間不存在插入之恆定區，其中一對重鏈及輕鏈可締合形成3個抗原結合位點，且其中一對重鏈及輕鏈可與另一對重鏈及輕鏈締合形成具有6個抗原結合位點之四聚體結合蛋白。

在一較佳實施例中，本發明之DVD-Ig結合蛋白不僅結合由其親本單株抗體所結合之相同標靶分子，且亦具有一或多種其親本單株抗體之一或多個所要性質。該種另外性質較佳為一或多種親本單株抗體之抗體參數。可由DVD-Ig結合蛋白之一或多種親本單株抗體給予DVD-Ig結合蛋白之抗體參數包括但不限於抗原特異性、抗原親和力、效能、生物功能、抗原決定基識別、蛋白質穩定性、蛋白質溶解性、生產效率、免疫原性、藥物動力學、生物可用

性、組織交叉反應性及直系同源抗原結合。

本發明之DVD-Ig結合蛋白結合人類DLL4蛋白質之至少一個抗原決定基。本發明之DVD-Ig結合蛋白之非限制性實例包括結合人類DLL4之一或多個抗原決定基的DVD-Ig結合蛋白、結合人類DLL4之一個抗原決定基及另一物種(例如小鼠)DLL4之一個抗原決定基的DVD-Ig結合蛋白，及結合人類DLL4之一個抗原決定基及另一靶分子(例如VEGFR2或VEGFR1)之一個抗原決定基的DVD-Ig結合蛋白。

結合蛋白之「功能性抗原結合位點」為能夠結合靶抗原之抗原結合位點。抗原結合位點之抗原結合親和力不必與獲得該抗原結合位點之親本抗體同樣強，但結合抗原之能力必須可使用已知用於評估抗體結合抗原之各種方法中之任一種進行量測。此外，本文中之多價抗體之各抗原結合位點的抗原結合親和力在數量上不需要相同。

如本文中所使用之術語「受體」及「受體抗體」係指提供或編碼一或多個架構區(FR)之至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%胺基酸序列的抗體或核酸序列。在一些實施例中，術語「受體」係指提供或編碼恆定區之抗體胺基酸或核酸序列。在又一實施例中，術語「受體」係指提供或編碼一或多個架構區及恆定區之抗體胺基酸或核酸序列。在一特定實施例中，術語「受體」係指提供或編碼一或多個架構區之至少80%、較佳至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%胺基酸序列

的人類抗體胺基酸或核酸序列。根據此實施例，受體可含有至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個或至少10個不出現於人類抗體之一或多個特定位置的胺基酸殘基。受體架構區及/或受體恆定區可例如來源於或獲自生殖系抗體基因、成熟抗體基因、功能抗體(例如，此項技術中熟知之抗體、處於開發中之抗體或市售抗體)。

如本文所使用之術語「典型」殘基係指界定如 Chothia 等人所定義之特定典型 CDR 結構之 CDR 或架構中之殘基(*J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987); Chothia 等人, *J. Mol. Biol.*, 227: 799-817 (1992)，二者均以引用的方式併入本文中)。根據 Chothia 等人，許多抗體之 CDR 之重要部分儘管在胺基酸序列層面上具有極大多樣性，但仍具有幾乎相同的肽主鏈構形。各典型結構主要指定一組使相連胺基酸殘基區段形成環之肽主鏈扭轉角。

如本文中所使用之術語「供體」及「供體抗體」係指提供一或多個 CDR 之抗體。在一較佳實施例中，供體抗體為來自不同於獲得或得到架構區之抗體之物種的抗體。在人類化抗體之情況下，術語「供體抗體」係指提供一或多個 CDR 之非人類抗體。

如本文中所使用之術語「架構」或「架構序列」係指可變區減去 CDR 之剩餘序列。由於 CDR 序列之確切定義可藉由不同系統(例如參看上文)確定，因此架構序列之含義作相應不同的解釋。6 個 CDR(輕鏈之 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3 以及重鏈之 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3)亦將輕鏈

及重鏈上之架構區在各鏈上分成四個亞區(FR1、FR2、FR3及FR4)，其中CDR1位於FR1與FR2之間，CDR2位於FR2與FR3之間，且CDR3位於FR3與FR4之間。在不將特定亞區規定為FR1、FR2、FR3或FR4的情況下，以其他名稱提及之架構區表示天然存在之單一免疫球蛋白鏈之可變區中的組合FR。如本文中所使用之FR表示四個亞區中之一者，且FRs表示構成架構區之四個亞區中之二者或二者以上。

人類重鏈及輕鏈架構(FR)序列在此項技術中為已知的，其可用作重鏈及輕鏈「受體」架構序列(或簡稱為「受體」序列)以便使用此項技術中已知之技術使非人類抗體人類化。在本發明之一實施例中，人類重鏈及輕鏈受體序列係選自公眾可用之資料庫中所列出之架構序列，諸如V-base(超文字傳送協定：[//vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/](http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/))或國際ImMunoGeneTics®(IMGT®)資訊系統(超文字傳送協定：[//imgt.cines.fr/texts/IMGTrepertoire/LocusGenes/](http://imgt.cines.fr/texts/IMGTrepertoire/LocusGenes/))。下表3提供此項技術中已知的人類重鏈受體序列之非限制性實例清單。下表4提供此項技術中已知的人類輕鏈受體序列之非限制性實例清單。在本發明之一實施例中，人類重鏈及輕鏈受體序列係選自下表3及表4中所述之序列，然而表3及表4中未列出之其他人類重鏈及輕鏈受體序列亦可用於使本發明抗體人類化。

表 3. 重鏈受體序列

SEQ ID NO:	蛋白質區/最親近生殖系 家族	胺基酸序列
		12345678901234567890123456789012
11	VH3-7 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
12	VH3-7 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
13	VH3-7 FR3	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
14	JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
15	VH3 共同序列FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
16	VH3 共同序列FR2	WVRQAPGKGLEWVS
17	VH3 共同序列FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
18	JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
19	VH1-46 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT
20	VH1-46 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
21	VH1-46 FR3	RVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR
22	JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
23	VH3-30 FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
24	VH3-30 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
25	VH3-30 FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
26	JH3 FR4	WGQGTMTVTVSS
27	VH3 共同序列FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
28	VH3 共同序列FR2	WVRQAPGKGLEWVS
29	VH3 共同序列FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
30	JH3 FR4	WGQGTMTVTVSS
31	VH2-70/JH6 FR1	EVTLRSGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL
32	VH2-70/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
33	VH2-70/JH6 FR3	RLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAR
34	VH2-70/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
35	VH2-26/JH6 FR1	EVTLKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSL
36	VH2-26/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
37	VH2-26/JH6 FR3	RLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYYCAR
38	VH2-26/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
39	VH3-72/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
40	VH3-72/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVG
41	VH3-72/JH6 FR3	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR
42	VH3-72/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
43	VH3-21/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
44	VH3-21/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
45	VH3-21/JH6 FR3	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
46	VH3-21/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
47	VH1-69/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS

SEQ ID NO:	蛋白質區/最親近生殖系家族	胺基酸序列
48	VH1-69/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
49	VH1-69/JH6 FR3	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAR
50	VH1-69/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
51	VH1-18/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
52	VH1-18/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
53	VH1-18/JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
54	VH1-18/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
55	IGHV4-59 FR1	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS
56	IGHV4-59 FR2	WIRQPPGKGLEWIG
57	IGHV4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
58	IGHV4-59/JH FR4	WGQGTLLTVSS
59	IGHV3-66 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSIS
60	IGHV3-66 FR2	WIRQAPGKGLEWIG
61	IGHV3-66 FR3	RVTISVDTSKNSFYLMNSLRAEDTAVYYCAR
62	IGHV3-66/JH FR4	WGQGTLLTVSS
63	IGHV4-59 FR1	EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSIS
64	IGHV4-59 FR2	WIRQAPGKGLEWIG
65	IGHV4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFYLLKSSVRAEDTAVYYCAR
66	IGHV4-59/JH FR4	WGQGTLLTVSS
67	IGHV5-51 FR1	EVQLVQSGTEVKKPGESLKISCKVSGGSIS
68	IGHV5-51 FR2	WIRQMPGKGLEWIG
69	IGHV5-51 FR3	QVTISVDTSFNTEFLQWSSLKASDTAMYYCAR
70	IGHV5-51/JH FR4	WGQGTMTVTVSS
71	IGHV2-70 FR1	EVTLRSGPALVKPTQTLTLTCTVSGGSIS
72	IGHV2-70 FR2	WIRQPPGKGLEWIG
73	IGHV2-70 FR3	RVTISVDTSKNQFVLTMTNMDPVDATYYCAR
74	IGHV2-70/JH FR4	WGQGTTVTVSS
75	IGHV3-15 FR1	EVQLLESGGGLVKSGGSLRLSCAASGFTFR
76	IGHV3-15 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
77	IGHV3-15 FR3	RFTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCAK
78	IGHV3-15/JH FR4	WGQGTMTVTVSS
79	IGHV3-43 FR1	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG
80	IGHV3-43 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
81	IGHV3-43 FR3	RFTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCAK
82	IGHV3-43/JH FR4	WGQGTMTVTVSS

表 4. 輕鏈受體序列

SEQ ID NO.:	蛋白質區/最親近生殖系家族	序列
		12345678901234567890123456789012



SEQ ID NO.:	蛋白質區/最親近生殖系 家族	序列
83	O2 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
84	O2 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
85	O2 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
86	JK2 FR4	FGQGTKLEIK
87	L2 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
88	L2 FR2	WYQQKPGQAPRLIY
89	L2 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
90	JK2 FR4	FGQGTKLEIK
91	B3/JK4 FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
92	B3/JK4 FR2	WYQQKPGQPPKLLIY
93	B3/JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC
94	B3/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
95	L2/JK4 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
96	L2/JK4 FR2	WYQQKPGQAPRLIY
97	L2/JK4 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
98	L2/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
99	L15/JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
100	L15/JK4 FR2	WYQQKPEKAPKSLIY
101	L15/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
102	L15/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
103	L5/JK4 FR1	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIC
104	L5/JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
105	L5/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
106	L5/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
107	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
108	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
109	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC
110	IGLV3-1/JL FR4	FGYGTKVTVL
111	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
112	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
113	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC
114	IGLV3-1/JL FR4	GGGKLTVLG
115	IGLV3-1 FR1	YELTQPPSVSVSPGQTASITC
116	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
117	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC
118	IGLV3-1/JL FR4	GGGKLTVLG
119	IGLV3-1 FR1	LYVLTQPPSVSVSPGQTASITC
120	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
121	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQTMDEADYLC
122	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKVTVLG
123	IGKV6D-21 FR1	EYVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC

SEQ ID NO.:	蛋白質區/最親近生殖系家族	序列
124	IGKV6D-21 FR2	WYQQKPDQSPKLVII
125	IGKV6D-21 FR3	GVPSRFSGSNSGDDATLTINSLEAEDAATYYC
126	IGKV6D-21/JK FR4	FGQGTKVEIKR
127	IGKV3D-15 FR1	EYVLTQSPATLSVSPGERATLSC
128	IGKV3D-15 FR2	WYQQKPGQSPRLVIY
129	IGKV3D-15 FR3	DIPARFSGSNSGDEATLTISLQSEDFAVYYC
130	IGKV3D-15/JK FR4	FGQGTRLEIKR
131	IGKV4-1 FR1	DYVLTQSPDSLAVSLGERATINC
132	IGKV4-1 FR2	WYQQKPGQSPKLVII
133	IGKV4-1 FR3	GIPDRFSGSNSGDDATLTISLQAEDVAVYYC
134	IGKV4-1/JK FR4	FGGGTKVEIKR
135	IGLV3-1 FR1	LPVLTQPPSVSVSPGQTASITC
136	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
137	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADYLC
138	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKVTVL
139	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
140	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
141	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADYLC
142	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKLTVL

在一實施例中，用於產生本發明之結合DLL4之人類化抗體的表3之重鏈人類受體架構序列包括由VH3-7 FR1、VH3-7 FR2、VH3-7 FR3及JH4 FR4受體序列組成之組；由VH3共同序列FR1、VH3共同序列FR2、VH3共同序列FR3及JH4 FR4受體序列組成之組；由VH1-46 FR1、VH1-46 FR2、VH1-46 FR3及JH4 FR4受體序列組成之組；由VH3-30 FR1、VH3-30 FR2、VH3-30 FR3及JH3 FR4受體序列組成之組；及由VH3共同序列FR1、VH3共同序列FR2、VH3共同序列FR3及JH3 FR4受體序列組成之組。

在一實施例中，用於產生本發明之結合DLL4之人類化抗體的表4之輕鏈人類受體架構序列包括由O2 FR1、O2 FR2、O2 FR3及JK2 FR4受體序列組成之組；及由L2

FR1、L2 FR2、L2 FR3及JK2 FR4受體序列組成之組。

在一實施例中，用於產生本發明之結合DLL4之人類化抗體的一組人類受體架構序列包含一或多個(例如每結合域包含任意1、2、3、4、5、6、7或8個)選自由以下組成之群的受體架構序列：

重鏈架構-1 (H-FR1)：

E-V-Q-L-V-E-S-G-G-G-L-V-Q-P-G-G-S-L-R-L-S-C-A-A-S-G-F-T-F- X_{30} (SEQ ID NO:143)，其中 X_{30} 為S、R或G；

重鏈架構-2 (H-FR2)：W-V-R-Q-A-P-G-K-G-L-E-W-V-A (SEQ ID NO:144)；

重鏈架構-3 (H-FR3)：

R-F-T-I-S-R-D-N-A-K- X_{11} -S-L-Y-L-Q-M-N-S-L-R-A-E-D-T-A-V-Y-Y-C- X_{31} -R (SEQ ID NO:145)，其中：

X_{11} 為N或S；且

X_{31} 為A或S；

重鏈架構-4 (H-FR4)：W-G-Q-G-T-L-V-T-V-S-S (SEQ ID NO:146)；

輕鏈架構-1 (L-FR1)：

D-I-Q-M-T-Q-S-P-S-S-L-S-A-S-V-G-D-R-V-T-I-T-C (SEQ ID NO:147)；

輕鏈架構-2 (L-FR2)：W-Y-Q-Q-K-P-G-K- X_9 -P-K-L-L-I- X_{15} (SEQ ID NO:148)，其中：

X_9 為A或S；且

X_{15} 為F或Y；

輕鏈架構-3 (L-FR3)：

G-V-P-S-R-F-S-G-S-G-S-G-T-D-X₁₅-T-L-T-I-S-S-L-Q-P-E-D-F-A-T-Y-Y-C (SEQ ID NO:149)，其中：

X₁₅為F或S；且

輕鏈架構-4 (L-FR4)：F-G-Q-G-T-K-L-E-I-K (SEQ ID NO:150)。

在一較佳實施例中，本發明之結合DLL4的抗體係使用由上述H-FR1、H-FR2、H-FR3、H-FR-4、L-FR1、L-FR2、L-FR3及L-FR4受體序列組成之一組人類受體序列進行人類化。

如本文所使用之術語「生殖系抗體基因」或「基因片段」係指由未經歷會引起基因重組及突變以表現特定免疫球蛋白之成熟過程的非淋巴細胞所編碼之免疫球蛋白序列。(參看例如Shapiro等人，*Crit. Rev. Immunol.*, 22(3): 183-200 (2002)；Marchalonis等人，*Adv. Exp. Med. Biol.*, 484:13-30 (2001))。本發明之各種實施例所提供之一個優勢係基於以下認知：生殖系抗體基因比成熟抗體基因更有可能保留物種中個體之特徵性必需胺基酸序列結構，因此當用於治療該物種時，被識別為來自外來來源之可能性較小。

如本文中所使用之術語「關鍵殘基」係指可變區內對抗體(尤其人類化抗體)之結合特異性及/或親和力具有較大影響的某些殘基。關鍵殘基包括但不限於以下中之一或更多者：與CDR相鄰之殘基、潛在糖基化位點(可為N-或O-糖

基化位點)、稀有殘基、能夠與抗原相互作用之殘基、能夠與CDR相互作用之殘基、典型殘基、重鏈可變區與輕鏈可變區之間的接觸殘基、Vernier區內之殘基，及Chothia所定義之可變重鏈CDR1與Kabat所定義之第一重鏈架構之間重疊之區域中的殘基。

如本文中所使用之「Vernier」區係指如Foote及Winter (*J. Mol. Biol.*, 224: 487-499 (1992))所述之可調節CDR結構並微調與抗原之配合的架構殘基之子集。Vernier區殘基形成處於CDR下方之層，且可影響CDR結構及抗體親和力。

如本文所使用之術語「中和」係指當結合蛋白特異性結合抗原時抵消該抗原之生物活性。在一實施例中，中和結合蛋白結合抗原且使該抗原之生物學活性降低至少約20%、40%、60%、80%、85%、90%、95%或95%以上。

術語「活性」包括諸如以下活性：抗體對抗原之結合特異性/親和力，例如，抗hDLL4抗體結合DLL4抗原；及/或抗體之中和效能，或抗hDLL4抗體，其與hDLL4結合將抑制hDLL4之生物活性，例如在人類Notch受體結合分析或PHA母細胞干擾素- γ 誘導分析中PHA母細胞增殖之抑制或受體結合之抑制。

術語「抗原決定基」包括特異性結合至免疫球蛋白或T-細胞受體之任何多肽決定子。在某些實施例中，抗原決定基決定子包括化學活性表面分子團，諸如胺基酸、糖側鏈、磷醯基或磺醯基，且在某些實施例中，其可具有特定三維結構特徵及/或特定電荷特徵。抗原決定基為抗原中

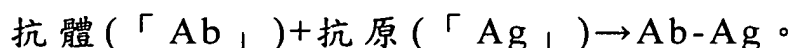
抗體結合之區域。因而，抗原決定基由抗原(或其片段)中已知結合至特異性結合搭配物上之互補位點之區域之胺基酸殘基組成。抗原或抗原片段可含有一個以上抗原決定基。因而，熟習此項技術者應瞭解，抗體分子之每個「抗原結合位點」結合抗原分子之一個抗原決定基，且每個抗原分子可具有一個、兩個、若干個或許多個抗原決定基。此外，熟習此項技術者應瞭解，針對一個抗原分子之兩個經獨立分離之抗體可結合於該抗原分子上之同一抗原決定基或兩個不同抗原決定基。

在某些實施例中，當抗體在蛋白質及/或大分子之複雜混合物中識別出其靶抗原時，稱為該抗體特異性結合抗原。若抗體交叉競爭(一抗體阻止另一抗體之結合或調節效應)，則該等抗體稱為「結合至同一抗原決定基」。另外，抗原決定基之結構定義(重疊、相似、相同)可提供資訊，但功能定義通常更具重要意義，因為其涵蓋結構(結合)及功能(調節、競爭)參數。

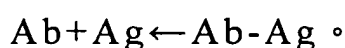
如本文所用之術語「表面電漿子共振」係指一種允許藉由偵測生物傳感器基質內蛋白質濃度之變化來分析即時生物特異性相互作用的光學現象，例如使用BIAcore®系統(BIAcore International AB、GE Healthcare company, Uppsala, Sweden及Piscataway, New Jersey, US)。關於進一步描述，參看Jönsson等人，*Ann. Biol. Clin.*, 51: 19-26 (1993)；Jönsson等人 *BioTechniques*, 11: 620-627 (1991)；Johnsson等人，*J. Mol. Recognit.*, 8: 125-131 (1995)；及

Johnsson 等人, *Anal. Biochem.*, 198: 268-277 (1991)。

如本文所使用之術語「 K_{on} 」意欲指結合蛋白(例如抗體)締合至同源搭配物(例如抗原)以形成結合搭配物/同源搭配物(例如抗體/抗原)複合物的締合速率常數，如此項技術已知。「 K_{on} 」亦稱為術語「締合速率常數」或「 k_a 」，其在本文中可互換使用。此值指示抗體與其靶抗原之締合速率或抗體與抗原之間的複合物形成速率，亦如以下方程式所示：



如本文所使用之術語「 K_{off} 」意欲指結合蛋白(例如抗體)自(例如)抗體/抗原複合物解離之解離速率常數，如此項技術已知。「 K_{off} 」亦稱為術語「解離速率常數」或「 k_d 」，其在本文中可互換使用。此值指示抗體自其靶抗原之解離速率或Ab-Ag複合物隨時間分離成游離抗體及抗原，如以下方程式所示：



如本文中可互換使用之術語「平衡解離常數」或「 K_D 」係指處於平衡時之滴定量測所獲得之值或藉由解離速率常數(K_{off})除以締合速率常數(K_{on})所獲得之值。締合速率常數、解離速率常數及平衡解離常數用於表示抗體對抗原之結合親和力。測定締合及解離速率常數之方法在此項技術中為熟知的。使用基於螢光之技術提供高敏感度且能夠檢查在生理學緩衝液中處於平衡態之樣本。可使用其他實驗方法及儀器，諸如BIAcore®表面電漿子共振(生物分子互

相作用分析)分析(例如,可獲自BIAcore International AB, GE Healthcare company, Uppsala, Sweden的儀器)。另外,亦可使用獲自Sapidyne Instruments(Boise, Idaho)之KinExA®(動力學排除分析, Kinetic Exclusion Assay)分析。

「標記」及「可偵測標記」意謂連接至特異性結合搭配物(諸如抗體或抗體所結合之分析物)以(例如)使特異性結合對之成員間(諸如抗體與分析物)之反應可偵測的部分。經如此標記之特異性結合搭配物(例如抗體或分析物)稱為「經可偵測標記」。因而,如本文中所使用之術語「經標記之結合蛋白」係指併有可達成結合蛋白之鑑別之標記的蛋白質。在一實施例中,標記為會產生可藉由視力或儀器方式偵測之信號的可偵測標記物,例如,併入經放射性標記之胺基酸或連接至可由經標記之抗生物素(例如,含有可藉由光學法或比色法偵測之螢光標記物或酶活性的抗生物素或抗生蛋白鏈菌素)偵測之生物素部分之多肽。多肽標記之實例包括但不限於以下:放射性同位素或放射性核素(例如, ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 或 ^{153}Sm);色素原、螢光標記(例如,FITC、若丹明(rhodamine)及鐳系元素磷光體)、酶標記(例如,辣根過氧化酶、螢光素酶、鹼性磷酸酶);化學發光標記物;生物素基;由第二報導子識別之預定多肽抗原決定基(例如,白胺酸拉鏈對序列、二次抗體之結合位點、金屬結合域及抗原決定基標籤);及磁性劑,諸如釷螯合物。

常用於免疫分析之標記的代表性實例包括：產生光之部分，例如吡啶鎘化合物；及產生螢光之部分，例如螢光素。其他標記為此項技術中已知的或描述於本文中。就此而論，該部分本身可能未經可偵測標記，但可在與另一部分反應後變得可偵測。使用「經可偵測標記」意欲涵蓋後一種類型之可偵測標記。

術語「抗體結合物」係指與諸如治療劑或細胞毒性劑之第二化學部分化學連接的結合蛋白，諸如抗體。術語「劑」在本文中用於表示化合物、化合物之混合物、生物大分子或由生物材料製成之萃取物。治療劑或細胞毒性劑較佳包括但不限於百日咳毒素(pertussis toxin)、紫杉醇、細胞鬆弛素B(cytochalasin B)、短桿菌肽D(gramicidin D)、溴化乙錠、吐根素(emetine)、絲裂黴素(mitomycin)、依託泊苷(etoposide)、特諾波賽(tenoposide)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、秋水仙鹼(colchicine)、小紅莓、道諾黴素(daunorubicin)、二羥基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神黴素(mithramycin)、放線菌素D(actinomycin D)、1-脫氫鞣固酮、糖皮質激素、普魯卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛爾(propranolol)及嘌呤黴素以及其類似物或同系物。

如本文中所使用之術語「晶體」及「結晶」係指以晶體形式存在之結合蛋白(例如抗體)或其抗原結合部分。晶體為固態物質之一種形式，其不同於諸如非晶形固態或液晶

態之其他形式。晶體係由原子、離子、分子(例如蛋白質, 諸如抗體)或分子組裝體(例如, 抗原/抗體複合物, 包括Fab/抗原複合物)之規則重複三維陣列構成。此等三維陣列係根據該領域中充分瞭解之特定數學關係排列。晶體中重複之基本單元或構建組塊稱為不對稱單元。不對稱單元以符合定義明確之指定晶體學對稱性的排列重複將提供晶體之「單位晶胞」。單位晶胞藉由在所有三個維向中有規則地平移而重複產生晶體。參看Giegé等人, **Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach**, 第2版, (Ducruix及Giegé編) (Oxford University Press, New York, 1999), 第1章, 第1-16頁。

術語「聚核苷酸」意謂兩個或兩個以上核苷酸(核糖核苷酸或脫氧核糖核苷酸或者任一類型核苷酸之經修飾形式)之聚合形式。該術語包括DNA之單股及雙股形式。

術語「經分離聚核苷酸」應意謂一種聚核苷酸(例如, 來源於基因組、cDNA或合成, 或其某種組合), 根據其來源, 該「經分離聚核苷酸」不與在自然界中發現與其在一起之聚核苷酸之所有部分或一部分締合; 可操作地連接至在自然界中不與其連接之聚核苷酸; 或在自然界中不作為較大序列之部分存在。

術語「載體」意欲指一種核酸分子, 其能夠輸送已與其連接之另一核酸。一種類型之載體為「質體」, 其係指可接合其他DNA區段之環狀雙股DNA環。另一類型之載體為病毒載體, 其中其他DNA區段可接合至病毒基因組中。某

些載體能夠在其所引入之宿主細胞中自主複製(例如具有細菌複製起點之細菌載體及游離型哺乳動物載體)。其他載體(例如，非游離型哺乳動物載體)可在引入宿主細胞之後整合至該宿主細胞基因組中，從而與宿主基因組一起複製。此外，某些載體能夠引導其可操作地連接之基因之表現。該等載體在本文中稱為「重組表現載體」(或簡稱為「表現載體」)。一般而言，適用於重組DNA技術中之表現載體通常呈質體形式。由於質體為最常用之載體形式，所以「質體」與「載體」在本說明書中可互換使用。然而，本發明意欲包括起等效作用之如下其他形式之表現載體，諸如病毒載體(例如，複製缺陷型逆轉錄病毒、腺病毒及腺相關病毒)。RNA型式之載體(包括RNA病毒載體)亦可用於本發明中。

術語「可操作地連接」係指所述組分處於允許其以其預定方式起作用之關係中的拼接。控制序列「可操作地連接」至編碼序列係以在與控制序列相容之條件下達成編碼序列之表現的方式接合。「可操作地連接」之序列包括與相關基因相連之表現控制序列、反式作用(亦即，位於與相關基因不同之核酸分子上)之表現控制序列，以及與相關基因位於同一核酸分子上但與其存在一定距離的表現控制序列。如本文中所使用之術語「表現控制序列」係指實現其所接合之編碼序列之表現及加工所必需的聚核苷酸序列。表現控制序列包括適當轉錄起始序列、終止序列、啟動子序列及強化子序列；有效RNA加工信號，諸如拼接及

聚腺苷酸化信號；使細胞質 mRNA 穩定之序列；增強轉譯效率之序列(亦即，Kozak 共同序列)；增強蛋白質穩定性之序列；及必要時增加蛋白質分泌之序列。該等控制序列之性質視宿主生物體而不同；在原核生物中，該等控制序列一般包括啟動子、核糖體結合位點及轉錄終止序列；在真核生物中，該等控制序列一般包括啟動子及轉錄終止序列。術語「控制序列」意欲包括存在為表現及加工所必需之組分，且亦可包括存在具有益處之其他組分，例如前導序列及融合搭配物序列。

「轉型」係指外源性核酸(例如 DNA 分子)藉以進入宿主細胞之任何過程。轉型可在天然或人工條件下使用此項技術熟知之各種方法進行。轉型可依賴用於向原核生物或真核生物宿主細胞中插入外來核酸序列之任何已知方法。該方法係基於所轉型之宿主細胞而選擇，且可包括但不限於質體攝取通過細胞膜、病毒感染、電穿孔、脂質體轉染及粒子轟擊。該等「轉型」細胞包括所插入之 DNA 能夠作為自主複製質體或宿主染色體之一部分來複製的穩定轉型細胞。其亦包括在有限時段內暫時表現所插入之 DNA 或 RNA 的細胞。

術語「重組宿主細胞」(或簡稱為「宿主細胞」)意欲指已引入外源 DNA 之細胞。在一實施例中，宿主細胞包含兩個或兩個以上(例如多個)編碼抗體之核酸，諸如，作為非限制性實例，美國專利第 7,262,028 號中所述之宿主細胞。該等術語不僅意欲指特定個體細胞，且亦指該種細胞之子

代。由於可能因突變或環境影響而在繼代中出現某些修飾，因此該子代實際上可能與母細胞不相同，但仍包括在如本文中所使用之術語「宿主細胞」之範疇內。在一實施例中，宿主細胞包括選自生物王國之任一者之原核生物及真核生物細胞。在另一實施例中，真核生物細胞包括原生生物細胞、真菌細胞、植物細胞及動物細胞。在另一實施例中，宿主細胞包括但不限於原核生物物種，諸如大腸桿菌；哺乳動物細胞株，諸如 CHO、HEK 293、COS、NS0、SP2 及 PER.C6；昆蟲細胞株 Sf9；及真菌細胞物種，諸如釀酒酵母。

重組 DNA、寡核苷酸合成以及組織培養及轉型(例如，電穿孔、脂質體轉染)可使用標準技術。酶促反應及純化技術可根據製造商之說明書執行或如此項技術中通常所實現或如本文中所述執行。上述技術及程序一般可根據此項技術中熟知之習知方法且如本說明書通篇所引用及論述之各種一般及較為具體之參考文獻中所述來執行。參看例如 Sambrook 等人，**Molecular Cloning: A Laboratory Manual**，第2版(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989)。

如此項技術已知之「轉殖基因生物體」係指具有含有轉殖基因之細胞的生物體，其中引入生物體(或生物體祖先)中之轉殖基因表現在天然條件下該生物體中不表現之多肽。「轉殖基因」為 DNA 構築體，其穩定且可操作地整合至發育成轉殖基因生物體之細胞之基因組中，從而引導編

碼基因產物於轉殖基因生物體之一或多種細胞類型或組織中表現。

術語「調控」與「調節」可互換使用，且如本文中所使用，其係指相關分子之活性(例如，hDLL4之生物活性)的改變或變化。調節可為相關分子之某一活性或功能之量值的增加或降低。分子之例示性活性及功能包括但不限於結合特徵、酶活性、細胞受體活化及信號轉導。

相應地，如本文中所使用之術語「調節劑」為能夠使相關分子之活性或功能(例如，hDLL4之生物活性)改變或變化的化合物。舉例而言，調節劑可使分子之某一活性或功能之量值相較於不存在該調節劑時所觀察到之活性或功能之量值有所增加或降低。在某些實施例中，調節劑為抑制劑，其降低分子之至少一種活性或功能之量值。例示性抑制劑包括但不限於蛋白質、肽、抗體、肽體(peptibody)、碳水化合物或小有機分子。肽體已有描述。參看例如PCT公開案第WO 01/83525號。

如本文中所使用之術語「促效劑」係指當與相關分子接觸時使該分子之某一活性或功能之量值相較於不存在該促效劑時所觀察到之活性或功能之量值有所增加的調節劑。相關特定促效劑可包括但不限於Notch信號傳導路徑之成員、DLL4多肽及核酸、碳水化合物，或結合DLL4之任何其他分子。

如本文中所使用之術語「拮抗劑」或「抑制劑」係指當與相關分子接觸時使該分子之某一活性或功能之量值相較

於不存在該拮抗劑時所觀察到之活性或功能之量值有所降低的調節劑。相關特定拮抗劑包括阻斷或調節DLL4，尤其人類DLL4(hDLL4)之生物活性或免疫活性的彼等拮抗劑。hDLL4之拮抗劑及抑制劑可包括但不限於蛋白質、核酸、碳水化合物或結合hDLL4及/或齧齒動物DLL4之任何其他分子。

如本文中所使用之術語「有效量」係指足以達成以下各者之療法之量：降低或改善病症或其一或多種症狀之嚴重程度及/或持續時間；抑制或防止病症進展；使病症消退；抑制或防止與病症相關之一或多種症狀復發、發展、發作或進展；偵測病症；或增強或改良另一療法(例如預防劑或治療劑)之預防或治療效果。

「患者」及「個體」在本文中可互換使用以指動物，諸如哺乳動物，包括靈長類動物(例如人類、猴及黑猩猩)、非靈長類動物(例如牛、豬、駱駝、駱馬、馬、山羊、兔、綿羊、倉鼠、豚鼠、貓、犬、大鼠、小鼠及鯨)、禽類(例如鴨或鵝)及鯊魚。患者或個體較佳為人類，諸如正進行疾病、病症或病狀之治療或評估的人類；處於疾病、病症或病狀之風險中的人類；患有疾病、病症或病狀的人類；及/或正進行疾病、病症或病狀之治療的人類。患者或個體更佳正進行癌症或其他疾病之治療或評估，其中所存在之異常DLL4表現促進該癌症或其他疾病，且需要抑制或破壞DLL4活性以治療癌症或其他疾病。

如本文中所使用之術語「樣本」係以其最廣泛意義加以

使用。如本文中所使用之「生物樣本」包括但不限於來自活物或先前為活物的任何量之物質。該等活物包括但不限於人類、小鼠、大鼠、猴、犬、兔及其他動物。該等物質包括但不限於血液(例如全血)、血漿、血清、尿、羊水、滑液、內皮細胞、白血球、單核細胞、其他細胞、器官、組織、骨髓、淋巴結及脾。

「組分」及「至少一種組分」一般係指根據本文所述之方法及此項技術已知之其他方法，可包括在測試樣本(諸如患者之尿、血清或血漿樣本)之分析套組中的捕捉抗體、偵測或結合抗體、對照、校準劑、一系列校準劑、敏感度套組、容器、緩衝液、稀釋劑、鹽、酶、酶之輔因子、偵測試劑、預處理試劑/溶液、受質(例如呈溶液形式)、終止溶液及其類似物。因而，在本發明之上下文中，「至少一種組分」及「組分」可包括多肽或上文之其他分析物，諸如包含諸如多肽之分析物的組合物，其視情況固定於固體支撐物上，諸如藉由結合至抗分析物(例如抗多肽)抗體。一些組分可呈溶液形式或經凍乾以便在用於分析時復原。

「風險」係指特定事件在目前或在未來某一時間點發生的可能性或機率。「風險分層」係指允許醫師將患者分類為患上特定疾病、病症或病狀之低、中、高或最高風險的已知臨床風險因素陣列。

在特異性結合對之成員(例如抗原或其片段與抗體或其抗原結合片段)間相互作用的情況下，「特異性」係指相

互作用之選擇性反應性。片語「特異性結合至」及類似片語係指結合蛋白，諸如抗體(或其抗原結合片段)能夠特異性結合至相關分子(或其片段)而不特異性結合至其他實體。

「特異性結合搭配物」為特異性結合對之成員。特異性結合對包含經由化學或物理方式彼此特異性結合的兩個不同分子。因此，除抗原及抗體特異性結合對以外，其他特異性結合對可包括生物素與抗生物素(或抗生蛋白鏈菌素)、碳水化合物與植物凝集素(lectins)、互補核苷酸序列、效應分子與受體分子、輔因子與酶、酶抑制劑與酶，及其類似物。此外，特異性結合對可包括原始特異性結合成員類似物的成員，例如分析物-類似物。免疫反應性特異性結合成員包括抗原、抗原片段及抗體，包括單株及多株抗體以及其複合物、片段及變異體(包括變異體片段)，無論經分離或重組產生。

本文所使用之「變異體」意謂藉由胺基酸添加(例如插入)、缺失或保守性取代使胺基酸序列不同於指定多肽(例如DLL4多肽或抗DLL4抗體)但保留指定多肽之生物活性的多肽(例如，若變異DLL4保留野生型DLL4之原始抗體結合位點(抗原決定基)，則變異DLL4可與野生型DLL4競爭結合抗DLL4抗體)。此項技術中認為胺基酸之保守性取代，亦即一個胺基酸經具有相似性質(例如親水性以及帶電區之程度及分佈)之不同胺基酸置換，通常涉及微小變化。如此項技術中所瞭解，此等微小變化可部分地藉由考慮胺

基酸之親水指數來鑑別(參看例如 Kyte 等人, *J. Mol. Biol.*, 157: 105-132 (1982))。胺基酸之親水指數係基於其疏水性及電荷之考慮。此項技術中已知相似親水指數之胺基酸可取代而仍保留蛋白質功能。在一態樣中, 親水指數 ± 2 之胺基酸經取代。胺基酸之親水性亦可用於揭露會保留蛋白質生物功能之取代。考慮肽之胺基酸之親水性允許計算該肽之最大局部平均親水性, 已報導其為一種與抗原性及免疫原性密切相關之有用測量(參看例如美國專利第4,554,101號)。具有相似親水性值之胺基酸之取代可產生保留生物活性(例如免疫原性)之肽, 如此項技術中所理解。在一態樣中, 以彼此之親水性值在 ± 2 以內之胺基酸進行取代。胺基酸之疏水性指數及親水性值均受該胺基酸之特定側鏈影響。與該觀察一致, 已知與生物功能相容之胺基酸取代取決於胺基酸之相對相似性, 尤其胺基酸側鏈之相對相似性, 如疏水性、親水性、電荷、大小及其他性質所揭露。

「變異體」亦可用於描述已藉由諸如蛋白質水解、磷酸化或其他轉譯後修飾加以差異化加工但仍保留其生物活性或抗原反應性(例如結合DLL4之能力)的多肽或其片段。除非另有相悖論述, 否則本文中使用的「變異體」意欲涵蓋變異體之片段。

如本文中所使用之術語「樣本」係以其最廣泛意義使用。如本文中所使用之「生物樣本」包括但不限於來自活物或先前為活物之任何量之物質。該等活物包括但不限於人類、小鼠、大鼠、猴、犬、兔及其他動物。該等物質包

括但不限於血液、血清、尿、滑液、細胞、器官、組織、骨髓、淋巴結及脾。

I. 結合人類DLL4之抗體

本發明之一個態樣提供以高親和力、慢解離速率及/或高中和能力結合DLL4的經分離大鼠單株抗體或其抗原結合部分。本發明之另一態樣提供結合DLL4之嵌合抗體。在另一態樣中，本發明提供結合DLL4之CDR移植抗體或其抗原結合部分。本發明之另一態樣提供結合DLL4之人類化抗體或其抗原結合部分。在一實施例中，抗體或其部分為經分離抗體或其經分離部分。在另一實施例中，本發明之抗體或其抗原結合部分為中和抗DLL抗體。該等結合DLL4之抗體或其抗原結合部分宜用作可投與個體(人類或其他哺乳動物)之治療劑。本發明之抗體或其抗原結合部分較佳為中和抗DLL4抗體及/或抗VEGFR2抗體。

A. 製造抗DLL4抗體之方法

本發明之抗體可藉由此項技術已知之諸多技術中之任一者來製造。下文描述可用於獲得本發明之DLL4單株抗體的各種技術之態樣。

1. 使用融合瘤技術產生抗DLL4單株抗體

可使用此項技術已知之多種技術製備單株抗體，包括使用融合瘤、重組及噬菌體呈現技術或其組合。舉例而言，可使用融合瘤技術產生單株抗體，包括此項技術已知及例如以下文獻中所教示之彼等技術：Harlow等人，**Antibodies: A Laboratory Manual**，第2版，(Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988) ; Hammerling, 等人, **Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas**, (Elsevier, New York, 1981) (該等參考文獻係以全文引用的方式併入本文中)。亦應注意, 如本文所使用之術語「單株抗體」不限於經由融合瘤技術產生之抗體。術語「單株抗體」係指來源於單一純系(包括任何真核、原核或噬菌體純系)的抗體而非其產生方法。

在一實施例中, 本發明提供產生單株抗體之方法以及由該方法產生之抗體, 該方法包括培養分泌本發明抗體之融合瘤細胞, 其中較佳該融合瘤係藉由以下步驟產生: 使自用DLL4免疫之動物(例如大鼠或小鼠)分離的脾細胞與骨髓瘤細胞融合; 接著, 自融合產生之融合瘤中篩選出分泌能夠結合本發明多肽之抗體的融合瘤純系。簡而言之, 可用DLL4抗原對大鼠進行免疫(參見下文之實例)。在一較佳實施例中, DLL4抗原與佐劑一起投藥以刺激免疫反應。該等佐劑包括完全或不完全弗氏佐劑(complete or incomplete Freund's adjuvant)、RIBI(胞壁醯二肽)或ISCOM(免疫刺激複合物)。該等佐劑可藉由將多肽螯合於局部沈積物中來保護該多肽以免快速分散, 或其可含有刺激宿主分泌對巨噬細胞及免疫系統之其他組分具有趨化性之因子的物質。較佳地, 若投與多肽, 則免疫時程將包括投與該多肽兩次或兩次以上, 持續數週; 然而亦可使用單次投與該多肽。

用DLL4抗原對動物進行免疫後, 可自動物獲得抗體及/或抗體產生細胞。藉由採血或處死動物自動物中獲得含抗

DLL4抗體之血清。血清可以自動物中獲得之原樣使用，可自血清獲得免疫球蛋白部分或可自血清純化抗DLL4抗體。以此方式獲得之血清或免疫球蛋白為多株物，因而具有一組不同性質。

一旦偵測到免疫反應，例如在大鼠血清中偵測到對抗原DLL4具有特異性之抗體，即收集大鼠之脾並分離脾細胞。接著，由熟知技術使脾細胞融合至任何適合骨髓瘤細胞，例如來自可獲自美國菌種保存中心(American Type Culture Collection)(ATCC, Manassas, Virginia, US)之細胞株SP20之細胞。選擇融合瘤並藉由限制稀釋法選殖。接著，針對分泌能夠結合DLL4之抗體的細胞，藉由此項技術已知之方法分析融合瘤純系。可藉由用陽性融合瘤純系對大鼠進行免疫來產生一般含有高抗體含量的腹水。

在另一實施例中，可由經免疫之動物製備產生抗體之永生融合瘤。免疫後，處死動物且使脾B細胞融合至永生融合骨髓瘤細胞，如此項技術中所熟知。參看例如Harlow及Lane，同上文。在一較佳實施例中，骨髓瘤細胞不分泌免疫球蛋白多肽(非分泌性細胞株)。融合及抗生素選擇後，使用DLL4或其部分或者表現DLL4之細胞篩選融合瘤。在一較佳實施例中，初始篩選係使用酶聯免疫吸附分析(ELISA)或放射免疫分析(RIA)來執行，ELISA較佳。在PCT公開案第WO 00/37504號中提供ELISA篩選之實例。

選擇產生抗DLL4抗體之融合瘤，選殖並進一步針對包括旺盛融合瘤生長、高抗體產量及所要抗體特徵之所要特

徵進行篩選，如下文進一步論述。融合瘤可在同系動物、缺乏免疫系統之動物(例如裸鼠)中活體內或在細胞培養物中活體外培養並擴增。選擇、選殖及擴增融合瘤之方法為一般熟習此項技術者所熟知。

在一較佳實施例中，融合瘤為如本文所述之大鼠融合瘤。在另一實施例中，融合瘤於非人類、非大鼠物種中，諸如小鼠、綿羊、豬、山羊、牛或馬中產生。在另一較佳實施例中，融合瘤為人類融合瘤，其中人類非分泌性骨髓瘤與表現抗DLL4抗體之人類細胞融合。

可藉由已知技術產生識別特異性抗原決定基之抗體片段。舉例而言，可藉由免疫球蛋白分子之蛋白質水解裂解，使用諸如木瓜蛋白酶(以產生兩個相同Fab片段)或胃蛋白酶(以產生F(ab')₂片段)之酶來產生本發明之Fab及F(ab')₂片段。IgG分子之F(ab')₂片段保留較大(「親本」)IgG分子之兩個抗原結合位點，包括兩個輕鏈(含有可變輕鏈區及恆定輕鏈區)、重鏈CH1結構域及親本IgG分子之形成二硫鍵之鉸鏈區。因此，F(ab')₂片段仍能夠如親本IgG分子般交聯抗原分子。

2. 使用SLAM產生抗DLL4單株抗體

在本發明之另一態樣中，使用此項技術中稱為選擇淋巴細胞抗體法(SLAM)之程序由單一經分離淋巴細胞產生重組抗體，如以下文獻中所述：美國專利第5,627,052號；PCT公開案第WO 92/02551號；及Babcook等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7843-7848 (1996)。在此方法中，使用

抗原特異性溶血空斑分析篩選分泌相關抗體之單細胞(例如，來源於I.A.1部分(上文)中所述之任一經免疫動物的淋巴細胞)，其中抗原DLL4、DLL4之亞單元或其片段係使用諸如生物素之連接子偶合至綿羊紅血球且用於鑑別分泌DLL4特異性抗體之單細胞。鑑別相關抗體分泌細胞後，藉由逆轉錄酶PCR(RT-PCR)自該等細胞取得重鏈及輕鏈可變區cDNA，接著在適當免疫球蛋白恆定區(例如人類恆定區)之情況下，此等可變區可於諸如COS或CHO細胞之哺乳動物宿主細胞中表現。接著，可在活體外例如藉由淘選經轉染之細胞以分離表現針對DLL4之抗體的細胞來進一步分析及選擇以來源於活體內選擇之淋巴細胞之經擴增之免疫球蛋白序列轉染的宿主細胞。可在活體外諸如藉由活體外親和力成熟法進一步處理經擴增之免疫球蛋白序列。參看例如PCT公開案第WO 97/29131號及PCT公開案第WO 00/56772號。

3. 使用轉殖基因動物產生抗DLL4單株抗體

在本發明之另一實施例中，藉由用DLL4抗原對包含一些或所有人類免疫球蛋白基因座之非人類動物進行免疫來產生抗體。在一實施例中，非人類動物為XENOMOUS®轉殖基因小鼠，其為包含人類免疫球蛋白基因座之大片段且小鼠抗體產生不足之經工程改造之小鼠品系。參看例如Green等人，*Nature Genetics*, 7: 13-21 (1994)；及美國專利第5,916,771號；第5,939,598號；第5,985,615號；第5,998,209號；第6,075,181號；第6,091,001號；第6,114,598

號；及第6,130,364。亦參看PCT公開案第WO 91/10741號；第WO 94/02602號；第WO 96/34096號；第WO 96/33735號；第WO 98/16654號；第WO 98/24893號；第WO 98/50433號；第WO 99/45031號；第WO 99/53049號；第WO 00/09560號；及第WO 00/37504。XENOMOUSE®轉殖基因小鼠產生完全人類抗體之成人樣人類譜系，且產生抗原特異性人類單株抗體。XENOMOUSE®轉殖基因小鼠經由引入人類重鏈基因座及x輕鏈基因座之百萬鹼基(megabase)長度的生殖系構型YAC片段而含有約80%人類抗體譜系。參看Mendez等人，*Nature Genetics*, 15: 146-156 (1997)；Green及Jakobovits, *J. Exp. Med.*, 188: 483-495 (1998)，該等文獻之揭示內容係以引用的方式併入本文中。

4. 使用重組抗體庫產生抗DLL4單株抗體

亦可使用活體外方法製造本發明之抗體，其中篩選抗體庫以鑑別具有所要DLL4結合特異性之抗體。該篩選重組抗體庫之方法在此項技術中為熟知的，且包括例如以下文獻中所述之方法：美國專利第5,223,409號(Ladner等人)；PCT公開案第WO 92/18619號(Kang等人)；PCT公開案第WO 91/17271(Dower等人)；PCT公開案第WO 92/20791(Winter等人)；PCT公開案第WO 92/15679(Markland等人)；PCT公開案第WO 93/01288(Breitling等人)；PCT公開案第WO 92/01047(McCafferty等人)；PCT公開案第WO 92/09690(Garrard等人)；Fuchs等人，*Bio/Technology*, 9:

1369-1372 (1991) ; Hay 等人, *Hum. Antibod. Hybridomas*, 3: 81-85 (1992) ; Huse 等人, *Science*, 246: 1275-1281 (1989) ; McCafferty 等人, *Nature*, 348: 552-554 (1990) ; Griffiths 等人, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993) ; Hawkins 等人, *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) ; Clackson 等人, *Nature*, 352: 624-628 (1991) ; Gram 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992) ; Garrard 等人, *Bio/Technology*, 9: 1373-1377 (1991) ; Hoogenboom 等人, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991) ; Barbas 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991) ; 美國專利申請公開案第 2003/0186374 號 ; 及 PCT 公開案第 WO 97/29131 號 , 各文獻之內容係以引用的方式併入本文中。

重組抗體庫可來自用 DLL4 或 DLL4 之一部分免疫之個體。或者，重組抗體庫可來自天然個體，亦即尚未用 DLL4 免疫之個體，諸如來自尚未用人類 DLL4 免疫之人類個體之人類抗體庫。藉由用包含人類 DLL4 之肽篩選重組抗體庫藉此選擇識別 DLL4 之彼等抗體來選擇本發明之抗體。進行該篩選及選擇之方法為此項技術中所熟知，諸如先前段落中之參考文獻中所述。為選擇對 DLL4 具有特定結合親和力之本發明抗體，諸如以特定 k_{off} 速率常數與人類 DLL4 解離之抗體，可使用此項技術已知之表面電漿子共振法選擇具有所要 k_{off} 速率常數之抗體。為選擇對 DLL4 具有特定中和活性之本發明抗體，諸如具有特定 IC_{50} 之抗體，可使用此項技術已知之標準方法來評定對 DLL4 活性

之抑制。

在一態樣中，本發明係關於一種結合人類DLL4之經分離抗體或其抗原結合部分。該抗體較佳為中和抗體。在各種實施例中，抗體為重組抗體或單株抗體。

舉例而言，本發明之抗體亦可使用此項技術中已知之各種噬菌體呈現法來產生。在噬菌體呈現法中，功能抗體結構域呈現於噬菌體粒子之表面上，該等噬菌體粒子帶有編碼該等結構域之聚核苷酸序列。該噬菌體可用於呈現由譜系或組合抗體庫(例如人類或鼠類)表現之抗原結合域。可用抗原，例如使用經標記抗原或者結合至或捕獲於固體表面或珠粒之抗原來選擇或鑑別表現結合相關抗原之抗原結合域的噬菌體。該等方法中所使用之噬菌體通常為絲狀噬菌體，其包括由Fab、Fv或經二硫鍵穩定之Fv抗體結構域重組式融合至噬菌體基因III或基因VIII蛋白質之噬菌體所表現之fd及M13結合域。可用於製造本發明抗體之噬菌體呈現法之實例包括以下文獻中所揭示之彼等方法：Brinkmann等人，*J. Immunol. Methods*, 182: 41-50 (1995)；Ames等人，*J. Immunol. Methods*, 184:177-186 (1995)；Kettleborough等人，*Eur. J. Immunol.*, 24: 952-958 (1994)；Persic等人，*Gene*, 187: 9-18 (1997)；Burton等人，*Advances in Immunology*, 57: 191-280 (1994)；PCT公開案第WO 92/01047號；PCT公開案第WO 90/02809號；第WO 91/10737號；第WO 92/01047號；第WO 92/18619號；第WO 93/11236號；第WO 95/15982號；第WO 95/20401號；

及美國專利第 5,698,426 號；第 5,223,409 號；第 5,403,484 號；第 5,580,717 號；第 5,427,908 號；第 5,750,753 號；第 5,821,047 號；第 5,571,698 號；第 5,427,908 號；第 5,516,637 號；第 5,780,225 號；第 5,658,727 號；第 5,733,743 號；及第 5,969,108 號。

如以上參考文獻中所述，在噬菌體選擇後，可自噬菌體分離抗體編碼區並用於產生包括人類抗體或任何其他所要抗原結合片段之全抗體，且例如如下文詳細描述，於包括哺乳動物細胞、昆蟲細胞、植物細胞、酵母及細菌之任何所要宿主中表現。舉例而言，亦可採用重組產生 Fab、Fab' 及 F(ab')₂ 片段之技術，使用此項技術中已知之方法，諸如下文獻中所揭示之彼等方法：PCT 公開案第 WO 92/22324 號；Mullinax 等人，*BioTechniques*, 12(6): 864-869 (1992)；Sawai 等人，*Am. J. Reprod. Immunol.*, 34: 26-34 (1995)；及 Better 等人，*Science*, 240: 1041-1043 (1988)。可用於產生單鏈 Fv 及抗體之技術之實例包括以下文獻中所述之彼等技術：美國專利第 4,946,778 號及第 5,258,498 號；Huston 等人，*Methods in Enzymology*, 203: 46-88 (1991)；Shu 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7995-7999 (1993)；及 Skerra 等人，*Science*, 240: 1038-1041 (1988)。

可應用此項技術已知之篩選大型組合庫之其他方法替代藉由噬菌體呈現篩選重組抗體庫來鑑別本發明之抗體。一類替代性表現系統為將重組抗體庫表現為 RNA-蛋白質融合物之表現系統，如以下文獻中所述：PCT 公開案第 WO

98/31700號(Szostak及Roberts)，及Roberts及Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302 (1997)。在此系統中，產生mRNA與其藉由活體外轉譯在3'末端帶有嘌呤微素(一種肽基受體抗生素)之合成mRNA而編碼之肽或蛋白質的共價融合物。因而，可基於所編碼之肽或蛋白質(例如，抗體或其部分)之性質(諸如抗體或其部分與雙重特異性抗原之結合)，在mRNA之複雜混合物(例如，組合庫)中增濃特定mRNA。可由上文所述之重組方式(例如，於哺乳動物宿主細胞中)表現由篩選該等文庫而回收之編碼抗體或其部分之核酸序列，且此外，可藉由再對已在最初選擇之序列中引入突變之mRNA-肽融合物進行數輪篩選或藉由如上文所述之用於重組抗體之活體外親和力成熟之其他方法使其進行進一步親和力成熟。此方法之較佳實例為實例(下文)中所採用之PRO融合呈現技術。

在另一方法中，本發明之抗體亦可使用此項技術已知之酵母呈現法產生。在酵母呈現法中，使用基因法將抗體結構域拴系至酵母細胞壁並將其呈現於酵母表面上。詳言之，可利用該酵母呈現由譜系或組合抗體庫(例如人類或鼠類)表現之抗原結合域。可用於製造本發明抗體之酵母呈現法的實例包括美國專利第6,699,658號(Wittrup等人)中所揭示之方法，該專利係以引用的方式併入本文中。

B. 產生重組DLL4抗體

本發明之抗體可藉由此項技術已知之許多技術中之任一者來產生。舉例而言，自宿主細胞表現，其中藉由標準技

術將編碼重鏈及輕鏈之表現載體轉染至宿主細胞中。術語「轉染」之各種形式意欲涵蓋常用於將外源DNA引入原核生物或真核生物宿主細胞中之多種技術，例如電穿孔、磷酸鈣沈澱、DEAE-葡聚糖轉染及其類似技術。雖然可於原核生物或真核生物宿主細胞中表現本發明之抗體，但較佳於真核生物細胞中且最佳於哺乳動物宿主細胞中表現抗體，因為該等真核生物細胞(尤其哺乳動物細胞)比原核生物細胞更有可能組裝並分泌適當摺疊且具免疫活性之抗體。

表現本發明之重組抗體之例示性哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢(CHO細胞)(包括在 Urlaub 及 Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216-4220 (1980)中所描述之 dhfr-CHO細胞，其與 DHFR 選擇性標記一起使用，例如，如 Kaufman 及 Sharp, *Mol. Biol.*, 159:601-621 (1982)中所述)、NS0骨髓瘤細胞、COS細胞及SP2細胞。當將編碼抗體基因之重組表現載體引入哺乳動物宿主細胞中時，藉由將宿主細胞培養足以使抗體於宿主細胞中表現或更佳使抗體分泌至宿主細胞所生長之培養基中之時段來產生抗體。可使用標準蛋白質純化法自培養基回收抗體。

亦可使用宿主細胞產生功能性抗體片段，諸如 Fab 片段或 scFv 分子。應瞭解，以上程序之變更在本發明之範疇內。舉例而言，可能需要用編碼本發明抗體之輕鏈及/或重鏈之功能性片段的DNA轉染宿主細胞。亦可使用重組DNA技術來移除一些或所有編碼對於與相關抗原結合而言

並非必需之輕鏈與重鏈中之任一者或兩者的DNA。本發明抗體亦涵蓋由該等截短之DNA分子表現之分子。另外，可藉由標準化學交聯法使本發明抗體與第二抗體交聯來產生雙功能抗體，其中一條重鏈及一條輕鏈為本發明抗體(亦即結合人類DLL4)而另一條重鏈及輕鏈對不同於人類DLL4之抗原具有特異性。

在本發明抗體或其抗原結合部分之較佳重組表現系統中，藉由磷酸鈣介導之轉染將編碼抗體重鏈及抗體輕鏈兩者之重組表現載體引入dhfr-CHO細胞中。在重組表現載體內，抗體重鏈及輕鏈基因各自可操作地連接至CMV強化子/AdMLP啟動子調控元件以驅動基因之高水準轉錄。重組表現載體亦帶有DHFR基因，其允許使用甲胺喋呤選擇/擴增來選擇已經載體轉染之CHO細胞。培養經選擇之轉型體宿主細胞以使抗體重鏈及輕鏈表現且自培養基回收完整抗體。使用標準分子生物學技術來製備重組表現載體、轉染宿主細胞、選擇轉型體、培養宿主細胞且自培養基回收抗體。本發明進一步提供一種合成本發明重組抗體之方法，該方法係藉由在適合培養基中培養本發明之宿主細胞直至合成本發明之重組抗體。該方法可進一步包含自該培養基中分離重組抗體。

1. 抗DLL4抗體

表9中顯示純系38H12、1A11、37D10、32C7、14G1、14A11及15D6結合人類DLL4之經分離大鼠單株抗體的VH及VL區之胺基酸序列(參看以下實例4)。本文所述之經分

離抗DLL4抗體CDR序列形成DLL4結合蛋白家族，該等DLL4結合蛋白係根據本發明分離且包含包括來源於其及其親和力成熟純系之CDR序列的多肽。單株抗體及其親和力成熟衍生物之可變區及CDR之序列列於表9、表11、表16、表20及表21中。為了產生並選擇對人類DLL4具有較佳DLL4結合活性及/或中和活性之本發明結合蛋白之CDR，可使用此項技術中已知之用於產生本發明結合蛋白及評估該等結合蛋白之DLL4結合及/或中和特徵的標準方法，包括但不限於本文特別描述之彼等方法。

基於本文所述之抗DLL4抗體純系之重鏈可變區(VH)及輕鏈可變區(VL)之CDR的胺基酸序列排列，本發明提供一種包含能夠結合人類DLL4之抗原結合域的DLL4結合蛋白，該抗原結合域包含下文所定義之6個CDR(亦即CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2及CDRL-3)中之至少一或多者：

CDR-H1係選自由以下組成之群：

X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 (SEQ ID NO:151)，其中：

X_1 為 N、H 或 Y；

X_2 為 F；

X_3 為 P；

X_4 為 M；且

X_5 為 A 或 S；

SEQ ID NO:157之殘基31-35 (CDR-H1 38H12)；

SEQ ID NO:161之殘基31-35 (CDR-H1 37D10)；

SEQ ID NO:163之殘基 31-35 (CDR-H1 32C7) ;
SEQ ID NO:165之殘基 31-35 (CDR-H1 14G1) ;
SEQ ID NO:167之殘基 31-35 (CDR-H1 14A11) ;
SEQ ID NO:169之殘基 31-35 (CDR-H1 15D6) ;
SEQ ID NO:171之殘基 31-35 (CDR-H1 VH.1 1A11) ;
SEQ ID NO:172之殘基 31-35 (CDR-H1 VH.1a 1A11) ;
SEQ ID NO:173之殘基 31-35 (CDR-H1 VH.1b 1A11) ;
SEQ ID NO:174之殘基 31-35 (CDR-H1 VH.2a 1A11) ;
SEQ ID NO:179之殘基 31-35 (CDR-H1 VH.1 38H12) ;
SEQ ID NO:180之殘基 31-35 (CDR-H1 VH.1A 38H12) ;
SEQ ID NO:181之殘基 31-35 (CDR-H1 VH.1b 38H12) ;
SEQ ID NO:182之殘基 31-35 (CDR-H1 VH.2a 38H12) ;
SEQ ID NO:187之殘基 31-35 (CDR-H1 h1A11VH.1) ;
SEQ ID NO:188之殘基 31-35 (CDR-H1 h1A11.A6) ;
SEQ ID NO:189之殘基 31-35 (CDR-H1 h1A11.A8) ;
SEQ ID NO:190之殘基 31-35 (CDR-H1 h1A11.C6) ;
SEQ ID NO:191之殘基 31-35 (CDR-H1 h1A11.A11) ;
SEQ ID NO:192之殘基 31-35 (CDR-H1 h1A11.B5) ;
SEQ ID NO:193之殘基 31-35 (CDR-H1 h1A11.E12) ;
SEQ ID NO:194之殘基 31-35 (CDR-H1 h1A11.G3) ;
SEQ ID NO:195之殘基 31-35 (CDR-H1 h1A11.F5) ; 及
SEQ ID NO:196之殘基 31-35 (CDR-H1 h1A11.H2) ;

CDR-H2係選自由以下組成之群：

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-

X₁₆-X₁₇ (SEQ ID NO:152)，其中：

X₁ 為 T 或 S；

X₂ 為 I；

X₃ 為 S；

X₄ 為 S 或 G；

X₅ 為 S；

X₆ 為 D；

X₇ 為 G、A、D、S 或 E；

X₈ 為 T 或 W；

X₉ 為 T、P 或 A；

X₁₀ 為 Y、S、T 或 N；

X₁₁ 為 Y 或 I；

X₁₂ 為 R 或 G；

X₁₃ 為 D；

X₁₄ 為 S；

X₁₅ 為 V；

X₁₆ 為 K；且

X₁₇ 為 G；

SEQ ID NO:157之殘基 50-66 (CDR-H2 38H12)；

SEQ ID NO:161之殘基 50-68 (CDR-H2 37D10)；

SEQ ID NO:163之殘基 50-66 (CDR-H2 32C7)；

SEQ ID NO:165之殘基 50-66 (CDR-H2 14G1)；

SEQ ID NO:167之殘基 50-66 (CDR-H2 14A11)；

SEQ ID NO:169之殘基 50-66 (CDR-H2 15D6)；

SEQ ID NO:171之殘基 50-66 (CDR-H2 VH.1 1A11) ;
SEQ ID NO:172之殘基 50-66 (CDR-H2 VH.1a 1A11) ;
SEQ ID NO:173之殘基 50-66 (CDR-H2 VH.1b 1A11) ;
SEQ ID NO:174之殘基 50-66 (CDR-H2 VH.2a 1A11) ;
SEQ ID NO:179之殘基 50-66 (CDR-H2 VH.1 38H12) ;
SEQ ID NO:180之殘基 50-66 (CDR-H2 VH.1A 38H12) ;
SEQ ID NO:181之殘基 50-66 (CDR-H2 VH.1b 38H12) ;
SEQ ID NO:182之殘基 31-35 (CDR-H1 VH.2a 38H12) ;
SEQ ID NO:187之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11VH.1) ;
SEQ ID NO:188之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.A6) ;
SEQ ID NO:189之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.A8) ;
SEQ ID NO:190之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.C6) ;
SEQ ID NO:191之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.A11) ;
SEQ ID NO:192之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.B5) ;
SEQ ID NO:193之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.E12) ;
SEQ ID NO:194之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.G3) ;
SEQ ID NO:195之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.F5) ; 及
SEQ ID NO:196之殘基 50-66 (CDR-H2 h1A11.H2) ;

CDR-H3係選自由以下組成之群：

X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 (SEQ ID NO:153)，其中：

X_1 為 G；

X_2 為 Y；

X_3 為 Y；

X_4 為 N；

X₅ 為 S ；

X₆ 為 P ；

X₇ 為 F ；

X₈ 為 A ； 且

X₉ 為 Y 、 F 或 S ；

SEQ ID NO:157之殘基 99-107 (CDR-H3 38H12) ；

SEQ ID NO:161之殘基 101-111 (CDR-H3 37D10) ；

SEQ ID NO:163之殘基 99-105 (CDR-H3 32C7) ；

SEQ ID NO:165之殘基 99-105 (CDR-H3 14G1) ；

SEQ ID NO:167之殘基 99-110 (CDR-H3 14A11) ；

SEQ ID NO:169之殘基 99-110 (CDR-H3 15D6) ；

SEQ ID NO:171之殘基 99-107 (CDR-H3 VH.1 1A11) ；

SEQ ID NO:172之殘基 99-107 (CDR-H3 VH.1a 1A11) ；

SEQ ID NO:173之殘基 99-107 (CDR-H3 VH.1b 1A11) ；

SEQ ID NO:174之殘基 99-107 (CDR-H3 VH.2a 1A11) ；

SEQ ID NO:179之殘基 99-107 (CDR-H3 VH.1 38H12) ；

SEQ ID NO:180之殘基 99-107 (CDR-H3 VH.1A 38H12) ；

SEQ ID NO:181之殘基 99-107 (CDR-H2 VH.1b 38H12) ；

SEQ ID NO:182之殘基 99-107 (CDR-H1 VH.2a 38H12) ；

SEQ ID NO:187之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11VH.1) ；

SEQ ID NO:188之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11.A6) ；

SEQ ID NO:189之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11.A8) ；

SEQ ID NO:190之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11.C6) ；

SEQ ID NO:191之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11.A11) ；

SEQ ID NO:192之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11.B5) ;
 SEQ ID NO:193之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11.E12) ;
 SEQ ID NO:194之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11.G3) ;
 SEQ ID NO:195之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11.F5) ;
 及

SEQ ID NO:196之殘基 99-107 (CDR-H3 h1A11.H2) ;

CDR-L1係選自由以下組成之群：

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}$ (SEQ ID NO:154) ,

其中：

X_1 為 R ;

X_2 為 A ;

X_3 為 S ;

X_4 為 E 或 Q ;

X_5 為 D 或 E ;

X_6 為 I ;

X_7 為 Y 或 W ;

X_8 為 S、I、Y、N 或 R ;

X_9 為 N ;

X_{10} 為 L ; 且

X_{11} 為 A ;

SEQ ID NO:158之殘基 24-34 (CDR-L1 38H12) ;

SEQ ID NO:162之殘基 24-34 (CDR-L1 37D10) ;

SEQ ID NO:164之殘基 24-34 (CDR-L1 32C7) ;

SEQ ID NO:166之殘基 24-34 (CDR-L1 14G1) ;

SEQ ID NO:168之殘基 23-37 (CDR-L1 14A11) ;
 SEQ ID NO:170之殘基 23-37 (CDR-L1 15D6) ;
 SEQ ID NO:175之殘基 24-34 (CDR-L1 VL.1 1A11) ;
 SEQ ID NO:176之殘基 24-34 (CDR-L1 VL.1a 1A11) ;
 SEQ ID NO:177之殘基 24-34 (CDR-L1 VL.1b 1A11) ;
 SEQ ID NO:178之殘基 24-34 (CDR-L1 VL.2a 1A11) ;
 SEQ ID NO:183之殘基 24-34 (CDR-L1 VL.1 38H12) ;
 SEQ ID NO:184之殘基 24-34 (CDR-L1 VL.1a 38H12) ;
 SEQ ID NO:185之殘基 24-34 (CDR-L1 VL.1b 38H12) ;
 SEQ ID NO:186之殘基 24-34 (CDR-L1 VL.2a 38H12) ;
 SEQ ID NO:197之殘基 24-34 (CDR-L1 h1A11VL.1) ;
 SEQ ID NO:198之殘基 24-34 (CDR-L1 h1A11.A2) ;
 SEQ ID NO:199之殘基 24-34 (CDR-L1 h1A11.A12) ;
 SEQ ID NO:200之殘基 24-34 (CDR-L1 h1A11.A7) ;
 SEQ ID NO:201之殘基 24-34 (CDR-L1 h1A11.B4) ;
 SEQ ID NO:202之殘基 24-34 (CDR-L1 h1A11.B5) ; 及
 SEQ ID NO:203之殘基 24-34 (CDR-L1 h1A11.E12) ;

CDR-L2係選自由以下組成之群：

X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 (SEQ ID NO:155)，其中：

X_1 為 D ；

X_2 為 T ；

X_3 為 N 或 S ；

X_4 為 N、D、S、I、Y 或 V ；

X_5 為 L ；

X₆為 A； 且

X₇為 D；

SEQ ID NO:158之殘基 50-56 (CDR-L2 38H12)；

SEQ ID NO:162之殘基 50-56 (CDR-L2 37D10)；

SEQ ID NO:164之殘基 50-56 (CDR-L2 32C7)；

SEQ ID NO:166之殘基 50-56 (CDR-L2 14G1)；

SEQ ID NO:168之殘基 53-59 (CDR-L2 14A11)；

SEQ ID NO:170之殘基 53-59 (CDR-L2 15D6)；

SEQ ID NO:175之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.1 1A11)；

SEQ ID NO:176之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.1a 1A11)；

SEQ ID NO:177之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.1b 1A11)；

SEQ ID NO:178之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.2a 1A11)；

SEQ ID NO:183之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.1 38H12)；

SEQ ID NO:184之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.1a 38H12)；

SEQ ID NO:185之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.1b 38H12)；

SEQ ID NO:186之殘基 50-56 (CDR-L2 VL.2a 38H12)；

SEQ ID NO:197之殘基 50-56 (CDR-L2 h1A11VL.1)；

SEQ ID NO:198之殘基 50-56 (CDR-L2 h1A11.A2)；

SEQ ID NO:199之殘基 50-56 (CDR-L2 h1A11.A12)；

SEQ ID NO:200之殘基 50-56 (CDR-L2 h1A11.A7)；

SEQ ID NO:201之殘基 50-56 (CDR-L2 h1A11.B4)；

SEQ ID NO:202之殘基 50-56 (CDR-L2 h1A11.B5)； 及

SEQ ID NO:203之殘基 50-56 (CDR-L2 h1A11.E12)；

且

CDR-L3係選自由以下組成之群：

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉ (SEQ ID NO:156)，其中：

X₁為Q；

X₂為Q；

X₃為Y；

X₄為N、D或T；

X₅為N、Y或W；

X₆為Y或V；

X₇為P；

X₈為P；及

X₉為T；

SEQ ID NO:158之殘基89-97 (CDR-L3 38H12)；

SEQ ID NO:162之殘基89-97 (CDR-L3 37D10)；

SEQ ID NO:164之殘基89-97 (CDR-L3 32C7)；

SEQ ID NO:166之殘基89-98 (CDR-L3 14G1)；

SEQ ID NO:168之殘基92-100 (CDR-L3 14A11)；

SEQ ID NO:170之殘基92-100 (CDR-L3 15D6)；

SEQ ID NO:175之殘基89-97 (CDR-L3 VL.1 1A11)；

SEQ ID NO:176之殘基89-97 (CDR-L3 VL.1a 1A11)；

SEQ ID NO:177之殘基89-97 (CDR-L3 VL.1b 1A11)；

SEQ ID NO:178之殘基89-97 (CDR-L3 VL.2a 1A11)；

SEQ ID NO:183之殘基89-97 (CDR-L3 VL.1 38H12)；

SEQ ID NO:184之殘基89-97 (CDR-L3 VL.1a 38H12)；

SEQ ID NO:185之殘基89-97 (CDR-L3 VL.1b 38H12)；

SEQ ID NO:186之殘基 89-97 (CDR-L3 VL.2a 38H12) ;
 SEQ ID NO:197之殘基 89-97 (CDR-L3 h1A11VL.1) ;
 SEQ ID NO:198之殘基 89-97 (CDR-L3 h1A11.A2) ;
 SEQ ID NO:199之殘基 89-97 (CDR-L3 h1A11.A12) ;
 SEQ ID NO:200之殘基 89-97 (CDR-L3 h1A11.A7) ;
 SEQ ID NO:201之殘基 89-97 (CDR-L3 h1A11.B4) ;
 SEQ ID NO:202之殘基 89-97 (CDR-L3 h1A11.B5) ; 及
 SEQ ID NO:203之殘基 89-97 (CDR-L3 h1A11.E12) 。

DLL4結合蛋白較佳包含至少一個上述CDR，更佳包含任意兩個上述CDR，更佳包含任意三個上述CDR，更佳包含任意四個上述CDR、更佳包含任意五個上述CDR，且最佳包含任意六個上述CDR(亦即如上文所述之CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3)。包含三個CDR之尤佳DLL4結合蛋白包含如上文所述之CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3。

包含上述一或多個CDR之DLL4結合蛋白較佳結合人類(「hu」、「h」)DLL4以及一或多個選自由以下組成之群的DLL4蛋白：小鼠(「鼠類」、「mu」)DLL4、獼猴(「獼猴」、「cyno」)DLL4及大鼠DLL4。

包含上述一或多個CDR之DLL4結合蛋白較佳結合人類(「hu」)DLL4以及獼猴(「獼猴」、「cyno」)DLL4。

2. 抗DLL4嵌合抗體

嵌合抗體為抗體之不同部分來源於不同動物物種的分子，諸如具有來源於鼠類單株抗體之可變區及人類免疫球

蛋白恆定區的抗體。參看例如 Morrison, *Science*, 229: 1202-1207 (1985); Oi等人, *BioTechniques*, 4: 214 (1986); Gillies等人, *J. Immunol. Methods*, 125: 191-202 (1989); 美國專利第 5,807,715 號; 第 4,816,567 號; 及第 4,816,397 號。另外, 可使用開發用於藉由將來自具有適當抗原特異性之小鼠抗體分子的基因與來自具有適當生物活性之人類抗體分子的基因剪接在一起來產生「嵌合抗體」的技術。參看例如 Morrison等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984); Neuberger等人, *Nature*, 312: 604-608 (1984); Takeda等人, *Nature*, 314: 452-454 (1985), 該等文獻係以全文引用的方式併入本文中。

3. 抗 DLL4 CDR 移植抗體

本發明之經分離抗 DLL4 抗體 CDR 序列可用於製造 CDR 移植抗體以調節原始抗體之性質。該等性質包括但不限於結合動力學、親和力、生物活性、物種交叉反應性、分子交叉反應性、抗原決定基、物理化學性質、藥物動力學性質、藥效學性質或藥理學性質。CDR 移植抗體包含來自人類抗體或非人類靈長類動物抗體之重鏈及輕鏈可變區序列, 其中 VH 及 / 或 VL 之一或多個 CDR 區經原始抗 DLL4 抗體之 CDR 序列置換。來自任何人類或非人類靈長類動物抗體之架構序列均可充當 CDR 移植之模板。然而, 至該架構上之直鏈置換通常導致對抗原之結合親和力部分喪失。人類或其他物種抗體與原始人類抗體之相似性愈高, CDR 與新人類架構或非人類靈長類動物架構組合將在 CDR 中引入

可能降低親和力或其他性質之畸變之可能性愈小。因此，較佳經選擇以置換除CDR外之人類可變區架構的可變架構與人類抗體可變區架構具有至少30%序列一致性。更佳經選擇以置換除CDR外之人類可變區架構的可變區架構與人類抗體可變區架構具有至少40%序列一致性。更佳經選擇以置換除CDR外之人類可變區架構的可變區架構與人類抗體可變區架構具有至少50%序列一致性。更佳經選擇以置換除CDR外之人類可變區架構的可變區架構與人類抗體可變區架構具有至少60%序列一致性。更佳新人類或非人類靈長類動物與除CDR外之原始人類可變區架構具有至少70%序列一致性。甚至更佳新人類或非人類靈長類動物與除CDR外之原始人類可變區架構具有至少75%序列一致性。最佳新人類或非人類靈長類動物與除CDR外之原始人類可變區架構具有至少80%序列一致性。即使使用高度相似的人類或非人類靈長類動物架構來移植原始人類抗DLL4抗體之CDR，所得移植抗體可能仍喪失一定程度之對抗原之結合親和力。在此狀況下，為了恢復親和力，必須包括原始抗體之至少一或多個關鍵架構殘基取代新移植抗體之相應位置。該關鍵殘基可選自由以下組成之群：

與CDR相鄰之殘基；

糖基化位點殘基；

稀有殘基；

能夠與人類DLL4相互作用之殘基；

典型殘基；

重鏈可變區與輕鏈可變區之間的接觸殘基；

Vernier區內之殘基；及

Chothia定義之可變重鏈CDR1與Kabat定義之第一重鏈架構之間重疊之區域中的殘基。

4. 抗DLL4人類化抗體

雖然本發明之組合物可消除對製造人類化抗體之需要，但可使用本發明之組合物製備人類化DLL4抗體。人類化抗體為來自非人類物種抗體之抗體分子，該非人類物種抗體結合具有一或多個來自非人類物種之互補決定區(CDR)及來自人類免疫球蛋白分子之架構區的所要抗原。已知人類Ig序列揭示於可經由全球資訊網(www.)獲得之網站，例如 ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi；atcc.org/phage/hdb.html；sciquest.com/；abcam.com/；antibodyresource.com/onlinecomp.html；public.iastate.edu/.about.pedro-/research_tools.html；mgen.uniheidelberg.de/SD/IT/IT.html；whfreeman.com/immunology-/CH05/kuby05.htm；library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html；hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/；path.-cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html；antibodyresource.com/；mcb.harvard.edu/BioLinks-/Immunology.html；immunologylink.com/；pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html；bio-tech.ufl.edu/.about.hcl/；pebio.com/pa/340913-/340913.html；nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/；m.ehimeu.ac.jp/.about.yasuhito-/Elisa.html；biodesign.com/table.asp；icnet.uk/axp/facs/davies/lin-ks.html；biotech.ufl.edu-/about.fccl/protocol.html；isac-net.org/

sites_geo.html ; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html ; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/linksl.html ; recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/ ; mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html ; ibt.unam.mx/-vir/V_mice.html ; imgt.cnusc.fr:8104/ ; biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html ; anti-body.bath.ac.uk/ ; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html ; unizh.ch/.about.honegger/AHO-seminar/Slide01.html ; cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/ ; nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm ; path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html ; ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.-html ; biosci.missouri.edu/smithgp/index.html ; cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Webpages-/Pept/spottech.html ; jerini.de/frroducts.htm ; patents.ibm.com/ibm.html 。 Kabat 等 人 , Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983) , 各文獻係以全文引用的方式併入本文中。該等輸入序列可用於降低免疫原性或降低、增強或改變結合親和力、締合速率、解離速率、親合力、特異性、半衰期或任何其他適合特徵，如此項技術已知。

可用來自 CDR 供體抗體之相應殘基取代人類架構區中之架構殘基以改變、較佳改良抗原結合。此等架構取代係藉由此項技術中熟知之方法鑑別，例如藉由建立 CDR 與架構殘基之相互作用模型以鑑別對於抗原結合而言重要之架構殘基，及進行序列比較以鑑別特定位置之異常架構殘基。(參看例如美國專利第 5,585,089 號 (Queen 等人) ; Riechmann

等人, *Nature*, 332:323-327 (1988), 該等文獻係以全文引用的方式併入本文中)。三維免疫球蛋白模型普遍可得且為熟習此項技術者熟悉。可使用說明並呈現所選候選免疫球蛋白序列之可能三維構形結構的電腦程式。對此等呈現之檢查允許分析殘基在候選免疫球蛋白序列起作用過程中之可能作用, 亦即, 分析影響候選免疫球蛋白結合其抗原之能力的殘基。以此方式, 可自共同及輸入序列選擇FR殘基並組合, 從而達成所要抗體特徵, 諸如對靶抗原之較高親和力。一般而言, CDR殘基直接且在最大程度上牽涉於影響抗原結合中。抗體可使用此項技術中已知之各種技術進行人類化, 諸如但不限於以下文獻中所描述之彼等技術: Jones等人, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Verhoeyen等人, *Science*, 239: 1534-1536 (1988); Sims等人, *J. Immunol.*, 151: 2296-2308 (1993); Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987); Carter等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285-4289 (1992); Presta等人, *J. Immunol.*, 151: 2623-2632 (1993); Padlan, E.A., *Molecular Immunology*, 28(4/5): 489-498 (1991); Studnicka等人, *Protein Engineering*, 7(6): 805-814 (1994); Roguska等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:969-973 (1994); PCT公開案第WO 91/09967號、第WO 99/06834 號 (PCT/US98/16280)、第WO 97/20032 號 (PCT/US96/18978)、第WO 92/11272號 (PCT/US91/09630)、第WO 92/03461 號 (PCT/US91/05939)、第WO 94/18219 號 (PCT/US94/01234)、第WO 92/01047 號 (PCT/GB91/01134)、

第 WO 93/06213 號(PCT/GB92/01755)、第 WO90/14443 號、第 WO90/14424 號及第 WO90/14430 號；歐洲公開案第 EP 0 592 106 號、第 EP 0 519 596 號，及第 EP 0 239 400 號；美國專利第 5,565,332 號；第 5,723,323 號；第 5,976,862 號；第 5,824,514 號；第 5,817,483 號；第 5,814,476 號；第 5,763,192 號；第 5,723,323 號；第 5,766,886 號；第 5,714,352 號；第 6,204,023 號；第 6,180,370 號；第 5,693,762 號；第 5,530,101 號；第 5,585,089 號；第 5,225,539 號；及第 4,816,567 號，各文獻係以全文引用的方式併入本文中，包括其中所引用之參考文獻。

C. 抗體及產生抗體之細胞株之產生

本發明之抗 DLL4 抗體較佳展現較強之降低或中和腫瘤血管生成活性之能力，例如，如藉由此項技術中已知之若干活體外及活體內分析中之任一者所評估。舉例而言，此等抗體以在至少約 10^{-7} M 或約 10^{-8} M 範圍內之對 DLL4 之 IC_{50} 值中和 Notch 信號傳導路徑中之 DLL4 相互作用。本發明之抗 DLL4 抗體較佳亦展現較強之降低或中和 DLL4 活性之能力。

在較佳實施例中，經分離抗體或其抗原結合部分結合人類 DLL4，其中該抗體或其抗原結合部分以約 0.1 s^{-1} 或 0.1 s^{-1} 以下之 K_{off} 速率常數與人類 DLL4 解離，如藉由表面電漿子共振所測定，或其以約 1×10^{-6} M 或 1×10^{-6} M 以下之 IC_{50} 抑制 DLL4 及/或人類 DLL4 活性。或者，抗體或其抗原結合部分可以約 $1 \times 10^{-2}\text{ s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-2}\text{ s}^{-1}$ 以下之 K_{off} 速率常數與人

類DLL4解離，如藉由表面電漿子共振所測定，或可以約 1×10^{-7} M 或 1×10^{-7} M 以下之 IC_{50} 抑制人類DLL4及/或人類DLL4活性。或者，抗體或其抗原結合部分可以約 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 以下之 K_{off} 速率常數與人類DLL4解離，如藉由表面電漿子共振所測定，或可以約 1×10^{-8} M 或 1×10^{-8} M 以下之 IC_{50} 抑制人類DLL4。或者，抗體或其抗原結合部分可以約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下之 K_{off} 速率常數與人類DLL4解離，如藉由表面電漿子共振所測定，或可以約 1×10^{-9} M 或以下之 IC_{50} 抑制DLL4活性。或者，抗體或其抗原結合部分可以約 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下之 K_{off} 速率常數與人類DLL4解離，如藉由表面電漿子共振所測定，或可以約 1×10^{-10} M 或 1×10^{-10} M 以下之 IC_{50} 抑制DLL4及/或人類DLL4活性。或者，抗體或其抗原結合部分可以約 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下之 K_{off} 速率常數與人類DLL4解離，如藉由表面電漿子共振所測定，或可以約 1×10^{-11} M 或 1×10^{-11} M 以下之 IC_{50} 抑制DLL4及/或人類DLL4活性。

在某些實施例中，該抗體包含重鏈恆定區，諸如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恆定區。該重鏈恆定區較佳為IgG1重鏈恆定區或IgG4重鏈恆定區。此外，抗體可包含輕鏈恆定區： κ 輕鏈恆定區或 λ 輕鏈恆定區。抗體較佳包含 κ 輕鏈恆定區。或者，抗體部分可為(例如)Fab片段或單鏈Fv片段。

置換Fc部分中之胺基酸殘基以改變抗體效應功能在此項技術中為已知的(參看美國專利第5,648,260號及第

5,624,821號(Winter等人))。抗體之Fc部分介導若干重要效應功能，例如細胞激素誘導、ADCC、吞噬作用、補體依賴性細胞毒性(CDC)以及抗體及抗原-抗體複合物之半衰期/清除速率。視治療目標而定，在一些情況下，此等效應功能為治療用抗體所要的，但在其他情況下可能為不必要的或甚至有害的。某些人類IgG同型，尤其IgG1及IgG3，分別經由結合至FcγR及補體C1q來介導ADCC及CDC。新生兒Fc受體(FcRn)為決定抗體之循環半衰期之重要組分。在又一實施例中，置換抗體恆定區、例如抗體Fc區中之至少一個胺基酸殘基，從而改變抗體之效應功能。

一個實施例提供一種經標記之結合蛋白，其中本發明之抗體或抗體部分用另一功能分子(例如，另一肽或蛋白質)衍生化或連接至另一功能分子。舉例而言，本發明之經標記之結合蛋白可藉由使本發明之抗體或抗體部分功能性連接(藉由化學偶合、基因融合、非共價締合或其他方式)至一或多個其他分子實體而獲得，該一或多個其他分子實體諸如另一抗體(例如雙特異性抗體或雙功能抗體)、可偵測劑、細胞毒性劑、醫藥劑及/或可介導抗體或抗體部分與另一分子(諸如抗生蛋白鏈菌素核心區或聚組胺酸標籤)締合的蛋白質或肽。

可用來衍生化本發明之抗體或抗體部分之適用可偵測劑包括螢光化合物。例示性螢光可偵測劑包括螢光素、螢光異硫氰酸鹽、若丹明、5-二甲胺-1-萘磺醯氯、藻紅素及其類似物。亦可用諸如鹼性磷酸酶、辣根過氧化酶、葡萄糖

氧化酶及其類似物之可偵測酶使抗體衍生化。當抗體用可偵測酶衍生化時，其可藉由添加被酶用來產生可偵測反應產物之其他試劑來偵測。舉例而言，當存在可偵測劑辣根過氧化酶時，添加過氧化氫及二胺基聯苯胺產生可偵測之有色反應產物。抗體亦可用生物素衍生化，並經由間接量測抗生物素蛋白或抗生蛋白鏈菌素結合來偵測。

本發明之另一實施例提供一種結晶DLL4結合蛋白。本發明較佳係關於本文所述之DLL4結合蛋白之晶體，包括如本文中所揭示之完整抗DLL4抗體、其片段以及抗體構築體及結合蛋白結合物(包括抗體結合物)，及包含該等晶體之調配物及組合物。在一實施例中，結晶結合蛋白的活體內半衰期長於結合蛋白之可溶性對應物。在另一實施例中，結合蛋白在結晶後保留生物活性。本發明之結晶結合蛋白可根據此項技術中已知之方法且如PCT公開案第WO 02/72636號中所揭示產生，該公開案係以引用的方式併入本文中。

本發明之另一實施例提供一種糖基化結合蛋白，其中抗體或其抗原結合部分包含一或多個碳水化合物殘基。初生活體內蛋白質產生可經歷進一步處理，稱為轉譯後修飾。詳言之，可酶促添加糖(糖基)殘基，一種稱為糖基化之過程。帶有共價連接之寡糖側鏈之所得蛋白質稱為糖基化蛋白質或糖蛋白。蛋白質糖基化視相關蛋白質之胺基酸序列以及表現蛋白質之宿主細胞而定。不同生物體可產生不同糖基化酶(例如，糖基轉移酶及糖苷酶)且有不同受質(核苷

酸糖)可用。由於該等因素，蛋白質糖基化模式及糖基殘基之組成可視表現特定蛋白質之宿主系統而不同。適用於本發明之糖基殘基可包括但不限於葡萄糖、半乳糖、甘露糖、海藻糖、正乙醯基葡糖胺及唾液酸。糖基化結合蛋白較佳包含糖基殘基以使糖基化模式為人類糖基化模式。

熟習此項技術者已知不同蛋白質糖基化可產生不同蛋白質特徵。舉例而言，諸如酵母之微生物宿主中產生且利用酵母內源性途徑糖基化之治療蛋白質的能效可能低於在諸如CHO細胞株之哺乳動物細胞中表現之相同蛋白質的能效。該等醣蛋白亦可在人類中具有免疫原性且投藥後顯示降低之活體內半衰期。人類及其他動物之特異性受體可識別特異性糖基殘基且促進蛋白質自血流中快速清除。其他副作用可包括蛋白質摺疊、溶解性、對蛋白酶之敏感度、運輸、轉運、區室化、分泌、為其他蛋白質或因子識別、抗原性或過敏原性的改變。因此，實踐者可能偏好具有特定糖基化組成及模式(例如與人類細胞或預定個體動物之物種特異性細胞中所產生者相同或至少相似的糖基化組成及模式)之治療用蛋白質。

不同於宿主細胞之糖基化蛋白質的糖基化蛋白質的表現可藉由基因修飾宿主細胞以表現異源糖基化酶來實現。使用此項技術已知之技術，實踐者可產生展現人類蛋白質糖基化之抗體或其抗原結合部分。舉例而言，已對酵母菌株進行基因修飾以表現非天然存在之糖基化酶，使得此等酵母菌株中所產生之糖基化蛋白質(醣蛋白)展現與動物細胞

(尤其人類細胞)之蛋白質糖基化相同的蛋白質糖基化(美國專利申請公開案第2004/0018590號及第2002/0137134號)。

此外，熟習此項技術者應瞭解，可使用經基因工程改造以表現各種糖基化酶之宿主細胞庫來表現相關蛋白質，從而使該文庫之成員宿主細胞產生具有變異糖化模式之相關蛋白質。接著，實踐者可選擇並分離具有特定新穎糖基化模式之相關蛋白質。具有特定選擇之新穎糖基化模式之蛋白質較佳展現改良或改變之生物學性質。

D. DLL4結合蛋白之用途

鑒於本文所述之DLL4結合蛋白(包括抗體及其部分)能夠結合人類DLL4及鼠類DLL4，因此其可藉由使用此項技術中已知之任何習知免疫分析，諸如酶聯免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)或組織免疫組織化學而用於偵測或量測樣本中(例如混合物、溶液或諸如血液、血清或血漿之生物樣本中)之DLL4。本發明提供一種偵測樣本中之人類DLL4及/或鼠類DLL4的方法，該方法包括使樣本與DLL4結合蛋白接觸，並偵測結合至人類DLL4及/或鼠類DLL4之DLL4結合蛋白或未結合之結合蛋白，藉此偵測樣本中之人類DLL4及/或鼠類DLL4。本文所述之DLL4結合蛋白可直接或間接使用可偵測物質標記，以便於偵測結合或未結合之DLL4結合蛋白。合適之可偵測物質包括各種酶、輔基、螢光物質、發光物質及放射性物質。合適酶之實例包括辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙醯膽鹼酯酶；適合輔基複合物之實例包括抗生蛋白鏈菌素/

生物素及抗生物素蛋白/生物素；合適螢光物質之實例包括傘酮(umbelliferone)、螢光素、螢光異硫氰酸鹽、若丹明、二氯三嗪基胺螢光素、丹醯氯或藻紅素；發光物質之實例包括魯米諾(luminol)；且合適放射性物質之實例包括 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 或 ^{153}Sm 。

可分析DLL4之生物樣本包括尿、糞便、血液、血清、血漿、汗液、唾液、口腔抹片(面頰、舌、咽喉)、陰道抹片、直腸抹片、皮膚抹片、皮膚刮落物、活組織切片，以及可藉由此項技術中之可用方法獲得的任何其他組織樣本。

亦可改由競爭免疫分析法，利用已標記可偵測物質之重組人類(rh)DLL4標準物及未標記之本文所述DLL4結合蛋白替代結合蛋白之標記法，來分析生物流體中之人類DLL4。在此分析中，組合生物樣本、經標記之rhDLL4標準物及DLL4結合蛋白，並測定結合至未標記之結合蛋白的經標記之rhDLL4標準物的量。生物樣本中，人類DLL4之量與結合至DLL4結合蛋白之經標記rhDLL4標準物之量成反比。類似地，亦可藉由競爭免疫分析，利用經可偵測物質標記之rhDLL4標準物及未標記之本文所述DLL4結合蛋白來分析生物流體中之人類DLL4。

本發明之DLL4結合蛋白較佳能夠中和活體外及活體內DLL4活性，尤其hDLL4活性。因此，本發明之該等結合蛋白可用於例如在含有DLL4之細胞培養物中、在人類個體

中，或在表現可與本發明之結合蛋白交叉反應之DLL4的其他哺乳動物個體中抑制DLL4活性。在一個實施例中，本發明提供一種抑制DLL4活性之方法，該方法包括使DLL4與本發明之DLL4抗體或抗體部分接觸，從而抑制DLL4活性。舉例而言，在含有或懷疑含有DLL4之細胞培養物中，可向培養基中添加本發明之抗體或抗體部分，以抑制培養物中之DLL4活性。

在另一實施例中，本發明提供一種在個體中，宜在罹患因DLL4或DLL4活性而受害之疾病或病症之個體中降低DLL4活性的方法。本發明提供一種在罹患該疾病或病症之個體中降低DLL4或DLL4活性的方法，該方法包括對該個體投與本發明之DLL4結合蛋白，從而降低該個體之DLL4或DLL4活性。較佳地，DLL4為人類DLL4且個體為人類個體。或者，個體可為表現能夠與本發明之DLL4結合蛋白結合之DLL4的哺乳動物。更進一步，個體可為已引入DLL4(例如，藉由投與DLL4或藉由表現DLL4轉殖基因)之哺乳動物。本發明之抗體或其他DLL4結合蛋白可投與用於治療性目的之人類個體。此外，本發明之DLL4結合蛋白可投與表現能夠與該結合蛋白結合之DLL4之非人類哺乳動物，其係用於獸醫學目的或作為人類疾病之動物模型。關於後者，該等動物模型可用於評估本發明抗體及其他DLL4結合蛋白之治療功效(例如，測試投藥劑量及時程)。

如本文中所使用之術語「DLL4及/或Notch信號傳導活性

有害之病症」意欲包括諸如癌症之疾病及其他病症，其中患有該病症之個體之DLL4及/或Notch信號傳導活性之存在已經顯示為或懷疑為造成該病症之病理生理學之原因或促使該病症惡化之因素。因此，DLL4及/或Notch信號傳導活性有害之病症為DLL4及/或Notch信號傳導活性降低有望減輕病症之症狀及/或進展(例如腫瘤生長)的病症。該等病症可例如表現為罹患該病症之個體之血管生成增加(例如，此項技術中已知在腫瘤生長及形成期間在個體之血清、血漿、滑液等中會增加之各種蛋白質之濃度增加)，該增加可例如使用如上所述之抗DLL4抗體來偵測。可用本發明抗體治療之病症的非限制性實例包括下文關於本發明抗體之醫藥組合物之部分中所論述的彼等病症。

II. 醫藥組合物及治療用途

本發明亦提供包含本發明之DLL4結合蛋白及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。包含本發明之DLL4結合蛋白的醫藥組合物係用於但不限於診斷、偵測或監控病症；預防、治療、控制或改善病症或其一或多種症狀；及/或研究。在一特定實施例中，組合物包含一或多種本發明DLL4結合蛋白。在另一實施例中，醫藥組合物包含一或多種本發明結合蛋白及一或多種除本發明結合蛋白外之用於治療DLL4及/或因DLL4活性而受害之病症的預防劑或治療劑。較佳已知適用於或已用於或目前正用於預防、治療、控制或改善諸如癌症或腫瘤之病症或其一或多種症狀的預防劑或治療劑。根據此等實施例，組合物可進一步包

含載劑、稀釋劑或賦形劑。

本發明之結合蛋白可併入適合投與個體之醫藥組合物中。通常，醫藥組合物包含本發明之DLL4結合蛋白(或其DLL4結合部分)及醫藥學上可接受之載劑。如本文中所使用之「醫藥學上可接受之載劑」包括生理學上相容之任何及所有溶劑、分散介質、包衣劑、抗細菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收延遲劑以及其類似物。醫藥學上可接受之載劑之實例包括水、生理食鹽水、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、右旋糖、甘油、乙醇及其類似物中之一或多者以及其組合。在許多情況下，組合物中較佳包括等張劑，例如，糖、多元醇(諸如甘露醇、山梨醇)或氯化鈉。醫藥學上可接受之載劑可進一步包含少量輔助物質，諸如濕潤劑或乳化劑、防腐劑或緩衝劑，其可增加抗體或抗體部分之存放期或效用。

各種遞送系統為已知的且可用於投與一或多種本發明DLL4結合蛋白或一或多種本發明結合蛋白與適用於預防、控制、治療或改善病症或其一或多種症狀(例如，減少腫瘤血管生成)之預防劑或治療劑的組合，囊封於脂質體、微粒、微囊、能夠表現DLL4結合蛋白之重組細胞中、受體介導之內飲作用(參看例如 Wu 及 Wu, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429-4432 (1987)、構築核酸作為逆轉錄病毒或其他載體之一部分等。投與本發明之預防劑或治療劑之方法包括但不限於非經腸投藥(例如皮內、肌肉內、腹膜內、靜脈內及皮下)、硬膜上投藥、腫瘤內投藥及經黏膜

投藥(例如鼻內途徑及經口途徑)。另外，可利採用經肺投藥，例如藉由使用吸入器或噴霧器及含有氣霧化劑之調配物。參看例如美國專利第6,019,968號；第5,985,320號；第5,985,309號；第5,934,272號；第5,874,064號；第5,855,913號；第5,290,540號；及第4,880,078；及PCT公開案第WO 92/19244號、第WO 97/32572號、第WO 97/44013號、第WO 98/31346號及第WO 99/66903號，各案係以全文引用的方式併入本文中。在一實施例中，使用Alkermes AIR®肺部藥物遞送技術(Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts, US)投與本發明之DLL4結合蛋白、組合療法或本發明之組合物。在一特定實施例中，肌肉內、靜脈內、腫瘤內、經口、鼻內、經肺或皮下投與本發明之預防劑或治療劑。可由任何便利途徑，例如藉由輸注或快速注射、藉由經上皮或皮膚黏膜內壁(例如口腔黏膜、直腸及腸黏膜等)吸收投與預防劑或治療劑，且其可與其他生物活性劑一起投藥。投藥可為全身或局部投藥。

在一特定實施例中，可能需要將本發明之預防劑或治療劑局部投與需要治療之區域；此舉可藉由例如但不限於局部輸注、注射或藉助於植入物來達成，該植入物為多孔或無孔物質，包括膜及基質，諸如矽橡膠膜(silastic membrane)、聚合物、纖維基質(例如，Tissuel®)或膠原蛋白基質。在一個實施例中，向個體之受影響區域局部投與有效量的一或多種本發明拮抗劑DLL4結合蛋白以預防、治療、控制及/或改善病症或其症狀。在另一實施例中，

向個體之受影響區域局部投與有效量之一或多種本發明 DLL4 結合蛋白與有效量之一或多種不同於本發明結合蛋白之療法(例如，一或多種預防劑或治療劑)的組合以預防、治療、控制及/或改善病症或其一或多種症狀。

在另一實施例中，預防劑或治療劑可於控制釋放或持續釋放系統中遞送。在一個實施例中，可使用泵來達成控制釋放或持續釋放(參看 Langer(*Science*, 249: 1527-1533 (1990))；Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.*, 14: 201-240 (1987)；Buchwald 等人，*Surgery*, 88: 507-516 (1980)；Saudek 等人，*N. Engl. J. Med.*, 321: 574-579 (1989))。在另一實施例中，可使用聚合材料來達成本發明療法之控制釋放或持續釋放。參看例如 Goodson, J.M, **Medical Applications of Controlled Release**, 第 II 卷, **Applications and Evaluations**, (Langer 及 Wise 編), (CRC Press Inc., Boca Raton, 1984), 第 6 章, 第 115-138 頁；**Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance**, Smolen 及 Ball (編)(Wiley, New York, 1984)；Langer 及 Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys.*, C23: 61-126 (1983)；亦參看 Levy 等人，*Science*, 228: 190-192 (1985)；During 等人，*Ann. Neurol.*, 25: 351-356 (1989)；Howard 等人，*J. Neurosurg.*, 71: 105-112 (1989)；美國專利第 5,679,377 號；第 5,916,597 號；第 5,912,015 號；第 5,989,463 號；及第 5,128,326 號；及 PCT 公開案第 WO 99/15154 號及第 WO 99/20253 號。持續釋放調配物中

所使用之聚合物之實例包括但不限於聚(甲基丙烯酸2-羥基乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酸酐、聚(N-乙基吡咯啉酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯醯胺、聚(乙二醇)、聚丙交酯(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)及聚原酸酯。在一較佳實施例中，持續釋放調配物中所使用之聚合物為惰性的、不含可浸出雜質、儲存穩定、無菌且生物可降解。在又一實施例中，控制釋放或持續釋放系統可鄰近於預防或治療標靶置放，由此僅需要全身劑量之一部分(參看例如，Goodson, **Medical Applications of Controlled Release** (1984)，第115-138頁)。

控制釋放系統論述於Langer之綜述(*Science*, 249: 1527-1533 (1990))中。可使用熟習此項技術者已知之任何技術來產生包含本發明之一或多種治療劑的持續釋放調配物。參看例如美國專利第4,526,938號；PCT公開案第WO 91/05548號及第WO 96/20698號；Ning等人，「Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel」，*Radiother. Oncol.*, 39: 179-189 (1996)；Song等人，「Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions」，*PDA J. Pharm. Sci. Tech.*, 50: 372-377 (1996)；Cleek等人，「Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application」，*Proceed. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 24: 853-854 (1997)；及Lam等人，「Microencapsulation

of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery」, *Proceed. Intl. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*: 24: 759-760 (1997), 各文獻係以全文引用的方式併入本文中。

在本發明組合物為編碼預防劑或治療劑之核酸的特定實施例中，該核酸可在活體內投與以促進其所編碼之預防劑或治療劑表現，此舉可藉由將核酸構築為適當核酸表現載體之一部分，且例如藉由以下方式投與核酸以使其變為細胞內的：使用反轉錄病毒載體(參看美國專利第4,980,286號)；或藉由直接注射或利用微粒轟擊(例如基因槍；Biolistic, Dupont)；或以脂質或細胞表面受體或轉染劑包覆；或藉由使其與已知會進入核之同源盒樣肽連接來投藥(參看例如Joliot等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:1864-1868 (1991))。或者，可於細胞內引入核酸且將其併入宿主細胞DNA內以便藉由同源重組加以表現。

本發明之醫藥組合物係調配成與其預定投與途徑相容。投藥途徑之實例包括但不限於非經腸(例如靜脈內)、皮內、皮下、經口、鼻內(例如，吸入)、經皮(例如，局部)、經黏膜，及直腸投藥。在一特定實施例中，組合物係根據常規程序調配為適合於靜脈內、皮下、肌肉內、經口、鼻內或局部投與人類之醫藥組合物。供靜脈內投藥之組合物通常為於無菌等張水性緩衝液中之溶液。必要時，組合物亦可包括增溶劑及用於緩解注射部位之疼痛的諸如利多卡因(lignocaine)之局部麻醉劑。

若將局部投與本發明組合物，則組合物可經調配呈軟膏、乳膏、經皮貼片、洗劑、凝膠、洗髮精、噴霧劑、氣霧劑、溶液、乳液形式或熟習此項技術者所熟知之其他形式。參看例如 **Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms**，第19版，(Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1995)。對於不可噴霧之局部劑型，通常採用包含與局部施用相容之載劑或一或多種賦形劑且動態黏度較佳大於水之黏稠至半固體或固體形式。適合調配物包括但不限於溶液、懸浮液、乳液、乳膏、軟膏、散劑、擦劑、油膏及其類似物，需要時其經滅菌或與影響諸如滲透壓之各種性質的助劑(例如防腐劑、穩定劑、濕潤劑、緩衝液或鹽)混合。其他適合局部劑型包括可噴霧之氣霧劑製劑，其中活性成分，較佳與固體或液體惰性載劑組合，係以與加壓揮發性物質(例如，諸如FREON®之氣體推進劑)之混合物形式封裝或封裝於塑料擠瓶(squeeze bottle)中。必要時，亦可向醫藥組合物及劑型中添加增濕劑或保濕劑。該等其他成分之實例在此項技術中為熟知的。

若本發明之方法包括鼻內投與組合物，則該組合物可調配成氣霧劑形式、噴霧劑、霧或滴液形式。詳言之，根據本發明使用之預防劑或治療劑可使用適合推進劑(例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合適氣體)自加壓包裝或噴霧器以氣霧劑噴霧呈現形式方便利地遞送。在加壓氣霧劑之情況下，劑量單位可藉由

提供閥門以遞送經計量之量來確定。可調配含有化合物與諸如乳糖或澱粉之適合粉末基劑之粉末混合物的膠囊及藥包(由例如明膠構成)以於吸入器或吹入器中使用。

若本發明之方法包括經口投藥，則組合物可調配為經口錠劑、膠囊、扁囊劑、膠囊錠(gelcap)、溶液、懸浮液及其類似物形式。錠劑或膠囊可藉由習知方式用醫藥學上可接受之賦形劑製備，該等賦形劑諸如黏合劑(例如預膠凝化玉米澱粉、聚乙烯吡咯啉酮或羥丙基甲基纖維素)；填充劑(例如乳糖、微晶纖維素或磷酸氫鈣)；潤滑劑(例如硬脂酸鎂、滑石或矽石)；崩解劑(例如馬鈴薯澱粉或澱粉乙醇酸鈉)；或濕潤劑(例如十二烷基硫酸鈉)。錠劑可藉由此項技術中所熟知之方法進行包衣。供經口投與之液體製劑可採用(但不限於)溶液、糖漿或懸浮液形式，或其可呈在使用之前用水或其他適合媒劑復原之乾燥產品形式。該等液體製劑可藉由習知方式用醫藥學上可接受之添加劑製備，諸如懸浮劑(例如山梨糖醇糖漿、纖維素衍生物或氫化可食用脂肪)；乳化劑(例如卵磷脂或阿拉伯膠)；非水性媒劑(例如杏仁油、油酯(oily ester)、乙醇或分餾植物油)；及防腐劑(例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯或山梨酸)。適當時該等製劑亦可含有緩衝鹽、調味劑、著色劑及甜味劑。供經口投與之製劑可經適當調配以緩慢釋放、控制釋放或持續釋放預防劑或治療劑。

本發明之方法可包含例如藉由使用吸入器或噴霧器經肺投與用氣霧化劑調配之組合物。參看例如美國專利第

6,019,968 號；第 5,985,320 號；第 5,985,309 號；第 5,934,272 號；第 5,874,064 號；第 5,855,913 號；第 5,290,540 號；及第 4,880,078 號；及 PCT 公開案第 WO 92/19244 號、第 WO 97/32572 號、第 WO 97/44013 號、第 WO 98/31346 號，及第 WO 99/66903 號，各案係以全文引用的方式併入本文中。在一特定實施例中，使用 Alkermes AIR® 肺部藥物遞送技術 (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts, US) 投與本發明抗體、組合療法及/或本發明組合物。

本發明方法可包含藉由注射(例如，藉由快速注射或連續輸注)投與經調配以供非經腸投藥之組合物。供注射之調配物可呈添加有防腐劑的單位劑型(例如於安瓶中或於多劑量容器中)。該等組合物可呈諸如於油性或水性媒劑中之懸浮液、溶液或乳液形式，且可含有諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑之調配劑。或者，活性成分呈在使用前用適合媒劑(例如，無菌無熱原質水)復原之粉末形式。

本發明之方法可另外包含投與調配為儲槽式製劑之組合物。該等長效調配物可藉由植入(例如，皮下或肌肉內)或藉由肌肉內注射來投與。因而，舉例而言，組合物可用適合的聚合或疏水性物質調配(例如，調配成於可接受油中之乳液)或用離子交換樹脂調配或調配成微溶衍生物(例如，調配成微溶鹽)。

本發明之方法涵蓋投與調配為中性或鹽形式之組合物。醫藥學上可接受之鹽包括與以下形成之鹽：陰離子，諸如衍生自鹽酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等之陰離子；及

陽離子，諸如衍生自氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣、氫氧化鐵、異丙胺、三乙胺、2-乙基胺基乙醇、組胺酸、普魯卡因(procaine)等之陽離子。

一般而言，組合物之成分係單獨或混合在一起成為單位劑型，例如呈乾燥凍乾粉末或無水濃縮物形式提供於指示活性劑之量之密封容器(諸如安瓿或藥囊)中。若投藥模式為輸注，則組合物可以含有無菌醫藥級水或生理食鹽水之輸注瓶分配。若投藥模式為注射，則可提供注射用無菌水或生理食鹽水之安瓿以便可在投藥前混合成分。

詳言之，本發明亦提供本發明之一或多種預防劑或治療劑或者醫藥組合物封裝於指示藥劑之量的密封容器(諸如安瓿或藥囊)中。在一實施例中，本發明之一或多種預防劑或治療劑或者醫藥組合物係以乾燥無菌凍乾粉末或無水濃縮物形式提供於密封容器中且可復原(例如用水或生理食鹽水)至適當濃度以便投與個體。本發明之一或多種預防劑或治療劑或醫藥組合物較佳以乾燥無菌凍乾粉末形式提供於密封容器中，單位劑量為至少5 mg，更佳為至少10 mg、至少15 mg、至少25 mg、至少35 mg、至少45 mg、至少50 mg、至少75 mg或至少100 mg。本發明之凍乾預防劑或治療劑或者醫藥組合物應於其原始容器中在2°C至8°C下儲存，且本發明之預防劑或治療劑或者醫藥組合物在復原後應於1週內，較佳在5天內、在72小時內、在48小時內、在24小時內、在12小時內、在6小時內、在5小時內、在3小時內或在1小時內投與。在一替代性實施例中，本發

明之一或多種預防劑或治療劑或者醫藥組合物係以液體形式提供於指示藥劑之量及濃度之密封容器中。所投與之組合物之液體形式較佳以至少 0.25 mg/ml、更佳至少 0.5 mg/ml、至少 1 mg/ml、至少 2.5 mg/ml、至少 5 mg/ml、至少 8 mg/ml、至少 10 mg/ml、至少 15 mg/kg、至少 25 mg/ml、至少 50 mg/ml、至少 75 mg/ml或至少 100 mg/ml提供於密封容器中。液體形式應於其原始容器中在 2°C 至 8°C 下儲存。

本發明之結合蛋白可併入適合非經腸投藥之醫藥組合物中。結合蛋白較佳將製備成含有 0.1-250 mg/mL 抗體之可注射溶液。可注射溶液可由處於無色或琥珀色小瓶、安瓿或預填充注射器中之液體或凍乾劑型構成。緩衝液可為 L-組胺酸 (1-50 mM)，最佳 5-10 mM，pH 值為 5.0 至 7.0 (最佳 pH 值為 6.0)。其他適合緩衝液包括但不限於丁二酸鈉、檸檬酸鈉、磷酸鈉或磷酸鉀。可使用濃度為 0-300 mM (對於液體劑型，最佳為 150 mM) 之氯化鈉改變溶液之毒性。對於凍乾劑型，可包括低溫保護劑，主要為 0-10% 蔗糖 (最佳 0.5-1.0%)。其他適合低溫保護劑包括海藻糖及乳糖。對於凍乾劑型，可包括增積劑，主要為 1-10% 甘露醇 (最佳 2-4%)。液體與凍乾劑型兩者中均可使用穩定劑，主要為 1-50 mM L-甲硫胺酸 (最佳為 5-10 mM)。其他適合增積劑包括甘胺酸、精胺酸，可包括如 0-0.05% 聚山梨酯 80 (最佳 0.005-0.01%)。其他界面活性劑包括但不限於聚山梨酸酯 20 及 BRIJ 界面活性劑。

本發明之組合物可呈多種形式。此等形式包括例如液體、半固體及固體劑型，諸如液體溶液(例如，可注射溶液及可輸注溶液)、分散液或懸浮液、錠劑、丸劑、散劑、脂質體及栓劑。較佳形式視預定投藥模式及治療應用而定。典型較佳組合物呈可注射或可輸注溶液形式，諸如與用於使人類經其他抗體被動免疫之組合物類似的組合物。較佳投藥模式為非經腸(例如，靜脈內、皮下、腹膜內、肌肉內)投藥。在一較佳實施例中，本文所述之DLL4結合蛋白係藉由靜脈內輸注或注射投與。在另一較佳實施例中，DLL4結合蛋白係藉由肌肉內或皮下注射投與。

在製造及儲存條件下，治療組合物通常必須無菌且穩定。組合物可調配為溶液、微乳液、分散液、脂質體或適合高藥物濃度之其他有序結構。無菌可注射溶液可藉由以下步驟製備：將所需量之活性化合物(亦即，抗體或抗體部分)併入含有上文所列舉之一種成分或成分組合之適當溶劑中，視需要接著進行過濾滅菌。一般而言，藉由將活性化合物併入無菌媒劑中來製備分散液，該無菌媒劑含有基礎分散介質及上文所列舉的其他所需成分。在用於製備無菌可注射溶液之無菌凍乾粉末之情況下，較佳製備方法為真空乾燥及噴霧乾燥，其產生活性成分加上來自先前經無菌過濾之活性成分溶液之任何其他所要成分的粉末。溶液之適當流動性可(例如)藉由使用諸如卵磷脂之包衣、在分散液之情況下藉由維持所要粒度及藉由使用界面活性劑來維持。可藉由在組合物中包括例如單硬脂酸鹽及明膠之

延遲吸收劑來延長可注射組合物之吸收。

可藉由此項技術中已知之各種方法來投與本發明之DLL4結合蛋白，但對於許多治療應用而言，較佳投藥途徑/模式為皮下注射、靜脈內注射或輸注。如熟習此項技術者應瞭解，投藥途徑及/或模式將視所要結果而變化。在某些實施例中，活性化合物可與將保護該化合物以免快速釋放之載劑一起製備，諸如控制釋放調配物，包括植入物、經皮貼片及微囊封遞送系統。可使用生物可降解、生物相容性聚合物，諸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯及聚乳酸。製備該等調配物之許多方法已取得專利權或一般為熟習技術者所知。參看例如 **Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems**, J. R. Robinson編, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978)。

在某些實施例中，本發明之結合蛋白可例如與惰性稀釋劑或可吸收之可食用載劑一起經口投與。該化合物(必要時與其他成分)亦可包封於硬殼或軟殼明膠膠囊中，壓成錠劑，或直接併入個體之飲食中。對於經口治療用投藥，可將化合物與賦形劑合併且以可攝取錠劑、經頰錠劑、片劑、膠囊、酏劑、懸浮液、糖漿、糯米紙囊劑及其類似物之形式使用。為經由除非經腸投藥以外之途徑投與本發明之化合物，可能有必要用防止化合物滅活之物質包覆該化合物或共投與化合物與防止其滅活之物質。

亦可在組合物中併入輔助性活性化合物。在某些實施例中，將本發明之結合蛋白與一或多種適用於治療因DLL4

活性而受害之病症的其他治療劑共同調配及/或共同投與。舉例而言，可將本發明之抗huDLL4抗體或抗體部分與一或多種結合其他標靶之其他抗體(例如，結合其他細胞激素或結合細胞表面分子之抗體)共同調配及/或共同投與。此外，一或多種本發明結合蛋白可與兩種或兩種以上上述治療劑組合使用。該等組合療法可有利地利用較低劑量的所投與之治療劑，從而避免與各種單一療法相關的可能之毒性或併發症。

在某些實施例中，本發明之DLL4結合蛋白係連接至此項技術中已知之半衰期延長媒劑。該等媒劑包括但不限於Fc域、聚乙二醇及葡聚糖。該等媒劑描述於例如美國專利第6,660,843 B1號及已公開之PCT公開案第WO 99/25044號中，該等文獻係以引用的方式併入本文中。

在一特定實施例中，藉由基因療法投與包含編碼本發明之結合蛋白或本發明之另一預防劑或治療劑之核苷酸序列的核酸序列來治療、預防、控制或改善病症或其一或多種症狀。基因療法係指藉由向個體投與已表現或可表現核酸來執行之療法。在本發明之此實施例中，核酸產生其所編碼之本發明結合蛋白或預防劑或治療劑，其會介導預防或治療作用。

根據本發明，可使用此項技術中可利用之用於基因療法之任何方法。對於該等基因療法方法之綜述，參看Goldspiel等人, *Clin. Pharmacy*, 12: 488-505 (1993); Wu及Wu, *Biotherapy*, 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev.*

Pharmacol. Toxicol., 32: 573-596 (1993) ; Mulligan, *Science*, 260: 926-932 (1993) ; 及 Morgan 及 Anderson, *Ann. Rev. Biochem.*, 62: 191-217 (1993) ; Robinson, C., *Trends Biotechnol.*, 11(5):155 (1993)。可使用之重組DNA技術中普遍已知之方法描述於以下文獻中：Ausubel等人(編), **Current Protocols in Molecular Biology** (John Wiley & Sons, New York, 1993)；及Kriegler, **Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual**, (Stockton Press, New York, 1990)。各種基因療法方法之詳細描述揭示於美國專利申請公開案第20050042664 A1號中，該案係以引用的方式併入本文中。

在另一態樣中，本發明提供一種治療(例如治癒、抑制、改善、延遲或防止發作，或防止反覆或復發)或預防個體與DLL4相關之腫瘤的方法。該方法包括投與個體以足以治療或預防與DLL相關之腫瘤或癌症之量的DLL4結合蛋白，例如，如本文所述之抗DLL4抗體或其片段。DLL4拮抗劑，亦即抗DLL4抗體或其片段，可單獨或與如本文所述之其他治療用儀器治療組合投與個體。DLL4在與涉及免疫及發炎性要素之各種疾病(尤其癌症及腫瘤血管生成)相關之病理學中起重要作用。與DLL4相關之病症之實例包括但不限於不利地影響以下生物過程的彼等病症：神經元功能及發育；穩定動脈內皮命運及血管生成；調控原瓣及心室發育及分化期間心內膜與心肌間之重要細胞通訊事件；心瓣膜恆定以及在涉及心血管系統之其他人類病症

中所牽涉之生物過程；內分泌及外分泌腺之適時細胞譜系特化；必須在腸中分泌性譜系與吸收性譜系之間做出選擇的二元細胞命運決定之影響；造血幹細胞隔室在骨發育期間擴增及參與骨母細胞譜系義務，諸如骨質疏鬆症；調控若干不同發育階段乳腺中之細胞命運決定；及某些非核機制，諸如經由酪氨酸激酶Abl控制肌動蛋白細胞骨架。更特定言之，與DLL4相關之病症包括但不限於癌症、T-ALL(T細胞急性淋巴母細胞白血病)、CADASIL(大腦體染色體顯性動脈病伴隨皮質下梗塞及腦白質病)、MS(多發性硬化)、法洛氏四聯症(TOF)及阿拉吉歐症候群(AS)、黃斑變性及年齡相關之黃斑變性疾病，及以異常DLL4表現或活性為特徵之其他血管生成依賴性疾病及非血管生成依賴性疾病。

如本文所述之DLL4結合蛋白，諸如抗體及其抗原結合部分較佳用於治療癌症及腫瘤。

本發明之結合蛋白可單獨使用或組合使用，亦即，一種以上本文所述之DLL4-結合蛋白，用於治療癌症、腫瘤或其他病症，其中DLL4之結合、抑制及/或中和視為個體健康所需或有益於個體健康。

應理解，本發明之DLL4結合蛋白亦可單獨或與其他藥劑(例如治療劑)組合使用，該其他藥劑係由熟習此項技術者針對其預定目的而選擇。舉例而言，該其他藥劑可為此項技術中認為適用於治療癌症、腫瘤或其他疾病或病狀的治療劑，其中DLL4之結合或抑制視為治療癌症、腫瘤或

其他疾病或病狀所需或對其有利。其他藥劑亦可為賦予治療用組合物以有利屬性的藥劑，例如影響組合物黏度的藥劑。

應進一步瞭解，將包括在本發明內之組合為適用於其預定目的之組合。以下陳述之藥劑係出於說明性目的且不意欲具限制性。作為本發明之一部分的組合可為本發明抗體與至少一種選自以下清單之其他藥劑。組合亦可包括一種以上其他藥劑，例如兩種或三種其他藥劑，只要該組合使得所形成之組合物可執行其預定功能即可。

較佳之治療劑組合可在不同時間點干擾促腫瘤形成或促血管生成信號傳導路徑。適用於本發明方法及組合物中之較佳治療劑實例包括抗腫瘤劑、放射療法及化學療法，諸如DNA烷化劑、順鉑、卡鉑、抗微管蛋白劑、太平洋紫杉醇、歐洲紫杉醇、紫杉醇、小紅莓、吉西他濱、健擇、蔥環黴素、阿黴素、拓撲異構酶I抑制劑、拓撲異構酶II抑制劑、5-氟尿嘧啶(5-FU)、甲醯四氫葉酸、伊立替康、受體酪胺酸激酶抑制劑(例如埃羅替尼、吉非替尼)、COX-2抑制劑(例如塞內昔布)及激酶抑制劑。

本發明之DLL4結合蛋白亦可與以下藥劑組合投與：諸如甲胺喋呤、6-MP、硫唑嘌呤、柳氮磺吡啶、美色拉秦(mesalazine)、奧色拉秦氯喹(olsalazine chloroquine)/羥氯喹、青黴胺、硫代蘋果酸鹽(aurothiomalate)(肌肉內及口服)、硫唑嘌呤(azathioprine)、秋水仙素(cochicine)、皮質類固醇(口服、吸入及局部注射)、 β -2腎上腺素受體促效

劑(沙丁胺醇(salbutamol)、特布他林(terbutaline)、沙美特羅(salmeteral))、黃嘌呤(茶鹼(theophylline)、胺茶鹼(aminophylline))、色甘酸鹽(cromoglycate)、奈多羅米(nedocromil)、酮替酚(ketotifen)、異丙托銨(ipratropium)及氧托銨(oxitropium)、環孢素、FK506、雷帕黴素、黴酚酸嗎啉乙酯、來氟米特(leflunomide)、NSAID(例如布洛芬)、皮質類固醇(諸如去氫皮質醇)、磷酸二酯酶抑制劑、腺苷促效劑(adenosine agonist)、抗血栓劑、補體抑制劑、腎上腺素激導劑、干擾促發炎性細胞激素(諸如TNF α 或IL-1)信號傳導之藥劑(例如IRAK、NIK、IKK、p38或MAP激酶抑制劑)、IL-1 β 轉化酶抑制劑、TNF α 轉化酶(TACE)抑制劑、T細胞信號傳導抑制劑(諸如激酶抑制劑)、金屬蛋白酶抑制劑、柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、6-巰基嘌呤、血管緊張素轉化酶抑制劑、可溶性細胞激素受體及其衍生物(例如可溶性p55或p75 TNF受體及衍生物p75TNFRIgG(EnbrelTM)及p55TNFRIgG(來那西普(Lenercept)))、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R)、消炎性細胞激素(例如IL-4、IL-10、IL-11、IL-13及TGF β)、賽利克西(celecoxib)、葉酸(folic acid)、硫酸羥氯喹、羅非昔布(rofecoxib)、依那西普(etanercept)、英利昔單抗(infliximab)、萘普生(naproxen)、伐地考昔(valdecoxib)、柳氮磺胺吡啶、甲潑尼龍(methylprednisolone)、美儂西康(meloxicam)、乙酸甲潑尼龍、硫代蘋果酸金鈉、阿司匹靈(aspirin)、曲安奈德(triamcinolone acetonide)、萘磺酸丙氧芬(propoxyphene

napsylate)/apap、葉酸鹽、萘丁美酮(nabumetone)、雙氯芬酸(diclofenac)、吡羅昔康(piroxicam)、依託度酸(etodolac)、雙氯芬酸鈉(diclofenac sodium)、奧沙普嗪(oxaprozin)、鹽酸羥考酮(oxycodone hcl)、酸式酒石酸氫可酮(hydrocodone bitartrate)/apap、雙氯芬酸鈉(diclofenac sodium)/米索前列醇(misoprostol)、芬太尼(fentanyl)、阿那白滯素(anakinra (人類重組))、鹽酸曲馬多(tramadol hCl)、雙水楊酯(salsalate)、舒林酸(sulindac)、氰鈷胺素(cyanocobalamin)/fa/吡哆醇(pyridoxine)、乙醯胺苯酚(acetaminophen)、阿倫磷酸鈉(alendronate sodium)、去氫皮質醇、硫酸嗎啡(morphine sulfate)、鹽酸利多卡因、吲哚美辛(indomethacin)、硫酸葡糖胺(glucosamine sulf)/軟骨素(chondroitin)、鹽酸阿米替林(amitriptyline HCl)、磺胺嘧啶、鹽酸羥考酮/乙醯胺苯酚、鹽酸奧洛他定(olopatadine hcl)、米索前列醇、萘普生鈉(naproxen sodium)、奧美拉唑(omeprazole)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、利妥昔單抗(rituximab)、IL-1 TRAP、MRA、CTLA4-IG、IL-18 BP、抗IL-18、抗IL15、BIRB-796、SCIO-469、VX-702、AMG-548、VX-740、羅氟司特(Roflumilast)、IC-485、CDC-801及美索潘(Mesopram)。

可與本發明之DLL4結合蛋白共同投與或組合使用之癌症治療劑的非限制性實例包括以下：布地奈德(budenoside)；表皮生長因子；柳氮磺胺吡啶；胺基水楊酸酯；6-巯基嘌呤；硫唑嘌呤；甲硝噻唑(metronidazole)；脂肪加氧酶抑

制劑；美沙拉明(mesalamine)；奧色拉秦；巴柳氮(balsalazide)；抗氧化劑；血栓素抑制劑(thromboxane inhibitor)；IL-1受體拮抗劑；抗IL-1 β 單株抗體；抗IL-6單株抗體；生長因子；彈性蛋白酶抑制劑；吡啶基-咪唑化合物；及針對其他人類細胞激素或生長因子(例如TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF及PDGF)之抗體或拮抗劑。本發明之抗體或其抗原結合部分可與針對細胞表面分子(諸如CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90)或其配位體之抗體組合。

可與本發明之DLL4結合蛋白組合之治療劑之其他實例包括以下：TNF拮抗劑，例如抗TNF抗體、D2E7(PCT公開案第WO 97/29131號；HUMIRA®)、CA2(REMICADE®)、CDP 571、TNFR-Ig構築體(p75TNFR IgG(ENBREL®)及p55TNFR IgG(LENERCEPT))及PDE4抑制劑。本發明之DLL4結合蛋白可與以下藥劑組合：美沙拉明、強的松、硫唑嘌呤、巯基嘌呤、英利昔單抗、甲潑尼龍丁二酸鈉、地芬諾酯(diphenoxylate)/硫酸阿托品(atrop sulfate)、鹽酸洛哌丁胺(loperamide hydrochloride)、甲胺喋呤、奧美拉唑、葉酸鹽、環丙沙星(ciprofloxacin)/右旋糖-水、酸式酒石酸氫可酮/apap、鹽酸四環素、醋酸氟輕鬆(fluocinonide)、甲硝噻唑、硫柳汞(thimerosal)/硼酸、消膽胺(cholestyramine)/蔗糖、鹽酸環丙沙星、硫酸萆菴

鹼、鹽酸哌替啶(meperidine hydrochloride)、鹽酸咪達唑倫(midazolam hydrochloride)、鹽酸羥考酮/乙醯胺苯酚、鹽酸普敏太定(promethazine hydrochloride)、磷酸鈉、磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole)/甲氧苄胺嘧啶(trimethoprim)、賽利克西、聚卡波非(polycarbophil)、萘磺酸丙氧芬、氫化可的松(hydrocortisone)、綜合維生素(multivitamin)、巴柳氮二鈉、磷酸可待因/apap、鹽酸考來維倫(colesevelam hCl)、氟鉍胺素、葉酸、左氧氟沙星(levofloxacin)、甲潑尼龍、那他珠單抗(natalizumab)及干擾素- γ 。

可與本發明之結合蛋白組合之治療劑之非限制性實例包括以下：阿司匹靈、硝酸甘油、單硝酸異山梨醇、丁二酸美托洛爾(metoprolol succinate)、阿替洛爾(atenolol)、酒石酸美托洛爾、苄磺酸胺氯地平、鹽酸地爾硫卓(diltiazem hydrochloride)、二硝酸異山梨醇(isosorbide dinitrate)、克羅匹多硫酸氫鹽(clopidogrel bisulfate)、硝苯吡啶(nifedipine)、阿托伐他汀鈣(atorvastatin calcium)、氯化鉀、呋喃苯胺酸、辛伐他汀(simvastatin)、鹽酸維拉帕米(verapamil hCl)、地高辛(digoxin)、鹽酸普萘洛爾(propranolol hydrochloride)、卡維地洛(carvedilol)、賴諾普利(lisinopril)、螺內酯(spironolactone)、氫氯噻嗪(hydrochlorothiazide)、順丁烯二酸依那普利(enalapril maleate)、納多洛爾(nadolol)、雷米普利(ramipril)、依諾肝素鈉(enoxaparin sodium)、肝素鈉(heparin sodium)、缬沙坦(valsartan)、鹽酸索他洛爾(sotalol hydrochloride)、非

諾貝特(fenofibrate)、依澤替米貝(ezetimibe)、布美他尼(bumetanide)、氯沙坦鉀(losartan potassium)、賴諾普利/氫氯噻嗪、非洛地平(felodipine)、卡托普利(captopril)及反丁烯二酸比索洛爾(bisoprolol fumarate)。

本發明之醫藥組合物可包括「治療有效量」或「預防有效量」之本發明結合蛋白。「治療有效量」係指在必需劑量下且持續必需時段有效達成所要治療結果的量。結合蛋白之治療有效劑量可由熟習此項技術者確定且可根據諸如疾病狀態、個體之年齡、性別及體重以及結合蛋白引發個體之所要反應之能力之因素而變化。治療有效量亦為結合蛋白之治療有益作用超過其任何毒性或有害作用的量。

「預防有效量」係指在必需劑量下且持續必需時段有效達成所要預防結果之量。由於預防劑量係在疾病之前或在疾病早期階段用於個體，因此預防有效量通常將小於治療有效量。

可調整劑量方案以提供最佳所要反應(例如治療或預防反應)。舉例而言，可投與單一大丸劑；可隨時間投與若干分次劑量；或可根據治療情況之緊急程度所指示按比例減少或增加劑量。出於投藥簡便性及劑量均一性考慮，尤其適宜將非經腸組合物調配成單位劑型。如本文中所使用之單位劑型係指適宜作為整體劑量用於待治療之哺乳動物個體的物理離散單元；各單元含有經計算將產生所要治療作用之預定量的活性化合物與所需醫藥載劑締合。本發明之單位劑型的規格由以下因素決定且直接取決於以下因

素：(a)活性化合物之獨特特徵及欲達成之特定治療或預防作用；及(b)混配該種活性化合物以治療個體之敏感性之技術中固有之限制。

本發明DLL4結合蛋白之治療或預防有效量之例示性非限制範圍為0.1-20 mg/kg，較佳為1-10 mg/kg。應注意劑量值可隨有待減輕之病狀之類型及嚴重度而變化。應進一步瞭解，對於任何特定個體，特定劑量方案應根據個體需要及投與組合物或監督組合物投與之人士的專業判斷隨時間調整，且本文所述之劑量範圍僅為例示性的，且不意欲限制所主張之組合物的範疇或實踐。

III. 在免疫技術中之用途

各種免疫偵測分析格式中之任一者均可適於採用本發明之DLL4結合蛋白以用於偵測混合物、溶液或生物樣本中存在之DLL4。該等免疫偵測分析格式包括但不限於放射免疫分析(RIA)、免疫沈澱法、酶聯免疫吸附分析(ELISA)、免疫墨點法(例如西方墨點法)、包含本發明DLL4結合蛋白吸附或固定至基質之免疫試紙條(例如免疫量桿)、螢光活化細胞分選術(FACS)及其類似方法。本文所述之DLL4結合蛋白可吸附或固定至基質，例如樹脂粒子或其他物質，以使用於此項技術中可用於純化樣本中之DLL4的親和力管柱或任何其他親和力格式。可在活體外使用本發明之DLL4結合蛋白對混合物、溶液或生物樣本進行DLL4偵測。可與本發明之DLL4結合蛋白接觸以偵測或量測樣本中之DLL4的生物樣本包括但不限於尿、唾

液、口腔抹片(頰、舌或咽喉抹片)、皮膚抹片、皮膚刮落物、直腸抹片、陰道抹片、全血樣本、血漿樣本、血清樣本、活組織切片，及藉由此項技術已知之程序自個體獲得的任何其他樣本。在另一實施例中，DLL4結合蛋白可用於偵測活體內DLL4，諸如各種斷層攝影法及掃描法，包括但不限於X射線電腦輔助斷層攝影法(CT)、磁共振成像(MRI)及正電子發射斷層攝影法(PET)。

熟習此項技術者將易於瞭解，本文所述之本發明方法之其他適合的修改及調整顯而易見，且可使用適合的相等物進行而不背離本發明之範疇或本文中所揭示之實施例。現已詳細描述了本發明，參考下列實例將更清楚理解本發明，該等實例僅出於說明之目的包括在本發明內而不意欲限制本發明。

實例

實例1：用於測定DLL4抗體之功能活性的活體外分析

實例1.1：使用BIACORE®表面電漿子共振技術測定親和力

BIACORE®表面電漿子共振分析(Biacore, Inc., Piscataway, New Jersey, US)藉由締合速率及解離速率常數之動力學量測來測定抗體之親和力。DLL4抗體與經純化之重組DLL4細胞外域(ECD)之結合係藉由用Biacore®儀器(Biacore 2000、Biacore 3000或Biacore T100; GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, US)，在25°C下使用操作緩衝液HBS-EPB(10 mM HEPES [pH 7.4]、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.1 mg/ml BSA及0.005%界面活性劑P20)進行之基

於表面電漿子共振之量測來測定。舉例而言，使用標準胺偶合套組，根據製造商之說明書及程序，以25 $\mu\text{g/ml}$ 將稀釋於10 mM乙酸鈉(pH 4.5)中之約9000 RU之山羊抗人類Fc特異性多株抗體(Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Illinois, US)直接固定在CM5研究級生物傳感器晶片上。用乙醇胺阻斷生物傳感器表面上之未反應部分。為進行動力學分析，利用Scrubber 2(BioLogic Software)、Biacore Biaevaluation 4.0.1軟體或Biacore T100評估軟體將由1:1朗繆爾結合模型(Langmuir binding model)得出之速率方程同時針對多次抗原注射擬合(使用全擬合分析)。經純化之抗體於操作緩衝液中稀釋以供在整個山羊抗人類Fc反應表面上進行捕捉。待捕捉為配位體之抗體(1 $\mu\text{g/ml}$)以10 $\mu\text{l/min}$ 之流動速率經反應基質注射。在分析期間，所有量測均以單獨捕捉表面(亦即，在無經捕獲之抗DLL4抗體)為參照。在80 $\mu\text{l/min}$ 之連續流動速率下測定締合及解離速率常數， $K_{\text{on}}(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$ 及 $K_{\text{off}}(\text{s}^{-1})$ 。速率常數係藉由在1.23-900 nM範圍內之不同抗原濃度(作為3倍稀釋系列)下進行動力學結合量測而獲得，且包括單獨緩衝液注射(用於雙重參照)。接著，藉由下式由動力學速率常數計算抗體與靶抗原間之反應之平衡解離常數 $K_{\text{D}}(\text{M})$ ： $K_{\text{D}}=K_{\text{off}}/K_{\text{on}}$ 。記錄結合隨時間之函數，並計算動力學速率常數。在此分析中，可量測快達 $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 之締合速率，及慢至 10^{-6} s^{-1} 之解離速率。

實例1.2：藉由ELISA測定DLL4抗體與可溶性DLL4細胞外域之結合

方法 1(捕捉 ELISA)

用 5 µg/ml 針對人類 IgG 之抗體 (具 Fcg 片段特異性, Jackson ImmunoResearch, #109-005-098, 100 微升/孔) 的 D-PBS (Gibco #14190) 溶液塗佈 96 孔 Nunc-Immuno 板 (#439454), 並在 4°C 下培育隔夜。在 25°C 下用洗滌緩衝液 (PBS, 0.05% Tween-20) 洗滌 ELISA 板 3 次, 接著用 200 毫升/孔阻斷緩衝液 (D-PBS、1% BSA、1 mM CaCl₂、0.05% Tween-20) 阻斷 1 小時。在 25°C 下洗滌板 3 次, 並用 100 微升/孔 DLL4 抗體 (0.0001-100 nM, 於阻斷緩衝液中 10 倍連續稀釋) 培育 1 小時, 接著再洗滌 3 次。在 25°C 下用經生物素標記之人類 DLL4 細胞外域 (10 nM 於阻斷緩衝液中, 100 微升/孔) 培育含有所捕獲之 DLL4 抗體的板 1 小時, 洗滌 3 次, 並在 25°C 下用與 HRP 結合之抗生蛋白鏈菌素 (KPL #474-3000, 於阻斷緩衝液中 1:10,000 稀釋, 100 微升/孔) 培育 1 小時。最後一次洗滌後, 用 100 微升/孔 ELISA 受質 (1-Step Ultra TMB-ELISA, Pierce #340280) 培育板。2 分鐘後, 在 25°C 下用 100 微升/孔 2 N H₂SO₄ 終止反應, 並在 450 nm 下讀取吸光度。使用 Graphpad Prism 軟體分析數據, 並報導 EC₅₀ 值。

方法 2(鍍銅板)

在使用前用洗滌緩衝液 (PBS, 0.05% Tween-20) 洗滌 96 孔鍍銅板 (Thermo Scientific #15143) 3 次, 接著在 25°C 下在震盪下用 1 µg/ml 6×His 標記之重組 DLL4 細胞外域 (ECD) (「6×His」如 SEQ ID NO: 206 揭示) 之 PBS 溶液以 100

微升/孔培育1小時。接著洗滌板3次。接著，在25℃下在震盪下向板中添加100微升/孔重組大鼠/人類嵌合或重組人類抗DLL4抗體(0.00164-27 nM，於ELISA緩衝液，即PBST、10% Superblock(Pierce #37515)中4倍連續稀釋)，歷時1小時，接著再洗滌3次。在25℃下在震盪下用山羊抗人類HRP(Pierce #31412)(於ELISA緩衝液中1:40,000稀釋，100微升/孔)培育板，接著洗滌3次。最後一次洗滌後，用100微升/孔ELISA受質(Sigma #T8665)培育板。8分鐘後，在25℃下用100微升/孔1 N HCl終止反應，並在450 nm下讀取吸光度。使用Graphpad Prism軟體分析數據，並報導EC₅₀值。

實例 1.3：藉由流動式細胞測量術(FACS)評估DLL4單株抗體與人類腫瘤細胞株之表面之結合

自組織培養燒瓶中收集過度表現細胞表面DLL4之穩定細胞株，洗滌4次，並再懸浮於含有1%牛血清白蛋白及1 mM CaCl₂之磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)(FACS緩衝液)中。1.5×10⁵個細胞與抗體一起以在於FACS緩衝液中之不同濃度下於冰上培育60分鐘。洗滌細胞兩次，並添加50 μL結合R-藻紅蛋白之抗大鼠IgG F(ab')₂片段(於FACS緩衝液中1:200稀釋)(Jackson ImmunoResearch，West Grove，PA，目錄號112-116-072)。在冰上培育(4℃，60分鐘)後，洗滌細胞3次並再懸浮於FACS緩衝液中。使用Becton Dickinson FACSCalibur-HTS(Becton Dickinson，San Jose，California，US)量測螢光。使用Graphpad Prism軟體分析

數據，且報導 EC_{50} 值，即達成DLL4抗體與DLL4表現細胞之最大結合之50%時的抗體濃度。

實例 1.4：DLL4抗體對Notch-1與可溶性DLL4細胞外域之相互作用的抑制(競爭ELISA)

用16 nM人類Notch-1(R & D Systems #3647-TK，100微升/孔，於D-PBS中)塗佈96孔Nunc-Immuno板(#439454，對於huDLL4 ELISA)及96孔Costar板(#9018，對於muDLL4 ELISA)，並在4°C下培育隔夜。接著，在25°C下用洗滌緩衝液(PBS，0.05% Tween-20)洗滌板3次，並用200微升/孔阻斷緩衝液(D-PBS、1% BSA、1 mM $CaCl_2$ 、0.05% Tween-20)阻斷1小時。在阻斷的同時，在25°C下在震盪下將經生物素標記之DLL4細胞外域(14 nM)與抗體(30 pM-66 nM，於阻斷緩衝液中3倍連續稀釋)混合1小時。阻斷後洗滌分析板，並用DLL4/抗體混合物進行培育(100微升/孔，1小時，在25°C下在震盪下)。再洗滌板，並在25°C下在震盪下添加100微升/孔與HRP結合之抗生蛋白鏈菌素(Fitzgerald #65R-S104PHRPx，於阻斷緩衝液中1:5,000稀釋)，歷時1小時。最後一次洗滌後，使用100微升/孔受質(TMB Sigma #T8665)使板顯色，並使用100微升/孔1 N HCl終止反應，且在450 nm下讀取吸光度。使用Graphpad Prism軟體分析數據，且報導 IC_{50} 值，即達成結合至Notch1之DLL4減少50%時的抗體濃度。

實例 1.5：藉由流動式細胞測量術(競爭FACS)評估抗DLL4單株抗體對可溶性Notch與過度表現DLL4之293G細胞之結

合的阻斷

Notch阻斷分析：簡而言之，自組織培養燒瓶中收集過度表現細胞表面DLL4之穩定細胞株，並再懸浮於含有1%牛血清白蛋白及1 mM CaCl_2 之磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)(FACS緩衝液)中。將HEK293G-DLL4細胞以 1.5×10^5 細胞/孔於FACS緩衝液中分配至96孔板(v底)中。使細胞旋轉沈降並棄去上清液後，向各孔中添加50 μL 經適當稀釋之經純化IgG，並在4°C下於冰上培育60分鐘，接著添加50微升/孔0.2 $\mu\text{g/mL}$ (對於人類DLL4-293G)或2.0 $\mu\text{g/mL}$ (對於小鼠DLL4-293G)Notch1-生物素(最終為1.0或0.1 $\mu\text{g/mL}$)，再在4°C下於冰上培育1小時。用FACS緩衝液洗滌細胞兩次後，添加50 μL 結合R-藻紅蛋白之抗生蛋白鏈菌素(於FACS緩衝液中1:150稀釋)(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, 目錄號016-110-084)。在冰上培育(4°C, 60分鐘)後，洗滌細胞3次並再懸浮於FACS緩衝液中。使用Becton Dickinson FACSCalibur-HTS(Becton Dickinson, San Jose, CA)量測螢光。使用Graphpad Prism軟體分析數據，且報導 IC_{50} 值，即達成結合至DLL4表現細胞之Notch1減少50%時的抗體濃度。

實例 1.6：使用Notch受體分析評估DLL4抗體對EA.hy926細胞中之DLL4依賴性Notch活化的抑制

用7,000個細胞/孔之經工程改造之EA.hy926細胞對96孔黑色透明底組織培養板接種隔夜，該等細胞表現受Notch反應性啟動子驅動的螢光素酶。將自200 nM連續稀釋之抗

體與相等體積之5,000個表現全長DLL4之HEK293G細胞/孔混合15分鐘。在測試抗體存在下，將293G/DLL4細胞與EA.hy926 Notch報導子細胞共同培養24小時。由Promega受質(Promega #E2940)分析螢光素酶活性。使用Graphpad Prism軟體分析數據，且報導 IC_{50} 值，即達成DLL4誘導之Notch活化減少50%時的抗體濃度。

實例1.7：物理化學性質表徵之分析方法及技術

PEG沈澱法

根據體積排除原理使用PEG誘導固體蛋白質之相分離為一種評估蛋白質之溶解性的可行方法。PEG具有優於其他沈澱劑之若干優點，包括在環境溫度下蛋白質變性最少(不影響蛋白質三級結構)且不需要溫度控制在4°C至30°C範圍內，亦即，可在周圍溫度下於實驗台上進行沈澱研究。

一般而言，基於體積排除效應解釋由PEG所致之蛋白質沈澱。根據此理論，蛋白質在空間上自PEG直鏈所佔據之溶劑區域中排除。因此，蛋白質被濃縮，最終在超過其溶解度時沈澱。就熱力學而言，空間排除使得蛋白質之化學勢增加，直至其超過純固態之化學勢，從而導致蛋白質沈澱。發生此現象主要由於PEG與蛋白質間之相互作用的不利自由能較大，從而由於空間排除效應而減少蛋白質之優先水合。在水溶液中，優先水合有助於維持蛋白質之天然結構。一般而言，已顯示隨PEG之分子量增加，體積排除變得更為有效，亦即，隨PEG分子量增加，使蛋白質沈澱時所需之PEG減少。

選擇分子量為3000之PEG來估測本專利所涵蓋之抗體的溶解度。藉由以1 g PEG:1 mL水之比率將PEG溶解於去離子水中，製備50% PEG溶液。接著，向最初濃度小於或等於0.5 mg/ml且體積為0.5 mL之抗體溶液中添加該PEG溶液。持續添加該PEG溶液並混合，直至第一種情況之混濁持續。根據 $(50) \times (\text{PEG 3000 溶液之添加體積}) / (\text{添加PEG之前之抗體溶液初始體積})$ ，計算引起此沈澱所需之PEG 3000百分比。

將沈澱所需之PEG 3000百分比與具有已知水溶解度之蛋白質沈澱所需之百分比比較。舉例而言，阿達木單抗之水溶解度超過200 mg/mL。因此，若使相關蛋白質沈澱所需之PEG 3000之百分比類似於使阿達木單抗沈澱所需之百分比，則該蛋白質之預測溶解度將類似於阿達木單抗之溶解度。

真溶解度法

藉由使用Amicon離心過濾器濃縮溶液中之蛋白質，直至觀察到蛋白質自溶液中沈澱析出，或直至達到蛋白質在過濾單元內濃縮可達到之最小體積為止，來測定真溶解度。對於後一種情況，15 mL Amicon離心過濾器具有約50 μ l之最小體積，而4 mL Amicon離心過濾器具有約15 μ l之最小體積。

首先，將蛋白質透析至特定調配物中。對於此等研究，抗體量為10 mg或更少。接著，將蛋白質溶液插入Amicon離心過濾器滯留腔中。該腔室襯有硝化纖維素膜，該膜具

有的孔隙將容許小於10至30千道爾頓(kilodalton)之分子在受到離心力時通過。通常140千道爾頓以上之抗體滯留，而水、緩衝液分子、小賦形劑及鹽通過。接著，根據製造商說明書使離心過濾器離心，直至觀察到蛋白質自溶液中沈澱析出或直至達到蛋白質於過濾單元內濃縮可達到之最小體積為止。

離心後，自滯留腔移除蛋白質溶液，並藉由紫外光吸收度量測濃度。接著，將溶液在25°C及5°C下保持1至2天，並監測沈澱跡象。

近UV-CD技術

近UV-CD光譜提供關於蛋白質三級結構之重要資訊，且為此方面之最常用技術之一。CD係指平面偏振輻射之左圓偏振成份與右圓偏振成分的差異吸收。對於蛋白質，近UVCD區(250-320 nm)中之發色團為芳族胺基酸(亦即，色胺酸、酪胺酸及苯基丙胺酸)，及二硫鍵，且當發色團存在於不對稱(隱嵌)環境中時，發生CD效應。250-270 nm區域中之信號可歸因於苯丙胺酸殘基，270-290 nm之信號可歸因於酪胺酸，且280-300 nm之信號可歸因於色胺酸。二硫鍵在整個近UV光譜中產生寬弱信號。近UV CD光譜會對三級結構中之微小變化敏感，諸如由蛋白質-蛋白質相互作用及/或調配條件變化所致之彼等變化。

許多其他因素可能影響芳族胺基酸之CD光譜。其中包括：(1)蛋白質之剛性；(2)氫鍵結性質；及(3)各種芳族胺基酸之間的相互作用。另外，具有許多該種胺基酸之蛋白

質可能由於陽性帶及陰性帶之刪除而具有較小CD帶。

簡而言之，用Jasco 800 CD光譜儀自250至320 nm或自240至320 nm掃描以1 mg/ml透析至所要調配物中之蛋白質。亦掃描不含蛋白質之相應調配物，並自蛋白質溶液之掃描讀數中減去該讀數。近UV-CD光譜為莫耳橢圓率對250或240 nm至320 nm之波長的曲線圖。

對於一般抗體，具有半S形曲線之近UV-CD光譜表明三級結構摺疊良好，而較平坦且特徵較少之曲線表明展開傾向較大。緊湊摺疊與良好穩定性相關，而不良摺疊暴露疏水性內部，其可導致蛋白質分子間的疏水性相互作用，從而形成不需要之聚集物。

DSC技術

使用差示掃描熱量測定(DSC)儀器評估抗體之熱穩定性。所使用之DSC儀器為具有毛細管吸收池之自動化VP-DSC設備(Microcal, GE Healthcare Ltd./Microcal, Buckinghamshire, UK)。對於1 mg/mL之樣本，施加在25°C -95°C溫度範圍內1°C/min之掃描速率來研究分子之展開。所應用之其他量測參數為16秒之擬合時段、10分鐘之預掃描等待時間，且以無反饋模式執行量測。根據個別量測，用下文所提供之板填充流程將420 µL樣本/空白物填充至DSC量測樣本固持器中。將所獲得之熱分析圖擬合成非兩態模型以獲得不同轉變之中點溫度及焓。

對於成功生物製劑開發候選物之另外要求為蛋白質保持其天然狀態及構形。於水溶液中之蛋白質處於天然(摺疊)

構形與其變性(展開)構形之間的平衡狀態。天然狀態之穩定性係基於系統之吉布斯自由能(DG)(Gibbs free energy)量值及焓(DH)與熵(DS)變化之間的熱力學關係。正DG表明天然狀態比變性狀態穩定，DG之正值愈大，穩定性愈高。為了使蛋白質展開，需要打破穩定力。構形熵克服穩定力，從而允許蛋白質在熵佔優勢之溫度下展開。DSC量測因熱變性而展開之蛋白質的DH。作為一般規律，可以說轉變中點(Tm)愈高，蛋白質在較低溫度下愈穩定。在同一實驗期間，DSC亦量測蛋白質變性之熱容變化(DCp)。與蛋白質展開相關之熱容變化主要歸因於側鏈水合之變化，該等側鏈在天然狀態下為隱嵌的，但在變性狀態下暴露於溶劑。已顯示DSC可有效預測蛋白質及其他生物大分子之液體調配物穩定性(Remmele, R.L. Jr., Gombotz, W.R., BioPharm 13, 36-46, 2000及Remmele, R.L. Jr., Nightlinger, N.S., Srinivasen, S., Gombotz, W.R., Pharm. Res. 15, 200-208, 1998)。

SEC技術

尺寸排除層析法(SEC)用於基於尺寸分離蛋白質。將蛋白質載於水性移動相中並通過裝填於管柱中之多孔固定相樹脂。在管柱中之滯留時間隨蛋白質之流體動力學尺寸及裝填樹脂床中之孔隙尺寸而變。較小分子可滲透至樹脂中之較小孔隙中且滯留時間長於較大分子。自管柱溶離後，即藉由UV吸光度偵測蛋白質。SEC法使用TSK凝膠保護柱(TOSOH Biosciences, Montgomeryville, PA, 目錄號

08543) 及 TSK 凝膠 G3000SWxL(TOSOH Biosciences , Montgomeryville , PA , 目錄號08541)。移動相為100 mM Na_2HPO_4 、200 mM Na_2SO_4 , pH 6.8。流動速率為0.25 mL/min。注射體積為20 μL 之1 mg/mL樣本。管柱溫度為室溫。自動進樣器溫度為2-8 $^{\circ}\text{C}$ 。總操作時間為55分鐘。偵測係基於214 nm波長下之UV吸收度，帶寬設定在8 nm，使用帶寬為100 nm之360 nm參考波長。

冷凍-解凍法

將於所要調配物中之1 mg/ml抗體溶液在-80 $^{\circ}\text{C}$ 下冷凍至少4小時，接著在30 $^{\circ}\text{C}$ 下於水浴中解凍。接著在-80 $^{\circ}\text{C}$ 下再冷凍。重複此操作5個循環。在某些冷凍-解凍循環，例如第二及第四循環後，在再冷凍前抽取一部分溶液藉由SEC進行分析。在低蛋白質濃度下進行冷凍-解凍穩定性測試以便獲得由於蛋白質分子較大程度暴露於變性冰-水界面而致之「較差情形(worse-case scenario)」。在較高濃度下，較少比例之蛋白質接觸冰-水界面，而與其他蛋白質分子相互作用。

加速穩定法

使於所要調配物中之1 mg/ml抗體溶液在無菌條件下通過0.22 μm PVDF過濾器，並在40 $^{\circ}\text{C}$ 及/或50 $^{\circ}\text{C}$ 下培育至少21天。在7天及21天時，在無菌條件下抽取等分試樣並藉由SEC進行分析。接著，重新培育溶液。

實例2：藉由大鼠融合瘤技術產生大鼠抗DLL4單株抗體

根據此項技術中已知的方法對大鼠進行免疫(例如E

Harlow, D. Lane, **Antibody: A Laboratory Manual**, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1998)。使用表現全長人類DLL4以及重組小鼠DLL4-ECD(DLL4細胞外域)蛋白質之人類細胞株作為免疫原。使用表現人類DLL4或小鼠DLL4之小鼠細胞株來測定抗血清效價並篩選分泌抗原特異性抗體之融合瘤。對於初次免疫及增強免疫，免疫劑量均含有 1×10^6 細胞/大鼠/注射。為了增加對小鼠DLL4之免疫反應，用含不完全弗氏佐劑(Sigma, St. Louis, MO, US)之乳液形式之重組小鼠DLL4-ECD對大鼠進行進一步增強免疫。簡而言之，藉由首先使用渦輪輕緩地混合小瓶中之佐劑來製備佐劑-抗原混合物。自小瓶中移除所要量之佐劑並置於經高壓處理之1.5 mL微量離心管中。製備抗原之PBS或生理食鹽水溶液，濃度在0.5至1.0 mg/ml範圍內。接著向含有佐劑之微量離心管中添加計算量之抗原，且藉由輕緩地渦旋2分鐘來混合溶液以產生油包水乳液。接著將佐劑-抗原溶液引入適當注射器中以供動物注射。總共注射50 µg抗原，體積為50至100 µl。對各動物進行免疫，接著增強免疫2至3次，視效價而定。用融合前表現人類DLL4之細胞株對具有良好效價之動物進行最終皮下增強免疫。

融合瘤融合及篩選

培養鼠類骨髓瘤細胞株(SP2/0-Ag14, ATCC CRL-1581)之細胞達到即將融合之對數期。根據此項技術中已知的方法(例如 E Harlow, D. Lane, **Antibody: A Laboratory**

Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1998) ; Kohler G 及 Milstein C., 「Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity」, *Nature*, 256: 495-497 (1975))以無菌方式製備免疫大鼠脾細胞且使其與骨髓瘤細胞融合。隨後將融合之「雜交細胞」分配至96孔培養板中之DMEM/20%FCS/HAT培養基中。融合後7至10天在顯微鏡下觀察存活之融合瘤群落。兩週後，使用表現重組人類DLL4或小鼠DLL4之小鼠細胞株對各孔之清液進行基於細胞之結合篩選。簡而言之，將表現人類或小鼠DLL4之小鼠細胞株混合物(1:1比率)以 1×10^6 個細胞/孔分配至96孔(圓底)培養板中，且在4°C下與融合瘤清液(50 μ l)一起培育1小時。接著用FACS緩衝液(PBS+2% BSA)洗滌細胞3次，使用HRP-山羊抗大鼠Ig-PE(藻紅素)在FACS機器中進行偵測。根據以下程序使用ELISA格式篩選融合瘤。在4°C下用50 μ l人類DLL4或小鼠DLL4(2.0 μ g/ml，於PBS中)塗佈ELISA培養板隔夜。用250 μ l PBS/0.5% Tween₂₀洗滌培養板3次，且用200 μ l阻斷緩衝液(2% BSA於PBS/0.5% Tween₂₀中)阻斷。向各孔中添加稀釋之血清或融合瘤清液(100 μ l)且在室溫下培育1小時。接著用PBS/0.5% Tween₂₀洗滌培養板3次，使用HRP-山羊抗大鼠-IgG進行偵測，且在450 nm下觀察結合OD。接著選擇分泌結合至人類DLL4或小鼠DLL4或兩者之抗體的陽性融合瘤，且轉移至24孔培養板中並藉由限制稀釋法進行次選殖，以確保細胞株之

純株性(clonality)。使用 Zymed's Mouse MonoAb-ID套組確定各單株抗體之同型。對產生顯示高特異性結合活性之抗體的融合瘤純系進行次選殖及純化(表5)，且抗體之親和力(Biacore)及效能(Notch阻斷FACS及報導子分析)表徵如下。

表5. 使用大鼠融合瘤技術產生之抗DLL4抗體之清單

融合瘤	同型	FACS結合	
		人類DLL4	小鼠DLL4
MC10-37D10.1C2	IgG2a/k	+	+
MC10-40B10.3C3	IgG2a/k	+	+
MC10-32C7.5A4	IgG2a/k	+	+
MC10-38H12.2G8	IgG2a/k	+	-
MC13-14A11.3A4	IgG2a/K	+	+
MC13-14G1.1B4	IgG2a/K	+	-
MC13-1A11.2E1	IgG1/K	+	+
MC13-13E4.4A3	IgG1/K	+	+
MC13-15D6.1G7	IgG2a/K	+	+

「+」指示抗體結合至細胞；「-」指示抗體未結合至細胞

實例3. 抗DLL4大鼠單株抗體之活體外表徵

如實例1.1中所述，藉由BIACORE技術測定此等大鼠單株抗體(mAb)之抗原結合親和力且示於下文之表6及表7中。使用實例1中所述之其他方法進一步檢查其活體外活性，且彙總於表8中。進一步表徵確定37D10及40B10一致的大鼠mAb。

表 6. 抗 DLL4 大鼠融合瘤抗體結合至人類及獼猴 DLL4 之
Biacore 動力學

純系	Biacore 動力學					
	huDLL4 ECD			cynoDLL4 ECD		
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
38H12	$4.0 \times 10^{+5}$	1.1×10^{-4}	0.3	$2.6 \times 10^{+5}$	9.8×10^{-5}	0.4
1A11	$1.9 \times 10^{+5}$	1.1×10^{-3}	5.8	$1.1 \times 10^{+5}$	9.3×10^{-4}	8.1
37D10 = 40B10	$1.4 \times 10^{+5}$	7.0×10^{-2}	484	$4.0 \times 10^{+4}$	過快*	<617
32C7	$2.8 \times 10^{+5}$	7.0×10^{-6}	0.03	$2.2 \times 10^{+5}$	6.3×10^{-6}	0.03
15D6	$1.1 \times 10^{+5}$	1.0×10^{-3}	9.2	$5.6 \times 10^{+4}$	8.3×10^{-4}	14.9
14A11	$1.2 \times 10^{+5}$	1.2×10^{-3}	10.3	$1.1 \times 10^{+5}$	1.2×10^{-3}	11.6
14G1	$5.4 \times 10^{+4}$	3.9×10^{-4}	7.2	$3.9 \times 10^{+4}$	4.1×10^{-4}	10.5
13E4	$2.3 \times 10^{+5}$	3.9×10^{-4}	1.7	$1.5 \times 10^{+5}$	4.2×10^{-4}	2.8

hu=人類；cyno=獼猴；*=處於量測範圍以外

表 7. 結合鼠類及大鼠 DLL4 之抗 DLL4 大鼠融合瘤抗體的
Biacore 動力學

純系	Biacore 動力學					
	muDLL4 ECD			大鼠 DLL4 ECD		
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
38H12	N/B	N/B	N/B	N/B	N/B	N/B
1A11	$1.3 \times 10^{+5}$	2.9×10^{-3}	23	N/B	N/B	N/B
37D10 = 40B10	$1.0 \times 10^{+5}$	1.35×10^{-2}	135	N/D	N/D	N/D
32C7	$4.8 \times 10^{+4}$	4.1×10^{-3}	88	N/D	N/D	N/D
15D6	$7.4 \times 10^{+4}$	5.1×10^{-5}	0.7	N/B	N/B	N/B
14A11	$7.0 \times 10^{+4}$	9.0×10^{-5}	1.3	N/B	N/B	N/B
14G1	N/B	N/B	N/B	N/B	N/B	N/B
13E4	$1.8 \times 10^{+5}$	1.9×10^{-4}	1.1	N/B	N/B	N/B

N/B=無顯著結合；N/D=未觀察到；mu=小鼠

表 8. 來源於大鼠融合瘤之抗 DLL4 抗體的活體外表徵

大鼠 mAb	直接結合分析				功能阻斷分析				
	結合 ELISA (EC ₅₀ , nM)		FACS (EC ₅₀ , nM)		競爭 ELISA (IC ₅₀ , nM)		競爭 FACS (IC ₅₀ , nM)		Notch 活化 抑制 (IC ₅₀ , nM)
	DLL4 ECD		DLL4 細胞		DLL4 ECD/ huNotch-1		huNotch-1/ DLL4 細胞		huDLL4 細胞/ Notch 報導 子細胞
	hu	mu	hu	mu	hu	mu	hu	mu	
1A11	0.06	0.11	34.8	0.8	0.78	0.79	8.4	0.8	2.9
38H12	0.06	-	1.2	-	3.63	-	1.7	-	0.5
37D10 = 40B10	0.12	0.14	2.3	0.7	5.39	3.36	5.5	3.8	-
32C7	0.08	0.15	3.1	0.8	-	-	-	-	促效劑
14G1	N/D	N/D	8.6	>50	N/D	N/D	4.2	-	6.1
14A11	N/D	N/D	>50	2.1	-	19.8	205	1.6	2.7
15D6	N/D	N/D	15	1.6	-	-	25	1.5	3.2
13E4	N/D	N/D	26	1.3	-	-	5.2	>200	-

「-」=無活性或在所用分析之偵測極限以下；「N/D」=未觀察到；hu=人類；cyno=獼猴；mu=小鼠。

實例 4. 藉由 DNA 選殖及定序來推斷抗 DLL4 大鼠單株抗體之可變區蛋白質序列

使用 RNeasy 小型套組 (Qiagen, 目錄號 74104), 使用以下方案自融合瘤細胞集結塊中萃取總 RNA。添加 600 µl 緩衝液 RLT, 藉由上下吸取若干次來破壞細胞。藉由使細胞溶解物通過固定於無 RNase 注射器之 20 號針 10 次來將其均質化。向經均質化之溶解物中添加 1 體積份之 70% 乙醇, 並藉由吸取使其充分混合。向 RNeasy 旋轉管柱中一次添加至多 700 µl 樣品, 且在 10,000 rpm 下旋轉 15 秒, 棄去流出物。向該管柱中添加 700 µl 緩衝液 RW1 且在 10,000 rpm 下

旋轉15秒，棄去流出物。添加500 μ l緩衝液RPE以洗滌管柱膜，且在10,000 rpm下旋轉15秒，棄去流出物。同一步驟再重複一次，但使管柱離心2分鐘。接著使樣品在10,000 rpm下離心1分鐘以消除緩衝液RPE之任何滯留物。藉由在10,000 rpm下離心1分鐘來用30 μ l無RNase水溶離RNA。隨後，根據以下方案使用用於RT-PCR之SuperScript First-Strand 合成系統(Invitrogen，目錄號11904-018)，使用2 μ g總RNA合成第一股cDNA：在65°C下培育2 μ g RNA+2 μ l dNTP+2 μ l Oligo (dT)+DEPC-H₂O(直至20 μ l)5分鐘，接著轉移至冰上持續至少1分鐘。接著將樣品添加至以下混合物中：4 μ l 10×RT緩衝液+ 8 μ l 25 mM MgCl₂+4 μ l 0.1 M DTT+2 μ l RNase OUT，且在42°C下培育2分鐘。接著，向樣品中添加2 μ l SuperScript II RT且在42°C下培育50分鐘。接著在70°C下培育樣品15分鐘並在冰上冷凍。接著添加2 μ l RNase H且在37°C下培育樣品20分鐘。接著使用cDNA作為模板以進行抗體可變區之PCR擴增。使用第一股cDNA、來自小鼠Ig引子組之引子(Novagen，目錄號69831-3)及Platinum Super Mix High Fidelity (Invitrogen，目錄號12532-016)進行PCR。為了擴增重鏈可變區，如下組裝PCR樣品：22.5 μ l PCR Super Mix+0.25 μ l反置引子MuIgG V_H3'-2+1 μ l cDNA+1.25 μ l前置引子(VH-A、VH-B)之一或0.5 μ l前置引子(VH-C、VH-D、VH-E、VH-F)之一。為了擴增輕鏈可變區，如下組裝PCR樣品：22.5 μ l PCR Super Mix+0.25 μ l反置引子MuIgKV_L-3'-1+1

μl cDN +1.25 μl 前置引子(VL-A、VL-B)之一或0.5 μl 前置引子(VL-C、VL-D、VL-E、VL-F、VL-G)之一。

對於含引子 VH-A、VH-B、VL-A及VL-B之樣品，使用以下PCR循環(40-45次循環，步驟2至4)：

- 1-變性，94℃，2分鐘；
- 2-變性，94℃，30秒；
- 3-黏接，50℃，30秒；
- 4-延長，68℃，1分鐘；
- 5-最終延長，68℃，5分鐘；
- 6-冷卻，4℃，一直。

對於含引子 VH-C至VH-F及VL-C至VL-G之樣品，使用以下PCR循環(40-45次循環，步驟2至4)：

- 1-變性，94℃，2分鐘；
- 2-變性，94℃，30秒；
- 3-黏接，60℃，30秒；
- 4-延長，68℃，1分鐘；
- 5-最終延長，68℃，5分鐘；
- 6-冷卻，4℃，一直。

使PCR產物在1.2%瓊脂糖凝膠上跑膠，且切除以預期大小(400-500 bp)遷移之條帶進行DNA萃取。使用QIAquick凝膠萃取套組(Qiagen，目錄號28704)根據以下方案純化DNA：將凝膠切片稱重。向各凝膠切片中每1體積分凝膠添加3體積分緩衝液QG。在50℃下培育樣品10分鐘直至凝膠切片完全溶解，每2至3分鐘進行混合。接著向各樣品中

將抗DLL4大鼠mAb之重鏈及輕鏈可變域(上表9)分別同框選殖至突變型人類IgG1(L234、235A)重鏈恆定區及κ輕鏈恆定區。在基於FACS之結合及競爭分析中確證所得嵌合抗體之活性(下表10)，且與其親本大鼠mAb相似。

表10. 含有抗DLL4大鼠mAb之可變域之重組嵌合抗體的基於FACS之結合及中和活性

嵌合體	FACS結合(EC ₅₀ nM)		競爭FACS(IC ₅₀ nM)	
	DLL4細胞		huNotch-1/DLL4細胞	
	人類DLL4	小鼠DLL4	人類DLL4	小鼠DLL4
1A11	19.59	0.74	2.338	0.682
38H12	1.468	N/D	1.443	N/D
32C7	3.706	4.114	ND	ND
37D10	2.32	0.99	5.951	4.395
14G1	0.994	N/D	4.11	N/D
14A11	1.613	2.139	4.025	1.391
15D6	1.715	1.817	10.48	1.49

N/D=未測定。

實例6. 抗DLL4大鼠單株抗體1A11之人類化

將1A11大鼠抗DLL4抗體(上表9)人類化。基於具有最大同源性之人類生殖系使人類化變異體胺基酸序列VH.1、VH.1a、VH.1b、VH.2a、VL.1、VL.1a、VL.1b及VL.2a(下表11)轉化為DNA序列並合成。對於重鏈變異體，使用人類生殖系重鏈受體序列VH3-7 FR1、VH3-7 FR2、VH3-7 FR 3及JH4 FR4(參看上表3)。對於輕鏈變異體VL.1、VL.1a及VL.1b，使用人類生殖系輕鏈受體序列O2 FR1、O2 FR2、O2 FR3及JK2 FR4(參看上表3)。對於輕鏈變異體VL.2a，使用人類生殖系輕鏈受體序列L2 FR1、L2 FR2、L2 FR3及JK2 FR4(參看上表4)。驗證個別構築體之序列以

VH.1與各VL變異體配對：VL.1：0個反突變；VL.1a：4個反突變；VL.1b：1個反突變；及VL.2a：5個反突變。變異體5至8各自含有VH.1a與各VL變異體配對：VL.1：2個反突變；VL.1a：6個反突變；VL.1b：3個反突變；及VL.2a：7個反突變。變異體9至12各自含有VH.1b與各VL變異體配對：VL.1：1個反突變；VL.1a：5個反突變；VL.1b：2個反突變；及VL.2a：6個反突變。變異體13至16各自含有VH.2a與各VL變異體配對：VL.1：3個反突變；VL.1a：7個反突變；VL.1b：4個反突變；及VL.2a：8個反突變。

表12. 所產生之人類化1A11抗體及反突變之彙總

名稱	VH/VL組合	可變區中之反突變 [†] (VH/VL)
h1A11.1	VH.1/VL.1	0/0
h1A11.2	VH.1/VL.1a	0/A43S、Y49F、F71S、Y87F
h1A11.3	VH.1/VL.1b	0/Y49F
h1A11.4	VH.1/VL.2a	0/A43S、Y49F、I58V、 F71S、Y87F
h1A11.5	VH.1a/VL.1	N76S、A93S/0
h1A11.6	VH.1a/VL.1a	N76S、A93S/A43S、Y49F、 F71S、Y87F
h1A11.7	VH.1a/VL.1b	N76S、A93S/Y49F
h1A11.8	VH.1a/VL.2a	N76S、A93S/A43S、Y49F、 I58V、F71S、Y87F
h1A11.9	VH.1b/VL.1	A93S/0
h1A11.10	VH.1b/VL.1a	A93S/A43S、Y49F、F71S、 Y87F
h1A11.11	VH.1b/VL.1b	A93S/Y49F
h1A11.12	VH.1b/VL.2a	A93S/A43S、Y49F、I58V、 F71S、Y87F
h1A11.13	VH.2a/VL.1	S49A、N76S、A93S/0

h1A11.14	VH.2a/VL.1a	S49A、N76S、A93S/A43S、 Y49F、F71S、Y87F
h1A11.15	VH.2a/VL.1b	S49A、N76S、A93S/ Y49F
h1A11.16	VH.2a/VL.2a	S49A、N76S、A93S/A43S、 Y49F、I58V、F71S、Y87F

[†]使用 Kabat 編號。

將所有 16 種變異體短暫轉染至 50 ml HEK 293 6e 懸浮液細胞培養物中，輕鏈構築體：重鏈構築體之比率為 60%:40%。使用 1 mg/ml PEI 轉染細胞。6 天後將細胞清液收集於震盪燒瓶中，旋轉沈降以形成細胞集結塊，且通過 0.22 μ m 過濾器過濾以將 IgG 與培養物污染物分離。經由捕捉結合 ELISA (實例 1.2) 初步評定結合至人類 DLL4 之變異體，該分析利用山羊抗人類 Fc 捕捉抗體 (Jackson ImmunoResearch, 109-005-008) 來捕捉經過濾之 293 6e 細胞清液內的 IgG (下表 13)。所有 16 種變異體具有極相似之親和力且經純化以供進一步表徵。

藉由添加 1 清液體積份之蛋白質 A IgG 結合緩衝液 (Thermo Scientific 21001) 及 1 ml rProteinA 瓊脂糖快流珠粒 (GE Healthcare, 17-1279-04) 來分批純化所有 16 種變異體 (h1A11.1 至 h1A11.16)。添加有珠粒及緩衝液之清液在 4°C 下搖動隔夜，且次日於 poly prep 層析管柱 (Bio Rad, 731-1550) 上藉由重力收集珠粒。一旦清液已通過管柱，即用 10 倍管柱體積之結合緩衝液洗滌珠粒，且用 Immunopure IgG 溶離緩衝液 (Pierce, 185 1520) 溶離 IgG，且以 1 ml 等分試樣收集。彙集含有 IgG 之溶離份 (層析) 且在 4°C 下在 PBS 中透析隔夜。

藉由結合ELISA(實例1.2, 方法2)、Biacore(實例1.1)及流式細胞測量術(FACS)進一步表徵經純化之變異體對人類、鼠類及獼猴DLL4之親和力。在所有3種分析中, 所有16種變異體均顯示其親和力與親本重組抗體1A11相似(表13)。接著藉由競爭ELISA(實例1.3)及Notch報導子分析(實例1.6)測試人類化變異體與人類及鼠類DLL4之功能性(實例1.6)。在兩種分析中, 所有16種變異體均顯示其效能與親本重組抗體1A11相似(下表14)。

表13. 人類化1A11 mAb之結合活性彙總

結合數據							
	人類DLL4			小鼠DLL4			獼猴DLL4
mAb	結合 ELISA (EC ₅₀ , nM)	Biacore (K _D , M)	結合 FACS (EC ₅₀ , nM)	結合 ELISA (EC ₅₀ , nM)	Biacore (K _D , M)	結合 FACS (EC ₅₀ , nM)	結合 ELISA (EC ₅₀ , nM)
h1A11-1	0.08	1.5×10 ⁻⁸	3.13	0.09	3.8×10 ⁻⁸	0.21	0.13
h1A11-2	0.08	1.0×10 ⁻⁸	2.85	0.09	1.9×10 ^{-8*}	0.21	0.13
h1A11-3	0.07	1.5×10 ⁻⁸	3.51	0.08	3.7×10 ⁻⁸	0.24	0.16
h1A11-4	0.08	1.6×10 ⁻⁸	3.61	0.09	3.9×10 ⁻⁸	0.22	0.17
h1A11-5	0.07	0.96×10 ⁻⁸	3.61	0.08	2.2×10 ⁻⁸	0.21	0.16
h1A11-6	0.08	1.13×10 ⁻⁸	3.74	0.10	3.1×10 ⁻⁸	0.15	0.13
h1A11-7	0.06	1.3×10 ⁻⁸	3.71	0.09	3.5×10 ⁻⁸	0.18	0.14
h1A11-8	0.06	1.1×10 ⁻⁸	3.34	0.09	2.4×10 ⁻⁸	0.18	0.17
h1A11-9	0.07	1.3×10 ⁻⁸	3.28	0.09	3.4×10 ⁻⁸	0.18	0.15
h1A11-10	0.06	1.3×10 ⁻⁸	nt	0.09	3.5×10 ⁻⁸	nt	0.15
h1A11-11	0.07	1.2×10 ⁻⁸	nt	0.09	2.7×10 ⁻⁸	nt	0.15
h1A11-12	0.06	1.4×10 ⁻⁸	nt	0.08	3.5×10 ⁻⁸	nt	0.16
h1A11-13	0.06	1.4×10 ⁻⁸	nt	0.09	3.7×10 ⁻⁸	nt	0.16

h1A11-14	0.055	1.3×10^{-8}	nt	0.07	2.8×10^{-8}	nt	0.14
h1A11-15	0.07	1.4×10^{-8}	nt	0.09	3.7×10^{-8}	nt	0.13
h1A11-16	0.06	1.5×10^{-8}	nt	0.09	3.9×10^{-8}	nt	0.12
1A11(嵌合)	0.2	0.9×10^{-8}	6.29	0.3	2.4×10^{-8}	0.53	0.33
1A11 (大鼠mAb)		0.6×10^{-8}					

nt=未測試

表 14. 人類化 1A11 mAb 之活體外功能效能彙總

功能數據			
	人類DLL4		小鼠DLL4
mAb	競爭ELISA (IC ₅₀ , nM)	報導子分析 (EC ₅₀ , nM)	競爭ELISA (IC ₅₀ , nM)
h1A11-1	0.4	2.53	1.3
h1A11-2	0.3	3.92	0.9
h1A11-3	0.2	2.53	0.9
h1A11-4	0.3	3.28	0.9
h1A11-5	0.3	3.8	0.8
h1A11-6	0.4	1.45	0.8
h1A11-7	0.5	4.84	0.9
h1A11-8	0.35	4.24	0.9
h1A11-9	0.3	3.18	0.9
h1A11-10	0.35	5.88	0.9
h1A11-11	0.4	3.73	0.8
h1A11-12	0.4	2.89	0.9
h1A11-13	0.3	10.42	1
h1A11-14	0.25	4.1	0.7
h1A11-15	0.2	5.4	0.7
h1A11-16	0.3	2.61	0.7
1A11(嵌合體)	1.8	5.98	3.5
1A11(大鼠融合瘤mAb)	0.5		1.1

用於人類化抗DLL4 1A11抗體之其他設計

用於人類化抗DLL4大鼠單株抗體1A11之其他VH及VL設計示於下表中。

表15. 用於人類化1A11抗體之其他VH及VL設計

VH或VL設計	受體架構序列	反突變 [†]
h1A11VH.2	VH3共同序列+ JH4	0
h1A11VH.2b	VH3共同序列+ JH4	S49A、A93S
h1A11VH.3	VH1-46+JH4 (含有Q1E防止N-末端焦麩胺酸形成)	0
h1A11VH.3b	VH1-46+JH4 (Q1E)	Y27F、M48V、G49A、A93S
h1A11VH.3c	VH1-46+JH4 (Q1E)	Y27F、M48V、G49A、V67F、M69I、T73N、V78L、A93S及T75I(以避免不需要之N-糖基化信號)
h1A11VH.3d	VH1-46+JH4 (Q1E)	Y27F、M48V、G49A、V67F、M69I、V78L、A93S(略去T73N以避免不需要之N-糖基化信號)
h1A11VL.1c	O2+JK2	Y49F、F71S
h1A11VL.2	3-15/L2+JK2	0
h1A11VL.2b	3-15/L2+JK2	Y49F
h1A11VL.2c	3-15/L2+JK2	Y49F、F71S

[†]使用 Kabat 編號。

實例7. 抗DLL4大鼠mAb 38H12之人類化

將38H12大鼠抗DLL4抗體(上表9)人類化。基於具有最大同源性之人類生殖系使人類化變異體胺基酸序列VH.1、VH.1a、VH.1b、VH.2a、VL.1、VL.1a、VL.1b及VL.2a(下表16)轉化為DNA序列並合成。使用人類生殖系重鏈受體序列VH3-30 FR1、VH3-30 FR2、VH3-30 FR3及JH3

FR4(參看表3)產生表16中所示之人類化重鏈變異體。使用人類生殖系輕鏈受體序列O2 FR1、O2 FR2、O2 FR3及JK2 FR4(參看表4)產生圖16中所示之人類化輕鏈變異體。驗證個別構築體之序列以檢查準確性。接著將陽性變異體接種至150 ml Luria培養液+安比西林中，且在37℃下培養隔夜。使用Qiagen高速大量製備型套組(12662)自變異體培養物中萃取DNA。

表 16. 人類化大鼠抗DLL4單株抗體38H12之VH及VL胺基酸序列

SEQ ID NO:	蛋白質區		序列
			123456789012345678901234567890
179	VH.1 38H12		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMYWVRQAPGKGLEWVAFISHGGGITYY RDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCARLNWELGIDYWGQGTMTVSS
		VH.1 38H12 CDR-H1	SEQ ID NO:179之殘基 31-35 NYGMY
		VH.1 38H12 CDR-H2	SEQ ID NO:179之殘基 50-66 FISHGGGITYYRDSVKG
		VH.1 38H12 CDR-H3	SEQ ID NO:179之殘基 99-107 LNWELGIDY
			123456789012345678901234567890
180	VH.1a 38H12		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMYWIRQAPGKGLEWVAFISHGGGITYY RDSVKGRFTISRDN SKSTLYLQMN SLRAED TAVYHCAALNWELGIDYWGQGTMTVSS
	VH.1a 38H12 CDR-H1	SEQ ID NO:180之殘基 31-35	NYGMY
	VH.1a 38H12 CDR-H2	SEQ ID NO:180之殘基 50-66	FISHGGGITYYRDSVKG

SEQ ID NO:	蛋白質區		序列
			123456789012345678901234567890
	VH.1a 38H12 CDR-H3	SEQ ID NO:180之殘基 99-107	LNWELGIDY
			123456789012345678901234567890
181	VH.1b 38H12		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMYWVRQAPGKGLEWVAFISHGGGITYY RDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAALNWELGIDYWGQGTMTVSS
	VH.1b 38H12 CDR-H1	SEQ ID NO:181之殘基 31-35	NYGMY
	VH.1b 38H12 CDR-H2	SEQ ID NO:181之殘基 50-66	FISHGGGITYYRDSVKG
	VH.1b 38H12 CDR-H3	SEQ ID NO:181之殘基 99-107	LNWELGIDY
			123456789012345678901234567890
182	VH.2a 38H12		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMYWIRQAPGKGLEWVAFISHGGGITYY RDSVKGRFTISRDN SKSTLYLQMNSLRAED TAVYHCAALNWELGIDYWGQGTMTVSS
	VH.2a 38H12 CDR-H1	SEQ ID NO:182之殘基 31-35	NYGMY
	VH.2a 38H12 CDR-H2	SEQ ID NO:182之殘基 50-66	FISHGGGITYYRDSVKG
	VH.2a 38H12 CDR-H3	SEQ ID NO:182之殘基 99-107	LNWELGIDY
			123456789012345678901234567890
183	VL.1 38H12		DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIY SNLAWYQQKPGKAPKLLIYAANRLQDGVPS RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQ GSKFPLTFGQGTKLEIKR
	VL.1 38H12 CDR-L1	SEQ ID NO:183之殘基 24-34	RASEDIYSNLA
	VL.1 38H12 CDR-L2	SEQ ID NO:183之殘基 50-56	AANRLQD
	VL.1 38H12 CDR-L3	SEQ ID NO:183之殘基 89-97	LQGSKFPLT
			123456789012345678901234567890

SEQ ID NO:	蛋白質區		序列
			123456789012345678901234567890
184	VL.1a 38H12		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIY SNLAWYQKKPGKSPKLLIYAANRLQDGVPS RFGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYFCLQ GSKFPLTFGQGTKLEIKR
	VL.1a 38H12 CDR-L1	SEQ ID NO:184之殘基 24-34	RASEDIYSNLA
	VL.1a 38H12 CDR-L2	SEQ ID NO:184之殘基 50-56	AANRLQD
	VL.1a 38H12 CDR-L3	SEQ ID NO:184之殘基 89-97	LQGSKFPLT
			123456789012345678901234567890
185	VL.1b 38H12		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIY SNLAWYQKKPGKAPKLLIYAANRLQDGVPS RFGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCLQ GSKFPLTFGQGTKLEIKR
	VL.1b 38H12 CDR-L1	SEQ ID NO:185之殘基 24-34	RASEDIYSNLA
	VL.1b 38H12 CDR-L2	SEQ ID NO:185之殘基 50-56	AANRLQD
	VL.1b 38H12 CDR-L3	SEQ ID NO:185之殘基 89-97	LQGSKFPLT
			123456789012345678901234567890
186	VL.2a 38H12		EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEDIY SNLAWYQKKPGQSPRLLIYAANRLQDGVPA RFGSGSGTEYTLTISSLSQSEDFAVYFCLQ GSKFPLTFGQGTKLEIKR
	VL.2a 38H12 CDR-L1	SEQ ID NO:186之殘基 24-34	RASEDIYSNLA
	VL.2a 38H12 CDR-L2	SEQ ID NO:186之殘基 50-56	AANRLQD
	VL.2a 38H12 CDR-L3	SEQ ID NO:186之殘基 89-97	LQGSKFPLT

對於總共16種變異體(下表17)，藉由組合各重鏈變異體與各輕鏈變異體來產生人類化抗體。變異體1至4各自含有VH.1與各VL變異體配對：VL.1：0個反突變；VL.1a：4個

反突變；VL.1b：1個反突變；及VL.2a：5個反突變。變異體5至8各自含有VH.1a與各VL變異體配對：VL.1：4個反突變；VL.1a：8個反突變；VL.1b：5個反突變；及VL.2a：9個反突變。變異體9至12各自含有VH.1b與各VL變異體配對：VL.1：1個反突變；VL.1a：5個反突變；VL.1b：2個反突變；及VL.2a：5個反突變。變異體13至16各自含有VH.2a與各VL變異體配對：VL.1：5個反突變；VL.1a：9個反突變；VL.1b：6個反突變；及VL.2a：10個反突變。

表17. 所產生之人類化38H12抗體及反突變之彙總

名稱	VH/VL組合	可變區中之反突變 [†] (VH/VL)
h38H12.1	VH.1/VL.1	0/0 (VH中之Q1E防止N-末端焦麩胺酸形成)
h38H12.2	VH.1/VL.1a	0/Q38K、A43S、F71Y、Y87F (VH中之Q1E如上文所註明)
h38H12.3	VH.1/VL.1b	0/F71Y (VH中之Q1E如上文所註明)
h38H12.4	VH.1/VL.2a	0/Q38K、A43S、I58V、F71Y、Y87F (VH中之Q1E如上文所註明)
h38H12.5	VH.1a/VL.1	V37I、N76S、Y91H、R94A/0
h38H12.6	VH.1a/VL.1a	V37I、N76S、Y91H、R94A/Q38K、A43S、F71Y、Y87F
h38H12.7	VH.1a/VL.1b	V37I、N76S、Y91H、R94A/F71Y

h38H12.8	VH.1a/VL.2a	V37I、N76S、Y91H、 R94A/Q38K、A43S、I58V、 F71Y、Y87F
h38H12.9	VH.1b/VL.1	R94A/0
h38H12.10	VH.1b/VL.1a	R94A/Q38K、A43S、F71Y、 Y87F
h38H12.11	VH.1b/VL.1b	R94A/F71Y
h38H12.12	VH.1b/VL.2a	R94A/Q38K、A43S、I58V、 F71Y、Y87F
h38H12.13	VH.2a/VL.1	V37I、S49A、N76S、Y91H、 R94A/0
h38H12.14	VH.2a/VL.1a	V37I、S49A、N76S、Y91H、 R94A/Q38K、A43S、F71Y、 Y87F
h38H12.15	VH.2a/VL.1b	V37I、S49A、N76S、Y91H、 R94A/F71Y
h38H12.16	VH.2a/VL.2a	V37I、S49A、N76S、Y91H、 R94A/Q38K、A43S、I58V、 F71Y、Y87F

[†]使用 Kabat 編號。

將所有 16 種變異體短暫轉染至 50 ml HEK 293 6e 懸浮液細胞培養物中，輕鏈構築體：重鏈構築體之比率為 60%:40%。使用 1 mg/ml PEI 轉染細胞。7 天後將細胞清液收集於震盪燒瓶中，旋轉沈降以形成細胞集結塊，且通過 0.22 μ m 過濾器過濾以將 IgG 與培養物污染物分離。經由捕捉結合 ELISA (實例 1.2) 初步評定結合至人類 DLL4 之變異體，該分析利用山羊抗人類 Fc 捕捉抗體 (Jackson Immuno research, 109-005-008) 來捕捉經過濾之 293 6e 細胞清液內的 IgG (參看下表 18 中之 ELISA 結合 EC₅₀)。含有 VH.1 之變異體與其他變異體相比展現最低結合親和力，且視為自篩選

中排除。VH.1為無架構反突變之CDR移植物。

接著藉由添加1清液體積份之蛋白質A IgG結合緩衝液(Thermo Scientific 21001)及800 μ l rProteinA瓊脂糖快流珠粒(GE Healthcare, 17-1279-04)來分批純化良好結合物(h38H12.5-h38A12.16)。在室溫下攪拌添加有珠粒及緩衝液之清液4小時，且於poly prep層析管柱(Bio Rad, 731-1550)上藉由重力收集珠粒。一旦清液已通過管柱，即用10 ml結合緩衝液洗滌珠粒，且用Immunopure IgG溶離緩衝液(Pierce, 185 1520)溶離IgG，且以1 ml等分試樣收集，用100 μ l 1M Tris(pH 8)中和。

在人類Notch-1競爭ELISA(實例1.4)中進一步表徵純化變異體，該分析使用的格式為將Notch-1 Fc塗於ELISA培養板上且預培育經生物素標記之人類DLL4加經滴定抗體。藉由游離經生物素標記之DLL4與Notch-1 Fc之結合來評定信號。強結合物在低抗體濃度下抑制信號。h38H12.5至h38H12.7與其他變異體相比展現較低競爭效能(參看下表18中之Notch競爭ELISA EC₅₀)。

藉由Biacore(實例1.1)，同時進行基於細胞之分析篩選來評定如藉由結合ELISA所測定之良好結合物變異體。所有變異體對人類DLL4之K_D類似(參看下表18中之Biacore K_D)。在檢查與人類DLL4之直接結合(實例1.3；下表18中之FACS結合EC₅₀)及Notch-1信號傳導之抑制(實例1.6；下表18中之Notch報導子分析EC₅₀)的基於細胞之分析中篩選變異體。

表 18. 人類化 38H12 mAb 針對人類 DLL4 之活體外活性之彙總

名稱	ELISA結合 EC ₅₀ (nM)	Notch競爭 ELISA EC ₅₀ (nM)	FACS結合 EC ₅₀ (nM)	Notch報導子 分析 EC ₅₀ (nM)	Biacore , K _D (nM)
h38H12.1	21.5		17.84		
h38H12.2	26.88				
h38H12.3	5.57				
h38H12.4	20.65				
h38H12.5	0.2015	14.81	77.15	7.307	0.401
h38H12.6	0.1584	26.96	12.29	6.317	0.434
h38H12.7	0.1798	12.49	19.06	2.598	0.34
h38H12.8	0.1972	8.315	20.02	5.557	0.397
h38H12.9	0.1155	4.158	3.71	1.436	0.986
h38H12.10	0.1226	3.902	2.489	0.7861	0.578
h38H12.11	0.1264	3.8	2.477	0.6572	0.554
h38H12.12	0.1651	3.228	1.478	1.062	0.819
h38H12.13	0.1534	5.287	2.556	0.7943	0.507
h38H12.14	0.146	5.839	1.04	1.014	0.303
h38H12.15	0.0904	5.714	2.369	0.837	0.355
h38H12.16	0.1696	3.766	2.914	1.185	0.392

用於人類化抗 DLL4 38H12 抗體之其他設計

用於人類化抗 DLL4 大鼠單株抗體 38H12 之其他 VH 及 VL 設計示於下表中。

表 19. 用於人類化 38H12 抗體之其他 VH 及 VL 設計

VH 或 VL 設計	生殖系受體架構序列	反突變 [†]
h38H12VH.2	VH3 共同序列+ JH3	0
h38H12VH.2b	VH3 共同序列+ JH3	S49A、R94A

h38H12VH.3	VH1-46+JH3	0 (VH中之Q1E防止N末端焦麩胺酸形成)
h38H12VH.3b	VH1-46+JH3	Y27F、M48V、G49A、R94A (VH中之Q1E如上文所註明)
h38H12VH.3c	VH1-46+JH3	Y27F、Y37I、M48V、 G49A、V67F、M69I、 T73N、V78L、Y91H、R94A (T75I消除不需要之N-糖基化 信號，VH中之Q1E如上文所 註明)
h38H12VH.3d	VH1-46+JH3	Y27F、Y37I、M48V、 G49A、V67F、M69I、 V78L、Y91H、R94A (VH中之Q1E如上文所註明)
h38H12VL.2	3-15/L2+JK2	0
h38H12VL.2b	3-15/L2+JK2	F71Y

[†]使用 Kaba 編號。

實例 8. h1A11.1 之親和力成熟

使用人類化抗體 h1A11.1 作為親和力成熟之模板。下文提供文庫設計之描述。單株抗體之可變區序列之編號用 Kabat 編號註明 (如上文所述；或參看全球資訊網站 bioinf.org.uk/abs/#kabatnum)，且用於產生下文所述之文庫。

如下文所述製造 3 個文庫。

H1+H2 文庫 (摻雜：76080808)：

在 30、31、32、35、50、52、52a、55、56、57 及 58 處摻雜 11 個殘基。

生殖系與 h1A11 序列之間的連接 (toggle) 處於位置 76(V/I)。

對 10^9 文庫取樣具有 4 個或少於 4 個突變殘基之突變體

至少 3.7 次。

藉由摻雜使具有帶有 4 至 6 個殘基之突變體的文庫中大部分突變。

H3 文庫 (摻雜：70101010)

在 95、96、97、98、99、100、100a 及 102 處摻雜 8 個殘基。

生殖系與 h1A11 序列之間的連接處於位置 93(A/S) 及 101(D/A)。

對 10^9 文庫取樣具有 4 個或少於 4 個突變殘基之突變體至少 4.7 次。

藉由摻雜使具有帶有 4 至 5 個殘基之突變體的文庫中大部分突變。

LC 文庫 (摻雜：70101010)：

在 28、30、31、50、53、92、93、94 及 96 處摻雜 9 個殘基。

生殖系與 h1A11 序列之間的連接處於 7 個位置：27(Q/E)、43(A/S)、49(Y/F)、52(S/N)、71(F/S)、87(Y/F) 及 91(S/Y)。

對 10^9 文庫取樣具有 4 個或少於 4 個突變殘基之突變體至少 1 次。

藉由摻雜使具有帶有 4 至 6 個殘基之突變體的文庫中大部分突變。

rHC 文庫：重組 H1+H2 與 H3 文庫之輸出。

rHCLC 文庫：重組 H1+H2、H3 與 LC 文庫之輸出。

VH及VL架構生殖均降低預計免疫原性。h1A11VL.1a中最理想之生殖突變為S43A及S71F。

在此規定摻雜殘基所使用之密碼子：

若脯胺酸經摻雜，則摻雜寡聚物將具有 $C_{(5-85-5-5)}C_{(5-85-5-5)}S$ 密碼子，無論抗體序列中之原始密碼子如何。基於以下準則選擇此等密碼子：

- 1.增加非同義突變
- 2.增加突變時更多胺基酸之覆蓋率
- 3.使用高頻率密碼子
- 4.避免SSS及WWW密碼子。

摻雜順序為A-C-G-T

$A_{(85-5-5-5)}, A_{(70-10-10-10)}$

$C_{(5-85-5-5)}, C_{(10-70-10-10)}$

$G_{(5-5-85-5)}, G_{(10-10-70-10)}$

$T_{(5-5-5-85)}, T_{(10-10-10-70)}$

丙胺酸(A)：

GCN	$G_{(10-10-70-10)}C_{(10-70-10-10)}S$	$G_{(5-5-85-5)}C_{(5-85-5-5)}S$

蘇胺酸(T)：

ACN	$A_{(70-10-10-10)}C_{(10-70-10-10)}S$	$A_{(85-5-5-5)}C_{(5-85-5-5)}S$

脯胺酸(P)：

CCN	$C_{(10-70-10-10)}C_{(10-70-10-10)}S$	$C_{(5-85-5-5)}C_{(5-85-5-5)}S$

絲胺酸(S)：

若TCN	$T_{(10-10-10-70)}C_{(10-70-10-10)}S$	$T_{(5-5-5-85)}C_{(5-85-5-5)}S$

若AGY	$A_{(70-10-10-10)}G_{(10-10-70-10)}C_{(10-70-10-10)}$	$A_{(85-5-5-5)}G_{(5-5-85-5)}C_{(5-85-5-5)}$

纈胺酸(V)：

GTN $G_{(10-10-70-10)}T_{(10-10-10-70)}S$ $G_{(5-5-85-5)}T_{(5-5-5-85)}S$

甘胺酸(G)：

GGN $G_{(10-10-70-10)}G_{(10-10-70-10)}S$ $G_{(5-5-85-5)}G_{(5-5-85-5)}S$

白胺酸(L)：

若CTN $C_{(10-70-10-10)}T_{(10-10-10-70)}S$ $C_{(5-85-5-5)}T_{(5-5-5-85)}S$

若TTR $T_{(10-10-10-70)}T_{(10-10-10-70)}G_{(10-10-70-10)}$ $T_{(5-5-5-85)}T_{(5-5-5-85)}G_{(5-5-85-5)}$

精胺酸(R)：

若CGN $C_{(10-70-10-10)}G_{(10-10-70-10)}S$ $C_{(5-85-5-5)}G_{(5-5-85-5)}S$

若AGR $A_{(70-10-10-10)}G_{(10-10-70-10)}G_{(10-10-70-10)}$ $A_{(85-5-5-5)}G_{(5-5-85-5)}G_{(5-5-85-5)}$

甲硫胺酸(M)：

ATG $A_{(70-10-10-10)}T_{(10-10-10-70)}G_{(10-10-70-10)}$ $A_{(85-5-5-5)}T_{(5-5-5-85)}G_{(5-5-85-5)}$

色胺酸(W)：

TGG $T_{(10-10-10-70)}G_{(10-10-70-10)}G_{(10-10-70-10)}$ $T_{(5-5-5-85)}G_{(5-5-85-5)}G_{(5-5-85-5)}$

苯丙胺酸(F)：

TTY $T_{(10-10-10-70)}T_{(10-10-10-70)}C_{(10-70-10-10)}$ $T_{(5-5-5-85)}T_{(5-5-5-85)}C_{(5-85-5-5)}$

異白胺酸(I)：需要兩種寡聚物

50% ATY $A_{(70-10-10-10)}T_{(10-10-10-70)}C_{(10-70-10-10)}$ $A_{(85-5-5-5)}T_{(5-5-5-85)}C_{(5-85-5-5)}$

50% ATA $A_{(70-10-10-10)}T_{(10-10-10-70)}A_{(70-10-10-10)}$ $A_{(85-5-5-5)}T_{(5-5-5-85)}A_{(85-5-5-5)}$

酪胺酸(Y)：

TAY $T_{(10-10-10-70)}A_{(70-10-10-10)}C_{(10-70-10-10)}$ $T_{(5-5-5-85)}A_{(85-5-5-5)}C_{(5-85-5-5)}$

組胺酸(H)：

CAY $C_{(10-70-10-10)}A_{(70-10-10-10)}C_{(10-70-10-10)}$ $C_{(5-85-5-5)}A_{(85-5-5-5)}C_{(5-85-5-5)}$

麩醯胺酸(Q)：

CAR C₍₁₀₋₇₀₋₁₀₋₁₀₎A₍₇₀₋₁₀₋₁₀₋₁₀₎G₍₁₀₋₁₀₋₇₀₋₁₀₎ C₍₅₋₈₅₋₅₋₅₎A₍₈₅₋₅₋₅₋₅₎G₍₅₋₅₋₈₅₋₅₎

天冬醯胺(N)：

AAV A₍₇₀₋₁₀₋₁₀₋₁₀₎A₍₇₀₋₁₀₋₁₀₋₁₀₎C₍₁₀₋₇₀₋₁₀₋₁₀₎ A₍₈₅₋₅₋₅₋₅₎A₍₈₅₋₅₋₅₋₅₎C₍₅₋₈₅₋₅₋₅₎

離胺酸(K)：

AAR A₍₇₀₋₁₀₋₁₀₋₁₀₎A₍₇₀₋₁₀₋₁₀₋₁₀₎G₍₁₀₋₁₀₋₇₀₋₁₀₎ A₍₈₅₋₅₋₅₋₅₎A₍₈₅₋₅₋₅₋₅₎G₍₅₋₅₋₈₅₋₅₎

天冬胺酸(D)：

GAY G₍₁₀₋₁₀₋₇₀₋₁₀₎A₍₇₀₋₁₀₋₁₀₋₁₀₎C₍₁₀₋₇₀₋₁₀₋₁₀₎ G₍₅₋₅₋₈₅₋₅₎A₍₈₅₋₅₋₅₋₅₎C₍₅₋₈₅₋₅₋₅₎

麩胺酸(E)：

GAR G₍₁₀₋₁₀₋₇₀₋₁₀₎A₍₇₀₋₁₀₋₁₀₋₁₀₎G₍₁₀₋₁₀₋₇₀₋₁₀₎ G₍₅₋₅₋₈₅₋₅₎A₍₈₅₋₅₋₅₋₅₎G₍₅₋₅₋₈₅₋₅₎

半胱胺酸(C)：

TGY 始終為NNS。

將h1A11.1文庫轉型至酵母細胞中，並呈現於細胞表面上以供依次藉由磁性及螢光活化細胞淘選(FACS)針對低濃度之經生物素標記之DLL4細胞外域進行選擇。針對改良之締合速率或解離速率或兩者進行選擇，並自酵母細胞中回收經親和力調節之hulA11純系之抗體蛋白質序列(下文之表20及表21)以便反轉化成IgG格式供進一步表徵(參看表22中之純系彙總)。表23列出在親和力成熟選擇期間在架構區(FR)及CDR中觀察到之胺基酸。

表20. 親和力成熟人類化1A11.1純系之VH序列

SEQ ID NO:	蛋白質區		序列
			123456789012345678901234567890
187	h1A11VH.1	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NFPMAWVRQAPGKGLEWVATISSSDGTTY RDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGYYNSPFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:	蛋白質區		序列
			123456789012345678901234567890
	h1A11VH.1 VH	CDR-H1	SEQ ID NO:187之殘基31-35 NFPMA
	h1A11VH.1 VH	CDR-H2	SEQ ID NO:187之殘基50-66 TISSSDGTYYRDSVKG
	h1A11VH.1 VH	CDR-H3	SEQ ID NO:187之殘基99-107 GYNSPFAY
188	h1A11.A6 VH		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR HFPMAWVRQAPGKGLEWVATISSSDAWPSY RDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCSRGGYNSPFAYWGQGLTVTVSS
	h1A11.A6 VH	CDR-H1	SEQ ID NO:188之殘基31-35 HFPMA
	h1A11.A6 VH	CDR-H2	SEQ ID NO:188之殘基50-66 TISSSDAWPSYRDSVKG
	h1A11.A6 VH	CDR-H3	SEQ ID NO:188之殘基99-107 GYNSPFAY
189	h1A11.A8 VH		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG NFPMSWVRQAPGKGLEWVASISSSDSWATI GDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCSRGGYNSPFAYWGQGLTVTVSS
	h1A11.A8 VH	CDR-H1	SEQ ID NO:189之殘基31-35 NFPMS
	h1A11.A8 VH	CDR-H2	SEQ ID NO:189之殘基50-66 SISSSDSWATIGDSVKG
	h1A11.A8 VH	CDR-H3	SEQ ID NO:189之殘基99-107 GYNSPFAY
190	h1A11.C6 VH		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR NFPMAWVRQAPGKGLEWVATISSSDGWPTY RDSVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRAED TAVYYCSRGGYNSPFAYWGQGLTVTVSS
	h1A11.C6 VH	CDR-H1	SEQ ID NO:190之殘基31-35 NFPMA
	h1A11.C6 VH	CDR-H2	SEQ ID NO:190之殘基50-66 TISSSDGWPTYRDSVKG
	h1A11.C6 VH	CDR-H3	SEQ ID NO:190之殘基99-107 GYNSPFAY
191	h1A11.A11 VH		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR HFPMAWVRQAPGKGLEWVATISSDDWPNY RDSVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRAED TAVYYCSRGGYNSPFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:	蛋白質區			序列
				123456789012345678901234567890
	h1A11.A11 VH	CDR-H1	SEQ ID NO:191之殘基31-35	HFPMA
	h1A11.A11 VH	CDR-H2	SEQ ID NO:191之殘基50-66	TISSDDWPNYRDSVKG
	h1A11.A11 VH	CDR-H3	SEQ ID NO:191之殘基99-107	GYNSPFAY
192	h1A11.B5 VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR YFPMSWVRQAPGKGLEWVASISGSDGWASY RDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGYNSPFASWGQGLTVTVSS
	h1A11.B5 VH	CDR-H1	SEQ ID NO:192之殘基31-35	YFPMS
	h1A11.B5 VH	CDR-H2	SEQ ID NO:192之殘基50-66	SISGSDGWASYRDSVKG
	h1A11.B5 VH	CDR-H3	SEQ ID NO:192之殘基99-107	GYNSPFAS
193	h1A11.E12 VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR YFPMAWVRQAPGKGLEWVATISGSDEWPNY RDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGYNSPFAPFWGQGLTVTVSS
	h1A11.E12 VH	CDR-H1	SEQ ID NO:193之殘基31-35	YFPMA
	h1A11.E12 VH	CDR-H2	SEQ ID NO:193之殘基50-66	TISGSDEWPNYRDSVKG
	h1A11.E12 VH	CDR-H3	SEQ ID NO:193之殘基99-107	GYNSPFAP
194	h1A11.G3 VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR YFPMSWVRQAPGKGLEWVASISGSDGWASY RDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGYNSPFAYWGQGLTVTVSS
	h1A11.G3 VH	CDR-H1	SEQ ID NO:194之殘基31-35	YFPMS
	h1A11.G3 VH	CDR-H2	SEQ ID NO:194之殘基50-66	SISGSDGWASYRDSVKG
	h1A11.G3 VH	CDR-H3	SEQ ID NO:194之殘基99-107	GYNSPFAY
195	h1A11.F5 VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR HFPMAWVRQAPGKGLEWVATISSDAWPSY RDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGYNSPFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:	蛋白質區			序列
				123456789012345678901234567890
	h1A11.F5 VH	CDR-H1	SEQ ID NO:195之殘基31-35	HFPMA
	h1A11.F5 VH	CDR-H2	SEQ ID NO:195之殘基50-66	TISSSDAWPSYRDSVKG
	h1A11.F5 VH	CDR-H3	SEQ ID NO:195之殘基99-107	GYNSPFAY
196	h1A11.H2 VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG NFPMSWVRQAPGKGLEWVASISSSDSWATI GDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGYNSPFAFWGQGLTVTVSS
	h1A11.H2 VH	CDR-H1	SEQ ID NO:196之殘基31-35	NFPMS
	h1A11.H2 VH	CDR-H2	SEQ ID NO:196之殘基50-66	SISSSDSWATIGDSVKG
	h1A11.H2 VH	CDR-H3	SEQ ID NO:196之殘基99-107	GYNSPFAF

表 21. 親和力成熟人類化1A11.1純系之VL序列

SEQ ID NO:	蛋白質區			序列
				123456789012345678901234567890
197	h1A11VL.1 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIY SNLAWYQQKPGKAPKLLIYDTNNLADGVPS RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YNNYPPTFGQGTKLEIK
	h1A11VL.1 VL	CDR-L1	SEQ ID NO:197之殘基24-34	RASEDIYSNLA
	h1A11VL.1 VL	CDR-L2	SEQ ID NO:197之殘基50-56	DTNNLAD
	h1A11VL.1 VL	CDR-L3	SEQ ID NO:197之殘基89-97	QQYNNYPPT
198	h1A11.A2 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIY INLAWYQQKPGKSPKLLIFDTNDLADGVPS RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YDYVPPTFGQGTKLEIK
	h1A11.A2 VL	CDR-L1	SEQ ID NO:198之殘基24-34	RASQDIYINLA
	h1A11.A2 VL	CDR-L2	SEQ ID NO:198之殘基50-56	DTNDLAD

SEQ ID NO:	蛋白質區			序列
				123456789012345678901234567890
	h1A11.A2 VL	CDR -L3	SEQ ID NO:198之殘基89-97	QQYDYVPPT
199	h1A11.A12 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIY YNLAWYQQKPGKSPKLLIFDTSSLADGVPS RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQ YDWYPPTFGQGTKLEIK
	h1A11.A12 VL	CDR -L1	SEQ ID NO:199之殘基24-34	RASQDIYYNLA
	h1A11.A12 VL	CDR -L2	SEQ ID NO:199之殘基50-56	DTSSLAD
	h1A11.A12 VL	CDR -L3	SEQ ID NO:199之殘基89-97	QQYDWYPPT
200	h1A11.A7 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIY INLAWYQQKPGKAPKLLIFDTSDLADGVPS RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YDYYPPTFGQGTKLEIK
	h1A11.A7 VL	CDR -L1	SEQ ID NO:200之殘基24-34	RASQDIYINLA
	h1A11.A7 VL	CDR -L2	SEQ ID NO:200之殘基50-56	DTSDLAD
	h1A11.A7 VL	CDR -L3	SEQ ID NO:200之殘基89-97	QQYDYYPPT
201	h1A11.B4 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIY YNLAWYQQKPGKAPKLLIFDTNILADGVPS RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQ YDYVPPTFGQGTKLEIK
	h1A11.B4 VL	CDR -L1	SEQ ID NO:201之殘基24-34	RASQDIYYNLA
	h1A11.B4 VL	CDR -L2	SEQ ID NO:201之殘基50-56	DTNILAD
	h1A11.B4 VL	CDR -L3	SEQ ID NO:201之殘基89-97	QQYDYVPPT
202	h1A11.B5 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIW NNLAWYQQKPGKSPKLLIFDTSYLADGVPS RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YDWYPPTFGQGTKLEIK
	h1A11.B5 VL	CDR -L1	SEQ ID NO:202之殘基24-34	RASQDIWNNLA
	h1A11.B5 VL	CDR -L2	SEQ ID NO:202之殘基50-56	DTSYLAD

SEQ ID NO:	蛋白質區		序列
			123456789012345678901234567890
	h1A11.B5 VL	CDR -L3	SEQ ID NO:202之殘基89-97 QQYDWYPPT
203	h1A11.E12 VL		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQEIY RNLAWYQQKPGKSPKLLIFDTSVLADGVPS RFGSGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQ YTYYPPTFGQGTKLEIK
	h1A11.E12 VL	CDR -L1	SEQ ID NO:203之殘基24-34 RASQEIYRNLA
	h1A11.E12 VL	CDR -L2	SEQ ID NO:203之殘基50-56 DTSVLAD
	h1A11.E12 VL	CDR -L3	SEQ ID NO:203之殘基89-97 QQYTYYPPT

表 22. 親和力成熟 h1A11.1 轉化純系之彙總

純系名稱	VH	VL
h1A11.A6	h1A11.A6 VH	h1A11VL.1
h1A11.C6	h1A11.C6 VH	h1A11VL.1
h1A11.A11	h1A11.A11 VH	h1A11VL.1
h1A11.A8	h1A11.A8 VH	h1A11VL.1
h1A11.B4	h1A11VH.1	h1A11.B4 VL
h1A11.A7	h1A11VH.1	h1A11.A7 VL
h1A11.A12	h1A11VH.1	h1A11.A12 VL
h1A11.A2	h1A11VH.1	h1A11.A2 VL
h1A11.B5	h1A11.B5 VH	h1A11.B5 VL
h1A11.E12	h1A11.E12 VH	h1A11.E12 VL
h1A11.G3	h1A11.G3 VH	h1A11.E12 VL
h1A11.F5	h1A11.F5 VH	h1A11.E12 VL
h1A11.H2	h1A11.H2 VH	h1A11.E12 VL

表 23. 在 h1A11.1之親和力成熟選擇期間在 VH區 (SEQ ID NO:204)及 VL區 (SEQ ID NO:205)之架構區 (FR)及各 CDR 中所觀察到之胺基酸

SEQ ID NO:204									
VH									
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFPMAWVRQAPGKGLEWVATISSSDGTTYRDSVKG									
			RYY	S			S	G	SSASIG
			NH	T			A		AFDN
			GS						EWST
			KA						D PA
			T						F D
			L						Q
									C
RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYYNSPFAYWGQGLVTVSS									
	SL			D			DF		
							S		
SEQ ID NO:205									
VL									
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYDTNNLAD									
			TQE	WN			S		F NS
			T	EI					D
			DT						Q
			NR						T
			M						V
			G						E
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYNNYPPTFGQGTKLEIK									
	S			F		SDWV	P		
						TY			
						YI			
						F			
						P			

使 hu1A11.1親和力成熟純系(表 22)表現，純化，並在活體外進一步表徵。如實例 1.1 中所述，藉由 Biacore 技術測定其抗原結合親和力，且示於表 24 及表 25(下文)中。使用實例 1.3 及實例 1.6 中所述之方法進一步檢查其結合至細胞結合 DLL4 及抑制細胞結合 DLL4 誘導之 Notch 活化的活性並彙總於表 26(下文)中。

表 24. 結合至人類及獼猴 DLL4 之親和力成熟人類化 1A11.1 抗體的 Biacore 動力學

純系	Biacore 動力學					
	人類 DLL4			獼猴 DLL4		
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
h1A11.A6	$1.82 \times 10^{+5}$	6.62×10^{-6}	3.6×10^{-11}	$1.71 \times 10^{+5}$	2.10×10^{-5}	1.2×10^{-10}
h1A11.C6	$1.78 \times 10^{+5}$	7.18×10^{-6}	4.0×10^{-11}	$1.71 \times 10^{+5}$	3.12×10^{-5}	1.8×10^{-10}
h1A11-G3	$1.09 \times 10^{+5}$	9.39×10^{-6}	8.7×10^{-11}	$9.90 \times 10^{+4}$	1.73×10^{-5}	1.7×10^{-10}
h1A11-F5	$1.31 \times 10^{+5}$	9.82×10^{-6}	7.5×10^{-11}	$1.18 \times 10^{+5}$	2.00×10^{-5}	1.7×10^{-10}
h1A11.A8	$1.74 \times 10^{+5}$	1.08×10^{-5}	6.2×10^{-11}	$1.60 \times 10^{+5}$	2.40×10^{-5}	1.5×10^{-10}
h1A11.A11	$1.83 \times 10^{+5}$	2.66×10^{-5}	1.5×10^{-10}	$1.70 \times 10^{+5}$	3.35×10^{-5}	2.0×10^{-10}
h1A11-E12	$1.49 \times 10^{+5}$	3.26×10^{-5}	2.2×10^{-10}	$1.37 \times 10^{+5}$	3.84×10^{-5}	2.8×10^{-10}
h1A11-H2	$1.43 \times 10^{+5}$	3.85×10^{-5}	2.7×10^{-10}	$1.31 \times 10^{+5}$	4.60×10^{-5}	3.5×10^{-10}
h1A11-B5	$1.30 \times 10^{+5}$	1.34×10^{-4}	1.0×10^{-9}	$1.17 \times 10^{+5}$	1.78×10^{-4}	1.5×10^{-9}
h1A11.A2	$1.42 \times 10^{+5}$	4.21×10^{-4}	3.0×10^{-9}	$1.34 \times 10^{+5}$	5.27×10^{-4}	3.9×10^{-9}
h1A11-B4	$1.57 \times 10^{+5}$	8.23×10^{-4}	5.2×10^{-9}	$1.43 \times 10^{+5}$	9.90×10^{-4}	6.9×10^{-9}
h1A11.A7	$1.70 \times 10^{+5}$	9.73×10^{-4}	5.7×10^{-9}	$1.58 \times 10^{+5}$	1.24×10^{-3}	7.8×10^{-9}
h1A11.A12	$1.73 \times 10^{+5}$	1.32×10^{-3}	7.6×10^{-9}	$1.58 \times 10^{+5}$	1.62×10^{-3}	1.0×10^{-8}
h1A11.1	$1.58 \times 10^{+5}$	2.12×10^{-3}	1.3×10^{-8}	$1.44 \times 10^{+5}$	2.55×10^{-3}	1.8×10^{-8}

表 25. 結合至小鼠及大鼠 DLL4 之親和力成熟人類化 1A11.1 抗體的 Biacore 動力學

純系	Biacore 動力學					
	小鼠 DLL4			大鼠 DLL4		
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
h1A11.A6	$1.98 \times 10^{+5}$	3.12×10^{-5}	1.6×10^{-10}	$1.29 \times 10^{+5}$	7.72×10^{-4}	6.0×10^{-9}
h1A11.C6	$2.03 \times 10^{+5}$	2.34×10^{-5}	1.2×10^{-10}	$1.69 \times 10^{+5}$	3.05×10^{-3}	1.8×10^{-8}
h1A11-G3	$1.17 \times 10^{+5}$	4.04×10^{-5}	3.5×10^{-10}	$1.18 \times 10^{+5}$	1.01×10^{-3}	8.6×10^{-9}

h1A11-F5	$1.43 \times 10^{+5}$	3.97×10^{-5}	2.8×10^{-10}	$1.16 \times 10^{+5}$	6.79×10^{-4}	5.8×10^{-9}
h1A11.A8	$1.87 \times 10^{+5}$	3.27×10^{-5}	1.8×10^{-10}	$1.39 \times 10^{+5}$	6.50×10^{-3}	4.7×10^{-8}
h1A11.A11	$1.98 \times 10^{+5}$	3.54×10^{-5}	1.8×10^{-10}	$1.16 \times 10^{+5}$	1.02×10^{-3}	8.8×10^{-9}
h1A11-E12	$1.56 \times 10^{+5}$	5.44×10^{-5}	3.5×10^{-10}	$1.08 \times 10^{+5}$	1.75×10^{-4}	1.6×10^{-9}
h1A11-H2	$1.54 \times 10^{+5}$	5.07×10^{-5}	3.3×10^{-10}	$1.78 \times 10^{+5}$	2.83×10^{-3}	1.6×10^{-8}
h1A11-B5	$1.45 \times 10^{+5}$	1.66×10^{-4}	1.2×10^{-9}	$9.82 \times 10^{+4}$	3.97×10^{-2}	4.1×10^{-7}
h1A11.A2	$1.81 \times 10^{+5}$	9.04×10^{-4}	5.0×10^{-9}	NB	NB	NB
h1A11-B4	$4.79 \times 10^{+5}$	2.51×10^{-3}	5.2×10^{-9}	NB	NB	NB
h1A11.A7	不良結合		1.3×10^{-8}	NB	NB	NB
h1A11.A12	不良結合		1.6×10^{-8}	NB	NB	NB
h1A11.1	$1.56 \times 10^{+5}$	4.98×10^{-3}	3.2×10^{-8}	NB	NB	NB

NB=無可觀察到之結合

表 26. 親和力成熟人類化 1A11.1 抗體針對細胞結合 DLL4 之活體外活性

	直接結合至 DLL4 細胞, FACS(nM)		經由 DLL4 細胞抑制 Notch 活化, Notch 受體分析(nM)	
	人類 DLL4	小鼠 DLL4	人類 DLL4	小鼠 DLL4
h1A11.A6	2.227	0.636	0.746	1.168
h1A11.C6	2.452	0.517	0.894	1.188
h1A11-G3	3.592	1.397	1.845	2.353
h1A11-F5	1.171	0.460	0.484	0.649
h1A11.A8	3.160	0.744	1.331	1.247
h1A11.A11	2.480	0.500	0.904	1.175
h1A11-E12	0.996	1.615	0.208	0.266
h1A11-H2	1.977	0.420	0.856	0.586
h1A11.A2	2.375	0.634	3.681	0.854
h1A11-B4	2.145	0.665	3.280	1.079
h1A11.A7	2.174	0.625	2.920	1.788
h1A11.A12	1.768	0.568	1.662	0.832

實例 9. 大鼠融合瘤抗體之分子身分及物理化學性質

如下文所述, 藉由質譜測定對 DLL4 具有特異性之單株

抗體的身分。

h1A11.1之質譜分析

23,501道爾頓之輕鏈分子量與理論值良好匹配。重鏈分子量與理論值良好匹配。觀察到之分子量為50,190道爾頓、50,352道爾頓及50,514道爾頓，由於糖基化不同而產生對應於162道爾頓之差異。

h38H12.11之質譜分析

23,408道爾頓之輕鏈分子量與理論值良好匹配。重鏈分子量與理論值良好匹配。觀察到之分子量為50,368道爾頓、50,530道爾頓及50,692道爾頓，由於糖基化不同而產生對應於162道爾頓之差異。

藉由聚乙二醇(PEG)3000沈澱來估測抗體之溶解度。亦藉由用Amicon離心過濾器濃縮於特定溶液及/或緩衝液中之抗體，接著觀察在25°C及5°C下之任何沈澱來直接測定溶解度，亦即，真溶解度。藉由近紫外線圓(UV-CD)及差示掃描量熱術(DSC)推斷穩定性。藉由尺寸排除層析(SEC)評估冷凍與解凍穩定性及在高溫下之穩定性(加速穩定性)。詳細技術描述於實例1.7中，且結果描述如下。

1A11之真溶解度篩選結果：

對於1A11純系系列，包括hu1A11.1、hu1A11.3、hu1A11.9、hu1A11.11及1A11重組體，用Amicon離心過濾器將各2 mg濃縮至約60 mg/ml。在25°C下、或在5°C下儲存1天後，未觀察到沈澱或混濁。濃度各自為63 mg/ml (1A11.1)、76 mg/ml (1A11.3)、63 mg/ml (1A11.9)、69

mg/ml (1A11.11)及 76 mg/ml(嵌合 1A11)。

實例 10. 藉由 Biacore 技術進行抗 DLL4 抗體抗原決定基分組

使用 Biacore 2000、3000 及 T100 儀器進行抗原決定基分組。經由胺基偶合將相關抗體直接固定於 CM5 晶片表面上。具有以類似方式固定之無關 IgG 的流槽充當參考表面。首先，在 50 μ l/min 下使固定之單株抗體 (mAb) 結合重組抗原 (濃度為至少 200 nM) 120 秒。接著，以 50 μ l/ml 注射另一抗體 120 至 240 秒，以便監測其與已結合至固定之 mAb 之抗原結合的能力。感測器圖譜上不存在其他結合反應構成兩個 mAb (一個固定於晶片上，一個引入液相中) 之抗原決定基中之重疊。接著，以將處於液相中之抗體固定且將固定於晶片上之抗體引入液相中的方式來轉換分析方向。將此等實驗中在兩個分析方向均不允許其他抗體結合的 mAb 對分為真重疊組。所得具有重疊抗原決定基之 mAb 分組示於下表 27 中。

表 27. 藉由 BIAcore 技術進行抗 DLL4 抗體抗原決定基分組

固定之抗體	第1次注射	第2次注射						
		huDLL4	38H12	15D6	13E4	1A11	14G1	14A11
38H12	+	-	+	+	+	+	+	+
15D6	+	+	-	-	-	-	-	-
13E4	+	+	-	-	-	+	-	-
1A11	+	+	-	-	-	-	-	-
14G1	+	+	+	+	+	-	-	-
14A11	+	+	-	-	-	-	-	-

「+」指示結合；「-」指示不結合

實例 11. DLL4 抗體在活體外內皮細胞萌芽分析中之活性

如所描述進行血纖維蛋白凝膠珠粒萌芽分析以檢查 HUVEC(2-3 繼代, Lonza)之活體外血管生成活性(Nakatsu, M. N. 等人, 2003 *Microvasc. Res.* 66, 102-112)。簡而言之, 用抑肽酶(4 U/ml)及凝血酶(50 U/ml)復原血纖維蛋白原溶液。以每個珠粒 350 至 400 個 HUVEC 塗佈 Cytodex 3 珠粒 (Amersham Pharmacia Biotech) 隔夜。將約 20 個經 HUVEC 塗佈之珠粒埋入 96 孔組織培養板之每個孔中之血纖維蛋白凝塊中。將來源於 80% 匯合時之正常人類纖維母細胞(NHLF, Lonza)之改良性培養基塗佈於凝膠上。將 15 μ g/ml 之 DLL4 抗體及對照抗體 KLH 添加至孔上。在第 10 天及第 12 天, 用倒置式顯微鏡及 Nikon CCD 相機獲取影像。表 28 彙總一些 DLL4 抗體增強活體外內皮細胞萌芽的活性。(Nakatsu 等人, 「Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: the role of fibroblasts and Angiopoietin-1」, *Microvasc. Res.* 66, 102-112 (2003))。

表 28. DLL4 抗體刺激內皮細胞萌芽之活性

測試抗體	刺激HUVEC萌芽
38H12大鼠mAb	是
1A11大鼠mAb	是
h1A11.1	是
40B10大鼠mAb	未觀察到
32C7大鼠mAb	未觀察到

實例12. 來源於融合瘤之抗體的齧齒動物PK評估

為了評估抗DLL4抗體之藥物動力學性質，視抗體對鼠類DLL4之交叉反應性，向SCID-Beige小鼠(n=3/抗體)投與單次腹膜內(IP)劑量之濃度為1、5、10或30 mg/kg的抗體。歷經21天自各動物採集縱向血清樣本(每個時間點，5 μ l全血於HBS-EP+緩衝液中1:50稀釋)。使用DLL4特異性Biacore平台測定血清濃度。簡而言之，將人類DLL4固定至感測器晶片，且以5 μ l/min將樣本注射至流槽上歷時5分鐘，量測所得結合水準並與標準值比較。使用血清濃度時間曲線估測藥物動力學參數 C_{max} (峰值血清濃度)、CL(清除率)及 $t_{1/2}$ (抗體半衰期)，彙總於下表29中。

表29. 單次IP給藥後SCID-Beige小鼠中之抗DLL4抗體的藥物動力學參數

抗體	劑量 (mg/kg)	C_{max} (μ g/mL)	CL (mL/hr/kg)	$t_{1/2}$ (d)
38H12大鼠mAb	5	30.2	0.3	20-29
h1A11.1	30	163	0.44	11.3
h1A11.1	10	49.9	0.50	9.9
h1A11.1	5	11.0	1.78	6.3
h1A11.1	1	3.1	2.16	4.4

實例13. DLL4抗體治療抑制活體內腫瘤生長

對移植於SCID-Beige小鼠中之皮下Calu-6異種移植腫瘤評估抗DLL4抗體對腫瘤生長之影響。簡而言之，將 2×10^6 個細胞皮下接種至雌性SCID-Beige小鼠之右後肋中。使腫瘤形成14至18天，在該時間點使用電子測徑規量測法測定腫瘤體積。使用下式計算腫瘤尺寸： $L \times W^2/2$ 。將小鼠分配

至治療組(n=10/組)中以使各組動物在開始治療前具有相等的平均腫瘤體積(通常在180與250 mm³之間)。接著經腹膜內向動物投與抗DLL4抗體，每週兩次持續兩週(總共4劑)或每週一次持續四週(總共4劑)。在實驗持續期間平均每週兩次量測腫瘤體積，直至各組之平均腫瘤體積達到≥2,000 mm³之終點。結果示於表30中。

表30. 抗DLL4抗體在Calu-6人類非小細胞肺癌皮下異種移植模型中之功效

Treatment	劑量，途徑，方案	%T/C ^a	%ILS ^b
1A11大鼠mAb	30 mg/kg，IP，2次/週×2	37**	89**
1A11大鼠mAb	10 mg/kg，IP，2次/週×2	47**	39**
1A11大鼠mAb	5 mg/kg，IP，2次/週×2	43**	57**
14A11大鼠mAb	10 mg/kg，IP，2次/週×2	37**	57**
40B10大鼠mAb	30 mg/kg，IP，2次/週×2	29**	89**
32C7大鼠mAb	30 mg/kg，IP，2次/週×2	65*	28*
14A11嵌合體	10 mg/kg，IP，q7d×4	32**	114**
15D6嵌合體	10 mg/kg，IP，q7d×4	47**	57**
40B10嵌合體	10 mg/kg，IP，q7d×4	43**	73**
32C7嵌合體	10 mg/kg，IP，q7d×4	71*	18*
h1A11.1	10 mg/kg，IP，q7d×4	34**	75**
h1A11.1	5 mg/kg，IP，q7d×4	31**	80**
h1A11.1	1 mg/kg，IP，q7d×4	43**	36**
h1A11.1	0.5 mg/kg，IP，q7d×4	62**	25*

^a. %T/C=治療組之平均腫瘤體積/治療對照組之腫瘤體積×100。P值(如星號所示)係由治療組對比治療對照組之司

徒頓 T 檢驗 (Student's T test) 比較而得出。基於第 25/26/27 天之量測。

$\%ILS = (T - C) / C \times 100$ ，其中 T = 治療組達到終點之中值時間，且 C = 治療對照組達到終點之中值時間。P 值 (如星號所示) 係由治療組對比治療對照組之 Kaplan Meier 對數等級比較而得出。基於終點 2000 mm³。

*p < 0.05；**p < 0.001

引用併入

可能在本申請案中引用之所有引用參考文獻 (包括參考文獻、專利、專利申請案及網站) 的內容出於任何目的明確地以全文引用的方式併入本文中，其中所引用之參考文獻亦如此。

相等物

本發明可以其他特定形式實施而不背離本發明之精神或基本特徵。因此，上述實施例在所有方面均視為說明性而非限制本文所述之本發明。因而，本發明之範疇由所附申請專利範圍而非以上描述來指定，且因此本文意欲涵蓋屬於申請專利範圍相等物之含義及範圍內的所有變化。

序列表

<110> 美商亞培公司

<120> 治療性 DLL4 結合蛋白

<130>

<140> 100106952

<141> 2011-03-02

<150> 61/309,494

<151> 2010-03-02

<160> 206

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 685

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Ala Ala Ala Ser Arg Ser Ala Ser Gly Trp Ala Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Val Ala Leu Trp Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Val Phe Gln Leu
 20 25 30

Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly Val Leu Ala Ser Gly Arg
 35 40 45

Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu Lys His
 50 55 60

Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys Thr Phe Gly Thr Val Ser
65 70 75 80

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

Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp Pro
100 105 110

Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp His Ala Pro Gly Asp Asp
115 120 125

Leu Arg Pro Glu Ala Leu Pro Pro Asp Ala Leu Ile Ser Lys Ile Ala
130 135 140

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

Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser Tyr Arg Val Ile Cys Ser
165 170 175

Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg Leu Cys Lys Lys Arg Asn
180 185 190

Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro Asp Gly Asn Leu Ser Cys
195 200 205

Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Gln Gln Pro Ile Cys Leu Ser
210 215 220

Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser Lys Pro Ala Glu Cys Leu
225 230 235 240

Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ile Pro His
245 250 255

Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Thr Pro Trp Gln Cys Thr Cys
260 265 270

Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp Gln Asp Leu Asn Tyr Cys
275 280 285

Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys Ser Asn Ser Gly
290 295 300

Gln Arg Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Arg Pro Gly Tyr Thr Gly Val Asp
305 310 315 320

Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys Asp Ser Asn Pro Cys Arg Asn Gly
325 330 335

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp Gly Tyr His Cys Leu Cys Pro Pro
340 345 350

Gly Tyr Tyr Gly Leu His Cys Glu His Ser Thr Leu Ser Cys Ala Asp
355 360 365

Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg Glu Arg Asn Gln Gly Ala
370 375 380

Asn Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe Thr Gly Ser Asn Cys Glu
385 390 395 400

Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln
405 410 415

Cys Leu Asn Arg Gly Pro Ser Arg Met Cys Arg Cys Arg Pro Gly Phe
420 425 430

Thr Gly Thr Tyr Cys Glu Leu His Val Ser Asp Cys Ala Arg Asn Pro
 435 440 445

Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu Glu Asn Gly Leu Met Cys
 450 455 460

Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg Cys Glu Val Arg Thr Ser
 465 470 475 480

Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe Asn Arg Ala Thr Cys Tyr
 485 490 495

Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys Asn Cys Pro Tyr Gly Phe
 500 505 510

Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly Leu Pro Pro Ser Phe Pro
 515 520 525

Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu Ala Val Leu Leu Val Leu
 530 535 540

Leu Gly Met Val Ala Val Ala Val Arg Gln Leu Arg Leu Arg Arg Pro
 545 550 555 560

Asp Asp Gly Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn Leu Ser Asp Phe Gln Lys
 565 570 575

Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys Asn Thr Asn Gln Lys Lys
 580 585 590

Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys Ser Asn Cys Gly Lys Gln
 595 600 605

Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala Pro Gly Pro Leu Gly Arg
610 615 620

Gly Thr Met Pro Gly Lys Phe Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly Glu
625 630 635 640

Lys Ala Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile Ser
645 650 655

Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu Ile
660 665 670

Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val
675 680 685

<210> 2
<211> 2058
<212> DNA
<213> 智人

<400> 2
atggcggcag cgtcccggag cgcctctggc tgggcgctac tgctgctggt ggcactttgg 60
cagcagcgcg cggccggctc cggcgtcttc cagctgcagc tgcaggagtt catcaacgag 120
cgcggcgctac tggccagtgg gcggccttgc gagcccggct gccggacttt cttccgcgtc 180
tgccttaagc acttccaggc ggctgtctcg cccggaccct gcaccttcgg gaccgtctcc 240
acgccggtat tgggcaccaa ctcttcgct gtccgggacg acagtagcgg cggggggcgc 300
aaccctctcc aactgccctt caatttcacc tggccgggta cttctcgcct catcatcgaa 360
gcttggcacg cgccaggaga cgacctgcgg ccagaggcct tgccaccaga tgcaatcacc 420
agcaagatcg ccatccaggg ctccctagct gtgggtcaga actggttatt ggatgagcaa 480
accagcacc tcacaaggct gcgtactct taccgggtca tctgcagtga caactactat 540

ggagacaact gctcccgccct gtgcaagaag cgcaatgacc acttcggcca ctatgtgtgc	600
cagccagatg gcaacttgtc ctgcctgccc ggttgactg gggaatatg ccaacagcct	660
atctgtcttt cgggctgtca tgaacagaat ggctactgca gcaagccagc agagtgcctc	720
tgccgcccag gctggcaggg ccggctgtgt aacgaatgca tccccacaa tggctgtcgc	780
cacggcacct gcagcactcc ctggcaatgt acttgtgatg agggctgggg aggcctgttt	840
tgtgaccaag atctcaacta ctgcacccac cactcccat gcaagaatgg ggcaacgtgc	900
tccaacagtg ggccagcgaag ctacacctgc acctgtcgcc caggctacac tgggtgtggac	960
tgtgagctgg agctcagcga gtgtgacagc aaccctgtc gcaatggagg cagctgtaag	1020
gaccaggagg atggctacca ctgcctgtgt cctccgggct actatggcct gcattgtgaa	1080
cacagcacct tgagctgcgc cgactcccc tgettcaatg ggggctcctg ccgggagcgc	1140
aaccaggggg ccaactatgc ttgtgaatgt cccccaaact tcaccggctc caactgcgag	1200
aagaaagtgg acaggtgcac cagcaacccc tgtgccaacg ggggacagtg cctgaaccga	1260
ggtccaagcc gcatgtgccg ctgccgtcct ggattcacgg gcacctactg tgaactccac	1320
gtcagcgact gtgcccgtaa cccttgccgc cacggtggca cttgccatga cctggagaat	1380
gggctcatgt gcacctgccc tgccggcttc tctggccgac gctgtgaggt gcggacatcc	1440
atcgatgcct gtgcctcgag tccctgcttc aacagggccca cctgctacac cgacctctcc	1500
acagacacct ttgtgtgcaa ctgcccttat ggctttgtgg gcagccgctg cgagttcccc	1560
gtgggcttgc cggccagctt cccttgggtg gccgtctcgc tgggtgtggg gctggcagtg	1620
ctgctggtac tgctgggcat ggtggcagtg gctgtgcggc agctgcggct tcgacggccg	1680
gacgacggca gcagggaagc catgaacaac ttgtcggact tccagaagga caacctgatt	1740
cctgccgccc agcttaaaaa cacaaccag aagaaggagc tggaagtgga ctgtggcctg	1800
gacaagtcca actgtggcaa acagcaaac cacacattgg actataatct ggccccaggg	1860

cccctggggc gggggaccat gccaggaaag tttccccaca gtgacaagag cttaggagag 1920
aaggcgccac tgcggttaca cagtgaaaag ccagagtgtc ggatatcagc gatatgctcc 1980
cccagggact ccatgtacca gtctgtgtgt ttgatatcag aggagaggaa tgaatgtgtc 2040
attgccacgg aggtataa 2058

<210> 3
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

290295300

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

305310315320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325330

<210> 4

<211> 330

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

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

151015

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

202530

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

354045

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

505560

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65707580

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

859095

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

100105110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5
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> 6
<211> 105
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽



<220>
<221> MOD_RES
<222> (3).. (3)
<223> 任何胺基酸

<400> 7
Phe Gly Xaa Gly
1

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2).. (9)
<223> 任何胺基酸

<400> 8
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 9
Leu Glu Trp Ile Gly

1 5

<210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 任何胺基酸

<400> 10
Trp Gly Xaa Gly
1

<210> 11
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

<210> 12
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 13
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 15
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

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

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

<210> 16
<211> 14
<212> PRT

<213> 智人

<400> 16

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

1 5 10

<210> 17

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 18

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 19

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<400> 19

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

20 25 30

<210> 20
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 21
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21
Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 22
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 23
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 23
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 25
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 27
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

<210> 28
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

● <400> 28
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 29
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 29
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 30
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 31

<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 31
Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

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

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 33
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 33
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 34
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 35
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 35
Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15

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

<210> 36
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 37
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 38
<211> 11
<212> PRT

<213> 智人

<400> 38
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 39
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

<210> 40
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 40
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 41
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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



<210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 42
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 43
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人

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

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

<210> 44
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 44
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 45
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 45
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

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

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 46
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 47
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 47
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 49
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人



<400> 49
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 50
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 51
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 51
Glu 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
20 25 30

<210> 52
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 52
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 53

<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 53
Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 55
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

<210> 56
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 56
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly



1 5 10

<210> 57
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 57
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

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

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 58
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 59
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 59
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser
20 25 30

<210> 60
<211> 14
<212> PRT

<213> 智人

<400> 60

Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 61

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 61

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Ser Phe Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 62

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 62

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 63

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<400> 63

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

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

<210> 64
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 64
Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 65
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 65
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Tyr Leu Lys
1 5 10 15

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

<210> 66
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 66
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 67
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 67
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser
20 25 30

<210> 68
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 68
Trp Ile Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 69
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 69
Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Phe Asn Thr Phe Phe Leu Gln
1 5 10 15

Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 70
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 70
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 71
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人



<400> 71
Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

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

<210> 72
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 72
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 73
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 73
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 74
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 74
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 75

<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 75
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Ser Gly Gly
1 5 10 15

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

<210> 76
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 76
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 77
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 77
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 78
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 78
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 79
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 79
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

<210> 80
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 80
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 81
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 81
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 82
<211> 11
<212> PRT

<213> 智人

<400> 82

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 83

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人

<400> 83

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 84

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 85

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 85

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20

25

30

<210> 86
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 86
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 87
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 87
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 88
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 88
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 89
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 89
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 90
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 90
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 91
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 91
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 92
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 92
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 93
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人



<400> 93

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 94
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 94
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 95
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 95
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 96
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 96
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 97

<211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 97
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15

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

<210> 98
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 98
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 99
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 99
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 100
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 100
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 101
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 101
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 102
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 102
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 103
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 103
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 104
<211> 15
<212> PRT

<213> 智人

<400> 104

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

<210> 105

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 105

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 106

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 106

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 107

<211> 22

<212> PRT

<213> 智人

<400> 107

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys
20

<210> 108
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 108
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 109
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 109
Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr
1 5 10 15

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

<210> 110
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 110
Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
1 5 10

<210> 111
<211> 22
<212> PRT
<213> 智人

<400> 111
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys
20

<210> 112
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 112
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 113
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 113
Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr
1 5 10 15

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

<210> 114
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 114
Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 115
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人



<400> 115
Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr
1 5 10 15

Ala Ser Ile Thr Cys
20

<210> 116
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 116
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 117
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 117
Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr
1 5 10 15

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

<210> 118
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 118
Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 119

<211> 22
<212> PRT
<213> 智人

<400> 119
Leu Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys
20

<210> 120
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 120
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 121
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 121
Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys
20 25 30

<210> 122
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 122
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly



1 5 10

<210> 123
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 123
Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 124
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 124
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 125
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 125
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 126
<211> 11
<212> PRT

<213> 智人

<400> 126

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 127

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人

<400> 127

Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 128

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 128

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

1 5 10 15

<210> 129

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 129

Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Glu Ala Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 130
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 130
Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 131
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 131
Asp Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 132
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 132
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 133
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 133
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr
1 5 10 15

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

<210> 134
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 134
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 135
<211> 22
<212> PRT
<213> 智人

<400> 135
Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys
20

<210> 136
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 136
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 137
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人



<400> 137
Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys
 20 25 30

<210> 138
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 138
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
1 5 10

<210> 139
<211> 22
<212> PRT
<213> 智人

<400> 139
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys
 20

<210> 140
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 140
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 141

<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 141
Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys
 20 25 30

<210> 142
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 142
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10

<210> 143
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30).. (30)
<223> Ser、Arg 或 Gly

<400> 143
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa



20 25 30

<210> 144
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 144
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 145
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11).. (11)
<223> Asn 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (31).. (31)
<223> Ala 或 Ser

<400> 145
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Xaa Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 146
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 146
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 147
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 147
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 148
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽



<220>
<221> MOD_RES
<222> (9).. (9)
<223> Ala 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15).. (15)
<223> Phe 或 Tyr

<400> 148
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Xaa Pro Lys Leu Leu Ile Xaa
1 5 10 15

<210> 149
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15).. (15)
<223> Phe 或 Ser

<400> 149
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Xaa Thr
1 5 10 15

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

<210> 150
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 150
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 151
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1).. (1)
<223> Asn、His 或 Tyr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5).. (5)
<223> Ala 或 Ser

<400> 151
Xaa Phe Pro Met Xaa
1 5

<210> 152
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽



<220>
<221> MOD_RES
<222> (1).. (1)
<223> Thr 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4).. (4)
<223> Ser 或 Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7).. (7)
<223> Gly 、 Ala 、 Asp 、 Ser 或 Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8).. (8)
<223> Thr 或 Trp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9).. (9)
<223> Thr 、 Pro 或 Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10).. (10)
<223> Tyr 、 Ser 、 Thr 或 Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11).. (11)
<223> Tyr 或 Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12).. (12)
<223> Arg 或 Gly

<400> 152
Xaa Ile Ser Xaa Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 153
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9).. (9)
<223> Tyr、Phe 或 Ser

<400> 153
Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Xaa
1 5

<210> 154
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4).. (4)
<223> Glu 或 Gln

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5).. (5)
<223> Asp 或 Glu



<220>
<221> MOD_RES
<222> (7).. (7)
<223> Tyr 或 Trp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8).. (8)
<223> Ser、Ile、Tyr、Asn 或 Arg

<400> 154
Arg Ala Ser Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 155
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3).. (3)
<223> Asn 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4).. (4)
<223> Asn、Asp、Ser、Ile、Tyr 或 Val

<400> 155
Asp Thr Xaa Xaa Leu Ala Asp
1 5

<210> 156
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4).. (4)

<223> Asn、Asp 或 Thr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223> Asn、Tyr 或 Trp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6).. (6)

<223> Tyr 或 Val

<400> 156

Gln Gln Tyr Xaa Xaa Xaa Pro Pro Thr
1 5

<210> 157

<211> 118

<212> PRT

<213> 家鼠屬

<400> 157

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

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

Gly Met Tyr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu Gln Trp Val
35 40 45



Ala Phe Ile Ser His Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Leu Asn Trp Glu Leu Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 158

<211> 108

<212> PRT

<213> 家鼠屬

<400> 158

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

Glu Thr Ile Ser Ile Glu Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Gly Met Gln Pro

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 160
<211> 108
<212> PRT
<213> 家鼠屬

<400> 160
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Ser Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

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

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

<210> 161
<211> 122
<212> PRT
<213> 家鼠屬

<400> 161

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

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

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

Ala Arg Ile Arg Thr Lys Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Ala Ala Pro Trp Arg Asp Ser Tyr Ala His Val Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 162

<211> 108

<212> PRT

<213> 家鼠屬

<400> 162

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

Asp Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile His Lys Asn

202530

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys His Gly Asp Ala Pro Lys Leu Leu Ile

354045

Tyr Tyr Thr Asp His Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

505560

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65707580

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Asn Gly Gly Pro Phe

859095

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100105

<210> 163

<211> 116

<212> PRT

<213> 家鼠屬

<400> 163

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

151015

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Ser Val

202530

Trp Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

354045

Ala Thr Ile Thr Asn Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ser Ala Ser Val

505560

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

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

Thr Arg Val Gly Thr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 164

<211> 109

<212> PRT

<213> 家鼠屬

<400> 164

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Tyr Asp Tyr Pro Pro

85

90

95

Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100105

<210> 165

<211> 116

<212> PRT

<213> 家鼠屬

<400> 165

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

151015

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

202530

Asp Ile Ser Trp Ile Lys Gln Thr Asn Gly Gln Gly Leu Glu Tyr Leu

354045

Gly Tyr Ile Asn Thr Gly Ser Gly Gly Ile Tyr Ser Asn Glu Lys Phe

505560

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

65707580

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

859095

Val Arg Glu Gly Asn Asn Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Val Lys Val

100105110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 166
<211> 108
<212> PRT
<213> 家鼠屬

<400> 166
Asp Thr Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

<210> 167
<211> 121
<212> PRT
<213> 家鼠屬

<400> 167
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15



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

Tyr Ile Ser Trp Ile Lys Gln Thr Thr Gly Gln Gly Leu Glu Tyr Val
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Thr Gly Ser Gly Gly Ala Asp Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Lys Ser Ile Leu Leu Gly Ser Thr Cys Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 168

<211> 111

<212> PRT

<213> 家鼠屬

<400> 168

Asn Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Arg Ser Val Ser Ser Pro Met
20 25 30

Tyr Ser Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro Lys

35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
50 55 60

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

Val Glu Ala Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Trp Ser
85 90 95

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

<210> 169

<211> 121

<212> PRT

<213> 家鼠屬

<400> 169

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

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

Tyr Ile Ser Trp Ile Lys Gln Thr Thr Gly Gln Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Lys Ser Ile Leu Leu Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 170
<211> 111
<212> PRT
<213> 家鼠屬

<400> 170
Asp Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Arg Ser Leu Ser Ser Pro Met
20 25 30

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

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

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

Val Glu Ala Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Trp Ser
85 90 95

Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100105110

<210> 171<211> 118<212> PRT<213> 人工序列<220><223> 人工序列之描述：合成多肽<400> 171Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly15105Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe202530Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val354045Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val505560Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr65707580Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys859095Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr100105110Leu Val Thr Val Ser Ser115



<210> 172

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 172

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 173

<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 173
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ser Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 174
<211> 118
<212> PRT



- 73 -

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 175

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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30

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

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

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

<210> 176

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 176

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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn

202530

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

354045

Phe Asp Thr Asn Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

505560

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65707580

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro

859095

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

100105

- <210> 177
- <211> 108
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 177

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

151015

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asn

202530

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

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

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

<210> 178

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 178

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

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

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

Phe Asp Thr Asn Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly

505560

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65707580

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro

859095

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

100105

<210> 179
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 179

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

151015

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

202530

Gly Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

354045

Ala Phe Ile Ser His Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val

505560

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65707580

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 180
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 180
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

Ala Phe Ile Ser His Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys

859095

Ala Ala Leu Asn Trp Glu Leu Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100105110

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 181

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 181

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

151015

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

202530

Gly Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

354045

Ala Phe Ile Ser His Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val

505560

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65707580

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

859095

Ala Ala Leu Asn Trp Glu Leu Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 182

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 182

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

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

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

Ala Phe Ile Ser His Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Leu Asn Trp Glu Leu Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100105110

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 183
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 183

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

151051

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asn

202530

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

354045

Tyr Ala Ala Asn Arg Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

505560

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65707580

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Ser Lys Phe Pro Leu

859095

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

100105

<210> 184
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 184
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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 185
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列



〈223〉 人工序列之描述：合成多肽

<400> 185

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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 186

<211> 108

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 人工序列之描述：合成多肽

<400> 186

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

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

<210> 187
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 187
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30



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

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

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

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

Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

- <210> 188
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 188
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

354045

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Ala Trp Pro Ser Tyr Arg Asp Ser Val
505560

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65707580

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
859095

Ser Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100105110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 189
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 189

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
151015

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asn Phe
202530

Pro Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
354045

S

Ala Ser Ile Ser Ser Ser Asp Ser Trp Ala Thr Ile Gly Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ser Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 190

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 190

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

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

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

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

50 55 60

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

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

Ser Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 191
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 191
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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



- 89 -

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 193

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 193

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Tyr Phe

20

25

30

Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Thr Ile Ser Gly Ser Asp Glu Trp Pro Asn Tyr Arg Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80



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

Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 194

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 194

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

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

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

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

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

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

85 90 95
Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 195
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 195
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Ala Trp Pro Ser Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

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

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



Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 196
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 196
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Ser Ile Ser Ser Ser Asp Ser Trp Ala Thr Ile Gly Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr

100105110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 197

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 197

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1510515

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asn

202530

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

354045

Tyr Asp Thr Asn Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

505560

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65707580

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro

859095

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100105

<210> 198
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 198
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 Tyr Ile Asn
 20 25 30

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

Phe Asp Thr Asn Asp Leu Ala Asp 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Tyr Val Pro Pro
 85 90 95

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

<210> 199
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

〈223〉 人工序列之描述：合成多肽

<400> 199

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 Tyr Tyr Asn
20 25 30

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

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

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

$\langle 210 \rangle$ 200

<211> 107

<212> PRT

〈213〉 人工序列

$\langle 220 \rangle$

〈223〉 人工序列之描述：合成多肽

<400> 200

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

15

10

5

1

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

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

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

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

<210> 201
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 201
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 Tyr Tyr Asn
20 25 30

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

Phe Asp Thr Asn Ile Leu Ala Asp 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 Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Tyr Val Pro Pro
85 90 95

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

<210> 202
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 202
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 Trp Asn Asn
20 25 30

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

Phe Asp Thr Ser Tyr Leu Ala Asp 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Trp Tyr Pro Pro		
	85	90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
	100	105

<210> 203
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 203
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 Glu Ile Tyr Arg Asn
20 25 30

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

Phe Asp Thr Ser Val Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 204
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30).. (30)
<223> Ser、Arg、Asn、Gly、Lys、Thr 或 Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (31).. (31)
<223> Asn、Tyr、His、Ser 或 Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (32).. (32)
<223> Phe 或 Tyr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (35).. (35)
<223> Ala、Ser 或 Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (50).. (50)
<223> Thr、Ser 或 Ala



<220>

<221> MOD_RES

<222> (53).. (53)

<223> Ser 或 Gly

<220>

<221> MOD_RES

<222> (56).. (56)

<223> Gly 、 Ser 、 Ala 、 Glu 、 Asp 、 Phe 、 Gln 或 Cys

<220>

<221> MOD_RES

<222> (57).. (57)

<223> Thr 、 Ser 、 Phe 或 Trp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (58).. (58)

<223> Thr 、 Ala 、 Asp 、 Ser 或 Pro

<220>

<221> MOD_RES

<222> (59).. (59)

<223> Tyr 、 Ser 、 Asn 、 Thr 、 Ala 或 Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (60).. (60)

<223> Tyr 或 Ile

<220>

<221> MOD_RES

<222> (61).. (61)

<223> Arg 或 Gly

<220>

<221> MOD_RES

<222> (77).. (77)

<223> Asn 或 Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (78).. (78)

<223> Ser 或 Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (89).. (89)
<223> Glu 或 Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (106).. (106)
<223> Ala 或 Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (107).. (107)
<223> Tyr 、 Phe 或 Ser

<400> 204
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Xaa Ile Ser Xaa Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110



Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 205

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26).. (26)

<223> Ser 或 Thr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27).. (27)

<223> Glu 或 Gln

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28).. (28)

<223> Asp、Glu 或 Thr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30).. (30)

<223> Tyr、Trp、Glu、Asp 或 Asn

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31).. (31)

<223> Ser、Asn、Ile、Thr、Arg、Met 或 Gly

<220>

<221> MOD_RES

<222> (43).. (43)

<223> Ala 或 Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (49).. (49)

<223> Tyr 或 Phe

<220>

<221> MOD_RES

<222> (53).. (53)

<223> Asn、Ser、Asp、Gln、Thr、Val 或 Glu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (71).. (71)

<223> Phe 或 Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (87).. (87)

<223> Tyr 或 Phe

<220>

<221> MOD_RES

<222> (91).. (91)

<223> Tyr 或 Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (92).. (92)

<223> Asn、Asp、Thr 或 Tyr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (93).. (93)

<223> Asn、Trp、Tyr、Ile、Phe 或 Pro

<220>

<221> MOD_RES

<222> (94).. (94)

<223> Tyr 或 Val

<220>

<221> MOD_RES

<222> (97).. (97)

<223> Thr 或 Pro

<400> 205

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 Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Asn
 20 25 30

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

Xaa Asp Thr Asn Xaa Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Xaa Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Xaa Cys Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Pro
 85 90 95

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

<210> 206

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成 6xHis 標籤

<400> 206

His His His His His His
1 5

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100106952

※申請日：100.3.2

※IPC 分類：~~C07K~~; A61K 39/395 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

治療性DLL4結合蛋白

C07K 16/30 (2006.01)

THERAPEUTIC DLL4 BINDING PROTEINS

二、中文發明摘要：

A61P 35/00 (2006.01)

本發明描述 DLL4 結合蛋白，包括抗體、CDR 移植抗體、人類化抗體及其 DLL4 結合片段，以高親和力結合 DLL4 之蛋白質，及中和 DLL4 及/或 VEGF 活性之 DLL4 結合蛋白。DLL4 結合蛋白適用於治療或預防癌症及腫瘤，尤其適用於治療或預防腫瘤血管生成。

三、英文發明摘要：

DLL4 binding proteins are described herein, including antibodies, CDR-grafted antibodies, humanized antibodies, and DLL4 binding fragments thereof, proteins that bind DLL4 with high affinity, and DLL4 binding proteins that neutralize DLL4 and/or VEGF activity. The DLL4 binding proteins are useful for treating or preventing cancers and tumors and especially for treating or preventing tumor angiogenesis.

四、指定代表圖：

- (一)本案指定代表圖為：（無）
- (二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

（無）

七、申請專利範圍：

1. 一種經分離之結合蛋白，其包含能夠結合 DLL4 之抗原

結合域，其中該抗原結合域包含一組六個互補決定區

(CDR)之序列：CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-

L1、CDR-L2 及 CDR-L3，其中該組六個 CDR 之序列

係：

- a) SEQ ID NO:171 之 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3，以及 SEQ ID NO:175 之 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3；
- b) SEQ ID NO:188 之 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3，以及 SEQ ID NO:197 之 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3；
- c) SEQ ID NO:190 之 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3，以及 SEQ ID NO:197 之 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3；
- d) SEQ ID NO:191 之 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3，以及 SEQ ID NO:197 之 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3；
- e) SEQ ID NO:189 之 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3，以及 SEQ ID NO:197 之 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3；
- f) SEQ ID NO:187 之 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3，以及 SEQ ID NO:197 之 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3；
- g) SEQ ID NO:187 之 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3，以及 SEQ ID NO:201 之 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3；
- h) SEQ ID NO:187 之 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3，以及 SEQ ID NO:200 之 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3；

- i) SEQ ID NO:187 之 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3，以
及 SEQ ID NO:199 之 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3；
 - j) SEQ ID NO:187 之 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3，以
及 SEQ ID NO:198 之 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3；
 - k) SEQ ID NO:192 之 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3，以
及 SEQ ID NO:202 之 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3；
 - l) SEQ ID NO:193 之 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3，以
及 SEQ ID NO:203 之 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3；
 - m) SEQ ID NO:194 之 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3，
以及 SEQ ID NO:203 之 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-
L3；
 - n) SEQ ID NO:195 之 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3，以
及 SEQ ID NO:203 之 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3；
或
 - o) SEQ ID NO:196 之 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3，以及
SEQ ID NO:203 之 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3。
2. 如請求項1之結合蛋白，其中CDR-H1係SEQ ID NO:171
之殘基31-35 (NFPMA)，CDR-H2係SEQ ID NO:171之殘
基50-66 (TISSSDGTTYRDSVKG)，及CDR-H3係SEQ ID
NO:171之殘基99-107 (GYYN SPFAY)；CDR-L1係SEQ ID
NO:175之殘基24-34 (RASEDIYSNLA)，CDR-L2係SEQ
ID NO:175之殘基50-56 (DTNNLAD)，及CDR-L3係SEQ

ID NO:175之殘基 89-97 (QQYNNYPPT)。

3. 如請求項1至2中任一項之結合蛋白，其進一步包含人類受體架構序列。
4. 如請求項1之結合蛋白，其中該抗原結合域包含兩個可變域，其中該兩個可變域具有以下胺基酸序列：
 - a) SEQ ID NO:171及SEQ ID NO:175；
 - b) SEQ ID NO:171及SEQ ID NO:176；
 - c) SEQ ID NO:171及SEQ ID NO:177；
 - d) SEQ ID NO:171及SEQ ID NO:178；
 - e) SEQ ID NO:172及SEQ ID NO:175；
 - f) SEQ ID NO:172及SEQ ID NO:176；
 - g) SEQ ID NO:172及SEQ ID NO:177；
 - h) SEQ ID NO:172及SEQ ID NO:178；
 - i) SEQ ID NO:173及SEQ ID NO:175；
 - j) SEQ ID NO:173及SEQ ID NO:176；
 - k) SEQ ID NO:173及SEQ ID NO:177；
 - l) SEQ ID NO:173及SEQ ID NO:178；
 - m) SEQ ID NO:174及SEQ ID NO:175；
 - n) SEQ ID NO:174及SEQ ID NO:176；
 - o) SEQ ID NO:174及SEQ ID NO:177；
 - p) SEQ ID NO:174及SEQ ID NO:178；
 - q) SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:197；
 - r) SEQ ID NO:190及SEQ ID NO:197；
 - s) SEQ ID NO:191及SEQ ID NO:197；

- t) SEQ ID NO:189及SEQ ID NO:197；
- u) SEQ ID NO:187及SEQ ID NO:197；
- v) SEQ ID NO:187及SEQ ID NO:201；
- w) SEQ ID NO:187及SEQ ID NO:200；
- x) SEQ ID NO:187及SEQ ID NO:199；
- y) SEQ ID NO:187及SEQ ID NO:198；
- z) SEQ ID NO:192及SEQ ID NO:202；
- aa) SEQ ID NO:193及SEQ ID NO:203；
- bb) SEQ ID NO:194及SEQ ID NO:203；
- cc) SEQ ID NO:195及SEQ ID NO:203； 或
- dd) SEQ ID NO:196及SEQ ID NO:203。

5. 如請求項3之結合蛋白，其中該人類受體架構序列包含至少一個架構區胺基酸取代在關鍵殘基，該關鍵殘基係選自由以下組成之群：

與CDR相鄰之殘基；

糖基化位點殘基；

稀有殘基；

能夠與人類DLL4相互作用之殘基；

能夠與CDR相互作用之殘基；

典型殘基；

重鏈可變區與輕鏈可變區之間的接觸殘基；

Vernier區內之殘基；及

Chothia定義之可變重鏈CDR1與Kabat定義之第一重鏈架構之間重疊區域中的殘基。

6. 如請求項1、2及4中任一項之結合蛋白，其中該結合蛋白能夠阻斷DLL4與Notch蛋白相互作用。
7. 如請求項1、2及4中任一項之結合蛋白，其中該結合蛋白能夠抑制VEGFR2活性、VEGFR1活性或兩者。
8. 如請求項1、2及4中任一項之結合蛋白，其中該結合蛋白能夠抑制正常血管生成。
9. 如請求項1、2及4中任一項之結合蛋白，其中該結合蛋白對DLL4具有選自由以下組成之群的解離常數(K_D)：最多 10^{-7} M；最多 10^{-8} M；最多 10^{-9} M；最多 10^{-10} M；最多 10^{-11} M；最多 10^{-12} M；及最多 10^{-13} M。
10. 如請求項1、2及4中任一項之結合蛋白，其中該結合蛋白係抗體。
11. 如請求項10之結合蛋白，其中該抗體係選自由以下組成之群：單株抗體、全長四聚體免疫球蛋白、IgG分子、IgG₁分子、嵌合抗體、CDR移植抗體、人類化抗體及親和力成熟抗體。
12. 如請求項11之結合蛋白，其中該抗體係單株抗體。
13. 如請求項10之結合蛋白，其中該抗體包含含有SEQ ID NO:187之重鏈可變域及含有SEQ ID NO:197之輕鏈可變域。
14. 如請求項10之結合蛋白，其中該抗體包含含有SEQ ID NO:171之重鏈可變域及含有SEQ ID NO:175之輕鏈可變域。
15. 如請求項1、2及4中任一項之結合蛋白，其中該結合蛋

白係雙重可變域免疫球蛋白(DVD-Ig)結合蛋白。

16. 如請求項15之結合蛋白，其中該DVD-Ig結合蛋白含有形成對DLL4之功能性目標結合點之可變域，其中該可變域包含SEQ ID NO:187之CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3，以及SEQ ID NO:197之CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3。
17. 如請求項16之結合蛋白，其中該形成對DLL4之功能性目標結合點之可變域包含SEQ ID NO:187及SEQ ID NO:197。
18. 如請求項15之結合蛋白，其中該DVD-Ig結合蛋白含有形成對DLL4之功能性目標結合點之可變域，其中該形成對DLL4之功能性目標結合點之可變域包含SEQ ID NO:171及SEQ ID NO:175。
19. 如請求項1、2及4中任一項之結合蛋白，其係用於降低人類個體中人類DLL4之活性。
20. 如請求項19之結合蛋白，其中該人類個體患有選自由以下組成之群之病症：乳癌、結腸癌、直腸癌、肺癌、口咽癌、咽下癌、食道癌、胃癌、胰臟癌、肝癌、膽囊癌、膽管癌、小腸癌、尿道癌、女性生殖道癌、男性生殖道癌、內分泌腺癌、皮膚癌、血管瘤、黑素瘤、肉瘤、腦腫瘤、神經癌、眼腫瘤、腦脊膜癌、造血惡性病之實體腫瘤、腫瘤轉移、眼部新血管生成、水腫、類風濕性關節炎、動脈粥樣硬化斑、克羅恩氏病(Crohn's disease)、發炎性腸病、難治性腹水、牛皮癬、類肉瘤病、動脈硬化、敗血症、消化性潰瘍、灼傷、胰腺炎、

多囊卵巢病(POD)、子宮內膜異位症、子宮纖維瘤、良性前列腺肥大、T細胞急性淋巴母細胞白血病(T-ALL)、大腦體染色體顯性動脈病伴隨皮質下梗塞及腦白質病(CADASIL)、多發性硬化症(MS)、法洛氏四聯症(tetralogy of Fallot; TOF)、阿拉吉歐症候群(Alagille syndrome; AS)、黃斑變性及年齡相關之黃斑變性疾病，及其他以異常DLL4活性為特徵之血管生成非依賴性及依賴性疾病。

21. 一種構築體，其包含如請求項1至18中任一項之結合蛋白，該構築體進一步包含連接多肽及/或免疫球蛋白恆定域。

22. 如請求項21之構築體，其係選自由以下組成之群：

免疫球蛋白分子；

單株抗體；

嵌合抗體；

CDR移植抗體；

Fab；

Fab'；

F(ab')₂；

Fv；

二硫鍵連接之Fv；

scFv；

單域抗體；

雙功能抗體(diabody)；

- 多特異性抗體；
- 雙重特異性(dual specific)抗體；
- 雙重可變域免疫球蛋白(DVD-Ig)結合蛋白；及
- 雙特異性(bispecific)抗體。
23. 一種結合物(conjugate)，其包含如請求項21或22中任一項之構築體，該結合物進一步包含選自由以下組成之群的藥劑：顯影劑、治療劑、細胞毒性劑及免疫黏著分子。
24. 一種經分離之核酸，其編碼如請求項1至18中任一項之結合蛋白之胺基酸序列。
25. 一種載體，其包含如請求項24之經分離之核酸。
26. 一種宿主細胞，其包含如請求項25之載體。
27. 一種產生結合人類DLL4之結合蛋白的方法，其包含於培養基中，在足以產生結合人類DLL4之結合蛋白的條件下培養如請求項26之宿主細胞。
28. 一種由如請求項27之方法所產生之DLL4結合蛋白。
29. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至18中任一項之結合蛋白及醫藥學上可接受之載劑。
30. 如請求項29之醫藥組合物，其進一步包含至少一種用於治療因DLL4活性而受害之病症的其他藥劑。
31. 如請求項30之醫藥組合物，其中該其他藥劑係選自由以下組成之群：治療劑；顯影劑；抗腫瘤劑；化學治療劑；血管生成抑制劑；抗VEGF抗體；抗EGFR抗體；抗cMet抗體；抗ErbB3抗體；抗HER2抗體；抗CD20抗體；

阿柏西普(aflibercept)；激酶抑制劑；共刺激分子阻斷劑；抗B7.2抗體；CTLA4-Ig；黏著分子阻斷劑；抗E選擇蛋白(selectin)抗體；抗L選擇蛋白抗體；抗細胞激素抗體或其功能片段；抗IL-18抗體；抗TNF抗體；抗IL-6抗體；甲胺喋呤(methotrexate)；皮質類固醇；環孢素(cyclosporin)；雷帕黴素(rapamycin)；FK506；DNA烷化劑；順鉑(cisplatin)；卡鉑(carboplatin)；抗微管蛋白劑；太平洋紫杉醇(paclitaxel)；歐洲紫杉醇(docetaxel)；小紅莓(doxorubicin)；吉西他濱(gemcitabine)；健擇(gemzar)；蒽環黴素(anthracycline)；阿黴素(adriamycin)；拓撲異構酶I抑制劑；拓撲異構酶II抑制劑；5-氟尿嘧啶(5-FU)；甲醯四氫葉酸(leucovorin)；伊立替康(irinotecan)；受體酪胺酸激酶抑制劑、細胞凋亡抑制劑；Bcl2/Bclx抑制劑；埃羅替尼(erlotinib)、吉非替尼(gefitinib)、COX-2抑制劑、塞內昔布(celecoxib)、環孢素；雷帕黴素；可偵測標記或報導分子；TNF拮抗劑；抗風濕藥；肌肉鬆弛劑；麻醉藥(narcotic)；鎮痛劑；麻醉劑(anesthetic)；鎮靜劑；局部麻醉劑；神經肌肉阻斷劑；抗微生物劑；抗牛皮癬劑；皮質類固醇；同化類固醇；紅血球生成素；免疫；免疫球蛋白；免疫抑制劑；生長激素；激素替代藥物；放射性藥物；抗抑鬱劑；抗精神病藥；刺激劑；哮喘藥； β 促效劑；吸入型類固醇；腎上腺素；腎上腺素類似物；細胞激素；及細胞激素拮抗劑。