

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 97139645

A61k 38/17

※申請日期： 97.10.15

※IPC 分類：

C07k 14/71

(2006.01)

(2006.01)

## 一、發明名稱：(中文/英文)

包含最佳化 HER1 和 HER3 多聚體的組成物和其使用方法  
COMPOSITIONS COMPRISING OPTIMIZED HER1 AND HER3  
MULTIMERS AND METHODS OF USE THEREOF

## 二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

受體生物公司 / Receptor BioLogix, Inc.

代表人：(中文/英文)

湯瑪士 A. 葛雷斯 / GLAZE, THOMAS A.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國 加州 94303 帕羅奧多市 西海灣路 3350 號 150 室  
3350 West Bayshore Road, Suite 150, Palo Alto, CA 94303, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 / U.S.A.

## 三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. H. 麥可 薛柏德 / SHEPARD, H. MICHAEL

2. 金霽 / PEI, JIN

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 / U.S.A.

2. 美國 / U.S.A.

#### 四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項  第一款或  第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國、 2007.10.16、 60/980,424
2. 美國、 2008.04.08、 61/043,308

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

## 九、發明說明：

相關申請案之交互引用

本申請案主張 2007 年 10 月 16 日申請之美國臨時申請案 60/980,424 及 2008 年 4 月 8 日申請之 61/043,308 的優先權，其皆以引用的方式全部併入本文中。

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於包含經設計之 Her 1 及 Her3 配位體結合域之組成物及製備及使用該等組成物之方法。

背景

### 【先前技術】

受體酪胺酸激酶 (RTK) 為細胞信號轉導分子之家族，該等分子為涉及許多信號轉導路徑之多肽中者。RTK 在種種細胞過程中起作用，包括胚胎發生、細胞分裂、增殖、分化、遷移及代謝。RTK 可由配位體活化。該活化一般又因隨後活化信號轉導路徑之需要而導致受體二聚或寡聚。信號轉導路徑之活化 (諸如藉由激發自分泌或旁分泌細胞信號轉導路徑，例如第二信使之活化) 導致特異性生物作用。RTK 之配位體與同源受體特異性結合。若干癌症中已注意到 RTK 之失調 (disregulation)。舉例而言，乳癌可與 p185-HER2 擴增之表現有關。RTK 亦與血管生成 (包括生理及腫瘤血管形成) 中涉及之調節路徑有關。RTK 亦牽涉於細胞增殖、遷移及生存之調節中。

與疾病有關之 RTK 中包括受體之 HER (人類 EGFR 家族，亦稱為 ErbB 或 EGFR) 家族 (例如參見，Hynes 等人 (2005))

*Nature Reviews Cancer* 5:341-354，論述其在癌症中之作用)。此等稱為 I 類受體之受體包括 HER1/EGFR、HER2、HER3 及 HER4。此等受體具有選擇性的名稱。HER1 有時稱為 EGFR 及 ErbB1；HER2 有時稱為 ErbB2 及 NEU；HER3 有時稱為 ErbB3；且 HER4 有時稱為 ErbB4。此家族之所有成員具有胞外配位體結合區、單跨膜區及細胞質的含有酪胺酸激酶之結構域。僅 HER1 及 HER4 在配位體結合及激酶活性方面完全起作用。HER3 之激酶活性受削弱且活性視其異元二聚搭配物的激酶活性而定。

一種靶向涉及 p185 (Her2) 之癌症的方法已使用靶向 ErbB2 蛋白質二聚體之肽 (例如參見, Greene 等人, 美國專利 6,417, 168)。目前已描述包括 ErbB2、Erb3 及 ErbB4 之配位體結合域之多種類型的嵌合多元分子。例如參見美國專利 6,696,290 及 WO 98/02540。然而, 此等方法不對具有 Her1 及/或 Her3 表現之癌症具有特異性, 其亦不可用於廣泛範圍的與 Her1 及/或 Her3 表現失調有關之疾病。因而, 對於具有 Her1 失調或 Her3 失調或該兩者之組合的癌症而言, 現有技術不足以克服特異性不夠的問題。此外, 此等 I 類受體之配位體的結合親和力視受體及其固有生物學性質及結構而變化。因此, 與 ErbB2 結合之分子不一定會與 Her1 或 Her3 結合且 ErbB2 配位體之任何最佳化工作無法可預測地應用於 Her1 或 Her3, 因為其為具有不同生物學特性及結構的不同受體。

為此目的, 所需要的是可以改良之結合親和力與 Her1

及 Her3 結合的組成物。本文所述之發明提供此需要之解決方法且亦提供額外益處。

### 【發明內容】

#### 發明簡短概要

本發明提供包含 Her 1 及 / 或 Her3 變體之組成物，該變體經最佳化以改良與其同源配位體之結合。因此，在一方面中，本發明提供包含來自 Her3 之胞外域 (extracellular domain, ECD) 的多聚體，該 Her3 經最佳化以改良與其同源配位體 (與 Her1 ECD 連接) 的結合。在一具體實例中，最佳化為 Y246A 突變。在另一具體實例中，最佳化 Her3 在位置 132 處另外含有離胺酸。在一具體實例中，Her3 變體具有 K132E 突變。在另一具體實例中，Her3 變體在具有 Y246A 變體之位置 132 處具有離胺酸。在另一具體實例中，Her3 變體在無 Y246A 變體之位置 132 處具有離胺酸。在另一具體實例中，Her3 變體經截短。在另一具體實例中，經截短 Her3 亦在位置 132 處具有離胺酸。

在另一方面中，本發明提供包含來自 Her1 之胞外域 (ECD) 的多聚體，該 Her1 經最佳化以改良與其同源配位體 (與 Her3 ECD 連接) 的結合。在一具體實例中，Her1 ECD 具有 T15S 突變 (或 T39S，若將具有信號序列肽之殘基包括在內)。在另一具體實例中，Her1 ECD 具有 T15S 及 G564S 突變。

本發明亦提供 Her 1 及 Her3 變體之組成物，該等變體以同元二聚體形式彼此締合。在一具體實例中，Her1 同元

二聚體由 T15S 及 G564S 突變形成。在另一具體實例中，Her3 同元二聚體由 Y246A 突變形成。在另一方面中，本發明提供 Her3 變體的組成物，該等 Her3 變體與 Her1 ECD 以異元二聚體形式締合。在一些具體實例中，Her1 ECD 亦經最佳化以提供與其同源配位體之結合（例如，T15S 或 T15S/G564S 突變）。最佳化係選自由以下者組成之群：結構域 4 缺失、T39S（或 T15S，不具有信號序列）、S193N/E330D/G588S、及 T39S/G564S。

本發明另外提供包含 Her1/Her1 同元二聚體、Her1/Her3 異元二聚體、與 Her3/Her3 同元二聚體之混合物的組成物，其中 Her 1 及/或 Her3 組份經最佳化以改良配位體結合。在一些方面中，同元二聚體或異元二聚體之任一多聚體係藉由使用連接子（諸如，通用連接子）與 Fc 受體連接。

本發明亦提供醫藥組成物及/或醫藥品，其包含最佳化 Her1 及/或最佳化 Her3 變體。本發明亦提供最佳化 Her1 及/或最佳化 Her3 變體之用途，其用於製造用以抑制癌細胞生長之醫藥品。在另一具體實例中，最佳化 Her1 及/或最佳化 Her3 變體用於製造用以治療表現 Her1 及/或 Her3 之細胞異常生長的醫藥品。

本發明亦提供使用該等組成物於抑制癌細胞生長之方法。在一些具體實例中，癌細胞生長之抑制係活體內用作治療組成物。在其他具體實例中，癌細胞生長之抑制為試管內的。在其他具體實例中，將包含最佳化 Her1 及/或最佳化 Her3 變體之組成物用於活體外治療。

## 【實施方式】

### 詳細描述

本發明提供包含 Her 1 及/或 Her3 配位體結合域之組成物，該結合域經最佳化以改良與其同源配位體之結合。此等組成物適用於藉由捕獲多個 HER 配位體（生長因子）抑制細胞活化。如本文所用，此等類型之組成物可為泛-特異性 HER 配位體阱（pan-HER）或在本文中亦稱為「Her 調控素（Hermodulin）」。

除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語具有熟習本發明所屬之技術者通常瞭解的相同意義。除非另外指明，否則本揭示案全文提及之所有專利、專利申請案、公開申請案及公開案、GENBANK 序列、網站及其他公開材料係以引用的方式全部併入。

### 一般描述

除非另外說明，本發明之實踐將採用此項技術內的分子生物學（包括重組技術）、微生物學、細胞生物學、生物化學及免疫學的習知技術。該等技術在文獻中充分解釋，諸如 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 2 版 (Sambrook 等人, 1989. Cold Spring Harbor Press); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait 編., 1984); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney 編., 1987); *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir & C. C. Blackwell 編.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M.

Miller & M. P. Calos, 編., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel 等人編, 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis 等人編, 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan 等人編, 1991)及 *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley 及 Sons, 1999)。

### 定義

如本文所用，胞外域 (ECD) 為出現於受體表面上之細胞表面受體的部分且包括配位體結合位點。為本發明之目的，提及 ECD 包括任何含有 ECD 之分子或其部分，只要 ECD 多肽不含有與同源受體之另一結構域 (亦即，跨膜蛋白激酶結構域或其他) 締合之任何鄰近序列。因此，例如，ECD 多肽包括細胞表面受體 (cell surface receptor, CSR) 之替代剪接同功異型物，其中該同功異型物具有含有 ECD 之部分，但缺乏同源 CSR 的任何其他結構域，且亦具有不與同源 CSR 之另一結構域序列締合或比對之其他序列。此等額外序列可為內含子編碼之序列，諸如以內含子融合蛋白同功異型物形式出現。通常，其他序列不會抑制或干擾 CSR ECD 多肽之配位體結合及/或受體二聚活性。ECD 多肽亦包括雜交 ECD。

如本文所用，多聚化結構域係指促進多肽分子與另一含有互補多聚化結構域之多肽分子的穩定相互作用之胺基酸序列，其可為相同或不同多聚化結構域以與第一結構域形成穩定多聚體。一般而言，多肽與多聚化結構域直接或

間接接合。例示性多聚化結構域包括免疫球蛋白序列或其部分、白胺酸拉鏈、疏水性區域、親水性區域、相容蛋白質-蛋白質相互作用結構域（諸如（但不限於）PKA之R子單元及錨定結構域（anchoring domain, AD））、在兩個分子之間形成分子間雙硫鍵之游離硫醇，及形成穩定多聚體之相同或類似尺寸之進入空穴之突起（protuberance-into-cavity）（亦即，進入空洞之按鈕（knob into hole））及互補空穴。多聚化結構域（例如）可為免疫球蛋白恆定區。免疫球蛋白序列可為免疫球蛋白恆定域，諸如來自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亞型、IgA、IgE、IgD及IgM之Fc結構域或其部分。

#### **包含最佳化 *Her 1* 及/或 *Her3* 之組成物**

本發明提供包含 *Her 1* 及/或 *Her3* 胞外域（extracellular domain, ECD）之組成物，其經設計（或最佳化）以相較於未經設計之 *Her 1* 及/或 *Her3* 改良結合。該等組成物（例如）有效用作結合其同源配位體之結合檢定的組份。在一些方面中，組成物含有 *Her3* ECD 同元二聚體之多聚體。*Her3* ECD 可含有下文及圖中更詳細揭示之突變，其適用於改良與其配位體之結合。在其他方面中，組成物含有 *Her3* 及 *Her1* 同元二聚體之多聚體。對於 *Her1* 或 *Her3* 中之任一者或其兩者而言，最佳化可用於改良與其配位體之結合親和力或另外改良其他生物學特性，包括（但不限於）抑制受體酪胺酸激酶之磷酸化，增加動物體內之生物可用性、較佳活體內藥物動力學、抑制細胞遷移、減小腫瘤體積或中斷腫

瘤生長。在其他方面中，組成物含有 Her1/Her1 同元二聚體（例如，具有 T15S、G564S 突變之 HER1 同元二聚體）、Her1/Her3 異元二聚體及 Her3/Her3 同元二聚體之混合物，其中 Her3 組份經設計用於改良與其配位體之結合。圖 1 描繪 HER 家族及其配位體。Her1、Her2 及 Her3 之失調占當前癌症病例 50% 以上。實施例詳述已針對最佳 Her3 配位體結合製造且測試的許多變體。

應瞭解本發明亦涵蓋最佳化 Her3 及最佳化 Her1 之組合以形成多聚體（同元二聚體或異元二聚體）以及 Her1/Her1 同元二聚體、Her1/Her3 異元二聚體及 Her3/Her3 同元二聚體之混合物。

#### HER1 ECD 結構及結構域組織

HER1 之胞外部分包括成熟 HER1 受體之殘基 1-621 且含有子結構域 I（胺基酸殘基 1-165）、II（胺基酸殘基 166-313）、III（胺基酸殘基 314-481）及 IV（胺基酸殘基 482-621）。HER1 之 I、II 及 III 結構域與 I 型胰島素樣生長因子受體之第一三結構域具有結構及序列同源性（IGF-1R，例如參見 Garret 等人，(2002) Cell, 110:763-773）。與 IGF-1R 類似，L 結構域（亦即，結構域 I 及 III）具有各端由螺旋及雙硫鍵封端之六圈  $\beta$  螺旋結構。相較於 IGF-1R，HER1 序列包括胺基酸插入，由此造成的生物化學結構對於介導藉由 HER1 之配位體結合來說較為重要。其中包括 V 型偏移（殘基 8-18），其坐落於結構域 I 之大  $\beta$  薄片上以形成配位體結合界面的主要部分。在結構

域 III 中，對應區域形成亦涉及配位體結合之環（殘基 316-326）。結構域 III（殘基 351-369）中存在之第三插入區域為結構域 III 之第二圈中的額外環。此環為防止配位體結合之多個抗體之抗原決定基（亦即，LA22、LA58 及 LA90，例如參見 Wu 等人，(1989) *J Biol Chem.*, 264:17469-17475）。此外，配位體結合中涉及第四圈  $\beta$  螺旋管中之其他環。

TGF- $\alpha$ ，即 HER1 之配位體，與一受體分子之 L 結構域 I 及 III 兩者的大  $\beta$  薄片相互作用。類似地，配位體 EGF 亦與 HER1 之結構域 I 及 III 相互作用，但認為 EGF 與結構域 III 之相互作用為 EGF 的主要結合位點（Kim 等人，(2002) *FEBS*, 269: 2323-2329）。交聯研究已確定 EGF 配位體之 N-及 C-末端部分分別與 HER1 受體之結構域 I 及 III 相互作用。對應於成熟全長 HER1 之結構域 III 中之胺基酸 Gly441 涉及經由與人類 EGF 的 Arg45 相互作用介導與 EGF 的結合。202 個胺基酸之 HER1 之 40 kDa 片段（對應於成熟 HER1 多肽之胺基酸 302-503）足以保持 HER1 與 EGF 的完全配位體結合能力。此 202 個胺基酸之部分含有所有結構域 III，且僅含有各結構域 II 及結構域 IV 的一些殘基（Kohda 等人，(1993) *JBC* 268: 1976）。

EGFR 之結構域 II 含有 8 個雙硫鍵接之模組。結構域 II 與結構域 I 及 III 相互作用。與結構域 III 之接觸經由模組 6 及 7 發生，而模組 7 及 8 具有可撓性之程度，藉此用於在無配位體形式之 EGFR 分子中形成鉸鏈。自結構域 II

之模組 5 形成有序大環且直接遠離配位體結合位點伸出。此環對應於殘基 240-260 (亦描述為殘基 242-259) 且含有反向平行  $\beta$ -帶狀物。該環 (亦稱為二聚化臂) 在介導分子內相互作用以及介導受體-受體接觸中為重要的。在 HER1 之非活動的或「繫栓」構型中，環藉由在分別對應於胺基酸 561-569 及 572-585 的模組 5 及 6 中的類似環結構之間插入成熟全長 ECD 造成分子內相互作用。

缺失結構域 II 環會消除 HER1 ECD 的二聚能力，因此顯示其在促進分子間相互作用中的重要性。二聚作用由跨越結構域 I、II 及 III 之間的空間中之第二 HER 分子的結構域 II 伸出環來介導。舉例而言，藉由二聚臂的殘基 244-253 與第二 HER 分子中結構域 II 之凹面上的殘基 229-239、262-278 及 282-288 形成接觸。結構域 II 中之 Tyr246 與第二 HER 分子中之 Gly264 及 Cys283 殘基形成氫鍵，且 Tyr246 之苯基環亦與相鄰分子的 Ser262 及 Ser282 相互作用。EGFR 與另一 HER 分子之結構域 II 之間的其他胺基酸接觸包括 Tyr251 與 Phe263、Gly264、Tyr275 及 Arg285；Pro248 與 Phe230 及 Ala265；Met253 與 Thr278；及 Tyr251 與 Arg285。此外，Asn247 及 Asn256 對於保持適當構型之環而言為重要的。HER 家族成員中的幾乎所有此等殘基保守且在 HER 家族受體之間起類似作用。此外，脯胺酸殘基出現於 HER 家族受體中環的位置 243、248、255 及 257 中之任一者處，其中 HER3 含有三個脯胺酸。脯胺酸殘基使環構型進一步穩定。舉例而言，HER1 在位置 248 及 257 含有脯胺酸。

除了在非活動的 HER1 分子之繫栓中牽涉結構域 IV( 模組 5 及 6) 之外，亦看似需要 HER1 之結構域 IV 的至少部分模組 1 來保持活性 HER1 分子的結構完整性。舉例而言，如上文所提及，含有所有結構域 III 及部分結構域 II 及 IV 的 HER1 之 40 kDa 蛋白水解片段保持完全配位體結合能力。此分子中存在之結構域 IV 之部分對應於胺基酸 482-503，包括所有模組 1。對應於成熟 HER1 分子中之 Trp492 的胺基酸藉由與結構域 III 中之疏水性凹穴 (hydrophobic pocket) 相互作用在保持 HER1 分子穩定性中起作用。含有所有結構域 I、II 及 III 但缺乏所有結構域 IV 之 HER1 重組分子不能結合配位體 (對應於成熟 HER1 之胺基酸 1-476，例如參見 Elleman 等人，(2001) *Biochemistry* 40:8930-8939)。因此，HER1 的配位體結合能力看似需要至少所有或部分結構域 IV 的模組 1。結構域 IV 的剩餘部分可消耗用於配位體結合及信號轉導。舉例而言，缺少成熟 HER1 多肽之殘基 521-603 的 HER1 分子中存在 HER1 之正常配位體結合及信號轉導特性。

#### HER3 ECD 結構及結構域組織

HER3 之胞外部分包括成熟 HER3 受體之殘基 1-621 且含有子結構域 I (胺基酸殘基 1-166)、II (胺基酸殘基 167-311)、III (胺基酸殘基 (312-480) 及 IV (胺基酸殘基 481-621)。與其他 HER 家族受體一樣，HER3 之結構域 I、II 及 III 的結構可與 IGF-1R 重疊，且展示許多與其他 HER 受體相同之結構特徵。舉例而言，HER3 之結構域 I 及 III

展示由含有雙硫鍵之模組的延長重複中斷之  $\beta$ -螺旋結構。結構域 II 及 III 之間存在結構域間的高度可撓性，而 IGF-1R 則不展現。此外，HER3 在結構域 II（對應於 HER3 的胺基酸 242-259）中展現特徵  $\beta$  髮夾式環或二聚臂。 $\beta$  髮夾式環提供與結構域 IV 中之保守殘基的分子內接觸，產生閉合或非活動的 HER3 結構。此繫栓相互作用中重要的殘基包括 Y246 與 D562 及 K583、F251 與 G563，及 Q252 與 H565 的相互作用。與配位體結合時，構型改變重定向結構域 I 及 III，從而自繫栓結構暴露二聚臂以允許受體二聚。

與其他 HER 家族受體不一樣，HER3 不具有功能性激酶結構域。另外激酶區中在所有蛋白酪胺酸激酶中保守的 4 個胺基酸殘基的改變使 HER3 激酶功能失常。然而，HER3 在其羧基末端結構域中保持酪胺酸殘基，且在適當活化及轉磷酸化後即能誘發細胞信號轉導。因此，HER3 之同元二聚體不能支持線性信號轉導（linear signaling）。HER3 的較佳二聚搭配物為 HER2。因而，鑒於此二聚偏好，本文提供之本發明並不受到期待。Her3 之配位體包括神經調節蛋白-1（NRG-1）及神經調節蛋白-2（NRG-2）。

#### ECD 多聚體之組份及 ECD 多聚體的形成

ECD 雜多聚體包括至少兩個不同 ECD，或其部分用於與配位體結合及/或二聚。在本文之例示性具體實例中，組份 ECD 中之至少一者為 HER3 ECD。雜多聚體或均多聚體之 ECD 經連接，藉此形成多聚體，至少異元二聚體或同元二聚體。預期允許或導致 ECD 相互作用以形成雜多聚體或

均多聚體的任何鍵。

### *ECD 多肽*

本文提供之用於產生 ECD 多聚體之 ECD 多肽可為 Her3 及/或 Her1 的所有或部分 ECD。如下文更詳細論述，可使用各種方法產生此等 ECD 多肽展示與其配位體改良之結合的變體。所用之 Her3 及/或 Her1 的 ECD 可為全長或截短的且亦涵蓋對偶基因變體的使用。

### *ECD 多聚體之形成*

ECD 多聚體（包括 HER ECD 多聚體）可為受體 ECD 的共價連接、非共價連接或化學連接之多聚體，以形成二聚體、三聚體或高級多聚體。在一些狀況下，可藉由使兩個或兩個以上 ECD 多肽二聚形成多聚體。兩個 ECD 多肽之間的多聚作用可為自然發生的，或可由於兩個或兩個以上多肽的受迫鍵（forced linkage）而發生。在一實例中，多聚體可由不同 ECD 多肽上的半胱胺酸殘基之間形成的雙硫鍵連接。在另一實例中，多聚體可包括經由共價或非共價相互作用與融合至可溶性多肽的肽部分接合之 ECD 多肽。該等肽可為肽連接子（間隔子），或具有促進多聚化之性質的肽。在另一實例中，可在兩個多肽之間藉由化學鍵（諸如藉由使用雜雙功能連接子）形成多聚體。

### *肽連接子*

可使用肽連接子產生多肽多聚體，諸如一個多聚搭配物為 HER 家族受體之所有或部分 ECD 的多聚體。在一實例中，肽連接子可與第一多肽之 C 末端及第二多肽之 N 末端

融合。此結構可重複多次，使得至少一個，較佳 2、3、4 或多個可溶性多肽經由其各別末端之肽連接子彼此連接。舉例而言，多聚體多肽可具有序列  $Z_1-X-Z_2$ ，其中  $Z_1$  及  $Z_2$  各自為細胞表面多肽之所有或部分 ECD 的序列且其中 X 為肽連接子的序列。在一些狀況下， $Z_1$  及 / 或  $Z_2$  為 HER 家族受體之所有或部分 ECD。在另一實例中， $Z_1$  及  $Z_2$  為相同的或其為不同的。在另一實例中，多肽具有  $Z_1-X-Z_2(-X-Z)_n$  序列，其中「n」為任何整數，亦即一般為 1 或 2。

通常，肽連接子為足夠長度以允許可溶性 ECD 多肽與相鄰可溶性 ECD 多肽形成鍵。肽連接子之實例包括 -Gly-Gly-、GGGGG、GGGGS 或  $(GGGGS)_n$ 、SSSSG 或  $(SSSSG)_n$ 、GKSSGSGSESKS、GGSTSGSGKSSEGKG、GSTSGSGKSSSEGSSTKG、GSTSGSGKPGSGEGSTKG、EGKSSGSGSESKEF 或 AlaAlaProAla 或  $(AlaAlaProAla)_n$ ，其中 n 為 1 至 6，諸如 1、2、3 或 4。在較佳具體實例中，連接子為 GGGGG (在本文中亦稱為「通用連接子」，且具有此連接子之構築體在其名稱末端具有「B」標記)。

連接部分描述於 (例如) Huston 等人. (1988) PNAS 85:5879-5883, Whitlow 等人. (1993) Protein Engineering 6:989-995 及 Newton 等人, (1996) Biochemistry 35:545-553 中。其他合適肽連接子包括彼等描述於美國專利第 4,751,180 號或第 4,935,233 號中之任一者，其以引用的方式併入本文中。編碼所要肽連接子之聚核苷酸可使用任何合適習知技術插入閱讀框架之間或插入同一閱讀框架中作為

編碼可溶性 ECD 多肽的聚核苷酸。在一實例中，融合多肽具有 2 至 4 個可溶性 ECD 多肽，包括一由肽連接子分離之所有或部分 HER ECD 多肽。

通常，ECD 嵌合蛋白之免疫球蛋白部分包括免疫球蛋白多肽之重鏈，最一般為重鏈恆定域。在一實例中，免疫球蛋白多肽嵌合蛋白包括免疫球蛋白多肽之 Fc 區。通常，該融合保持至少一個功能活性鉸鏈，免疫球蛋白重鏈恆定區之 C<sub>H2</sub> 及 C<sub>H3</sub> 結構域。另一例示性 Fc 多肽描述於 PCT 申請案 WO 93/10151 中，且為自人類 IgG1 抗體之 Fc 區的 N-末端鉸鏈區延伸至天然 C-末端的單鏈多肽。形成鏈之精確位點不關鍵：特定位點為熟知的且可經選擇以使 ECD 多肽之生物活性、分泌或結合特徵最佳化。舉例而言，其他例示性 Fc 多肽序列在序列之胺基酸 C109 或 P113 處開始(例如參見，US 2006/0024298)。

除 hIgG1 Fc 之外，其他 Fc 區亦可包括於 ECD 嵌合多肽中。舉例而言，當由 Fc/Fc $\gamma$ R 相互作用介導之效應功能待最小化時，預期與不良募集互補序列或效應細胞之 IgG 同型(諸如，IgG2 或 IgG4 之 Fc)之融合。此外，Fc 融合可含有實質上由屬於任一抗體類的免疫球蛋白基因編碼之免疫球蛋白序列，包括(但不限於)抗體之 IgG(包括人類子類 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)、IgA(包括人類子類 IgA1 及 IgA2)、IgD、IgE 及 IgM 類。此外，連接子可用於將 Fc 與另一多肽共價連接產生 Fc 嵌合體。

本文亦預期經修飾 Fc 結構域用於與 ECD 多肽所形成之

嵌合體，例示性修飾（例如）參見美國專利申請案第 US 2006/0024298 號；及國際專利申請案第 WO 2005/063816 號。在一些實例中，Fc 區使得其具有與野生型免疫球蛋白重鏈之 Fc 區的效應功能相比改變（亦即，或多或少）的效應功能。抗體之 Fc 區與多種 Fc 受體及配位體相互作用，賦予一系列稱為效應功能之重要功能性能力。

因此，經修飾 Fc 結構域可具有改變之親和力，包括（但不限於）對 Fc 受體增加或降低的親和力或無親和力。舉例而言，不同 IgG 子類針對 Fc $\gamma$ R 具有不同親和力，其中 IgG1 及 IgG3 與受體之結合通常實質上優於 IgG2 及 IgG4。此外，不同 Fc $\gamma$ R 介導不同效應功能。Fc $\gamma$ R1、Fc $\gamma$ RIIa/c 及 Fc $\gamma$ RIIIa 為免疫複合物激發之活化的正調控劑，特徵為具有基於免疫受體酪胺酸之活化基元（ITAM）的胞內域。然而，Fc $\gamma$ RIIb 具有基於免疫受體酪胺酸之抑制基元（ITIM）且因此為抑制劑。因此，改變 Fc 區對受體之親和力可調節由 Fc 結構域誘發之效應功能。

在一實例中，使用經修飾以最佳化與某些 Fc $\gamma$ R 的結合，從而更佳介導效應功能（諸如，ADCC）之 Fc 區。在另一實例中，亦已知經取代以降低或消除與 Fc $\gamma$ R 之結合的多種 Fc 突變體。該等突變蛋白適用於需要降低或消除由 Fc 介導之效應功能的狀況。此通常為需要拮抗作用，但不殺死攜帶靶抗原之細胞的狀況。該 Fc 之實例為美國專利第 5,457,035 號中所述之 Fc 突變蛋白。在一些狀況下，本文提供之 ECD 多肽 Fc 嵌合蛋白可經修飾以增強與互補蛋白 C1q

之結合。在另一實例中，可利用與 FcRn 結合時經修飾的 Fc 區，藉此改良 ECD-Fc 嵌合多肽之藥物動力學。FcRn 為新生 FcR，與其結合使內飲抗體 (endocytosed antibody) 自內體再循環回到血流。此與防止由大尺寸全長分子引起的腎過濾偶合之方法導致 1-3 週範圍內之有利抗體血清半衰期。Fc 與 FcRn 之結合在抗體傳遞中亦起作用。用於增強與 FcRn 之結合的 Fc 蛋白中之例示性修飾包括對應於 T34Q、T34E、M212L 及 M212F 之胺基酸修飾。

通常，多肽多聚體為藉由將相同或不同 ECD 多肽中之兩者直接或間接與 Fc 多肽連接形成的兩個嵌合蛋白之二聚體。在一些實例中，將編碼 ECD-Fc 嵌合蛋白之基因融合物插入至適當表現載體中。所得 ECD-Fc 嵌合蛋白可表現於以重組表現載體轉型之宿主細胞中且允許組裝非常類似之抗體分子，其中在 Fc 部分之間形成鏈間雙硫鍵以產生二價 ECD 多肽。通常，宿主細胞及表現系統為可用於使適當胺基酸糖基化的哺乳動物表現系統。

含有 Fc 部分之所得嵌合多肽及由其形成之多聚體可藉由於蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱上親和力層析容易地純化。當將編碼不同 ECD 嵌合多肽之兩個核酸轉型入細胞時，必須以生物化學方法形成異元二聚體，因為攜帶 Fc 結構域之 ECD 嵌合分子亦將會表現為雙硫鍵連接之同元二聚體。因此，在有利於破壞鏈間二硫鍵，但不影響鏈內二硫鍵之條件下可減少同元二聚體。通常，具有不同胞外部分之嵌合單體以等莫耳量混合且氧化形成同元二聚體與異元二聚體

之混合物。此混合物之組份由層析技術分離。或者，此類型異元二聚體之形成可藉由基因工程設計及表現含有 ECD 多肽，隨後 hIgG 之 Fc 結構域，隨後 c-jun 或 c-fos 白胺酸拉鏈之 ECD 融合分子而有所偏向。因為白胺酸拉鏈主要形成異元二聚體，所以需要時其可用於驅使形成異元二聚體。含有 Fc 區之 ECD 嵌合多肽亦可經設計以包括具有金屬螯合物或其他抗原決定基之標記。經標記結構域可用於藉由金屬螯合物層析及/或藉由抗體迅速純化，以允許偵測西方墨點、免疫沈澱或生物檢定中的活性耗盡/阻斷。

#### 產生最佳化 Her 1 及 3 ECD 之方法

可使用在 ECD，其部分，尤其足以配位體結合及/或受體二聚之部分，以及替代的剪接部分與多聚化結構域之間產生嵌合多肽的任何合適方法。此等方法為熟習此項技術者所已知。類似地，可藉由彼等熟習此項技術者已知的任何方法自嵌合多肽形成多聚體。如所述，多聚體通常包括來自至少一個 HER 家族成員的 ECD，通常 HER1 或 HER3。

ECD 多肽亦可使用自動合成多肽的合成法來合成。經選殖及/或電子雜交 (*in silico*) 產生之多肽序列可以片段合成且接著化學連接。或者，嵌合分子可合成為單個多肽。編碼 ECD 之核酸分子 (包括編碼 ECD 融合物之核酸分子) 可使用此項技術中已知的任何可用方法選殖或分離以選殖及分離核酸分子。該等方法包括核酸之 PCR 擴增，及庫篩選，包括核酸雜交篩選，基於抗體之篩選及基於活性之篩選。

如實施例部分進一步論述，Her 家族之成員（諸如，Her3）可經設計以最佳化與其配位體的結合能力。此可藉由使用熟習此項技術者已知的多種方法實現。可使用電腦輔助之程式來預測可能突變區域。此後可為使用標準分子生物學技術的胺基酸突變誘發且接著進行配位體結合篩選以識別最佳化結合子。

將編碼嵌合多肽之 DNA（諸如本文所提供）轉染至宿主細胞中以供表現。在一些狀況下，其中需要 ECD 多聚多肽藉此使多聚作用由多聚結構域介導，則宿主細胞以編碼將會形成多聚體之單獨嵌合 ECD 分子的 DNA 轉型，宿主細胞經最佳選擇以能夠以所要方式組裝多聚體之單獨鏈。單獨單體多肽之組裝係由各別多聚結構域的相互作用促進，其相同或在嵌合 ECD 多肽之間互補。當 HER 家族受體 ECD 或其部分為多聚多肽之一或兩個 ECD 部分時，選擇多聚結構域使得單體的組裝使 HER 分子之二聚臂遠離搭配物多聚體分子定向。此定向稱為「背-對-背」且確保二聚臂可用於與細胞表面上的同源 HER 二聚。

包括嵌合 ECD 多肽之 ECD 多肽可表現於適於產生所要量及形式之為投藥及治療所需多肽的任何生物體中。一般而言，可經設計以表現異源 DNA 且具有分泌路徑的任何細胞類型為合適的。表現宿主包括原核及真核生物體，諸如大腸桿菌（*E.coli*）、酵母、植物、昆蟲細胞、哺乳動物細胞（包括人類細胞系及轉殖基因動物）。表現宿主之蛋白質產生程度以及所表現蛋白質上存在的轉譯後修飾類型可

不同。表現宿主之選擇可基於此等因素及其他因素進行，諸如調節及安全考慮、生產成本及純化之需要及方法。

亦可根據 WO 2007/146959 中所揭示之方法進行此等 ECD 多肽多聚體之產生（包括（但不限於）最佳化、多聚、修飾及連接），其以引用的方式特定全部併入。

### 純化

ECD 多肽及嵌合 ECD 多肽（包括 ECD 多肽多聚體）可使用此項技術中熟知的多種技術分離。熟習此項技術者可容易地遵循已知方法來分離多肽及蛋白質以獲得本文提供之經分離多肽或蛋白質中的一者。此等包括（但不限於）免疫層析法、HPLC、尺寸排阻層析法及離子交換層析法。離子交換層析法之實例包括陰離子及陽離子交換且包括使用 DEAE Sepharose、DEAE Sephadex、CM Sepharose、SP Sepharose 或此項技術者已知的任何其他類似管柱。在一些較佳具體實例中，蛋白質純化係藉由使用蛋白質 A、Ni-Sepharose、Nickel His Trap 或 Anti-EGFR Affibody Sepharose 完成。

ECD 多肽或 ECD 多聚體多肽與細胞培養基或溶胞細胞之分離可使用針對嵌合 ECD 多肽之抗原決定基標記或針對 ECD 多肽之抗體促進且接著經由免疫沈澱法及經由 SDS-聚丙稀醯胺凝膠電泳（PAGE）之分離而分離。或者，包括 ECD 多聚體之 ECD 多肽或嵌合 ECD 多肽可經由使多肽特異性抗體與 ECD 多肽結合及/或隨後使抗體與蛋白質 A 或蛋白質 G 瓊脂糖管柱結合，且自管柱溶離蛋白質來分離。ECD 多肽

之純化亦可包括使用會與蛋白質結合之試劑固定的親和力管柱或珠粒，隨後一或多個用於自結合劑溶離蛋白質的管柱步驟。親和力試劑之實例包括刀豆球蛋白 A-瓊脂糖、肝素-toyopearl 或 Cibacrom 藍 3Ga 瓊脂糖。蛋白質亦可藉由疏水性相互作用層析法使用諸如苯基醚、丁基醚或丙基醚之樹脂純化。可使用一個以上管柱實現較大純度。

### 評估或監測 ECD 多聚體活性之檢定

一般而言，ECD 多聚體調節一或多種，通常兩種或兩種以上同源細胞表面受體（CSR）或其他相互作用 CSR 的一或多種生物活性。可使用試管內及活體內檢定監測 ECD 多聚體之生物活性。本文提供例示性試管內及活體內檢定以評估 HER ECD 多聚體的生物活性。測試 ECD 多聚體對 RTK 活性之作用的檢定包括（但不限於）激酶檢定、同元二聚及異元二聚檢定、蛋白質:蛋白質相互作用檢定、結構檢定、細胞信號轉導檢定及活體內表型分類檢定。檢定亦包括使用動物模型，包括可觀測及/或量測生物活性之疾病模型。ECD 多聚體在該等檢定中之劑量反應曲線可用於評估生物活性之調節以及測定 ECD 多聚體用於投予之治療有效量。下文描述例示性檢定。

#### 1. 激酶/磷酸化檢定

可直接及間接偵測及/或量測激酶活性。舉例而言，可使用針對磷酸化酪胺酸之抗體偵測 RTK 之磷酸化。舉例而言，可在 RTK 之配位體存在下量測 RTK 之酪胺酸激酶活性之活化。可藉由抗磷酸化酪胺酸抗體偵測轉磷酸化作用。

可在 ECD 多聚體存在及不存在下量測及/或偵測轉磷酸化作用，從而量測 ECD 多聚體調節 RTK 轉磷酸化的能力。簡言之，可將表現 RTK 之細胞暴露於 ECD 多聚體且以配位體處理。將細胞溶解且將蛋白質萃取物（完全細胞萃取物或分餾萃取物）裝載於聚丙烯醯胺凝膠上，藉由電泳分離且轉移至膜，諸如用於西方墨點法。使用抗 RTK 抗體之免疫沈澱亦可用於分餾及分離 RTK 蛋白質，隨後進行凝膠電泳及西方墨點法。膜可使用抗磷酸化酪胺酸抗體探察以偵測磷酸化作用以及以抗-RTK 抗體探察以偵測總 RTK 蛋白。可使對照細胞（諸如，不表現 RTK 同功異型物之細胞及未暴露於配位體之細胞）進行相同程序用於比較。

酪胺酸磷酸化作用亦可（諸如）藉由質譜分析直接量測。舉例而言，ECD 多聚體對 RTK 之磷酸化狀態的作用可（諸如）藉由以多種濃度之 ECD 多聚體處理完整細胞且量測對 RTK 活化之作用來量測。RTK 可藉由免疫沈澱法分離且胰蛋白酶化產生肽片段用於藉由質譜分析來分析。肽質譜分析為用於定量測定蛋白質酪胺酸磷酸化程度的公認方法；酪胺酸之磷酸化會增加含有磷酸化酪胺酸之肽離子質量，且此肽係藉由質譜分析容易地自非磷酸化肽分離。

## 2. 複合/二聚

可偵測及/或量測複合作用，諸如 RTK 及 ECD 多聚體之二聚作用。舉例而言，經分離多肽可混合在一起，進行凝膠電泳及西方墨點法。亦可將 RTK 及/或 ECD 多聚體添加至細胞及細胞萃取物，諸如完全細胞或分餾萃取物中，

且可進行凝膠電泳及西方墨點法。鑑別多肽之抗體可用於偵測單體、二聚體及其他複合形式的存在。或者，可在檢定中偵測經標記 RTK 及/或經標記 ECD 多聚體。該等檢定可用於在 ECD 多聚體存在及不存在下比較 RTK 之同元二聚作用或兩種或兩種以上 RTK 之異元二聚作用。亦可進行檢定來評估 ECD 多聚體與 RTK 二聚之能力。舉例而言，可評估 HER3 ECD 多聚體與 HER1 異元二聚之能力。

### 3. 配位體結合

一般而言，RTK 與一或多個配位體結合。如上文所述，圖 1 說明一些與 HER 家族之成員結合的配位體。配位體結合調節受體之活性且因此在信號傳導路徑內調節（例如）信號轉導。可量測在 ECD 多聚體存在下與 ECD 多聚體結合之配位體及與 RTK 結合之配位體。舉例而言，可添加經標記配位體（諸如，放射性標記之配位體）以在 ECD 多聚體存在或不存在（對照）下純化或部分純化 RTK。免疫沈澱及量測放射活性可用於定量在 ECD 多聚體存在及不存在下與 RTK 結合之配位體的量。相較於野生型或主要形式之對應 RTK 結合之量，亦可（諸如）藉由以經標記配位體培育 ECD 多聚體且測定由 ECD 多聚體結合之經標記配位體之量來評估用於配位體結合之 ECD 多聚體。實施例亦列出其他偵測配位體結合之方式。

### 4. 細胞增殖檢定

細胞增殖中涉及 HER 家族受體。可量測 ECD 多聚體對細胞增殖之作用。待測試之細胞通常表現標靶 RTK 受體。

舉例而言，可向表現 RTK 之細胞中添加配位體。ECD 多聚體可在配位體添加之前、同時或之後添加至該等細胞中，且量測對細胞增殖之作用。細胞增殖程度可藉由以諸如阿爾瑪藍 (Alamar Blue) 或結晶紫 (Crystal Violet) 之染料或其他類似染料標記細胞，隨後進行最佳化密度量測來評估。MTT[溴化 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四銻鹽]亦可用於評估細胞增殖。MTT 作為增殖試劑之用途係基於來自活細胞之粒線體脫氫酶裂解淺黃色 MTT 之四銻環且形成在健康細胞中積聚 (因為其對細胞膜而言不可滲透) 的深藍色甲臍晶體之能力。藉由添加清潔劑使細胞溶解導致可釋放及溶解晶體。與活增殖細胞數目成正比之顏色可藉由分光光度計法定量。因此，在配位體存在或不存在下將所選擇細胞以 ECD 多聚體培育後，可向細胞中添加 MTT，細胞可經清潔劑溶解，且在 570 nm 下讀取吸光率。或者，在增殖實驗前，細胞可經放射活性標記 (諸如， $^3\text{H}$ -氘) 或其他螢光標記 (諸如，CFSE) 預標記。

#### 5. 細胞疾病模型檢定

來自疾病或病況或可經調節以模仿疾病或病況之細胞可用於量測及/或偵測最佳化 Her3 多聚體之作用。在細胞中添加或表現最佳化 Her3 多聚體且相較於未暴露或未表現 ECD 多聚體之細胞量測或偵測表型。該等檢定可用於量測如下作用，包括對細胞增殖、轉移、發炎、血管生成、病原體感染及骨骼再吸收的作用。

#### 6. 動物模型

可使用動物模型評估最佳化 Her1 及/或 Her3 多聚體之作用。舉例而言，ECD 多聚體對癌細胞增殖、遷移及侵襲之作用可在癌症動物模型中量測。在一該檢定中，癌細胞（諸如，卵巢癌細胞）在試管內培養後胰蛋白酶化、懸浮於合適緩衝液中，且注射入小鼠（例如，注射入諸如 Balb/c 裸鼠之模型小鼠的側腹及肩膀）。在藉由任何合適投予途徑（亦即，皮下、靜脈內、腹膜內及其他途徑）向小鼠投予癌細胞之前、同時或之後，向小鼠共投予。隨時間流逝監測腫瘤生長。可以其他細胞類型及動物模型進行類似檢定，例如鼠科動物肺癌（LLC）細胞及 C57BL/6 小鼠及 SCID 小鼠。可與未投予 ECD 多聚體之小鼠或缺乏 ECD 多聚體之各別同源受體或相互作用受體的小鼠比較腫瘤生長。

#### 使用方法

本文揭示之組成物具有多種用途。在一方面中，Her 調控素可用於抑制癌細胞生長。如圖 11、12、14 及 17 所示，本發明之 Her 調控素抑制已由天然 Her 1 及/或 Her3 配位體誘發之癌細胞增殖。包含最佳化 Her1 及/或 Her1 之 Her 調控素可以有效量向有需要之個體投予。有需要之個體的實例為罹患表現 Her1 及/或 Her3 之細胞異常生長之個體。Her 調控素亦可用於減小腫瘤體積及/或抑制腫瘤生長。腫瘤可涵蓋多種類型之腫瘤，包括（但不限於）癌瘤、基於血液之腫瘤及實體腫瘤。Her 調控素可調配為醫藥學上可接受之組成物。熟習此項技術者將顯而易見，可獲得基於 Her 調控素組成物之功能及生物作用之其他用途。本文揭示之組

成物可用於與其他藥劑組合。

組成物可以適於實現生物作用之方法投予。此包括(但不限於)腹膜內、靜脈內或經口投予。在其他情況下,醫藥組成物亦可經調配用於局部(local, topical)或全身投予。在一些具體實例中,將醫藥組成物調配為單劑量投予。在其他具體實例中,本發明範疇內涵蓋包含最佳化 Her 調控素之組成物的套組。在一些具體實例中,套組視情況封裝有說明書。套組可含有單劑量或多劑量之 Her 調控素。Her 調控素可為以下中之一或多者:最佳化 Her1/Her1 或最佳化 Her3/Her3 之同元二聚體、Her1/Her3 之最佳化異元二聚體或同元二聚體與異元二聚體之混合物。

#### 識別、篩選及製造額外 Her 調控素之方法

除本文提供之 ECD 多聚體外,可識別其他候選 Her 調控素。本文提供識別 Her 調控素之方法及其篩選檢定。該等方法經設計可識別的分子靶向 ECD 子結構域以干擾配位體結合及/或受體二聚及/或識別分子(諸如,小分子及多肽)之繫栓,該等識別分子與此等活化中所涉及一個以上 HER 受體家族成員上的區相互作用。該等治療劑可同時靶向不具有 HER 受體之多個共同表現的 HER 家族之若干成員。

一種可用於識別藥理學活性之 pan-HER 治療分子的方法為使用電腦輔助之最佳化技術將導致與配位體以較高親和力結合的可能突變體分類。實施例提供如何使用該等電腦輔助最佳化技術之指導且提供使用電腦輔助最佳化產生的最佳化 Her3 之工作實施例。舉例而言,與配位體具有增

強之結合的 HER1、HER2、HER3 或 HER4 可由此方式產生且用作製備異元二聚體、同元二聚體及其混合物之組份。

可測試上文所述之方法中所識別出之 Her 調控素功能性調節一或多種 HER 活性之能力。該等活性為彼等熟習此項技術者已知且為本文所述。該等檢定之實例包括配位體結合、細胞增殖、細胞磷酸化及複合/二聚作用。因此，本文基於與 HER 分子或其部分的高親和力識別為候選物之任何候選物可在其他篩選檢定中測試以測定候選治療劑是否具有 pan-HER 治療特性，亦即針對 HER 活化之抑制特性。

### 實施例

包括以下實施例僅為說明性目的且不欲限制本發明範疇。

#### 實施例 1 具有改良之結合的設計之 Her3

圖 1 描繪 Her 家族及其配位體。HER1 配位體結合域之電腦建模係使用 EGFR-EGF (PDB code IMOX-chain C; Ogiso H 等人 Cell (2002) 775-787) 與 EGFR-TGF $\alpha$  (PDB code 1IVO-chain C, Garrett, T.P.J 2002) 之共晶體結構進行。藉由使用電腦重新設計之組合，單胺基酸突變誘發、高產量配位體結合篩選且接著選擇最佳的最佳化結合子改良配位體阱之 Her3 部分的結合。對於進一步實驗而言，表現按比例增加且進行一些純化步驟。

#### 電腦設計

使用 HER3 ECD 之結構資訊 (PDB code IM6B, Cho 2002, Schwede T, Kopp J, Guex N, and Peitsch MC (2003))

進行 HER3 配位體結合域之電腦建模。經設計配位體-受體相互作用之最佳化是基於胺基酸的物理化學特性及分類，諸如帶電、極性、芳族性等。亦考慮殘基體積、表面積、溶劑可得到性等。使用 PAM250 基質幫助預測胺基酸取代 (W. A Pearson, Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA, in Methods in Enzymology 編. R. Doolittle (ISBN 0-12-182084-X, Academic Press, San Diego) 183(1990)63-98 ; 以及 M.O. Dayhoff 編, 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure, 第 5 卷)。

### 實施例 2 高產量突變誘發

定點突變誘發係藉由包括三個連續 PCR 反應之重疊 PCR 進行，各反應藉由補充有校讀 DNA 聚合酶 pfu 的熱穩定 DNA 聚合酶鏈延長酶 (Invitrogen) 催化。HER1:Fc 及 HER3:Fc cDNA 用作 PCR 模板。針對具有 2 對引子之第一輪 PCR 設定之條件為 94°C 2 min, 94°C 45 s, 60°C 45 s, 68°C 3 min, 26 個循環。兩個由第一輪 PCR 產生之重疊 PCR 片段經凝膠純化，以 1:1 莫耳比組合且用於第二輪 PCR。第二輪 PCR 使用 94°C 2 min, 94°C 45 s, 57°C 45 s, 68°C 30 min, 歷時 8 個循環之條件，黏接兩個重疊 PCR 片段。在第三輪 PCR 中，將第二輪 PCR 之產物用作模板。在覆蓋啟動密碼子之前置引子及覆蓋終止密碼子的反置引子存在下進行 PCR 擴增。PCR 條件為 94°C 2 min, 94°C 45 s, 60°C 45 s, 68°C 3 min, 歷時 26 個循環。將攜帶突變之 PCR 產物選殖入 Gateway System 質體 pDONR221 (Invitrogen) 中。經設

計突變由完全定序確認。接著藉由根據製造商說明進行 LR 反應將 pDONR221 中之插入物轉移至表現載體 pcDNA3.2-DEST (Gateway System, Invitrogen)。

### 實施例 3 蛋白質表現及純化

對於配位體結合篩選而言，使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 將序列確認之 HER1:Fc 及 HER3:Fc 突變體瞬時轉染至 HEK293T 細胞 (ATCC) 中。為了表現 Fc-介導之 HER1/3 異元二聚體，將 HER1:Fc 及 HER3:Fc 或其突變體共轉染至 HEK293T 細胞中。轉染後 72 小時後收集無血清條件培養基。使用人類 HER1 或 HER3 ELISA 偵測套組根據製造商說明 (R&D Systems) 定量 HER1:Fc 及 Her3:Fc 同元二聚體之含量。為定量 Fc 介導之異元二聚體，將抗-HER3-塗覆之 ELISA 培養盤用於捕獲且將 HER1 抗體用於偵測。

對於成比例增加 HER1/3 異元二聚體之表現而言，在補充有 8 mM L-麩胺醯胺及 1xHT (Gibco) 的 Pro-CHO5 (Lonza) 中以  $1 \times 10^6$ /mL 將保持於 Pro-CHO5 (Lonza, Allendale, NJ) 中之指數生長期 CHO-S 細胞 (Invitrogen) 轉移至搖袋式細胞培養生物反應器 (Wave Bio-Reactor) (GE HealthCare) 中。第二天，將細胞以相應 HER1:Fc 及 HER3:Fc cDNA 構築體共轉染。藉由使用 25 Kdal 線性 PEI (Polysciences) 以 12 mg/L 實現轉染。轉染後 4 小時，ProCHO5 之體積加倍。將轉染之細胞保持於搖袋式細胞培養生物反應器中歷時 7 天，隨後採集條件培養基。

藉由使用以下方案純化 Fc-介導之 HER1/3 異元二聚

體：將來自共轉染 CHO-S 細胞 (Invitrogen) 之條件培養基淨化，10 倍濃縮，且施加於 MabSelect SuRe 親和力管柱 (GE Healthcare Biosciences AB, Sweden) 上。以含有 0.1% (體積比) TX-114 之磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (PBS) 大範圍洗滌管柱且以 IgG 溶離緩衝劑 (Pierce, Rockville, IL) 溶離。將溶離之部分以 1M Tris-HCL 迅速中和至 pH 8.0。將含有蛋白質之部分的池裝載於 Ni-Sepharose 管柱 (GE-Healthcare Biosciences AB, Sweden) 上。將管柱以含有 25 mM 咪唑之 Ni-瓊脂糖 (Sepharose) 緩衝液洗滌。將結合蛋白質以相同緩衝劑中之 25-135 mM 梯度咪唑溶離。主要異元二聚體峰通常在 80-125 nM 咪唑之間溶離。來自 Ni-瓊脂糖管柱的含有異元二聚體之部分的池在 4°C 下在 PBS 中徹底透析。異元二聚體製劑之純度係藉由分析型逆相 HPLC 測定。

#### 實施例 4 用於改良配位體結合之篩選

藉由 Delfia (PerkinElmer) 篩選鎊標記之 EGF (Eu-EGF) 與 NRG1 $\beta$  (Eu-NRG1 $\beta$ ) 的結合在 96 孔黃色培養盤 (Perkin Elmer) 中進行。在室溫 (RT) 下將孔以 100  $\mu$ l 抗人類 Fc 抗體 (5  $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich) 塗覆隔夜。在室溫下將經塗覆培養盤以 PBS/0.05% Tween-20 (洗滌緩衝液, WB) 沖洗 3 次且以 PBS/1% BSA 阻斷，歷時 2 小時。將培養盤以 WB 再沖洗 3 次。將來自轉染 HEK293T 細胞之條件培養基中的 Fc 融合蛋白以 Delfia 結合緩衝液稀釋至每孔 20 ng 之濃度且添加至各孔 (每孔 100  $\mu$ l) 中。將培養盤在室溫下培育 2 小時，且接著以 DELFIA 洗滌緩衝液沖洗 3 次。接著將

培養盤以 100  $\mu$ l Eu-EGF (Perkin Elmer) 或 Eu-NRG1 $\beta$  (由 PerkinElmer 定製標記) 以 0.5 nM 之濃度培育。將培養盤在室溫下培育 2 小時，隨後以含有 0.02% Tween-20 之冰冷 Delfia 洗滌緩衝液快速沖洗 3 次。為定量所結合之 Eu-配位體，每孔添加 130  $\mu$ l Delfia 增強溶液且將培養盤在螢光培養盤讀取器 (Envision, model 2100, PerkinElmer) 上讀取。

使用 TGF $\alpha$  及 HB-EGF ELISA 套組 (R&D System) 進行針對 TGF $\alpha$  及 HB-EGF 結合之篩選。將以 100  $\mu$ l 抗-人類 Fc 抗體以 1  $\mu$ g/mL 塗覆 96 孔培養盤在室溫下隔夜。如上所述沖洗並阻斷培養盤。將條件培養基中之 Fc 融合蛋白以 PBS/1% BSA 稀釋至 20 ng/孔且以 100  $\mu$ l/孔添加至各孔中。將培養盤在室溫下培育 2 小時，隨後以 WB 沖洗 3 次。以 PBS/1% BSA 將 TGF $\alpha$  及 HB-EGF (R&D Systems) 稀釋至 5 nM 且添加至培養盤中。將培養盤在室溫下培育 2 小時，隨後以冰冷之 WB 迅速沖洗 3 次。使用針對 TGF $\alpha$  或 HB-EGF 之經生物素標記的偵測抗體偵測所結合之配位體。隨後根據製造商說明進行 ELISA 顯色步驟。

使用條件培養基針對 HER1 配位體結合 (Eu-EGF、TGF $\alpha$  及 HB-EGF) 至固定 HER1/3 異元二聚體的篩選程序與針對上文所述 Eu-EGF、TGF $\alpha$  及 HB-EGF 結合之篩選相同，其中例外為培養盤經抗人類 HER3 抗體 (DYC1769) 以 2  $\mu$ g/mL 之濃度預塗覆且將每孔 100 ng 來自條件培養基的 Fc-融合蛋白用於配位體結合。

藉由建模研究可預測在位置 246 處以丙胺酸取代酪胺

酸 (Y246A) 之變體引起高親和力且其經篩選且發現與 NRG1 $\beta$  結合。先前工作已最佳化 Her1 ECD 以產生稱為 T39S (或若不具有 24 個殘基信號序列, 則為 T15S) 稱為 HFD120 之變體。經構築之各種變體的命名描繪於圖 2 及下文中。

HER3 \ HER	HFD100	HFD120
HFD300	RB20	RB220
HFD300.1	RB200.1	---
HFD320.1	RB202.1	RB222.1

此命名法用於本說明書全文中。此等具有最佳化 Her1 及/或 Her3 之各種 Her 調控素與圖 3 中所示之均一連接子及 Fc 連接。

### 實施例 3 配位體結合檢定

使用包括 (但不限於) I<sup>125</sup> 標記配位體、DELFI A (鎊標記之配位體)、表面電漿共振 (Biacore) 及等溫熱量測定之標準配位體結合檢定篩選各種 HFD 構築體。用於飽和結合之例示性方案如下:

#### *Eu-配位體飽和結合及置換*

Eu-EGF 與 Eu-NRG1 $\beta$  飽和結合及 Eu-EGF 置換與上文所述之 EU-EGF 結合篩選相同, 其中例外為使用純化異元二聚體且用於配位體結合之異元二聚體濃度比所檢定配位體之 KD 低至少 10 倍 (Cell surface receptors: a short course on

theory and methods, Lee E. Limbird, 2004)。對於與 Eu-EGF 之飽和結合而言，將每孔 30 ng RB200 或每孔 2 ng RB242 固定於抗人類 Fc 塗覆之培養盤上。對於與 Eu-NGR1 $\beta$  的飽和結合而言，將每孔 2 ng RB200 或 RB242 固定。在增加濃度之所示未標記競爭者存在下將 Eu-EGF(對於 RB200 而言濃度為 50 nM 或對於 RB242 而言濃度為 5 nM)添加至孔中來進行置換檢定。

#### 125-配位體飽和結合

<sup>125</sup>I-EGF 購自 GE-保健所。TGF $\alpha$  及 HB-EGF (R&D Systems) 由 GE-保健所定製標記。將 96 孔檢定培養盤以 5  $\mu$ g/mL 抗人類 Fc 抗體塗覆。如上文所述洗滌且阻斷經塗覆培養盤。將條件培養基或稀釋為每孔 20 ng 之純化蛋白質固定於抗人類 Fc 塗覆之孔中。使用增加濃度之 <sup>125</sup>I-配位體達到飽和結合。結合後，將具有經結合 <sup>125</sup>I-配位體之洗滌過的孔以每孔 100  $\mu$ l 閃爍混合液 OptiPhase 「SuperMix」 (PerkinElmer, Waltham, MA) 覆蓋且由 Microbeta Trilux (PerkinElmer) 讀取。

藉由與 NRG1 $\beta$ 1 (本文亦稱為 NRG $\beta$ 1) 結合測定 Her3 最佳化。圖 4 展示量測最佳化 Her1 及 Her3 分子之締合解離速率(on-off rate)的資料。圖 5 展示 HFD300 及 HFD300.1 之結合親和力。

當測試 RB242.1B 的結合親和力時，結果(圖 6)展示其克服配位體結合中 HER1 與 HER3 之間的拮抗作用。對 HER1 配位體之親和力的改良優於 RB222.1 超過 30 倍。

圖 13 展示 RB200 之配位體結合親和力經由高產量合理突變法最佳化。識別出對 HER1 及 HER3 配位體皆具有次奈莫耳親和力之最佳化 Her 調控素變體 RB242。RB242 與其他 HER 配位體（諸如，TGF- $\alpha$  及 HBEGF）之結合係藉由針對 Eu-EGF 之競爭性結合評估。RB242 相對於 RB200 結合於不同配位體之比較係基於多種測定法表示為  $K_d$  及  $B_{max}$  的改良倍數。

圖 17（上圖）亦展示 RB242 具有改良之配位體結合親和力。

#### 實施例 4 Her 調控素同元二聚體對 RTK 之磷酸化的抑制

測試最佳化 Her3 構築體是否可抑制 NRG-刺激之 Her3 磷酸化。圖 7 描繪測試 Her 調控素同元二聚體抑制 Her3 磷酸化的實驗結果。如所示，HFD320.1 展示出乎意料的優於 HFD300 之 42 倍改良。

#### 實施例 5 Her 調控素異元二聚體對磷酸化之抑制

測試 Her 調控素異元二聚體（heteromodulin）之各種構築體以測定其對磷酸化之作用。進行磷酸化酪胺酸 ELISA。簡言之，在 37°C 下將血清饑餓細胞以每孔 50  $\mu$ l 含有 0.1% BSA 及所指示抑制劑之 DMEM 預處理 30 分鐘。隨後在 37°C 下以 3 nM EGF 或 1 nM NRG1 $\beta$ 1 刺激細胞歷時 10 分鐘。接著將具有細胞之培養盤置於冰上，以冰冷 PBS 洗滌一次，且以含有磷酸酶抑制劑混合物的溶解緩衝液溶解。細胞溶解物係藉由在 4°C 下在培養盤震盪器上以 20  $\mu$ l 蛋白質-A-瓊脂糖珠粒漿料培育隔夜來澄清。接著移除珠粒且將上清

液用於磷酸化酪胺酸 ELISA。用於 ELISA 之 HER1 及 HER3 捕捉抗體培養盤製備如下：將 96 孔檢定培養盤以 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抗人類 EGFR 抗體 (#AF231) 或以 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抗人類 ErbB3 DuoSet IC (#DYC1769) 塗覆。在室溫下，將經塗覆培養盤以 PBS 中 2% 胎牛血清白蛋白及 0.05% Tween-20 阻斷 2 小時。將如上加工之細胞溶解物 (75  $\mu\text{l}$ ) 轉移至經塗覆培養盤之各孔中，在 4°C 下在混合下培育隔夜且接著以 WB 洗滌 4 次。HER 蛋白質上的酪胺酸磷酸化係以每孔 100  $\mu\text{l}$  根據製造商說明稀釋於含有 2% BSA 之 PBS 中且在室溫下培育 2 小時的抗磷酸化酪胺酸-HRP 結合物 (R&D Systems) 偵測。將培養盤以 WB 洗滌 4 次，且接著以每孔 100  $\mu\text{l}$  TMB 底物隨後每孔 100  $\mu\text{l}$  TMB 停止劑(皆來自 Sigma-Aldrich)顯色。顯色時間可變，使得經顯色培養盤光學密度在 0.5-1.0 範圍內。將培養盤在 650 nm 下藉由 VERSAmax 微量培養盤讀取器 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 讀取。

圖 8 展示此等測試 Her 調控素異元二聚體對受體磷酸化的相對抑制之實驗結果。如圖 8 所示，EGF 之異元二聚體之間不存在差異。對於 TGF- $\alpha$  而言，RB220 最有效，而對於 HB-EGF 而言，異元二聚體之間的差異最小。對於 NRG 而言，RB202.1 最有效，而 RB200.1 及 RB222.1 比 RB200 或 RB220 更有效。

當使配位體結合位點數目標準化時，則將結果展示於比較異元二聚體與同元二聚體的圖 9 中。該表展示當計算值針對配位體結合位點數目標準化時  $\text{EC}_{50}$  的改良倍數。出

乎意料地，此等結果展示當與 HFD100 配對時，HFD320.1 序列比 HF300 多 50 倍活性，且當與 HF120 配對時 HFD320.1 序列與 HF300.1 類似。HFD100 序列不受二聚搭配物影響，而當與 HFD320.1 配對時 HFD120 序列活性相較於 HFD300 有所減弱。HFD300.1 未經測試。因此，結果表明對於多個 ECD 配對而言，配對之組合可影響異元二聚體活性。圖 10 展示各種 ECD 配對之平均改良倍數的結果，其展示該等配對可影響異元二聚體活性。

圖 17 (中圖) 展示 RB242 比 RB 200 更有效抑制 GF- 依賴性 HER 磷酸化。

#### 實施例 6 NRG-誘發之細胞增殖的 Her 調控素抑制

使用不同細胞系測試 Her 調控素對配位體誘發之增殖的作用。細胞增殖研究在無血清培養基中進行。將細胞以每孔 100  $\mu$ l 培養基 (對細胞系適當) 中 2000 至 5000 個細胞塗覆於 96 孔組織培養盤 (Falcon #35-3075, Becton Dickinson, NJ) 中且接著生長隔夜 (15 至 18 小時)。接著使細胞血清饑餓歷時 24 小時，且以 3 nM EGF 或 NRG1 $\beta$  在增加濃度之所指示抑制劑存在下處理 3 天。細胞增殖係藉由 MTS 檢定定量。接著將培養盤在培養盤讀取器上在 490 nm 波長下讀取吸光率，其與孔中之細胞量成正比。

圖 11 展示測試抑制 NRG-誘發之 MCF7 增殖的實驗結果而圖 12 展示測試抑制 NRG-誘發之 T47D 增殖的實驗結果。對於 NRG-誘發之增殖而言，RB222.1 最佳作用，隨後為 HFD320.1 及 1:1 混合物。RB200 為群組中對 NRG-誘發

之細胞增殖的作用最不有效者，儘管其抑制 MCF7 細胞的 EGF-誘發之增殖。

圖 14 展示 Her 調控素可抑制配位體誘發之細胞增殖。將 BxPC3 胰腺癌細胞以 3 nM TGF- $\alpha$  (A) 或 3 nM NRG1- $\beta$ 1 (B) 在增加量之 RB200 或 RB242 存在下處理 3 天。細胞增殖藉由 MTS 檢定定量。資料表示為相較於僅以 TGF $\alpha$  或 NRG1- $\beta$ 1 刺激之對照細胞的細胞生長的抑制百分比。資料為 8 個重複樣本之平均值  $\pm$  SEM。圖 17 (下圖) 亦展示 RB242.1 為 GF-誘發之細胞增殖的有效抑制劑。

#### 實施例 7 Her 調控素之藥物動力學分析

所有 Her 調控素構築體之齧齒動物模型 (包括彼等具有最佳化 Her3 者) 中的血漿濃度係藉由 Her 調控素特異性 ELISA 分析, 該 ELISA 使用抗-HER1 (AF231, R&D System) 及抗-HER3 (AF234, R&D Systems) 抗體作為捕捉抗體, HRP 結合之抗人類 Fc 抗體 (Bethyl Laboratories) 作為展示達到完整體循環的投藥劑量程度之報導基因。計算生物可用性、清除率及血漿半衰期。對於 RB200 而言, RB200 之絕對生物可用性藉由使用下式量測 RB200 在小鼠中腹膜內投予 15-30 mg/kg 後在體循環中之可用性:

$$F = \frac{\text{腹膜內(AUC)} * \text{靜脈內劑量}}{\text{靜脈內(AUC)} * \text{腹膜內劑量}}$$

其中 AUC = 曲線下面積。由此計算可見, 所估算  $F_{\text{RB200h}}$  經測定為  $> 90\%$ 。除高生物可用性之外, RB200 亦展示低分

布體積，及與 Fc-融合蛋白質及其他治療性單株抗體之預期一致的延長之最終半衰期。其他 Her 調控素之計算以相同方式進行以測定生物可用性及最終半衰期。圖 15 及 16 展示各種 Her 調控素在大鼠及裸鼠中的血漿濃度及所計算出之藥物動力學參數。

#### 實施例 8 Her1 及 Her3 的最佳化

下表說明一些針對 Her1 測試之經設計突變及與其同源配位體的結合活性。

EGFR (Her1) 突變	子結構域	結合活性
Q8P	I	降低
S11L	I	降低
T15S	I	增加
T15E	I	未結合
T15Y	I	未結合
T15Y,Q16E	I	未結合
T15K	I	未結合
Q16E	I	降低
Q16S	I	未分泌
Q16K	I	增加
Q16Y	I	未結合
Q16Y,G18D	I	未分泌
L17V	I	未分泌
L17I	I	類似
G18N,D22E	I	未結合
G18N,T19G	I	降低
G18N,T19G,F20Y	I	未結合
G18N,T19N,F20Y	I	降低
T19D,F20A	I	未結合
T19D,F20A,D22N,H23Q	I	未結合
T19D,F20A,D22N,H23Q,F24Y	I	未分泌

EGFR (Her1) 突變	子結構域	結合活性
T19K	I	增加
T19Q	I	增加
T19D	I	未分泌
T19Y	I	降低
T19G	I	類似
T19I	I	降低
D22N	I	增加
L25A	I	類似
L25A,S26L	I	未結合
L25A,S26Q	I	降低
L25Y,S26A	I	降低
L25N,S26A	I	未分泌
L25Q	I	未分泌
S26L	I	降低
S26A	I	降低
S26T	I	未分泌
M30L	I	類似
N32E	I	類似
T44V,Y45L	I	降低
T44V,Y45L,V46T,Q47G	I	未分泌
Y45W	I	增加
L69V	I	降低
L69I	I	類似
T71E,V72F,E73S,R74T	I	未分泌
V72F	I	未分泌
Q81R	I	類似
N86T,M87Q,Y88V	I	類似
Y89H,E90D	I	降低
Y89W	I	類似
L98M,S99L	I	未分泌
L98M,S99F,D102N	I	未分泌
S99A	I	增加
S99T	I	降低

EGFR (Her1) 突變	子結構域	結合活性
P112R,M113L,R114T	I	類似
F126I,S127E,N128K	I	未分泌
F126I	I	類似
F126I,N129K	I	未分泌
P130D,A131K	I	降低
S145R,S146G	I	未分泌
F148R,L149D,S150A,N151E,M152I,S153V	I	增加
M154V,D155K,F160G,Q161D	I	類似
Y246A	II	未結合
Y246M	II	未結合
Y246V	II	未結合
V350L	III	增加
F352H	III	未結合
G354A	III	未分泌
A385D	III	增加
W386E	III	未分泌
H409V,G410R	III	降低
G410R	III	未分泌
N420D	III	類似
S440L	III	增加
G441R	III	降低
K463E	III	降低
K463Q	III	類似
I467Q,S468K	III	降低
I467K	III	未分泌
D563L	IV	類似
D563P	IV	類似
G564D	IV	增加
G564S	IV	增加
H566G	IV	增加
H566V	IV	增加
N579R	IV	類似
V583E	IV	降低

對於 Her3 而言，所測試之一些突變如下：

HER3 突變	子結構域	結合活性
A8S	I	類似
L14E	I	增加
G16D	I	降低
G16K	I	類似
S18T	I	未結合
V19Q	I	未結合
D22T	I	類似
A23F	I	增加
A23L	I	降低
N25	I	降低
R36N	I	增加
V47T	I	降低
L48Y	I	未結合
G50E	I	降低
A53Y	I	增加
V70E	I	降低
M72L	I	增加
V86I	I	增加
D93E	I	類似
F96L	I	未結合
M101F	I	降低
L102S	I	未結合
N103K	I	未結合
N105R	I	類似
T106K	I	增加
T106Q	I	類似
N107D	I	降低
S109N	I	降低
H110F	I	降低
R113Q-Q114E	I	降低
R116H	I	降低

HER3 突變	子結構域	結合活性
T121I,	I	降低
P165L	I	降低
Y129R	I	降低
K132N	I	增加
I32K	I	降低
G215D	II	降低
Y246A	II	增加
Y246P	II	增加
Y246V	II	增加
K248E	II	降低
Q252D	II	增加
Q252E	II	增加
P309R	II	類似
E313N	III	降低
S322DS	III	未結合
D325N	III	未結合
G331K	III	類似
L339N	III	類似
N341D	III	降低
D343F	III	未結合
D343H	III	未結合
D343I	III	未結合
D343L	III	未結合
D343S	III	降低
N350H	III	類似
N350R	III	降低
P353S	III	降低
H355N	III	降低
K356A	III	降低
P358E	III	類似
P362S	III	類似
Y377F	III	降低
N379L	III	降低
H386N	III	類似
H388T	III	類似

HER3 突變	子結構域	結合活性
N389D	III	降低
S403V	III	類似
L404K	III	降低
Y405Q	III	降低
Y405T	III	降低
N406H	III	降低
R407G	III	類似
R407Q	III	降低
R407Y	III	增加
F409L, L411	III	降低
L411,L417Q	III	降低
L412A	III	增加
L412Y	III	降低
M414V	III	類似
K415S	III	未結合
R434N	III	降低
Y436G	III	降低
Y436L	III	未結合
S438H	III	類似
S438T	III	未結合
S438V	III	類似
A439D	III	未結合
R441S	III	增加
Q442N	III	類似
E460K	III	類似
E460N	III	增加
E461G	III	類似
E461Q	III	增加
L463H	III	降低
L463S	III	降低
D464H	III	增加
D464K	III	降低
D464Q	III	增加
D464V	III	降低
K466I	III	增加

HER3 突變	子結構域	結合活性
K466P	III	降低
K466T	III	增加
H467D	III	增加
H467G	III	增加
C481R	III	未結合
S487F	III	類似
D562-565deL	IV	未結合
G563F	IV	降低
G563L	IV	降低
G563Q	IV	未結合
G563R	IV	降低
H565E	IV	未結合
H565F	IV	降低
H565I	IV	增加
H565Q	IV	增加
S569R	IV	類似
I581D	IV	類似
K583E	IV	類似
I581V	IV	降低

實施例 9 最佳化 HER3:Fc 抑制最佳化 EGFR 之配位體結合

EGFR<sub>T15S</sub>:Fc 亦與 HER3<sub>Y246A</sub>:Fc 在 HEK293T 細胞中共表現，且將所得異元二聚體 (RB222) 純化至約 95% 均質性。配位體結合表明 RB222 相較於親本異元二聚體 RB200 保持針對 <sup>125</sup>I-NRG1-β 改良之親和力 (K<sub>d</sub> 為 1.6 nM 對 12.3 nM)。然而，RB222 不再具有針對 EGFR 配位體改良之親和力。如圖 18 所示，異元二聚體 RB200 及 RB222 各自針對 <sup>125</sup>I-TGF-α 具有表觀 K<sub>d</sub> >30 nM (在 100 nM <sup>125</sup>I-TGF-α 下結合不飽和)，而 EGFR<sub>T15S</sub>:Fc 同元二聚體針對同一配位體呈現約

1.0 nM 之  $K_d$ 。因此，HER3 ECD 當鎖定於 Fc 介導之異元二聚體中時抑制 EGFR ECD 之高親和力結合。

### 實施例 10 A G564S 突變恢復 EGFR 配位體與 RB222 的高親和力結合

為了恢復與異元二聚體 RB222 的高親和力 EGFR 配位體結合，向集中在其子結構域 II/IV 繫栓區的 RB222 之 EGFR 臂中引入額外單獨突變。利用在不預先純化的情況下在條件培養基中有效篩選與 EGFR/HER3 異元二聚體突變體之 EGFR 配位體結合的方法。將條件培養基中 EGFR/HER3:Fc 異元二聚體以及 HER3:Fc 同元二聚體固定於 96-孔培養盤表面上，該等培養盤預塗覆有抗人類 HER3 (ECD-特異性) 抗體。此後使 EGFR 配位體與經固定 EGFR/HER3:Fc 異元二聚體結合。此方法之重要優勢為含有異元二聚體與同元二聚體之混合物的條件培養基可直接篩選用於異元二聚體特異性 EGFR 配位體結合而無須移除污染同元二聚體。

形成 10 個異元二聚體突變體且使用此方法篩選。回收具有位於自體抑制劑繫栓之子結構域 IV 中之 G564S 突變的突變體 RB242，其展示恢復之高親和力 EGFR 配位體結合。隨後將 RB242 純化至約 95% 均一性且檢定其配位體結合親和力。

上文進行之所有初始配位體親和力篩選使得可獲得並比較表觀  $K_d$  值。為了測定真實  $K_d$ ，將表觀  $K_d$  用作校準飽和結合之起始點使得所檢定受體的濃度比針對所檢定配位體量測出之  $K_d$  低至少 10 倍。當根據此數學關係進行結合檢

定時，在針對 Eu-EGF 之親和力方面 RB242 展示出優於 RB200 之 10 倍改良 ( $K_d$  為 1.0 nM 對 9.5 nM) 且在針對 Eu-NRG1- $\beta$  之親和力方面展示出 31 倍改良 ( $K_d$  為 0.1 nM 對 3.1 nM, 圖 19A 及 B)。進行競爭性配位體結合以藉由未標記之 TGF- $\alpha$  或 HB-EGF 置換 Eu-EGF 結合。在此等配位體置換檢定中，在針對 TGF- $\alpha$  之親和力方面 RB242 展示出優於 RB200 之 34-倍改良 ( $K_i$  為 0.5 nM 對 17.0 nM)，以及在針對 HB-EGF 之親和力方面 16 倍改良 ( $K_i$  為 1.3 nM 對 20.1 nM, 圖 19C 及 D)。

分析經純化 RB200 及 RB242 抑制 EGFR 及 HER3 磷酸化的能力。RB200 或 RB242 的配位體誘發之 EGFR 磷酸化的劑量依賴性抑制在 N87 細胞及 MCF7 細胞中得以證明。如增加之配位體結合親和力表明，在抑制 EGF-誘導之 EGFR 磷酸化方面 RB242 比 RB200 有效 65 倍 ( $EC_{50}$  為 1.8 nM 對 117.3 nM) 且在抑制 TGF- $\alpha$ -誘導之 EGFR 磷酸化方面有效 10 倍 ( $EC_{50}$  為 19.4 nM 對 199.0 nM)。類似地，在抑制 MCF7 細胞中 NRG1- $\beta$ -誘發之 HER3 磷酸化方面，RB242 比 RB200 有效 15 倍 ( $EC_{50}$  為 1.7 nM 對 25.1 nM)。

實施例 11 在抑制經培養腫瘤細胞的增殖方面 RB242 比 RB200 有效

比較 RB200 及 RB242 對經培養單層腫瘤細胞之增殖的作用。BxPC3 胰腺癌細胞之增殖由無血清培養基中之 TGF- $\alpha$  或 NRG1- $\beta$  誘發。生長因子誘發之 BxPC3 增殖由 RB200 或 RB242 以劑量依賴性方式抑制 (圖 20A, 上圖)。在 3 天增

殖檢定中，估算出之  $EC_{50}$  表明在抑制 TGF- $\alpha$ -或 NRG1- $\beta$ -誘發之增殖方面 RB242 比 RB200 有效約 5 倍。在 RB242 處理之 BxPC3 細胞中可見多達 200% 的抑制。此由 BxPC3 細胞在無血清條件下之增殖推測性產生，此增殖由 RB242 抑制。類似地，血清饑餓之 MCF7 乳癌細胞體由 NRG1- $\beta$  誘發增殖；此增殖受 RB200 或 RB242 抑制（圖 20A，左下圖）。在 5 天增殖檢定中，估算出之  $EC_{50}$  表明 RB242 比 RB200 有效 7 倍。在生長培養基（RPMI1640/10% FBS）中以增加之 RB200 或 RB242 濃度分析人類 H1437 NSCLC 細胞之增殖。如圖 20A（右下圖）所示，在 5 天增殖檢定中 RB242 比 RB200 有效約 5 倍（ $EC_{50}$  為 18.9 nM 對 100.7 nM）。

#### 實施例 12 RB242 展示出在人類非小細胞肺癌的小鼠模型中改良之抗腫瘤活性

在攜帶來源於人類 H1437 NSCLC 細胞之腫瘤之裸鼠中比較 RB200 及 RB242 之活體內功效。使用小鼠腫瘤異種移植模型：在雌性 CD-1 nu/nu 裸鼠中進行 H1437 非小細胞肺癌（NSCLC）腫瘤異種移植研究。以 9 隻小鼠為一組進行功效研究。將 H1437 細胞保持於 RPMI 1640/10% FBS 中。將細胞以 0.025% EDTA 採集，以培養基洗滌兩次，再懸浮於無菌 PBS 中，且接著以 100  $\mu$ l 體積中  $6 \times 10^6$  個細胞皮下注射入小鼠。使用測徑規量測腫瘤，且自長度、寬度及橫截面積計算腫瘤體積。當平均腫瘤體積達到約 100  $mm^3$  時開始處理。將小鼠以 RB200 或 RB242 以 150  $\mu$ l 體積以 12 mg/kg 腹膜內給藥，每週 3 次，歷時 3 週。在實驗室動物之

人道護理及使用的 OLAW 公共衛生服務政策(OLAW Public Health Service Policy on Humane Care and use of Laboratory Animals) (1996)之指導方針，針對實驗室動物護理及使用指南中所述的政策及帕拉奧圖醫療基金會(Palo Alto Medical Foundation)之 IACUC 下進行實驗。來自小鼠腫瘤異種移植實驗之結果使用雙因子 ANOVA 以及博非瑞尼後檢驗 (Bonferroni's post-test) 進行分析。

選擇此小鼠腫瘤模型，部分是因為 RB200 及 RB242 展示直接試管內抗增殖活性 (圖 20A, 右下圖)。皮下注射 H1437 細胞且在開始處理前使其生長至約  $100 \text{ mm}^3$ 。在此模型中，以  $12 \text{ mg/kg}$  給藥之 RB200 展示已建立腫瘤的生長抑制趨勢 (圖 20B;  $P > 0.05$ )。以相同劑量投予之 RB242 表明改良之抗腫瘤活性，在 2 週處理後將腫瘤生長抑制約 50% ( $P < 0.01$ )，與其在經培養腫瘤細胞中增強之抑制活性一致 (圖 20A)。

#### 【圖式簡單說明】

圖 1 描繪 HER 家族及其配位體。

圖 2 描繪概述 Her 調控素命名之圖表。

圖 3 描繪某些具有均一連接子及 Fc 之 Her 調控素分子。

圖 4 描繪 Her1 及 Her3 ECD 最佳化實驗之結果。

圖 5 展示量測 HFD300 及 HFD300.1 與其配位體之結合親和力的實驗結果。

圖 6 描繪 RB242.1B (作為命名之部分的「B」表示使用通用連接子) 之結合結果。

圖 7 描繪測試 Her 調控素同元二聚體抑制 Her3 磷酸化之實驗結果。

圖 8 展示測試 Her 調控素異元二聚體相對抑制受體磷酸化之實驗結果。

圖 9 展示測試相對抑制受體磷酸化之實驗結果，其中當針對配位體結合位點數目標準化時將異元二聚體與同元二聚體比較。

圖 10 展示各種 ECD 配對之平均改良倍數的結果，其展示該等配對可影響異元二聚體活性。

圖 11 描繪測試 Her 調控素抑制 NRG-誘發之 MCF7 增殖之實驗結果。

圖 12 展示測試 Her 調控素抑制 NRG-誘發之 T47D 增殖之實驗結果。

圖 13 展示 RB200 之配位體結合親和力經由高產量合理突變法最佳化。

圖 14 展示 Her 調控素可抑制配位體誘發之細胞增殖。

圖 15 展示 RB200 在大鼠中之藥物動力學。RB200 係在正常大鼠中以 15 mg/kg 呈單次靜脈內 (IV) 或腹膜內 (IP) 劑投予，在各時間點收集血漿樣本。RB200 之血漿濃度經由 Her 調控素特異性 ELISA 使用抗-HER1 及抗-HER3 作為捕獲抗體，抗-人類 Fc-HRP 作為偵測抗體來分析。資料為每時間點 2-3 隻大鼠的平均值 $\pm$ SEM。使用 Sigma Plot 10.0.1 計算藥物動力學參數。

圖 16 展示 RB200 及 RB242 在裸鼠中之血漿濃度。

RB200 及 RB242 在 CD-1 裸鼠中以 30 mg/kg 之單次腹膜內劑投予，在 24 小時及第 7 天收集血漿樣本。RB200 及 RB242 之血漿濃度係藉由 Her 調控素特異性 ELISA 測定。繪製每時間點 4 隻小鼠的平均血漿濃度 ( $\pm$ SD) 的資料。

圖 17 展示最佳化雙特異性配位體併 RB242.1 為經設計之三突變體。RB242.1 展示出較高配位體結合親和力(上圖)及對生長因子誘發之 HER 磷酸化(中圖)及腫瘤細胞增殖(下圖)的增加之抑制活性。量測 KD 及 EC50，且指示相對於親本/中間形式 (parent/interim form) 的改良倍數。

圖 18 展示高親和力 EGFR 配位體結合在 Fc 介導之 EGFR/HER3 異元二聚體中受抑制。在抗-Fc-塗覆之 96-孔培養盤中以固定於表面上之所示純化 EGFR/HER3 異元二聚體進行  $^{125}$ I-配位體結合。所示者為  $^{125}$ I-TGF- $\alpha$  結合(上圖)及  $^{125}$ I-NRG1- $\beta$  結合(下圖)。結果為三個孔之平均值  $\pm$  SEM。

圖 19 展示 RB242 已恢復針對 EGFR 配位體之高親和力。如實施例中詳述在抗-Fc-塗覆之 96-孔培養盤中使用最佳化配位體結合條件進行配位體結合。圖 A 及 B 展示 Eu-EGF 及 Eu-NRG1- $\beta$  之飽和結合。圖 C 及 D 展示以未標記之 TGF- $\alpha$  或 HB-EGF 置換 Eu-EGF。結果為三個獨立實驗之代表且標準化為與配位體結合之受體的分數。

圖 20 在圖 A 中展示 RB242 比 RB200 在抑制經培養腫瘤細胞的增殖方面更具潛力。上圖展示使用血清饑餓之 BxPC3 胰腺癌細胞在增加濃度之 RB200 或 RB242 存在下經 3 nM TGF- $\alpha$  (左上圖) 或 NRG1- $\beta$  (右上圖) 處理 3 天的結

果。左下圖展示血清饑餓之 MCF7 細胞在增加濃度之 RB200 或 RB242 存在下經 3 nM NRG1- $\beta$  處理 3 天的結果。右下圖展示 H1437 NSCLC 細胞在生長培養基(RPMI1640/10%FBS) 中在增加濃度之 RB200 或 RB242 存在下歷時 5 天的增殖。細胞增殖係使用標準技術定量且於實施例中討論。結果為 8 或 16 個重複樣本之平均值  $\pm$  SEM。BxPc3 細胞的近似  $EC_{50}$  值以約束類型設定至最大常數等於 100 而測定。圖 B 展示 RB242 在小鼠腫瘤異種移植模型中具有改良之抗腫瘤活性。如實施例中所述，裸鼠以 H1437 NSCLC 細胞皮下移植。當腫瘤體積達到約  $100 \text{ mm}^3$  時，將小鼠以每公斤 12 mg PBS 媒劑 (○) 或 RB200 (▼) 或 RB242 (▲) 處理，其係每週腹膜內投予 3 次歷時 3 週。各處理組存在 9 隻小鼠。資料表示為平均腫瘤體積  $\pm$  SEM。藉由雙向 ANOVA 以及博非瑞尼後檢驗，\*\* =  $P < 0.01$ 。

【主要元件符號說明】

無

### 五、中文發明摘要：

本發明提供包含具有改良之結合親和力之經設計之 Her3 多聚體的組成物。該等多聚體包括(但不限於)Her1/Her 3 異元二聚體，其中該 Her3 配位體結合域經最佳化以增加與 Her3 之結合。該組成物亦可包括 Her 1 同元二聚體、Her 3 同元二聚體、及 Her 1/Her 3 異元二聚體之混合物。

### 六、英文發明摘要：

The invention provides for compositions comprising engineered Her3 multimers with improved binding affinity. Such multimers include, but are not limited to, Her1/Her 3 heterodimers in which the Her3 ligand binding domain has been optimized to increase binding to Her3. The composition also can include mixtures of Her 1 homodimers, Her 3 homodimers, and Her 1/Her 3 heterodimers.

## 十、申請專利範圍：

1.一種多聚體，其包含來自 Her3 之胞外域( extracellular domain, ECD) ，其中該 Her3 經最佳化以改良與其同源配位體之結合。

2.如申請專利範圍第 1 項之多聚體，其中該 Her3 ECD 包含 Y246A 突變。

3.如申請專利範圍第 1 或 2 項之多聚體，其中該 Her3 ECD 在位置 132 處包含離胺酸。

4.如申請專利範圍第 1 項之多聚體，其中該 Her3 ECD 為 K132E 突變。

5.如申請專利範圍第 1、2 和 4 項中任一項之多聚體，其中該 Her3 ECD 經截短。

6.如申請專利範圍第 3 項之多聚體，其中該 Her3 ECD 經截短。

7.如申請專利範圍第 1 項之多聚體，其進一步包含來自 Her1 之 ECD。

8.一種多聚體，其包含來自 Her1 之胞外域 (ECD) ，其中該 Her1 經最佳化以改良與其同源配位體之結合。

9.如申請專利範圍第 8 項之多聚體，其中該 Her1 ECD 包含 T15S 突變。

10.如申請專利範圍第 9 項之多聚體，其進一步包含 G564S 突變。

11.如申請專利範圍第 10 項之多聚體，其進一步包含含有 Y246A 突變之 Her3 ECD。

12.如申請專利範圍第 8 項之多聚體，其中該 Her1 ECD 包含結構域 4 缺失。

13.如申請專利範圍第 8 項之多聚體，其中該 Her1 ECD 包含一或多個選自由 S193N、E330D、及 G588S 組成之群的突變。

14.一種包含 Her1 同元二聚體之組成物，其中該 Her1 經最佳化以改良與其同源配位體之結合。

15.如申請專利範圍第 14 項之組成物，其中該 Her1 包含一或多個選自由 T15S、G564S、結構域 4 缺失、S193N、E330D、及 G588S 組成之群的突變。

16.如申請專利範圍第 14 項之組成物，其中該 Her1 包含 T15S 及 G564S 突變。

17.一種包含 Her3 同元二聚體之組成物，其中該 Her3 經最佳化以改良與其同源配位體之結合。

18.如申請專利範圍第 17 項之組成物，其中該 Her3 包含 Y246A 突變。

19.一種包含 Her3 變體與 Her1 變體之異元二聚體之組成物，其中兩變體皆經最佳化以改良與其同源配位體之結合。

20.如申請專利範圍第 19 項之組成物，其中該 Her1 變體包含一或多個選自由 T15S、G564S、結構域 4 缺失、S193N、E330D 及 G588S 組成之群的突變。

21.如申請專利範圍第 19 項之組成物，其中該 Her1 變體包含 T15S 及 G564S 突變。

22.如申請專利範圍第 19 項之組成物，其中該 Her3 變體包含一或多個選自由 Y246A、K132E 及 K132 組成之群的突變。

23.如申請專利範圍第 21 項之組成物，其中該 Her3 變體包含 Y246A 突變。

24.如申請專利範圍第 14 至 23 項中任一項之組成物，其中另外包含與 Her1 或 Her3 或兩者連接之 Fc 受體。

25.一種包含 Her1/Her1 同元二聚體、Her1/Her3 異元二聚體、與 Her3/Her3 同元二聚體之混合物的組成物，其中該 Her 1 及/或該 Her3 組份經最佳化以改良配位體結合。

26.如申請專利範圍第 25 項之組成物，其中該 Her1 變體包含一或多個選自由 T15S、G564S、結構域 4 缺失、S193N、E330D 及 G588S 組成之群的突變且其中該 Her3 變體包含一或多個選自由 Y246A、K132E 及 K132 組成之群的突變。

27.如申請專利範圍第 25 項之組成物，其中該 Her1 變體包含 T15S 及 G564S 突變且其中該 Her3 變體包含 Y246A 突變。

28.如申請專利範圍第 14 至 23 和 25 至 27 項中任一項之組成物，其進一步包含醫藥學上可接受之賦形劑。

29.如申請專利範圍第 24 項之組成物，其進一步包含醫藥學上可接受之賦形劑。

30.一種抑制癌細胞生長之方法，其包含使該細胞與包含 Her1 變體及 Her3 變體之組成物接觸，其中該 Her 1 及/

或該 Her3 組份已經最佳化以改良配位體結合。

31.如申請專利範圍第 30 項之方法，其中該 Her1 變體包含 T15S 及 G564S 突變且其中該 Her3 變體包含 Y246A 突變。

32.一種減小腫瘤體積之方法，其包含使該細胞與包含 Her1 變體及 Her3 變體之組成物接觸，其中該 Her 1 及/或該 Her3 組份已經最佳化以改良配位體結合。

33.如申請專利範圍第 32 項之方法，其中該 Her1 變體包含 T15S 及 G564S 突變且其中該 Her3 變體包含 Y246A 突變。

## 十一、圖式：

如次頁

或該 Her3 組份已經最佳化以改良配位體結合。

31.如申請專利範圍第 30 項之方法，其中該 Her1 變體包含 T15S 及 G564S 突變且其中該 Her3 變體包含 Y246A 突變。

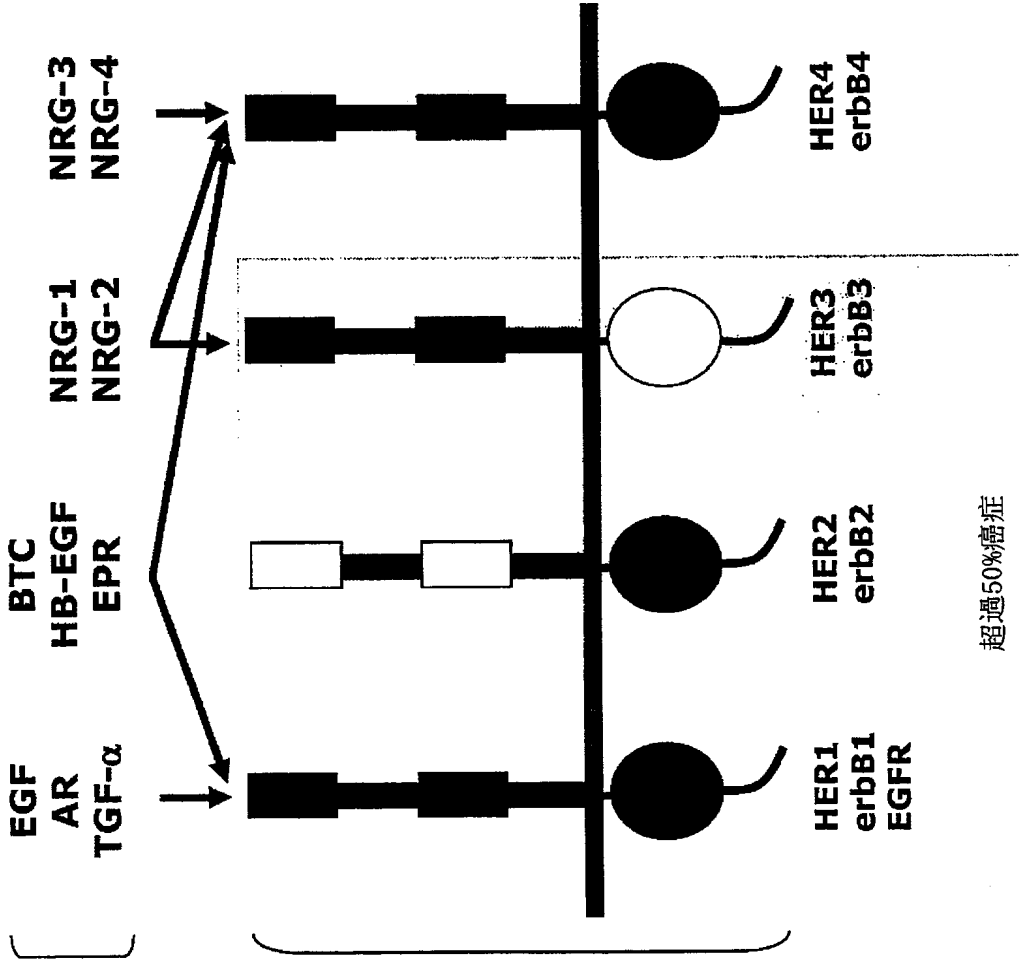
32.一種減小腫瘤體積之方法，其包含使該細胞與包含 Her1 變體及 Her3 變體之組成物接觸，其中該 Her 1 及/或該 Her3 組份已經最佳化以改良配位體結合。

33.如申請專利範圍第 32 項之方法，其中該 Her1 變體包含 T15S 及 G564S 突變且其中該 Her3 變體包含 Y246A 突變。

## 十一、圖式：

如次頁

HER家族及其配位體



三類配位體

4個HER家族成員

超過50%癌症

圖1

Her 調控素命名

	HER1 變體	HER3 變體	
HFD100	WT	HFD300	K132E
HFD110	結構域4缺失	HFD300.1	K132
HFD120	T39S (Her1 Optimizer)	HFD310	截短
HFD130	S193N, E330D, G588S (Her1 Optimizer)	HFD310.1	截短 w/ K132
HFD140	T39S, G564S	HFD320	Y246A (Her3 Optimizer)
		HFD320.1	Y246A (Her3 Optimizer) w/ K132

HER1	HER3	RB2XX (het)	RB6XX (混合物)
HFD100	HFD300	RB200	RB600
HFD100	HFD300.1	RB200.1	RB600.1
HFD100	HFD310	RB201	RB601
HFD100	HFD310.1	RB201.1	RB601.1
HFD100	HFD320	RB202	RB602
HFD100	HFD320.1	RB202.1	RB602.1
HFD110	HFD300	RB210	RB610
HFD110	HFD300.1	RB210.1	RB610.1
HFD110	HFD310	RB211	RB611
HFD110	HFD310.1	RB211.1	RB611.1
HFD110	HFD320	RB212	RB612
HFD110	HFD320.1	RB212.1	RB612.1
HFD120	HFD300	RB220	RB620
HFD120	HFD300.1	RB220.1	RB620.1
HFD120	HFD310	RB221	RB621
HFD120	HFD310.1	RB221.1	RB621.1
HFD120	HFD320	RB222	RB622
HFD120	HFD320.1	RB222.1	RB622.1
HFD130	HFD300	RB230	RB630
HFD130	HFD300.1	RB230.1	RB630.1
HFD130	HFD310	RB231	RB631
HFD130	HFD310.1	RB231.1	RB631.1
HFD130	HFD320	RB232	RB632
HFD130	HFD320.1	RB232.1	RB632.1
HFD140	HFD320.1	RB242.1	RB642.1

圖2

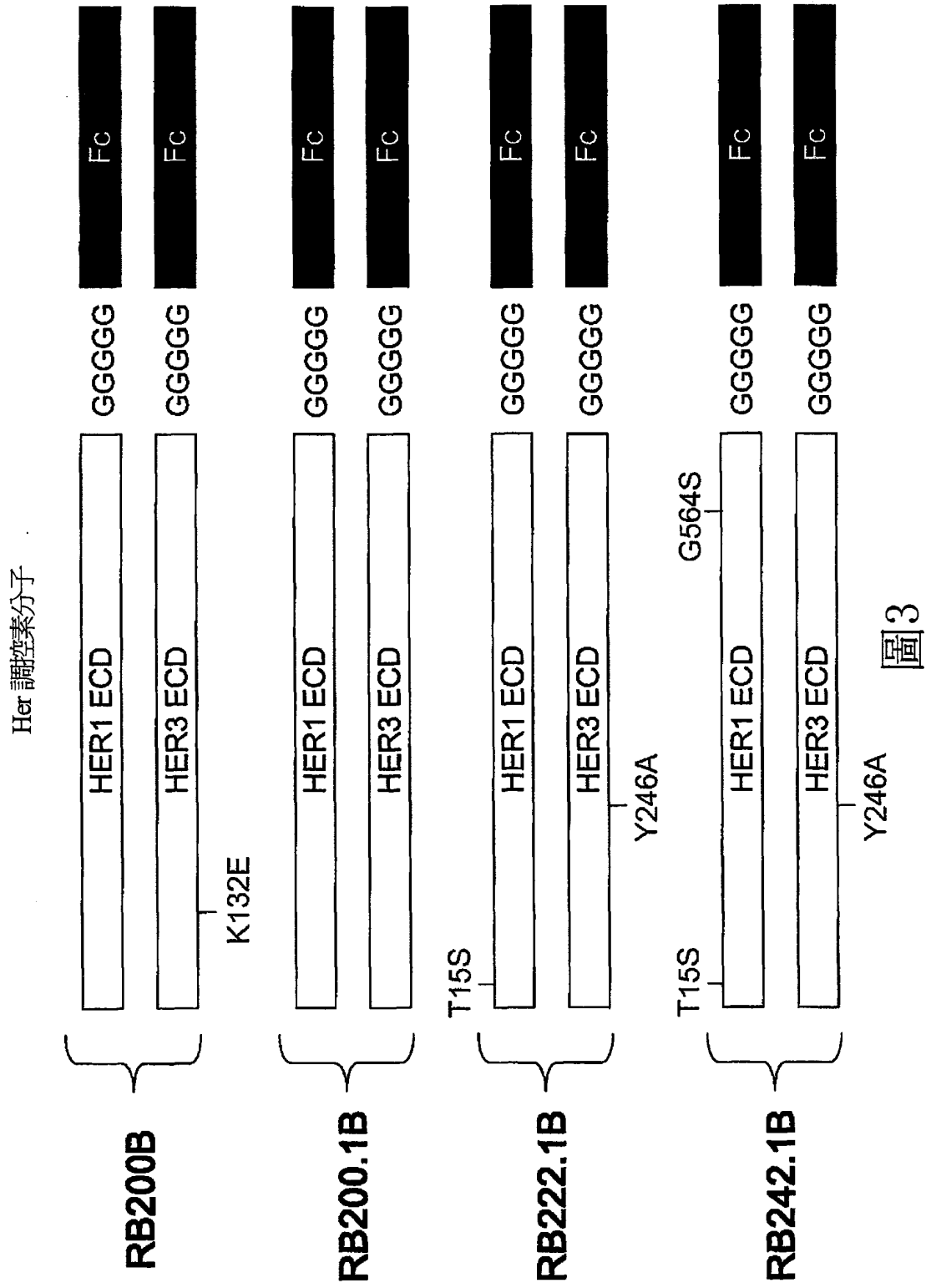


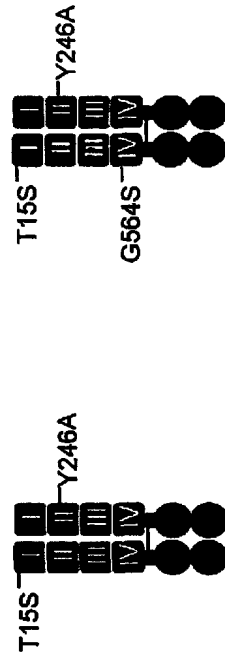
圖3

Her1及Her3 ECD之最佳化

TGF $\alpha$	HFD100	HFD120	改良倍數
KD (nM)	38.1	1.7	> 22.6
締合 (T1/2 min)	5.7	3.4	1.7
解離 (T1/2 min)	48.8	86.0	1.8
Bmax (CPM)	375	3810	10.2

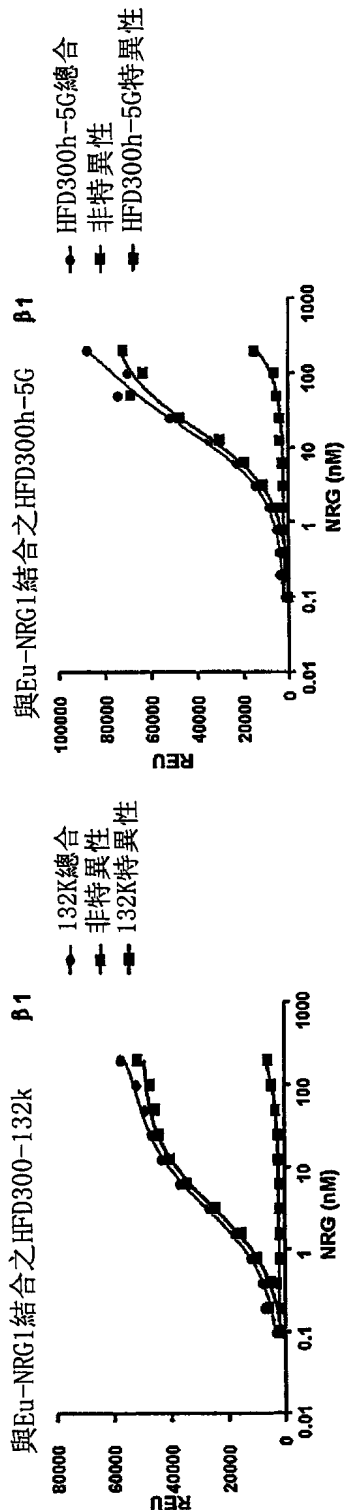
NRG1 $\beta$	HFD300.1	HFD320.1	改良倍數
KD (nM)	12.1	1.4	8.7
締合 (T1/2 min)	3.1	1.0	3.2
解離 (T1/2 min)	3.3	4.7	1.4
Bmax (CPM)	1880	7490	4.0

使用10nM <sup>125</sup>I-配位體量測締合/解離半衰期及Bmax值



RB222.1 圖4 RB242.1B

HFD300及HFD300.1之結合親和力



132K特異性	
BMAX	49963
KD	3.111

HFD300h-5G 特異性	
BMAX	79859
KD	17.06

HFD300.1 (HFD300-132K) 野生型

HFD300h (HFD300-K132E)

分子

與NRG1 $\beta 1$ 之結合親和力

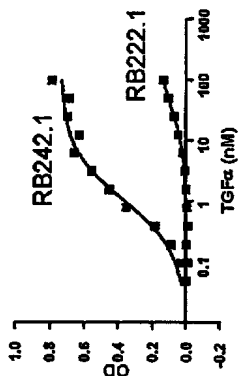
**HFD300:** 在K132E處具有突變 ----- KD ~ 17 nM (分泌程度: 210 ng/ml)

**HFD300.1:** 野生型 ----- KD ~ 3.1 nM (分泌程度: 286 ng/ml)

圖5

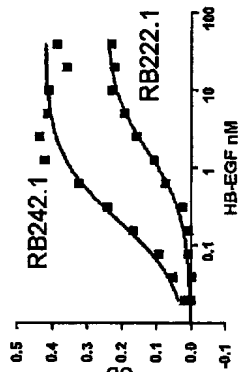
RB242.1B之結合結果

TGF $\alpha$ -生物素結合



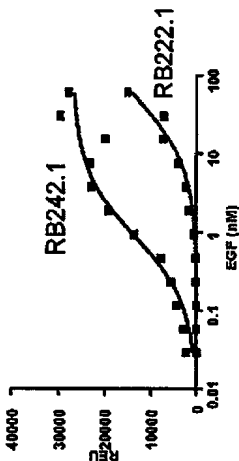
	120-G564S/320.1	120/320.1
Bmax	0.7387	0.1951
Kd	1.036	42.60

HB-EGF-生物素結合

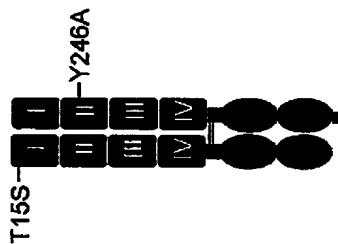


	120-G564S/320.1	RB222.1
Bmax	0.4242	0.2608
Kd	0.2115	1.580

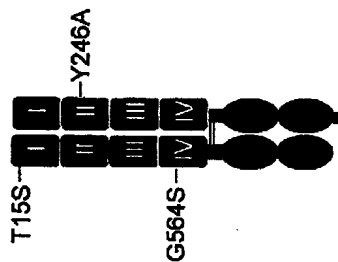
EU-EGF 結合



	20-G564S/320.1	RB222.1
Bmax	27038	28037
Kd	0.8775	45.93



RB222.1



RB242.1B

改良倍數

	KD	Bmax
TGF $\alpha$	RB222.1 + RB242.1 41.1	RB242.1 + RB222.1 3.7
HB-EGF	7.5	1.7
EGF	52.0	1.8

圖6

Her 調控素同元二聚體抑制HER3 磷酸化

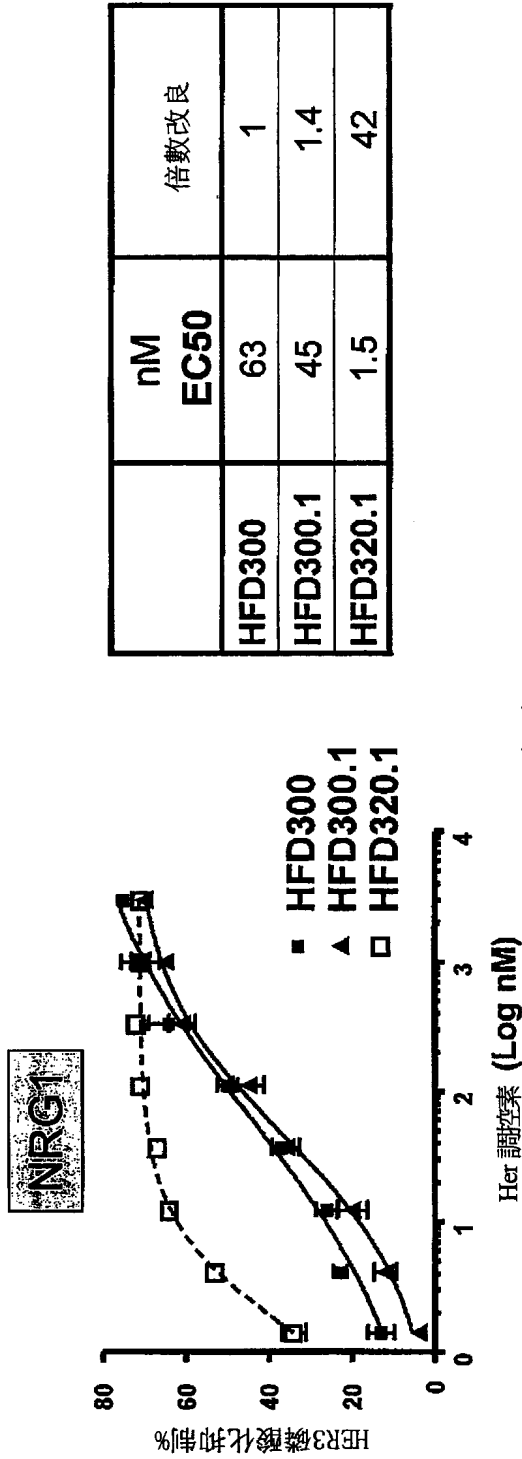


圖7

## Her 調控素異元二聚體相對抑制受體磷酸化

平均改良倍數

分子	EGF	TGF- $\alpha$	HB-EGF	NRG
RB200	1.0	1.0	1.0	1.0
RB200.1	0.6	0.8	1.0	7.1
RB202.1	0.7	1.1	1.9	52
RB220	1.6	7.7	4.4	1.2
RB222.1	0.6	1.5	0.5	9.5

圖8

異元二聚體相對於同元二聚體之 $EC_{50}$ 改良倍數  
 (針對配位體結合位點數目標準化)

分子	pHER1			pHER3		
	EGF	TGF $\alpha$	HB-EGF	EGF	TGF $\alpha$	NRG
HFD100	1	1	1			
HFD120	4	6.6	1.1			
HFD300						1.0
HFD300.1						1.0
HFD320.1						51
RB200	0.3	0.9	0.6			1.1
RB200.1	0.2	0.8	0.7			7.5
RB202.1	0.2	1.1	1.0			53
RB220	0.5	5.6	1.8			1.4
RB222.1	0.2	1.5	0.3			8.7

圖9

ECD 配對可影響異元二聚體活性

平均改良倍數

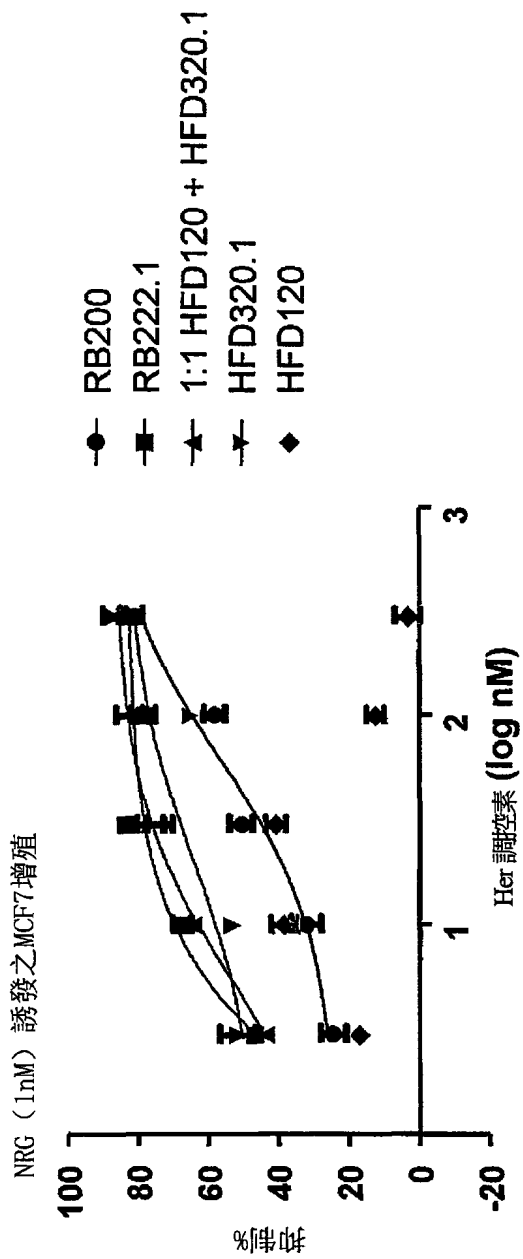
改良倍數	總HER1計分	總HER3計分
HFD100	1	
HFD120	4	
HFD300		1
HFD300.1		1
HFD320.1		51
RB200	1	1
RB200.1	1	7
RB202.1	1	52
RB220	5	1
RB220.1	ND	ND
RB222.1	1	9

構築體

HER1 ECD	HER3 ECD
100	
120	
	300
	300.1
	320.1
100	300
100	300.1
100	320.1
120	300
120	300.1
120	320.1

圖10

Her 調控素抑制 NRG-誘發之 MCF7 增殖



實驗 1

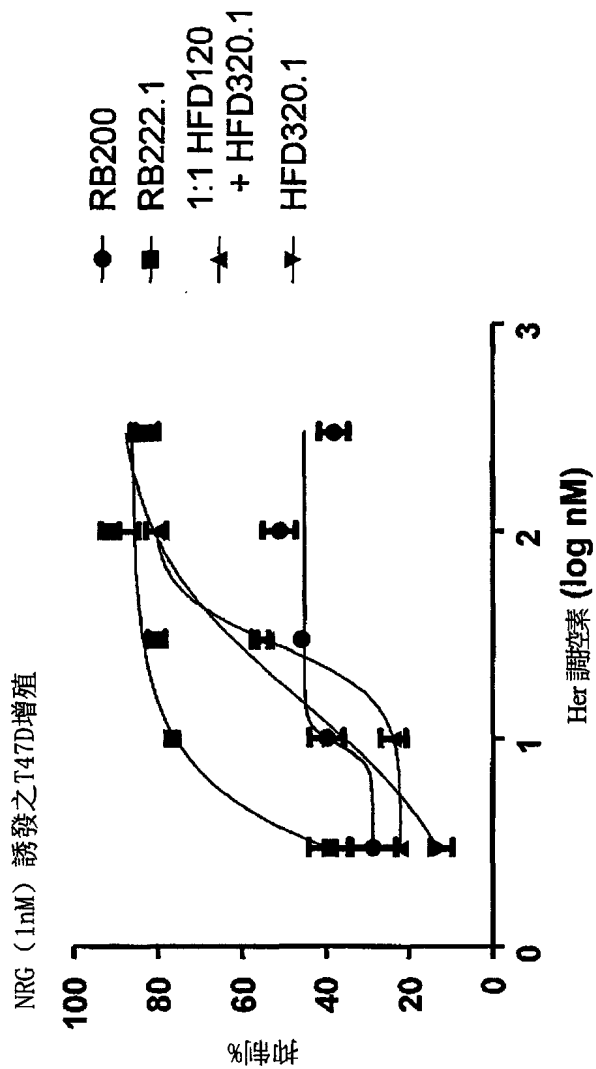
EC50	RB200	RB222.1	1:1 混合物	HFD320.1
	63.61	0.9802	5.803	21.44

實驗 2

EC50	RB200	RB222.1	1:1 混合物	HFD320.1
	104	5.863	11.07	1.989

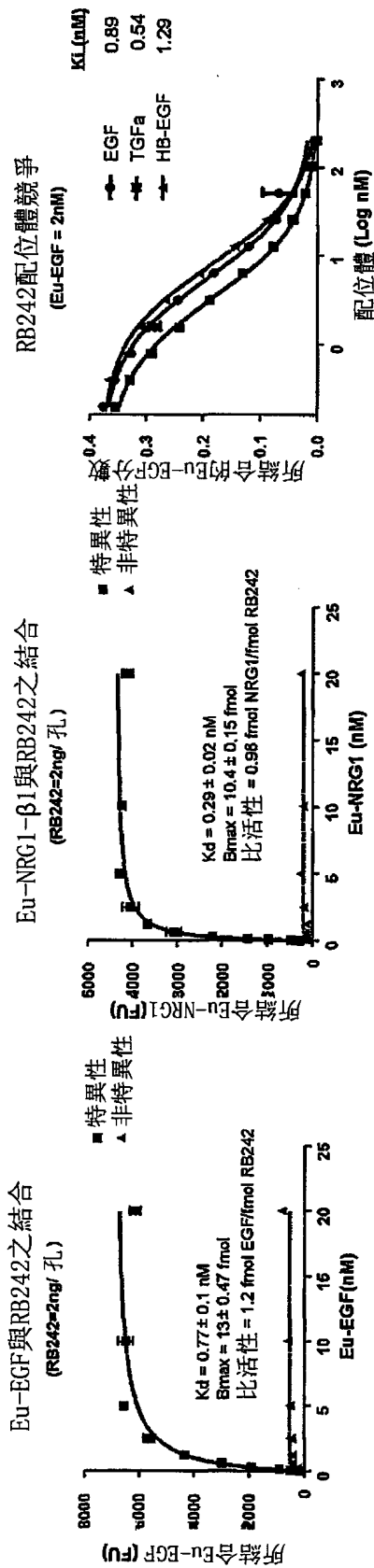
圖 11

Her 調控素抑制 NRG 誘發之 T47D 增殖



EC50	RB200	RB222.1	1:1 混合物	HFD320.1
	9.261	0.03614	28.31	15.02

圖12



**RB242 vs RB200:**

配位體結合的倍數改良

	Kd	Bmax
TGFα	31.5	3.7
HB-EGF	16.0	5.5
EGF	35.0	10
NRG1β	100.0	3.0

**RB200 最佳化方法**

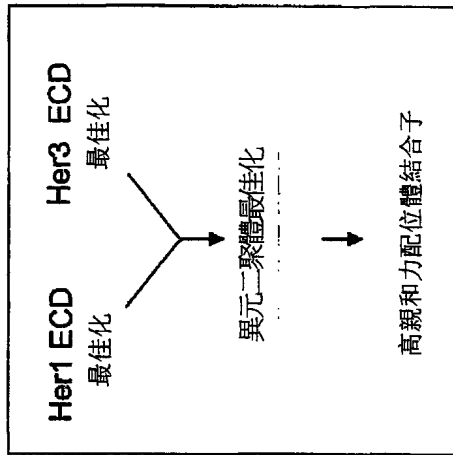


圖13

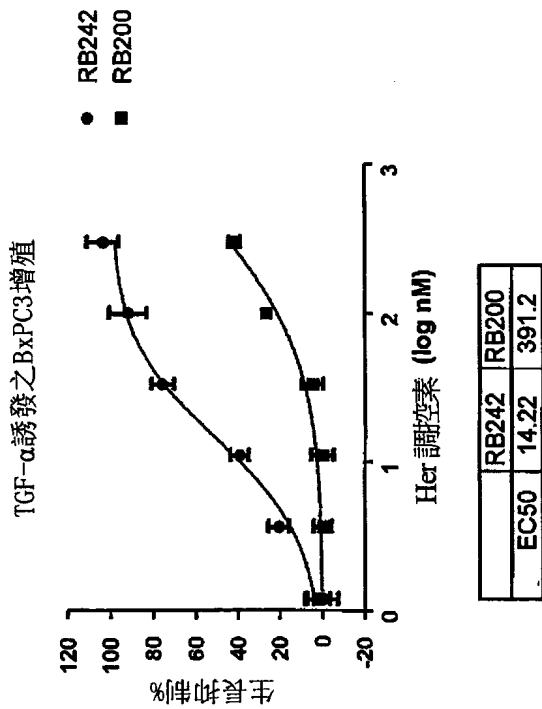
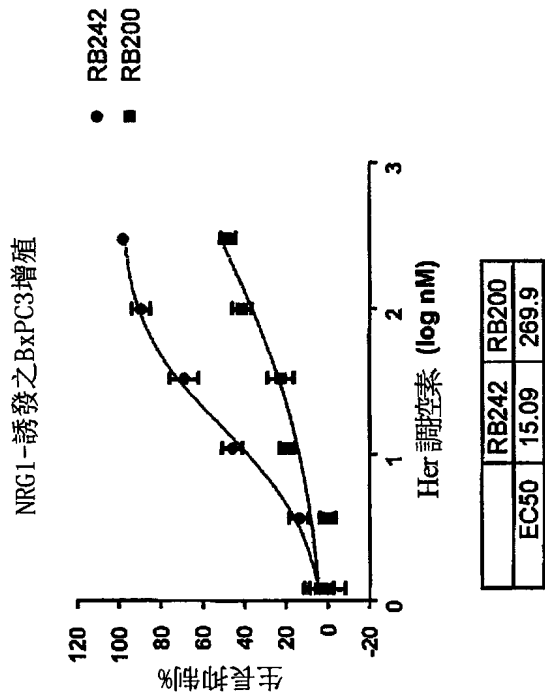


圖14

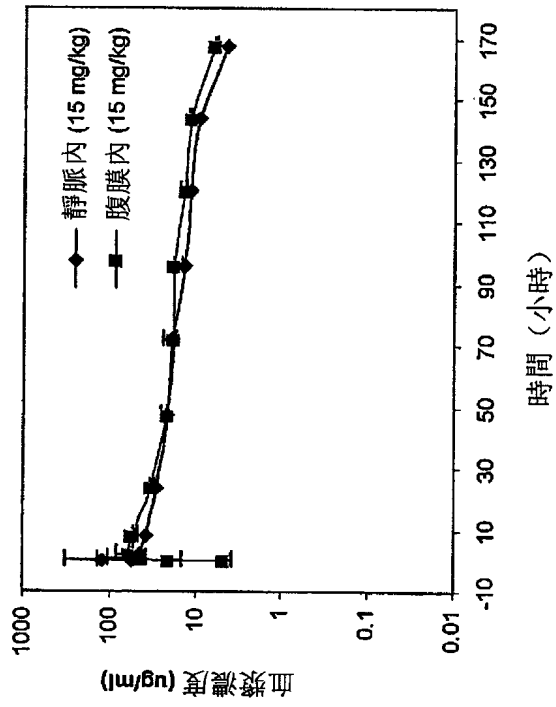


圖15

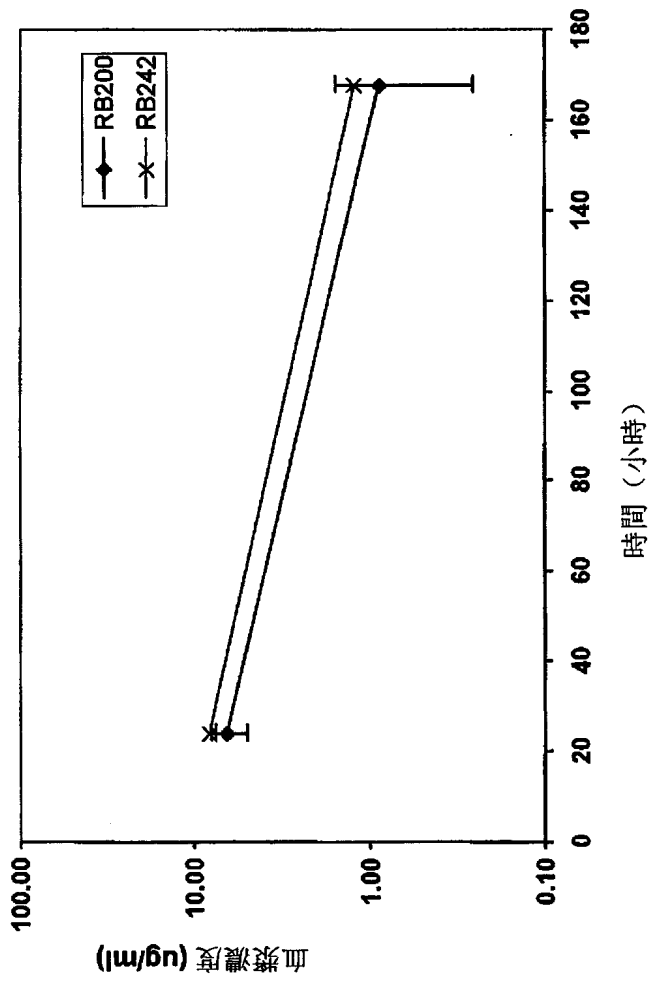


圖16

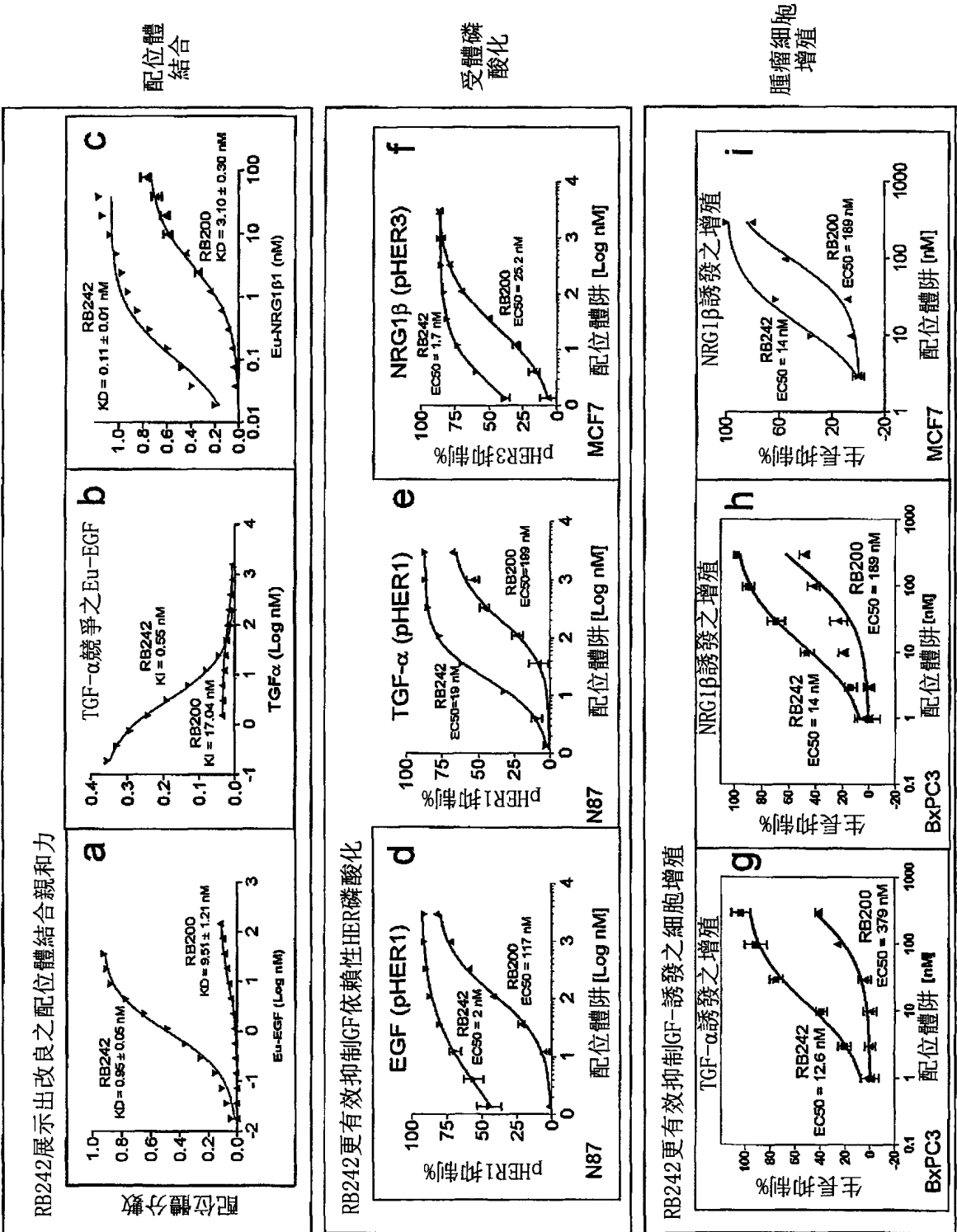


圖17

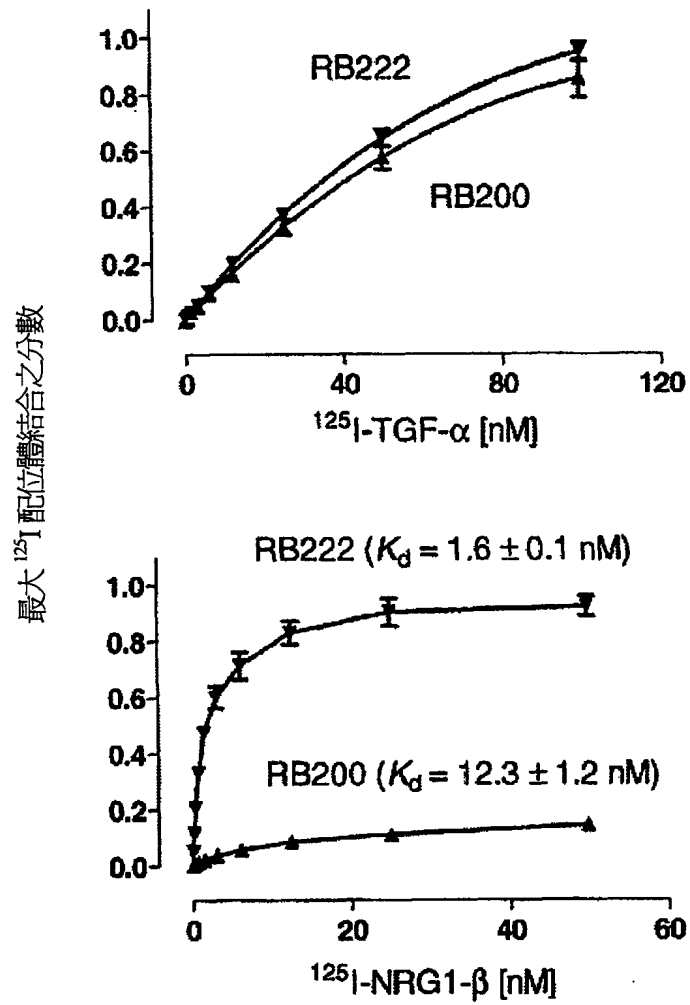


圖 18

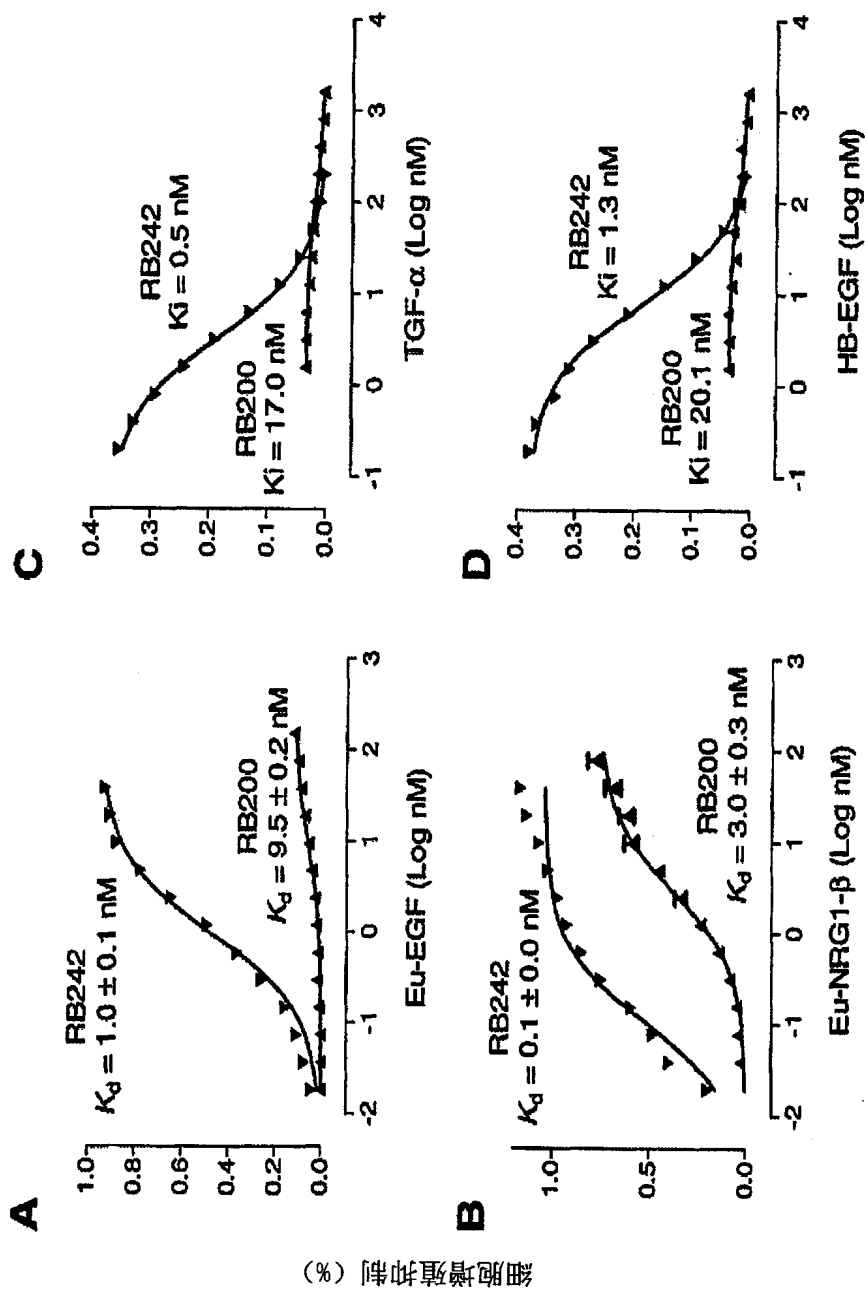
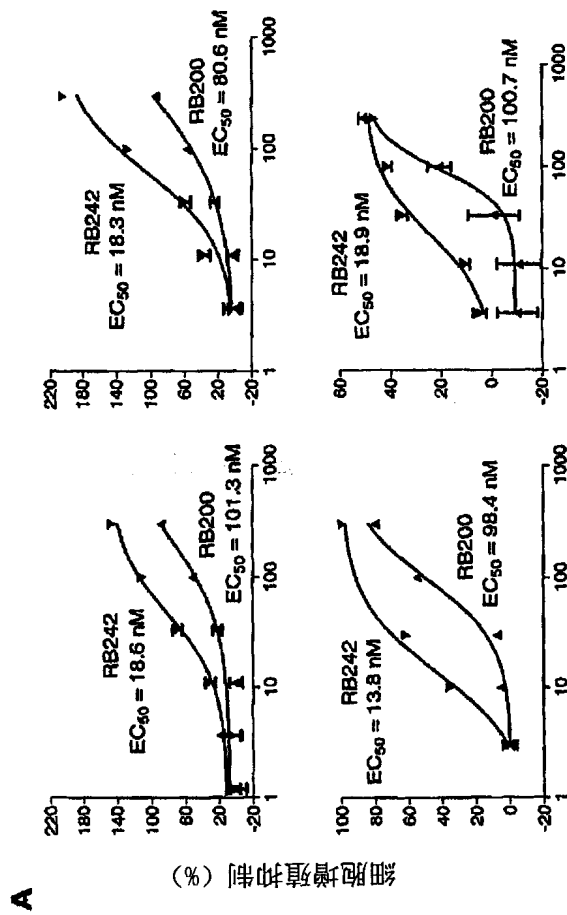


圖 19



配位體阱 (nM)

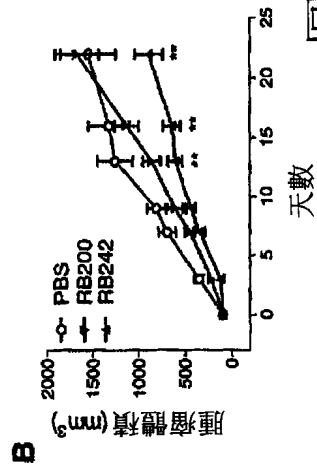


圖20

**七、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：第( 1 )圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

**八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**

無