



(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 I469792 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 01 月 21 日

(21)申請案號：098133164

(51)Int. Cl. : A61K39/395 (2006.01)  
C12P21/08 (2006.01)(30)優先權：2008/10/01 歐洲專利局 08305631.7  
2008/10/01 美國 61/136,772  
2009/04/29 美國 61/173,743(71)申請人：皮爾法伯製藥公司 (法國) PIERRE FABRE MEDICAMENT (FR)  
法國

(72)發明人：科林古爾 哈默爾 克里斯汀 KLINGUER-HAMOUR, CHRISTINE (FR)；格瑞尼爾 卡桑奈 維隆尼格 VERONIQUE GRENIER-CAUSSANEL (FR)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

(56)參考文獻：

WO 2006089141A2

Baribaud, Frédéric, et al., "Antigenically Distinct Conformations of CXCR4", J. Virol. October 2001 vol. 75 no. 19, 8957-8967.

審查人員：蔡付樺

申請專利範圍項數：26 項 圖式數：23 共 192 頁

(54)名稱

新穎之抗 C X C R 4 抗體及其於治療癌症之用途

NOVEL ANTI CXCR4 ANTIBODIES AND THEIR USE FOR THE TREATMENT OF CANCER

(57)摘要

本發明是有關於能夠結合至 CXCR4 還能誘發 CXCR4 同型二聚物和/或異型二聚物的構型改變的一新穎的經分離的抗體、或它的衍生化合物或功能性片段。

更特別地，本發明是有關於 414H5 與 515H7(對 CXCR4 蛋白質具有專一性)，以及它們用於癌症的治療的用途。包含有該等抗體的藥學組成物以及用於該等抗體的選擇的方法亦被涵蓋。

The present invention relates to a novel isolated antibody, or the derived compounds or functional fragments of same, capable of binding to CXCR4 but also of inducing conformational changed of the CXCR4 homodimers and/or heterodimers.

More particularly, the present invention relates to the 414H5 and 515H7 antibodies, specific to the CXCR4 protein, as well as their use for the treatment of cancer. Pharmaceutical compositions composed of such antibodies and a process for the selection of such antibodies are also covered.

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

#### 發明領域

本發明是有關於能夠專一性地(specifically)結合至趨化激素受體(chemokine receptors)(CXCR)的新穎抗體[特別是嵌合(chimeric)以及人類化(humanized)的鼠單株抗體(murine monoclonal antibodies)]以及編碼該等抗體的胺基酸以及核酸序列。從一個方面而言，本發明是有關於能夠專一性地結合至CXCR4並且具有強的抗-腫瘤活性的新穎抗體、衍生化合物或功能性片段(functional fragments)。本發明亦包含該抗體作為一用於癌症的預防和/或治療處理的藥物，以及在有關於癌症診斷(cancer diagnosis)的程序(procedures)或套組(kits)上的用途。最後，本發明包含組成物{包含有該等組合或綴合以其他抗-癌化合物[諸如，抗體、毒素、細胞毒性(cytotoxic)/細胞生長抑制(cytostatic)]的抗體}，以及它們用於預防和/或治療特定癌症的用途。

### 【先前技術】

#### 發明背景

趨化激素(chemokines)是小的、被分泌的勝肽，它控制白血球(leukocytes)沿一配位子的化學梯度(chemical gradient of ligand)[被知曉為趨化激素梯度(chemokine gradient)]的移動(migration)，特別是在免疫反應的期間(Zlotnick A. et al., 2000)。它們是根據NH<sub>2</sub>-端半胱氨酸殘基(cysteine residues)的位置而被區分成二主要的亞家族(CC

以及 CXC)，並且結合至 G 蛋白質偶合受體 (G protein coupled receptors)(它們的 2 個主要的亞家族被命名為 CCR 以及 CXCR)。至今超過 50 種人類趨化激素以及 18 種趨化激素受體 (chemokine receptors) 已經被發現。

許多癌症具有一複雜的趨化激素網路，該趨化激素網路會影響腫瘤的免疫-細胞浸潤 (immune-cell infiltration) 以及腫瘤細胞生長、存活、移動與血管生成 (angiogenesis)。免疫細胞、內皮細胞 (endothelial cells) 與腫瘤細胞本身表現趨化激素受體並且可以針對趨化激素梯度反應。人類癌症生物檢體樣品 (biopsy samples) 與小鼠癌症模型的研究顯示：癌細胞趨化激素-受體的表現是與增高轉移的能力 (metastatic capacity) 有關聯。來自不同癌症類型的惡性細胞具有不同的趨化激素-受體表現的圖譜，但是趨化激素受體 4 (CXCR4) 是最常被發現。從至少 23 種不同的人類上皮 (epithelial)、間葉 (mesenchymal) 以及造血 (haematopoietic) 來源的癌症的細胞表現 CXCR4 受體 (Balkwill F. et al., 2004)。

趨化激素受體 4 [亦被知曉為融合素 (fusin)、CD184、LESTR 或 HUMSTR] 以二種包含有 352 或 360 個胺基酸的異構型 (isoforms) 而存在。在該受體的細胞外部分 (extracellular part) 上的殘基 Asn11 被糖基化 (glycosylated)、殘基 Tyr21 是藉由一硫酸鹽基團的加入而被修飾，以及 Cys 109 與 186 是以二硫鍵 (disulfide bridge) 而被結合 (Juarez J. et al., 2004)。

此受體是藉由不同種類的正常組織、原初 (naïve)、非-

記憶T細胞(non-memory T-cells)、調節T細胞 (regulatory T cells)、B-細胞(B-cells)、嗜中性白血球(neutrophils)、內皮細胞(endothelial cells)、初級單核球(primary monocytes)、樹突細胞(dendritic cells)、自然殺手細胞(Natural Killer cells)、CD34+造血幹細胞(CD34+ hematopoietic stem cells)而被表現並且在心臟、結腸、肺臟、腎臟與腦中呈一低的位準。CXCR4在白血球移動(leukocytes trafficking)、B細胞淋巴細胞形成(B cell lymphopoesis)以及骨髓形成(myelopoiesis)上扮演一關鍵角色。

CXCR4受體被過度-表現在很多的癌症中，癌症包括，但不限於：結腸(Ottaiano A. et al., 2004)、乳房(Kato M. et al., 2003)、前列腺(Sun Y.X. et al., 2003)、肺[小-細胞與非-小 - 細 胞 - 癌 (small-cell-and non-small-cell-carcinoma)(Phillips R.J. et al., 2003)]、卵巢(Scotton C.J. et al., 2002)、胰臟(Koshiba T. et al., 2000)、腎臟、腦(Barbero S et al., 2002)、神經膠母細胞瘤(glioblastoma)以及淋巴瘤(lymphomas)。

至今被描述的CXCR4受體的獨特配位子(ligand)是基質-細胞-衍生因子-1 (Stromal-cell-Derived Factor-1, SDF-1)或CXCL12。SDF-1在淋巴結(lymph node)、骨髓(bone marrow)、肝、肺中是呈大的數量而被分泌以及藉由腎臟、腦與皮膚而達致一較少的程度。CXCR4亦是藉由一拮抗的趨化激素(antagonistic chemokine)[由人類第三型疱疹病毒(herpesvirus type III)所編碼的病毒巨噬細胞發炎性蛋白質

II (the viral macrophage inflammatory protein II, vMIP-II)]而被辨識。

CXCR4/SDF-1軸(CXCR4/SDF-1 axis)在癌症上扮演關鍵角色並且直接地被牽連在導致轉移的移動、侵入中。的確，癌細胞表現CXCR4受體，它們移動以及進入全身性循環(systemic circulation)。接著癌細胞在產生高位準的SDF-1的器官的血管床(vascular beds)中被制動(arrested)，它們在那增生(proliferate)、誘導血管生成以及形成轉移的腫瘤(Murphy PM., 2001)。此軸亦涉及經由活化細胞外-信號-調節激酶(Extracellular-signal-Regulated Kinase, ERK)途徑(Barbero S. et al., 2003)的細胞增生以及血管生成。的確，CXCR4受體以及它的配位子SDF-1明確地藉由刺激VEGF-A(它依次增高CXCR4/SDF-1的表現)表現促進血管生成(Bachelder R.E. et al., 2002)。亦已知曉的是：腫瘤關連性巨噬細胞(tumor associated macrophages, TAM)被累積在腫瘤的缺氧區域(hypoxic areas)以及被刺激會使得與腫瘤細胞合作以及促進血管生成。被觀察到的是：在各種不同的細胞類型(包括TAM)中CXCR4的缺氧選擇性地上升-調節表現(hypoxia up-regulated selectively expression)(Mantovani A. et al., 2004)。最近已經被證實的是：CXCR4/SDF-1軸調節CXCR4+造血幹/祖細胞(CXCR4+ hematopoietic stem/progenitor cells, HSC)的移動(trafficking)/歸巢(homing)以及可以在血管新生(neovascularization)扮演一角。證據指出：除了HSC之外，

功能性 CXCR4 亦被表現在由其它組織而來的幹細胞(stem cells)[組織-定向幹細胞(tissue-committed stem cells, TCSCs)]上，因此 SDF-1 可能在化學吸引(chemottracting)對於器官/組織再生(organ/tissue regeneration)所必需的 CXCR4+ TCSCs (chemottracting CXCR4+ TCSCs) 上扮演一個重要的角色，但是這些 TCSC 亦可能是一癌症發展[癌幹細胞理論(cancer stem cells theory)]的細胞來源。癌症的一幹細胞來源被證實針對人類白血病(leukemia)並且最近針對數個固體腫瘤(solid tumors)(諸如，腦以及乳房)。有數個 CXCR4+ 腫瘤可能衍生自正常的 CXCR4+ 組織/器官-專一性幹細胞(tissue/organ-specific stem cells)的實例，諸如，白血病、腦腫瘤、小細胞肺癌、乳癌、肝母細胞瘤(hepatoblastoma)、卵巢以及子宮頸癌(cervical cancers)(Kucia M. et al., 2005)。

藉由以 CXCR4 受體來干擾標靶癌症轉移被證實在活體內使用一直接針對 CXCR4 受體的單株抗體(monoclonal antibody)(Muller A. et al., 2001)。簡言之，被顯示的是：在 SCID 小鼠體內的一原位乳癌模型(orthotopic breast cancer model)(MDA-MB231)中一直接針對 CXCR4 受體的單株抗體(Mab 173 R&D Systems)顯著地減低淋巴結轉移的數目。另一個研究(Phillips R.J et al., 2003)亦使用針對 SDF-1 的多株抗體(pyclonal antibodies)而顯示 SDF-1/CXCR4 軸在一原位肺癌模型(A549)中的轉移的重要角色，但是在此研究中不論在腫瘤生長上或在血管生成上沒有影響。數個

其它的研究亦描述在活體內使用 CXCR4 的 siRNAs 雙螺旋物 (siRNAs duplexes) (Liang Z. et al., 2005) 或生物穩定的 CXCR4 胜肽拮抗劑 (peptide antagonists) (Tamamura H. et al., 2003) 抑制轉移或在活體內利用 CXCR4 的小分子拮抗劑 [如 AMD 3100 (Rubin J.B. et al., 2003; De Falco V. et al., 2007) 或 Mab (WO2004/059285 A2 號專利)] 抑制腫瘤生長。因此，CXCR4 是一經確認用於癌症的治療標靶。

趨化激素受體 2 (CXCR2) (另一種趨化激素受體) 亦被描述為一在腫瘤學 (oncology) 上令人感到興趣的標靶。的確，CXCR2 在數個腫瘤細胞類型中傳送一自體分泌細胞生長信號 (autocrine cell growth signal) 並且亦可間接地藉由促進血管生成而影響腫瘤生長 (Tanaka T. et al. 2005)。

CXCR2 趨化激素受體含有 360 個胺基酸。它被主要地表現在內皮細胞上並且特別地在血管新生的期間。數個趨化激素結合 CXCR2 受體：CXCL5、-6、-7、IL-8、GRO- $\alpha$ 、- $\beta$  以及 - $\gamma$ ，它們屬於 ERL+ 前 - 血管生成趨化激素 (pro-angiogenic chemokine)。CXCR2 受體與 CXCR4 受體享有序列同源性 (sequence homologies)：37% 序列相同性 (sequence identity) 以及 48% 序列同源性。CXCR2 / 配位子軸涉及數個腫瘤生長機制 [諸如，轉移 (Singh RK. et al., 1994)、細胞增生 (Owen J.D. et al., 1997)] 以及 ERL+ 趨化激素 - 媒介的血管生成 (ERL+ chemokines-mediated angiogenesis) (Strieter R.M. et al., 2004; Romagnani et al., 2004)。最後，腫瘤 - 關連性巨噬細胞以及嗜中性白血球是發

炎-誘導的腫瘤生長(inflammatory-induced tumor growth)的關鍵要素並且趨化激素(諸如，CXCL5、IL-8以及GRO- $\alpha$ )起始嗜中性白血球募集(neutrophils recruitment)。

二聚作用(dimerization)已經出現作為一種一般機制用以調節G-蛋白質-偶合受體(在這些之中是趨化激素受體)的功能(Wang J. and Norcross M., 2008)。對趨化激素結合的反應的同型-以及異型二聚作用(Homo- and heterodimerization)已經被顯示對於藉由許多趨化激素受體起始與改變信號而言是需要的。生長證據支持受體二聚物(receptor dimmers)或寡聚物(oligomers)可能是趨化激素受體的基本功能性單元的觀念。趨化激素受體二聚物在配位子以及趨化激素的不存在下被發現誘發受體二聚物的構形改變(conformational changes)。CXCR4被知曉會形成同型二聚物(homodimers)亦形成異型二聚物(heterodimers)[例如，與 $\delta$ -類鴉片受體( $\delta$ -opioid receptor, DOR)(Hereld D., 2008)或CCR2(Percherancier Y. et al., 2005)]。在後者實例中，衍生自CXCR4的穿膜領域(transmembrane domains)之勝肽藉由阻斷該二聚物的配位子-誘發的構形轉變(ligand-induced conformational transitions)而抑制活化(Percherancier Y. et al., 2005)。另一個研究顯示：在惡性細胞中，CXCR4-TM4勝肽(—CXCR4的穿膜領域的合成勝肽)會降低在CXCR4同型二聚物的原體(protomers)之間的能量轉移(energy transfer)以及抑制SDF-1-誘發的移動與肌動蛋白聚合(actin polymerization)(Wang J. et al., 2006)。最近，亦被描述的

是：CXCR7與CXCR4形成功能性的異型二聚物以及增強SDF-1-誘發的信號(Sierro F. et al., 2007)。其它組成性的異型二聚物(constitutive heterodimers)的實例包括顯示CXCR1和CXCR2交互作用以及形成個別的同型二聚物的研究。對於它們的任一者和另一GPCR [ $\alpha(1A)$ -腎上腺素受體(alpha(1A)-adrenoreceptor)]沒有交互作用被注意到，這表示：CXCR1以及CXCR2交互作用的專一性(specification)(Wilson S. et al., 2005)。

有如先前所被提到的，CXCR4以及CXCR2受體是令人感到興趣的腫瘤標的。干涉這些受體應該以一非常有效率的方式(藉由減低細胞增生、血管生成、腫瘤細胞移動與侵入、由腫瘤所募集的嗜中性白血球與巨噬細胞以及藉由抑制CXCR4癌幹細胞)來抑制腫瘤生長以及轉移。

## 【發明內容】

### 發明概要

本發明的發明方面之一者是為了產生一會誘發CXCR4二聚物的構形改變的小鼠單株抗體。本發明涵蓋一能夠結合與會誘發CXCR4同型二聚物與CXCR4/CXCR2異型二聚物這兩者的構形改變，以及在小鼠異種移植(xenograft)與存活模型(survival models)這兩者中具有強的抗-腫瘤活性的CXCR4 Mab 414H5(或它的片段)。本發明亦涵蓋一能夠結合與會誘發CXCR4同型二聚物與CXCR4/CXCR2異型二聚物這兩者的構形改變，以及具有強的抗-腫瘤活性的CXCR4 Mab 515H7(或它的片段)。在MDA-MB-231異種移植模型中

抗-CXCR4 414H5 Mab抑制腫瘤生長以及在U937模型中增進小鼠存活。它們不僅針對CXCR4同型二聚物上亦針對CXCR4/CXCR2異型二聚物誘發構形改變。這個新穎的性質應該是在癌症療法應用(給予這兩個趨化激素受體用於癌症的重要角色)中令人感到興趣之一。

標靶受體的同型-與異型-二聚物這兩者已經被發現會增進Mab的治療效果。的確，已經被證實的是：例如，一標靶IGF-1R與胰島素/IGF-1雜合(insulin/IGF-1 hybrid)受體這兩者的Mab (h7C10)對在活體內抑制腫瘤的生長要比一Mab單獨地標靶IGF-1R是更有效力的(Pandini G., 2007)。

再者，該抗-CXCR4 Mabs 414H5 以及 515H7 對於 CXCR4是默化拮抗劑(silent antagonists)，它們在活體外分析中不會改變基礎的信號(basal signal)，但是在不同的分析中(GTP $\gamma$ S結合、Camp釋放)抑制由SDF-1所誘發的信號並且亦能夠在活體外抑制SDF-1所誘發的腫瘤細胞增生與移動。

作為局部促效劑(partial agonists)或反向促效劑(inverse agonists)的分子在配位子的不存在下展現出內在活性(intrinsic activity)。這些類型的分子即使在配位子的不存在下穩定化(stabilize)(分別地一高-親合力或一低-親合力狀態)，藉此活化或抑制下游信號級聯(downstream signaling cascades)(Galandin et al., 2007; Kenakin, 2004)。

在414H5與515H7 Mabs的情形下，這些分子作用有如默化拮抗劑，在SDF-1的不存在下沒有任何CXCR4受體的內在活性。相較於局部或反向促效劑而言，此藥理學上的

特徵可能與較少不利副作用(adverse side-effects)有關連，有如針對類鴉片受體配位子的已經被觀察到(Bosier and Hermans, 2007)。的確，414H5與515H7 Mabs這兩者的功能性活性是完全視SDF-1的存在而定並且在組織與器官(其中SDF-1配位子不被表現、被分泌或被血流所提供之)中沒有CXCR4受體活性的調節將被觀察到。因此，相較於其他具有正向或負向效力(positive or negative efficacy)的CXCR4受體之配位子414H5與515H7 Mabs有可能是較少毒性的。此外，默化拮抗劑在藥理學領域中是較少數的種類(Wurch et al., 1999, Kenakin, 2004)。

令人驚訝地，對於首次，發明人已經設法去產生不僅能夠結合至CXCR4還能夠誘發CXCR4同型二聚物和/或異型二聚物的構形改變的抗體。更特別地，本發明的抗體能夠誘發CXCR4同型二聚物以及CXCR4/CXCR2異型二聚物的構形改變。

在下面的說明書中，複數表示的“CXCR4二聚物(CXCR4 dimers)”必須被瞭解為涵蓋CXCR4同型二聚物以及亦涵蓋CXCR4/CXCR2異型二聚物。

在此階段必須被提及的是：該等抗體在前案中不曾被描述。再者，必須被提及的是：該CXCR4/CXCR2異型二聚物的存在是從未被描述的。

本發明的一部分是發現由CXCR4與CXCR2所形成的異型二聚物的存在。

因此，在一個特定方面，本發明針對一包含有或由

CXCR4/CXCR2異型二聚物所構成的經分離的複合物。

較佳地，該 CXCR4/CXCR2 異型二聚物複合物的 CXCR4 化合物部分是選自於由下列所構成之群組的二個人類 CXCR4 異構型 (CXCR4 isoforms) 之一者：

趨化激素 [C-X-C 要素 (C-X-C motif)] 受體 4 異構型 b [智慧人 (Homo sapiens)] 具有如在 Genbank 寄存編號 (accession number) NP\_003458 中所描述的序列辨識編號           ：       29           的       序       列       ：

MEGISIYTSNDNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANF  
NKIFLPTIYSIIFLTGIVGNGLVILVMGYQKKLRSMTD  
KYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFGNFLCK  
AVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRYLAIVHATNSQRPR  
KLLAEKVYYVGWIPALLTIPDFIFANVSEADDRYI  
CDRFYPNDLWVVVFQFQHIMVGLILPGIVILSCYCIII  
SKLSHSKGHQKRKALKTTVILIAFFACWLPYYIGISI  
DSFILLEIIKQGCEFENTVHKWISITEALAFFHCCLNPI  
LYAFLGAKFKTSQAQHALTSVSRGSSLKILSKGKRGG  
HSSVSTESESSSFHSS；

趨化激素 (C-X-C 要素) 受體 4 異構型 a [智慧人] 具有如在 Genbank 寄存編號 NP\_001008540 中所描述的序列辨識      編      號      ：       30      之      序      列      ：

MSIPLPLLQIYTSNDNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREE  
NANFNKIFLPTIYSIIFLTGIVGNGLVILVMGYQKKLR  
SMTDKYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFGN

FLCKAVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRYLAIVHATNS  
 QRPRKLLAEKVVYVGWIPALLTIPDFIFANVSEAD  
 DRYICDRFYPNDLWVVVFQFHIMVGLILPGIVILSC  
 YCIIISKLSHSKGHQKRKALKTTVILIAFFACWLPPYY  
 IGIISIDSFILLEIIKQGCEFENTVHKWISITEALAFFHC  
 CLNPILY AFLGAKFKTSQAQHALTSVSRGSSLKILSKG  
 KRGGHSSVSTESESSSFHSS ;

一與這些具有序列辨識編號：29或30的b或a異構型之一者具有至少95%相同性(identity)的選擇性轉錄的剪接變異體(alternate transcriptional splice variant)或它的天然變異體(natural variant thereof)；以及

一它能夠被它的天然的配位子基質細胞-衍生因子-1(SDF-1)專一性地辨識的片段並且較佳地具有至少100、150與200個胺基酸長度。

較佳地，該CXCR4/CXCR2異型二聚物複合物的CXCR2化合物部分是選自於下列所構成之群組：

介白素8受體β (interleukin 8 receptor beta)[智慧人]具有如在Genbank寄存編號NP\_001548中所描述的序列  
 辨 識 編 號 : 31 的 序 列 :

MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSSTLPPFLLDA  
 APCEPESLEINKYFVVIYALVFLLSLLGNSLVMLVIL  
 YSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPPIWAASKVN  
 GWIFGTFLCKVVSLLKEVNFYSGILLACISVDRYLA  
 IVHATRTLTQKRYLVKFICLSIWGLSLLLALPVLLFRR

TVYSSNVSPACYEDMGNNTANWRMLLRILPQSF<sup>GFI</sup>  
VPLLIMLFCYGFTLRTLFKAHM<sup>G</sup>QKHRAMRVIFAVV  
LIFLLCWLPYNLVLLADTLMRTQVIQETCERRNHID  
RALDATEILGILHSCLNPLIYAFIGQKFRHGLLKILAI  
HGLISKDSL<sup>P</sup>KDSRPSFVGSSSGHTSTTL；

一與該具有序列辨識編號：31的介白素8受體 $\beta$ 具有至少95%相同性的選擇性轉錄的剪接變異體或它的天然變異體；以及

一它能夠被它的天然的配位子IL-8專一性地辨識的片段並且較佳地具有至少100、150與200胺基酸長度。

在此特定方面，本發明亦包含有一編碼一包含有該CXCR4/CXCR2異型二聚物複合物的多肽(polypeptide)的經分離的RNA或DNA。

本發明進一步包含有一編碼該CXCR4/CXCR2異型二聚物複合物的核酸建構物(nucleic construct)，較佳地一表現載體(expression vector)[諸如，一質體(plasmid)]。

本發明進一步包含有一組成物，該組成物包含有至少一編碼該CXCR4/CXCR2異型二聚物複合物的CXCR4部分的核酸建構物[較佳地是一表現載體(諸如，一質體)]，以及一編碼該CXCR4/CXCR2異型二聚物複合物之CXCR2部分的第二建構物[較佳地是一表現載體(諸如，一質體)]。

在此方面，本發明進一步包含有一用於製備一表現該CXCR4/CXCR2異型二聚物複合物的重組型宿主細胞(recombinant host cell)的方法，其中該方法包含有一轉形

(transforming)該宿主細胞的步驟：

- a) 具有一編碼該CXCR4/CXCR2異型二聚物複合物的核酸建構物[較佳地是一表現載體(諸如，一質體)]；或
- b) 具有至少一編碼該CXCR4/CXCR2異型二聚物複合物的CXCR4部分的核酸建構物[較佳地是一表現載體(諸如，一質體)]，以及一編碼該CXCR4/CXCR2異型二聚物複合物的CXCR2部分的第二建構物[較佳地是一表現載體(諸如，一質體)]。

在一個較佳具體例中，該宿主細胞是一真核細胞(eukaryotic cell)，諸如，一哺乳動物細胞(mammalian cell)。

在一個較佳具體例中，該編碼CXCR4/CXCR2異型二聚物複合物的核酸建構物(等)亦編碼一締合[特別地藉由共價偶合(covalent coupling)]以CXCR4序列的第一標記(first marker)(諸如，luc標記)，以及締合[特別地藉由共價偶合]以CXCR2序列的第二標記(諸如，GFP標記)(亦即，用於BRET分析)。

本發明亦包含有一用於選擇一具有一抗-癌症活性或它可被使用來製備一用於治療癌症的組成物的化合物的方法，其特徵在於該方法包含有下列步驟：

- a) 令本發明的一表現該CXCR4/CXCR2異型二聚物複合物的重組型宿主細胞與要被測試的化合物接觸；以及
- b) 測定此化合物是否在重組型宿主細胞中能夠調節(modulating)(較佳地是抑制)該CXCR4/CXCR2異型二

聚物複合物的活性。

## 【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

在第一個方面，本發明的一標的是一依據本發明來產生以及選擇抗體的方法。

更特別地，本發明是有關於一用於選擇一能夠去抑制 CXCR4 之配位子 - 依賴的與配位子 - 獨立的活化 (ligand-dependent and ligand-independent activation of CXCR4) 的抗 CXCR4 抗體、或它的功能性片段或衍生物之一者的方法，該方法包含有下列步驟：

- i) 篩選被產生的抗體並且選擇能夠專一性地結合至 CXCR4 以及亦調節 CXCR4 的活化的抗體；
- ii) 測試步驟 i) 的該等經選擇的抗體並且選擇能夠誘發 CXCR4 同型二聚物構形改變的抗體，並且接而
- iii) 測試步驟 ii) 的該等經選擇的抗體並且選擇能夠誘發 CXCR4/CXCR2 異型二聚物構形改變的抗體。

就“調節 (to modulate)”的表示而言，必須被瞭解是一增高或一抑制。較佳地，本發明的經選擇的抗體必須抑制 CXCR4 活化。

有如先前所解釋的，CXCR4 二聚物構形改變的誘發是本發明作為該等抗體將對於一較大族群的病人呈現出一真實利益的一個首要的方面。

該抗體的產生可以藉由熟悉此技藝者所熟知的任何方法而被進行，諸如，例如，一骨髓瘤細胞 (myeloma cell) 與

一來自可相容於該所選擇的骨髓瘤細胞的經免疫接種的(immunized)小鼠或其他物種的脾臟細胞(spleen cells)的融合(fusion)(Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497)。

該經免疫接種的動物可包括具有人類免疫球蛋白基因座(immunoglobulin loci)的基因轉殖小鼠(transgenic mice)，該基因轉殖小鼠接而直接地生產人類抗體。另一個可能的具體例在於使用噬菌體呈現法技術(phage display technologies)去篩選存庫(libraries)。

該篩選步驟i)可以藉由熟悉此技藝者所熟知的任何方法而被進行。作為非限制性實例，可以被提及的是：ELISA、BIAcore、免疫組織化學法(immunohistochemistry)、FACS分析以及功能性篩選(functional screens)。一較佳的方法在於一藉由FACS分析在CXCR4轉染物(transfected)上以及在至少一腫瘤細胞株上的篩選，俾以確認所生產的抗體亦將能夠辨識在腫瘤細胞上的天然的受體(native receptor)。該方法將在下列的實施例中被更詳細地描述。

就“調節CXCR4活化(to modulate CXCR4 activation)”的表示而言，所意欲的是：調節至少在下面的實施例4、5、7以及13中所描述的活性之一者：

較佳地調節：

配位子SDF-1針對受體CXCR4在細胞膜(cellular membranes)上的專一性結合(參見實施例4)，特別地藉由在穩定地表現人類野生型CXCR4受體的真核的經轉形的細胞膜(諸如CHO-K1膜)上的競爭(competition)；

GTP $\gamma$ S針對受體CXCR4在細胞膜上的專一性結合(參見實施例5)，特別地是在真核的經轉形的細胞膜上，諸如NIH-3T3細胞，穩定地且基本地表現野生型CXCR4受體膜(; CXCR4-調節的抑制cAMP的生成(參見實施例7)；以及CXCR4受體-調節的細胞內鈣池(intracellular calcium stores)的調動(mobilization)(參見實施例13)。

更佳地，至少這些活性之一者的調節是抑制該活性。

在本發明的選擇步驟ii)與iii)的一個較佳實施例中，該步驟 ii) 與 iii) 在 於 藉 由 分 別 地 針 對 表 現 CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP 與 CXCR4-Rluc/CXCR2-YFP 的細胞的BRET分析來評估抗體，並且選擇能夠抑制至少40%，較佳地45%、50%、55%以及最佳地60%的BRET信號的抗體。

BRET技術是一種被知曉為蛋白質二聚作用的技術的代表(Angers et al., PNAS, 2000, 97:3684-89)。

被使用在該方法的步驟ii)與iii)的BRET技術是熟悉此技藝的人士所熟知並且將在下列實施例中被詳細說明。更特別地，BRET [生物發光共振能量轉移(Bioluminescence Resonance Energy Transfer)]是一發生在一生物發光供體[bioluminescent donor][水母螢光素酶(Renilla Luciferase, Rluc)]與一螢光受體(fluorescent acceptor){—GFP [綠色螢光蛋白質(Green Fluorescent Protein)]或YFP [黃色螢光蛋白質(Yellow fluorescent protein)]的突變體(mutant)}之間的非-輻射的能量轉移(non-radiative energy transfer)。在本案中，

EYFP [增強的黃色螢光蛋白質(Enhanced Yellow Fluorescent Protein)]被使用。轉移的效力視在該供體與受體(acceptor)之間的位向(orientation)與距離(distance)而定。接著，該能量的轉移可以發生在僅是兩個分子是呈接近的鄰近性(in close proximity)(1-10 nm)時。這種性質被用來進行蛋白質-蛋白質交互作用分析法(protein-protein interaction assays)。的確，為了要研究兩個搭檔間的交互作用，第一者被遺傳地融合至水母螢光素酶並且第二者被融合至GFP的黃色變異體。融合蛋白質(fusion proteins)一般是，但非必須，被表現在哺乳動物細胞中。在它的膜可通透性受質(membrane permeable substrate)[腔腸素(coelenterazine)]的存在下，Rluc發射出藍光。若GFP突變體是要比離Rluc的10 nm還近，一能量轉移可以發生並且額外的黃色信號可被偵測到。BRET信號是被測定為在由受體所發射出的光以及由該供體所發射出的光之間的比值。因此當該兩融合蛋白質被帶到鄰近性或若一構形改變使Rluc與GFP突變體較接近時，BRET信號將會增高。

若BRET分析在於一個較佳具體例中，任何熟悉此技藝的人所熟知的方法可以被用來測量CXCR4二聚物的構形改變。沒有限制，下列技術可以被提及：FRET [螢光共振能量轉移(Fluorescence Resonance Energy Transfer)]、HTRF [均勻時間分辨螢光(Homogenous Time resolved Fluorescence)]、FLIM [螢光壽命成像顯微術(Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy)]或SW-FCCS [單波長螢光交

叉相關光譜學 (single wavelength fluorescence cross-correlation spectroscopy)]。

其它傳統的技術亦可被使用，諸如，共-免疫沉澱 (Co-immunoprecipitation)、 $\alpha$ 篩選(Alpha screen)、化學交聯 (Chemical cross-linking)、雙-雜交(Double-Hybrid)、親合性層析法(Affinity Chromatography)、ELISA或遠端西方墨點法(Far western blot)。

在依據本發明的方法的一個特別的方面，步驟ii)在於在表現 CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP 這兩者的細胞上藉由 BRET 分析評估抗體，以及選擇能夠抑制至少 40% 的 BRET 信號的抗體。

在依據本發明的方法的另一個特別的方面，步驟iii)在於在表現 CXCR4-RLuc/CXCR2-YFP 這兩者的細胞上藉由 BRET 分析評估抗體，以及選擇能夠抑制至少 40% 的 BRET 信號之抗體。

在第二個方面，本發明的一個標的是一經分離的抗體、或它的功能性片段或者衍生物之一者，是藉由該方法而被獲得。該抗體或它的功能性片段或衍生物之一者是能夠專一性地結合至該人類 CXCR4 並且再者，如果必要的話，較佳地能夠抑制它的配位子的天然接附(natural attachment)，該抗體亦能夠去誘發 CXCR4 二聚物的構形改變。

語句“功能性片段與衍生物(functional fragments and derivatives)”將在本說明書之後被詳細地定義。

在此必須被瞭解的是：本發明無關於呈天然形式的抗體，換言之，它們不存在它們天然的環境中但是它們已經可以被分離或從天然來源中藉由純化而被獲得，或其他藉由基因重組、或藉由化學合成而被獲得，並且它們接而可以含有如將再進一步被描述的非天然的胺基酸。

更特別地，依據本發明的另一個方面，其請求一抗體、或它的功能性片段或衍生物之一者，該抗體的特徵在於它包含有至少一互補決定區域(complementarity determining regions, CDR)，該互補決定區域選自於包含有序列辨識編號：1至12之胺基酸序列的CDRs。

更特別地，依據本發明的另一個方面，其請求一抗體、或它的功能性片段或衍生物之一者，該抗體的特徵在於它包含有至少一互補決定區域(CDR)，該互補決定區域選自於包含有序列辨識編號：2、5或40至49之胺基酸序列的CDRs。

依據一個第一方面，本發明是有關於一經分離的抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段，包含有至少一選自於序列辨識編號：1、2、3、4、5或6之序列的CDRs的CDR，或者至少一序列在最佳化排列(optimal alignment)之後與序列辨識編號：1、2、3、4、5或6的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%以及98%的相同性(identity)的CDR。

依據一個另一個方面，本發明是有關於一經分離的抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段，包含有至少一選自於序列辨識編號：40、2、41、42、5或43之序列的CDRs的CDR，或者至少一序列在最佳化排列之後與序列辨識編

號：40、2、41、42、5或43的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%以及98%的相同性的CDR。

一抗體的一“功能性片段(functional fragment)”特別地意指一抗體片段，諸如，片段Fv、scFv [sc=簡單鏈(simple chain)]、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、scFv-Fc或雙鏈抗體(diabodies)，或任何半衰期(half-life)已被增高的片段。該等功能性片段將在後面的本詳細說明中被詳細地描述。

一抗體的一“衍生化合物(derived compound)”或“衍生物(derivative)”特別地意指一由一胜肽支架(peptide scaffold)以及為了保存它辨識CXCR4的能力的該原始抗體的CDRs之至少一者所組成的結合蛋白質(binding protein)。熟悉此技藝的人士所熟知的衍生化合物將在後面的本詳細說明中被更詳細地描述。

更佳地，本發明包含有該等抗體、它們的衍生化合物或它們的功能性片段，依據本發明，特別是嵌合的或人類化的，它們是藉由基因重組或化學合成而被獲得。

依據一個較佳具體例，依據本發明的抗體，或它的衍生化合物或功能性片段，其特徵在於它由一單株抗體所構成。

“單株抗體(Monoclonal antibody)”被瞭解為意指一由一幾乎均質性抗體族群(nearly homogeneous antibody population)而產生的抗體。更特別地，除了一些被發現呈最小比例的可能天然-存在的突變(naturally-occurring mutations)之外，一族群的個別的抗體是相同的。換言之，

一單株抗體由一由一單一細胞選殖株(single cell clone)[例如，一融合瘤(hybridoma)、一被轉染(transfected)以一編碼該均質性抗體的DNA分子的真核宿主細胞、一被轉染以一編碼該均質性抗體的DNA分子的原核宿主細胞等等]的生長而產生的均質性抗體所構成，並且一般而言特徵在於一個以及僅一類型與亞型的的重鏈，以及只有一種類型的輕鏈。單株抗體是高度地專一性並且直接針對一單一抗原(single antigen)。此外，相較於多株抗體的製備，單株抗體典型地包含各種不同的直接針對各種不同的決定位(determinants)、或抗原決定位(epitopes)的抗體，各個單株抗體是直接針對抗原的一單一抗原決定位。

在此必須被瞭解的是：本發明無關於呈天然形式的抗體，亦即，它們不是從它們的天然環境中被取得，而是藉由從天然來源中的純化而被分離出或被獲得，或者藉由基因重組或化學合成而被獲得，並且因此它們可以攜帶有如下面將被描述的非天然胺基酸。

更特別地，依據本發明的一個較佳具體例，該抗體、或它的衍生化合物或功能性片段，其特徵在於它包含有一輕鏈(light chain)，該輕鏈包含有至少一從序列辨識編號：1、2或3之序列的CDRs之中所選出的CDR，或者至少一序列在最佳化排列之後與序列辨識編號：1、2或3的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%以及98%相同性的CDR；或者它包含有一重鏈(heavy chain)，該重鏈包含有至少一從序列辨識編號：4、5或6之序列的CDRs之中所選出的CDR，

或者至少一序列在最佳化排列之後與序列辨識編號：4、5或6的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%以及98%相同性的CDR。

依據另一個具體例，本發明的抗體、或它們的衍生化合物或功能性片段之一者，其特徵在於它們包含有一輕鏈，該輕鏈包含有序列辨識編號：1、2或3之序列的三個CDRs的至少之一者，或者至少一在最佳化排列之後與序列辨識編號：1、2或3的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%以及98%相同性的序列。

在一個較佳的方式中，本發明的抗體、或它們的衍生化合物或功能性片段之一者，其特徵在於它們包含有一輕鏈，該輕鏈包含有下列三個CDRs，分別是：CDR-L1、CDR-L2以及CDR-L3，其中：

CDR-L1包含有序列辨識編號：1或9的序列，或者一在最佳化排列之後與序列辨識編號：1或9的序列具有至少80%相同性的序列；

CDR-L2包含有序列辨識編號：2或10的序列，或者一在最佳化排列之後與序列辨識編號：2或10的序列具有至少80%相同性的序列；以及

CDR-L3包含有序列辨識編號：3的序列，或者一在最佳化排列之後與序列辨識編號：3的序列具有至少80%相同性的序列。

依據一個特別的具體例，抗體、或它們的衍生化合物或功能性片段之一者，其特徵在於它們包含有一輕鏈，該

輕鏈包含有該序列辨識編號：1之序列的CDR-L1、該序列辨識編號：2之序列的CDR-L2以及該序列辨識編號：3之序列的CDR-L3。

依據另一個特別的具體例，抗體、或它們的衍生的化合物或功能性片段之一者，其特徵在於它們包含有一輕鏈，該輕鏈包含有該序列辨識編號：9之序列的CDR-L1、該序列辨識編號：10之序列的CDR-L2以及該序列辨識編號：3之序列的CDR-L3。

更特別地，本發明的抗體、或它們的衍生的化合物或功能性片段之一者，其特徵在於它們包含有一重鏈，該重鏈包含有序列辨識編號：4、5或6之序列的三個CDRs的至少之一者或者至少一在最佳化排列之後與序列辨識編號：4、5或6的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%以及98%相同性的序列。

甚至更特別地，本發明的該等抗體、或它們的衍生化合物或功能性片段之一者，其特徵在於它們包含有一重鏈，該重鏈包含有下列三個CDRs，分別是：CDR-H1、CDR-H2以及CDR-H3，其中：

CDR-H1包含有序列辨識編號：4、7或11的序列，或者一在最佳化排列之後與序列辨識編號：4、7或11的序列具有至少80%相同性的序列；

CDR-H2包含有序列辨識編號：5或12的序列，或者一在最佳化排列之後與序列辨識編號：5或12的序列具有至少80%相同性的序列；以及

CDR-H3包含有序列辨識編號：6或8的序列，或者一在最佳化排列之後與序列辨識編號：6或8的序列具有至少80%相同性的序列。

依據一個特別的具體例，抗體、或它們的衍生化合物或功能性片段之一者，其特徵在於它們包含有一重鏈，該重鏈包含有該序列辨識編號：7之序列的CDR-H1、該序列辨識編號：5之序列的CDR-H2以及該序列辨識編號：8之序列的CDR-H3。

依據另一個特別的具體例，抗體、或它們的衍生化合物或功能性片段之一者，其特徵在於它們包含有一重鏈，該重鏈包含有該序列辨識編號：11之序列的CDR-H1、該序列辨識編號：12之序列的CDR-H12以及該序列辨識編號：6之序列的CDR-H3。

更特別地，依據本發明的一個較佳具體例，該抗體、或它的衍生化合物或功能性片段之一者，其特徵在於它包含有一輕鏈，該輕鏈包含有至少一從序列辨識編號：40、2或41之序列的CDRs之中所選出的CDR，或者至少一在最佳化排列之後與序列辨識編號：40、2或41的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%以及98%相同性的序列；或者它包含有一重鏈，該重鏈包含有至少一從序列辨識編號：42、5或43之序列的CDRs之中所選出的CDR，或者至少一在最佳化排列之後與序列辨識編號：42、5或43的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%以及98%相同性的序列。

依據另一個具體例，本發明的抗體、或它們的衍生化合物或功能性片段之一者，其特徵在於它們包含有一輕鏈，該輕鏈包含有序列辨識編號：40、2或41之序列的三個CDRs的至少之一者，或者至少一在最佳化排列之後與序列辨識編號：40、2或41的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%以及98%相同性的序列。

在一個較佳的方式中，本發明的抗體，或它們的衍生化合物或功能性片段之一者，其特徵在於它們包含有一輕鏈，該輕鏈包含有下列三個CDRs，分別是：CDR-L1、CDR-L2以及CDR-L3，其中：

CDR-L1包含有序列辨識編號：40或46的序列，或者一在最佳化排列之後與序列辨識編號：40或46的序列具有至少80%相同性的序列；

CDR-L2包含有序列辨識編號：2或47的序列，或者一在最佳化排列之後與序列辨識編號：2或47的序列具有至少80%相同性的序列；以及

CDR-L3包含有序列辨識編號：41的序列，或者一在最佳化排列之後與序列辨識編號：41的序列具有至少80%相同性的序列。

依據一個特別的具體例，抗體、或它們的衍生化合物或功能性片段之一者，其特徵在於它們包含有一輕鏈，該輕鏈包含有該序列辨識編號：40之序列的CDR-L1、該序列辨識編號：2之序列的CDR-L2以及該序列辨識編號：41之序列的CDR-L3。

依據另一個特別的具體例，抗體、或它們的衍生化合物或功能性片段之一者，其特徵在於它們包含有一輕鏈，該輕鏈包含有該序列辨識編號：46之序列的CDR-L1、該序列辨識編號：47之序列的CDR-L2以及該序列辨識編號：41之序列的CDR-L3。

更特別地，本發明的抗體、或它們的衍生化合物或功能性片段之一者，其特徵在於它們包含有一重鏈，該重鏈包含有序列辨識編號：42、5或43之序列的三個CDRs的至少之一者，或者至少一在最佳化排列之後與序列辨識編號：42、5或43的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%以及98%相同性的序列。

甚至更特別地，本發明的抗體、或它們的衍生化合物或功能性片段之一者，其特徵在於它們包含有一重鏈，該重鏈包含有下列三個CDRs，分別是：CDR-H1、CDR-H2以及CDR-H3，其中：

CDR-H1包含有序列辨識編號：42、44或48的序列，或者一在最佳化排列之後與序列辨識編號：42、44或48的序列具有至少80%相同性的序列；

CDR-H2包含有序列辨識編號：5或49的序列，或者一在最佳化排列之後與序列辨識編號：5或49的序列具有至少80%相同性的序列；以及

CDR-H3包含有序列辨識編號：45或43的序列，或者一在最佳化排列之後與序列辨識編號：45或43的序列具有至少80%相同性的序列。

依據一個特別的具體例，抗體、或它們的衍生化合物或功能性片段之一者，其特徵在於它們包含有一重鏈，該重鏈包含有該序列辨識編號：44之序列的CDR-H1、該序列辨識編號：5之序列的CDR-H2以及該序列辨識編號：45之序列的CDR-H3。

依據另一個特別的具體例，抗體、或它們的衍生化合物或功能性片段之一者，其特徵在於它們包含有一重鏈，該重鏈包含有該序列辨識編號：48之序列的CDR-H1、該序列辨識編號：49之序列的CDR-H2以及該序列辨識編號：43之序列的CDR-H3。

在本詳細說明中，術語“多肽(polypeptides)”、“多肽序列(polypeptide sequences)”、“胜肽(peptides)”以及“被接附至抗體化合物或至它們的序列的蛋白質(proteins attached to antibody compounds or to their sequences)”是可交換使用的。

在此必須被瞭解的是：本發明無關於呈天然形式的抗體，亦即，它們不是從它們的天然環境中被取得，而是藉由從天然來源藉中的純化而被分離出或被獲得，或者藉由基因重組或化學合成而被獲得，並且因此它們可以攜帶有如下面將被描述的非天然胺基酸。

在一個第一具體例中，互補決定區域、或CDR，意指有如由Kabat等人(Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 5<sup>th</sup> Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, and later editions)所定義的

免疫球蛋白之重與輕鏈的高變異性區域(hypervariable regions)。有三個重-鏈CDRs以及三個輕-鏈CDRs。在此，術語“CDR”以及“CDRs”被用來表示(視例子而定)一或多個、或甚至全部的區域，該等區域含有大多數負責用於針對它辨識的抗原或抗原決定位的抗體結合親合性的胺基酸殘基。

在一個第二具體例中，就CDR區域或CDR(等)而言，其意欲要表示有如由IMGT所定義的免疫球蛋白之重與輕鏈的高變異性區域。

IMGT唯一編號(IMGT unique numbering)已經被定義無論抗原受體、鏈的類型、或物種要用來比較變異性領域(variable domains)[Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]。在IMGT唯一編號中，守恆的胺基酸(conserved amino acids)永遠具有相同的位置，例如半胱胺酸23 (第1-CYS)、色胺酸41 (tryptophan 41)(CONSERVED-TRP)、疏水性胺基酸89 (hydrophobic amino acid 89)、半胱胺酸104 (第2-CYS)、苯丙胺酸(phenylalanine)或色胺酸118 (J-PHE or J-TRP)。該IMGT唯一編號提供一標準化的定限(standardized delimitation)的框架區域(framework regions)(FR1-IMGT：位置1至26、FR2-IMGT：39至55、FR3-IMGT：66至104與FR4-IMGT：

118至128)以及互補決定區域：CDR1-IMGT：27至38、CDR2-IMGT：56至65與CDR3-IMGT：105至117。當間隙(gaps)代表未被佔用的位置(unoccupied positions)時，該CDR-IMGT長度(被表示在括號間以及藉由點被分開，例如，[8.8.13])成為重要的資訊。該IMGT唯一編號被使用在2D圖的表示(2D graphical representations)，被命名為IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)]，以及在3D結構的IMGT/3D結構-DB中[Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)]。

三個重鏈CDRs與三個輕鏈CDRs存在。依據該例子，術語CDR以及CDRs在此被使用為了表示，這些區域之一者或數個，或甚至全部的區域，該等區域含有多數的胺基酸殘基負責用以由該抗體對於其辨識的該抗原或抗原決定位的親合性的結合。

為更表清楚，要被瞭解的是：在下列的描述中，以及更特別地在表2以及3中，CDRs將藉由IMGT編號(IMGT numbering)、Kabat編號(Kabat numbering)以及藉由一般編號(common numbering)而被定義。

一般編號重新群組各個CDR的殘基部份，該等殘基是共同於如藉由IMGT以及Kabat編號系統而被定義的CDRs。

IMGT編號系統依據如上面所定義的IMGT系統定義該

等CDRs，而Kabat編號系統依據如上面所定義的Kabat編號系統定義該等CDRs。

更特別地，該CDR-L1由在一般與IMGT編號系統中的序列辨識編號：1 (**QSLYNSRTRKNY**)以及在Kabat編號系統中的序列辨識編號：9 (**KSSQSLYNSRTRKNYLA**)所構成。

關於該CDR-L2，它由在一般與IMGT編號系統中的序列辨識編號：2 (**WAS**)以及在Kabat編號系統中的序列辨識編號：10 (**WASTRES**)所構成。

該CDR-L3由針對三個編號系統之每一者的序列辨識編號：3 (**KQSYNLRT**)所構成。

針對該重鏈，該CDR-H1由在一般編號系統中的序列辨識編號：4 (**TDYY**)、在IMGT編號系統中的序列辨識編號：7 (**GFTFTDYY**)以及在kabat編號系統中的序列辨識編號：11 (**TDYYMS**)所構成。

該CDR-H2由在一般與IMGT編號系統中的序列辨識編號：5 (**IRNKANGYTT**)以及在kabat編號系統中的序列辨識編號：12 (**FIRNKANGYTTEYSASVKG**)所構成。

最後，該CDR-H3由在一般與kabat編號系統中的序列辨識編號：6 (**DIPGFAY**)，而它由在IMGT編號系統中的序列辨識編號：8 (**ARDIPGFAY**)所構成。

更特別地，該CDR-L1由在一般與IMGT編號系統中的序列辨識編號：40 (**QSLFNSRTRKNY**)以及在Kabat編號系統中的序列辨識編號：46 (**KSSQSLFNSRTRKNYLA**)所構成。

成。

關於該CDR-L2，它由在一般與IMGT編號系統中的序列辨識編號：2 (**WAS**)以及在Kabat編號系統中的序列辨識編號：47 (**WASARDS**)所構成。

該CDR-L3由針對三個編號系統之每一者的序列辨識編號：41 (**MQSFNLRT**)所構成。

就重鏈而言，該CDR-H1由在一般編號系統中的序列辨識編號：42 (**DNY**)、在IMGT編號系統中的序列辨識編號：44 (**GFTFTDNY**)以及在kabat編號系統中的序列辨識編號：48 (**DNYMS**)所構成。

該CDR-H2由在一般與IMGT編號系統中的序列辨識編號：5 (**IRNKANGYTT**)以及在kabat編號系統中的序列辨識編號：49 (**FIRNKANGYTTDYSASVRG**)所構成。

最後，該CDR-H3由在一般與kabat編號系統中的序列辨識編號：43 (**DVGSNYFDY**)所構成，而該序列辨識編號43由在IMGT編號系統中的序列辨識編號：45 (**ARDVGSNYFDY**)所構成。

就本發明的意義上而言，在核酸或胺基酸的兩個序列之間的“百分比相同性(percentage identity)”意指在兩個要被比對的序列之間的相同核苷酸或胺基酸殘基在最佳化排列之後而被獲得的百分比，該百分比純粹是統計的並且在兩個序列之間的差異是沿著它們的長度隨機地分佈。兩個核酸或胺基酸序列的比對傳統上是在已經最適地排列它們之後藉由比對該等序列而被進行，該比對是能夠藉由節段

(segment)或藉由使用一“排列視窗(alignment window)”而被進行。用於比對序列的最佳化排列除了藉由人力來比對之外，可以藉由史密斯與華特曼的局部同源性演算法(local homology algorithm of Smith and Waterman)(1981)[Ad. App. Math. 2:482]的方式、藉由倪德曼與王氏的局部同源性演算法 (Needleman and Wunsch algorithm of Smith and Waterman)(1970)[J. Mol. Biol. 48:443]的方式、藉由皮爾森與李普曼的相似性搜尋(similarity search method of Pearson and Lipman)(1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444]的方式，或者藉由使用這些演算法(在Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI 中的GAP、BESTFIT、FASTA以及TFASTA，或藉由比對軟體BLAST NR或BLAST P)的電腦軟體的方式而被進行。

在兩個核酸或胺基酸序列之間的百分比相同性是藉由比對兩個經最佳化-排列的序列而被決定，其中相較於在兩個序列之間的最佳化排列的參考序列(reference sequence)，要比對的核酸或胺基酸序列中可以具有加入(additions)或刪除(deletions)。百分比相同性藉由決定在兩個序列之間，較佳地在兩個完全序列(complete sequence)之間有關於胺基酸核苷酸或殘基上是相同的位置的數量而被計算，相同位置的數量除以在比對視窗內位置的總數量並且將結果乘以100，俾以獲得在兩個序列之間的百分比相同性。

例如，在位址<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>上可取得的BLAST程式：“BLAST 2 sequences” (Tatusova et al., “Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”, FEMS Microbiol., 1999, Lett. 174:247–250)，可以以系統內定參數(default parameters)[特別是針對參數“開放間隙補償(open gap penalty)”：5，以及“延伸間隙補償(extension gap penalty)”：2；被選擇的矩陣(matrix)，例如，由該程式所推薦的“BLOSUM 62”矩陣]被使用；在該用來比對的兩個序列之間的百分比相同性直接是藉由該程式而被計算。

對於與一參考胺基酸序列展現出至少80%、較佳地85%、90%、95%與98%相同性的胺基酸序列而言，較佳的實例包含有那些含有參考序列、特定的修飾(modifications)[特別是一至少一胺基酸的刪除、加入或取代(substitution)、截斷(truncation)或延伸(extension)]者。在一或多個連續的或非-連續的胺基酸(consecutive or non-consecutive amino acids)的取代的例子中，較佳的取代是其中被取代的胺基酸被置換以“等效(equivalent)”胺基酸。在此，語句“等效胺基酸(equivalent amino acids)”意指表示任何可能以結構胺基酸(structural amino acids)之一者來取代的胺基酸，然而沒有更改對應抗體的以及那些下面所定義的特定實例的生物活性。

等效胺基酸可以針對它們的結構同源性(structural homology)與它們要被取代成的胺基酸或者針對可能要被

產生的各種不同的抗體之間的生物活性的比較測試 (comparative tests) 的結果而被決定。

有如一非-限制性實例，下面的表1彙整出可以被進行而不會導致經對應修飾的抗體的生物活性的一顯著的修飾的可能的取代；在相同的條件下，反向取代 (inverse substitution) 是當然可能的。

表 1

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

那些熟悉此技藝者所熟知的是：在此技藝的現行狀態中，在該6個CDRs之間的最大變異性 (variability) (長度以及組成) 被發現是在三個重-鏈CDRs上，並且更特別地是在這個重鏈的CDR-H3。因此，將被證明的是：本發明的抗體的、或者它們的衍生化合物或功能性片段之一者的較佳的特定

CDRs，將是重鏈的三個CDRs，亦即，就414H5而言，編碼分別依據IMGT與Kabat所定義的序列辨識編號：7、5、8與11、12、6的序列的CDRs，以及就515H7而言，編碼分別依據IMGT與Kabat所定義的序列辨識編號：44、5、45與48、49、43的序列的CDRs。甚至更優先地，對應於CDR-H3的CDR編碼序列辨識編號：8或6(就414H5而言)以及序列辨識編號：45或43(就515H7而言)的序列。

在一個特定具體例中，本發明是有關於一鼠抗體、或它的衍生化合物或功能性片段。

本發明的另一個具體例揭示一抗體、或它的衍生化合物或功能性片段，包含有一輕鏈，該輕鏈包含有下列三個CDRs：

序列辨識編號：1的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：1的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列的CDR-L1；

序列辨識編號：2的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：2的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列的CDR-L2；以及

序列辨識編號：3的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：3的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列的CDR-L3，以及

一重鏈，該重鏈包含有下列三個CDRs：

序列辨識編號：4的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：4的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%

相同性的序列的CDR-H1；

序列辨識編號：5的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：5的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列的CDR-H2；以及

序列辨識編號：6的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：6的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列的CDR-H3。

本發明的又另一個具體例揭示一抗體、或它的衍生化合物或功能性片段，包含有一輕鏈，該輕鏈包含有下列三個CDRs：

序列辨識編號：1的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：1的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-L1；

序列辨識編號：2的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：2的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-L2；以及

序列辨識編號：3的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：3的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-L3，以及一重鏈，該重鏈包含有下列三個CDRs：

序列辨識編號：7的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：7的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-H1；

序列辨識編號：5的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：5的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-H2；以及

序列辨識編號：8的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：8的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-H3。

本發明的又另一個具體例揭示一抗體、或它的衍生化合物或功能性片段，包含有一輕鏈，該輕鏈包含有下列三個CDRs：

序列辨識編號：9的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：9的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-L1；

序列辨識編號：10的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：10的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-L2；

以及

序列辨識編號：3的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：3的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-L3，以及一重鏈，該重鏈包含有下列3個CDRs：

序列辨識編號：11的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：11的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-H1；

序列辨識編號：12的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：12的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-H2；

以及

序列辨識編號：6的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：6的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-H3。

一抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段，依據本發明其特徵在於它包含有：

一包含有序列辨識編號：1的序列的CDR-L1、序列辨識編號：2的序列的CDR-L2以及序列辨識編號：3的序列的CDR-L3的輕鏈；以及

一包含有序列辨識編號：7的序列的CDR-H1、序列辨

識編號：5的序列的CDR-H2以及序列辨識編號：8的序列的CDR-H3的重鏈。

在另一個具體例中，一抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段，依據本發明其特徵在於它包含有：

一包含有序列辨識編號：9的序列的CDR-L1、序列辨識編號：10的序列的CDR-L2以及序列辨識編號：3的序列的CDR-L3的輕鏈；以及

一包含有序列辨識編號：11的序列的CDR-H1、序列辨識編號：12的序列的CDR-H2以及序列辨識編號：6的序列的CDR-H3的重鏈。

依據又另一個具體例，本發明的抗體、或它的衍生化合物或功能性片段，其特徵在於它包含有一包含有序列辨識編號：13的胺基酸序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：13的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列的輕-鏈序列；並且它還包含有一包含有序列辨識編號：14的胺基酸序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：14的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列的重-鏈序列。

本發明的另一個具體例揭示一抗體、或它的衍生化合物或功能性片段，包含有一輕鏈，該輕鏈包含有下列三個CDRs：

序列辨識編號：40的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：40的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列的CDR-L1；

序列辨識編號：2的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：2的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列的CDR-L2；以及

序列辨識編號：41的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：41的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列的CDR-L3，以及

一重鏈，該重鏈包含有下列三個CDRs：

序列辨識編號：42的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：42的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列的CDR-H1；

序列辨識編號：5的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：5的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列的CDR-H2；以及

序列辨識編號：43的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：43的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列的CDR-H3。

本發明的又另一個具體例揭示一抗體、或它的衍生化合物或功能性片段，包含有一輕鏈，該輕鏈包含有下列三個CDRs：

序列辨識編號：40的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：40的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-L1；

序列辨識編號：2的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：2的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-L2；以及

序列辨識編號：41的序列或一在最佳化排列之後與序列辨

識編號：41的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-L3，

以及

一重鏈，該重鏈包含有下列三個CDRs：

序列辨識編號：44的序列或一在最佳化排列之後與序列辨

識編號：44的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-H1；

序列辨識編號：5的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識

編號：5的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-H2；以

及

序列辨識編號：45的序列或一在最佳化排列之後與序列辨

識編號：45的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-H3。

本發明的又另一個具體例揭示一抗體，或它的衍生化

化合物或功能性片段，包含有一輕鏈，其包含有下列三個

CDRs：

序列辨識編號：46的序列或一在最佳化排列之後與序列辨

識編號：46的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-L1；

序列辨識編號：47的序列或一在最佳化排列之後與序列辨

識編號：47的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-L2；

以及

序列辨識編號：41的序列或一在最佳化排列之後與和序列

辨識編號：41的序列具有至少80%相同性的序列的

CDR-L3，以及

一重鏈，該重鏈包含有下列3個CDRs：

序列辨識編號：48的序列或一在最佳化排列之後與序列辨

識編號：48的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-H1；

序列辨識編號：49的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：49的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-H2；以及

序列辨識編號：43的序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：43的序列具有至少80%相同性的序列的CDR-H3。

一抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段，依據本發明其特徵在於它包含有：

一包含有序列辨識編號：40的序列的CDR-L1、序列辨識編號：2的序列的CDR-L2以及序列辨識編號：41的序列的CDR-L3的輕鏈；以及

一包含有序列辨識編號：44的序列的CDR-H1、序列辨識編號：5的序列的CDR-H2以及序列辨識編號：45的序列的CDR-H3的重鏈。

在另一個具體例中，一抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段，依據本發明其特徵在於它包含有：

一包含有序列辨識編號：46的序列的CDR-L1、序列辨識編號：47的序列的CDR-L2以及序列辨識編號：41的序列的CDR-L3的輕鏈；以及

一包含有序列辨識編號：48的序列的CDR-H1、序列辨識編號：49的序列的CDR-H2以及序列辨識編號：43的序列的CDR-H3的重鏈。

依據又另一個具體例，本發明的抗體、或它的衍生化合物或功能性片段，其特徵在於它包含有一包含有序列辨識編號：50的胺基酸序列或一在最佳化排列之後與序列辨

識編號：50的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列的輕-鏈序列；並且它還包含有一包含有序列辨識編號：51的胺基酸序列或一在最佳化排列之後與序列辨識編號：51的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列的重-鏈序列。

如上所見，本發明亦有關於任何衍生自一如在本發明中所描述的抗體的化合物。

更特別地，本發明的抗體、或它的衍生化合物或功能性片段，其特徵在該衍生化合物由一包含有一勝肽支架的結合蛋白質所構成，在該勝肽支架上會以一種方法被移植(grafted)至少一CDR因而得以保留有起始抗體的全部或部分的抗原結合位辨識性質(paratope recognition properties)。

在本發明中所描述的6個CDR序列之中的一或多個序列亦可以是存在於各種不同的免疫球蛋白的支架上。在這個例子中，蛋白質序列使得可以再產生(recreate)一適合摺疊(folding)的被移植的CDRs的勝肽骨架，使它們能保留抗原結合位抗原-辨識性質(paratope antigen-recognition properties)。

一般而言，一熟悉此技藝的人士熟知如何決定蛋白質支架的類型，其中移植由原始抗體所產生的CDRs的至少之一者。更特別地，被知曉的是：該等支架要被選擇就必須符合下列多數的標準(Skerra A., J. Mol. Recogn., 2000, 13:167-187)：

優異的系統守恆(phylogenetic conservation)；

已知的三-維結構(three-dimensional structure)[像是，例如，藉由晶體繞射法(crystallography)、NMR光譜(NMR spectroscopy)或熟悉此技藝的人士所熟知的任何其他技術]；

小的尺寸(size)；

少數或沒有後-轉錄修飾(post-transcriptional modifications)；和/或

易於生產、表現以及純化。

該等原始蛋白質支架可以是，但不限於選自於下列的結構：纖維連接蛋白(fibronectin)以及優先地第三型纖維連接蛋白領域10(fibronectin type III domain 10)、脂質運載蛋白(lipocalin)、抗運載蛋白(anticalin)(Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74(4):257-75)、由金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的蛋白質A的領域B所產生的蛋白質Z、硫氧化還原蛋白A(thioredoxin A)或具有一重複要素(repeated motif)[諸如“錨蛋白重複(ankyrin repeat)”(Kohl et al., PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705)、“犰狳重複(armadillo repeat)”、“多白胺酸重複(leucine-rich repeat)”以及“三四肽重複(tetratricopeptide repeat)”]的蛋白質。

衍生自毒素(toxins)的支架[諸如，例如，來自蠍(scorpions)、昆蟲(insects)、植物(plants)、軟體動物(mollusks)等等的毒素]，以及神經NO合成酶(neuronal NO synthase, PIN)的蛋白質抑制劑亦應該被提及。

在無限制下，一個雜合建構物(hybrid constructions)的

實例是一抗CD4抗體(亦即13B8.2)的CDR-H1 (重鏈)插入至PIN的環(loops)之一者中，因此保留有如該原始抗體的相同結合性質之新的結合蛋白質而被獲得(Bes *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 343(1), 334-344)。在一純粹例示說明的基礎上，將一抗-溶菌酶VHH抗體(anti-lysozyme VHH antibody)的CDR-H3 (重鏈)移植至一新制癌菌素(neocarzinostatin)的環之一者上(Nicaise *et al.*, Protein Science, 2004, 13(7):1882-1891)亦可以被提及。

最後，如上所描述的，該等胜肽支架可包含有由原始抗體所產生的1至6個CDRs。較佳地，但非一必要條件，一熟悉此技藝的人士將從重鏈中選擇至少一CDR，該重鏈被熟知是主要負責關於抗體的專一性(specificity)。一或多個相關的CDRs的選擇對於熟悉此技藝的人士是明顯的，接而他將會選出適當的已知技術(Bes *et al.*, FEBS letters 508, 2001, 67-74)。

本發明的一個特定方面是有關於一用於選擇一衍生自依據本發明的一抗體之化合物的方法，該衍生化合物能夠在活體外和/或在活體內抑制腫瘤細胞的生長並且該衍生化合物包含有一被移植至少一抗體CDR的胜肽支架，其特徵在於它包含有下列步驟：

- a) 令一化合物(由一被移植至少一抗體CDR的胜肽支架所組成)與一含有能夠生長的腫瘤細胞的生物樣品，並且在允許這些細胞能生長的條件下進行活體外的接觸；以及
- b) 若該化合物是能夠抑制這些腫瘤細胞的生長，選擇該化

合物，

以及它的特徵在於該至少一被移植的CDR是選自於下列CDRs：

序列辨識編號：1、9、40、46之序列的CDR或一在最佳化排列後與序列辨識編號：1、9、40、46的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列；

序列辨識編號：2、10、47之序列的CDR或一在最佳化排列後與序列辨識編號：2、10、47的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列；

序列辨識編號：3、41之序列的CDR或一在最佳化排列後與序列辨識編號：3、41的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列；

序列辨識編號：4、7、11、42、44、48之序列的CDR或一在最佳化排列後與序列辨識編號：4、7、11、42、44、48的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列；

序列辨識編號：5、12、49之序列的CDR或一在最佳化排列後與序列辨識編號：5、12、49的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的序列；

以及

序列辨識編號：6、8、43、45之序列的CDR或一在最佳化排列後與序列辨識編號：6、8、43、45的序列具有至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%相同性的

序列。

依據一個較佳的方式，該方法可以包括在步驟a)中令一化合物(由被移植至少2或3個抗體CDRs的勝肽支架所組成)進行活體外的接觸。

依據該方法的一個甚至更佳的方式，該勝肽支架是選自於它們的結構是在上面所提及的支架或結合蛋白質。

顯然地，這些實例不是限制性，並且任何對於熟悉此技藝的人士而言是熟知的或明顯的其他結構應該被認為是藉由本專利申請案所授予的保護所涵蓋。

因此，本發明是有關於一抗體、或它的衍生化合物或功能性片段，其特徵在於該勝肽支架是選自於下列的蛋白質：a)系統地被良好地保留(phylogenetically well preserved)、b)堅固結構的(of robust architecture)、c)具有一熟知的3-D分子組織(molecular organization)、d)小的尺寸的和/或e)包含有可以藉由沒有修飾穩定度性質(stability properties)的刪除和/或插入而被修飾的區域。

依據一個較佳的具體例，本發明的抗體、或它的衍生化合物或功能性片段，其特徵在於：該勝肽支架是選自於：i)由纖維連接蛋白，優先地第三型纖維連接蛋白領域10、脂質運載蛋白、抗運載蛋白、金黃色葡萄球菌的蛋白質A的領域B所產生的蛋白質Z、硫氧還蛋白A或具有一重複要素[諸如“錨蛋白重複序列”(Kohl *et al.*, PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705)、“犰狳重複”、“多白胺酸重複”以及“三四肽重複”]所產生的蛋白質，或iii)神經NO合成酶(PIN)的蛋白質

抑制劑。

本發明的另一個方面是有關於上面所描述的抗體的功能性片段。

更特別地，本發明標靶(targets)一抗體、或它的衍生化合物或功能性片段，其特徵在於：該功能性片段是選自於下列：片段Fv、Fab、(Fab')<sub>2</sub>、Fab'、scFv、scFv-Fc以及雙鏈抗體，或任何它的半衰期已經被增高的片段[諸如，聚乙二醇化的片段(PEGylated fragments)]。

依據本發明的抗體的該等功能性片段，例如，由下列所構成：片段Fv、scFv (sc=單鏈)、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、scFv-Fc 或雙鏈抗體或任何它的半衰期已經藉由化學修飾而被增高{諸如，加入聚烷撐二醇(polyalkyleneglycol)[諸如，聚乙二醇(polyethylene glycol)][聚乙二醇化(PEGylation)][聚乙二醇化片段(PEGylated fragments)被稱為Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')<sub>2</sub>-PEG以及Fab'-PEG]、或被併入一脂質體(liposome)、微球體(microspheres)或PLGA}的片段，該等片段具有本發明的特有CDRs至少之一者，該CDR特別是能夠發揮一所產生的抗體的通常形式甚至部分的活性。

較佳地，該等功能性片段將包含有或包括它們所衍生自的抗體的變異重或輕鏈的一部分序列，該部分序列足夠來保持有如產生它的抗體的相同的結合專一性以及足夠的親合力(affinity)，較佳地至少等於1/100，更佳地至少產生它的抗體的親和力的1/10。

該一功能性片段將含有至少5個胺基酸，較佳地6、7、

8、10、15、25、50或100個產生它的抗體的連續胺基酸。

較佳地，這些功能性片段將是在Fv、scFv、Fab、 $F(ab')_2$ 、 $F(ab')$ 、scFv-Fc或雙鏈抗體的類型中之一，該等功能性片段一般具有如產生它們的抗體的相同的結合專一性。依據本發明，本發明的抗體的片段可以藉由諸如酵素分解(enzyme digestion)[包括胃蛋白酶(pepsin)或木瓜蛋白酶(papain)]的方法，和/或藉由被化學還原的二硫鍵的切割]從上述所描述的抗體中被獲得。該等抗體片段亦可以藉由熟悉此技藝的人士亦所熟知的重組基因技術或藉由胜肽合成(peptide synthesis)[例如，藉由自動胜肽合成儀(automatic peptide synthesizers)(諸如那些被Applied BioSystems所販賣者等等)]而被獲得。

為更表清楚，下面的表2彙整對應於本發明的抗體的各種不同的胺基酸序列。

表2 (其中 Mu.=鼠 以及 Ch.=嵌合的)

抗體	CDR編號	重鏈	輕鏈	序列辨識編號
414H5	一般		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	3
		CDR-H1		4
		CDR-H2		5
		CDR-H3		6
	IMGT		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	3
		CDR-H1		7
		CDR-H2		5
		CDR-H3		8
	Kabat		CDR-L1	9
			CDR-L2	10
			CDR-L3	3
		CDR-H1		11
		CDR-H2		12
		CDR-H3		6
	Mu.變異領域		Mu.變異領域	13
			Mu.變異領域	14
			Ch.變異領域	64
			Ch.變異領域	65
515H7	一般		CDR-L1	40
			CDR-L2	2
			CDR-L3	41
		CDR-H1		42
		CDR-H2		5
		CDR-H3		43
	IMGT		CDR-L1	40
			CDR-L2	2
			CDR-L3	41
		CDR-H1		44
		CDR-H2		5
		CDR-H3		45
	Kabat		CDR-L1	46
			CDR-L2	47
			CDR-L3	41
		CDR-H1		48
		CDR-H2		49
		CDR-H3		43

	Mu. 變異領域	50
	Mu. 變異領域	51
	Ch. 變異領域	66
	Ch. 變異領域	67

本發明的另一個特定方面是有關於一嵌合抗體、或它的衍生化合物或功能性片段，其特徵在於：該抗體亦包含有衍生自一與小鼠異源(heterologous)的物種(特別是人)的一抗體的輕-鏈以及重-鏈恆定區域(constant regions)。

本發明又另一個特定方面是有關於一人類化抗體、或它的衍生化合物或功能性片段，其特徵在於：該衍生自人類抗體的輕-鏈以及重-鏈的該等恆定區域分別是 $\lambda$  (lambda) 或 $\kappa$ 區域(kappa region)以及 $\gamma-1$  (gamma-1)、 $\gamma-2$  (gamma-2) 或 $\gamma-4$ 區域(gamma-4 region)。

依據另一方面，本發明是有關於一能夠分泌依據本發明的一單株抗體的鼠融合瘤，特別是藉由融合經Balb/C免疫接種的小鼠的脾臟細胞(splenocytes)與骨髓瘤Sp 2/O-Ag14細胞株的細胞而被獲得。

該單株抗體，在此意指為414H5或為515H7或它們的衍生物或功能性片段，其特徵在於：該由該融合瘤所分泌的抗體顯然地形成本發明的一部份。

本發明的抗體亦包含有嵌合的或人類化抗體。

一嵌合抗體是含有一衍生自一既定物種的抗體的天然變異區域(輕鏈與重鏈)組合以一異源於(heterologous to)該既定物種之物種的輕鏈與重鏈的恆定區域者。

該等抗體，或它們的嵌合片段，可以藉由使用重組基因的技術而被製備。例如，該嵌合抗體可以藉由選殖重組型DNA (recombinant DNA)[含有一啟動子(promoter)以及一編碼本發明一非人類單株抗體(特別是鼠)之變異性區域的序列以及一編碼人類抗體恆定區域的序列]而被產生。依據本發明的一藉由一該重組型基因而被編碼的嵌合抗體可以是，例如，一小鼠-人類嵌合體(chimera)[這個抗體的專一性是藉由衍生自該鼠DNA的變異性區域而被決定，以及它的同型物(isotype)是藉由衍生自人類DNA的恆定區域而被決定]。參照Verhoeven等人(BioEssays, 8:74, 1988)的關於用於製備嵌合抗體的方法。

在另一個方面，本發明描述一抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段，其包含有一嵌合抗體。

在一個特定較佳具體例中，本發明的嵌合抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段，包含有一輕鏈序列，該輕鏈序列包含有一序列辨識編號：64的胺基酸序列，並且它還包含有一重鏈序列，該重鏈序列包含有一序列辨識編號：65的胺基酸序列。

在另一個較佳具體例中，本發明的嵌合抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段，包含有一輕鏈序列，該輕鏈序列包含有一序列辨識編號：66的胺基酸序列，並且它還包含有一重鏈序列，該重鏈序列包含有一序列辨識編號：67的胺基酸序列。

“人類化抗體(humanized antibodies)”意指一抗體，該抗

體含有衍生自非人類來源之抗體的CDR區域，該抗體分子的其它部份衍生自一個(或數個)人類抗體。此外，部份的骨架節段殘基(skeleton segment residue)(被稱為FR)可以被修飾而得以保留結合親合力(Jones *et al.*, Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeyen *et al.*, Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-327, 1988)。

本發明的人類化抗體或它們的片段可以藉由熟悉此技藝的人士所熟知的技術(諸如，例如，那些在文件中所描述的：Singer *et al.*, J. Immun., 150:2844-2857, 1992; Mountain *et al.*, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992；以及 Bebbington *et al.*, Bio/Technology, 10:169-175, 1992)而被製備。該等人類化抗體對於它們用於涉及在活體外的診斷或預防(preventive)和/或在活體內的治療處理(therapeutic treatment)的方法而言是較佳的。其它人類化技術亦為熟悉此技藝的人士所熟知的，諸如，例如，PDL在專利案中所描述的“CDR移植(CDR grafting)”技術：EP 0 451 261、EP 0 682 040、EP 0 939 127、EP 0 566 647或US 5,530,101、US 6,180,370、US 5,585,089與US 5,693,761。美國專利第5,639,641號或第6,054,297號、第5,886,152號與第5,877,293號亦可被引用。

此外，本發明亦有關於由上面所描述的鼠抗體所產生的人類化抗體。

在一個較佳方式中，衍生自人類抗體的輕-鏈與重-鏈的恆定區域分別是 $\lambda$ 或 $\kappa$ 與 $\gamma-1$ 、 $\gamma-2$ 或 $\gamma-4$ 區域。

在一對應於 IgG1 同型物 IgG1 的具體例中，該抗體的一個額外的特徵是展現出效應子功能 (effector functions)，諸如，抗體 - 依賴的細胞毒性 (antibody-dependant cellular cytotoxicity, ADCC) 和 / 或 補 體 - 依 賴 的 細 胞 毒 性 (complement-dependant cytotoxicity, CDC)。

本發明的一個新穎的方面是有關於一經分離的核酸 (isolated nucleic acid)，其特徵在於：它是選自於下列核酸 [包含任何同義遺傳密碼子 (degenerate genetic code)]：

一編碼依據本發明的一抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段的核酸、DNA 或 RNA，；

一互補於有如在 a) 中所定義的一核酸的核酸；

一至少 18 個核苷酸在高度嚴苛的條件下能夠與序列辨識編號：15 至 26 或 52 至 61 的核酸序列的 CDRs 之至少一者或一在最佳化排列後與序列辨識編號：15 至 26 或 52 至 61 的序列具有至少 80%，較佳地 85%、90%、95% 與 98% 相同性的序列雜交 (hybridizing) 的核酸；以及

一至少 18 個核苷酸在高度嚴苛的條件下能夠與至少序列辨識編號：27，或者序列辨識編號：62，或者序列辨識編號：68 或 70 之輕鏈的核酸序列和 / 或 序列辨識編號：28，或者序列辨識編號：63，或者序列辨識編號：69 或 71 之重鏈的核酸序列，或者一在最佳化排列之後與序列辨識編號：27 和 / 或 28，或序列辨識編號：62 和 / 或 63，或序列辨識編號：68 和 / 或 69，或序列辨識編號：70 和 / 或 71 的序列具有至少 80%，較佳地 85%、90%、95% 與 98% 相同性的序列雜

交的核酸。

下面的表3彙整關於本發明的抗體的各種不同的核苷酸序列。

表3

抗體	CDR編號	重鏈	輕鏈	序列辨識編號
414H5	一般		CDR-L1	15
			CDR-L2	16
			CDR-L3	17
		CDR-H1		18
		CDR-H2		19
		CDR-H3		20
	IMGT		CDR-L1	15
			CDR-L2	16
			CDR-L3	17
		CDR-H1		21
		CDR-H2		19
		CDR-H3		22
	Kabat		CDR-L1	23
			CDR-L2	24
			CDR-L3	17
		CDR-H1		25
		CDR-H2		26
		CDR-H3		20
			Mu. 變異領域	27
		Mu. 變異領域		28
			Ch. 變異領域	68
		Ch. 變異領域		69
515H7	一般		CDR-L1	52
			CDR-L2	16
			CDR-L3	53
		CDR-H1		54
		CDR-H2		19
		CDR-H3		55
	IMGT		CDR-L1	52
			CDR-L2	16
			CDR-L3	53
		CDR-H1		56
		CDR-H2		19
		CDR-H3		57
	Kabat		CDR-L1	58
			CDR-L2	59
			CDR-L3	53
		CDR-H1		60
		CDR-H2		61
		CDR-H3		55

	Mu. 變異領域	62
	Mu. 變異領域	63
	Ch. 變異領域	70
	Ch. 變異領域	71

術語“核酸(nucleic acid)”、“核酸序列(nucleic sequence)”、“核酸序列(nucleic acid sequence)”、“聚核苷酸(polynucleotide)”、“寡核苷酸(oligonucleotide)”、“聚核苷酸序列(polynucleotide sequence)”以及“核苷酸序列(nucleotide sequence)”，在本詳細說明中被相互交換使用，意指核苷酸(經或未經修飾的)、一核酸(含有或沒有非天然的核苷酸)的明確的一片段或一區域，以及是一雙-股DNA(double-strand DNA)、一單-股DNA(single-strand DNA)或該等DNAs的轉錄產物(transcription products)的一精確序列。

在此亦應該被包括的是：本發明無關於核苷酸在它們的天然的染色體環境(chromosomal environment)(亦即，在一天然的狀態)中的。本發明的序列已被經分離(isolated)和/或被純化(purified)，亦即，它們直接地或間接地被取樣[例如，藉由一複製(copy)]，它們的環境已經至少部份被修改。在此亦應該被提及的是經分離的核酸是藉由重組遺傳學(例如，藉由宿主細胞的方式)而被獲得，或藉由化學合成而被獲得。

“核酸序列在最佳化排列之後與一較佳序列展現出一至少80%，較佳地85%、90%、95%與98%的百分比相同性”意指相對於參考核酸序列，核酸序列展現特定的修飾[諸

如，特別是一刪除、一截斷、一延長、一嵌合融合(chimeric fusion)和/或一取代，特別是點狀的(punctual)]。較佳地，這些序列是編碼有如參考序列的相同胺基酸序列，這是有關於遺傳密碼子的退化(the degeneration of the genetic code)、或可能地與該參考序列專一性地雜交的互補序列(complementarity sequences)，較佳地在高度嚴苛的條件下，特別是那些在下面所定義者。

在高度嚴苛的條件下雜交意指有關於溫度與離子強度(ionic strength)的條件是以一種它們允許雜交被維持在二個互補的DNA片段之間的方式而被選擇。在一純粹例示說明的基礎上，為了定義如上面所描述的聚核苷酸片段的目的該雜交步驟的高度嚴苛的條件有利地是如下所示。

DNA-DNA或DNA-RNA雜交在兩步驟中被進行：(1)在42 °C下於含有5X SSC [1X SSC對應於一為0.15 M NaCl+0.015 M檸檬酸鈉(sodium citrate)的溶液]、50%甲醯胺(formamide)、7%十二烷基硫酸鈉(sodium dodecyl sulfate, SDS)、10X丹哈特氏(Denhardt's)、5%硫酸葡聚糖(dextran sulfate)以及1%鮭魚精子DNA (salmon sperm DNA)的磷酸緩衝液(phosphate buffer)(20 mM、pH 7.5)中預雜交(prehybridization)歷時3小時；(2)在一視探針(probe)長度而定的溫度下(亦即：針對一長度>100個核苷酸的探針的42°C)初級雜交(primary hybridization)歷時20小時，繼而在20°C下於2X SSC+2% SDS中兩次20-分鐘的清洗，在20°C下於0.1X SSC+0.1% SDS中一次20-分鐘的清洗。最後的清洗是在針

對一長度>100核苷酸的探針的60°C下於0.1X SSC+0.1% SDS中被進行歷時30分鐘。依據Sambrook等人(Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory; 3rd edition, 2001)所描述的操作程序，上面針對一被定義大小的聚核苷酸所描述的高度嚴苛的雜交條件可以藉由熟悉此技藝的人士針對較長或較短的寡核苷酸所改變。

本發明亦有關於一包含有如在本發明中所描述的一核酸的載體(vector)。

本發明特別是標靶選殖(target cloning)和/或含有該一核苷酸序列的表現載體。

本發明的載體較佳地含有在一既定的宿主細胞內允許核苷酸序列的表現和/或分泌的要素(elements)。因此該載體必須含有一啟動子、轉譯起始與終止信號(translation initiation and termination signals)，以及適合的轉錄調節區域(transcription regulation regions)。它必須能夠以一穩定的方式在該宿主細胞內被維持並且可選擇性地具有指定分泌被轉譯的蛋白質的特定信號。這些各種不同的要素是藉由熟悉此技藝的人士依據所使用的宿主細胞而被選擇以及被最佳化。為了這個目的，該等核苷酸序列可以被插入至在被選定的宿主內的自我-複製載體(self-replicating vectors)中或是被選定的宿主的整合性載體(integrative vectors)中。

典型地，該等載體是藉由熟悉此技藝的人士所使用的方法而被製備，並且所形成的選殖株(clones)可以藉由標準方法[諸如，脂質體轉染(lipofection)、電穿孔

(electroporation)、熱休克(heat shock)或化學方法]而被導入至一適合的宿主內。

例如，該等載體是質體(plasmid)或病毒來源(viral origin)的載體。為了選殖或表現本發明的核苷酸序列，它們被用來轉形(transform)宿主細胞。

本發明亦包含有被轉形以或包含有一有如在本發明中所描述的載體的宿主細胞。

宿主細胞可以選自於原核(諸如，細菌細胞)或真核系統(例如，還有真菌細胞或動物細胞，特別是哺乳動物細胞)。昆蟲或植物細胞亦可以被使用。

本發明亦有關於具有一依據本發明的經轉形的細胞的動物(除了人類)。

本發明的另一個方面是有關於一用於生產一依據本發明之抗體，或它的功能性片段之一者的方法，特徵在於該方法包含有下列步驟：

- a) 在一培養基(medium)中以及適合的培養條件下培養一依據本發明的宿主細胞；以及
- b) 回收該因而被生產自培養基或自培養細胞中的抗體或它的功能性片段之一者。

依據本發明的經轉形的細胞是在用於製備依據本發明的重組型多肽(recombinant polypeptides)的方法中使用。用於製備依據本發明的呈重組形式的多肽的方法，其特徵在於該等使用一載體和/或一被一依據本發明的載體所轉形的細胞的方法亦被包含有在本發明中。較佳地，一藉由一

依據本發明的載體所轉形的細胞是在允許該上述多肽的表現以及該重組型胜肽的回收的條件下予以培養。

有如已被提及的，宿主細胞可以選自於原核或真核系統。特別是，鑑定在該一原核或真核系統中促進分泌的本發明的核苷酸序列是可能的。因此，攜帶該一序列的依據本發明的載體可以有利地被使用於要被分泌的重組型蛋白質的生產。的確，這些感興趣的重組型蛋白質的純化將藉由它們存在於細胞培養物的上清液(supernatant)而不是在宿主細胞內的事實而被促進。

本發明的多肽亦可以藉由化學合成而被製備。該一製備方法亦是本發明的標的。一熟悉此技藝的人士瞭解用於化學合成的方法，諸如，藉由片段的冷凝(condensation)或藉由在溶液中的傳統合成的固-相技術(solid-phase techniques)(特別是參見 Steward *et al.*, 1984, Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd ed.)或部分固-相技術(partial solid-phase techniques)。本發明亦包含有藉由化學合成而被獲得的並且能夠含有對應的非天然胺基酸的多肽。

本發明亦包含有可以藉由本發明的方法而被獲得的抗體、或它們的衍生化合物或功能性片段。

依據又另一個方面，本發明是有關於一如上面所描述的抗體，此外，特徵在於它能夠專一性地結合至一人類趨化激素家族受體和/或能夠專一性地抑制該一受體的信號。

依據一個新穎的具體例，本發明是有關於一抗體、或

它的衍生化合物或功能性片段，由一為雙特異性(bispecific)的抗體所組成，在這個意義上它包含有一能夠和任何在腫瘤的發展有牽連的受體交互作用的第二要素(motif)，諸如，例如，VEGFR、VEGF、EGFR、IGF-1R、HER2neu、HGF、cMET、FGF、四跨膜蛋白(tetraspanins)、整合素(integrins)、CXCR4(其他非本發明的抗體，亦即，標靶另一個抗原決定位)、CXCR7或CXCR2。

該等雙特異性或雙功能抗體(bifunctional antibody)由一第二代的單株抗體所構成，其中2個不同的變異性區域被組合在一相同的分子上(Hollinger and Bohlen, 1999, Cancer and metastasis, rev. 18:411-419)。它們的效用在診斷與療效的領域(有關於它們的能力去募集新的效應子功能或在腫瘤細胞表面上去標靶數個分子)這兩者中被證實；該等抗體可以藉由化學方法(Glennie MJ *et al.*, 1987, J. Immunol. 139, 2367-2375; Repp R. *et al.*, 1995, J. Hemat., 377-382)或體細胞的方法(somatic methods)(Staerz U.D. and Bevan M.J., 1986, PNAS 83, 1453-1457; Suresh M.R. *et al.*, 1986, Method Enzymol., 121:210-228)，以及較佳地藉由遺傳工程技術(genetic engineering techniques)[使得可以迫使異型二聚作用並且因此促進該抗體的純化](Merchand *et al.*, 1998, Nature Biotech., 16:677-681)而被獲得。

這些雙特異性抗體可以被構築為全部的IgG、雙特異性Fab'2、Fab'PEG、雙鏈抗體或雙特異性scFv，以及一四價雙特異性抗體(tetraivalent bispecific antibody)，其中兩個結

合位址是用於各個被標靶的抗原(Park *et al.*, 2000, Mol. Immunol., 37(18):1123-30)或如上面所描述的它們的片段而存在。

除了一個一雙特異性抗體的生產與投藥是較便宜於二個特異性抗體的生產所提供的經濟優點之外，該等雙特異性抗體的使用具有減低治療的毒性的優點。的確，一雙特異性抗體的使用因而使得減低循環抗體的總量以及可能的毒性成為可能。

在本發明的一個較佳具體例中，該雙特異性抗體是一雙價或四價抗體(bivalent or tetravalent antibody)。

最後，本發明是有關於一如上面所描述的抗體、或它的衍生物或功能性片段供用作為一藥物。

本發明亦有關於一包含有一作為活性成分(active ingredient)的化合物(由本發明的抗體、或它的衍生化合物或功能性片段之一者所組成)的藥學的組成物。較佳地，該抗體被補充以一賦形劑(excipient)和/或一藥學上可接受的載劑(carrier)。

此外，本發明亦有關於一組成物，其特徵在於它包含有一作為一供用於一同步的(simultaneous)、分開的(separated)或持久的方式(extended fashion)的組合產物的抗-腫瘤抗體(除了一直接針對CXCR4的抗體之外)。

依據又另一個具體例，本發明亦有關於一有如上面所描述的藥學組成物，其包含有至少一選自於下列的第二抗腫瘤化合物：能夠專一性地抑制酪胺酸激酶(tyrosine kinase)

活性的受體(諸如，IGF-IR、EGFR、HER2/neu、cMET、VEGFR 或 VEGF)的化合物、或熟悉此技藝的人士所熟知的任何其他抗腫瘤化合物。

在本發明一個第二較佳方面，該第二化合物可以選自於能夠抑制增生的(proliferative)和/或抗-細胞凋亡的(anti-apoptotic)和/或血管生成的(angiogenic)和/或藉由該等受體所促進的轉移散播(metastatic dissemination)的誘導性活性(inductive activity)的經分離的抗體、抗EGFR、抗IGF-IR、抗HER2/neu、抗cMET、VEGFR、VEGF等等或者它們的功能性片段與衍生化合物。

亦適合提及的是：抗CD20抗體[諸如，一利妥昔單抗(rituximab)、替伊莫單抗(ibritumomab)或托西莫單抗(tositumomab)]；抗CD33抗體[諸如，吉妥單抗(gemtuzumab)或林妥珠單抗(lintuzumab)]；抗CD22抗體[諸如，依帕珠單抗(epratuzumab)]；抗CD52抗體[諸如，阿倫單抗(alemtuzumab)]；抗EpCAM抗體[諸如，依決洛單抗(edrecolomab)、Ch 17-1A或IGN-101]；抗CTP21或16抗體(諸如，Xactin)；抗DNA-Ag抗體(諸如，<sup>131</sup>I-Cotara TNT-1)；抗MUC1抗體(諸如，盤妥莫(pemtumomab)或R1150)；抗MUC18抗體(諸如，ABX-MA1)；抗GD3抗體[諸如，米妥莫單抗(mitumomab)]；抗ECA抗體[諸如，CeaVac或拉貝珠單抗(labetuzumab)]；抗CA125抗體(諸如，OvaRex)；抗HLA-DR抗體[諸如，阿泊珠單抗(apolizumab)]；抗CTLA4抗體(諸如，MDX-010)；抗PSMA抗體(諸如，MDX-070、<sup>111</sup>In &

<sup>90</sup>Y-J591、<sup>177</sup>Lu J591、J591-DM1)；抗Lewis Y抗體(諸如，IGN311)；抗血管生成抗體(antiangiogenesis antibodies)(諸如，AS1405與90YmuBC1)；抗Trail-R1抗體(諸如，TRAIL R1mAb或TRAIL R2mAb)。

此外，另一個具體例補充本發明包含有一如上面所描述的組成物，該組成物包含有一作為一供同步的、分開的或持久使用的組合或綴合產物的細胞毒性/細胞生長抑制劑(cytotoxic/cytostatic agent)。

“同步的使用(simultaneous use)”意指包含有呈一單劑型(single dosage form)的組成物與化合物這兩者的投藥(administration)。

“分開的使用(separated use)”意指包含有呈一不同的劑型(distinct dosage form)的組成物與化合物這兩者在相同時間的投藥。

“持久的使用(extended use)”意指各自包含有呈一不同的劑型的組成物與化合物這兩者的相繼的投藥。

一般而言，依據本發明的該組成物相當地增高癌症治療的有效性(effectiveness)。換言之，本發明之抗體的治療效用是以一藉由投藥一細胞毒性劑(cytotoxic agent)的意想不到的方式而被增進。另一個由本發明的組成物所產生的主要隨後的優點是有關於使用較低有效劑量(lower effective doses)的活性成分的可能性，因此使得可以避免或減低副作用(特別是該細胞毒性劑的效用)出現的風險。再者，這組成物使得可以更快地達到預期的治療效用。

“治療抗癌劑(Therapeutic anticancer agent)”或“細胞毒性劑(cytotoxic agent)”意指一物質，當它被投藥至一病人時，它在病人體內治療或預防癌症的發展。該等試劑的非-限制性實例包含“烷基化”試劑(“alkylating” agents)、抗代謝物(antimetabolites)、抗腫瘤抗生素(antitumor antibiotics)、有絲分裂抑制劑(mitotic inhibitors)、染色質作用的抑制劑(inhibitors of chromatin functioning)、血管生成抑制劑(antiangiogenics)、抗雌激素(antiestrogens)、抗雄激素(antiandrogens)以及免疫調節劑(immunomodulators)。

該等藥劑，例如，在VIDAL中被引述，在專門關於腫瘤學(oncology)與血液學(hematology)的化合物的頁面的標題“Cytotoxic”下，參考此文件所引用的細胞毒性化合物在此被引用作為較佳的細胞毒性劑。

“烷基化試劑(alkylating agent)”意指任何在一細胞內可以共價地(covalently)結合以或可以烷化任何分子[優先地一核酸(例如，DNA)]的物質，該等烷基化試劑的實例包括：氮芥劑(nitrogen mustards)[諸如，二氯甲基二乙酸(mechlorethamine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、苯丙胺酸氮芥(melphalan)、氯水合物(chlorhydrate)、哌泊溴烷(pipobroman)、潑尼莫司汀(prednimustine)、磷酸二鈉(disodium phosphate)或雌莫司汀(estramustine)]；氧氮磷環類(oxazaphosphorines)[諸如，環磷醯胺(cyclophosphamide)、六甲密胺(alretamine)、曲磷胺(trofosfamide)、磺酸磷醯胺(sulfofosfamide)或異環磷醯胺

(ifosfamide)]；氮丙啶 (aziridines) 或環乙亞胺 (ethylene-imines)[諸如，塞替派 (thiotepa)、三乙醇胺 (triethyleneamine)或六甲三聚氰胺 (altetramine)]；亞硝基脲 (nitrosoureas)[諸如，卡莫司汀 (carmustine)、鏈脲黴素 (streptozocine)、福莫司汀 (fotemustine)或洛莫司汀 (lomustine)]；烷基磺酸鹽 (alkyl sulfonates)[諸如，硫酸布他卡因 (busulfan)、曲奧舒凡 (treosulfan)或英丙舒凡 (improsulfan)]；三氮烯 (triazenes)[諸如，達卡巴仁 (dacarbazine)]；或鉑複合物 (platinum complexes)[諸如，順鉑 (cisplatin)、奧沙利鉑 (oxaliplatin)或卡鉑 (carboplatin)]。

“抗代謝物 (antimetabolite)”意指一藉由干擾特定的活性(一般地，DNA合成)來阻斷生長和/或細胞代謝 (cellular metabolism)的物質。抗代謝物的實例包括：胺甲蝶呤 (methotrexate)、5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracile)、氟脫氧尿苷 (floxuridine)、5-氟去氧尿苷 (5-fluorodeoxyuridine)、卡培他濱 (capecitabine)、阿糖胞苷 (cytarabine)、氟達拉濱 (fludarabine)、阿糖胞苷 (cytosine arabinoside)、6-巯嘌呤 (6-mercaptopurine, 6-MP)、6-硫鳥嘌呤 (6-thioguanine, 6-TG)、氯脫氧腺苷 (chlorodesoxyadenosine)、5-氮胞核 (5-azacytidine)、吉西他賓 (gemcitabine)、克拉曲濱 (cladribine)、脫氧助間型黴素 (deoxycyformycin)以及噴司他丁 (pentostatin)。

“抗腫瘤抗生素 (Antitumor antibiotic)”意指一可以預防

或抑制DNA、RNA和/或蛋白質的合成的化合物。抗腫瘤抗生素的實例包括：多索如必辛(doxorubicin)、柔紅黴素(daunorubicin)、艾達魯比辛(idarubicin)、戊柔比星(valrubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、放線菌素D(dactinomycin)、光輝黴素(mithramycin)、普卡黴素(plicamycin)、絲裂黴素C(mitomycin C)、博來黴素(bleomycin)以及丙卡巴肼(procabazine)。

“有絲分裂抑制劑(mitotic inhibitors)”防止細胞週期與有絲分裂的正常進行。一般地，微管抑制劑(microtubule inhibitors)或“紅豆杉雙萜類(taxoids)”[諸如，太平洋紫杉醇(paclitaxel)與多西紫杉醇(docetaxel)]是能夠抑制有絲分裂。長春花生物鹼(vinca alkaloids)[諸如，長春鹼(vinblastine)、長春花新鹼(vincristine)、長春地辛(vindesine)與長春瑞濱(vinorelbine)]亦能夠抑制有絲分裂。

“染色質抑制劑(chromatin inhibitors)”或“拓樸異構酶抑制劑(topoisomerase inhibitors)”是抑制使染色質成形的蛋白質(諸如，拓樸異構酶抑制劑I以及II)的正常功能的物質。該等抑制劑的實例包括：就拓樸異構酶I而言，喜樹鹼(camptothecine)及其衍生物[諸如，依立替康(irinotecan)或拓泊替康(topotecan)]；就拓樸異構酶II而言，依託泊昔(etoposide)、磷酸依託泊昔(etiposide phosphate)以及替尼泊昔(teniposide)。

一“血管新生抑制劑(antiangiogenic)”是任何抑制血管生長的藥物、化合物、物質或試劑。血管新生抑制劑的實

例包括，但不限於：雷佐生(razoxin)、馬立馬司他(marimastat)、巴馬司他(batimastat)、普琳司他(prinomastat)、坦諾司他(tanomastat)、伊洛馬司他(ilomastat)、CGS-27023A、常山酮(halofuginone)、COL-3、鱉癌靈(neovastat)、BMS-275291、沙利度胺(thalidomide)、CDC 501、DMXAA、L-651582、角鲨胺(squalamine)、血管內皮抑制素(endostatine)、SU5416、SU6668、干擾素- $\alpha$ (interferon-alpha)、EMD121974、介白素-12(interleukin-12)、IM862、血管抑制素(angiostatin)以及vitaxin。

“抗雌激素(antiestrogen)”或“雌激素拮抗劑(estrogen antagonist)”意指任何減低、拮抗或抑制雌激素作用的物質。該等試劑的實例為泰莫西芬(tamoxifene)、托瑞米芬(toremifene)、雷洛昔芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、伊多昔芬(iodoxyfene)、阿那曲唑(anastrozole)、來曲唑(letrozole)以及依西美坦(exemestane)。

“抗雄激素(antiandrogen)”或“雄激素拮抗劑(androgen antagonist)”意指任何減低、拮抗或抑制雄激素作用之物質。抗雄激素的實例包括：氟他胺(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)、比卡魯胺(bicalutamide)、螺內酯(spiironolactone)、醋酸環丙氯地孕酮(cyproterone acetate)、非那甾胺(finasteride)以及西米替丁(cimetidine)。

免疫調節劑(immunomodulators)是刺激免疫系統的物質。免疫調節劑的實例包括：干擾素(interferon)、介白素(interleukins)[諸如，阿地介白素(aldesleukin)、OCT-43、介

白素融合毒素(denileukin diftitox)或介白素-2]、腫瘤壞死因子(tumor necrosis factors)[諸如，他索納明(tasonermin)]，或其它類型的免疫調節劑[諸如，香菇多醣(lentinan)、西佐喃(sizofiran)、羅喹美克(roquinimex)、匹多莫德(pidotimod)、培加酶(pegademase)、胸腺五肽(thymopentine)、聚I:C(poly I:C)或組合以5-氟尿嘧啶的左旋咪唑(levamisole)。

關於進一步的細節，一熟悉此技藝的人士可以參照由法國治療化學教師的聯盟(French Association of Therapeutic Chemistry Teachers)所發行的手冊，標題為“Therapeutic chemistry, vol. 6, Antitumor drugs and perspectives in the treatment of cancer, TEC and DOC edition, 2003 [in French]”。

在一個特定較佳具體例中，該作為一組合產物的本發明的組成物特徵在於：該細胞毒性劑是被化學地結合至該抗體供同步地使用。

在一個特定較佳具體例中，該組成物特徵在於：該細胞毒性/細胞生長抑制劑是選自於紡錘體抑制劑(spindle inhibitors)或安定劑(stabilizers)，較佳地是長春瑞濱和/或長春氟寧(vinflunine)和/或長春花新鹼。

為了促進在細胞毒性劑與依據本發明的抗體之間的結合，間隔分子(spacer molecules)可以在兩個要結合的化合物之間被導入，諸如，聚(烷撐)二醇、聚乙二醇或胺基酸；或者，在另一個具體例中，細胞毒性劑的活性衍生物可以被

使用，其中已經導入的能夠與抗體反應的功用。這些結合技術對於一熟悉本技藝的人士而言是熟知的並且在本詳細說明中將不會更詳細地討論。

其它EGFR抑制劑包含，但不限於：單株抗體C225與抗EGFR 22Mab (ImClone Systems Incorporated)、ABX-EGF (Abgenix/Cell Genesys)、EMD-7200 (Merck KgaA)或化合物ZD-1834、ZD-1838 與 ZD-1839 (AstraZeneca)、PKI-166 (Novartis)、PKI-166/CGP-75166 (Novartis)、PTK 787 (Novartis)、CP 701 (Cephalon)、氟米特 (flunomide) (Pharmacia/Sugen)、CI-1033 (Warner Lambert Parke Davis)、CI-1033/PD 183、805 (Warner Lambert Parke Davis)、CL-387、785 (Wyeth-Ayerst)、BBR-1611 (Boehringer Mannheim GMBH/Roche)、5-[[5-[(4-羥苯基)-4-[(4-甲氧苯基)甲基]-1-甲基咪唑-2-基]氨基]-3-甲基咪唑-2,4-二酮 (Naamidine A) (Bristol-board Myers Squibb)、RC-3940-II (Pharmacia)、BIBX-1382 (Boehringer Ingelheim)、OLX-103 (Merck & Co)、VRCTC-310 (Ventech Research)、EGF融合毒素 (EGF fusion toxin)(Seragen Inc.)、DAB-389 (Seragen/Lilgand)、ZM-252808 (Imperial Cancer Research Fund)、RG-50864 (INSERM)、LFM-A12 (Parker Hughes Center Cancer)、WHI-P97 (Parker Hughes Center Cancer)、GW-282974 (Glaxo)、KT-8391 (Kyowa Hakko)或“EGFR疫苗 (EGFR vaccine)”(York Medical/Centro of Immunologia Molecular)。

本發明的另一個方面是有關於一組成物，其特徵在於該等抗體、或它們的衍生化合物其中或功能性片段之至少之一者被組合或被綴合以一細胞毒素和/或一放射同位素(radioisotope)。

較佳地，該毒素或該放射同位素是能夠預防腫瘤細胞的生長或增生，特別是完全地去活化(inactivating)該腫瘤細胞。

亦較佳地，該毒素是一腸桿菌毒素(enterobacteria toxin)，特別是綠膿桿菌外毒素A (*Pseudomonas* exotoxin A)。

該等優先地組合以治療抗體的放射同位素是放射出 $\gamma$ 射線(gamma rays)的放射同位素，優先地，碘<sup>131</sup> (iodine<sup>131</sup>)、鈇<sup>90</sup> (yttrium<sup>90</sup>)、金<sup>199</sup> (gold<sup>199</sup>)、鉑<sup>100</sup> (palladium<sup>100</sup>)、銅<sup>67</sup> (copper<sup>67</sup>)、鉱<sup>217</sup> (bismuth<sup>217</sup>)以及銻<sup>211</sup> (antimony<sup>211</sup>)。放射出 $\alpha$ 以及 $\beta$ 射線的放射同位素亦可被使用於治療中。

“組合以本發明的抗體，或它的一功能性片段之至少一者的毒素或放射同位素”意指任何可以將毒素或放射同位素結合至至少一抗體的方法，特別是藉由在兩個化合物之間的共價結合，有或沒有導入結合分子。

允許全部或部分的綴合的元素之化學的(共價)、靜電(electrostatic)，或非-共價鍵結(non-covalent bonding)的試劑的實例包括，特別是苯醌(benzoquinone)、碳化二亞胺(carbodiimide)，以及更特別地是EDC {1-乙基-3[3-二甲基-氨基丙基]-碳化二亞胺-氯化氫

[1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimide-hydrochloride]、雙馬來亞醯胺(dimaleimide)、二硫代二硝基苯甲酸(dithiobis-nitrobenzoic acid, DTNB)、N-琥珀醯亞胺S-乙醯基硫酸(N-succinimidyl S-acetyl thio-acetate, SATA)、具有一或多個基團、具有一或多個疊氮基基團(phenylaside group)和紫外線射線[ultraviolet (UV) rays]反應的結合劑(binding agent)，最優先地是N-[4(疊氮基柳胺基)丁基]-3'-(2'-吡啶二硫基)-丙醯胺{N-[4(azidosalicylamino)butyl]-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamide, APDP}、N-琥珀醯亞胺3(2-吡啶二硫基)丙酸酯[(N-succinimidyl 3(2-pyridyldithio) propionate, SPDP]以及6-肼基-菸鹼醯胺(6-hydrazino-nicotinamide, HYNIC)。

另一種結合的形式，特別地就放射同位素而言，可以包含有使用雙功能離子螯合劑(bifunctional ion chelating agents)。

該等螯合劑(chelators)的實例包括：衍生自被發展來結合金屬(特別是放射活性金屬)與免疫球蛋白的EDTA [乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid)]或DTPA [二乙三胺五乙酸(diethylenetriaminepentaacetic acid)]的螯合劑。因此，DTPA與它的衍生物可以在碳鏈(carbon chain)上藉由各種不同的基團來予以取代，用該一方法俾以增高配位基-金屬錯合物(ligand-metal complex)的穩定性與剛性(rigidity)(Krejcarek *et al.*, 1977; Brechbiel *et al.*, 1991; Gansow, 1991; 美國專利第4,831,175號)。

例如，DTPA (二乙三胺五乙酸)以及它的衍生物[已長久廣泛地以它的自由形式(free form)或以一和金屬離子的錯合物被使用在藥物與生物學上]展現出和金屬離子形成穩定螯合物的值得注意的特徵，它可以被偶合以感興趣的治療或診斷的蛋白質(諸如，抗體)，用於發展供癌症治療的放射-免疫綴合物(radio-immuno conjugates)(Meases *et al.*, 1984; Gansow *et al.*, 1990)。

亦較佳地，形成該綴合物的至少一本發明的抗體是選自於它的功能性片段，特別是已經失去它們的Fc組份(Fc component)的片段(諸如，scFv片段)。

本發明亦包含有用於製備一意欲要用於癌症的預防或治療的藥物的組成物的用途。

本發明亦有關於一抗體、或它的一衍生物或功能性片段(較佳地，人類化)，和/或一依據本發明用於製備一用於抑制腫瘤細胞生長的藥物的組成物的用途。一般而言，本發明是有關於一抗體、或其一衍生物或功能性片段(較佳地人類化)，和/或一依據本發明用於製備一用於癌症預防或治療的藥物的組成物的用途。

較佳的，可以被預防和/或治療的癌症包括：前列腺癌、骨肉瘤(osteosarcoma)、肺癌、乳癌、子宮內膜癌(endometrial cancer)、結腸癌、多發性骨髓瘤(multiple myeloma)、卵巢癌、胰臟癌或任何其他的癌症。

本發明亦有關於一抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段，和/或一如上面所描述的用於製備一用於在一細胞

內調節CXCR4活性的藥物的化合物的用途。

本發明的另一個方面是有關於作為在一與CXCR4表現位準有關的疾病的診斷方法(較佳地，在活體外)中所描述的抗體的用途。較佳地，在該診斷方法中，與該CXCR4蛋白質有關的疾病將是癌症。

因此，本發明的該等抗體，或它們的衍生化合物或功能性片段可以在一用於在活體外於生物樣品中偵測和/或定量CXCR4蛋白質的方法中被採用，特別是用於與這個蛋白質的不正常表現有關聯的疾病(諸如，癌症)的診斷，其中該方法包含有下列步驟：

- a) 令該生物樣品接觸以一依據本發明的抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段；
- b) 驗證該抗原-抗體複合物可能形成。

因此，本發明亦包含有用於一有如所描述的方法的實施套組(kits)或附件(accessories)，包含有下列要素：

- a) 本發明的一多株或單株抗體；
- b) 選擇性地，用於組成適合於免疫反應的培養基的試劑；
- c) 選擇性地，顯見出由免疫反應所產生的抗原-抗體複合物的試劑。

有利地，該等抗體或它們的功能性片段可以被固定在一撐體(support)[特別是一蛋白質晶片(protein chip)]上。該一蛋白質晶片是本發明的一標的。

有利地，蛋白質晶片可以被用於在一生物樣品中偵測

和/或定量CXCR4蛋白質所需要的套組或附件。

必須被陳述的是：術語“生物樣品(biological sample)”在此是有關於被取自於一活體(living organism)的樣品[特別是被取自於哺乳動物(特別是人)的血液、組織、器官或其他的樣品]或任何可能含有CXCR4蛋白質的樣品(諸如，一如有需要而經轉形的細胞的樣品)。

該抗體、或它的一功能性片段可以是呈一免疫綴合物(immunoconjugate)或一為了獲得一可偵測到和/或可定量的信號之經標記的抗體的形式。

本發明的經標記的抗體，或它們的功能性或片段，包含，例如，抗體綴合物(antibody conjugates)[免疫綴合物(immunoconjugates)]可以被組合以，例如，酵素[諸如，過氧化酶(peroxidase)、鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase)、 $\alpha$ -D-半乳糖苷酶( $\alpha$ -D-galactosidase)、葡萄糖氧化酶(glucose oxidase)、葡萄糖澱粉酶(glucose amylase)、碳酸酐酶(carbonic anhydrase)、乙醯膽鹼酯酶(acetyl-cholinesterase)、溶菌酶(lysozyme)、蘋果酸去氫酶(malate dehydrogenase)或葡萄糖-6-磷酸鹽去氫酶(glucose-6 phosphate dehydrogenase)]或一分子[諸如，生物素(biotin)、地高辛(digoxigenin)或5-溴-去氧尿苷(5-bromo-desoxyuridine)]。螢光標記(Fluorescent labels)亦可以被組合以本發明的該等抗體或它們的功能性片段，包含特別是螢光素(fluorescein)及其衍生物、螢光染料(fluorochrome)、玫瑰紅(rhodamine)及其衍生物、綠色螢光

蛋白質(GFP)、丹礦醯(dansyl)、繖形酮(umbelliferone)等。在該等綴合物中，本發明的該等抗體或它的功能性片段可以藉由熟悉此技藝的人士所熟知的方法而被製備。它們可以直接地被結合以酵素或螢光標記；經由一間隔基團(spacer group)或一鍵聯基團(linkage group)[諸如，聚醛(polyaldehyde)、戊二醛(glutaraldehyde)、乙二胺四乙酸(EDTA)、或二乙三胺五乙酸(DPTA)]；或在結合劑(諸如，上面那些被提及用於治療的綴合物)的存在。攜帶螢光標記的綴合物可以藉由以一異硫氰酸酯(isothiocyanate)的反應而被製備。

其他綴合物亦可包含化學發光標記(chemiluminescent labels)[諸如，發光胺(luminol)以及二氧乙烷(dioxetane)]、生物發光標記(bioluminescent labels)[諸如，螢光素酶(luciferase)與蟲螢光素(luciferin)]、或放射活性標記(radioactive labels)[諸如，碘<sup>123</sup>(iodine<sup>123</sup>)、碘<sup>125</sup>(iodine<sup>125</sup>)、碘<sup>126</sup>(iodine<sup>126</sup>)、碘<sup>133</sup>(iodine<sup>133</sup>)、溴<sup>77</sup>(bromine<sup>77</sup>)、鎗<sup>99m</sup>(technetium<sup>99m</sup>)、銫<sup>111</sup>(indium<sup>111</sup>)、銫<sup>113m</sup>(indium<sup>113m</sup>)、镓<sup>67</sup>(gallium<sup>67</sup>)、镓<sup>68</sup>(gallium<sup>68</sup>)、釔<sup>95</sup>(ruthenium<sup>95</sup>)、釔<sup>97</sup>(ruthenium<sup>97</sup>)、釔<sup>103</sup>(ruthenium<sup>103</sup>)、釔<sup>105</sup>(ruthenium<sup>105</sup>)、汞<sup>107</sup>(mercury<sup>107</sup>)、汞<sup>203</sup>(mercury<sup>203</sup>)、铼<sup>99m</sup>(rhenium<sup>99m</sup>)、铼<sup>101</sup>(rhenium<sup>101</sup>)、铼<sup>105</sup>(rhenium<sup>105</sup>)、钪<sup>47</sup>(scandium<sup>47</sup>)、碲<sup>121m</sup>(tellurium<sup>121m</sup>)、碲<sup>122m</sup>(tellurium<sup>122m</sup>)、碲<sup>125m</sup>(tellurium<sup>125m</sup>)、铥<sup>165</sup>(thulium<sup>165</sup>)、铥<sup>167</sup>(thulium<sup>167</sup>)、铥<sup>168</sup>(thulium<sup>168</sup>)、氟<sup>18</sup>(fluorine<sup>18</sup>)、釔<sup>199</sup>

(yttrium<sup>199</sup>)與碘<sup>131</sup> (iodine<sup>131</sup>)]。熟悉此技藝的人士所熟知的用於結合放射同位素以抗體[直接地或經由一螯合劑(諸如，上面所提及的EDTA或DTPA)]的現行方法，可以被使用來作為診斷的放射同位素。因此應該被提及的是藉由氯胺-T技術(chloramine-T technique)標記以[I<sup>125</sup>]Na (Hunter W.M. and Greenwood F.C. (1962) Nature 194:495)；有如Crockford等人所描述的標記以鎘<sup>99m</sup> (美國專利第4,424,200號)或有如Hnatowich所描述的經由DTPA而結合 (美國專利第4,479,930號)。

本發明亦有關於一依據本發明用於製備一用於專一性標靶一對於表現或過度表現CXCR4的細胞而言是生物活性的化合物的藥物的用途。

就本發明的意義而言，一“生物活性的化合物(biologically active compound)”是任何能夠調節(特別是抑制)細胞活性(特別是生長、增生、轉錄以及基因轉譯)的化合物。

本發明亦有關於一在活體內由一依據本發明的抗體、或它的功能性片段(較佳地經標定的，特別是經放射標記的)所組成的診斷試劑，以及它在醫療成像(medical imaging)上的用途，特別是用於與CXCR4的細胞表現或過度表現有關的癌症的偵測。

依據本發明，本發明亦是有關於一作為一組合產物的組成物，或有關於一被用作為一藥物的抗-CXCR4/毒素綴合物或放射同位素。

較佳地，該作為一組合產物組成物或該綴合物將藉由一賦形劑和/或一藥學載劑而予以補充。

在本詳細說明中，“藥學載劑(pharmaceutical vehicle)”意指一化合物、或化合物的結合，加入一不引起二級反應的藥學組成物，並且該藥學載劑，例如，促進該等活性化合物的投藥、在個體內增高它的生命期限(lifespan)和/或有效性(effectiveness)、增高它在溶液中的溶解度或改善它的儲藏(storage)。該等藥學的載劑是被熟知的並且將被熟悉此技藝的人士依據所選擇的活性化合物的天然的與投藥的途徑而被改變適應。

較佳地，該等化合物將藉由全身的途徑(systemic route)[特別是由靜脈內的(intravenous)、肌肉內地(intramuscular)、皮內的(intradermal)、腹膜內的(intraperitoneal)、皮下的(subcutaneous)或口服的(oral)途徑]而被投藥。更佳地，由依據本發明的抗體所組成的組成物將在經過一段時間相等地間隔的數個劑量下而被投藥。

它們的投藥途徑、劑量表(dosing schedules)與最適的蓋倫制劑(optimal galenic forms)當確定適合一病人的治療時可以依據一般被考慮到的標準而被決定，諸如，例如，病人的年齡或體重、他的整體狀態的嚴重性、他對於所經歷的治療與副作用的耐受性(tolerance)。

因此，本發明是有關於一抗體、或它的功能性片段之一者用於製備一用於專一性標靶一對於表現或過度表現CXCR4的細胞而言是生物活性的化合物的藥物的用途。

本發明的其他特徵以及優點在詳細說明中用實施例以及它的說明在下面表現的圖示進一步顯現。

第1A與1B圖分別顯示藉由qPCR分析在癌細胞中的CXCR4與CXCR2的表現。

第2圖顯示藉由FACS分析在癌細胞中的CXCR4與CXCR2的蛋白質表現。

第3A與3B圖顯示在穩定表現野生型人類CXCR4的CHO-K1細胞的細胞膜上，未標定的SDF-1(第3A圖)以及414H5與515H7 Mabs(第3B圖)競爭專一性 $[^{125}\text{I}]$ SDF1結合(T：總結合；NS：非-專一性結合)。

第4A與4B圖顯示由414H5 Mab(第4A圖)與515H7 Mab(第4B圖)所調節的G蛋白質活化是藉由監測在被穩定地表現在NIH-3T3細胞上的野生型CXCR4受體的 $[^{35}\text{S}]$ GTP $\gamma$ S結合反應。

第5圖顯示由抗-CXCR4 Mabs 414H5與515H7所調節的G蛋白質活化是藉由監測在經SDF-1(10以及100 nM)刺激的HeLa腫瘤細胞中的 $[^{35}\text{S}]$ GTP $\gamma$ S結合反應。

第6A-6F圖顯示經由一生物發光共振能量轉移(BRET)方法在HEK-293細胞中藉由SDF-1以及藉由414H5與515H7 Mabs調節CXCR4受體與不同的交互作用搭檔的締合[第6A與6B圖：CXCR4：CXCR4同型-二聚作用；第6C與6D圖：CXCR2：CXCR4異型-二聚作用；第6E與6F圖：CXCR4-調節的 $\beta$ -抑制蛋白募集(CXCR4-mediated recruitment of  $\beta$ -arrestin)]。

第7A與7B圖顯示在穩定表現CXCR4受體的NIH3T3細胞中藉由SDF-1以及藉由414H5與515H7 Mabs抑制的佛司可林-刺激的cAMP生成(forskolin-stimulated cAMP production)。

第8圖顯示由抗-CXCR4 Mabs 414H5與515H7所調節的G蛋白質活化是藉由監測在被穩定地表現在CHO-K1細胞上的組成性低活化突變體Asn<sup>119</sup>Ser CXCR4受體的[<sup>35</sup>S]GTPγS結合反應。

第9圖例示說明Mab 414H5在活體外抑制SDF-1所誘發的HeLa細胞增生。

第10A與10B圖顯示CXCR4 Mab 414H5(第10A圖)與Mab 515H7(第10B圖)在活體外抑制SDF-1所誘發的U937細胞移動。

第11圖顯示抗-CXCR4 Mab 414H5(A)與Mab 515H7(B)抑制在Nod/Scid小鼠中的MDA-MB-231異種移植腫瘤生長。

第12圖顯示在U937 Nod/Scid小鼠存活模型中的抗-CXCR4 Mab 414H5活性。

第13A-13C圖顯示在CHO-CXCR4細胞(第13A圖)與MDA-MB-231(第13B圖)、U937(第13C圖)癌細胞中，抗-CXCR4 Mab 515H7抑制SDF-1-誘發的鈣離子釋放。

第14圖顯示414H5抑制在Nod/Scid小鼠中的T-細胞KARPAS 299異種移植腫瘤。

第15圖顯示在U937 Nod/Scid小鼠存活模型中的鼠抗-CXCR4 Mab m515H7的活性。

第 16 圖 顯示 鼠 抗 -CXCR4 Mab m515H7 在 抑 制 在 Nod/Scid 小 鼠 中 的 T-細 胞 KARPAS 299 異 種 移 植 肿 瘤 生 長 上 的 活 性 。

第 17 圖 顯 示 在 穩 定 表 現 野 生 型 人 類 CXCR4 的 CHO-K1 細 胞 的 細 胞 膜 上 ， 鼠 m414H5 與 m515H7 以 及 嵌 合 Mabs c414H5 與 c515H7 競 爭 專 一 性  $[^{125}\text{I}]$ SDF1 結 合 (T : 總 結 合 ; NS : 非 - 專 一 性 結 合 ) 。

第 18 圖 顯 示 由 鼠 m414H5 與 m515H7 Mabs 以 及 由 嵌 合 Mabs c414H5 與 c515H7 所 調 節 的 G 蛋 白 質 活 化 是 藉 由 監 測 在 被 穩 定 地 表 現 在 經 SDF-1 (10 nM) 刺 激 的 NIH-3T3 細 胞 中 的  $[^{35}\text{S}]$ GTP $\gamma$ S 結 合 反 應 。

第 19 圖 顯 示 由 鼠 m414H5 與 m515H7 Mabs 以 及 嵌 合 Mabs c414H5 與 c515H7 所 調 節 的 G 蛋 白 賴 活 化 是 藉 由 監 測 在 經 SDF-1 (10 nM) 刺 激 的 HeLa 人 類 肿 瘤 細 胞 中 的  $[^{35}\text{S}]$ GTP $\gamma$ S 結 合 反 應 。

第 20A-20C 圖 顯 示 經 由 一 生 物 發 光 共 振 能 量 轉 移 (BRET) 方 法 在 HEK293 細 胞 中 藉 由 SDF-1 以 及 藉 由 m414H5 、 c414H5 、 m515H7 與 c515H7 Mabs 調 節 CXCR4 受 體 與 不 同 的 交 互 作 用 搭 檔 的 締 合 (第 20A 圖 : CXCR4 : CXCR4 同 型 - 二 聚 作 用 ; 第 20B 圖 : CXCR2 : CXCR4 異 型 - 二 聚 作 用 ; 第 20C 圖 : CXCR4 - 調 節 的  $\beta$ -抑 制 蛋 白 募 集 ) 。

第 21A 與 21B 圖 顯 示 在 CHO-CXCR4 細 胞 (第 21A 圖 ) 與 U937 細 胞 (第 21B 圖 ) 中 的 SDF-1 - 誘 發 的 鈣 離 子 釋 放 的 抑 制 。

第 22A 與 22B 圖顯示 CXCR4 Mabs m414H5 與 c414H5 (第 22A 圖) 以及 Mabs m515H7 與 c515H7 (第 22B 圖) 在活體外抑制 SDF-1-誘發的 U937 細胞移動。

第 23 圖顯示在 U937 Nod/Scid 小鼠存活模型中的抗-CXCR4 嵌合 Mabs c414H5 與 c515H7 的活性。

### 實施例

#### 實施例 1：CXCR4 與 CXCR2 在癌細胞中的表現

##### *Q-PCR 分析：*

為了定量 CXCR4 與 CXCR2 在不同的癌細胞株中的相對表現，一即時 RT-PCR (real time RT-PCR) 被使用。

RNA 樣品是使用 RNeasy Mini 或 Midi Protocols (Qiagen Corporation, France) 而由不同的細胞株中被萃取。該等 RNA 樣品接而是使用 Experion 自動電泳系統 (Experion automated electrophoresis system) (BIO-RAD Corporation, France) 而被控制，並且顯示一良好的品質 (quality)/完整性 (integrity)。1 μg 的各個 RNA 樣品是使用 iScript cDNA Synthesis 套組 (BIO-RAD Corporation, France) 而被轉換成 cDNA 模版 (cDNA template)。cDNA 位準是使用具有一針對 CXCR2 的 TaqMan 探針 (probe) 或針對 CXCR4 的 SYBERGreen 的 qPCR 而被定量。比較樣品需要標準化 (normalization)，所以內部參考 RPL0 (internal reference RPL0) 被導入。TaqMan 碳針 (針對 CXCR2 而被使用) 攜帶 -5' FAM 報導子標記與 -3' TAMRA 淬滅體基團 (quencher group)。PCR 酶素是藉由在 50 °C 下加熱歷時 2 分鐘與在 95 °C 下歷時 10 分鐘而被活化。一個

兩步驟的處理程序被使用：以一PCR混合物(mix)[在一為50 μL的總體積中含有5 μl的cDNA模版(稀釋1/20)、1x qPCR Mastermix (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems corporation, Branchburg New Jersey, USA)、50至900 nM的各個引子以及50至100 nM的探針]在95°C下15秒以及在62°C下1分鐘歷經40或45個循環。所有反應是使用iCycler儀器(BIO-RAD Corporation)而被執行。Q-PCR允許測定循環臨界值(Cycle threshold, Ct)。Ct值越小，所測試基因越被表現。針對人類核糖體蛋白質大P0 (Human Ribosomal protein, large, P0)的引子以及探針是：

前向引子 (forward primer) ,  
 5'-GAAACTCTGCATTCTCGCTTCCTG-3' (序列辨識編號：32)；

反向引子 (reverse primer) ,  
 5'-AGGACTCGTTGTACCCGTTGA-3' (序列辨識編號：33)；

探針 ,  
 5-(FAM)-TGCAGATTGGCTACCCAAC TGTTGCA-(TAMRA)-3' (序列辨識編號：34)。

針對人類CXCR4 (趨化激素受體4)的引子是：

前向引子，5'-CTCCTTCATCCTCCTGGAAATC-3' (序列辨識編號：35)；

反向引子，5'-CCAAGGAAAGCATAGAGGATGG-3' (序列辨識編號：36)。

針對人類CXCR2(趨化激素受體2)的引子以及探針是：  
 前向引子，5'-GTGGTCATTATCTATGCCCTGG-3' (序  
 列辨識編號：37)；  
 反向引子，5'-CGACCCTGCTGTATAAGATGAC-3' (序  
 列辨識編號：38)；  
 探 鈺 ，  
 5-(FAM)-TATTCCCTGCTGAGCCTGCTGGGAAA-(TAMRA)-  
 3' (序列辨識編號：39)。

在我們的比較研究中，在兩種不同的樣品(被測試的細胞株與一參考細胞株)中兩種基因[被測試的基因(CXCR4或CXCR2)以及RPL0]的表現被定量。參考細胞株對應於含有最低表現的被定量的基因的細胞株。比較基因表現計算(comparative gene expression calculation)是使用下列公式被完成：

$$\text{相對基因表現}(\text{relative gene expression}) = (1+E_{\text{基因}})^{-\Delta Ct}^{(1)} / (1+E_{RPL0})^{-\Delta Ct}^{(2)}$$

$E_{\text{基因}}$ =使用被定量基因的引子/探針的PCR效率

$E_{RPL0}$ =使用RPL0的引子/探針的PCR效率

$Ct$ =臨界值循環(threshold cycle)

$\Delta Ct(1)=Ct_{\text{基因}}(\text{被測試的細胞株})-Ct_{\text{基因}}(\text{參考細胞株})$

$\Delta Ct(2)=Ct_{RPL0}(\text{被測試的細胞株})-Ct_{RPL0}(\text{參考細胞株})$

針對各個PCR系列，一相對基因定量數值被計算，以及癌細胞株考慮它們從最高至負的表現的位準而被分類為群組。所有數據被呈現在第1A以及1B圖中。除了DU145與

U-87MG針對於CXCR2之外(第1B圖)，所有被測試的癌細胞株表現CXCR4(第1A圖)以及CXCR2。

#### FACS分析：

MDA-MB-231、PC3以及U937癌細胞株被通透化(permabilized)並且接而被培育以10 μg/mL的抗-CXCR4單株抗體[44717 (R&D Systems)相對於它的同型物對照組IgG2b (SIGMA)或10 μg/mL的抗-CXCR2單株抗體(抗h-CXCR2，選殖株48311，R&D Systems，Mab 331相對於同型物對照組IgG2a)。該等細胞接而以1% BSA/PBS/0.01%NaN3予以清洗。接著，Alexa-標定的二級抗體(Alexa-labeled secondary antibodies)被添加至該等細胞並且允許在4°C下培育歷時20分鐘。細胞接而再被清洗兩次。在第二次清洗之後，FACS分析被執行。這些結合研究的結果被提供在第2圖中。因此，腫瘤細胞(諸如，MDA-MB-231、PC3以及U937)表現CXCR4與CXCR2這兩者蛋白質。

#### 實施例2：針對人類CXCR4的單株抗體(Mabs)的產生

為了產生針對CXCR4的單株抗體，Balb/c小鼠被免疫接種以重組型NIH3T3-CXCR4細胞和/或對應於CXCR4細胞外N-端與環(extracellular N-term and loops)的勝肽。對於第一次免疫接種的6-16週大的小鼠，一次性皮下地(subcutaneously, s.c.)被免疫接種以配於完全弗倫氏佐劑(complete Freund's adjuvant)的抗原，繼而2至6次皮下地免疫接種以配於不完全弗倫氏佐劑(incomplete Freund's adjuvant)的抗原。免疫反應是藉由眼後流血而被偵測。血

清是藉由ELISA(有如下面所描述的)而被篩選，並且具有較高效價(titer)的抗-CXCR4抗體的小鼠被使用以供融合。小鼠在犧牲以及移除脾臟之前的兩天被靜脈內地追加免疫(intravenously boost)以抗原。

### *ELISA*

為了選擇生產抗-CXCR4抗體的小鼠，來自經免疫接種的小鼠的血清是藉由ELISA而被測試。簡言之，微滴定量培養盤(microtiter plates)被塗覆以呈一為 $5\text{ }\mu\text{g}$ 等效胜肽(equivalent peptide)/mL， $100\text{ }\mu\text{L}/\text{井(well)}$ 之綴合有BSA的經純化的[1-41] N-端胜肽，於 $4^\circ\text{C}$ 被培育過夜，接而以 $250\text{ }\mu\text{L}/\text{井}$ 之配於PBS中的0.5%明膠(gelatine)予以阻斷。來自CXCR4-免疫的小鼠的稀釋血漿被添加至各井中並且在 $37^\circ\text{C}$ 下予以培育歷時2小時。該等培養盤以PBS予以清洗並且接而在 $37^\circ\text{C}$ 下以綴合有HRP的山羊抗-小鼠IgG抗體(Jackson Laboratories)予以培養歷時1小時。在清洗之後，培養盤以TMB基質予以發展，反應是藉由添加 $100\text{ }\mu\text{L}/\text{井}$ 的 $1\text{M H}_2\text{SO}_4$ 後5分鐘被停止。發展出最高效價的抗-CXCR4抗體的小鼠被用來產生抗體。

會生產出針對CXCR4的*Mabs*的融合瘤(hybridomas)的產生小鼠的脾臟細胞(被分離自發展最高效價的抗-CXCR4抗體的Balb/c小鼠)是以PEG而被融合至一小鼠骨髓瘤細胞株Sp2/O。細胞是呈大約 $1 \times 10^5/\text{井}$ 而被平盤培養於一微滴定量培養盤中，繼而培育在一選擇性培養基(selective medium)[含有超培養基(ultra culture medium)+2 mM L-麩

醯胺酸+1 mM丙酮酸鈉(sodium pyruvate)+1x HAT]中歷時2週。接著，井是藉由針對抗-CXCR4單株IgG抗體的ELISA而被篩選。抗體分泌融合瘤(antibody secreting hybridomas)接而是藉由限制稀釋法(limiting dilution)而被次選殖(subcloned)至少兩次，在活體外被培養俾以產生抗體用於進一步的分析。

### 實施例3：藉由FACS分析的抗-CXCR4 Mabs 414H5與515H7結合專一性以及癌細胞株辨識的特徵鑑定

在本實驗中，專一性結合至人類CXCR4的抗-CXCR4 Mabs 414H5與515H7是藉由FACS分析而被試驗。

經 NIH3T3、NIH3T3-hCXCR4 轉染的細胞、MDA-MB-231、HeLa以及U937癌細胞株被培育以10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的單株抗體414H5與515H7。該等細胞接而以1% BSA/PBS/0.01%  $\text{NaN}_3$ 予以清洗。接著，Alexa-標定的二級抗體被添加至該等細胞並且被允許在4°C下培育歷時20分鐘。該等細胞接而再被清洗兩次。在第二次的清洗之後，FACS分析被執行。這些結合研究的結果被提供在下列的表4中，表4 [藉由FACS而被獲得的平均螢光強度(Mean Fluorescence Intensity, MFI)]顯示抗-CXCR4 Mabs 414H5與515H7會專一性地結合至經人類CXCR4-NIH3T3轉染的細胞株而不會辨識母體NIH3T3細胞(parent NIH3T3 cell)。這些Mab亦能夠辨識人類癌細胞株，例如MDA-MB-231乳癌細胞、U937前骨髓細胞性癌細胞(promyelocytic cancer cell)

以及 Hela 子宮頸癌細胞。

抗 -CXCR4 Mabs 414H5 與 515H7 會辨識 NIH3T3-hCXCR4 轉染物 (transfected) 而不會辨識該母體 NIH3T3 野生型細胞。Mabs 414H5 與 515H7 亦能夠辨識癌細胞株。

表 4

選殖株 (10 μg/ml)	在細胞株上的MFI				
	NIH3T3	NIH3T3-CXCR4	MDA-MB-231	Hela	U937
414H5	21	2162	32	467	95
515H7	16	2752	239	1851	645

**實施例4：在穩定地表現人類CXCR4受體的CHO-K1膜上抗 CXCR4 Mabs 414H5與515H7針對[<sup>125</sup>I]SDF-1的競爭結合**

此分析允許去評估 414H5 與 515H7 Mabs 在原位或異位結合位址 (orthosteric or allosteric binding sites) 上競爭經放射標定的 [<sup>125</sup>I]SDF-1 結合至人類 CXCR4 受體的能力。

穩定地與組成性地表現人類 CXCR4 受體的 CHO-K1 細胞是藉由以一攜帶人類 CXCR4 受體 (RefSeq NM\_003467) 的全部編碼序列的哺乳動物表現載體轉染原初 CHO-K1 細胞 (ATCC CCL-61) 而被獲得。細胞是在一完全培養基 [被補充以 5% 胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) 以及 500 μg/ml 的遺傳黴素 (geneticin) 的 DMEM-Ham's F12] 中被增殖 (propagated)。放射配位子結合實驗 (radioligand binding experiments) 是在細胞膜 [它們是藉由在一溶解緩衝液 (lysis buffer) (Hepes 20 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM) 中機械性刮削

(mechanical scrapping) CHO/CXCR4細胞，繼而離心(10000 g、15分鐘)而被獲得]上被進行。 $[^{125}\text{I}]$ SDF-1結合[比活性(specific activity): 1500 Ci/mmol]是使用SPA技術[閃爍鄰近分析法(scintillation proximity assay)-GE Healthcare]而被執行。簡言之，細胞膜(30  $\mu\text{g}$ /井)連同要評估的化合物(SDF-1或mAb)、放射配位子(1 nM)以及決定性SPA-WGA-PVT珠粒(beads)(7.3 mg/井)被培育在結合緩衝液[Hepes 20 mM、pH 7.4、 $\text{CaCl}_2$  1 mM、 $\text{MgCl}_2$  5mM、 $\text{NaCl}$  150 mM、BSA 1%]中。結合平衡(binding equilibrium)是在25°C下於1小時之後被達到。在離心(1000 g、歷時10分鐘)之後，放射活性計數是使用一閃爍計數器(scintillation counter)(TopCount, Perkin Elmer)而被測量。非-專一性結合是在10  $\mu\text{M}$ 的未經標定的SDF-1的存在下而被估計。

未經標定的SDF-1是呈一為 $7.75 \pm 0.27$  nM ( $n=4$ )的pKi數值( $\text{IC}_{50}$ =產生50%的專一性 $[^{125}\text{I}]$ SDF-1結合的抑制的配位子濃度)而劑量-依賴地(dose-dependently)抑制 $[^{125}\text{I}]$ SDF-1結合(第3A圖)。在相同的實驗條件下，我們的抗-CXCR4 Mabs(100 nM)以下列競爭效力(competition efficacy)的等級次序( $[^{125}\text{I}]$ SDF-1的%抑制)有效地競爭針對 $[^{125}\text{I}]$ SDF-1結合：515H7 ( $64 \pm 3\%$ )、414H5 ( $43 \pm 4\%$ )(第3B圖)。

**實施例5：藉由抗-CXCR4 Mabs 414H5與515H7在表現野生型CXCR4受體的細胞膜上調節 $[^{35}\text{S}]$ GTP $\gamma$ S結合此功能性分析允許監測經由野生型人類CXCR4受體之G蛋白質活化，以及藉由CXCR4配位子以及414H5與515H7**

mAbs之G蛋白質的調節。

穩定地與組成性地表現野生型CXCR4受體的NIH-3T3細胞有如在上面關於CHO-K1細胞的實施例所描述的而被獲得。HeLa (人類子宮頸癌)細胞是在完全培養基(被補充以10% FCS、1% L-麴醯胺酸、2 μM碳酸氫鈉的EMEM)中被增殖。[<sup>35</sup>S]GTPγS結合是在細胞膜[它們是藉由在一溶解緩衝液(Hepes 20 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM)中機械性刮削並且進一步離心(10000 g、15分鐘)而被獲得]上而被執行。[<sup>35</sup>S]GTPγS (比活性：1000 Ci/mmol)的合併(incorporation)與偵測(detection)是使用SPA技術(閃爍鄰近分析法 -GE Healthcare)而被執行。簡言之，細胞膜(10 μg/井)連同要評估的化合物(SDF-1或感興趣的mAb)、[<sup>35</sup>S]GTPγS (0.2-0.4 nM)以及決定性SPA-WGA-PVT珠粒(7.3 mg/井)被培育在結合緩衝液(Hepes 20 mM, GDP 3 μM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH=7.4)中。結合反應是在25°C下於1小時的期間內被執行。在離心(1000 g、歷時10分鐘)之後，放射活性計數是使用一閃爍計數器(TopCount, Perkin Elmer)而被測量。拮抗劑效力(antagonist potency)藉由採用Cheng Prussof公式(Cheng Prussof equation)而被計算：

$K_B = [\text{拮抗劑濃度}] / \{(EC_{50'} / EC_{50}) - 1\}$ ，其中  $EC_{50'}$  與  $EC_{50}$  分別是在mAb不存在以及存在下的SDF-1的效力。

有如藉由CXCR4受體的G蛋白質活化的結果，SDF-1誘發 [<sup>35</sup>S]GTPγS結合的一劑量-依賴增高。就 HeLa 以及 NIH3T3/CXCR4細胞膜而言，[<sup>35</sup>S]GTPγS結合的最大的刺激

分別代表超過基礎的 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合的167%與320%。就這兩個細胞株而言，SDF-1的效力是相似的並且對應於 $41.3 \pm 9.7 \text{ nM}$ (第4A-4B圖)。在這些實驗條件下，414H5以及515H7 Mabs的拮抗劑效力，有如在NIH3T3/CXCR4細胞中所測定的分別為 $51 \text{ nM}$ 與 $15 \text{ nM}$ 。就HeLa細胞而言，相似的拮抗劑效力被觀察到(第5圖)。

**實施例6：CXCR4的締合以不同的交互作用搭檔：經由生物發光共振能量轉移(BRET)方法之同型與異型二聚作用、 $\beta$ -抑制蛋白( $\beta$ -arrestin)的募集，以及414H5與515H7 Mabs對於這些二聚物的影響**

此功能性分析允許評估對於SDF-1和/或414H5與515H7 Mabs在一CXCR4同型-二聚物與CXCR2/CXCR4異型-二聚物形成的位準下結合至CXCR4受體所誘發的構形改變，以及 $\beta$ -抑制蛋白-2信號蛋白質的募集。關於各個被研究的交互作用搭檔的表現載體是藉由採用傳統分子生物學技術而被構築成為具有對應染料[水母螢光素酶(*Renilla reniformis* luciferase, Rluc)以及黃色螢光蛋白質(yellow fluorescent protein, YFP)]的融合蛋白質。在執行BRET實驗之前的兩天，HEK293細胞被暫時性地轉染以編碼對應的BRET搭檔的表現載體：[CXCR4/Rluc+CXCR4/YFP]用以研究CXCR4同型二聚作用、[CXCR4/Rluc+CXCR2:YFP]用以研究CXCR4與CXCR2異型-二聚作用以及[CXCR4/Rluc+ $\beta$ -arr2:YFP]用以研究CXCR4-調節的 $\beta$ -抑制蛋白-2的募集(CXCR4-mediated recruitment of

$\beta$ -arrestin-2)。隔天，細胞被分佈於聚-離胺酸預先-塗覆的白色96 MW培養盤(poly-lysine pre-coated white 96 MW plates)中的完全培養基(被補充以10% FBS的DMEM)中。首先，細胞在37°C下以5% CO<sub>2</sub>予以培養俾以允許細胞貼附(cell attachment)至該培養盤。接而，細胞以200  $\mu$ l DMEM/井予以挨餓(starved)過夜。緊接著在BRET實驗之前，DMEM被移除並且細胞以PBS予以快速地清洗。接而，細胞在加入具有或沒有300 nM SDF-1的5  $\mu$ M腔腸素H (coelenterazine H)而呈一為50  $\mu$ l的最終體積之前，於37°C下被培育在抗體的存在或不存在下的PBS中歷時10分鐘。在37°C下又再歷時10分鐘的培育之後，在485 nm與530 nm下的光-發射獲取(light-emission acquisition)是使用Mithras LB940多重標記讀取機(Mithras LB940 multilabel reader)(Berthold)(在室溫下，1s/波長/井被重複15次)而被起始。

BRET比值的計算有如先前所描述的而被執行(Angers et al., 2000)：[(發射<sub>530 nm</sub>)-(發射<sub>485 nm</sub>) X Cf]/(發射<sub>485 nm</sub>)，其中Cf=在相同的實驗條件下細胞單獨表現Rluc融合蛋白質的(發射<sub>530 nm</sub>)/(發射<sub>485 nm</sub>)。簡化此公式顯示：BRET比值對應於當兩BRET搭檔存在時所獲得的比值530/485 nm，藉由在相同的實驗條件下當在此分析中僅有被融合至Rluc的搭檔存在時所獲得的比值530/485 nm予以校正。為了可讀性的目的，結果被表示為毫BRET單位(milliBRET unit, mBU)；mBU對應於被乘以1000的BRET比值。

SDF1 (300 nM)由於被融合至CXCR4受體的承接體

(adaptor)與受體蛋白質的空間鄰近性(spatial proximity)而被增高達大約20%的BRET信號，這可能表示CXCR4/CXCR4同型-二聚物形成或既存二聚物(pre-existing dimer)的構形改變(第6A與6B圖)。令人感到興趣地，SDF1(300 nM)由於被融合至CXCR2與CXCR4受體的承接體與受體蛋白質的空間鄰近性而被減低達大約24%的BRET信號，這亦可能表示CXCR2/CXCR4異型-二聚物形成或既存二聚物的構形改變(第6C與6D圖)。在後者的這個例子中，經SDF-1活化的CXCR4/CXCR2的構形似乎較不適合於BRET能量轉移。在這兩個例子中，414H5與515H7 Mabs能夠調節關於CXCR4同型-二聚物(就414H5而言SDF-1所誘發的BRET增高的63%抑制，以及就515H7而言SDF-1所誘發的BRET增高的69%抑制分別為第6A與6B圖)以及關於CXCR2/CXCR4異型-二聚物的形成(就414H5而言SDF-1所誘發BRET減低的50%抑制，以及就515H7而言SDF-1所誘發BRET減低的90%抑制分別為第6C與6D圖)的經SDF-1誘發的構形改變。414H5與515H7 Mabs亦能夠分別地藉由它們本身而調節CXCR4/CXCR4以及CXCR2/CXCR4空間鄰近性，這表示414H5與515H7 Mabs對於CXCR4/CXCR4同型與CXCR2/CXCR4異型-二聚物這兩者構形的影響(第6A、6B、6C以及6D圖)。

藉由SDF-1(300 nM)的CXCR4活化產生一強烈的細胞內信號分子 $\beta$ -抑制蛋白的募集，有如在BRET信號中所顯示的達233%增強(第6E與6F圖)。此募集是藉由414H5與515H7

Mabs而被部分地抑制(分別就414H5而言大約20%以及就515H7而言大約95%的抑制，第6E與6F圖)，這顯示Mabs 414H5以及515H7在信號上的效用。

### 實施例7：CXCR4-調節的cAMP生成的抑制

此功能性分析被設計用以監測在經由抑制Gi/o蛋白質之腺苷酸環化酶(adenylate cyclases)的位準下的CXCR4受體信號。

cAMP LANCE處理步驟(Perkin Elmer)是有如被供應者所詳細說明的而被施行。簡言之，穩定地與組成性地表現野生型CXCR4受體的NIH3T3細胞是有如上面所描述的而被獲得以及增殖。細胞是使用無胰蛋白酶維爾烯試劑(trypsin-free agent Versene)予以收集並且以一為 $10^6$ 細胞/ml的濃度被再懸浮於一含有AlexaFluor-結合的抗cAMP Mab (1/100<sup>th</sup>稀釋)以及化合物[佛司可林(forskolin)、SDF-1和/或414H5與515H7 Mabs]的溶液中。於室溫下在培育歷時30分鐘之後，含有铕-鏈黴抗生素蛋白(Europium-Streptavidin)(1/125<sup>th</sup>稀釋)以及生物素-cAMP (1/125<sup>th</sup>稀釋)複合物的偵測混合物(detection mix)被加入。於一室溫下在培育歷時1小時之後，所形成的FRET信號是使用一Mithras LB940多重標記讀取機(Berthold)而被計算。數據被表示為任意的螢光數值或為一在扣除FK效用之後相對於SDF-1反應的相對的刺激。

佛司可林(FK)在NIH3T3/CXCR4細胞中以一大約0.3  $\mu\text{M}$ 的效力劑量-依賴地刺激cAMP生成(第7A圖)。在SDF-1

的共-存在(co-presence)下，細胞內cAMP水準減低由於抑制的Gi/o蛋白質被CXCR4受體所活化。SDF-1的效力為 $5.0 \pm 3.1$  nM(圖7A)。414H5與515H7 Mabs有效地抑制SDF-1 (100 nM)的佛司可林-刺激的結果，就414H5而言達多於60%與就515H7而言達多於80% (第7B圖)。

**實施例8：在組成性地表現活性突變體Asn<sup>119</sup>Ser CXCR4受體的細胞膜上藉由Mabs 414H5以及515H7調節[<sup>35</sup>S]GTPγS結合**

此功能性分析允許經由一組成性活性突變體(constitutively active mutant, CAM) Asn<sup>119</sup>Ser CXCR4受體來監測G蛋白質的活化(參見Zhang et al., 2002)。此靈敏的分析允許區分CXCR4配位子基於它們的內在活性(局部促效劑、默化拮抗劑或反向促效劑)。有如先前由Zhang及同僚所描述的，CXCR4配位子，諸如，AMD3100或T140分別地被表現有如一針對CAM CXCR4受體的局部促效劑與反向促效劑。默化拮抗劑的鑑定可能是困難的因為這種種類的分子對於CXCR4的活性與非活性狀態這兩者必須展現相似的親和力(Wurch et al., 1999)。

在一CXCR4受體的編碼序列中一Asn119Ser突變的導入是藉由採用傳統分子生物學技術[QuickChange定點突變套組(QuickChange site directed mutagenesis kit, Stratagene US)而被執行。穩定地與組成性地表現CAM CXCR4受體的CHO-K1細胞是有如上面在實施例中所描述的而被獲得。[<sup>35</sup>S]GTPγS結合是在細胞膜[它們是藉由在一溶解緩衝液

(lysis buffer)(Hepes 20 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM)中機械性刮削並且進一步離心(10000 g、15分鐘)而被獲得]上被執行。[<sup>35</sup>S]GTPγS(比活性：1000 Ci/mmol)的合併是使用SPA技術(閃爍鄰近分析法-GE Healthcare)被執行。簡言之，細胞膜(10 μg/井)連同要評估的化合物(SDF-1或mAb)、[<sup>35</sup>S]GTPγS (0.2-0.4 nM)與決定性SPA-WGA-PVT珠粒(7.3 mg/井)被培育在結合緩衝液(Hepes 20 mM, GDP 3 μM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH=7.4)中。結合反應是在25°C下於1小時的期間內被執行。在離心(1000 g、歷時10分鐘)之後，放射活性計數是使用一閃爍計數器(TopCount, Perkin Elmer)而被測量。

SDF-1 (100 nM)刺激[<sup>35</sup>S]GTPγS結合達130%。該反向促效劑T140抑制基礎(-17%)與SDF-1-刺激(-159%)這兩者的[<sup>35</sup>S]GTPγS結合。相比之下，414H5與515H7 Mabs表現有如針對CAM CXCR4的默化拮抗劑，沒有改變基礎[<sup>35</sup>S]GTPγS結合(第8圖)但抑制SDF-1誘發的[<sup>35</sup>S]GTPγS結合(第8圖)。

#### **實施例9：藉由CXCR4 Mab 414H5在活體外抑制SDF-1-誘發的HeLa細胞增生**

來自ATCC的HeLa細胞被慣常地培養在EMEM培養基(Lonza Corporation. Verviers. Belgium)、10% FCS (SIGMA Corporation. St Louis. USA)、1% L- 麥醯胺酸(L-Glutamine)(Invitrogen Corporation. Scotland. UK)、2%碳酸氫鈉7.5%溶液(Invitrogen Corporation. Scotland. UK)中。

細胞在增生分析之前三天被分裂(split)而使得它們是匯聚的(confluent)。

### *SDF-1所誘發的HeLa細胞增生*

HeLa細胞以在200  $\mu\text{l}$ 的無血清培養基(serum free medium)(EMEM培養基外加1% L-麴醯胺酸。2%碳酸氫鈉7.5%溶液)中的一為 $1 \times 10^4$ 細胞/井的密度而被平盤培養在96-井組織培養盤(tissue culture plates)中。在平盤培養24小時後，適當稀釋的SDF-1被加入至HeLa細胞。在一總計為76小時的培養之後，細胞被脈衝(pulsed)以0.25  $\mu\text{Ci}$ 的 $[^3\text{H}]$ 胸苷( $[^3\text{H}]$ thymidine)(Amersham Biosciences AB. Uppsala. Sweden)歷時16小時。被併入至DNA中的 $[^3\text{H}]$ 胸苷的量是藉由液體閃爍計數法(liquid scintillation counting)而被定量。

結果被表示為增生指數(proliferation Index)=[細胞的平均cpm+SDF-1/細胞的平均cpm-SDF-1]。

HeLa細胞被培育以SDF-1(0至1000 ng/ml)。SDF-1在活體外刺激HeLa細胞增生1.5至2倍。為了獲得最高的以及可再現性的增生指數的SDF-1的濃度是200 ng/ml (25 nM)。

藉由CXCR4 414H5 Mab在活體外抑制SDF-1-誘發的HeLa細胞增生

HeLa細胞以一在200  $\mu\text{l}$ 的無血清培養基(EMEM培養基外加1% L-麴醯胺酸、2%碳酸氫鈉7.5%溶液)中的一為 $1 \times 10^4$ 細胞/井的密度被平盤培養在一96-井組織培養盤中。在平盤培養後的24小時，適當稀釋的抗-CXCR4 Mab 414H5、稀釋培養基三重複被加入至在SDF-1存在或不存在的HeLa細胞

中呈一為200 ng/ml (25 nM)的最終濃度。在一總計為76小時的培養之後，細胞被脈衝以0.25  $\mu$ Ci的 $[^3\text{H}]$ 胸昔(Amersham Biosciences AB. Uppsala. Sweden)歷時16小時。被併入至DNA中的 $[^3\text{H}]$ 胸昔的量是藉由液體閃爍計數法而被定量。

結果使用方程式被計算而被表示為影響分率(affected fraction, Fa)：

$Fa = [1 - (\frac{\text{被培育以Mab的細胞的平均cpm} + \text{SDF-1}}{\text{被培育以稀釋培養基的細胞的平均cpm} + \text{SDF-1}})] \times 100$ 。

抗-CXCR4 Mab 414H5對於SDF-1-誘發的HeLa細胞增生的活體外效用(*in vitro effect*)被描述。HeLa細胞被培育以具有或沒有SDF-1 (200 ng/ml)的414H5 Mab或對照組(control)。SDF-1刺激HeLa細胞在活體外的生長(1.5至2倍)。關於414H5的劑量-反應曲線(dose-response curve)是藉由在細胞平盤培養之後將細胞處理以範圍從0至1500 nM的Mab的序列2倍稀釋(serial two fold dilutions)歷時24小時而被獲得。當在平盤培養之後的細胞增生被評估歷時76小時，就Mab或對照組而言各個測試條件對應於一為48小時暴露時間(exposure time)。結果是使用上面所描述的Fa方程式而被表示為影響分率。該等結果(被表示在第9圖中)顯示CXCR4 Mab 414H5在活體外抑制SDF-1-誘發的Hela細胞增生。

#### 實施例10：抗-CXCR4 Mabs 414H5與515H7對於SDF-1-誘發的U937細胞移動(cells migration)的效用

為了評估抗-CXCR4單株抗體414H5以及515H7對於移

動過程的抑制效用，在被補充以2% FCS的RPMI 1640培養基中的100,000個U-937細胞被平盤培養在一移動室(migration chambers)[具有8- $\mu\text{m}$ 孔徑(pore size)的24井培養盤]的上方小室中，該等井的下面部分有SDF-1的存在或不存在以及在該上方小室中具有或沒有Mabs 414H5與515H7。在此測試中，鼠IgG2a與IgG2B被導入作為一同型物對照組。在平盤培養後的2小時，移動的細胞被計數。被呈現在關於414H5的第10A圖以及關於515H7的第10B圖的結果證實：如預期的，SDF-1能夠誘發一顯著增高的U-937細胞移動。當細胞被培育以IgG2同型對照組，沒有效用被觀察到。相比之下，就被培育以414H5與515H7 Mabs的細胞而言，在SDF-1-誘發U937細胞移動上的一顯著的並且可再現性的減低被觀察到：就414H5 Mab而言50%以及就515H7 Mab而言超過80%。

#### **實施例11：抗-CXCR4 Mab 414H5在Nod/Scid小鼠中抑制MDA-MB-231異種移植(xenograft)的腫瘤生長**

這些實驗的目的是為了評估在Nod/Scid小鼠中抗-CXCR4 Mabs 414H5與515H7抑制MDB-MB-231異種移植的生長的能力。

來自ECACC的MDA-MB-231細胞被慣常地培養在DMEM培養基(Invitrogen Corporation, Scotland, UK)、10%FCS(Sigma, St Louis MD, USA)中。細胞在移植(engraftment)之前被分裂48小時以使得它們在生長的指數期(exponential phase of growth)。在PBS中的一千萬的

MDA-MB-231細胞被移植至7週大的Nod/Scid小鼠(Charles River, France)。在植入(implantation)之後的5天，腫瘤是可測量的( $34 \text{ mm}^3 < V^3 < 40 \text{ mm}^3$ )並且以可比較的腫瘤大小而被區分成6隻小鼠的群組。小鼠分別是以2 mg/小鼠裝填劑量/loading dose)的Mab 414H5以及Mab 515H7而被i.p.處理。

接而，小鼠一週2次被注射以1mg/劑量/小鼠的Mab 414H5一週2次，或者0.5 mg/劑量/小鼠的Mab 515H7一週3次。在此實驗中一PBS群組被導入作為一對照組群組。腫瘤體積被測量一週2次並且藉由方程式而被計算，該方程式： $\pi/6 \times \text{長度}(\text{length}) \times \text{寬度}(\text{width}) \times \text{高度}(\text{height})$ 。統計分析在各個測量下使用曼-懷特尼檢定(Mann-Whitney test)而被執行。

在這些實驗中，在處理期間沒有死亡率(mortality)被觀察到。相較於PBS群組，就415H5 Mab 1 mg/劑量或515H7 0.5 mg/劑量而言在D7與D39 ( $p \leq 0.002$ )之間沒有顯著的腫瘤生長的抑制，並且相較於PBS，就Mab 415H5與515H7而言平均腫瘤體積在5週的處理後分別地減低達82%與50% (圖11A與11B)。

#### 實施例12：在U937小鼠存活模型(survival model)中的抗-CXCR4 Mab 414H5活性

來自ATCC的U937細胞被培養在RPMI 1640培養基、10% FCS、1% L-麩醯胺酸中。細胞在移植前的2天被分裂而使得它們在生長的指數期。一千萬個U937細胞被i.p.注射至雌性NOD/SCID小鼠體內。在植入之後的2天，小鼠被s.c.

處理以一為 $2\text{ mg}$ 的414H5 mAb/小鼠的裝填劑量並且接而一週2次 $1\text{ mg}$ 的抗體/小鼠。對照組小鼠接受PBS注射，有如已經在先前研究中所顯示的：在被注射以PBS的小鼠與被投藥以一小鼠IgG同型對照組的小鼠之間在存活上沒有差異被觀察到。小鼠存活每天被監測。

在第12圖中所描述的結果顯示：被處理以414H5 Mab的小鼠具有一在生命期限中的戲劇性的與顯著的增高(具有大約343的T/C%)。

#### **實施例13：CXCR4受體-調節的細胞內鈣池的調動**

此功能性分析被設計來監測經由磷脂酶C(phospholipase C)途徑的刺激的CXCR4受體信號，誘發鈣離子(calcium)從來自內質網(endoplasmic reticulum)的細胞內儲池(intracellular stores)的釋出(liberation)。

穩定地與組成性地表現野生型CXCR4受體的CHO-K1細胞是有如在上面實施例中所描述的而被獲得。MDA-MB-231 [人類乳腺癌(human breast adenocarcinoma)]以及U937 (人類淋巴瘤)細胞在完全培養基{分別是(被補充以10% FCS的DMEM)以及[被補充以10% FCS、 $20\text{ mM}$  HEPES、1%非-必需胺基酸溶液(non-essential amino acid solution)、1%丙酮酸鈉(sodium pyruvate)、1% L-麩醯胺酸、 $4.5\text{ g/l}$ 葡萄糖(glucose)的RPMI 1640]}中被增殖。所有細胞類型是以一在適當的培養基中的100,000個細胞/井的細胞密度而被平盤培養在一黑色96MW培養盤內。細胞在進行該實驗之前予以挨餓過夜。細胞被裝填以配於裝填緩衝液

(loading buffer)[HBSS 1x、HEPES 20 mM、丙礦舒酸(Probenicid acid) 25 mM]中的螢光鈣離子染劑(Fluo-4 No Wash, Invitrogen US)，在37°C下歷時30分鐘下，繼而在25°C下歷時30分鐘。SDF-1的刺激是藉由直接注射至各個井中而被執行。關於拮抗作用(antagonism)實驗，在SDF-1之前的至少10分鐘，10 μl的Mab溶液被直接地添加至裝填緩衝液中。動力螢光測量(kinetic fluorescence measurements)是在一多模螢光微量盤讀取機Mithras LB940 (multi-mode fluorescence microplate reader Mithras LB940)(Berthold)上使用下列設定而被執行：在485 nm下的激發(excitation)，在535 nm的發射，在10000任意單位(arbitrary units)的激發能量(excitation energy)。在SDF-1注射前，各個井中的螢光在每秒的0.1秒的期間被紀錄一次並且歷時一為20秒的時間期間(time period)(基礎信號)。接而20 μl的SDF-1被注入並且數據紀錄接著歷時一為2分鐘的時間期間。各個實驗的條件被執行2重複。關於各個井的數值首先會藉由扣除基礎螢光以及沒有細胞的對照組井所發射出的螢光而予以校正。相對的數據被表示為一藉由SDF-1 (100 nM)所獲得的最大刺激(maximal stimulation)的百分比。

在重組型CHO/CXCR4中，SDF1 (100 nM)誘發一快速且強的細胞內鈣離子的釋放，而在原初CHO-K1細胞中沒有螢光信號被偵測到。最大強度達到>超過基礎螢光的160%並且在藉由SDF-1刺激之後的大約30秒被觀察到，相似的動力曲線是以MDA-MB-231與U-937這兩者而被觀察到(第

13A、13B、13C圖)，雖然藉由SDF-1 (100 nM)的最大螢光強度較低(超過基礎的130-140%)。在全部的3個被研究的細胞株中，515H7抗體(133 nM)產生一強的並且幾乎完全抑制SDF-1 (100 nM)-誘發的鈣離子信號。

#### **實施例14：抗-CXCR4 Mab 414H5在Nod/Scid小鼠中抑制T-細胞KARPAS 299異種移植腫瘤生長**

本實驗的目標是為了評估抗-CXCR4 Mab 414H5在Nod/Scid小鼠中抑制的KARPAS 299異種移植的生長的能力。

來自ECACC的KARPAS 299細胞被培養在RPMI培養基、1% L-Glu以及10% FCS (Sigma, St Louis MD, USA)中。細胞在移植前的48小時被分裂以使得它們在成長的指數期。在PBS中的五百萬KARPAS 299細胞被移植至7週大的Nod/Scid小鼠(Charles River, France)。在植入之後的5天，腫瘤是可測量到的( $32 \text{ mm}^3 < V^3 < 49 \text{ mm}^3$ )並且動物以可比較的腫瘤大小而被區分成6隻小鼠的群組。小鼠被i.p.處理以一為2 mg/小鼠裝填劑量的Mab 414H5。

接而，小鼠被注射以1 mg/劑量/小鼠的Mab 414H5一週2次。在本實驗中，一PBS群組被導入作為一控制群組。腫瘤體積被測量一週2次並且藉由方程式而被計算，該方程式： $\pi/6 \times \text{長度} \times \text{寬度} \times \text{高度}$ 。統計分析是使用曼-懷特尼檢定而在各個測量時被執行。

在本實驗中，在處理期間沒有死亡率被觀察到。相較於PBS群組，就414H5 Mab 1mg/劑量而言在D7與D33

( $p \leq 0.002$ ) 之間沒有一顯著的腫瘤生長的抑制並且相較於 PBS，就 Mab 414H5 而言在 5 週的處理後的平均的腫瘤體積被減低達 73% (第 14 圖)。

### 實施例 15：在 U937 小鼠存活模型中的抗-CXCR4 Mab 515H7 活性

來自 ATCC 的 U937 細胞被培養在一 RPMI 1640 培養基、10% FCS、1% L-麩醯胺酸中。細胞在移植之前的 2 天被分裂以使得它們在一生長的指數期。1 千萬個 U937 細胞被 i.p. 注射至雌性 NOD/SCID 小鼠。在植入之後的 2 天，小鼠被 s.c. 處理以一為 2 mg 的 515H7 Mab/ 小鼠的裝填劑量並且接而 1 mg 的抗體/老鼠一週 2 次。接受 PBS 注射的對照組小鼠有如在先前研究中所顯示的：被注射以 PBS 的小鼠以及被投藥以一小鼠 IgG 同型對照組的小鼠之間在存活上沒有差異被觀察到。小鼠的存活每天被監測。

在第 15 圖中所描述的結果顯示：小鼠被處理以 515H7 Mab 具有一在生命期限中的戲劇性的與顯著的增高，就 515H7 Mab 而言具有大約 280 的 T/C% (第 15 圖)。

### 實施例 16：抗-CXCR4 Mab 515H7 在 Nod/Scid 小鼠中抑制 T-cell KARPAS 299 異種移植腫瘤生長

本實驗的目的是為了評估抗-CXCR4 Mab 515H7 在 Nod/Scid 小鼠中抑制 KARPAS 299 異種移植的生長的能力。

來自 ECACC 的 KARPAS 299 細胞被培養在 RPMI 培養基、1% L-Glu 以及 10% FCS (Sigma, St Louis MD, USA) 中。細胞在移植前的 48 小時被分裂以使得它們在成長的指數

期。在PBS中的五百萬KARPAS 299細胞被移植至7週大的Nod/Scid小鼠(Charles River, France)。在植入之後的5天，腫瘤是可測量到的( $32 \text{ mm}^3 < V^3 < 49 \text{ mm}^3$ )並且動物以可比較的腫瘤大小而被區分成6隻小鼠的群組。小鼠被i.p.處理以一為2 mg/小鼠裝填劑量的Mab 515H7。

接而，小鼠被注射以1 mg/劑量/小鼠的Mab 515H7一週2次。在本實驗中，一PBS群組被導入作為一對照組群組。腫瘤體積被測量一週2次並且藉由方程式而被計算，該方程式： $\pi/6 \times \text{長度} \times \text{寬度} \times \text{高度}$ 。統計分析是使用曼-懷特尼檢定而在各個測量時被執行。

在本實驗中，在處理期間沒有死亡率被觀察到。相較於PBS群組，就515H7Mab 1 mg/劑量而言在D7與D33 ( $p \leq 0.002$ )之間沒有一顯著的腫瘤生長的抑制並且相較於PBS，就Mab 515H7而言，在5週的處理後平均的腫瘤體積被減低達63% (第14圖)。

#### **實施例17：抗-CXCR4的嵌合Mabs c414H5與c515H7 (anti-CXCR4 chimeric Mabs c414H5 and c515H7)的產生**

鼠414H5與515H7 Mabs的嵌合形式被設計：它們對應於感興趣的鼠抗體的輕與重鏈變異性領域，遺傳地融合至人類C $\kappa$ 與IgG1恆定領域(human C $\kappa$ appa and IgG1 constant domains)。所有重組型Mabs是藉由使用具有一pCEP4表現載體(Invitrogen, US)的HEK293/EBNA系統的暫時性轉染(transient transfection)之後而被產生。

對應於414H5與515H7 Mabs的輕與重鏈的變異性領域的整體核苷酸序列是藉由全面性基因合成(global gene synthesis)(Genecust, Luxembourg)而被合成。它們被次選殖至一攜帶有一人類IgG1免疫球蛋白的輕[C<sub>K</sub>]或重鏈[CH1-樞鈕(hinge)-CH2-CH3]的恆定領域的整體編碼序列的pCEP4載體(Invitrogen, US)。所有選殖步驟是依據有如在實驗室手冊中所描述的傳統分子生物學技術(Sambrook and Russel, 2001)或依據供應商的指引(instructions)被執行。各個基因建構物是藉由使用Big Dye終止子循環定序套組(Big Dye terminator cycle sequencing kit)(Applied Biosystems, US)的核苷酸定序而被充分地確認並且使用3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, US)予以分析。

懸浮-適應的HEK293 EBNA細胞(Suspension-adapted HEK293 EBNA cells)(Invitrogen, US)被慣常地生長於在一迴轉式振盪器(orbital shaker)(110 rpm旋轉速度)上的250 ml 培養瓶(flasks)的50 ml的被補充以6 mM麴醯胺酸的無-血清 培養基Excell 293 (SAFC Biosciences)中。暫時性轉染是使 用被配製於水中呈一為1 mg/ml的經混合的最終濃度的線 性25 kDa聚乙烯亞胺(polyethyleneimine, PEI)(Polysciences) 以及質體DNA (plasmid DNA)(就1：1的重對輕鏈質體比例 的1.25 μg/ml的最終濃度)而以2.106細胞/ml被執行。在4小 時轉染後，培養物被稀釋以一體積的新鮮培養基俾以達到 一為106細胞/ml的最終細胞密度。培養過程是根據細胞可 活性(cell viability)與Mab生成而被監測。典型地，培養物被

維持歷時4至5天。Mabs是使用在一蛋白質A樹脂(Protein A resin)(GE Healthcare, US)上的傳統層析方法而被純化。所有不同的Mabs是以適合於功能性評估的位準而被產生。生產率位準(productivity level)典型地範圍落在6以及15 mg/l的經純化的Mabs之間。

**實施例 18：藉由 FACS 分析抗-CXCR4 的嵌合 Mabs c414H5 與 c515H7 的結合專一性與癌細胞株辨識的特徵**

在本實驗中，專一性結合至人類CXCR4的抗-CXCR4的嵌合Mabs c414H5與c515H7是藉由FACS分析而被檢查。

經 NIH3T3、NIH3T3-hCXCR4 轉染的細胞以及 MDA-MB-231細胞株被培育以 10 µg/mL 的單株抗體c414H5 與c515H7。該等細胞接而以 1% BSA/PBS/0.01% NaN3 予以清洗。接著，Alexa-標定的二級抗體被添加至該等細胞並且被允許在 4°C 下培育歷時 20 分鐘。該等細胞接而再被清洗 2 次。在第 2 次的清洗之後，FACS 分析被執行。這些結合研究的結果被提供在下列表 5 中，表 5 顯示[藉由 FACS 所獲得的平均螢光強度(MFI)]：抗-CXCR4 的嵌合 Mabs c414H5 與 c515H7 專一性地結合至經人類 CXCR4-NIH3T3 轉染的細胞株並且亦辨識人類癌細胞株，例如，乳癌 MDA-MB-231 細胞。

表 5

選殖株 (10 µg/ml)	在細胞株上的MFI	
	NIH3T3-CXCR4	MDA-MB-231
c414H5	1039	未經測試

**實施例19：在穩定地表現人類CXCR4受體的CHO-K1膜上抗-CXCR4鼠Mabs m414H5與m515H7以及嵌合Mabs c414H5與c515H7針對[<sup>125</sup>I]SDF-1的競爭結合**

此分析允許評估鼠Mabs m414H5、m515H7以及嵌合Mabs c414H5、c515H7在原位或異位的結合位址上競爭針對經放射標定的[<sup>125</sup>I]SDF-1的結合至人類CXCR4受體的能力。

穩定地並且組成性地表現人類CXCR4受體的CHO-K1細胞是藉由轉染以一攜帶有全部人類CXCR4受體的編碼序列(RefSeq NM\_003467)的哺乳動物表現載體的原初CHO-K1細胞(ATCC CCL-61)而被獲得。細胞是在一完全培養基[被補充以5%胎牛血清(FCS)以及500 μg/ml的遺傳黴素的DMEM-Ham's F12]中被增殖。放射配位子結合實驗是在細胞膜[它們是藉由在溶解緩衝液(Hepes 20mM, pH 7.4, NaCl 150mM)中機械性刮削CHO/CXCR4細胞，繼而離心(10000 g、15分鐘)之後而被獲得]上被進行。[<sup>125</sup>I]SDF-1結合(比活性：1500 Ci/mmol)是使用SPA技術(閃爍鄰近分析法-GE Healthcare)而被執行。簡言之，細胞膜(30 μg/井)連同要評估的化合物(SDF-1或mAb)、放射配位子(1 nM)以及決定性SPA-WGA-PVT珠粒(7.3 mg/井)被培育在結合緩衝液(Hepes 20 mM, pH 7.4, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 150mM, BSA 1%)中。結合平衡是在25°C下於1小時後被達

到。在離心(1000 g歷時10分鐘)之後，放射配位子計數是使用一閃爍計數器(TopCount, Perkin Elmer)而被測量。非-專一性(NS)結合是在10 μM的未被標定的SDF-1的存在下被估計。

抗-CXCR4 Mabs (100 nM) 以下列競爭效力(competition efficacy)的等級次序([<sup>125</sup>I]SDF-1的%抑制)有效率地針對[<sup>125</sup>I]SDF-1結合競爭：m515H7 (62±10%)、c515H7 (55±4%)、m414H5 (30±5%)以及c414H5 (21±10%)(第17圖)。

**實施例20：藉由抗-CXCR4鼠Mabs m414H5與m515H7以及  
嵌合Mabs c414H5與c515H7在表現野生型  
CXCR4受體的細胞膜上調節[<sup>35</sup>S]GTPγS結合**

此功能性分析允許監測經由野生型人類CXCR4受體的G蛋白質活化以及藉由抗-CXCR4鼠Mabs m414H5與m515H7以及嵌合Mabs c414H5與c515H7之G蛋白質的調節。

穩定地並且組成性地表現野生-型CXCR4受體的NIH-3T3細胞有如在上面實施例關於CHO-K1細胞所描述的而被獲得。HeLa (人類子宮頸癌)細胞是在一完全培養基(被補充以10% FCS、1% L-麩醯胺酸、2 μM碳酸氫鈉的EMEM)中被增殖。[<sup>35</sup>S]GTPγS結合是在細胞膜[它們藉由在溶解緩衝液中(Hepes 20 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM)機械性刮削並且進一步離心(10000 g、15分鐘)而被獲得]上而被執行。[<sup>35</sup>S]GTPγS(比活性：1000 Ci/mmol)的合併與偵測是使

用 SPA 技術(閃爍鄰近分析法-GE Healthcare)而被執行。簡言之，細胞膜( $10 \mu\text{g}/\text{井}$ )連同要評估的化合物(SDF-1 以及感興趣的 Mab)、 $[^{35}\text{S}]GTP\gamma\text{S}$  ( $0.2\text{-}0.4 \text{ nM}$ ) 以及 決定性 SPA-WGA-PVT 珠粒( $7.3 \text{ mg}/\text{井}$ )被培育在結合緩衝液(Hepes  $20 \text{ mM}$ , GDP  $3 \mu\text{M}$ ,  $\text{MgCl}_2 10 \text{ mM}$ ,  $\text{NaCl } 100 \text{ mM}$ , EDTA  $1 \text{ mM}$ , pH=7.4)中。結合反應是在  $25^\circ\text{C}$  下於 1 小時的期間內被執行。在離心( $1000 \text{ g}$  歷時 10 分鐘)之後，放射活性計數是使用閃爍計數器(TopCount, Perkin Elmer)而被測量。針對各個 Mab 的  $\text{IC}_{50}$  被計算。

在這些實驗條件下，有如在 NIH3T3/CXCR4 細胞中所決定的，m414H5、c414H5、m515H7 以及 c515H7 Mabs 的  $\text{IC}_{50}$  分別是  $1.6 \text{ nM}$ 、 $1.1 \text{ nM}$ 、 $1.9 \text{ nM}$  以及  $1.5 \text{ nM}$  (第 18 圖)。在相同實驗條件下使用 HeLa 細胞所測定的 m414H5、c414H5、m515H7 以及 c515H7 Mabs 的  $\text{IC}_{50}$  分別是  $0.5 \text{ nM}$ 、 $0.3 \text{ nM}$ 、 $0.2 \text{ nM}$  以及  $0.6 \text{ nM}$  (第 19 圖)。

**實施例 21：CXCR4 與不同交互作用搭檔的締合：經由生物發光共振能量轉移(BRET)方法之同型以及異型二聚作用、 $\beta$ -抑制蛋白的募集，以及鼠 Mabs m414H5、m515H7 與嵌合 Mabs c414H5 與 c515H7 對於這些二聚物的效用**

此功能性分析允許評估對於 SDF-1 和 / 或 m414H5、m515H7 鼠 Mabs 與 c414H5 和 c515H7 嵌合 Mabs 在一 CXCR4 同型-二聚物與 CXCR2/CXCR4 異型-二聚物形成的位準下結合至 CXCR4 受體所誘發的構形改變，以及  $\beta$ -抑制蛋白-2

信號蛋白質的募集。

關於各個被研究的交互作用搭檔的表現載體是藉由採用傳統分子生物學技術而被構築成為具有對應染料[水母螢光素酶(Rluc)以及黃色螢光蛋白質(YFP)]的融合蛋白質。在執行BRET實驗之前的兩天，HEK293細胞被暫時性地轉染以編碼對應的BRET搭檔的表現載體：[CXCR4/Rluc+CXCR4/YFP]用以研究CXCR4同型二聚作用、[CXCR4-Rluc+CXCR2-YFP]用以研究CXCR4與CXCR2異型-二聚作用以及[CXCR4-Rluc+β-arr2-YFP]用以研究CXCR4-調節的β-抑制蛋白-2的募集。隔天，細胞被分佈於聚-離胺酸(poly-lysine)預先-塗覆的白色96MW培養盤中的完全培養基(被補充以10% FBS的DMEM)中。首先，細胞在37°C下以5% CO<sub>2</sub>予以培養俾以允許細胞貼附至該培養盤。接而，細胞以200 μl DMEM/井予以挨餓過夜。緊接著在BRET實驗之前，DMEM被移除並且細胞以PBS予以快速地清洗。接而，細胞在加入具有或沒有SDF-1 300 nM的5 μM腔腸素H而呈一為50 μl的最終體積之前於37°C下被培育在抗體的存在或不存在下的PBS中歷時10分鐘。於37°C下在培育歷時5分鐘並且僅針對同型與異型-二聚物在室溫下又再培育歷時20分鐘之後，在485 nm與530 nm下的光-發射獲取是使用Mithras LB940多重標記讀取機(Berthold)(在室溫下，1s/波長/井被重複15次)而被起始。

BRET比值的計算有如先前所描述而被執行(Angers et al., 2000)：[(發射<sub>530 nm</sub>)-(發射<sub>485 nm</sub>) X Cf]/(發射<sub>485 nm</sub>)，其中

$C_f = \frac{\text{發射}_{530\text{ nm}}}{\text{發射}_{485\text{ nm}}}$ 。簡化此公式顯示BRET比值對應於當兩BRET搭檔存在時所獲得的比值 $530/485\text{ nm}$ ，藉由在相同的實驗條件下當在此分析中僅有被融合至Rluc的搭檔存在時所獲得的比值 $530/485\text{ nm}$ 予以校正。為了可讀性的目的，結果被表示為毫BRET單位(milliBRET unit, mBU)；mBU對應於被乘以1000的BRET比值。

SDF1 (100 nM)由於被融合至CXCR4受體的供體與受體蛋白質的空間鄰近性而被增高達大約10%的BRET信號，這可能表示CXCR4/CXCR4同型-二聚物形成或既存二聚物的構形改變(第20A圖)。令人感到興趣地，SDF1 (100 nM)由於被融合至CXCR2與CXCR4受體的供體與受體蛋白質的空間鄰近性而被減低達大約17%的BRET信號，這亦可能表示CXCR2/CXCR4異型-二聚物形成或既存二聚物的構形改變(第20B圖)。在後者的這個例子中，經SDF-1-活化的CXCR4/CXCR2的構形似乎較不適合於BRET能量轉移。在這兩個例子中，m414H5、c414H5與m515H7、c515H7 Mabs能夠調節關於CXCR4同型-二聚物(就c414H5而言SDF-1-誘發的BRET增高的75%抑制以及就c515H7而言SDF-1-誘發的BRET增高的96%抑制，第20A圖)以及關於CXCR2/CXCR4異型-二聚物形成(就c414H5而言SDF-1-誘發的BRET減低的77%抑制以及就c515H7而言SDF-1-誘發的BRET減低的98%抑制，第20B圖)的經SDF-1-誘發的構形改變。m414H5、c414H5、m515H7以及c515H7 Mabs亦能夠

分別地藉由它們本身而調節 CXCR4/CXCR4 以及 CXCR2/CXCR4 空間鄰近性，表示這些 Mabs 對於 CXCR4/CXCR4 同型與 CXCR2/CXCR4 異型-二聚物這兩者的形成的影响(第 20A 與 20B 圖)。

藉由 SDF-1 (100 nM) 的 CXCR4 活化產生一強烈的細胞內信號分子  $\beta$ -抑制蛋白的募集，有如在 BRET 信號中所顯示的達 400% 增強(第 20C 圖)。此募集是藉由 c414H5 以及 c515H7 Mabs 而被部分地抑制(就 c414H5 而言大約 63% 以及就 c515H7 而言 93% 的抑制，第 20C 圖)，這顯示這些 Mabs 在信號上的效用。

#### 實施例 22：CXCR4 受體-調節細胞內鈣池的調動

此功能性分析被設計來監測經由磷脂酶 C 路徑刺激的 CXCR4 受體信號，誘發鈣離子從來自內質網的細胞內儲池釋出。

穩定地並且組成性地表現野生-型 CXCR4 受體的 CHO-K1 細胞是有如在上面實施例中所描述的而被獲得。U937 (人類淋巴瘤) 細胞在完全培養基，分別是(被補充以 10% FCS 的 DMEM) 以及(被補充以 10% FCS、20 mM HEPES、1% 非-必需胺基酸溶液、1% 丙酮酸鈉、1% L-麩醯胺酸、4.5 g/l 葡萄糖的 RPMI 1640) 中被增殖。所有細胞類型是以一在適當的培養基中的 100,000 個細胞/井的細胞密度而被平盤培養在一黑色 96MW 培養盤內。細胞在進行該實驗之前予以挨餓過夜。細胞被裝填以配在裝填緩衝液 (HBSS 1x、HEPES 20 mM、丙礦舒酸 25 mM) 中的螢光鈣離子染劑

(Fluo-4 No Wash, Invitrogen US)，在37°C下歷時30分鐘，繼而在25°C下歷時30分鐘。SDF-1的刺激是藉由直接注射至各個井中而被執行。關於拮抗作用實驗，在SDF-1之前的至少10分鐘，10  $\mu$ l的Mab溶液被直接地添加至裝填緩衝液中。動力螢光測量是在一多模螢光微量盤讀取機Mithras LB940(Berthold)上使用下列設定而被執行：在485 nm下的激發，在535 nm的發射，在10000任意單位的激發能量。在SDF-1注射前，各個井中的螢光在每秒的0.1秒的期間被紀錄一次並且歷時一為20秒的時間期間(基礎信號)。接而20  $\mu$ l的SDF-1被注入並且數據紀錄接著歷時一為2分鐘的時間期間。各個實驗的條件被執行2重複。關於各個井的數值首先會藉由扣除基礎螢光以及沒有細胞的對照組井所發射出的螢光而被校正。相對的數據被表示為一藉由SDF-1 (100 nM)所獲得的最大刺激(maximal stimulation)的百分比。

在重組型CHO/CXCR4中，SDF1 (100 nM)誘發一快速且強的細胞內鈣離子的釋放，而在原初CHO-K1細胞中沒有螢光信號被偵測到。最大強度達到>超過基礎螢光的140%並且在藉由SDF-1刺激之後的大約40秒被觀察到，相似的動力曲線是以U-937被觀察到(第21A、21B圖)，雖然藉由SDF-1 (100 nM)的最大螢光強度較低(超過基礎的130-140%)。在所研究的細胞株這兩者中，嵌合抗體c515H7 (133 nM)產生一強的並且幾乎完全抑制的SDF-1 (100 nM)-誘發的鈣離子信號。

**實施例23：抗-CXCR4鼠Mabs m414H5、m515H7與嵌合**

## Mabs c414H5、c515H7對於SDF-1-誘發的U937 細胞移動的效用

為了評估抗-CXCR4 Mabs m414H5、m515H7、c414H5與c515H7對於移動過程的抑制效用，在被補充以2% FCS的RPMI 1640培養基中的100,000個U-937細胞被平盤培養在一移動室 [具有8- $\mu\text{m}$ 孔徑的24井培養盤]的上方小室中，該等井的下面部分有SDF-1的存在或不存在以及在該上方小室中具有或沒有Mabs c414H5、m414H5、c515H7與m515H7。在此測試中，鼠IgG2a與IgG2b被導入作為一同型對照組。在平盤培養後的2小時，移動的細胞被計數。被呈現在關於c414H5相對於m414H5的第22A圖中以及關於c515H7相對於m515H7的22B圖中的結果證實：如所預期的，SDF-1能夠誘發一顯著增高的U-937細胞移動。當細胞被培育以IgG2同型對照組，沒有效用被觀察到。相比之下，就培育以c414H5、m414H5、c515H7以及m515H7 Mabs的細胞而言，在SDF-1-誘發U937細胞移動上一顯著的並且可再現性的減低被觀察到：就c414H5與m414H5 Mabs而言大約50%以及就c515H7與m515H7 Mabs而言超過80%。

### 實施例24：在U937小鼠存活模型中的抗-CXCR4嵌合Mabs c414H5與c515H7活性

來在ATCC的U937細胞被培養在RPMI 1640培養基、10% FCS、1% L-麩醯胺酸中。細胞在移植之前的2天被分裂而使得它們在生長的指數期。一千萬個U937細胞被i.p.注射至雌性NOD/SCID小鼠體內。在植入之後的2天，小鼠

被 s.c. 處理以一為 2 mg 的 c414H5 或 c515H7 Mab / 小鼠 的 裝 填 劑 量 並 且 接 而 一 週 2 次 1 mg 的 抗 體 / 小 鼠 。 對 照 組 小 鼠 接 受 PBS 注 射 ， 有 如 已 經 在 先 前 研 究 中 所 顯 示 的 : 在 被 注 射 以 PBS 小 鼠 以 及 被 投 藥 以 一 小 鼠 IgG 同 型 對 照 組 的 小 鼠 之 間 在 存 活 上 沒 有 差 異 被 觀 察 到 。 小 鼠 存 活 每 天 被 監 測 。

在 第 23 圖 中 所 描 述 的 結 果 顯 示 : 被 處 理 以 c414H5 與 c515H7 Mabs 的 小 鼠 具 有 一 在 生 命 期 限 中 的 戲 劇 性 的 與 顯 著 的 增 高 ( 就 c414H5 以 及 c515H7 而 言 分 別 地 具 有 大 約 210 與 180 的 T/C% ) 。

### 【 圖 式 簡 單 說 明 】

第 1A 與 1B 圖 分 別 顯 示 藉 由 qPCR 分 析 在 癌 細 胞 中 的 CXCR4 與 CXCR2 的 表 現 。

第 2 圖 顯 示 藉 由 FACS 分 析 在 癌 細 胞 中 的 CXCR4 與 CXCR2 的 蛋 白 質 表 現 。

第 3A 與 3B 圖 顯 示 在 穩 定 表 現 野 生 型 人 類 CXCR4 的 CHO-K1 細 胞 的 細 胞 膜 上 , 未 標 定 的 SDF-1 ( 第 3A 圖 ) 以 及 414H5 與 515H7 Mabs ( 第 3B 圖 ) 競 爭 專 一 性 [<sup>125</sup>I]SDF1 結 合 ( T : 總 結 合 ; NS : 非 - 專 一 性 結 合 ) 。

第 4A 與 4B 圖 顯 示 由 414H5 Mab ( 第 4A 圖 ) 與 515H7 Mab ( 第 4B 圖 ) 所 調 節 的 G 蛋 白 質 活 化 是 藉 由 監 測 在 被 穩 定 地 表 現 在 NIH-3T3 細 胞 上 的 野 生 型 CXCR4 受 體 的 [<sup>35</sup>S]GTPγS 結 合 反 應 。

第 5 圖 顯 示 由 抗 -CXCR4 Mabs 414H5 與 515H7 所 調 節 的 G 蛋 白 質 活 化 是 藉 由 監 測 在 經 SDF-1 ( 10 以 及 100 nM ) 刺 激

的HeLa腫瘤細胞中的 $[^{35}\text{S}]GTP\gamma\text{S}$ 結合反應。

第6A-6F圖顯示經由一生物發光共振能量轉移(BRET)方法在HEK-293細胞中藉由SDF-1以及藉由414H5與515H7 Mabs調節CXCR4受體與不同的交互作用搭檔的締合 [第6A與6B圖：CXCR4：CXCR4同型-二聚作用；第6C與6D圖：CXCR2：CXCR4異型-二聚作用；第6E與6F圖：CXCR4-調節的 $\beta$ -抑制蛋白募集]。

第7A與7B圖顯示在穩定表現CXCR4受體的NIH3T3細胞中藉由SDF-1以及藉由414H5與515H7 Mabs抑制的佛司可林-刺激的cAMP生成。

第8圖顯示由抗-CXCR4 Mabs 414H5與515H7所調節的G蛋白質活化是藉由監測在被穩定地表現在CHO-K1細胞上的組成性低活化突變體Asn<sup>119</sup>Ser CXCR4受體的 $[^{35}\text{S}]GTP\gamma\text{S}$ 結合反應。

第9圖例示說明Mab 414H5在活體外抑制SDF-1所誘發的HeLa細胞增生。

第10A與10B圖顯示CXCR4 Mab 414H5(第10A圖)與Mab 515H7(第10B圖)在活體外抑制SDF-1-所誘發的U937細胞移動。

第11圖顯示抗-CXCR4 Mab 414H5(A)與Mab 515H7(B)抑制在Nod/Scid小鼠中的MDA-MB-231異種移植腫瘤生長。

第12圖顯示在U937 Nod/Scid小鼠存活模型中的抗-CXCR4 Mab 414H5活性。

第13A-13C圖顯示在CHO-CXCR4細胞(第13A圖)與

MDA-MB-231 (第 13B 圖)、U937 (第 13C 圖)癌細胞中，抗-CXCR4 Mab 515H7 抑制 SDF-1 所誘發的鈣離子釋放。

第 14 圖顯示 414H5 抑制在 Nod/Scid 小鼠中的 T-細胞 KARPAS 299 異種移植腫瘤。

第 15 圖顯示在 U937 Nod/Scid 小鼠存活模型中的鼠抗-CXCR4 Mab m515H7 的活性。

第 16 圖顯示鼠抗 -CXCR4 Mab m515H7 在抑制在 Nod/Scid 小鼠中的 T-細胞 KARPAS 299 異種移植腫瘤生長上的活性。

第 17 圖顯示在穩定表現野生型人類 CXCR4 的 CHO-K1 細胞的細胞膜上，鼠 m414H5 與 m515H7 以及嵌合 Mabs c414H5 與 c515H7 競爭專一性  $[^{125}\text{I}]$ SDF1 結合 (T：總結合；NS：非-專一性結合)。

第 18 圖顯示由鼠 m414H5 與 m515H7 Mabs 以及由嵌合 Mabs c414H5 與 c515H7 所調節的 G 蛋白質活化是藉由監測在被穩定地表現在經 SDF-1 (10 nM) 刺激的 NIH-3T3 細胞中的  $[^{35}\text{S}]$ GTP $\gamma$ S 結合反應。

第 19 圖顯示由鼠 m414H5 與 m515H7 Mabs 以及嵌合 Mabs c414H5 與 c515H7 所調節的 G 蛋白質活化是藉由監測在經 SDF-1 (10 nM) 刺激的 HeLa 人類腫瘤細胞中的  $[^{35}\text{S}]$ GTP $\gamma$ S 結合反應。

第 20A-20C 圖顯示經由一生物發光共振能量轉移 (BRET) 方法在 HEK293 細胞中藉由 SDF-1 以及藉由 m414H5、c414H5、m515H7 與 c515H7 Mabs 調節 CXCR4 受

體與不同的交互作用搭檔的締合(第20A圖：CXCR4：CXCR4同型-二聚作用；第20B圖：CXCR2：CXCR4異型-二聚作用；第20C圖：CXCR4-調節的β-抑制蛋白募集)。

第21A與21B圖顯示在CHO-CXCR4細胞(第21A圖)與U937細胞(第21B圖)中的SDF-1-誘發的鈣離子釋放的抑制。

第22A與22B圖顯示CXCR4 Mabs m414H5與c414H5(第22A圖)以及Mabs m515H7與c515H7(第22B圖)在活體外抑制SDF-1-誘發的U937細胞移動。

第23圖顯示在U937 Nod/Scid小鼠存活模型中的抗-CXCR4嵌合Mabs c414H5與c515H7的活性。

#### 【主要元件符號說明】

(無)

## 序列表

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT  
<120> 新穎之抗CXCR4抗體及其於治療癌症之用途  
<130> D26935  
<150> EP 08305631.7  
<151> 2008-10-01  
<150> US 61/136,772  
<151> 2008-10-01  
<150> US 61/173,743  
<151> 2009-04-29  
<160> 71  
<170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 家鼴鼠(*mus musculus*)

<400> 1

Gln Ser Leu Tyr Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 2  
<211> 3  
<212> PRT

I469792

<213> 家鼴鼠(mus musculus)

<400> 2

Trp Ala Ser

1

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(mus musculus)

<400> 3

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr

1

5

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(mus musculus)

<400> 4

Thr Asp Tyr Tyr

1

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(*mus musculus*)

<400> 5

Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr

1 5 10

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(*mus musculus*)

<400> 6

Asp Ile Pro Gly Phe Ala Tyr

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(*mus musculus*)

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(mus musculus)

<400> 8

Ala Arg Asp Ile Pro Gly Phe Ala Tyr

1

5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(mus musculus)

<400> 9

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(mus musculus)

<400> 10

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1

5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(*mus musculus*)

<400> 11

Thr Asp Tyr Tyr Met Ser

1

5

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(*mus musculus*)

<400> 12

Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser

1

5

10

15

Val Lys Gly

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(*mus musculus*)

<400> 13

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly

1

5

10

15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Asn Ser

20

25

30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Phe Tyr Cys Lys Gln  
 85 90 95  
 Ser Tyr Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(mus musculus)

<400> 14

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Thr Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Glu Tyr Ser Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile  
 65                      70                      75                      80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr  
 85                      90                      95  
 Tyr Cys Ala Arg Asp Ile Pro Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100                      105                      110  
 Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115

<210> 15  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 家鼴鼠(*mus musculus*)  
 <400> 15  
 cagagtctgt acaacagtag aacccgaaag aactac                      36

<210> 16  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> 家鼴鼠(*mus musculus*)  
 <400> 16  
 tgggcattcc                      9

<210> 17

<211> 24  
<212> DNA  
<213> 家鼠 (mus musculus)  
<400> 17  
aagcaatctt ataatcttcg gacg 24

<210> 18  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> 家鼠 (mus musculus)  
<400> 18  
actgattact ac 12

<210> 19  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> 家鼠 (mus musculus)  
<400> 19  
attagaaaca aagctaattgg ttacacaaca 30

<210> 20  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 家鼠 (mus musculus)  
<400> 20

gatatccgg ggttgctta c 21

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> 家鼷鼠(*mus musculus*)

<400> 21

gggttcacct tcactgatta ctac 24

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> 家鼷鼠(*mus musculus*)

<400> 22

gcaagagata tcccggggtt tgcttac 27

<210> 23

<211> 51

<212> DNA

<213> 家鼷鼠(*mus musculus*)

<400> 23

aaatccagtc agagtctgta caacagtaga acccgaaaga actacttggc t 51

<210> 24

<211> 21  
<212> DNA  
<213> 家鼠 (mus musculus)  
<400> 24

tggcatcca ctaggaaatc t 21

<210> 25  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 家鼠 (mus musculus)  
<400> 25

actgattact acatgagc 18

<210> 26  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> 家鼠 (mus musculus)  
<400> 26

tttattagaa acaaagctaa tggttacaca acagagtaca gtgcatactgt gaagggt 57

<210> 27  
<211> 336  
<212> DNA  
<213> 家鼠 (mus musculus)

<400> 27

gacattgtga tgtcacagtc tccatccctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtaact	60
atgagctgca aatccagtc gagtctgtac aacagttagaa cccgaaagaa ctacttgct	120
tggtaccaggc agaaaccagg gcagtcctt aaactgctga tctactgggc atccactagg	180
gaatctgggg tccctgatcg ctgcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc	240
atcaccaggc tgcaaggctga ggacctggca gtttttact gcaagcaatc ttataatctt	300
cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa	336

<210> 28

<211> 354

<212> DNA

<213> 家鼴鼠(*mus musculus*)

<400> 28

gaggtgaagc tgggtggagtc tggaggaggc ttggcacagc ctgggggttc tctgagactc	60
tcctgtacaa cttctgggtt cacccactt gattactaca tgagctgggt ccgccagtc	120
ccagggaaagg cacttgagtg gttgacttt attagaaaca aagctaattt ttacacaaca	180
gagttacagtg catctgtgaa gggtcgggttc accatctcca gagataattc ccaaagcatc	240
ctctatcttc aaatgaacac cctgagagct gaggacagtg ccacttatta ctgtgcaaga	300
gatatcccgg ggtttgccta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca	354

<210> 29

<211> 352

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(*mus musculus*)

&lt;400&gt; 29

Met Glu Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu Met  
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys Phe Arg Glu Glu  
 20 25 30

Asn Ala Asn Phe Asn Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile  
 35 40 45

Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly  
 50 55 60

Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu  
 65 70 75 80

Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val  
 85 90 95

Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu Cys Lys Ala Val  
 100 105 110

His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala  
 115 120 125

Phe Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser  
 130 135 140

Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val Gly Val  
 145 150 155 160

Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asn  
 165 170 175

Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn

	180	185	190
	Asp Leu Trp Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu		
	195	200	205
	Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile Ser		
	210	215	220
	Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys Ala Leu Lys Thr		
	225	230	235
	Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr		
	245	250	255
	Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu Ile Ile Lys Gln		
	260	265	270
	Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu		
	275	280	285
	Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe		
	290	295	300
	Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His Ala Leu Thr Ser Val		
	305	310	315
	Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly		
	325	330	335
	His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Phe His Ser Ser		
	340	345	350
	<210> 30		
	<211> 356		

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(mus musculus)

<400> 30

Met Ser Ile Pro Leu Pro Leu Leu Gln Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr

1 5 10 15

Thr Glu Glu Met Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys

20 25 30

Phe Arg Glu Glu Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile

35 40 45

Tyr Ser Ile Ile Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile

50 55 60

Leu Val Met Gly Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr

65 70 75 80

Arg Leu His Leu Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro

85 90 95

Phe Trp Ala Val Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu

100 105 110

Cys Lys Ala Val His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val

115 120 125

Leu Ile Leu Ala Phe Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His

130 135 140

Ala Thr Asn Ser Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val

145 150 155 160

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

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

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 360

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 家鼴鼠(mus musculus)

&lt;400&gt; 31

Met Glu Asp Phe Asn Met Glu Ser Asp Ser Phe Glu Asp Phe Trp Lys

1 5 10 15

Gly Glu Asp Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Ser Ser Thr Leu Pro Pro Phe

20 25 30

Leu Leu Asp Ala Ala Pro Cys Glu Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys

35 40 45

Tyr Phe Val Val Ile Ile Tyr Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu

50 55 60

Gly Asn Ser Leu Val Met Leu Val Ile Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg

65 70 75 80

Ser Val Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu

85 90 95

Phe Ala Leu Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp

100 105 110

Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu Lys Glu Val

115 120 125

Asn Phe Tyr Ser Gly Ile Leu Leu Ala Cys Ile Ser Val Asp Arg

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

325	330	335
Lys Asp Ser Leu Pro Lys Asp Ser Arg Pro Ser Phe Val Gly Ser Ser		
340	345	350
Ser Gly His Thr Ser Thr Thr Leu		
355	360	

<210> 32  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 家鼴鼠(mus musculus)  
 <400> 32

gaaactctgc attctcgctt cctg 24

<210> 33  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 家鼴鼠(mus musculus)  
 <400> 33

aggactcgtt tgtacccgtt ga 22

<210> 34  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> 家鼴鼠(mus musculus)

<400> 34  
tgcaaggatgg ctacccaact gttgca 26

<210> 35  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 家鼠 (mus musculus)  
<400> 35  
ctccttcatc ctcctggaaa tc 22

<210> 36  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 家鼠 (mus musculus)  
<400> 36  
ccaaggaaag catagaggat gg 22

<210> 37  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 家鼠 (mus musculus)  
<400> 37  
gtggtcatta tctatgcctt gg 22

<210> 38  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 家鼠 (mus musculus)  
 <400> 38  
 cgaccctgct gtataagatg ac 22

<210> 39  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> 家鼠 (mus musculus)  
 <400> 39  
 tattcctgct gagcctgctg ggaaa 25

<210> 40  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 家鼠 (mus musculus)  
 <400> 40

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

1 5 10

<210> 41  
 <211> 8

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(mus musculus)

<400> 41

Met Gln Ser Phe Asn Leu Arg Thr

1

5

<210> 42

<211> 3

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(mus musculus)

<400> 42

Asp Asn Tyr

1

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(mus musculus)

<400> 43

Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr

1

5

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(mus musculus)

<400> 44

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn Tyr

1 5

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(mus musculus)

<400> 45

Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(mus musculus)

<400> 46

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

1 5 10 15

Ala

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(*mus musculus*)

<400> 47

Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser

1 5

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(*mus musculus*)

<400> 48

Asp Asn Tyr Met Ser

1 5

<210> 49

<211> 19

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(*mus musculus*)

<400> 49

Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Ser Ala Ser

1 5 10 15

Val Arg Gly

<210> 50

<211> 112

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(mus musculus)

<400> 50

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser

20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val

50 55 60

Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln

85 90 95

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 51

<211> 120

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(mus musculus)

I469792

<400> 51

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn

20

25

30

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

35

40

45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Ser Ala

50

55

60

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile

65

70

75

80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr

85

90

95

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 52

<211> 36

<212> DNA

<213> 家鼠 (mus musculus)

<400> 52

cagagtctgt tcaacagtcg aacccgaaag aactac

36

<210>	53	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	家鼷鼠 ( <i>mus musculus</i> )	
<400>	53	
atgcaatctt ttaatcttcg gacg		24
<210>	54	
<211>	9	
<212>	DNA	
<213>	家鼷鼠 ( <i>mus musculus</i> )	
<400>	54	
gataactac		9
<210>	55	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	家鼷鼠 ( <i>mus musculus</i> )	
<400>	55	
gatgtcggtt ccaactactt tgactac		27

<210>	56
<211>	27

<212> DNA  
<213> 家鼠 (mus musculus)  
<400> 56  
gatgtcggtt ccaactactt tgactac 27

<210> 57  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 家鼠 (mus musculus)  
<400> 57  
gcaagagatg tcgggtccaa ctactttgac tac 33

<210> 58  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> 家鼠 (mus musculus)  
<400> 58  
aaatccagtc agagtctgtt caacagtcga acccgaaaga actacttggc t 51

<210> 59  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 家鼠 (mus musculus)  
<400> 59

tgggcacatccg ctagggattc t

21

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 家鼠 (mus musculus)

&lt;400&gt; 60

gataactaca tgagt

15

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 57

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 家鼠 (mus musculus)

&lt;400&gt; 61

tttattagaa acaaagctaa tggcacaca acagactaca gtgcacatgtt gaggggt 57

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 336

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 家鼠 (mus musculus)

&lt;400&gt; 62

gacattgtga tgtcacagtc tccatccctcc ctggctgtt cagcaggaga gaaggtaact 60

atgagctgca aatccagtc gaggctgttc aacagtcgaa cccgaaagaa ctacttggt 120

tggtaccaggc agaagccagg gcagtcctt aaactgctga tctactgggc atccgtttagg 180

gattctgggg tccctgctcg cttcacaggc agtggatctg agacataattt cactctcacc 240  
 atcagccgtg tgcaaggctga agacctggca gtttattact gcatgcaatc tttaatctt 300  
 cggaacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 63

<211> 360

<212> DNA

<213> 家鼠 (mus musculus)

<400> 63

gaggtgaacc tgggtggagtc tggaggaggc ttgggtacagc ctgggggttc tctgagactc 60  
 tcctgtgcaa cttctgggtt caccttcaact gataactaca tgagttgggt ccgccagcct 120  
 ccagggaaagg cacttgagtg gttgggcttt attagaaaca aagctaattgg ttacacaaca 180  
 gactacagtg catctgtgag gggtcgggttc accatctcaa gagataattc ccaaagcata 240  
 ctctatcttc aaatgaacgc cctgagagcc gaagacagtg ccacttatta ctgtgcaaga 300  
 gatgtcggtt ccaactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 360

<210> 64

<211> 239

<212> PRT

<213> 家鼠 (mus musculus)

<400> 64

Met Glu Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Trp Val Ser

I

5

10

15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala

	20	25	30
Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser			
	35	40	45
Leu Tyr Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln			
	50	55	60
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg			
	65	70	75
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp			
	85	90	95
Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Phe			
	100	105	110
Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys			
	115	120	125
Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro			
	130	135	140
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu			
	145	150	155
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp			160
	165	170	175
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp			
	180	185	190
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys			
	195	200	205
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln			

210	215	220
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	235
<210> 65		
<211> 467		
<212> PRT		
<213> 家鼠鼠(mus musculus)		
<400> 65		
Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly		
1	5	10
Phe Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln		
20	25	30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Thr Phe		
35	40	45
Thr Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Ala Leu		
50	55	60
Glu Trp Leu Thr Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu		
65	70	75
Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser		
85	90	95
Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser		
100	105	110
Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ile Pro Gly Phe Ala Tyr Trp Gly		

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

305	310	315	320
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
325	330		335
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
340	345		350
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
355	360	365	
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser			
370	375	380	
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
385	390	395	400
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
405	410		415
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
420	425		430
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
435	440	445	
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
450	455	460	
Pro Gly Lys			
465			

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 239

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 家鼴鼠(mus musculus)

&lt;400&gt; 66

Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr  
 1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala  
 20 25 30

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser  
 35 40 45

Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg  
 65 70 75 80

Asp Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr  
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr  
 100 105 110

Tyr Cys Met Gln Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys  
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu  
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp

165

170

175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp

180

185

190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys

195

200

205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln

210

215

220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225

230

235

<210> 67

<211> 469

<212> PRT

<213> 家鼴鼠(*mus musculus*)

<400> 67

Met Lys Met Trp Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly

1

5

10

15

Ile Gln Cys Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln

20

25

30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe

35

40

45

Thr Asp Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu

50

55

60

Glu Trp Leu Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp

65	70	75	80
Tyr Ser Ala Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser			
85	90	95	
Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser			
100	105	110	
Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr			
115	120	125	
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly			
130	135	140	
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly			
145	150	155	160
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val			
165	170	175	
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe			
180	185	190	
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val			
195	200	205	
Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val			
210	215	220	
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys			
225	230	235	240
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu			
245	250	255	
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr			

	260	265	270
	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
	275	280	285
	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
	290	295	300
	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
	305	310	315
	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
	325	330	335
	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
	340	345	350
	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
	355	360	365
	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
	370	375	380
	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
	385	390	395
	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
	405	410	415
	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
	420	425	430
	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
	435	440	445
	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		

450

455

460

Leu Ser Pro Gly Lys

465

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 720

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 家鼠鼠(mus musculus)

&lt;400&gt; 68

atggagtcac aggcccaggt tcttatattg ctgctgctat gggtatctgg tacctgtggg 60

gacattgtga tgtcacagtgc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 120

atgagctgca aatccagtca gagtctgtac aacagttagaa cccgaaagaa ctactggct 180

tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactggc atccactagg 240

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300

atcaccagtg tgcaaggctga ggacctggca gtttttact gcaagcaatc ttataatctt 360

cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgta cggggccgc tcccagcgtg 420

ttcatcttcc ccccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 480

ctgaacaact tctacccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgcctgcag 540

agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 600

agcagcaccc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 660

gtgacccacc agggcctgac cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgctga 720

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 1404

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 家鼠 (mus musculus)

&lt;400&gt; 69

atgaagctgt ggctgaacgt ggtgttccgt gtgaccctgc tgaacggctt ccagtgcgaa	60
gtgaaacgtgg tggagtcgtgg cggcggactg gtgcagccag gcggcagccct gagactgagc	120
tgcaccacctt ccggcttcac ctccaccgtac taclacatga gctgggtgcg ccagagcccc	180
ggcaaggccc tggaaatggct gacccttcattc cggaacaagg ccaacggcta caccaccgag	240
tacagcgcca gctgtgaagggg ccggtttaccatc atcagccggg acaacagcca gagcaatctg	300
tacctgcaga tgaacaccctt gcgggcccggag gactccgcata cctactactg cgccagagac	360
atccccggct tcgcctactg gggccagggc accctgggtgc ccgttgtccgc cgccagcacc	420
aaggggcccaa gcgtgttccc gctagccccc agcagcaaga gcaccagcgg cggcacagcc	480
gccctgggct gccctgggtgaa ggactacttc cccgagcccg tggaccgtgtc ctggAACAGC	540
ggagccctga cctccggcgt gcacacccttc cccgcccgtgc tggcagagcag cggcctgtac	600
agccctgagca gcgtgggtgac cggtgtccaggc agcagccgtgg gcaccaggac ctacatctgt	660
aacgtgtacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagtgaggagcc caagagctgt	720
gacaagaccc acacccgtcccc cccctggccca gcccccgagc tggctgggctgg acccagcgtg	780
tccctgttcc cccccaagcc caaggacacc ctgtatgtca gcagaacccc cgagggtgacc	840
tgtgtgggtgg tggacgtgtc ccacgaggac ccagagggtga agttcaactg gtacgtggac	900
ggcggtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg agcagtacaa cagcacctac	960
agggtgggtgt ccgtgtgtgac cgtgtgtgcac caggacgtggc tggacggcaa ggagtacaag	1020
tgttaagggtgtt ccaacaaggc ccgtccagcc ccaatcgaaa agaccatcg caaggccaaag	1080
ggccagccaa gagagcccca ggtgtacacc ctggccacccca gcaggagggaa gatgaccaag	1140
aaccagggtt ccctgtaccgt tctgggtgttgcaccaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag	1200
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca ccccccagt gctggacagc	1260

gacggcagct tttccgtta cagcaagctg accgtggaca agagcagatg gcagcaggc 1320  
 aacgtgttca gctgcgtccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1380  
 ctgagccgtt ccccaggcaa gtga 1404

<210> 70

<211> 720

<212> DNA

<213> 家鼠 (mus musculus)

<400> 70

atggagtcac agactctggt cttcatatcc atactgctct ggtttatatgg tacctgtggg 60  
 gacattgtga tgtcacagtc tccatccctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 120  
 atgagctgca aatccagtca gagtctgttc aacagtgcgaa cccgaaagaa ctacttggct 180  
 tggtaccaggc agaagccagg gcagtcctt aaactgctga tctactgggc atccgcttagg 240  
 gattctgggg tccctgctcg cttcacaggc agtggatctg agacataattt cactctcacc 300  
 atcagccgtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcatgcaatc tttaatctt 360  
 cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgta cggggccgc tcccagcgtg 420  
 ttcatcttcc ccccaagcga cgagcagctg aagagcggca cggccagcgt ggtgtgtctg 480  
 ctgaacaact tctacccag ggaggccaaag gtgcagtggaa aggtggacaa cggccgtcag 540  
 agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 600  
 agcagcaccc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 660  
 gtgacccacc agggccgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgctga 720

<210> 71

<211> 1410

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 家鼠 (mus musculus)

&lt;400&gt; 71

atgaagatgt ggcttgaactg ggtgttcctg gigaccctgc tgaacggcat ccagtgcgaa	60
tgtaaacctgg tggagttctgg cggcggactg gtgcagccctg ggggcagcct gagactgagc	120
tgcgccacct ccggcttcac cticaccgac aactacatga gctgggtgcg ccagccccct	180
ggcaaggccc tggaaatggct gggcttcatc cggaacaagg ccaacggcta caccaccgac	240
tacagcgcca gcgtgcgggg cagattcacc atcagccggg acaacagcca gagcatccctg	300
tacctgcaga tgaacgccc tgcgggccc gagacagcgcca cctactactg tgcccgggac	360
gtgggcagca actacttgcg ctactgggc cagggcacca cactgaccgt gtccagcgcc	420
agcaccaagg gccccccgt gttcccgta gccccccagca gcaagagcac cagcggcggc	480
acagccgccc tgggcgtgcct ggtgaaggac tacttcccg agcccgtagc cgtgtccctg	540
aacagcggag ccctgaccc cggcgtagcac accttcccg ccgtgtcgca gagcagcggc	600
cgttacagcc tggcggcggt ggtgaccgtg cccagcagca gcctgggcac ccagacccat	660
atctgtAACG tgaaccacaa gcccagcaac accaagggtgg acaagagagt ggagcccaag	720
agctgtgaca agacccacac ctggccccc tggccagccc ccgagctgct gggcggaccc	780
agcggttgtcc ttgtcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagcag aaccccgag	840
gtggaccgtgt tggtgggtggc cgtgtccac gaggacccag aggtgaagt caactggtag	900
gtggacggcg tggagggtgca caacgccaag accaaggcca gagaggagca gtacaacagc	960
acc tacaggg tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag	1020
tacaagtgta agggtccaa caaggcccctg ccagccccaa tcgaaaagac catcagcaag	1080
gccaaggggcc agccaagaga gccccaggtg tacaccctgc cacccagcag ggaggagatg	1140
accaagaacc aggtgtccctt gaccgtgtg gtgtggct tctacccaaag cgacatcgcc	1200
gtggagtggtt agagcaacgg ccagccccag aacaactaca agaccacccc cccagtgctg	1260

I469792

gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc aagctgaccg tggacaagag cagatggcag 1320  
cagggcaacg tttcagctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacacccag 1380  
aagagcctga gcctgtcccc aggcaagtga 1410

## 公告本

## 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 98133164

A61k 39/395 (2006.01)

※申請日： 98.9.30

※IPC 分類： C07K 16/28 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

C12P 21/08 (2006.01)

新穎之抗CXCR4抗體及其於治療癌症之用途

A61P 35/00 (2006.01)

NOVEL ANTI CXCR4 ANTIBODIES AND THEIR USE FOR THE  
TREATMENT OF CANCER

## 二、中文發明摘要：

本發明是有關於能夠結合至CXCR4還能誘發CXCR4同型二聚物和/或異型二聚物的構型改變的一新穎的經分離的抗體、或它的衍生化合物或功能性片段。

更特別地，本發明是有關於414H5與515H7 (對CXCR4蛋白質具有專一性)，以及它們用於癌症的治療的用途。包含有該等抗體的藥學組成物以及用於該等抗體的選擇的方法亦被涵蓋。

## 三、英文發明摘要：

The present invention relates to a novel isolated antibody, or the derived compounds or functional fragments of same, capable of binding to CXCR4 but also of inducing conformational changed of the CXCR4 homodimers and/or heterodimers.

More particularly, the present invention relates to the 414H5 and 515H7 antibodies, specific to the CXCR4 protein, as well as their use for the treatment of cancer. Pharmaceutical compositions composed of such antibodies and a process for the selection of such antibodies are also covered.









































四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（　　）圖。(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

## 七、申請專利範圍：

1. 一種用於選擇能夠抑制CXCR4的活化的抗-CXCR4抗體或者它的功能性片段或衍生物之一者的方法，其特徵在於該方法包含有下列步驟：
  - i) 篩選被產生的抗體並且選擇能夠專一性地結合至CXCR4以及亦能夠調節CXCR4的活化的抗體；
  - ii) 測試步驟i)的該等經選擇的抗體並且選擇能夠誘發CXCR4同型二聚物構型改變的抗體，並且接而
  - iii) 測試步驟ii)的該等經選擇的抗體並且選擇能夠誘發CXCR4/CXCR2異型二聚物構型改變的抗體。
2. 如申請專利範圍第1項的方法，其中步驟ii)在於在表現CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP這兩者的細胞上藉由BRET(生物發光共振能量轉移(Bioluminescence Resonance Energy Transfer))分析評估抗體，並且選擇能夠抑制至少40%的BRET信號的抗體。
3. 如申請專利範圍第1項的方法，其中步驟iii)在於在表現CXCR4-RLuc/CXCR2-YFP這兩者的細胞上藉由BRET分析評估抗體，並且選擇能夠抑制至少40%的BRET信號的抗體。
4. 一種經分離的抗-CXCR4抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段，其係選自於由下列所組成之群組：
  - 一抗體或其功能性片段，其包含：
    - ◆ 一輕鏈，其包含序列辨識編號：1之序列之的CDR-L1、序列辨識編號：2之序列的CDR-L2及

序列辨識編號：3之序列的CDR-L3；以及

◆ 一重鏈，其包含序列辨識編號：7之序列的CDR-H1、序列辨識編號：5之序列的CDR-H2及序列辨識編號：8之序列的CDR-H3；以及

- 一抗體或其功能性片段，其包含：

◆ 一輕鏈，其包含序列辨識編號：40之序列的CDR-L1、序列辨識編號：2之序列的CDR-L2及序列辨識編號：41之序列的CDR-L3；以及

◆ 一重鏈，其包含序列辨識編號：44之序列的CDR-H2、序列辨識編號：5之序列的CDR-H2及序列辨識編號：45之序列的CDR-H3。

5. 如申請專利範圍第4項的抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段，其特徵在於它由一單株抗體所構成。

6. 如申請專利範圍第4或5項的抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段，其中該抗體係能夠抑制CXCR4之活化。

7. 如申請專利範圍第4或5項中任一項的抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段，其中該抗體係能夠抑制下列至少一者之活性：

- 配位子SDF-1於細胞膜上結合於CXCR4受體之專一性結合；
- GTP $\gamma$ S於細胞膜上結合於CXCR4受體上之專一性結合；
- 經CXCR4-調節之cAMP的生成的抑制作用；以及
- 經CXCR4-調節的細胞內鈣池(intracellular calcium

stores)的調動(mobilization)。

8. 如申請專利範圍第4或5項中任一項的抗體、或它的一衍

生化合物或功能性片段，其係能夠誘發CXCR4同型二聚

物構型改變，以及能夠誘發CXCR4/CXCR2異型二聚物

構型改變。

9. 如申請專利範圍第4或5項的抗體、或它的一衍生化合物

或功能性片段，其係選自由下列所組成之群組：

- 一抗體，其包含含有序列辨識編號：13之胺基酸序  
列之輕鏈，並且包含含有序列辨識編號：14之胺基  
酸序列之重鏈；以及

- 一抗體，其包含一含有序列辨識編號：50之胺基酸  
序列之輕鏈，並且包含一含有序列辨識編號：51之  
胺基酸序列之重鏈。

10. 如申請專利範圍第4或5項的抗體、或它的一衍生化合物

或功能性片段，該抗體係由一嵌合抗體所組成。

11. 如申請專利範圍第10項的抗體、或它的一衍生化合物或

功能性片段，其係選自由下列所組成之群組：

- 一抗體，其包含一含有序列辨識編號：64之胺基酸  
序列的輕鏈序列，並且包含一含有序列辨識編號：  
65之胺基酸序列的重鏈序列；以及

- 一抗體，其包含一含有序列辨識編號：66之胺基酸  
序列的輕鏈序列，並且包含一含有序列辨識編號：  
67之胺基酸序列的重鏈序列。

12. 一種經分離的核酸，其特徵在於它是選自於下列的核

酸：

- a) 一編碼如申請專利範圍第4至11項中任一項的一經分離的抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段的核酸、DNA或RNA；以及
  - b) 一互補於一如在a)中所定義之核酸的核酸。
13. 一種由一如申請專利範圍第12項的核酸所組成的載體。
14. 一種包含有一如申請專利範圍第13項的載體的宿主細胞。
15. 一種用於製備如申請專利專利範圍第4至11項中任一項的抗體或它的一衍生化合物或功能性片段的方法，其特徵在於該方法包含有下列步驟：  
在一培養基中並且適當的培養條件下培養如申請專利範圍第14項的宿主細胞；以及  
回收從該培養基或從該等被培養的細胞中而被產生的該抗體、或它的功能性片段之一者。
16. 如申請專利範圍第4至11項中的任一項的抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段供用於作為一藥物。
17. 一種包含有作為一活性成分的一由如申請專利範圍第4至11項中的任一項的抗體、或它的一衍生化合物或功能性片段所構成的化合物的組成物。
18. 如申請專利範圍第17項的組成物，其特徵在於它進一步包含有一非為直接針對CXCR4的抗體之抗-腫瘤抗體，以作為一供一同步的、分開的或持久的方式使用的組合產物。

19. 如申請專利範圍第17或18項的組成物，其特徵在於它進一步包含一細胞毒性/細胞生長抑制劑、一細胞的毒素和/或一放射同位素，以作為一供同步的、分開的或持久的方式使用的組合或綴合產物。
20. 如申請專利範圍第17或18項的組成物，用來作為一藥物的用途。
21. 一種使用如申請專利範圍第4至12項中任一項的抗體或它的一衍生化合物或功能性片段之用途，其係用於製備在一細胞內調節CXCR4活性的藥物。
22. 如申請專利範圍第21項之用途，其中該藥物係用於癌症的預防或治療。
23. 如申請專利範圍第22項之用途，其中該癌症是一種選自於下列的癌症：前列腺癌、骨肉瘤、肺癌、乳癌、子宮內膜癌、多發性骨髓瘤、卵巢癌、胰臟癌以及結腸癌。
24. 一種使用如申請專利範圍第17至19項中任一項之組成物的用途，其係用於製備在一細胞內調節CXCR4活性的藥物。
25. 如申請專利範圍第24項之用途，其中該藥物係用於癌症的預防或治療。
26. 如申請專利範圍第25項之用途，其中該癌症是一種選自於下列的癌症：前列腺癌、骨肉瘤、肺癌、乳癌、子宮內膜癌、多發性骨髓瘤、卵巢癌、胰臟癌以及結腸癌。