(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201036637 A1
(43)公開日： 中華民國 99 (2010) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：099108332 (22)申請日： 中華民國 99 (2010) 年 03 月 19 日
(51)Int. Cl.： *A61K39/395 (2006.01)* *C07K16/30 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)
(30)優先權：2009/03/20 美國 61/210,562
(71)申請人：建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)
美國
(72)發明人：佛齊 傑曼尼 FUH, GERMAINE (US)；史加夫 賈伯林M SCHAEFER, GABRIELE M. (DE)；漢伯 羅瑞克 HABER, LAURIC (FR)；史瓦斯其 馬克X SLIWKOWSKI, MARK X. (US)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：33 項 圖式數：33 共 254 頁

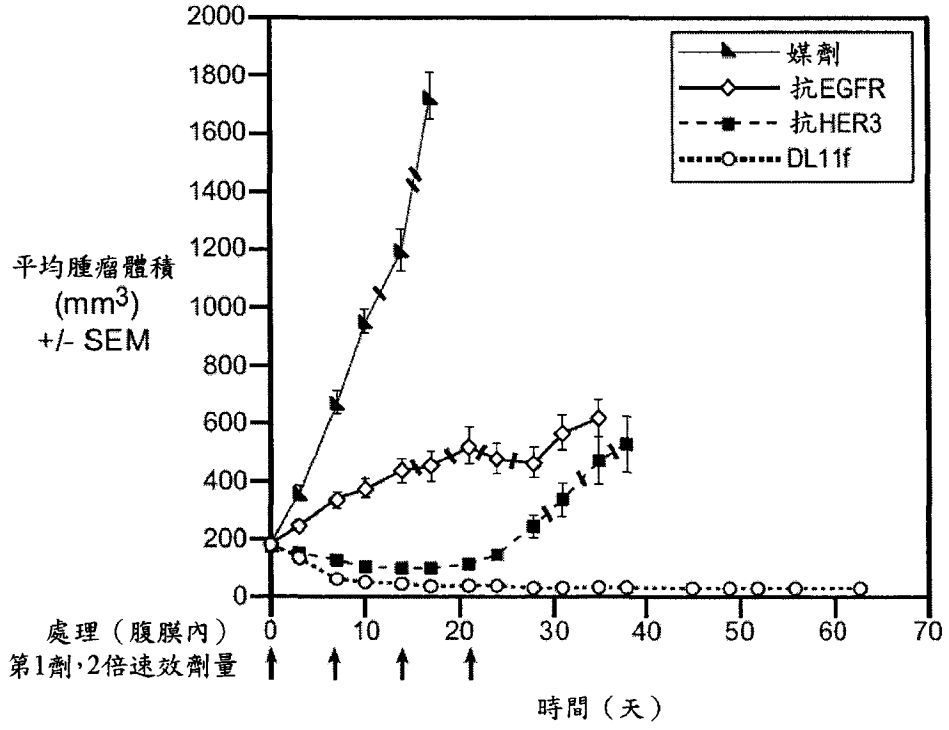
(54)名稱

抗－ＨＥＲ抗體

ANTI-HER ANTIBODIES

(57)摘要

本發明提供抗 HER 抗體，包括多特異性抗 HER 抗體，包含此等抗體之組合物，及使用此等抗體之方法。本文亦提供 EGFR/HER3 多特異性抗體，毒性小於傳統 EGFR 拮抗劑。



(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201036637 A1
(43)公開日： 中華民國 99 (2010) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：099108332 (22)申請日： 中華民國 99 (2010) 年 03 月 19 日
(51)Int. Cl.： *A61K39/395 (2006.01)* *C07K16/30 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)
(30)優先權：2009/03/20 美國 61/210,562
(71)申請人：建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)
美國
(72)發明人：佛齊 傑曼尼 FUH, GERMAINE (US)；史加夫 賈伯林M SCHAEFER, GABRIELE M. (DE)；漢伯 羅瑞克 HABER, LAURIC (FR)；史瓦斯其 馬克X SLIWKOWSKI, MARK X. (US)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：33 項 圖式數：33 共 254 頁

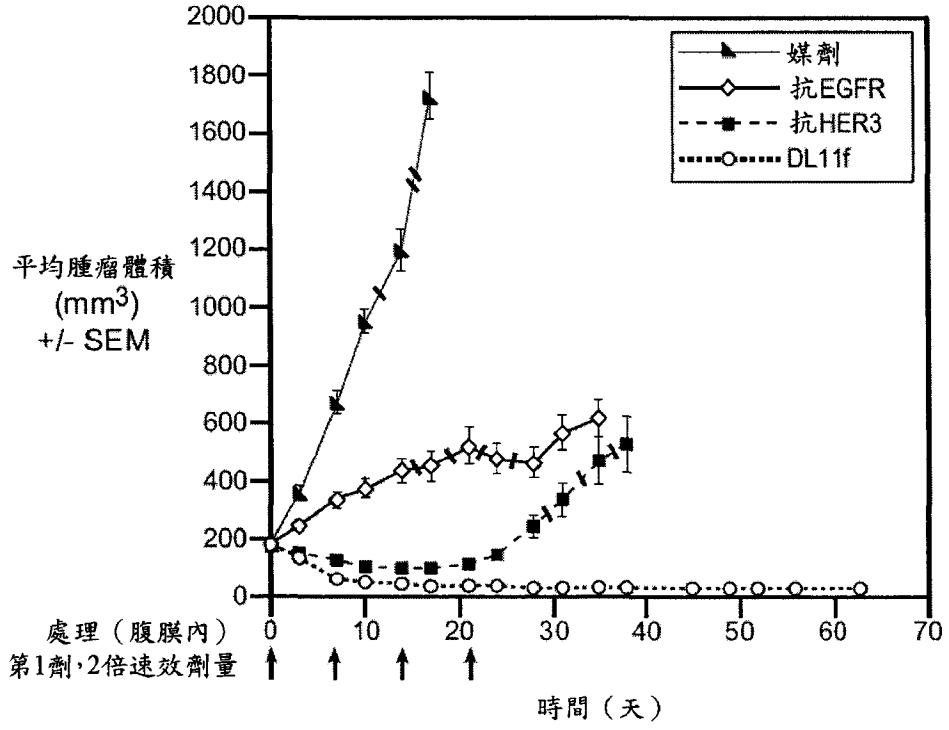
(54)名稱

抗－ＨＥＲ抗體

ANTI-HER ANTIBODIES

(57)摘要

本發明提供抗 HER 抗體，包括多特異性抗 HER 抗體，包含此等抗體之組合物，及使用此等抗體之方法。本文亦提供 EGFR/HER3 多特異性抗體，毒性小於傳統 EGFR 拮抗劑。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於抗HER抗體，包括對至少兩種不同HER受體具有結合特異性之多特異性抗HER抗體，及該等抗體治療疾病或病症之用途。

本申請案依據35 USC 119(e)主張2009年3月20日申請之美國臨時申請案第61/210562號的優先權，該案之揭示內容係以全文引用的方式併入本文中。

【先前技術】

受體酪胺酸激酶之HER家族為細胞生長、分化及存活之重要介體。該受體家族包括四個不同成員，包括表皮生長因子受體(EGFR、ErbB1或HER1)、HER2(ErbB2或$p185^{neu}$)、HER3(ErbB3)及HER4(ErbB4或tyro2)。

由*erb*B1基因編碼之EGFR在病因上已牽涉人類惡性疾病。詳言之，已在乳癌、膀胱癌、肺癌、頭癌、頸癌及胃癌以及神經膠母細胞瘤中觀測到EGFR表現提高。EGFR受體表現提高通常引起相同腫瘤細胞更多地產生EGFR配位體(轉型生長因子α(TGF-α))，從而使得受體活化藉由自分泌刺激路徑進行。Baselga及Mendelsohn *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994)。針對EGFR或其配位體TGF-α及EGF之單株抗體作為治療此等惡性疾病之治療劑業已評估。參看例如Baselga及Mendelsohn，同上文；Masui等人，*Cancer Research* 44:1002-1007 (1984)；及Wu等人，*J. Clin. Invest.* 95:1897-1905 (1995)。

HER家族之第二個成員HER2(p185^{neu})最初以來自經化學處理之大鼠之神經母細胞瘤的轉型基因產物形式得到鑑別。活化形式之*neu*原癌基因係因所編碼蛋白質之跨膜區中之點突變(纈胺酸突變為麩胺酸)產生。*neu*之人類同系物擴增已在乳癌及卵巢癌中觀測到且與不良預後有關(Slamon等人，*Science*, 235:177-182 (1987)；Slamon等人，*Science*, 244:707-712 (1989)；及美國專利第4,968,603號)。亦已在其他癌(包括胃癌、子宮內膜癌、唾腺癌、肺癌、腎癌、結腸癌、甲狀腺癌、胰臟癌及膀胱癌)中觀測到HER2過度表現(通常但非一律歸因於基因擴增)。尤其參看King等人，*Science*, 229:974 (1985)；Yokota等人，*Lancet*: 1:765-767 (1986)；Fukushige等人，*Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986)；Guerin等人，*Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988)；Cohen等人，*Oncogene*, 4:81-88 (1989)；Yonemura等人，*Cancer Res.*, 51:1034 (1991)；Borst等人，*Gynecol. Oncol.*, 38:364 (1990)；Weiner等人，*Cancer Res.*, 50:421-425 (1990)；Kern等人，*Cancer Res.*, 50:5184 (1990)；Park等人，*Cancer Res.*, 49:6605 (1989)；Zhau等人，*Mol. Carcinog.*, 3:254-257 (1990)；Aasland等人，*Br. J. Cancer* 57:358-363 (1988)；Williams等人，*Pathobiology* 59:46-52 (1991)；及McCann等人，*Cancer*, 65:88-92 (1990)。HER2可在前列腺癌中過表現(Gu等人，*Cancer Lett.* 99:185-9 (1996)；Ross等人，*Hum. Pathol.* 28:827-33 (1997)；Ross等人，*Cancer* 79:2162-70 (1997)；及Sadasivan等人，*J.*

Urol. 150:126-31 (1993))。

針對大鼠p185^{neu}及人類HER2蛋白產物之抗體業已描述。Drebin及同事已製得針對大鼠*neu*基因產物p185^{neu}之抗體。參看例如Drebin等人，*Cell* 41:695-706 (1985)；Myers等人，*Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991)；及WO 94/22478。Drebin等人，*Oncogene* 2:273-277 (1988)報導對p185^{neu}之兩個不同區域具有反應性之抗體混合物對植入裸小鼠中之經*neu*轉型NIH-3T3細胞產生協同抗腫瘤作用。亦參看1998年10月20日頒予之美國專利5,824,311。

Hudziak等人，*Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989)描述一組HER2抗體之產生，其特徵為使用人類乳房腫瘤細胞株SK-BR-3。72小時後，藉由單層結晶紫染色來測定SK-BR-3細胞在暴露於抗體後之相對細胞增殖。使用此檢定，稱為4D5之抗體獲得最大抑制，其將細胞增殖抑制56%。在此檢定中，該組中之其他抗體將細胞增殖降至較小程度。進一步發現抗體4D5使過度表現HER2之乳房腫瘤細胞株對TNF-α之細胞毒性作用敏感。亦參看1997年10月14日頒予之美國專利第5,677,171號。Hudziak等人所論述之HER2抗體的特徵進一步描述於以下文獻中：Fendly等人，*Cancer Research* 50:1550-1558 (1990)；Kotts等人，*In Vitro* 26(3):59A (1990)；Sarup等人，*Growth Regulation* 1:72-82 (1991)；Shepard等人，*J. Clin. Immunol.* 11(3):117-127 (1991)；Kumar等人，*Mol. Cell. Biol.* 11(2):979-986 (1991)；Lewis等人，*Cancer Immunol. Immunother.*

37:255-263 (1993)；Pietras等人，*Oncogene* 9:1829-1838 (1994)；Vitetta等人，*Cancer Research* 54:5301-5309 (1994)；Sliwkowski等人，*J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665 (1994)；Scott等人，*J. Biol. Chem.* 266:14300-5 (1991)；D'souza等人，*Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7202-7206 (1994)；Lewis等人，*Cancer Research* 56:1457-1465 (1996)；及Schaefer等人，*Oncogene* 15:1385-1394 (1997)。

重組人類化型鼠類HER2抗體4D5(huMAb4D5-8、rhuMAb HER2、曲妥珠單抗(trastuzumab)或HERCEPTIN®；美國專利第5,821,337號)對患有過度表現HER2之轉移性乳癌的已接受廣泛先前抗癌療法之患者具有臨床活性(Baselga等人，*J. Clin. Oncol.* 14:737-744 (1996))。食品及藥物管理局(Food and Drug Administration)於1998年9月25日批准曲妥珠單抗可在市面上銷售用於治療轉移性乳癌患者，該等患者之腫瘤過度表現HER2蛋白。

具有不同特性之其他HER2抗體已描述於以下文獻中：Tagliabue等人，*Int. J. Cancer* 47:933-937 (1991)；McKenzie等人，*Oncogene* 4:543-548 (1989)；Maier等人，*Cancer Res.* 51:5361-5369 (1991)；Bacus等人，*Molecular Carcinogenesis* 3:350-362 (1990)；Stancovski等人，*PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991)；Bacus等人，*Cancer Research* 52:2580-2589 (1992)；Xu等人，*Int. J. Cancer* 53:401-408 (1993)；WO 94/00136；Kasprzyk等人，*Cancer Research* 52:2771-2776 (1992)；Hancock等人，*Cancer Res.* 51:4575-4580 (1991)；

Shawver等人，*Cancer Res.* 54:1367-1373 (1994)；Arteaga等人，*Cancer Res.* 54:3758-3765 (1994)；Harwerth等人，*J. Biol. Chem.* 267:15160-15167 (1992)；美國專利第5,783,186號；及Klapper等人，*Oncogene* 14:2099-2109 (1997)。

同源性篩檢已鑑別兩種其他HER受體家族成員：HER3(美國專利第5,968,511號、第5,183,884號及第5,480,968號以及Kraus等人，*PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989))及HER4(歐洲專利申請案第599,274號；Plowman等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993)；及Plowman等人，*Nature*, 366:473-475 (1993))。此等受體在至少一些乳癌細胞株上均顯示提高之表現。

HER受體一般以不同組合存在於細胞中且認為雜二聚可提高對各種HER配位體之細胞反應的多樣性(Earp等人，*Breast Cancer Research and Treatment* 35: 115-132 (1995))。EGFR可由六種不同配位體結合；表皮生長因子(EGF)、轉型生長因子α(TGF-α)、雙調蛋白(amphiregulin)、肝素結合表皮生長因子(HB-EGF)、β細胞調節素(betacellulin)及表皮調節素(epiregulin)(Groenen等人，*Growth Factors* 11:235-257 (1994))。替代性拼接單基因所產生之神經調節蛋白-1(heregulin)蛋白質家族為HER3及HER4之配位體。神經調節蛋白-1家族包括α、β及γ神經調節蛋白-1(Holmes等人，*Science*, 256:1205-1210 (1992)；美國專利第5,641,869號；及Schaefer等人，*Oncogene* 15:1385-1394 (1997))；*neu*分化因子(NDF)、神經膠質生長因子(GGF)；

乙醯膽鹼受體誘導活性因子(ARIA)；及感覺及運動神經元衍生因子(SMDF)。欲回顧，參看Groenen等人，*Growth Factors* 11:235-257 (1994)；Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7:247-262 (1996)及Lee等人，*Pharm. Rev.* 47:51-85 (1995)。已鑑別三種其他HER配位體；據報導可結合HER3或HER4之神經調節蛋白-2(NRG-2)(Chang等人，*Nature* 387 509-512 (1997)；及Carraway等人，*Nature* 387:512-516 (1997))；結合HER4之神經調節蛋白-3(Zhang等人，*PNAS* (USA) 94(18):9562-7 (1997))；及結合HER4之神經調節蛋白-4(Harari 等人，*Oncogene* 18:2681-89 (1999))。HB-EGF、β細胞調節素及表皮調節素亦結合HER4。

儘管EGF及TGFα不結合HER2，但EGF刺激EGFR與HER2形成雜二聚體，活化EGFR且引起雜二聚體中之HER2發生轉磷酸化。二聚化及/或轉磷酸化似乎活化HER2酪胺酸激酶。參看Earp等人，同上文。同樣地，當HER3與HER2共表現時，形成活化信號傳導複合物且針對HER2之抗體能夠分裂此複合物(Sliwkowski等人，*J. Biol. Chem.*, 269(20): 14661-14665 (1994))。另外，當與HER2共表現時，HER3對神經調節蛋白-1(HRG)之親和力提高至較高親和力狀態。關於HER2-HER3蛋白複合物，亦參看Levi等人，*Journal of Neuroscience* 15: 1329-1340 (1995)；Morrissey等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1431-1435 (1995)；及Lewis等人，*Cancer Res.*, 56:1457-1465 (1996)。如

HER3，HER4亦可與HER2形成活化信號傳導複合物(Carraway及Cantley, *Cell* 78:5-8 (1994))。

靶向HER路徑之治療劑目前用於治療諸如乳癌、非小細胞肺癌、結腸直腸癌、頭頸癌及胰臟癌之疾病。儘管此等治療劑已取得一些成功，但仍存在關於天然及誘發抗藥性及毒性之問題。Arteaga CL. *J Clin Oncol* 21:289-91s (2003)；Hoshi S等人，*Gan To Kagaku Ryoho* 31:1209-13 (2004)；Viloria-Petit AM及Kerbel RS. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58:914-26 (2004)；Bianco R等人，*Endocr Relat Cancer* 12:S159-71 (2005)；Engelman JA及Janne PA., *Clin Cancer Res* 14:2895-9 (2008)；Davoli A等人，*Cancer Chemother Pharmacol.* 65(4):611-23 (2010)；Pohlmann PR等人，*Clin Cancer Res.* 15(24):7479-7491 (2009)。詳言之，靶向HER1(EGFR)之治療劑經常引起不良副作用，諸如顯著程度之皮膚毒性。Robert等人，*Lancet Oncology* 6:491-500 (2005)。

因此，需要開發靶向HER路徑之經改良治療劑。

【發明內容】

本發明提供多特異性抗體，其包含可特異性結合於至少兩種選自由以下組成之群的HER受體之抗原結合域：(a)EGFR及HER2、(b)EGFR及HER3及(c)EGFR及HER4。抗體抑制至少一種HER受體之生物活性。在特定實施例中，多特異性抗體特異性結合於其標靶HER受體且不特異性結合於非標靶HER受體。因此，在一個實施例中，抗體特異

性結合於EGFR及HER3但不特異性結合於HER2或HER4。在另一實施例中，抗體特異性結合於EGFR及HER2但不特異性結合於HER3或HER4。在另一實施例中，抗體特異性結合於EGFR及HER4但不特異性結合於HER2或HER3。本發明亦提供特異性結合於標靶HER受體之單特異性抗體。

本發明之一個態樣提供能夠特異性結合於EGFR及另一種HER受體、毒性小於諸如西妥昔單抗(cetuximab)之傳統EGFR拮抗劑的多特異性抗體。在一個實施例中，毒性為皮膚毒性。在一個實施例中，多特異性HER抗體包含可特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域。

在一個態樣中，本發明提供一種包含可特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域的多特異性抗體。在一個實施例中，多特異性抗體之毒性比EGFR拮抗劑小。在一個實施例中，多特異性抗體抑制EGFR及HER3中至少一者之生物活性。在一個實施例中，抗體抑制EGF結合於EGFR。在另一實施例中，抗體抑制TGF-α誘導之EGFR磷酸化。在一些實施例中，抗體抑制腫瘤細胞生長。在一個實施例中，多特異性抗體特異性結合於EGFR及HER3但不特異性結合於HER2或HER4。

在一個實施例中，多特異性抗體包含可以小於10^{-6} M之Kd特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域。在一個實施例中，多特異性抗體包含可以小於10^{-6} M之Kd特異性結合EGFR且可以小於10^{-7} M之Kd特異性結合HER3的抗原結合域。

在一個實施例中，包含可特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域的多特異性抗體包含(a)包含LSGDWIH之胺基酸序列(SEQ ID NO: 48)的HVR-H1；(b)包含VGEISAAGGYTD之胺基酸序列(SEQ ID NO: 51)的HVR-H2；及(c)包含ARESRVSFEAAMDY之胺基酸序列(SEQ ID NO: 53)的HVR-H3；及(d)包含NIATDVA之胺基酸序列(SEQ ID NO: 55)的HVR-L1；(e)包含SASF之胺基酸序列(SEQ ID NO: 56)的HVR-L2；及(f)包含SEPEPYT之胺基酸序列(SEQ ID NO: 57)的HVR-L3。

在一個實施例中，包含可特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域的多特異性抗體包含(a)對SEQ ID NO: 30之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之重鏈可變域；(b)對SEQ ID NO: 29之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之輕鏈可變域；或(c)如(a)中之重鏈可變域序列及如(b)中之輕鏈可變域序列。在一個實施例中，包含可特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域的多特異性抗體包含SEQ ID NO: 30之重鏈可變域序列。在一個實施例中，包含可特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域的多特異性抗體包含SEQ ID NO: 29之輕鏈可變域序列。在另一實施例中，包含可特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域的多特異性抗體包含SEQ ID NO: 30之重鏈可變域序列及SEQ ID NO: 29之輕鏈可變域序列。

在一些實施例中，包含可特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域的多特異性抗體為全長IgG1抗體。

本發明之一個態樣提供一種編碼多特異性HER抗體的分離之核酸。另一態樣提供一種包含編碼多特異性HER抗體之核酸的宿主細胞。又一態樣提供一種產生多特異性HER抗體之方法，其包含培養包含編碼多特異性HER抗體之核酸的宿主細胞以產生抗體。

本發明之一個態樣提供一種包含多特異性HER抗體及細胞毒性劑之免疫結合物。另一態樣提供一種醫藥調配物，其包含多特異性HER抗體及醫藥學上可接受之載劑。

本發明之一個態樣提供一種治療患有癌症之個體的方法，其包含向該個體投與有效量之多特異性HER抗體。在一個實施例中，多特異性HER抗體包含可特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域。在一個實施例中，由多特異性HER抗體治療之癌症包含表現EGFR及HER3之細胞。在一個實施例中，由多特異性HER抗體治療之癌症為乳癌、結腸直腸癌、胰臟癌、頭頸癌、黑色素瘤、卵巢癌、前列腺癌或非小細胞肺癌。

本發明之另一態樣提供一種抑制個體中HER受體生物活性之方法，其包含向該個體投與有效量之多特異性HER抗體。在一個實施例中，多特異性HER抗體包含可特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域。

本發明之一個態樣提供一種適用作藥物之多特異性HER抗體。另一態樣提供一種用於治療癌症(諸如乳癌、結腸直腸癌、胰臟癌、頭頸癌、黑色素瘤、卵巢癌、前列腺癌或非小細胞肺癌)的多特異性HER抗體。另一態樣提供一

種用於抑制HER受體之生物活性的多特異性HER抗體。在一個實施例中，多特異性HER抗體包含可特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域。

本發明之另一態樣提供一種用於製造藥物之多特異性HER抗體。在一個實施例中，該藥物可用以治療癌症，諸如乳癌、結腸直腸癌、胰臟癌、頭頸癌、黑色素瘤、卵巢癌、前列腺癌或非小細胞肺癌。在一個實施例中，藥物係用於抑制HER受體之生物活性。在一個實施例中，多特異性HER抗體包含可特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域。在一個實施例中，多特異性HER抗體之毒性比諸如西妥昔單抗之傳統EGFR拮抗劑小。

【實施方式】

I.定義

除非另作定義，否則本文中所用之所有技術術語、記法及其他科學術語均意欲具有熟習本發明所屬技術者通常所理解之含義。在一些情況下，為清楚及/或容易參考起見，在本文中定義具有通常所理解含義之術語，且本文中包括此等定義不應解釋為代表與此項技術中一般所瞭解有實質差異。本文中所述或所參考之技術及程序一般易懂且通常由熟習此項技術者使用習知方法實施，諸如以下文獻中所述之廣泛利用之分子選殖方法：Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual第2版(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y。除非另作說明，若適當，涉及使用市售套組及試劑之程序

一般根據製造商規定之方案及/或參數進行。

因此，在描述本發明之方法、套組及用途之前，應瞭解本發明並不限於特定方法，所述方案、細胞株、動物種或屬、構築體及試劑當然可變化。亦應瞭解，本文中所用之術語僅為描述特定實施例，並不意欲限制本發明之範疇，其僅由隨附申請專利範圍限制。

必須注意，除非上下文另外明確規定，否則如本文及隨附申請專利範圍中所用，單數形式「一」及「該」包括複數指示物。

在本說明書及申請專利範圍中，「包含(comprise)」一詞或變化形式(諸如「comprises」或「comprising」)應理解為意指包括所述整體或整群，但不排除任何其他整體或整群。

術語「抗體」在本文中係以最廣泛意義使用，且特定涵蓋單株抗體、多株抗體、多特異性抗體，及抗體片段，祇要其顯示所需生物活性。術語「多特異性抗體」係以最廣泛意義使用，且特定涵蓋包含具有多抗原決定基特異性(polyepitopic specificity)(亦即能夠特異性結合於一種生物分子上之兩個或兩個以上不同抗原決定基，或能夠特異性結合於兩種或兩種以上不同生物分子上之抗原決定基)之抗原結合域的抗體。抗原結合域之一個特定實例為包含重鏈可變域(V_H)及輕鏈可變域(V_L)之V_HV_L單元。此等多特異性抗體包括(但不限於)全長抗體、具有兩個或兩個以上V_L及V_H域之抗體、抗體片段(諸如Fab、Fv、dsFv、scFv)、

雙功能抗體(diabodies)、雙特異性雙功能抗體及三功能抗體(triabodies)、已共價或非共價連接之抗體片段。「雙特異性抗體」為一種多特異性抗體，其包含能夠特異性結合於一種生物分子上之兩個不同抗原決定基，或能夠特異性結合於兩種不同生物分子上之抗原決定基的抗原結合域。雙特異性抗體在本文中亦稱為具有「雙特異性」或為「雙特異」。

在某些實施例中，本發明之抗體對其標靶HER具有≤1 μM、≤100 nM、≤10 nM、≤1 nM、≤0.1 nM、≤0.01 nM或≤0.001 nM(例如10^{-8} M或10^{-8} M以下，例如10^{-8} M至10^{-13} M，例如10^{-9} M至10^{-13} M)之解離常數(Kd)。

基本4鏈抗體單元為由兩條相同輕(L)鏈及兩條相同重(H)鏈構成之雜四聚醣蛋白(IgM抗體係由5個基本雜四聚體以及稱為J鏈之其他多肽組成，且因此含有10個抗原結合位點，而分泌之IgA抗體可聚合形成包含2-5個基本4鏈單元以及J鏈之多價集合體)。在IgG之情況下，4鏈單元一般為約150,000道爾頓。各L鏈藉由一個雙硫鍵與H鏈連接，而兩條H鏈視H鏈同型而定彼此藉由一或多個雙硫鍵連接。各H鏈及L鏈亦具有規則間隔之鏈內雙硫橋。各H鏈在N端具有可變域(V_H)，繼之為各α及γ鏈之三個恆定域(C_H)及μ及ε同型之四個C_H域。各L鏈在N端具有可變域(V_L)，繼之為位於其另一端之恆定域(C_L)。V_L與V_H比對且C_L與重鏈之第一恆定域(C_H1)比對。咸信特定胺基酸殘基形成輕鏈與重鏈可變域之間的界面。成對之V_H與V_L一起形成單一抗

原結合位點。關於不同種類抗體之結構及特性，參看例如**Basic and Clinical Immunology**，第8版，Daniel P. Stites, Abba I. Terr及Tristram G. Parslow（編），Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994，第71頁及第6章。

來自任何脊椎動物物種之L鏈均可基於其恆定域之胺基酸序列歸屬為稱為κ及λ之兩種明顯不同類型之一。免疫球蛋白可視其重鏈之恆定域(C_H)之胺基酸序列而定歸屬於不同種類或同型。存在五類免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，其重鏈分別指定為α、δ、γ、ε及μ。基於C_H序列及功能之相對較小差異，將γ及α類進一步分成子類，例如人類表現以下子類：IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1及IgA_2。

術語「可變」係指可變域之某些區段的序列在抗體之間廣泛不同。V域介導抗原結合且限定特定抗體對其特定抗原之特異性。然而，可變性並不均勻分布在跨度為110個胺基酸之可變域上。事實上，V區域係由具有15-30個胺基酸的相對不變區段(稱為構架區(FR))組成，該等區段由極具可變性之較短區域(稱為高變區或HVR)分隔。天然重鏈及輕鏈之可變域各自包含四個FR，主要採用β摺疊構型，由三個高變區連接，該等高變區形成連接β摺疊結構的環且在一些情況下形成β摺疊結構之一部分。各鏈中之高變區藉由FR緊密結合在一起且與其他鏈之高變區一起促進抗體之抗原結合位點的形成(參看Kabat等人，**Sequences of Proteins of Immunological Interest**，第5版Public Health

Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。恆定域並不直接涉及抗體與抗原之結合，但顯示各種效應功能，諸如抗體參與抗體依賴性細胞毒性(antibody dependent cellular cytotoxicity；ADCC)。

當用於本文中時，術語「高變區」、「HVR」或「HV」係指抗體可變域中序列高變及/或形成結構上確定之環的之區域。抗體一般包含六個HVR；三個在VH中(HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3)且三個在VL中(HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3)。在天然抗體中，H3及L3顯示六個HVR之最高多樣性，且咸信尤其H3在賦予抗體精細特異性方面起到獨特作用。參看例如Xu等人，*Immunity* 13:37-45 (2000)；Johnson及Wu, *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo，編，Human Press, Totowa, NJ, 2003)。實際上，僅由重鏈組成之天然存在之駱駝抗體在無輕鏈存在下亦具功能性及穩定性。參看例如Hamers-Casterman等人，*Nature* 363:446-448 (1993)；Sheriff等人，*Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996)。

HVR一般包含高變環及/或「互補決定區」(CDR)之胺基酸殘基，後者(CDR)具有最高序列可變性及/或涉及抗原識別。本文中使用及涵蓋多種HVR描述。Kabat互補決定區(CDR)係基於序列可變性且最常用(Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版。Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothia另外提及結構環之位置(Chothia及

Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。AbM HVR表示Kabat CDR與Chothia結構環之間的折衷，且由Oxford Molecular之AbM抗體模型化軟體使用。「接觸」HVR係基於對可用複雜晶體結構之分析。此等各HVR之殘基註解如下。

環	Kabat	AbM	Chothia	接觸
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B (Kabat編號)	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1	H31-H35 (Chothia編號)	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

HVR可包含如下「擴展HVR」：VL中之24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)及89-97或89-96(L3)，及VH中之26-35(H1)、50-65或47-65(H2)及93-102、94-102或95-102(H3)。可變域殘基係利用此等各種定義、根據Kabat等人(同上文)加以編號。

「構架」或「FR」殘基為除如本文所定義之HVR殘基外之彼等可變域殘基。

術語「如Kabat中之可變域殘基編號」或「如Kabat中之胺基酸位置編號」及其變化形式係指Kabat等人(同上文)用於彙編抗體之重鏈可變域或輕鏈可變域的編號系

統。使用此編號系統，實際線性胺基酸序列可含有較少或額外胺基酸(對應於可變域之FR或HVR之縮短，或插入可變域之FR或HVR)。舉例而言，重鏈可變域可包括H2之殘基52後之單一胺基酸插入(根據Kabat之殘基52a)及重鏈FR殘基82後之插入殘基(例如根據Kabat之殘基82a、82b及82c等)。可藉由在抗體序列之同源區域與「標準」Kabat編號序列比對來確定既定抗體之殘基的Kabat編號。

提及可變域中之殘基(大致為輕鏈之殘基1-107及重鏈之殘基1-113)時，一般使用Kabat編號系統(例如Kabat等人，*Sequences of Immunological Interest.* 第5版。Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。提及免疫球蛋白重鏈恆定區中之殘基時，一般使用「EU編號系統」或「EU索引」(例如Kabat等人(同上文)所報導之EU索引)。「如Kabat中之EU索引」係指人類IgG1 EU抗體之殘基編號。除非本文中另有說明，否則提及抗體可變域中之殘基編號意謂殘基編號係依據Kabat編號系統。除非本文中另有說明，否則提及抗體恆定域中之殘基編號意謂殘基編號係依據EU編號系統(參看例如WO 2006/073941)。

「親和力」係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間非共價相互作用力的總和。除非另有指示，否則如本文所使用，「結合親和力」係指

反映結合對(例如抗體與抗原)成員之間1:1相互作用之固有結合親和力。分子X對其搭配物Y之親和力一般可由解離常數(Kd)表示。可藉由此項技術中已知之常見方法(包括本文所述之方法)量測親和力。

「親和力成熟」抗體為在其一或多個HVR或構架區中具有一或多處變化、從而使得抗體對抗原之親和力改良(相較於不具有彼等變化之親本抗體)的抗體。在一個實施例中，親和力成熟抗體對標靶抗原具有奈莫耳濃度(nanomolar)或甚至皮莫耳濃度(picomolar)親和力。可使用此項技術中已知之某些程序來製造親和力成熟抗體。舉例而言，Marks等人，*Bio/Technology* 10:779-783 (1992)描述藉由VH及VL域改組之親和力成熟。以下文獻描述HVR及/或構架殘基之隨機突變誘發：例如Barbas等人，*Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994)；Schier等人，*Gene* 169:147-155 (1995)；Yelton等人，*J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995)；Jackson等人，*J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995)；及Hawkins等人，*J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)。

抗體之「種類」係指其重鏈所具有之恆定域或恆定區之類型。存在五個主要類別之抗體：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且其中多者可進一步分為子類(同型)，例如IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1及IgA_2。對應於不同種類免疫球蛋白之重鏈恆定域分別稱作α、δ、ε、γ及μ。

如本文中所用，術語「單株抗體」係指來自實質上同源之抗體群體之抗體，亦即構成該群體之個別抗體實質上類似且結合相同抗原決定基，除了在產生單株抗體期間可能出現之可能變異體，此等變異體一般以少量存在。此單株抗體通常包括包含結合標靶之可變區之抗體，其中藉由包括自多種抗體選擇抗體之方法獲得抗體。舉例而言，選擇方法可為自多種純系(諸如融合瘤純系、噬菌體純系或重組DNA純系之池)選擇獨特純系。應瞭解，所選抗體可經進一步改變，以例如改良對標靶之親和力、將抗體人類化、改良其在細胞培養中之產量、降低其活體內免疫原性、產生多特異性抗體等，且包含經改變可變區序列之抗體亦為本發明之單株抗體。單株抗體製劑除其特異性之外有利之處亦在於其通常未被其他免疫球蛋白污染。修飾語「單株」表示抗體獲自實質上同源之抗體群體之特徵，且不應理解為需要藉由任何特定方法產生該抗體。舉例而言，根據本發明使用之單株抗體可藉由各種技術產生，該等技術包括融合瘤方法(例如Kohler等人，Nature, 256:495 (1975)；Harlow等人，Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press，第2版。1988)；Hammerling等人，Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981))、重組DNA法(參看例如美國專利第4,816,567號)、噬菌體呈現技術(參看例如Clackson等人，Nature, 352:624-628 (1991)；Marks等人，J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)；Sidhu等人，J.

Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004)；Lee等人，J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004)；Fellouse, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004)；及Lee等人，J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004))及由具有部分或所有編碼人類免疫球蛋白序列之人類免疫球蛋白基因座或基因之動物產生人類或擬似人類抗體之技術(參看例如WO 98/24893、WO/9634096、WO/9633735及WO/91 10741；Jakobovits等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)；Jakobovits等人，Nature, 362:255-258 (1993)；Bruggemann等人，Year in Immuno., 7:33 (1993)；美國專利第5,545,806號、第5,569,825號、第5,591,669號(皆屬於GenPharm)；第5,545,807號；WO 97/17852、美國專利第5,545,807號；第5,545,806號；第5,569,825號；第5,625,126號；第5,633,425號；及第5,661,016號，及Marks等人，Bio/Technology, 10: 779-783 (1992)；Lonberg等人，Nature, 368: 856-859 (1994)；Morrison, Nature, 368: 812-813 (1994)；Fishwild等人，Nature Biotechnology, 14: 845-851 (1996)；Neuberger, Nature Biotechnology, 14: 826 (1996)；及Lonberg及Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93 (1995))。

「完整」抗體為包含抗原結合位點以及C_L及至少重鏈恆定域C_H1、C_H2及C_H3之抗體。恆定域可為天然序列恆定域(例如人類天然序列恆定域)或其胺基酸序列變異體。完整抗體較佳具有一或多種效應功能。

「抗體片段」包含完整抗體之一部分，較佳包含完整抗體之抗原結合區或可變區。抗體片段之實例包括Fv、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fab'-SH；雙功能抗體；線性抗體(參看美國專利第5,641,870號實例2；Zapata等人，Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995))；單鏈抗體分子(例如scfv)。儘管在本發明之描述中及在整篇本說明書中，參考抗體及抗體之各種特性，但相同揭示內容亦適用於功能抗體片段，例如雙作用Fab片段。

表述「線性抗體」一般係指Zapata等人，Protein Eng., 8(10):1057-1062 (1995)中所述之抗體。此等抗體包含一對串聯Fd區段(V_H-C_H1-V_H-C_H1)，其與互補輕鏈多肽一起形成一對抗原結合區。在一個較佳實施例中，片段具「功能性」，亦即定性地保留相應完整抗體結合於標靶HER受體之能力且若完整抗體亦抑制HER活化或功能，則亦定性地保留此抑制特性。定性保留意謂保留幾分活性(activity in kind)，但結合親和力及/或活性之程度可不同。

木瓜酶消化抗體可產生兩個相同的抗原結合片段(稱為「Fab」片段)，及殘餘「Fc」片段，名稱反映易於結晶之能力。Fab片段由整條L鏈以及H鏈之可變區域(V_H)，及一條重鏈之第一恆定域(C_H1)組成。用胃蛋白酶處理抗體產生單一大$F(ab')_2$片段，其大致相當於具有二價抗原結合活性之兩個經二硫鍵連接之Fab片段且仍能夠交聯抗原。Fab'片段不同於Fab片段之處為在包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸的C_H1域的羧基端具有額外少數殘基。Fab'-

SH在本文中為恆定域之半胱胺酸殘基帶有游離硫醇基之Fab'的名稱。$F(ab')_2$抗體片段最初以其間具有鉸鏈半胱胺酸之Fab'片段對形式產生。其他化學偶合之抗體片段亦已知。

Fc片段包含兩條H鏈藉由二硫鍵結合在一起的羧基端部分。抗體之效應功能由Fc區中之序列確定；此區亦為由某些類型細胞上所見之Fc受體(FcR)識別之部分。

「Fv」係由一個重鏈可變區域與一個輕鏈可變區域非共價緊密結合之二聚體組成。此兩個域之摺疊產生六個高變環(H及L鏈各3個環)，促使胺基酸殘基可供抗原結合且賦予抗體以抗原結合特異性。然而，甚至單一可變域(或僅包含三個對抗原具特異性之HVR的Fv之一半)亦具有識別及結合抗原之能力，但其親和力通常低於整個結合位點。

「單鏈Fv」(亦縮寫為「sFv」或「scFv」)為抗體片段，其包含連接成單一多肽鏈的V_H及V_L抗體域。sFv多肽較佳進一步包含V_H與V_L域之間的多肽連接子，其使sFv能夠形成供抗原結合之所需結構。欲回顧sFv，請參看Pluckthun, **The Pharmacology of Monoclonal Antibodies**，第113卷，Rosenburg及Moore編，Springer-Verlag, New York，第269-315頁(1994); Borrebaeck 1995。

術語「雙功能抗體」係指藉由構築sFv片段製備之小抗體片段(參看前述段落)，該等sFv片段在V_H與V_L域之間具有短連接子(約5-10個殘基)，以便實現V域之鏈間而非鏈內配對，從而產生二價片段，亦即具有兩個抗原結合位點

之片段。雙功能抗體充分描述於例如EP 404,097；WO 93/11161；及Hollinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)中。

「結合於相同抗原決定基之抗體」作為參考抗體時係指在競爭檢定中將參考抗體與其抗原之結合阻斷50%或50%以上之抗體，且相反地，參考抗體在競爭檢定中將抗體與其抗原之結合阻斷50%或50%以上。

術語「嵌合」抗體係指重鏈及/或輕鏈之一部分源自特定來源或物種，而重鏈及/或輕鏈之其餘部分源自不同來源或物種之抗體。

「人類抗體」為一種抗體，其具有之胺基酸序列對應於由人類或人類細胞產生或源自利用人類抗體譜或其他人類抗體編碼序列之非人類來源的抗體之胺基酸序列。人類抗體之此定義尤其排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

「人類共同構架(human consensus framework)」為在選擇人類免疫球蛋白V_L或V_H構架序列時代表最常出現之胺基酸殘基的構架。人類免疫球蛋白V_L或V_H序列一般選自可變域序列之亞群。序列亞群一般為如以下文獻中之亞群：Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第五版，NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991)，第1-3卷。在一個實施例中，V_L之亞群為如Kabat等人(同上文)中之亞群κI。在一個實施例中，V_H之

亞群為如Kabat等人(同上文)中之亞群III。

非人類(例如齧齒動物)抗體之「人類化」形式為含有源自非人類抗體之最小序列的嵌合抗體。在最大程度上，人類化抗體為人類免疫球蛋白(受體抗體)，其中受體之高變區的殘基係經來自具有所需抗體特異性、親和力及容量之非人類物種(供體抗體)(諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物)之高變區的殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之構架區(FR)殘基係經相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含受體抗體或供體抗體中未見之殘基。此等修飾可進一步改進抗體效能。一般而言，人類化抗體將包含實質上所有至少一個及通常兩個可變域，其中所有或實質上所有高變環均對應於非人類免疫球蛋白之高變環，且所有或實質上所有FR均為人免疫球蛋白序列之FR。人類化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分，通常包含人類免疫球蛋白恆定區之至少一部分。欲進一步詳知，參看Jones等人，Nature 321:522-525 (1986)；Riechmann等人，Nature 332:323-329 (1988)；及Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)。

「結合」相關抗原之本發明抗體為以足夠親和力結合抗原，使得該抗體適用作靶向表現該抗原之蛋白質或細胞或組織之診斷劑及/或治療劑的抗體。關於抗體與標靶分子之結合，術語「特異性結合」或「特異性結合於」特定多肽或特定多肽標靶上之抗原決定基或「對特定多肽或特定多肽標靶上之抗原決定基具有特異性」意謂結合在可測定

程度上不同於非特異性相互作用。特異性結合可加以量測，例如藉由測定分子結合相較於對照分子結合來量測。舉例而言，可藉由與類似於標靶(例如過量的未標記標靶)之對照分子競爭來測定特異性結合。在此情況下，若標記之標靶與探針之結合被過量的未標記標靶競爭性抑制，則指示特異性結合。在一個特定實施例中，「特異性結合」係指抗體結合其特定標靶HER受體而非其他特定非標靶HER受體。舉例而言，抗體特異性結合於EGFR及HER3，但不特異性結合於HER2或HER4，或抗體特異性結合於EGFR及HER2，但不特異性結合於HER3或HER4，或抗體特異性結合於EGFR及HER4，但不特異性結合於HER2或HER3。

「HER受體」為受體蛋白酪胺酸激酶，其屬於HER受體家族且包括EGFR(ErbB1、HER1)、HER2(ErbB2)、HER3(ErbB3)及HER4(ErbB4)受體。HER受體一般將包含可結合HER配位體及/或與另一HER受體分子二聚之細胞外域；親脂跨膜域；保守之細胞內酪胺酸激酶域；及具有若干可磷酸化之酪胺酸殘基的羧基端信號傳導域。HER受體可為「天然序列」HER受體或其「胺基酸序列變異體」。HER受體較佳為天然序列人類HER受體。

「HER路徑」係指由HER受體家族介導之信號傳導網路。

術語「ErbB1」、「HER1」、「表皮生長因子受體」及「EGFR」在本文中可互換使用且係指EGFR，例如

Carpenter等人，*Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914 (1987)中所揭示之EGFR，包括其天然存在之突變形式(例如缺失突變型EGFR，如Ullrich等人，Nature (1984) 309:418425及Humphrey等人，*PNAS (USA)* 87:4207-4211 (1990)中)，以及其變異體，諸如EGFRvIII。EGFR之變異體亦包括缺失型、取代型及插入型變異體，例如以下文獻中所述之變異體：Lynch等人(New England Journal of Medicine 2004, 350:2129)、Paez等人(Science 2004, 304:1497)及Pao等人(PNAS 2004, 101:13306)。

在本文中，「EGFR細胞外域」或「EGFR ECD」係指EGFR中位於細胞外部(錨定於細胞膜或處於循環中)之域，包括其片段。在一個實施例中，EGFR之細胞外域可包含四個域：「域I」(約1-158之胺基酸殘基)、「域II」(胺基酸殘基159-336)、「域III」(胺基酸殘基337-470)及「域IV」(胺基酸殘基471-645)，其中邊界為大致邊界，且其變化可為約1-3個胺基酸。

表述「ErbB2」及「HER2」在本文中可互換使用且係指人類HER2蛋白，例如以下文獻中所述之人類HER2蛋白：Semba等人，*PNAS (USA)* 82:6497-6501 (1985)及Yamamoto等人，*Nature* 319:230-234 (1986)(GenBank寄存編號X03363)。術語「*erb*B2」係指編碼人類HER2之基因且「*neu*」係指編碼大鼠p185^{neu}之基因。較佳HER2為天然序列人類HER2。

在本文中，「HER2細胞外域」或「HER2 ECD」係指

HER2中位於細胞外部(錨定於細胞膜或處於循環中)之域，包括其片段。在一個實施例中，HER2之細胞外域可包含四個域：「域I」(約1-195之胺基酸殘基)、「域II」(約196-319之胺基酸殘基)、「域III」(約320-488之胺基酸殘基)及「域IV」(約489-630之胺基酸殘基)(殘基編號係在無信號肽之情況下進行)。參看Garrett等人，*Mol. Cell.* 11:495-505(2003)；Cho等人，*Nature* 421: 756-760 (2003)；Franklin等人，*Cancer Cell* 5:317-328 (2004)及Plowman等人，*Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:1746-1750 (1993)。

「ErbB3」及「HER3」係指受體多肽，例如美國專利第5,183,884號及第5,480,968號以及Kraus等人，*PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989)中揭示之受體多肽。

在本文中，「HER3細胞外域」或「HER3 ECD」係指HER3中位於細胞外部(錨定於細胞膜或處於循環中)之域，包括其片段。在一個實施例中，HER3之細胞外域可包含四個域：域I、域II、域III及域IV。在一個實施例中，HER3 ECD包含胺基酸1-636(編號包括信號肽)。在一個實施例中，HER3域III包含胺基酸328-532(編號包括信號肽)。

術語「ErbB4」及「HER4」在本文中係指受體多肽，例如以下文獻中揭示之受體多肽：歐洲專利申請案第599,274號；Plowman等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993)；及Plowman等人，*Nature*, 366:473-475 (1993)，包括其同功異型物，例如1999年4月22日公開

之WO 99/19488中揭示之其同功異型物。

「HER配位體」意謂結合及/或活化HER受體之多肽。本文中尤其關注之HER配位體為天然序列人類HER配位體，諸如表皮生長因子(EGF)(Savage等人，*J. Biol. Chem.* 247: 7612-7621 (1972))；轉型生長因子α(TGF-α)(Marquardt等人，*Science* 223:1079-1082 (1984))；雙調蛋白(亦稱為許旺細胞瘤(schwanoma)或角質細胞自分泌生長因子)(Shoyab等人，*Science* 243:1074-1076 (1989)；Kimura等人，*Nature* 348:257-260 (1990)；及Cook等人，*Mol. Cell. Biol.* 11:2547-2557 (1991))；β細胞調節素(Shing等人，*Science* 259:1604-1607 (1993)；及Sasada等人，*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190:1173 (1993))；肝素結合表皮生長因子(HB-EGF)(Higashiyama等人，*Science* 251:936-939 (1991))；表皮調節素(Toyoda等人，*J. Biol. Chem.* 270:7495-7500 (1995)；及Komurasaki等人，*Oncogene* 15:2841-2848 (1997))；神經調節蛋白-1(參看下文)；神經調節蛋白-2(NRG-2)(Carraway等人，*Nature* 387:512-516 (1997))；神經調節蛋白-3(NRG-3)(Zhang等人，*Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:9562-9567 (1997))；神經調節蛋白-4(NRG-4)(Harari等人，*Oncogene* 18:2681-89 (1999))；及畸胎癌衍生生長因子(cripto)(CR-1)(Kannan等人，*J. Biol. Chem.* 272(6):3330-3335 (1997))。結合EGFR之HER配位體包括EGF、TGF-α、雙調蛋白、β細胞調節素、HB-EGF及表皮調節素。結合HER3之HER配位體包括神經調節蛋白-1及

NRG-2。能夠結合HER4之HER配位體包括β細胞調節素、表皮調節素、HB-EGF、NRG-2、NRG-3、NRG-4及神經調節蛋白-1。

「神經調節蛋白-1」(HRG)當用於本文中時係指由神經調節蛋白-1基因產物編碼之多肽，如美國專利第5,641,869號或Marchionni等人，*Nature*, 362:312-318 (1993)中所揭示。神經調節蛋白-1之實例包括神經調節蛋白-1α、神經調節蛋白-1β1、神經調節蛋白-1β2及神經調節蛋白-1β3 (Holmes等人，*Science*, 256:1205-1210 (1992)；及美國專利第5,641,869號)；*neu*分化因子(NDF)(Peles等人，*Cell* 69: 205-216 (1992))；乙醯膽鹼受體誘導活性因子(ARIA)(Falls等人，*Cell* 72:801-815 (1993))；神經膠質生長因子(GGF)(Marchionni等人，*Nature*, 362:312-318 (1993))；感覺及運動神經元衍生因子(SMDF)(Ho等人，*J. Biol. Chem.* 270:14523-14532 (1995))；γ-神經調節蛋白-1 (Schaefer等人，*Oncogene* 15:1385-1394 (1997))。

「HER二聚體」在本文中為包含至少兩個HER受體之非共價結合二聚體。此等複合物可在表現兩種或兩種以上HER受體之細胞暴露於HER配位體時形成，且可藉由免疫沈澱來分離且藉由SDS-PAGE分析，例如Sliwkowski等人，*J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994)中所述。諸如細胞激素受體亞單元(例如gp130)之其他蛋白質可與二聚體結合。

「HER雜二聚體」在本文中為包含至少兩種不同HER受

體之非共價結合雜二聚體，諸如EGFR-HER2、EGFR-HER3、EGFR-HER4、HER2-HER3或HER2-HER4雜二聚體。

「HER抑制劑」為干擾HER活化或功能之藥劑。HER抑制劑之實例包括HER抗體(例如EGFR、HER2、HER3或HER4抗體)；靶向EGFR之藥物；小分子HER拮抗劑；HER酪胺酸激酶抑制劑；HER2及EGFR雙酪胺酸激酶抑制劑，諸如拉帕替尼(lapatinib)/GW572016；反義分子(參看例如WO 2004/87207)；及/或結合下游信號傳導分子(諸如MAPK或Akt)或干擾該等下游信號傳導分子之功能的藥劑。HER抑制劑較佳為可結合於HER受體之抗體。

「HER二聚合抑制劑」或「HDI」為抑制HER均二聚體或HER雜二聚體形成之藥劑。HER二聚合抑制劑較佳為抗體。然而，HER二聚合抑制劑亦包括肽及非肽小分子，及抑制HER均二聚體或雜二聚體形成之其他化學實體。

「抑制HER二聚合」之抗體為抑制或干擾HER二聚體形成之抗體，不論潛在機制。在一個實施例中，此抗體在HER2之雜二聚結合位點結合HER2。二聚合抑制性抗體之一個特定實例為帕妥珠單抗(Pmab)或MAb 2C4。HER二聚合抑制劑之其他實例包括結合EGFR且抑制其與一或多種其他HER受體(例如EGFR單株抗體806(MAb 806)，其結合於經活化或「未繫拴」之EGFR)二聚合之抗體；參看Johns等人，*J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004))；結合HER3且抑制其與一或多種其他HER受體二聚合之抗體；

結合HER4且抑制其與一或多種其他HER受體二聚合之抗體；肽二聚合抑制劑(美國專利第6,417,168號)；反義二聚合抑制劑；等抑制劑。

如本文中所用，「EGFR拮抗劑」或「EGFR抑制劑」係指特異性結合於EGFR且防止或降低其信號傳導活性且不特異性結合於HER2、HER3或HER4之彼等化合物。此等藥劑之實例包括可結合於EGFR之抗體及小分子。可結合於EGFR之抗體的實例包括MAb 579(ATCC CRL HB 8506)、MAb 455(ATCC CRL HB8507)、MAb 225(ATCC CRL 8508)、MAb 528(ATCC CRL 8509)(參看美國專利第4,943,533號，Mendelsohn等人)及其變異體，諸如嵌合225(C225或西妥昔單抗；ERBITUX®)及經改造之人類225(H225)(參看WO 96/40210, Imclone Systems Inc.)；IMC-11F8，一種靶向EGFR之完全人類抗體(Imclone)；可結合第II型突變EGFR之抗體(美國專利第5,212,290號)；可結合EGFR的人類化及嵌合抗體，如美國專利第5,891,996號中所述；及可結合EGFR之人類抗體，諸如ABX-EGF或帕尼單抗(Panitumumab)(參看WO 98/50433，Abgenix/Amgen)；EMD 55900(Stragliotto等人，*Eur. J. Cancer* 32A:636-640 (1996))；EMD7200(馬妥珠單抗(matuzumab))，一種針對EGFR且與EGF及TGF-α競爭結合EGFR之人類化EGFR抗體(EMD/Merck)；人類EGFR抗體HuMax-EGFR(GenMab)；稱為E1.1、E2.4、E2.5、E6.2、E6.4、E2.11、E6.3及E7.6.3且描述於US 6,235,883中之完全人類抗體；MDX-447(Medarex Inc)；及

mAb 806或人類化 mAb 806(Johns等人，*J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004))。抗EGFR抗體可與細胞毒性劑結合，從而產生免疫結合物(參看例如EP659,439A2, Merck Patent GmbH)。EGFR拮抗劑包括小分子，諸如描述於以下文獻中之化合物：美國專利第5,616,582號、第5,457,105號、第5,475,001號、第5,654,307號、第5,679,683號、第6,084,095號、第6,265,410號、第6,455,534號、第6,521,620號、第6,596,726號、第6,713,484號、第5,770,599號、第6,140,332號、第5,866,572號、第6,399,602號、第6,344,459號、第6,602,863號、第6,391,874號、第6,344,455號、第5,760,041號、第6,002,008及第5,747,498，以及以下PCT公開案：WO 98/14451、WO 98/50038、WO 99/09016及WO 99/24037。特定小分子EGFR拮抗劑包括OSI-774 (CP-358774、埃羅替尼(erlotinib)、TARCEVA® Genentech/OSI Pharmaceuticals)；PD 183805(CI 1033，N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)胺基]-7-[3-(4-嗎啉基)丙氧基]-6-喹唑啉基]-2-丙烯醯胺二鹽酸鹽，Pfizer Inc.)；ZD1839(吉非替尼(gefitinib)(IRESSA®)，4-(3'-氯-4'-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(3-(N-嗎啉基)丙氧基)喹唑啉，AstraZeneca)；ZM 105180((6-胺基-4-(3-甲基苯基-胺基)-喹唑啉，Zeneca)；BIBX-1382(N8-(3-氯-4-氟-苯基)-N2-(1-甲基-哌啶-4-基)-嘧啶并[5,4-d]嘧啶-2,8-二胺，Boehringer Ingelheim)；PKI-166((R)-4-[4-[(1-苯基乙基)胺基]-1H-吡咯并[2,3-d]嘧

啶-6-基]-苯酚)；(R)-6-(4-羥基苯基)-4-[(1-苯基乙基)胺基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶)；CL-387785(N-[4-[(3-溴苯基)胺基]-6-喹唑啉基]-2-丁炔醯胺)；EKB-569(N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)胺基]-3-氰基-7-乙氧基-6-喹啉基]-4-(二甲胺基)-2-丁烯醯胺)(Wyeth)；AG1478(Sugen)；及AG1571(SU 5271；Sugen)。

「HER抗體」為可結合HER受體之抗體。HER抗體視情況進一步干擾HER活化或功能。特定HER2抗體包括帕妥珠單抗及曲妥珠單抗。特定EGFR抗體之實例包括西妥昔單抗及帕尼單抗。

關於HER抗體之專利公開案包括：US 5,677,171、US 5,720,937、US 5,720,954、US 5,725,856、US 5,770,195、US 5,772,997、US 6,165,464、US 6,387,371、US 6,399,063、US 2002/0192211A1、US 6,015,567、US 6,333,169、US 4,968,603、US 5,821,337、US 6,054,297、US 6,407,213、US 6,719,971、US 6,800,738、US 2004/0236078A1、US 5,648,237、US 6,267,958、US 6,685,940、US 6,821,515、WO 98/17797、US 6,333,398、US 6,797,814、US 6,339,142、US 6,417,335、US 6,489,447、WO 99/31140、US 2003/0147884A1、US 2003/0170234A1、US 2005/0002928A1、US 6,573,043、US 2003/0152987A1、WO 99/48527、US 2002/0141993A1、WO 01/00245、US 2003/0086924、US 2004/0013667A1、WO 00/69460、WO 01/00238、WO 01/15730、US

6,627,196B1、US 6,632,979B1、WO 01/00244、US 2002/0090662A1、WO 01/89566、US 2002/0064785、US 2003/0134344、WO 04/24866、US 2004/0082047、US 2003/0175845A1、WO 03/087131、US 2003/0228663、WO 2004/008099A2、US 2004/0106161、WO 2004/048525、US 2004/0258685A1、US 5,985,553、US 5,747,261、US 4,935,341、US 5,401,638、US 5,604,107、WO 87/07646、WO 89/10412、WO 91/05264、EP 412,116 B1、EP 494,135 B1、US 5,824,311、EP 444,181 B1、EP 1,006,194 A2、US 2002/0155527A1、WO 91/02062、US 5,571,894、US 5,939,531、EP 502,812 B1、WO 93/03741、EP 554,441 B1、EP 656,367 A1、US 5,288,477、US 5,514,554、US 5,587,458、WO 93/12220、WO 93/16185、US 5,877,305、WO 93/21319、WO 93/21232、US 5,856,089、WO 94/22478、US 5,910,486、US 6,028,059、WO 96/07321、US 5,804,396、US 5,846,749、EP 711,565、WO 96/16673、US 5,783,404、US 5,977,322、US 6,512,097、WO 97/00271、US 6,270,765、US 6,395,272、US 5,837,243、WO 96/40789、US 5,783,186、US 6,458,356、WO 97/20858、WO 97/38731、US 6,214,388、US 5,925,519、WO 98/02463、US 5,922,845、WO 98/18489、WO 98/33914、US 5,994,071、WO 98/45479、US 6,358,682 B1、US 2003/0059790、WO 99/55367、WO 01/20033、US 2002/0076695 A1、WO 00/78347、WO

01/09187、WO 01/21192、WO 01/32155、WO 01/53354、WO 01/56604、WO 01/76630、WO 02/05791、WO 02/11677、US 6,582,919、US 2002/0192652A1、US 2003/0211530A1、WO 02/44413、US 2002/0142328、US 6,602,670 B2、WO 02/45653、WO 02/055106、US 2003/0152572、US 2003/0165840、WO 02/087619、WO 03/006509、WO 03/012072、WO 03/028638、US 2003/0068318、WO 03/041736、EP 1,357,132、US 2003/0202973、US 2004/0138160、US 5,705,157、US 6,123,939、EP 616,812 B1、US 2003/0103973、US 2003/0108545、US 6,403,630 B1、WO 00/61145、WO 00/61185、US 6,333,348 B1、WO 01/05425、WO 01/64246、US 2003/0022918、US 2002/0051785 A1、US 6,767,541、WO 01/76586、US 2003/0144252、WO 01/87336、US 2002/0031515 A1、WO 01/87334、WO 02/05791、WO 02/09754、US 2003/0157097、US 2002/0076408、WO 02/055106、WO 02/070008、WO 02/089842及WO 03/86467。

「HER活化」係指任一或多種HER受體之活化或磷酸化。HER活化一般產生信號轉導(例如由使HER受體或受質多肽中之酪胺酸殘基磷酸化的HER受體之細胞內激酶域引起)。HER活化可由HER配位體結合於包含相關HER受體之HER二聚體所介導。HER配位體結合於HER二聚體可活化二聚體中一或多種HER受體之激酶域，且藉此引起一或多

種HER受體中酪胺酸殘基之磷酸化，及/或其他受質多肽(諸如Akt或MAPK細胞內激酶)中酪胺酸殘基之磷酸化。

「磷酸化」係指將一或多個磷酸基添加至蛋白質(諸如HER受體或其受質)中。

HER2上之「雜二聚結合位點」係指HER2之細胞外域中之一種區域，形成二聚體後，該區域與EGFR、HER3或HER4之細胞外域中之區域接觸或連接。該區域存在於HER2之域II中。Franklin等人，*Cancer Cell* 5:317-328 (2004)。

「可結合於HER2之雜二聚結合位點」的HER2抗體可結合於域II中之殘基(且視情況亦結合於HER2細胞外域之其他域(諸如域I及域III)中之殘基)，且在空間上可以至少某種程度阻礙HER2-EGFR、HER2-HER3或HER2-HER4雜二聚體之形成。Franklin等人，*Cancer Cell* 5:317-328 (2004)描述寄存於RCSB蛋白質資料庫(RCSB Protein Data Bank)(ID代碼IS78)之HER2-帕妥珠單抗晶體結構的特徵，該結構說明可結合於HER2之雜二聚結合位點的例示性抗體。

「可結合於HER2之域II」之抗體可結合於域II中之殘基且視情況結合於HER2之其他域(諸如域I及域III)中之殘基。

「分離」當用以描述本文所揭示之各種抗體時意謂已被鑑別及自表現其之細胞或細胞培養物分離及/或回收之抗體。其自然環境之污染組分為通常會干擾多肽之診斷或治

療用途之物質，且可包括酶、激素及其他蛋白質性或非蛋白質性溶質。在較佳實施例中，抗體應純化至：(1)足以藉由使用旋杯式定序儀獲得N端或內部胺基酸序列之至少15個殘基的程度，或(2)均質性，此係在非還原或還原條件下，使用庫馬斯藍(Coomassie blue)或較佳使用銀染色法(silver stain)、藉由SDS-PAGE達成。因為多肽自然環境之至少一種組分將不會存在，所以分離之抗體包括重組細胞內之原位抗體。然而，分離之多肽通常藉由至少一個純化步驟製備。

術語「控制序列」係指在特定宿主生物體內表現可操作連接之編碼序列所必需之DNA序列。適於原核生物之控制序列例如包括啟動子、視情況選用之操縱序列(operator sequence)及核糖體結合位點。已知真核細胞利用啟動子、聚腺苷酸化信號及強化子。

核酸當定位成與另一核酸序列呈功能關係時，其係「可操作地連接」。舉例而言，若前序列或分泌性前導序列之DNA以參與多肽分泌之前體蛋白(preprotein)形式表現，則其可操作地連接於該多肽之DNA；若啟動子或強化子影響序列轉錄，則其可操作地連接於編碼序列；或若核糖體結合位點經定位以便有助於轉譯，則其可操作地連接於編碼序列。「可操作地連接」一般意謂所連接之DNA序列為鄰接的且在分泌性前導序列之情形下為鄰接的且處於閱讀階段。然而，強化子不必為鄰接的。連接係藉由在適宜限制性位點接合來實現。若此等位點不存在，則根據習知實務

使用合成寡核苷酸接附子或連接子。

相對於參考多肽序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」係定義為在比對序列且必要時引入間隙(以達成最大序列一致性百分比)且不將任何保守性取代視作序列一致性之一部分之後，候選序列之胺基酸殘基與參考多肽序列之胺基酸殘基一致之百分比。可以此項技術範圍內之各種方式，例如使用公開可得之電腦軟體(諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)軟體)來比對以便測定胺基酸序列一致性百分比。熟習此項技術者可確定用於比對序列之適當參數，包括在所比較序列之全部長度上實現最大比對所需的任何演算法。然而，出於本文目的，胺基酸序列一致性%值係使用序列比較電腦程式ALIGN-2來產生。ALIGN-2序列比較電腦程式係由Genentech, Inc.創作，且原始碼已以使用者文件呈遞於美國版權辦公室(U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559)，並以美國版權註冊號TXU510087註冊。ALIGN-2程式可公開獲自Genentech, Inc., South San Francisco, California，或可自原始碼彙編。ALIGN-2程式經彙編應可在UNIX操作系統上使用，包括數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數均由ALIGN-2程式設定且不改變。

在ALIGN-2用於胺基酸序列比較之情況下，既定胺基酸序列A對既定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性%(其或者可表示為既定胺基酸序列A具有或包含特定%胺基酸序列與既定胺基酸序列B一致)係計算如下：

100乘以分數X/Y

其中X為藉由序列比對程式ALIGN-2在對A與B之彼程式比對中記為一致匹配之胺基酸殘基的數目，且其中Y為B中胺基酸殘基之總數。應瞭解當胺基酸序列A之長度不等於胺基酸序列B之長度時，A對B之胺基酸序列一致性%將不等於B對A之胺基酸序列一致性%。除非另外特別規定，否則本文所用之所有胺基酸序列一致性%值均如在前一段落中所述使用ALIGN-2電腦程式來獲得。

雜交反應之「嚴格性」可易於由一般技術者確定，且一般為取決於探針長度、洗滌溫度及鹽濃度之經驗計算。一般而言，較長探針需要較高溫度以便適當黏接，而較短探針需要較低溫度。互補股存在於低於其解鏈溫度之環境中時，雜交一般視變性DNA再黏接之能力而定。探針與可雜交序列之間的所需同源性程度愈高，可使用之相對溫度愈高。因此，可瞭解較高相對溫度傾向於使得反應條件更為嚴格，而較低溫度卻非如此。關於雜交反應嚴格性之其他細節及解釋，參看Ausubel等人，**Current Protocols in Molecular Biology**, Wiley Interscience Publishers, (1995)。

如本文所定義，「嚴格條件」或「高嚴格條件」可依據以下來鑑別：(1)採用低離子強度及高溫來洗滌，例如0.015 M氯化鈉/0.0015 M檸檬酸鈉/0.1%十二烷基硫酸鈉，在50℃下；(2)在雜交期間採用變性劑，諸如甲醯胺，例如50%(v/v)甲醯胺與0.1%牛血清白蛋白/0.1% Ficoll/0.1%聚乙烯吡咯啶酮/50 mM磷酸鈉緩衝液(pH 6.5)與750 mM氯化

鈉、75 mM檸檬酸鈉，在42℃下；或(3)在42℃下在採用50%甲醯胺、5×SSC(0.75 M NaCl、0.075 M檸檬酸鈉)、50 mM磷酸鈉(pH 6.8)、0.1%焦磷酸鈉、5×登哈特氏溶液(Denhardt's Solution)、經音波處理之鮭魚精子DNA(50 μg/ml)、0.1% SDS及10%硫酸葡聚糖之溶液中雜交隔夜，在42℃下在0.2×SSC(氯化鈉/檸檬酸鈉)中洗滌10分鐘，接著在55℃下在由含有EDTA之0.1×SSC組成之高嚴格性洗滌液中洗滌10分鐘。

「中等嚴格條件」可如Sambrook等人，**Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989所述來鑑別，且包括使用嚴格性小於上述者之洗滌溶液及雜交條件(例如溫度、離子強度及%SDS)。中等嚴格條件之實例為在37℃下在包含以下之溶液中培育隔夜：20%甲醯胺、5×SSC(150 mM NaCl、15 mM檸檬酸三鈉)、50 mM磷酸鈉(pH 7.6)、5×登哈特氏溶液、10%硫酸葡聚糖及20 mg/ml變性剪切之鮭魚精子DNA，接著在1×SSC中在約37-50℃下洗滌過濾器。熟習此項技術者瞭解必要時如何調節溫度、離子強度等以適應諸如探針長度等因素。

抗體「效應功能」係指由抗體之Fc區(天然序列Fc區或胺基酸序列變異Fc區)引起之彼等生物活性，且隨抗體同型而變。抗體效應功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體)之

下調；及B細胞活化。

「抗體依賴性細胞介導之細胞毒性」或「ADCC」係指一種細胞毒性形式，其中與存在於某些細胞毒性細胞(例如自然殺手(NK)細胞、嗜中性白血球及巨噬細胞)上之Fc受體(FcR)結合之分泌型Ig使此等細胞毒性效應細胞能夠特異性結合於帶有抗原之標靶細胞且隨後以細胞毒素殺死標靶細胞。抗體「武裝(arm)」細胞毒性細胞且絕對為此殺死所需。介導ADCC之初級細胞NK細胞僅表現FcγRIII，而單核細胞表現FcγRI、FcγRII及FcγRIII。造血細胞上之FcR表現概述於Ravetch及Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)之第464頁的表3中。為評估相關分子之ADCC活性，可進行活體外ADCC檢定，諸如美國專利第5,500,362號或第5,821,337號中所述之檢定。適用於此等檢定之效應細胞包括末梢血液單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。或者，或另外，可評估活體內(例如動物模型中)相關分子之ADCC活性，諸如Clynes等人，(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 95:652-656 (1998)中所揭示者。

「Fc受體」或「FcR」描述一種可結合抗體之Fc區的受體。較佳FcR為天然序列人類FcR。此外，較佳FcR為可結合IgG抗體之FcR(γ受體)且包括FcγRI、FcγRII及FcγRIII子類之受體，包括此等受體之對偶基因變異體及替代性拼接形式。FcγRII受體包括FcγRIIA(「活化受體」)及FcγRIIB(「抑制受體」)，其具有類似胺基酸序列，不同之處主要在於其細胞質域。活化受體FcγRIIA在其細胞質域

中含有基於免疫受體酪胺酸之活化基元(ITAM)。抑制受體FcγRIIB在其細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之抑制基元(ITIM)(參看M.於Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)中之回顧)。FcR於以下文獻中回顧：Ravetch及Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)；Capel等人，Immunomethods 4:25-34 (1994)；及de Haas等人，J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)。本文中術語「FcR」涵蓋其他FcR，包括有待將來鑑別之FcR。該術語亦包括新生兒受體FcRn，其負責將母體IgG轉移至胎兒(Guyer等人，J. Immunol. 117:587 (1976)及Kim等人，J. Immunol. 24:249 (1994))。

「人類效應細胞」為表現一或多個FcR且執行效應功能之白血球。較佳地，該等細胞至少表現FcγRIII且執行ADCC效應功能。介導ADCC之人類白血球之實例包括末梢血液單核細胞(PBMC)、自然殺手(NK)細胞、單核細胞、細胞毒性T細胞及嗜中性白血球；其中PBMC及NK細胞為較佳。效應細胞可自天然來源分離，例如自血液分離。

「補體依賴性細胞毒性」或「CDC」係指在補體存在下溶解標靶細胞。經典補體路徑之活化係由補體系統之第一組分(C1q)與結合於其同源抗原之抗體(適當子類之抗體)結合來引發。為評估補體活化，可進行CDC檢定，例如Gazzano-Santoro等人，J. Immunol. Methods 202:163 (1996)中所述。

如本文中所用，「治療(treatment)」(及其語法變化形式，諸如「治療(treat)」或「治療(treating)」)係指試圖改變所治療個體之自然過程的臨床介入，且可出於預防之目的或在臨床病理檢查過程中進行。理想治療效果包括(但不限於)預防疾病發作或復發、緩和症狀、減小疾病之任何直接或間接病理後果、預防轉移、降低疾病進展速率、改善或減輕疾病病況，及好轉或預後改良。在一些實施例中，本發明之抗體用以延遲疾病發展或減緩疾病進展。

術語「治療有效量」係指治療個體之疾病或病症的抗體或抗體片段之量。在腫瘤(例如癌性腫瘤)之情況下，抗體或抗體片段之治療有效量可減少癌細胞數目；減小原發腫瘤尺寸；抑制(亦即在某種程度上減緩且較佳為中止)癌細胞浸潤至周邊器官中；抑制(亦即在某種程度上減緩且較佳為中止)腫瘤轉移；在某種程度上抑制腫瘤生長；及/或在某種程度上減輕一或多種與病症相關之症狀。就抗體或抗體片段在一定程度上可預防癌細胞生長及/或殺死現存癌細胞而言，其可具有細胞抑制性及/或細胞毒性。癌症治療之活體內功效可例如藉由評估存活持續時間、疾病進展時間(TTP)、反應率(RR)、反應持續時間及/或生活品質來量測。

「減小或抑制」意謂能夠引起較佳20%或20%以上，更佳50%或50%以上且最佳75%、85%、90%、95%或95%以上之總體降幅。減小或抑制可指所治療病症之症狀、轉移之存在或尺寸、原發腫瘤之尺寸或血管生成病症中血管之

尺寸或數目。

術語「癌症」及「癌性」係指或描述哺乳動物的生理學病狀，其特徵通常為調節異常之細胞生長。此定義包括良性及惡性癌症。「早期癌症」意謂非侵襲性或轉移性或歸類為0、I或II期癌症之癌症。

術語「癌症前期(precancerous)」係指通常進展或發展成癌症之病狀或生長。

「非轉移性」意謂癌症為良性或保留在原發部位且未滲入淋巴或血管系統或除原發部位外之組織。非轉移性癌症一般為任何為0、I或II期癌症及偶爾為III期癌症之癌症。

「醫藥學上可接受之載劑」係指醫藥調配物中除活性成分外之對個體無毒性的成分。醫藥學上可接受之載劑包括(但不限於)緩衝劑、賦形劑、穩定劑或防腐劑。

術語「抗癌療法」係指適用於治療癌症之療法。抗癌治療劑之實例包括(但不限於)例如化學治療劑、生長抑制劑、細胞毒性劑、用於放射療法之藥劑、抗血管生成劑、細胞凋亡劑、抗微管蛋白劑及其他治療癌症之藥劑、抗CD20抗體、血小板衍生生長因子抑制劑(例如Gleevec™(甲磺酸伊馬替尼(Imatinib Mesylate))、COX-2抑制劑(例如塞內昔布(celecoxib))、干擾素、細胞激素；可結合一或多種以下標靶之拮抗劑(例如中和性抗體)：ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR-beta、BlyS、APRIL、BCMA或VEGF受體；TRAIL/Apo2，及其他生物活性及有機化學藥劑等。其組合亦包括於本發明中。

「化學治療劑」為適用於治療癌症之化合物。化學治療劑之實例包括烷化劑，諸如噻替派(thiotepa)及環磷醯胺(CYTOXAN®)；烷基磺酸鹽，諸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶(aziridine)，諸如苯唑多巴(benzodopa)、卡巴醌(carboquone)、米特多巴(meturedopa)及尤利多巴(uredopa)；伸乙基亞胺及甲基密胺(methylamelamine)，包括六甲密胺(altretamine)、三伸乙基密胺(triethylenemelamine)、三伸乙基磷醯胺(trietylenephosphoramide)及三伸乙基硫代磷醯胺(triethiylenethiophosphoramide)；乙醯精寧(acetogenin)(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))；Δ-9-四氫大麻酚(delta-9-tetrahydrocannabinol)(屈大麻酚(dronabinol)，MARINOL®)；β-拉帕酮(beta-lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙鹼(colchicine)；樺木酸(betulinic acid)；喜樹鹼(camptothecin)(包括合成類似物拓朴替康(topotecan)(HYCAMTIN®)、CPT-11(伊諾替康(irinotecan)；CAMPTOSAR®)、乙醯基喜樹鹼、斯考普萊叮(scopolectin)及9-胺基喜樹鹼)；苔蘚蟲素(bryostatin)；卡利斯塔叮(callystatin)；CC-1065(包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；足葉草毒素(podophyllotoxin)；足葉草酸(podophyllinic acid)；替尼泊甙(teniposide)；念珠藻環肽(cryptophycin)(尤其念珠藻環肽1及念珠藻環肽8)；海兔毒

素(dolastatin)；多卡米辛(duocarmycin)(包括合成類似物KW-2189及CB1-TM1)；艾榴素(eleutherobin)；盤克斯塔叮(pancratistatin)；沙考的汀(sarcodictyin)；海綿素(spongistatin)；氮芥(nitrogen mustard)，諸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷醯胺、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、甲二氯二乙胺(mechlorethamine)、鹽酸甲二氯二乙胺氧化物(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法侖(melphalan)、新恩比興(novembichin)、膽固醇苯乙酸氮芥(phenesterine)、松龍苯芥(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶芥(uracil mustard)；亞硝基尿素(nitrosourea)，諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲黴素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimnustine)；抗生素，諸如烯二炔抗生素(例如刺孢黴素(calicheamicin)，尤其刺孢黴素γ1及刺孢黴素ω1(參看例如Nicolaou等人，*Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994))；CDP323，口服α-4整合素抑制劑；達米辛(dynemicin)，包括達米辛A；艾斯帕米辛(esperamicin)；以及新抑癌素(neocarzinostatin)發色團及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團)、阿克拉黴素(aclacinomysin)、放線菌素(actinomycin)、胺茴黴素(anthramycin)、偶氮絲胺酸(azaserine)、博萊黴素(bleomycins)、放線菌素C(cactinomycin)、卡拉比辛(carabicin)、洋紅黴素

(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycin)、更生黴素(dactinomycin)、道諾黴素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-側氧基-L-正白胺酸、小紅莓(doxorubicin)(包括ADRIAMYCIN® N-嗎啉基-小紅莓、氰基N-嗎啉基-小紅莓、2-N-吡咯啉基-小紅莓、鹽酸小紅莓脂質體注射劑(DOXIL®)、脂質體小紅莓TLC D-99(MYOCET®)、聚乙二醇化脂質體小紅莓(CAELYX®)，及去氧小紅莓)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、黃膽素(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycin)(諸如絲裂黴素C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycin)、培洛黴素(peplomycin)、泊非黴素(porfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、奎那黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑菌素(streptonigrin)、鏈脲黴素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、左柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤(methotrexate)、吉西他濱(gemcitabine)(GEMZAR®)、喃氟啶(tegafur)(UFTORAL®)、卡培他濱(capecitabine)(XELODA®)、艾普塞隆(epothilone)及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如迪諾特寧(denopterin)、甲胺喋呤、喋羅呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉濱(fludarabine)、6-巰基嘌呤、噻咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，諸如

安西他濱(ancitabine)、阿紮胞苷(azacitidine)、6-氮雜尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙去氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)；雄激素，諸如卡普睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾內酯(testolactone)；抗腎上腺藥劑(anti-adrenal)，諸如胺魯米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)及曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如夫羅林酸(frolinic acid)；醋葡醛內酯(aceglatone)；醛磷醯胺醣苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸(aminolevulinic acid)；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吖啶(amsacrine)；倍思塔布(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；艾達曲克(edatraxate)；得弗伐胺(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吖醌(diaziquone)；艾弗利散(elfornithine)；依利醋銨(elliptinium acetate)；艾普塞隆(epothilone)；乙環氧啶(etoglucid)；硝酸鎵；羥基脲；香菇多糖(lentinan)；羅尼達寧(lonidainine)；美登素類(maytansinoid)，諸如美登素(maytansine)及安絲菌素(ansamitocin)；丙脒腙(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫哌達醇(mopidanmol)；硝拉維林(nitraerine)；噴司他汀(pentostatin)；苯來美特(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；2-乙基醯肼；丙卡巴肼(procarbazine)；

PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；根瘤菌素(rhizoxin)；西佐糖(sizofiran)；鍺螺胺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌(triaziquone)；2,2',2'-三氯三乙胺；單端孢黴毒素(trichothecene)(尤其T-2毒素、弗納庫林A(verracurin A)、桿孢菌素A(roridin A)及胺癸叮(anguidine))；烏拉坦(urethan)；長春地辛(vindesine)(ELDISINE®、FILDESIN®)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露莫司汀(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；雙溴丙基哌嗪(pipobroman)；甲托辛(gacytosine)；阿拉伯糖(arabinoside)(「Ara-C」)；噻替派；紫杉醇，例如太平洋紫杉醇(paclitaxel)(TAXOL®)、白蛋白工程改造之太平洋紫杉醇(ABRAXANE™)及多西他賽(docetaxel)(TAXOTERE®)奈米粒子調配物；苯丁酸氮芥；6-硫鳥嘌呤；巯基嘌呤；甲胺喋呤；鉑劑，諸如順鉑(cisplatin)、奧賽力鉑(oxaliplatin)(例如ELOXATIN®)及卡鉑(carboplatin)；防止微管蛋白聚合形成微管之長春花(vinca)，包括長春鹼(vinblastine)(VELBAN®)、長春新鹼(vincristine)(ONCOVIN®)、長春地辛(ELDISINE®、FILDESIN®)及長春瑞賓(NAVELBINE®)；依託泊苷(etoposide)(VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌；甲醯四氫葉酸(leucovorin)；諾凡特龍(novantrone)；依達曲沙(edatrexate)；道諾黴素(daunomycin)；胺基喋呤

(aminopterin)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；類視黃素，諸如視黃酸，包括貝瑟羅汀(bexarotene)(TARGRETIN®)；雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)(例如BONEFOS®或OSTAC®)、依替膦酸鹽(etidronate)(DIDROCAL®)、NE-58095、唑來膦酸(zoledronic acid)/唑來膦酸鹽(zoledronate)(ZOMETA®)、阿侖膦酸鹽(alendronate)(FOSAMAX®)、帕米膦酸鹽(pamidronate)(AREDIA®)、替魯膦酸鹽(tiludronate)(SKELID®)或利塞膦酸鹽(risedronate)(ACTONEL®)；曲沙他濱(troxacitabine)(1,3-二氧戊環核苷胞嘧啶類似物)；反義寡核苷酸，尤其抑制涉及異常細胞增殖之信號傳導路徑中基因之表現的反義寡核苷酸，諸如PKC-α、Raf、H-Ras，及表皮生長因子受體(EGF-R)；疫苗，諸如THERATOPE®疫苗及基因療法疫苗，例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗及VAXID®疫苗；拓撲異構酶1抑制劑(例如LURTOTECAN®)；rmRH(例如ABARELIX®)；BAY439006(索拉非尼(sorafenib)；Bayer)；SU-11248(舒尼替尼(sunitinib,)，SUTENT®, Pfizer)；蘇尼替尼(perifosine)、COX-2抑制劑(例如塞內昔布或依託考昔(etoricoxib))、蛋白體抑制劑(例如PS341)；硼替佐米(bortezomib)(VELCADE®)；CCI-779；替比伐尼(tipifarnib)(R11577)；索拉非尼、ABT510；Bcl-2抑制劑，諸如奧利默森鈉(oblimersen sodium)(GENASENSE®)；潘屈酮(pixantrone)；EGFR抑制

劑(參看下文定義)；酪胺酸激酶抑制劑(參看下文定義)；絲胺酸-蘇胺酸激酶抑制劑，諸如雷帕黴素(rapamycin)(西羅莫司(sirolimus)，RAPAMUNE®)；法尼基轉移酶抑制劑，諸如洛那法尼(lonafarnib)(SCH 6636、SARASAR™)；及上述任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物；以及上述兩者或兩者以上之組合，諸如CHOP(環磷醯胺、小紅莓、長春新鹼及潑尼松龍(prednisolone)之組合療法的縮寫)及FOLFOX(奧賽力鉑(ELOXATIN™)與5-FU及甲醯四氫葉酸組合之治療方案的縮寫)。

如本文中所定義之化學治療劑包括作用為調節、減小、阻斷或抑制可促進癌症生長之激素效應的「抗激素劑」或「內分泌治療劑」。其可為激素本身，包括(但不限於)抗雌激素與混合促效劑/拮抗劑配置，包括他莫昔芬(tamoxifen)(NOLVADEX®)、4-羥基他莫昔芬、托瑞米芬(toremifene)(FARESTON®)、艾多昔芬(艾多昔芬)、曲洛昔芬(droloxifene)、雷洛昔芬(raloxifene)(EVISTA®)、曲沃昔芬(trioxifene)、克沃昔芬(keoxifene)及選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，諸如SERM3；無促效劑特性之純抗雌激素，諸如氟維司群(fulvestrant)(FASLODEX®)，及EM800(此等藥劑可阻斷雌激素受體(ER)二聚合、抑制DNA結合、提高ER循環及/或抑制ER含量)；芳香酶抑制劑，包括類固醇芳香酶抑制劑，諸如福美司坦(formestane)及依西美坦(exemestane)(AROMASIN®)，及非類固醇芳香酶抑制劑，諸如阿那曲唑(anastrazole)

(ARIMIDEX®)、來曲唑(letrozole)(FEMARA®)及胺魯米特，且其他芳香酶抑制劑包括伏羅唑(vorozole)(RIVISOR®)、乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)(MEGASE®)、法屈唑(fadrozole)，及4(5)-咪唑；黃體生成素釋放激素促效劑，包括亮丙立德(leuprolide)(LUPRON®及ELIGARD®)、戈舍瑞林(goserelin)、布舍瑞林(buserelin)及曲特瑞林(tripterelin)；性類固醇，包括孕激素(progestine)，諸如乙酸甲地孕酮及乙酸甲羥助孕酮(medroxyprogesterone acetate)，雌激素，諸如己烯雌酚(diethylstilbestrol)及普雷馬林(premarin)，及雄激素/類視黃素，諸如氟羥甲基睪酮(fluoxymesterone)，全反式視黃素(all transretionic acid)及芬維A胺(fenretinide)；奧那司酮(onapristone)；抗孕酮；雌激素受體下調劑(ERD)；抗雄激素，諸如氟他胺(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)及比卡魯胺(bicalutamide)；及上述任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物；以及上述兩者或兩者以上之組合。

「個體」為脊椎動物，較佳為哺乳動物，更佳為人類。哺乳動物亦包括(但不限於)人類、非人類較高級靈長類動物、靈長類動物、農畜(諸如牛)、運動型動物、寵物(諸如貓、狗及馬)及實驗動物(諸如小鼠及大鼠)。

II.詳細說明

本發明提供抗體及功能抗體片段，其包含至少一個對至少兩種不同HER受體(詳言之，EGFR及HER2、EGFR及HER3，或EGFR及HER4)具有結合特異性之抗原結合域。

此等多特異性抗體不同於含有具有不同結合特異性之抗原結合域(通常兩個)之傳統多特異性抗體。在某些實施例中，本文所述之多特異性抗體具有IgG(或Fab)之分子結構且因此保留IgG對治療開發之有利特性，諸如可預測之藥物動力學特性、廣泛認可之製造方案、Fc介導效應功能之選擇，及雙價或單價。藉由兩個不同抗體片段組裝成一個分子所獲得之傳統多特異性抗體通常缺乏此等有利特性。

本文所述之多特異性抗體及其功能抗體片段適用於治療與HER受體路徑相關之疾病或病狀，諸如癌症。在一個特定實施例中，多特異性抗體之抗原結合域特異性結合於EGFR與HER3。在另一實施例中，抗原結合域特異性結合於EGFR與HER2。在另一實施例中，抗原結合域特異性結合於EGFR與HER4。

本發明之一個特定態樣提供包含兩個(或兩個以上)各自具有相同結合特異性之抗原結合域的抗體。

一個實施例提供包含兩個抗原結合域之多特異性抗體，其中各抗原結合域具有相同特異性且特異性結合於兩種不同HER受體。在一個特定實施例中，各抗原結合域特異性結合於EGFR與HER3。在另一實施例中，各抗原結合域特異性結合於EGFR與HER2。在另一實施例中，各抗原結合域特異性結合於EGFR與HER4。在又一實施例中，各抗原結合域特異性結合於EGFR之域III。在另一實施例中，各抗原結合域特異性結合於HER3之域III。在又一實施例中，各抗原結合域能夠結合於EGFR之域III及HER3之域

III。

在特定實施例中，多特異性抗體特異性結合於其標靶HER受體或HER受體且不特異性結合於非標靶HER受體。因此，在一個實施例中，多特異性抗體特異性結合於EGFR及HER3但不特異性結合於HER2或HER4。在另一實施例中，多特異性抗體特異性結合於EGFR及HER2但不特異性結合於HER3或HER4。在另一實施例中，多特異性抗體特異性結合於EGFR及HER4但不特異性結合於HER2或HER3。

在某些實施例中，各抗原結合域包含重鏈可變域(V_H)及輕鏈可變域(V_L)。在一個實施例中，V_HV_L單元特異性結合於兩種不同HER受體。在一個特定實施例中，V_HV_L單元特異性結合於EGFR及HER3。在另一實施例中，V_HV_L單元特異性結合於EGFR及HER2。在另一實施例中，V_HV_L單元特異性結合於EGFR及HER4。

在特定實施例中，多特異性抗體對其標靶HER受體之親和力係由小於10^{-5} M、小於10^{-6} M、小於10^{-7} M、小於10^{-8} M、小於10^{-9} M、小於10^{-10} M、小於10^{-11} M或小於10^{-12} M之Kd指示。在一個實施例中，抗體對其標靶受體之一的Kd小於10^{-7} M、小於10^{-8} M、小於10^{-9} M、小於10^{-10} M、小於10^{-11} M或小於10^{-12} M。在另一實施例中，多特異性抗體對所有其標靶受體之Kd均小於10^{-7} M、小於10^{-8} M、小於10^{-9} M、小於10^{-10} M、小於10^{-11} M或小於10^{-12} M。

在一些實施例中，多特異性抗體對其標靶HER受體之一

的親和力大於對其他標靶HER受體之親和力。在一個實施例中，多特異性抗體對一種標靶HER受體之親和力為其對另一標靶HER受體之親和力的至少2、3、4、5、8、10、12、15、18、20、22、25、30、35、40、50、100倍。在一個實施例中，多特異性抗體特異性結合於EGFR及另一HER受體且其對另一HER受體之結合親和力為其對EGFR之親和力的至少2、3、4、5、8、10、12、15、18、20、22、25、30、35、40、50或100倍。在一個實施例中，多特異性抗體特異性結合於EGFR及HER3且其對HER3之結合親和力為其對EGFR之結合親和力的至少2、3、4、5、8、10、12、15、18、20、22、25、30、35、40、50或100倍。在另一實施例中，多特異性抗體特異性結合於EGFR及HER2且其對HER2之結合親和力為其對EGFR之結合親和力的至少2、3、4、5、8、10、12、15、18、20、22、25、30、35、40、50或100倍。在另一實施例中，多特異性抗體特異性結合於EGFR及HER4且其對HER4之結合親和力為其對EGFR之親和力的至少2、3、4、5、8、10、12、15、18、20、22、25、30、35、40、50或100倍。

在一些實施例中，本發明之多特異性抗體抑制其所特異性結合之至少一種HER受體的生物活性。在一些實施例中，本發明之多特異性抗體抑制其所特異性結合之兩種HER受體的生物活性。因此，舉例而言，本發明之多特異性抗體抑制EGFR及/或HER2及/或HER3及/或HER4受體之生物活性。

在一個實施例中，多特異性抗體特異性結合人類EGFR及人類HER3，且抑制至少EGFR之生物活性。在另一實施例中，多特異性抗體特異性結合人類EGFR及人類HER3且抑制HER3之至少一種生物活性。在另一實施例中，多特異性抗體特異性結合人類EGFR及人類HER3且抑制EGFR與HER3之生物活性。

在另一實施例中，多特異性抗體特異性結合人類EGFR及人類HER2且抑制EGFR之至少一種生物活性。在又一實施例中，抗體特異性結合人類EGFR及人類HER2且抑制HER2之至少一種生物活性。在又一實施例中，抗體特異性結合人類EGFR及人類HER2且抑制EGFR與HER2之生物活性。

在另一實施例中，抗體特異性結合人類EGFR及人類HER4，且抑制至少EGFR之生物活性。在另一實施例中，抗體特異性結合人類EGFR及人類HER4且抑制HER4之至少一種生物活性。在另一實施例中，抗體特異性結合人類EGFR及人類HER4且抑制EGFR與HER4之生物活性。

在某些實施例中，本文之抗體抑制至少部分由其不結合之HER受體驅動之生物活性。舉例而言，結合EGFR及HER3之抗體可仍能夠抑制HER2驅動之生物活性。

可用此項技術中熟知之檢定量測生物活性之抑制。因此，舉例而言，本文中之抗體可抑制一或多種HER受體之磷酸化，及/或可抑制HER配位體結合其受體，及/或可抑制配位體誘導之HER受體表現細胞增殖，及/或可抑制經

HER受體活化之下游信號傳導路徑。

響應於EGFR磷酸化而活化之兩種主要下游信號傳導路徑為Ras/MAPK及磷脂醯肌醇3-激酶(PI3K)/Akt路徑。因此，本文中之抗體抑制HER受體之生物活性的能力可藉由評估其是否可阻斷此等路徑(例如NR6細胞中)之活化來量測。因此，可量測抗體阻斷配位體誘導之p44/42MAPK、pAKT或其他下游信號傳導分子之磷酸化的能力。HER3信號傳導亦已涉及若干其他路徑，包括c-Met及FGFR。本文中之抗體抑制HER受體之生物活性的能力可藉由評估其是否可阻斷此等路徑之活化來量測。

本發明之一個態樣提供多特異性抗體，其係藉由使對一種HER受體具有特異性之抗體多樣化來產生，使得其在保留對第一HER受體之特異性的同時對第二HER受體產生特異性。一般而言，此方法包含以下步驟：(1)將抗體之輕鏈可變域(V_L)之胺基酸序列多樣化，其中在多樣化之前，該抗體包含能夠結合於第一HER受體上之抗原決定基的V_L及重鏈可變域(V_H)，及(2)選擇能夠結合於第一HER受體上之抗原決定基及第二HER受體上之抗原決定基的多樣化抗體。可重複此等步驟以產生多特異性抗體。此方法之詳細說明提供於美國專利公開案第20080069820號中，該案之全部揭示內容係以引用的方式明確併入本文中。在實例中進一步說明此方法。在實例所述之方法中，抗EGFR抗體係用作多樣化之模板且從而用於製備多特異性抗HER抗體，然而其他抗HER抗體(諸如抗HER2、抗HER3或抗

HER4抗體)亦可充當模板。

本發明進一步提供能夠特異性結合於一種HER受體且不特異性結合於其他HER受體之單特異性抗體。在一個實施例中，抗體特異性結合於EGFR。在一個實施例中，抗體特異性結合於EGFR之域III。在一些實施例中，抗體特異性結合於EGFR且抑制EGFR之生物活性。在另一實施例中，抗體特異性結合於HER3。在一個實施例中，抗體特異性結合於HER3之域III。在一些實施例中，抗體特異性結合於HER3且抑制HER3之生物活性。

單特異性抗體可用作供進一步多樣化之模板抗體以增加對其他HER受體或對其他標靶抗原之結合特異性。

毒性

EGFR拮抗劑之毒性在臨床前與臨床研究中已充分記錄。舉例而言，抗EGFR抗體西妥昔單抗在治療有效量下顯示各種形式之毒性。西妥昔單抗(ERBITUX®, Imclone)最常見之不良反應(發生率≥25%)為皮膚不良反應(包括皮疹、搔癢及指甲變化)、頭痛、腹瀉及感染。與西妥昔單抗治療相關之最嚴重不良反應為輸注反應、心肺驟停(cardiopulmonary arrest)、皮膚毒性(dermatologic toxicity)及放射性皮炎、敗血症、腎衰竭、間質性肺病(interstitial lung disease)及肺栓塞。參看關於西妥昔單抗之生物製品許可協定(Biologics License Agreement (BLA) for cetuximab)(申請案第125084號)(以引用的方式併入本文中)。對於帕尼單抗(VECTIBIX® Amgen)觀測到類似毒性問題，其中皮

膚毒性出現於89%投與此抗體之患者中。此等毒性為嚴重的CTC 3級及3級以上。(VECTIBIX® FDA標記)

已報導抗EGFR化學治療劑埃羅替尼有時候會引起急性腎衰竭或腎機能不足、肝衰竭及/或肝腎症候群、腸胃穿孔、大皰及剝落性皮膚病及角膜潰瘍及穿孔。參看關於埃羅替尼之FDA警告及預防安全性標記(FDA *Warnings and Precautions* safety labeling for erlotinib)(TARCEVA®, Genentech, OSI Pharmaceuticals)(2009)。

「毒性的」或「毒性」係指藥劑投與個體時所引起之任何不良反應。毒性度量包括(但不限於)死亡率、體重減輕、器官衰竭、器官功能改變、中樞神經系統毒性、腸胃毒性(如由以下所示：例如腹瀉)、皮膚毒性(如由以下所示：例如出現皮疹、皮膚病變、脫屑或搔癢)、心臟毒性、感染、敗血症及細胞毒性。

可藉由此項技術中已知之方法測定毒性，諸如監測臨床籠側觀測結果(clinical cage side observation)、體重、食物消耗、呼吸速率、脈動式測氧法量測、身體檢查、眼科評估、神經學評估、代謝參數、心血管參數、臨床病理學(包括臨床化學、血液學、尿分析及凝血參數)，及宏觀及微觀病變。

由國家癌症協會(National Cancer Institute)制定之不良事件常見術語標準3.0版(Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0/CTCAE)(以全文引用的方式併入本文中)提供關於人類個體之特定可接受毒性指標的資訊。圖

31提供關於針對EGFR拮抗劑療法所觀測到之非臨床及臨床毒性的資訊。

可根據總毒性事件或毒性事件嚴重度量測毒性。可使用CTCAE中建立之分級系統描述事件嚴重度。基於以下通用準則，使用嚴重度之獨特臨床描述來對各種不利事件評級：1級係指輕度事件，2級係指中度事件，3級係指嚴重事件，4級係指威脅生命或失能之事件，且5級係指與事件有關之死亡。CTCAE提供毒性事件之特定臨床描述。皮膚毒性之描述提供於CTCAE 3版之第14頁開始。舉例而言，圖32展示皮疹/脫屑及痤瘡/痤瘡樣皮疹之分級。(CTCAE 3版)此項技術中已知多種模型可用以監測潛在毒性指標，包括(但不限於)基於活體外細胞之模型及活體內非人類動物模型。亦在臨床試驗研究中監測人類個體中之毒性。

在一個特定實施例中，量測獼猴中之毒性。EGFR拮抗劑在獼猴中之毒性效應已充分記錄。如關於西妥昔單抗之生物製品許可協定(BLA)(申請案第125084號)(以引用的方式併入本文中)中所闡述，所有接受西妥昔單抗之猴均顯示輕度至重度皮膚病變，其由鱗屑形成、發紅、紅斑、皮炎、裂口、創傷及疹及/或毛髮稀疏或損失組成。皮膚毒性之嚴重度與發作時間均隨劑量而定，其中高劑量、中劑量及低劑量之嚴重度分別為重度、中度及輕度且發作時間分別出現於研究第15天、22天及64天。嚴重皮膚病變之繼發性併發症為細菌感染或敗血症，高劑量組中50%動物隨後死亡或安樂死。其他劑量相關毒性包括某些臨床病理學

參數之變化，該等變化與肝臟、骨髓、脾臟及淋巴器官之細胞及組織損害之宏觀及微觀跡象相關。

如實例中所闡述，相較於給予等量EGFR拮抗劑西妥昔單抗之獼猴，給予可特異性結合於EGFR及HER3之雙特異性抗體的獼猴顯示較小毒性發生率(如由真皮病變所指示)。給予25 mg/kg雙特異性抗體的三個獼猴中有一個產生真皮病變，然而給予25 mg/kg西妥昔單抗的3個獼猴皆產生真皮病變。給予雙特異性抗體之猴中出現之病變嚴重度小於給予西妥昔單抗之猴的病變且病變發作延遲。相較於給予西妥昔單抗之猴(其中所有動物真皮病變之發作均在第三次給藥之後出現)，給予雙特異性抗體之動物在最後(第六次)給藥之後一週產生皮膚病變。

在西妥昔單抗之臨床研究中，觀測到皮膚毒性，包括痤瘡樣皮疹、皮膚乾燥及裂口，及發炎性及傳染性後遺症。皮膚毒性之報導發生率高達89%(對於患有晚期結腸直腸癌之彼等患者)。

皮膚毒性之模型已知且可用以測定抗體之皮膚毒性。此等模型之實例包括人類表皮角質細胞NHEK(Clonetics, San Diego, CA；Lonza Bioscience, Walkersville, MD)；HEKa (Cascade Biologics, Portland, OR; Invitrogen, Carlsbad, CA)及重建型人類表皮(EpiDerm™培養物(MatTek, Ashland, MA))。此等模型可用以檢驗抗體對細胞增殖、基因表現、蛋白質表現、受體磷酸化、細胞生存率及組織病理學變化之影響。Lacouture, M.E., *Nature Rev. Cancer,*

6:803-812 (2006)。

需要提供靶向EGFR路徑之較小毒性抗體。諸如西妥昔單抗之EGFR拮抗劑之給藥受限於毒性(主要為皮膚毒性及輸注反應)。較小毒性抗體可以高於較大毒性EGFR拮抗劑之劑量投與，從而可增強抗腫瘤效應。因此，本發明之一個態樣提供特異性結合於EGFR及至少一種其他HER受體(HER2、HER3及/或HER4)之多特異性抗體，其中當該抗體與EGFR拮抗劑投與劑量相等時，該抗體之毒性小於EGFR拮抗劑。在一個實施例中，抗體特異性結合於EGFR及HER3。在另一實施例中，抗體特異性結合於EGFR及HER2。在又一實施例中，抗體特異性結合於EGFR及HER4。

在一些實施例中，相較於EGFR拮抗劑，多特異性抗體在活體內模型中誘導較低發生率之毒性、較不嚴重之毒性或延遲毒性發作。本發明之一個態樣提供特異性結合於EGFR及至少一種其他HER受體(HER2、HER3及/或HER4)之多特異性抗體，其中相較於投與EGFR拮抗劑之個體中之毒性事件，該抗體在投與該抗體之個體中誘發較少毒性事件。在特定實施例中，投與抗體之個體中之毒性事件數比投與EGFR拮抗劑之個體中之毒性事件數小至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

在其他實施例中，投與抗體之個體中之毒性事件發生率小於80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%或1%。

在特定實施例中，相較於EGFR拮抗劑，多特異性抗體在活體內模型中誘導較低發生率之皮膚毒性、較不嚴重之皮膚毒性或延遲皮膚毒性發作。本發明之一個態樣提供特異性結合於EGFR及至少一種其他HER受體(HER2、HER3及/或HER4)之多特異性抗體，其中相較於投與EGFR拮抗劑之個體中的總皮膚毒性事件，該抗體在投與該抗體之個體中誘發較少的總皮膚毒性事件。在特定實施例中，投與該抗體之個體中之皮膚毒性事件總數比投與EGFR拮抗劑之個體中之皮膚毒性事件總數小至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

在其他實施例中，投與抗體之個體中之皮膚毒性事件總發生率小於80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%或1%。

本發明之另一態樣提供特異性結合於EGFR及至少一種其他HER受體(HER2、HER3及/或HER4)之多特異性抗體，其中相較於投與EGFR拮抗劑之個體中之3級或3級以上毒性事件，該抗體在投與該抗體之個體中誘發較少的3級或3級以上毒性事件。在特定實施例中，投與抗體之個體中之3級或3級以上毒性事件數比投與EGFR拮抗劑之個體中之3級或3級以上毒性事件數小至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

在其他實施例中，投與多特異性抗體之個體中之3級或3級以上毒性事件發生率小於70%、60%、50%、40%、30%、20%、15%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、

6%、5%、4%、3%、2%或1%。

在特定實施例中，相較於投與EGFR拮抗劑之個體中之3級或3級以上皮膚毒性事件，多特異性抗體在投與該雙特異性抗體之個體中誘發較少的3級或3級以上皮膚毒性事件。在特定實施例中，投與多特異性抗體之個體中之3級或3級以上皮膚毒性事件數比投與EGFR拮抗劑之個體中之3級或3級以上皮膚毒性事件數小至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

在其他實施例中，投與多特異性抗體之個體中之3級或3級以上皮膚毒性事件發生率小於70%、60%、50%、40%、30%、20%、15%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。

在其他實施例中，相較於EGFR拮抗劑，該抗體在活體內模型中誘發更少發生率之器官功能改變。在其他實施例中，相較於EGFR拮抗劑，抗體在活體內模型中誘發更少或較不嚴重之腸胃毒性。

在一些實施例中，EGFR拮抗劑為抗EGFR抗體。在一個實施例中，EGFR拮抗劑為西妥昔單抗。在另一實施例中，EGFR拮抗劑為帕尼單抗。在另一實施例中，EGFR拮抗劑為小分子。在一個實施例中，EGFR拮抗劑為埃羅替尼。在一個實施例中，活體內模型為猴，諸如獼猴。在另一實施例中，活體內模型為人類。

抗體及抗體變異體

在一些實施例中，本發明提供包含特異性結合於EGFR

及HER3之抗原結合域的多特異性抗體。在一些實施例中，抗原結合域不特異性結合於其他標靶，包括其他HER受體。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的V_H(重鏈可變域)。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 40之胺基酸序列的V_L(輕鏈可變域)。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的V_H及含有SEQ ID NO: 40之胺基酸序列的V_L。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之HVR的V_H。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 40之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之HVR的V_H及含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 40之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有所有三

個具有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之HVR的V_H及含有所有三個具有SEQ ID NO: 40之胺基酸序列之HVR的V_L。在一些實施例中，HVR為擴展HVR。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 64之胺基酸序列的V_H。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 26之胺基酸序列的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 64之胺基酸序列的V_H及含有SEQ ID NO: 26之胺基酸序列的V_L。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 64之胺基酸序列之HVR的V_H。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 26之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 64之胺基酸序列之HVR的V_H及含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 26之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有所有三個具有SEQ ID NO: 64之胺基酸序列之HVR的V_H及含有所

有三個具有SEQ ID NO: 26之胺基酸序列之HVR的V_L。在一些實施例中，HVR為擴展HVR。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 28之胺基酸序列的V_H。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 27之胺基酸序列的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 28之胺基酸序列的V_H及含有SEQ ID NO: 27之胺基酸序列的V_L。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之HVR的V_H。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 27之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之HVR的V_H及含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 27之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有所有三個具有SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之HVR的V_H及含有所有三個具有SEQ ID NO: 27之胺基酸序列之HVR的V_L。在

一些實施例中，HVR為擴展HVR。在一個特定實施例中，HVR-H1包含胺基酸序列LSGDWIH(SEQ ID NO: 48)，HVR-H2包含胺基酸序列LGEISAAGGYTD(SEQ ID NO: 50)，HVR-H3包含胺基酸序列ARESRVSFEAAMDY(SEQ ID NO: 53)，HVR-L1包含胺基酸序列DLATDVA(SEQ ID NO: 54)，HVR-L2包含胺基酸序列SASF(SEQ ID NO: 56)，且HVR-L3包含胺基酸序列SEPEPYT(SEQ ID NO: 57)。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 29之胺基酸序列的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 28之胺基酸序列的V_H及含有SEQ ID NO: 29之胺基酸序列的V_L。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之HVR的V_H及含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有所有三個具有SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之HVR的V_H及含有所

有三個具有SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之HVR的V_L。在一些實施例中，HVR為擴展HVR。在一個特定實施例中，HVR-H1包含胺基酸序列LSGDWIH(SEQ ID NO: 48)，HVR-H2包含胺基酸序列LGEISAAGGYTD(SEQ ID NO: 50)，HVR-H3包含胺基酸序列ARESRVSFEAAMDY(SEQ ID NO: 53)，HVR-L1包含胺基酸序列NIATDVA(SEQ ID NO: 55)，HVR-L2包含胺基酸序列SASF(SEQ ID NO: 56)，且HVR-L3包含胺基酸序列SEPEPYT(SEQ ID NO: 57)。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的V_H。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的V_H及含有SEQ ID NO: 29之胺基酸序列的V_L。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之HVR的V_H。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之HVR的V_H及含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有所有三

個具有SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之HVR的V_H及含有所有三個具有SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之HVR的V_L。在一些實施例中，HVR為擴展HVR。在一個特定實施例中，HVR-H1包含胺基酸序列LSGDWIH(SEQ ID NO: 48)，HVR-H2包含胺基酸序列VGEISAAGGYTD(SEQ ID NO: 51)，HVR-H3包含胺基酸序列ARESRVSFEAAMDY(SEQ ID NO: 53)，HVR-L1包含胺基酸序列NIATDVA(SEQ ID NO: 55)，HVR-L2包含胺基酸序列SASF(SEQ ID NO: 56)且HVR-L3包含胺基酸序列SEPEPYT(SEQ ID NO: 57)。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 40、41、42、43、44、45或46之胺基酸序列的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的V_H及含有SEQ ID NO: 40、41、42、43、44、45或46之胺基酸序列的V_L。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 40、41、42、43、44、45或46之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之HVR的V_H及含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 40、41、42、43、44、45或46之胺基酸序列之HVR的

V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有所有三個具有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之HVR的V_H及含有所有三個具有SEQ ID NO: 40、41、42、43、44、45或46之胺基酸序列之HVR的V_L。在一些實施例中，HVR為擴展HVR。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER2之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 36、37或38之胺基酸序列的輕鏈可變域。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER2之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的重鏈可變域及含有SEQ ID NO: 36、37或38之胺基酸序列的輕鏈可變域。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER2之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之HVR的V_H。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER2之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 36、37或38之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER2之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之HVR的V_H及含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 36、37或38之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含

特異性結合於EGFR及HER2之抗原結合域，其中該抗體包含含有所有三個具有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之HVR的V_H及含有所有三個具有SEQ ID NO: 36、37或38之胺基酸序列之HVR的V_L。在一些實施例中，HVR為擴展HVR。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER4之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的V_H。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER4之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 39之胺基酸序列的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER4之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的重鏈可變域及含有SEQ ID NO: 39之胺基酸序列的輕鏈可變域。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER4之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 39之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER4之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之HVR的V_H及含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 39之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER4之抗原結合域，其中該抗體包含含有所有三個具有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之HVR的V_H及含有所有三個具有SEQ ID NO: 39之胺基酸序列之HVR的V_L。在

一些實施例中，HVR為擴展HVR。

在一個實施例中，本發明提供包含特異性結合於EGFR之抗原結合域之單特異性抗體，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的V_H。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於EGFR之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 58或SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的V_L。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於EGFR之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的V_H及含有SEQ ID NO: 58或SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的V_L。

在一個實施例中，本發明提供包含特異性結合於EGFR之抗原結合域的單特異性抗體，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之HVR的V_H。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於EGFR之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 24之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於EGFR之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之HVR的V_H及含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 24之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於EGFR之抗原結合域，其中該抗體包含含有所有三個具有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之HVR的V_H及含有所有三個具有SEQ ID NO: 24之胺基酸序列之HVR的V_L。在一些實施例中，HVR

為擴展HVR。在一個特定實施例中，HVR-H1包含胺基酸序列FTGNWIH(SEQ ID NO: 47)，HVR-H2包含胺基酸序列VGEISPSGGYTD(SEQ ID NO: 49)，HVR-H3包含胺基酸序列ARESRVSYEAAMDY (SEQ ID NO: 52)，HVR-L1包含胺基酸序列DVSTAVA (SEQ ID NO: 78)，HVR-L2包含胺基酸序列SASF(SEQ ID NO: 56)且HVR-L3包含胺基酸序列SYPTPYT(SEQ ID NO: 79)。

在一個實施例中，本發明提供包含特異性結合於HER3之抗原結合域的單特異性抗體，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 29之胺基酸序列的V_H。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 33、34或35之胺基酸序列的V_L。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 29之胺基酸序列的V_H及含有SEQ ID NO: 33、34或35之胺基酸序列的V_L。

在一個實施例中，本發明提供包含特異性結合於HER3之抗原結合域的單特異性抗體，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之HVR的V_H。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 33、34或35之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三

個具有SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之HVR的V_H及含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 33、34或35之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有所有三個具有SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之HVR的V_H及含有所有三個具有SEQ ID NO: 33、34或35之胺基酸序列之HVR的VL。在一些實施例中，HVR為擴展HVR。在一個特定實施例中，HVR-H1包含胺基酸序列FTGDWIH(SEQ ID NO: 62)，HVR-H2包含胺基酸序列VGEISPAGAYTD(SEQ ID NO: 60)，HVR-H3包含胺基酸序列AREAKVSFEAAMDY(SEQ ID NO: 61)，HVR-L1包含胺基酸序列NIATDVA(SEQ ID NO: 55)，HVR-L2包含胺基酸序列SASF(SEQ ID NO: 56)且HVR-L3包含胺基酸序列SEPEPYT(SEQ ID NO: 57)。

在一個實施例中，本發明提供包含特異性結合於HER3之抗原結合域的單特異性抗體，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 32之胺基酸序列的V_H。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 31之胺基酸序列的V_L。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 32之胺基酸序列的V_H及含有SEQ ID NO: 31之胺基酸序列的V_L。

在一個實施例中，本發明提供包含特異性結合於HER3之抗原結合域的單特異性抗體，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 32之胺基酸序列之HVR的

V_H。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 32之胺基酸序列之HVR的V_H及含有一、二及/或三個具有SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之HVR的V_L。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有所有三個具有SEQ ID NO: 32之胺基酸序列之HVR的V_H及含有所有三個具有SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之HVR的V_L。在一些實施例中，HVR為擴展HVR。在一個特定實施例中，HVR-H1包含胺基酸序列FSGDWIH(SEQ ID NO: 59)，HVR-H2包含胺基酸序列VGEISPAGAYTD(SEQ ID NO: 60)，HVR-H3包含胺基酸序列AREAKVSFEAAMDY (SEQ ID NO: 61)，HVR-L1包含胺基酸序列DLATDVA (SEQ ID NO: 54)，HVR-L2包含胺基酸序列SASF(SEQ ID NO: 56)且HVR-L3包含胺基酸序列SEPEPYT(SEQ ID NO: 57)。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 2、12或14之胺基酸序列的重鏈。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 4、5、6、7、8、9、10、11或13之胺基酸序列的輕鏈。在一個實施例中，

多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 2之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的輕鏈。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的輕鏈。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的輕鏈。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 14之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的輕鏈。

在一些實施例中，本發明提供包含特異性結合於EGFR及HER2之抗原結合域的多特異性抗體。在一些實施例中，抗原結合域不特異性結合於其他標靶，包括其他HER受體。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER2之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 2之胺基酸序列的重鏈。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER2之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 21、22或23之胺基酸序列的輕鏈。

在一些實施例中，本發明提供包含特異性結合於EGFR及HER4之抗原結合域的多特異性抗體。在一些實施例

中，抗原結合域不特異性結合於其他標靶，包括其他HER受體。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER4之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 2之胺基酸序列的重鏈。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER4之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的輕鏈。

在一個實施例中，本發明提供特異性結合於EGFR之單特異性抗體。在一些實施例中，抗原結合域不特異性結合於其他標靶，包括其他HER受體。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於EGFR之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 2之胺基酸序列的重鏈。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於EGFR之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 1或3之胺基酸序列的輕鏈。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於EGFR之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 2之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 1之胺基酸序列的輕鏈。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於EGFR之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 2之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的輕鏈。

在一個實施例中，本發明提供特異性結合於HER3之單特異性抗體。在一些實施例中，抗原結合域不特異性結合於其他標靶，包括其他HER受體。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該

抗體包含含有SEQ ID NO: 16、17、19或20之胺基酸序列的重鏈。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 13或15之胺基酸序列的輕鏈。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 16、17、19或20之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 13或15之胺基酸序列的輕鏈。

在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 16之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 15之胺基酸序列的輕鏈。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 17之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的輕鏈。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 19之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的輕鏈。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含含有SEQ ID NO: 20之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的輕鏈。

在一些實施例中，涵蓋本文所述之抗體之胺基酸序列修飾。舉例而言，可能需要改良抗體之結合親和力及/或其他生物特性。抗體之胺基酸序列變異體可藉由將適當變化引入編碼該抗體之核苷酸序列中或藉由肽合成來製備。此

等修飾包括例如抗體之胺基酸序列內殘基之缺失及/或插入及/或取代。可將缺失、插入及取代任意組合以獲得最終構築體，限制條件為最終構築體具有所需特徵。胺基酸變化可在製造序列時引入本發明抗體之胺基酸序列中。

在一些實施例中，相對於參考序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列含有取代、插入或缺失，但包含該胺基酸序列之抗體保留結合於參考序列之原始標靶的能力。在一些實施例中，相對於參考序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列含有取代、插入或缺失，但包含該胺基酸序列之抗體保留結合於參考序列之原始標靶且不特異性結合任何其他標靶(包括其他HER受體)的能力。在一些實施例中，參考序列之胺基酸序列中總共1至10個胺基酸已被取代、插入或缺失。在一些實施例中，取代、插入或缺失出現於HVR外之區域中(亦即在FR中)。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中抗體包含V_H與SEQ ID NO: 25之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中抗體包含V_L與SEQ ID

NO: 40之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含V_H，其與SEQ ID NO: 25之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性；及V_L，其與SEQ ID NO: 40之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中抗體包含V_H與SEQ ID NO: 64之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中抗體包含V_L與SEQ ID NO: 26之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含V_H，其與SEQ ID NO: 64之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性；及V_L，其與SEQ ID NO: 26之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中抗體包含胺基酸序列與SEQ ID NO: 29至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含V_H，其與SEQ ID NO: 28之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性；及V_L，其與SEQ ID NO: 29之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中抗體包含V_H與SEQ ID NO: 30之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含V_H，其與SEQ ID NO: 30之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性，及V_L，其與SEQ ID NO: 29之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中抗體包含V_L與SEQ ID

NO: 40、41、42、43、44、45或46之胺基酸序列中任一者具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含V_H，其與SEQ ID NO: 25之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性；及V_L，其與SEQ ID NO: 40、41、42、43、44、45或46之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER2之抗原結合域，其中抗體包含V_H與SEQ ID NO: 25之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER2之抗原結合域，其中抗體包含V_L與SEQ ID NO: 36之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER2之抗原結合域，其中該抗體包含V_H，其與SEQ ID NO: 25之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性；及V_L，其與SEQ ID NO: 36之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER2之抗原結合域，其中抗體包含V_L與SEQ ID NO: 37之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER2之抗原結合域，其中該抗體包含V_H域，其與SEQ ID NO: 25之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性；及具有SEQ ID NO: 37之胺基酸序列的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER2之抗原結合域，其中該抗體包含具有SEQ ID NO: 38之胺基酸序列的V_L。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER2之抗原結合域，其中該抗體包含V_H，其與SEQ ID NO: 25之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性；及V_L，其與SEQ ID NO: 38之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。

在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER4之抗原結合域，其中抗體包含V_H與SEQ ID NO: 25之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於

EGFR及HER4之抗原結合域，其中抗體包含V_L與SEQ ID NO: 39之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，多特異性抗體包含特異性結合於EGFR及HER4之抗原結合域，其中該抗體包含V_H，其與SEQ ID NO: 25之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性；及V_L，其與SEQ ID NO: 39之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。

在一個實施例中，本發明提供包含特異性結合於EGFR之抗原結合域的單特異性抗體，其中抗體包含V_H與SEQ ID NO: 25之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於EGFR之抗原結合域，其中抗體包含V_L與SEQ ID NO: 24之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於EGFR之抗原結合域，其中該抗體包含V_H，其與SEQ ID NO: 25之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性；及V_L，其與SEQ ID NO: 24之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

98%或99%序列一致性。

在一個實施例中，本發明提供包含特異性結合於HER3之抗原結合域的單特異性抗體，其中抗體包含V_H與SEQ ID NO: 32之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中抗體包含V_L與SEQ ID NO: 31之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含V_H，其與SEQ ID NO: 32之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性；及V_L，其與SEQ ID NO: 31之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。

在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中抗體包含V_H與SEQ ID NO: 33之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中抗體包含V_L與SEQ ID NO: 29之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個

實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含V_H，其與SEQ ID NO: 33之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性；及V_L，其與SEQ ID NO: 29之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中抗體包含V_H與SEQ ID NO: 34之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含V_H，其與SEQ ID NO: 34之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性；及V_L，其與SEQ ID NO: 29之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中抗體包含V_H與SEQ ID NO: 35之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在一個實施例中，單特異性抗體包含特異性結合於HER3之抗原結合域，其中該抗體包含V_H，其與SEQ ID NO: 35之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、

97%、98%或99%序列一致性；及V_L，其與SEQ ID NO: 29之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。

展示若干抗HER抗體之重鏈及輕鏈之Kabat編號的例示性比對展示於圖33中。

適用於鑑別抗體之某些殘基或區域為較佳突變誘發位置的方法稱作「丙胺酸掃描突變誘發」，如Cunningham及Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所述。此處，鑑別一個殘基或一組標靶殘基(例如帶電殘基，諸如arg、asp、his、lys及glu)且用中性或帶負電荷之胺基酸(例如丙胺酸或聚丙胺酸)置換以影響胺基酸與抗原之相互作用。接著藉由在取代位點或針對取代位點引入另外或其他變異來改進彼等顯示對取代具有功能敏感性之胺基酸位置。因此，儘管供引入胺基酸序列變異之位點係預先確定，但突變本身之性質無需預先確定。舉例而言，為分析既定位點處之突變效能，在標靶密碼子或區域上進行ala掃描或隨機突變誘發，且針對所需活性篩檢所表現之免疫球蛋白。

胺基酸序列插入包括長度介於一個殘基至含有一百個或一百個以上殘基之多肽之範圍內的胺基端及/或羧基端融合物，以及單個或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有N端甲硫胺醯基殘基之抗體。抗體分子之其他插入變異體包括抗體之N端或C端與延長抗體血清半衰期之酶(例如對於ADEPT)或多肽的融合物。

糖基化變異體

在某些實施例中，改變本發明之抗體以提高或降低抗體糖基化程度。多肽之糖基化通常為N連接或O連接。N連接係指碳水化合物部分與天冬醯胺殘基之側鏈連接。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-蘇胺酸(其中X為除脯胺酸外之任何胺基酸)為碳水化合物部分與天冬醯胺側鏈酶促連接之識別序列。因此，多肽中存在任一此等三肽序列均會產生潛在糖基化位點。O連接糖基化係指使糖N-乙醯半乳胺糖、半乳糖或木糖之一連接至羥基胺基酸，最通常為絲胺酸或蘇胺酸，但亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸。

在抗體中添加或缺失糖基化位點宜如下完成：改變胺基酸序列以便產生或移除一或多個上述三肽序列(對於N連接糖基化位點)。亦可藉由在原始抗體之序列中添加、缺失或取代一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基來改變(對於O連接糖基化位點)。

當抗體包含Fc區時，可改變連接於其之碳水化合物。哺乳動物細胞產生之天然抗體通常包含分支鏈雙觸寡醣，其一般藉由N-鍵與Fc區之CH2域之Asn297連接。參看例如Wright等人，(1997) *TIBTECH* 15:26-32。寡醣可包括各種碳水化合物，例如甘露糖、N-乙醯基葡糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸，以及海藻糖連接於GlcNAc(於雙觸寡醣結構之「莖」中)。在一些實施例中，可修飾本發明抗體中之寡醣以產生具有某些改良特性之抗體變異體。

在一個實施例中，提供具有碳水化合物結構之抗體變異

體，其中海藻糖不與Fc區(直接或間接)連接。舉例而言，此抗體中海藻糖之含量可為1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。相對於與Asn297連接之所有糖結構(glycostructure)(例如複合物、融合物及高甘露糖結構)之總和(如藉由MALDI-TOF質譜分析來量測)，藉由計算Asn297處糖鏈內海藻糖平均含量來測定海藻糖之含量，例如WO 2008/077546中所述。Asn297係指Fc區中位於約位置297(Fc區殘基之Eu編號)之天冬醯胺殘基；然而，由於抗體中之微小序列變化，因此Asn297亦可位於位置297之上游或下游約±3個胺基酸處，亦即位置294與300之間。此等海藻糖基化變異體可具有改良之ADCC功能。參看例如美國專利公開案第US 2003/0157108號(Presta, L.)；第US 2004/0093621號(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。關於「去海藻糖基化」或「海藻糖不足」抗體變異體之公開案的實例包括：US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO 2005/053742；WO 2002/031140；Okazaki等人，*J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki等人，*Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)。能夠產生去海藻糖基化抗體之細胞株的實例包括蛋白質海藻糖基化不足之Lec13 CHO細胞(Ripka等人，*Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-

545 (1986)；美國專利申請案第US 2003/0157108 A1號，Presta, L；及WO 2004/056312 A1, Adams等人，尤其實例11)，及基因剔除細胞株，諸如α-1,6-海藻糖基轉移酶基因*FUT8*剔除之CHO細胞(參看例如Yamane-Ohnuki等人，*Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)；Kanda, Y.等人，*Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006)；及WO 2003/085107)。

進一步提供具有對分寡醣的抗體變異體，例如其中與抗體之Fc區連接的雙觸寡醣經GlcNAc對分。此等抗體變異體可具有降低之海藻糖基化及/或改良之ADCC功能。此等抗體變異體之實例描述於例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等人)；美國專利第6,602,684號(Umana等人)；及第US 2005/0123546號(Umana等人)中。亦提供在與Fc區連接的寡醣中具有至少一個半乳糖殘基的抗體變異體。此等抗體變異體可具有改良之CDC功能。此等抗體變異體描述於例如WO 1997/30087(Patel等人)；WO 1998/58964(Raju, S.)；及WO 1999/22764(Raju, S.)中。

Fc區變異體

在某些實施例中，可將一或多種胺基酸修飾引入本文所提供之抗體的Fc區中，藉此產生Fc區變異體。Fc區變異體可包含在一或多個胺基酸位置含有胺基酸修飾(例如取代)之人類Fc區序列(例如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)。

在某些實施例中，本發明涵蓋一種具有一些而非所有效應功能之抗體變異體，從而使得其成為應用之理想候選藥

劑，在該等應用中抗體之活體內半衰期為重要的，而某些效應功能(諸如互補性及ADCC)為不必要或有害的。可進行活體外及/或活體內細胞毒性檢定以驗證CDC及/或ADCC活性之降低/耗乏。舉例而言，可進行Fc受體(FcR)結合檢定以確保抗體無FcγR結合能力(因此可能無ADCC活性)，但保留FcRn結合能力。介導ADCC之初級細胞NK細胞僅表現FcγRIII，而單核細胞表現FcγRI、FcγRII及FcγRIII。造血細胞上之FcR表現概述於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)之第464頁的表3中。評估相關分子之ADCC活性的活體外檢定之非限制性實例描述於美國專利第5,500,362號(參看例如Hellstrom, I.等人，*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986))及Hellstrom, I等人，*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985)；5,821,337(參看Bruggemann, M.等人，*J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987))。或者，可採用非放射性檢定法(參看例如針對流式細胞量測術之ACTI™非放射性細胞毒性檢定(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA)；及CytoTox 96®非放射性細胞毒性檢定(Promega, Madison, WI)。適用於此等檢定之效應細胞包括末梢血液單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。或者，或另外，可評估活體內分子之ADCC活性，例如在動物模型(諸如Clynes等人，*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998)中所揭示之動物模型)中。亦可進行C1q結合檢定以驗證抗體不能結合C1q且因此無CDC活性。參看例如WO 2006/029879及WO

2005/100402中之C1q及C3c結合ELISA。為評估補體活化，可進行CDC檢定(參看例如Gazzano-Santoro等人，*J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)；Cragg, M.S.等人，*Blood* 101:1045-1052 (2003)；及Cragg, M.S.及M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004))。亦可使用此項技術中已知之方法進行FcRn結合及活體內清除率/半衰期測定(參看例如Petkova, S.B.等人，*Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006))。

效應功能降低之抗體包括Fc區殘基238、265、269、270、297、327及329中之一或多者經取代之抗體(美國專利第6,737,056號)。此等Fc突變體包括胺基酸位置265、269、270、297及327中之兩者或兩者以上具有取代之Fc突變體，包括殘基265及297取代為丙胺酸之所謂「DANA」Fc突變體(美國專利第7,332,581號)。

對FcR之結合增強或減弱的某些抗體變異體已描述。(參看例如美國專利第6,737,056號；WO 2004/056312，及Shields等人，*J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001))。

在某些實施例中，抗體變異體包含Fc區具有一或多個改良ADCC之胺基酸取代，例如Fc區之位置298、333及/或334(殘基之EU編號)之取代。

在一些實施例中，改變Fc區可引起C1q結合及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)改變(亦即增強或減弱)，例如美國專利第6,194,551號、WO 99/51642及Idusogie等人，*J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)中所述。

US 2005/0014934A1(Hinton等人)中描述半衰期延長且對新生兒Fc受體(FcRn)之結合增強的抗體，該新生兒Fc受體負責將母體IgG轉移至胎兒(Guyer等人，*J. Immunol.* 117:587 (1976)及Kim等人，*J. Immunol.* 24:249 (1994))。彼等抗體包含其中具有一或多個使Fc區與FcRn結合增強之取代的Fc區。此等Fc變異體包括在一或多個以下Fc區殘基處具有取代的Fc變異體：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434，例如在Fc區殘基434具有取代之Fc變異體(美國專利第7,371,826號)。

關於Fc區變異體之其他實例，亦參看Duncan及Winter, *Nature* 322:738-40 (1988)；美國專利第5,648,260號；美國專利第5,624,821號；及WO 94/29351。

半胱胺酸工程改造之抗體變異體

在某些實施例中，可能需要產生半胱胺酸工程改造之抗體，例如「thioMAb」，其中抗體之一或多個殘基經半胱胺酸殘基取代。在特定實施例中，所取代之殘基出現於抗體之可達位點。藉由半胱胺酸取代彼等殘基可使反應性硫醇基藉此定位於抗體之可達位點且可用以使抗體與其他部分(諸如藥物部分或連接子-藥物部分)結合以產生免疫結合物，如本文中進一步描述。在某些實施例中，任一或多個以下殘基可經半胱胺酸取代：輕鏈之V205(Kabat編號)；重鏈之A118(EU編號)；及重鏈Fc區之S400(EU編號)。半胱胺酸工程改造抗體可如例如美國專利第7,521,541號中所述

來產生。

抗體衍生物

在某些實施例中，本文提供之抗體可進一步加以修飾以含有此項技術中已知且易得之額外非蛋白質部分。適於抗體衍生化之部分包括(但不限於)水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、聚葡萄糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啶酮、聚-1,3-二氧戊環、聚-1,3,6-三氧雜環己烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)及聚葡萄糖或聚(N-乙烯吡咯啶酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛因其於水中之穩定性而可具有製造優勢。聚合物可具有任何分子量且可為分枝或不分枝聚合物。與抗體連接之聚合物之數目可變化，且若連接一個以上聚合物，則其可為相同或不同分子。一般而言，用於衍生化之聚合物之數目及/或類型可基於以下來判定：包括(但不限於)欲改良之抗體的特定性質或功能、抗體衍生物是否在限定條件下用於治療等。

在另一實施例中，提供抗體與可藉由曝露於輻射來選擇性加熱之非蛋白質部分的結合物。在一個實施例中，非蛋白質部分為碳奈米管(Kam等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005))。該輻射可具有任何波長，且包括(但不限於)不傷害一般細胞但可將非蛋白質部分加

熱至可殺死抗體-非蛋白質部分近側之細胞之溫度的波長。參看例如Petkova, S.B.等人，*Int'l. Immunol.* 18(12): 1759-1769 (2006)。

提供具有一或多個胺基酸取代之其他抗體變異體。供取代性突變誘發之相關位點包括高變區，但亦涵蓋FR變化。保守性取代展示於表1中標題「較佳取代」下。更多名為「例示性取代」之實質變化提供於表4中或如下文參考胺基酸種類進一步描述。可將胺基酸取代引入相關抗體及所篩檢產物中，例如針對所需活性(諸如增強之抗原結合、降低之免疫原性、增強之ADCC或CDC等)篩檢之產物。

表1

原始殘基	例示性取代	較佳取代
Ala(A)	Val；Leu；Ile	Val
Arg(R)	Lys；Gln；Asn	Lys
Asn(N)	Gln；His；Asp，Lys；Arg	Gln
Asp(D)	Glu；Asn	Glu
Cys(C)	Ser；Ala	Ser
Gln(Q)	Asn；Glu	Asn
Glu(E)	Asp；Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn；Gln；Lys；Arg	Arg
Ile(I)	Leu；Val；Met；Ala； Phe；正白胺酸	Leu
Leu(L)	正白胺酸；Ile；Val； Met；Ala；Phe	Ile

Lys(K)	Arg；Gln；Asn	Arg
Met(M)	Leu；Phe；Ile	Leu
Phe(F)	Trp；Leu；Val；Ile；Ala；Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val；Ser	Ser
Trp(W)	Tyr；Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp；Phe；Thr；Ser	Phe
Val(V)	Ile；Leu；Met；Phe；Ala；正白胺酸	Leu

可藉由選擇以下取代來修改抗體之生物特性：(a)影響取代區域中多肽主鏈之結構的取代，例如呈摺疊或螺旋構形，(b)影響靶點處分子之電荷或疏水性的取代，或(c)影響側鏈大小的取代。胺基酸可根據其側鏈特性之相似性分類(A. L. Lehninger, Biochemistry，第二版，第73-75頁，Worth Publishers, New York (1975))：

(1)非極性：Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M)

(2)不帶電極性：Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q)

(3)酸性：Asp(D)、Glu(E)

(4)鹼性：Lys(K)、Arg(R)、His(H)。

或者，天然存在之殘基可基於共同側鏈特性來分類：

(1)疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

(2)中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(3)酸性：Asp、Glu；

(4)鹼性：His、Lys、Arg；

(5)影響鏈取向之殘基：Gly、Pro；

(6)芳族：Trp、Tyr、Phe。

非保守性取代要求將此等種類之一的成員交換為另一種類。亦可將此等經取代之殘基引入保守性取代位點或其餘(非保守性)位點。

一種類型之取代變異體涉及取代親本抗體(例如人類化抗體或人類抗體)之一或多個高變區殘基。一般而言，選用於進一步開發之所得變異體相對於產生其之親本抗體將具有經修改(例如經改良)之生物特性。例示性取代變異體為親和力成熟抗體，其宜使用基於噬菌體呈現之親和力成熟技術來產生。簡言之，使若干高變區位點(例如6-7個位點)突變以在各位點產生所有可能之胺基酸取代。使由此產生之抗體以與封裝於各粒子內之噬菌體鞘蛋白(例如M13之基因III產物)之至少一部分之融合物的形式自絲狀噬菌體粒子呈現。接著針對生物活性(例如結合親和力)來篩檢噬菌體呈現之變異體。為鑑別供修飾之候選高變區位點，可進行掃描突變誘發(例如丙胺酸掃描)以鑑別顯著有助於抗原結合之高變區殘基。或者或另外，分析抗原-抗體複合物之晶體結構以鑑別抗體與抗原之間的接觸點可為有益的。根據此項技術已知之技術，包括本文詳述之技術，此等接觸殘基及鄰近殘基為取代候選殘基。產生此等變異體

後，使用此項技術中已知之技術(包括本文中所述之技術)對該組變異體進行篩檢，且可在一或多個相關檢定中選擇具有優良特性之變異體以便進一步開發。

編碼抗體之胺基酸序列變異體的核酸分子係藉由此項技術中已知之各種方法製備。此等方法包括(但不限於)自天然來源分離(在天然存在之胺基酸序列變異體之情況下)，或藉由對早先製備之變異體或非變異體型抗體進行寡核苷酸介導(或定點)突變誘發、PCR突變誘發及匣式突變誘發來製備。

免疫結合物

本發明亦提供免疫結合物(可互換地稱作「抗體-藥物結合物」或「ADC」)，其包含抗體結合一或多種細胞毒性劑，諸如化學治療劑、藥物、生長抑制劑、毒素(例如蛋白質毒素，細菌、真菌、植物或動物來源之酶促活性毒素，或其片段)或放射性同位素，諸如At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}，及Lu之放射性同位素(亦即放射性結合物)。

在癌症治療中，免疫結合物已用於局部傳遞細胞毒性劑，亦即殺死細胞或抑制細胞生長或增殖之藥物(Lambert, J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543-549；Wu等人，(2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146；Payne, G. (2003) i 3:207-212；Syrigos及Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614；Niculescu-Duvaz及Springer (1997) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26:151-172；美國專

利第4,975,278號)。免疫結合物允許將藥物部分靶向傳遞至腫瘤且於其中進行細胞內累積，其中全身性投與非結合藥物會對正常細胞以及設法欲加以清除之腫瘤細胞產生不可接受之毒性程度(Baldwin等人，*Lancet* (1986年3月15日)第603-05頁；Thorpe (1985)「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,」*Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (A. Pinchera等人編)第475-506頁。已報導多株抗體與單株抗體均適用於此等策略(Rowland等人，(1986) *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-87)。此等方法中所用之藥物包括道諾黴素、小紅莓、甲胺喋呤及長春地辛(Rowland等人，(1986) 同上文)。抗體-毒素結合物中所用之毒素包括細菌毒素，諸如白喉毒素(diphtheria toxin)；植物毒素，諸如蓖麻毒素(ricin)；小分子毒素，諸如格爾德黴素(geldanamycin)(Mandler等人，(2000) *J. Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581；Mandler等人，(2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028；Mandler等人，(2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)；美登素類(maytansinoid)(EP 1391213；Liu等人，(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623)，及刺孢黴素(Lode等人，(1998) *Cancer Res.* 58:2928；Hinman等人，(1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342)。毒素可藉由以下機制發揮其細胞毒性作用：包括微管蛋白結合、DNA結合或拓撲異構酶抑制。一些細胞毒性藥物當與大抗體或蛋白質受體配位體結合時

傾向於無活性或活性較小。

曲妥珠單抗-DM1(或T-DM1)在對曲妥珠單抗敏感及曲妥珠單抗不敏感之過度表現HER2之癌症模型中已顯示為有效的(US 7097840)。ZEVALIN®(替坦異貝莫單抗(ibritumomab tiuxetan)，Biogen/Idec)為由以下構成之抗體-放射性同位素結合物：針對正常及惡性B淋巴細胞表面上所見之CD20抗原的鼠類IgG1κ單株抗體與111In或90Y放射性同位素，其由硫脲連接子螯合劑結合(Wiseman等人，(2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77；Wiseman等人，(2002) *Blood* 99(12):4336-42；Witzig等人，(2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63；Witzig等人，(2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69)。儘管ZEVALIN具有針對B細胞非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's Lymphoma/NHL)之活性，但投藥在大部分患者中導致嚴重及長久之血細胞減少症。MYLOTARG™(吉妥珠單抗奧唑米星(gemtuzumab ozogamicin)，Wyeth Pharmaceuticals)，一種由huCD33抗體連接刺孢黴素構成之抗體-藥物結合物，在2000年獲准用於注射治療急性骨髓白血病(*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686；美國專利第4970198號；第5079233號；第5585089號；第5606040號；第5693762號；第5739116號；第5767285號；第5773001號)。康圖單抗美坦辛(Cantuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.)，一種由huC242抗體經由二硫化物連接子SPP連接美登素類藥物部分DM1構成之抗體-藥物結合物，正進入針對表現CanAg之

癌症(諸如結腸癌、胰臟癌、胃癌及其他癌症)治療之II期試驗中。MLN-2704(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)，一種由抗前列腺特異性膜抗原(PSMA)單株抗體連接美登素類藥物部分DM1構成之抗體-藥物結合物，正處在針對前列腺腫瘤之潛在治療的開發中。奧利斯坦汀(auristatin)肽、奧利斯坦汀E(AE)及單甲基奧利斯坦汀(monomethylauristatin/MMAE)(海兔毒素之合成類似物)係與嵌合單株抗體cBR96(對癌上之Lewis Y具有特異性)及cAC10(對血液惡性疾病上之CD30具有特異性)結合(Doronina等人，(2003) *Nature Biotechnol.* 21(7):778-784)且正處在治療性開發中。

在某些實施例中，免疫結合物包含抗體及化學治療劑或其他毒素。本文中(例如上文)已描述適用於產生免疫結合物之化學治療劑。可用之酶促活性毒素及其片段包括白喉毒素A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿假單胞菌(Pseudomonas aeruginosa))、篦麻毒素A鏈、相思豆毒素A鏈、莫迪素(modeccin)A鏈、α-帚麴菌素(alpha-sarcin)、油桐蛋白(Aleurites fordii protein)、康乃馨蛋白(dianthin protein)、美洲商陸蛋白(Phytolaca americana protein)(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(momordica charantia)抑制劑、麻瘋樹毒蛋白(curcin)、巴豆毒素(crotin)、石鹼草(sapaonaria officinalis)抑制劑、白樹素(gelonin)、有絲分裂素(mitogellin)、侷限麴菌素(restrictocin)、酚黴素(phenomycin)、伊諾黴素(enomycin)

及黴菌毒素(tricothecene)。參看例如1993年10月28日公開之WO 93/21232。各種放射性核種可用於製造放射性結合抗體。實例包括^{212}Bi、^{131}I、^{131}In、^{90}Y及^{186}Re。抗體與細胞毒性劑之結合物係使用各種雙功能蛋白質偶合劑製得，諸如3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙功能衍生物(諸如己二亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮鹽衍生物(諸如雙(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人，Science, 238: 1098 (1987)中所述來製備。碳14標記之1-異硫氰基苯甲基-3-甲基二伸乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)為一種使放射性核苷酸與抗體結合之例示性螯合劑。參看WO 94/11026。

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

美登素及美登素類

在一些實施例中，免疫結合物包含抗體(全長或片段)與一或多個美登素類分子之結合。

美登素類為藉由抑制微管蛋白聚合來起作用之有絲分裂抑制劑。美登素首先自東非灌木齒葉美登木(Maytenus

serrata)分離(美國專利第3,896,111號)。隨後，發現某些微生物亦產生美登素類，諸如美登醇(maytansinol)及C-3美登醇酯(美國專利第4,151,042號)。合成美登醇及其衍生物及類似物揭示於例如以下文獻中：美國專利第4,137,230號；第4,248,870號；第4,256,746號；第4,260,608號；第4,265,814號；第4,294,757號；第4,307,016號；第4,308,268號；第4,308,269號；第4,309,428號；第4,313,946號；第4,315,929號；第4,317,821號；第4,322,348號；第4,331,598號；第4,361,650號；第4,364,866號；第4,424,219號；第4,450,254號；第4,362,663號；及第4,371,533號。

美登素類藥物部分在抗體藥物結合物中為誘人之藥物部分，因為其：(i)藉由醱酵或醱酵產物之化學修飾、衍生化可相對容易製備；(ii)易用適於經由非二硫化物連接子結合抗體之官能基衍生化；(iii)在血漿中穩定；及(iv)有效抵抗各種腫瘤細胞株。.

含有美登素類之免疫結合物、其製造方法及其治療用途揭示於例如美國專利第5,208,020號、第5,416,064號及歐洲專利EP 0 425 235 B1中，其揭示內容係以引用的方式明確併入本文中。Liu等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)描述的免疫結合物包含美登素類(命名為DM1)連接至針對人類結腸直腸癌之單株抗體C242。發現該結合物對所培養之結腸癌細胞具有高細胞毒性且在活體內腫瘤生長檢定中顯示抗腫瘤活性。Chari等人，Cancer

Research 52:127-131 (1992)描述免疫結合物，其中美登素類經由二硫化物連接子與結合人類結腸癌細胞株上之抗原的鼠類抗體A7結合，或與結合HER-2/neu致癌基因之另一鼠類單株抗體TA.1結合。已活體外測試TA.1-美登素類結合物對人類乳癌細胞株SK-BR-3的細胞毒性，人類乳癌細胞株SK-BR-3可每個細胞表現3×10^5個HER-2表面抗原。該藥物結合物達成的細胞毒性度與游離美登素類藥物類似，該結合物之細胞毒性度可藉由增大每個抗體分子之美登素類分子數目來提高。A7-美登素類結合物在小鼠體內顯示低的全身性細胞毒性。

可藉由在不顯著減弱抗體或美登素類分子之生物活性的情況下將抗體與美登素類分子化學連接來製備抗體-美登素類結合物。參看例如美國專利第5,208,020號(其揭示內容係以引用的方式明確併入本文中)。每個抗體分子結合平均3-4個美登素類分子已顯示增強標靶細胞之細胞毒性的功效而對抗體功能或溶解性無不利影響，但預計即使一個分子的毒素/抗體亦可增強細胞毒性超過使用裸抗體。美登素類在此項技術中為熟知的且可藉由已知技術合成或自天然來源分離。適合之美登素類揭示於例如美國專利第5,208,020號及上文提及之其他專利及非專利公開案中。較佳美登素類為美登醇及在美登醇分子之芳環中或其他位置處經修飾之美登醇類似物，諸如各種美登醇酯。

此項技術中已知多種用於製造抗體-美登素類結合物之連接基團，包括例如以下文獻中所揭示者：美國專利第

5,208,020號或歐洲專利0 425 235 B1；Chari等人，Cancer Research 52:127-131 (1992)，及2004年10月8日申請之美國專利申請案第10/960,602號，其揭示內容係以引用的方式明確併入本文中。包含連接子組分SMCC之抗體-美登素類結合物可如2004年10月8日申請之美國專利申請案第10/960,602中所揭示來製備。連接基團包括如上文鑑別之專利中所揭示之二硫基、硫醚基、酸不穩定性基團、光不穩定性基團、肽酶不穩定性基團或酯酶不穩定性基團，二硫基及硫醚基為較佳。本文中描述及例舉其他連接基團。

抗體與美登素類之結合物可使用各種雙功能蛋白質偶合劑製得，諸如3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸丁二醯亞胺(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙功能衍生物(諸如己二亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。尤其較佳之偶合劑包括提供二硫鍵之3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)(Carlsson等人，Biochem. J. 173:723-737 (1978))及4-(2-吡啶基硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(SPP)。

視連接類型而定，連接子與美登素類分子可在各種位置連接。舉例而言，可使用習知偶合技術、藉由與羥基反應

來形成酯鍵。反應可發生於具有羥基之C-3位置、經羥甲基修飾之C-14位置、經羥基修飾之C-15位置及具有羥基之C-20位置。在一個較佳實施例中，在美登醇或美登醇類似物之C-3位置形成鍵。

奧利斯坦汀及海兔毒素

在一些實施例中，免疫結合物包含抗體與海兔毒素或海兔毒素肽類似物及衍生物奧利斯坦汀之結合(美國專利第5635483號；第5780588號)。海兔毒素及奧利斯坦汀已顯示可干擾微管動力學、GTP水解，及核及細胞分裂(Woyke等人，(2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584)且具有抗癌(US 5663149)及抗真菌活性(Pettit等人，(1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)。海兔毒素或奧利斯坦汀藥物部分可經由肽藥物部分之N(胺基)端或C(羧基)端與抗體連接(WO 02/088172)。

例示性奧利斯坦汀實施例包括「Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands」，US Ser. No. 10/983,340(2004年11月5日申請，其揭示內容係以全文引用的方式明確併入本文中)中所揭示之N端連接之單甲基奧利斯坦汀藥物部分DE及DF。

基於肽之藥物部分通常可藉由在兩個或兩個以上胺基酸及/或肽片段之間形成肽鍵來製備。此等肽鍵例如可根據肽化學領域中熟知之液相合成法(參看Schröder及K. Lübke,「The Peptides」，第1卷，第76-136頁，1965, Academic Press)製備。奧利斯坦汀/海兔毒素藥物部分可根據以下文

獻之方法來製備：US 5635483；US 5780588；Pettit等人，(1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465；Pettit等人，(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277；Pettit, G.R.等人，Synthesis, 1996, 719-725；及Pettit等人，(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863。亦參看Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784；「Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands」, US Ser. No. 10/983,340，2004年11月5日申請，其以全文引用的方式併入本文中(揭示例如連接子及製備單甲基纈胺酸化合物(諸如MMAE及MMAF)與連接子之結合物的方法)。

刺孢黴素

在其他實施例中，免疫結合物包含抗體與一或多個刺孢黴素分子之結合。抗生素之刺胞黴素家族能夠在亞皮莫耳濃度下產生雙股DNA斷裂。關於刺胞黴素家族結合物之製備，參看美國專利第5,712,374號、第5,714,586號、第5,739,116號、第5,767,285號、第5,770,701號、第5,770,710號、第5,773,001號及第5,877,296號(均頒予American Cyanamid Company)。可用之刺孢黴素之結構類似物包括(但不限於)γ1I、α2I、α3I、N-乙醯基-γ1I、PSAG及θI1(Hinman等人，Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode等人，Cancer Research 58:2925-2928 (1998)及上述頒予American Cyanamid之美國專利)。抗體可結合之另一抗腫瘤藥物為QFA，其為抗葉酸劑。刺胞黴素與QFA均具有

細胞內作用位點且不易跨越質膜。因此，細胞經由抗體介導之內化作用吸收此等藥劑可極大地增強其細胞毒性作用。

其他細胞毒性劑

可與抗體結合之其他抗腫瘤劑包括BCNU、鏈脲佐菌素(streptozoicin)、長春新鹼及5-氟尿嘧啶；美國專利5,053,394、5,770,710中所述之統稱為LL-E33288複合物之一類藥劑，以及埃斯培拉黴素(esperamicin)(美國專利5,877,296)。

可用之酶促活性毒素及其片段包括白喉毒素A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿假單胞菌)、篦麻毒素A鏈、相思豆毒素A鏈、莫迪素A鏈、α-帚麴菌素、油桐蛋白、康乃馨蛋白、美洲商陸蛋白(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜抑制劑、麻瘋樹毒蛋白、巴豆毒蛋白、石鹼草抑制劑、白樹素、有絲分裂素、侷限麴菌素、酚黴素、伊諾黴素及黴菌毒素。參看例如1993年10月28日公開之WO 93/21232。

本發明進一步涵蓋抗體與具有核分解活性之化合物(例如核糖核酸酶或DNA核酸內切酶，諸如去氧核糖核酸酶DNase)之間形成之免疫結合物。

為選擇性破壞腫瘤，抗體可包含高度放射性原子。各種放射性同位素可用於產生放射性結合抗體。實例包括At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}及Lu之放射性同位素。當結合物用於偵測時，其可包

含供閃爍攝影研究之放射性原子，例如tc99m或I123；或供核磁共振(NMR)成像(亦稱為磁共振成像，mri)之自旋標記，諸如碘-123及碘-131、銦-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、釓、錳或鐵。

放射性標記或其他標記可以已知方式併入結合物中。舉例而言，肽可生物合成，或可藉由化學胺基酸合成法、使用包括例如氟-19而非氫的適合胺基酸前驅體來合成。諸如$tc^{99}m$或I^{123}、Re^{186}、Re^{188}及In^{111}之標記可經由肽中之半胱胺酸殘基來連接。釔-90可經由離胺酸殘基來連接。IODOGEN方法(Fraker等人，(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57)可用以合併碘-123。「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)詳細描述其他方法。

抗體與細胞毒性劑之結合物可使用各種雙功能蛋白質偶合劑製得，諸如3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸丁二醯亞胺(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙功能衍生物(諸如己二亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人，Science 238:1098 (1987)中所述來製備。碳14標記之1-異硫

氯基苯甲基-3-甲基二伸乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)為一種使放射性核苷酸與抗體結合之例示性螯合劑。參看WO 94/11026。連接子可為有助於細胞毒性藥物在細胞中釋放之「可裂解連接子」。舉例而言，可使用酸不穩定性連接子、肽酶敏感性連接子、光不穩定性連接子、二甲基連接子或含二硫化物之連接子(Chari等人，Cancer Research 52:127-131 (1992)；美國專利第5,208,020號)。

化合物明確涵蓋(但不限於)用以下交聯試劑製備之ADC：BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、sulfo-EMCS、sulfo-GMBS、sulfo-KMUS、sulfo-MBS、sulfo-SIAB、sulfo-SMCC及sulfo-SMPB及SVSB ((4-乙烯基碸)苯甲酸丁二醯亞胺酯)，其可市購(例如購自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。參看第467-498頁，2003-2004 Applications Handbook and Catalog。

製備抗體藥物結合物

在抗體藥物結合物(ADC)中，抗體(Ab)經由連接子(L)與一或多個藥物部分(D)結合，例如每個抗體結合約1至約20個藥物部分。式I之ADC可藉由若干途徑，採用熟習此項技術者已知之有機化學反應、條件及試劑來製備，包括：(1)使抗體之親核基團與二價連接試劑反應以經由共價鍵形成Ab-L，接著與藥物部分D反應；及(2)使藥物部分之親核基團與二價連接試劑反應以經由共價鍵形成D-L，接著與

抗體之親核基團反應。本文描述製備ADC之其他方法。

$$Ab-(L-D)_p \qquad I$$

連接子可由一或多種連接組分構成。例示性連接組分包括6-順丁烯二醯亞胺基己醯基(「MC」)、順丁烯二醯亞胺基丙醯基(「MP」)、纈胺酸-瓜胺酸(「val-cit」)、丙胺酸-苯丙胺酸(「ala-phe」)、對胺基苯甲氧基羰基(「PAB」)、4-(2-吡啶基硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(「SPP」)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸N-丁二醯亞胺酯(「SMCC」)及(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(「SIAB」)。其他連接組分在此項技術中為已知的且一些描述於本文中。亦參看「Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands」, US Ser. No. 10/983,340，2004年11月5日申請，其內容係以全文引用的方式併入本文中。

在一些實施例中，連接子可包含胺基酸殘基。例示性胺基酸連接組分包括二肽、三肽、四肽或五肽。例示性二肽包括：纈胺酸-瓜胺酸(vc或val-cit)、丙胺酸-苯丙胺酸(af或ala-phe)。例示性三肽包括：甘胺酸-纈胺酸-瓜胺酸(gly-val-cit)及甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸(gly-gly-gly)。構成胺基酸連接組分之胺基酸殘基包括彼等天然存在之胺基酸以及次要胺基酸及非天然存在之胺基酸類似物，諸如瓜胺酸。胺基酸連接組分可在其對特定酶(例如腫瘤相關蛋白酶、組織蛋白酶B、C及D，或纖維蛋白溶酶蛋白酶(plasmin protease))之酶促裂解的選擇性方面加以設計及最

優化。

抗體上之親核基團包括但不限於：(i) N端胺基；(ii)側鏈胺基，例如離胺酸；(iii)側鏈硫醇基，例如半胱胺酸；及(iv)糖羥基或胺基，其中抗體係經糖基化。胺、硫醇及羥基具親核性且能夠與包括以下之連接部分及連接試劑上之親電子基團反應形成共價鍵：(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵甲酸酯及酸鹵化物；(ii)烷基及苯甲基鹵化物，諸如鹵乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及順丁烯二醯亞胺基團。某些抗體具有可還原之鏈間二硫鍵，亦即半胱胺酸橋。抗體可藉由諸如DTT(二硫蘇糖醇)之還原劑處理而產生與連接試劑結合之反應性。因此，理論上每個半胱胺酸橋將形成兩個反應性硫醇親核體。其他親核基團可經由離胺酸與2-亞胺基硫雜環戊烷(特勞特試劑(Traut's reagent))反應使胺轉化為硫醇而引入抗體中。反應性硫醇基可藉由引入一、二、三、四或四個以上半胱胺酸殘基(例如製備包含一或多個非天然半胱胺酸胺基酸殘基之突變型抗體)來引入抗體(或其片段)中。

亦可藉由修飾抗體以引入可與連接試劑或藥物上之親核取代基反應之親電子部分來製得抗體藥物結合物。糖基化抗體之糖可氧化，例如以過碘酸鹽氧化試劑氧化，以形成可與連接試劑或藥物部分之胺基反應的醛或酮基。所得亞胺席夫鹼(Schiff base)基團可形成穩定鍵，或可還原，例如藉由硼氫化物試劑還原，以形成穩定胺鍵。在一個實施例中，糖基化抗體之碳水化合物部分與半乳糖氧化酶或偏

過碘酸鈉之反應可在蛋白質中產生可與藥物上之適當基團反應的羰基(醛及酮基團)(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一實施例中，含有N端絲胺酸或蘇胺酸殘基之蛋白質可與偏過碘酸鈉反應，從而產生醛而非第一胺基酸(Geoghegan及Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146；US 5362852)。此醛可與藥物部分或連接親核體反應。

同樣地，藥物部分上之親核基團包括(但不限於)：胺、硫醇、羥基、醯肼、肟、肼、硫半卡(thiosemicarbazone)、羧酸肼及芳基醯肼基團，其能夠與包括以下之連接部分及連接試劑上之親電子基團反應形成共價鍵：(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵甲酸酯及酸鹵化物；(ii)烷基及苯甲基鹵化物，諸如鹵乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及順丁烯二醯亞胺基團。

或者，可製造包含抗體及細胞毒性劑之融合蛋白，例如藉由重組技術或肽合成法來製造。DNA長度可包含彼此相鄰或由編碼連接子肽之區域分隔(不破壞結合物之所需特性)的編碼結合物之兩個部分的各別區域。

在又一實施例中，抗體可與用於預靶向腫瘤之「受體」(諸如抗生蛋白鏈菌素)結合，其中將該抗體-受體結合物投與患者，接著使用清除劑將未結合之結合物自循環中移除，且接著投與「配位體」(例如抗生物素蛋白)與細胞毒性劑(例如放射性核苷酸)之結合物。

重組方法及組合物

可使用例如美國專利第4,816,567號中所述之重組方法及組合物製得抗體。在一個實施例中，提供編碼本文所述之抗HER抗體的分離之核酸。此核酸可編碼包含抗體(例如抗體之輕鏈及/或重鏈)之V_L的胺基酸序列及/或包含抗體(例如抗體之輕鏈及/或重鏈)之V_H的胺基酸序列。在另一實施例中，提供一或多種包含此核酸之載體(例如表現載體)。在另一實施例中，提供包含此核酸之宿主細胞。在一個此實施例中，宿主細胞包含(例如已用以下轉型)：(1)包含核酸的載體，該核酸編碼包含抗體V_L之胺基酸序列及包含抗體V_H之胺基酸序列，或(2)包含編碼包含抗體V_L之胺基酸序列之核酸的第一載體，及包含編碼包含抗體V_H之胺基酸序列之核酸的第二載體。在一個實施例中，宿主細胞為真核細胞，例如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或淋巴樣細胞(例如Y0、NS0、Sp20細胞)。在一個實施例中，提供一種製造抗HER抗體之方法，其中該方法包含在適於表現抗體之條件下培養如上提供之包含編碼該抗體之核酸的宿主細胞，及視情況自宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收抗體。

重組產生抗HER抗體時，將編碼抗體之核酸(例如上述核酸)分離及插入一或多個載體中以便在宿主細胞中進一步選殖及/或表現。此核酸可輕易分離且使用習知程序(例如使用能夠特異性結合於編碼抗體重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)來定序。

適用於選殖或表現編碼抗體之載體的宿主細胞包括本文

所述之原核或真核細胞。舉例而言，抗體可在細菌中產生，尤其當不需要糖基化及Fc效應功能時。關於在細菌中表現抗體片段及多肽，參看例如美國專利第5,648,237號、第5,789,199號及第5,840,523號。(亦參看Charlton, Methods in Molecular Biology，第248卷(B.K.C. Lo編，Humana Press, Totowa, NJ, 2003)，第245-254頁，其描述在大腸桿菌中表現抗體片段)。表現之後，可自含有細菌細胞團之可溶性部分中分離抗體且可進一步純化。

除原核細胞之外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物亦為適用於編碼抗體之載體的選殖或表現宿主，包括糖基化路徑已「人類化」、從而產生具有部分或完全人類糖基化模式之抗體的真菌及酵母菌株。參看Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004)及Li等人，Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)。

適用於表現糖基化抗體的宿主細胞亦源自多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別可與昆蟲細胞聯合使用，尤其用於轉染草地夜蛾(Spodoptera frugiperda)細胞之多種桿狀病毒株。

亦可將植物細胞培養物用作宿主。參看例如美國專利第5,959,177號、第6,040,498號、第6,420,548號、第7,125,978號及第6,417,429號(描述用於在轉殖基因植物中產生抗體之PLANTIBODIESTM技術)。

亦可將脊椎動物細胞用作宿主。舉例而言，可使用經調

適可於懸浮液中生長之哺乳動物細胞株。適用之哺乳動物宿主細胞株之其他實例為經SV40轉型之猴腎CV1細胞株(COS-7)；人類胚腎細胞株(例如Graham等人，J. Gen Virol. 36:59 (1977)中所述之293或293細胞)；幼倉鼠腎細胞(BHK)；小鼠塞爾托利細胞(mouse sertoli cell)(例如Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)中所述之TM4細胞)；猴腎細胞(CV1)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76)；人類子宮頸癌細胞(HELA)；犬腎細胞(MDCK)；水牛鼠肝細胞(BRL 3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝細胞(Hep G2)；小鼠乳腺腫瘤(MMT 060562)；TRI細胞，例如Mather等人，Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)中所述之TRI細胞；MRC 5細胞；及FS4細胞。其他適用之哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括DHFR-CHO細胞(Urlaub等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；及骨髓瘤細胞株，諸如Y0、NS0及Sp20。欲回顧適於產生抗體之某些哺乳動物宿主細胞株，參看例如Yazaki及Wu, Methods in Molecular Biology，第248卷(B.K.C. Lo,編，Humana Press, Totowa, NJ)，第255-268頁(2003)。

治療用途

本文所述之抗體及抗體片段可用於治療癌症，包括癌前、非轉移性及癌性腫瘤(例如早期癌症)，或用於治療有患癌(例如乳癌)風險的個體。抗體及抗體片段亦可用以治療或預防非惡性疾病，諸如神經退化病症、精神病症或自

體免疫疾病。

術語癌症包含各種增生病症，包括(但不限於)癌前生長、良性腫瘤及惡性腫瘤。良性腫瘤侷限於原發部位且不具有浸潤、侵襲或轉移至遠端部位之能力。惡性腫瘤將侵襲及損害其周圍之其他組織。其亦能夠脫離其發生之處且擴散至身體其他部分(轉移)，通常經由血流或經由存在淋巴結之淋巴系統擴散至身體其他部分(轉移)。原發腫瘤可依據其來源之組織類型分類；轉移性腫瘤可依據癌細胞來源之組織類型分類。惡性腫瘤之細胞隨著時間消逝而變得更加異常且看上去更不像正常細胞。癌細胞外觀之此變化稱腫瘤等級，且癌細胞被描述為充分分化、適度分化、不良分化或未分化。充分分化之細胞具有相當正常的外觀且類似於其來源之正常細胞。未分化細胞為已變得如此異常以致無法判定細胞起源之細胞。

腫瘤可為實體腫瘤或非實體腫瘤或軟組織腫瘤。軟組織腫瘤之實例包括白血病(例如慢性骨髓白血病、急性骨髓性白血病、成年急性淋巴母細胞白血病、急性骨髓性白血病、成熟B細胞急性淋巴母細胞白血病、慢性淋巴細胞白血病、前淋巴球性白血病或毛細胞白血病)或淋巴瘤(例如非霍奇金氏淋巴瘤、皮膚T-細胞淋巴瘤或霍奇金氏病(Hodgkin's disease))。實體腫瘤包括除血液、骨髓或淋巴系統外之身體組織的任何癌症。實體腫瘤可進一步分為上皮細胞起源之實體腫瘤及非上皮細胞起源之實體腫瘤。上皮細胞實體腫瘤之實例包括胃腸道、結腸、乳房、前列

腺、肺、腎臟、肝臟、胰臟、卵巢、頭及頸、口腔、胃、十二指腸、小腸、大腸、肛門、膽囊、唇、鼻咽、皮膚、子宮、雄性生殖器官、泌尿器官、膀胱及皮膚之腫瘤(包括黑色素瘤)。非上皮起源之實體腫瘤包括肉瘤、腦瘤及骨腫瘤。

上皮癌一般由良性腫瘤發展為侵襲前期(例如原位癌)、再發展為已滲透基底膜且侵襲上皮下基質之惡性癌症。

在一個實施例中，多特異性抗體特異性結合EGFR及至少一種其他HER受體，諸如HER2或HER3或HER4，且可用於預防及/或治療實體腫瘤，尤其結腸直腸、肺、頭及頸、卵巢、皮膚、胰腺及/或乳房之腫瘤。

多特異性抗體亦可用於降低或預防對靶向HER路徑之療法的抗性。使用靶向HER路徑之療法明顯受限於許多癌症患者顯示之對療法之治療效果的抗性。一些癌症患者對靶向HER路徑之療法顯示無反應。其他癌症患者可顯示初始有反應，但接著變得對治療具有抗性。若在接受治療之同時癌症已進展(難治)，或若癌症在完成治療療程後12個月內已進展(復發)，則癌症對治療具有抗性。

在一個實施例中，靶向HER路徑之療法包含用靶向HER路徑之抗體(例如EGFR抗體、HER2抗體、HER3抗體及/或HER4抗體)治療。在另一實施例中，靶向HER路徑之療法包含用化學治療劑治療。

劑量及調配物

本文之抗體或抗體片段組合物可以符合良好醫學實務之

方式調配、給藥及投與。在此情形下考慮之因素包括所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床病狀、病症起因、藥劑之傳遞位點、投藥方法、投藥時程及醫務人員已知之其他因素。欲投與之抗體或抗體片段之「治療有效量」將取決於此等考慮，且為預防、改善或治療癌症所必需之最小量。抗體或抗體片段不必定、而是視情況與一或多種目前用以預防或治療癌症或患癌風險之藥劑一起調配。此等其他藥劑之有效量視調配物中存在之抗體或抗體片段之量、病症或治療之類型及上文討論之其他因素而定。此等量一般以與上文所用相同之劑量及投藥途徑來使用或為迄今所用劑量之約1%至99%。緩和或治療癌症一般包括減輕一或多種與癌症相關之症狀或醫學問題。治療有效量之藥物可實現以下之一或組合：使癌細胞數目減少(至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或100%以上)；減小或抑制腫瘤尺寸或腫瘤負荷；抑制(亦即降至某種程度及/或中止)癌細胞浸潤至周邊器官中；在腺瘤之情況下減少激素分泌；降低血管密度；抑制腫瘤轉移；降低或抑制腫瘤生長；及/或使一或多種與癌症相關之症狀減輕至某種程度。在一些實施例中，使用抗體或抗體片段預防個體癌症之發生或復發。

在一個實施例中，本發明可用於延長易患癌症或診斷患有癌症之人類患者之存活持續時間。存活持續時間係定義為首次投與藥物至死亡之時間。存活持續時間亦可用治療組相對於對照組之分層風險比(HR)度量，其表示患者在治

療期間之死亡風險。

在又一實施例中，本發明之療法使一組易患癌症或診斷患有癌症且已經各種抗癌療法治療之人類患者的反應率顯著提高。反應率係定義為對治療有反應之所治療患者之百分比。在一個態樣中，相較於手術、放射療法或化學療法單獨治療組，使用抗體或抗體片段及手術、放射療法或一或多種化學治療劑之本發明組合療法使所治療之患者組的反應率顯著提高，此增幅具有小於0.005之卡方p-值(Chi-square p-value)。

癌症治療之治療功效的其他度量描述於美國專利申請公開案第20050186208號中。

使用此項技術中已知之標準方法，藉由將具有所需純度之活性成分與視情況選用之生理學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑混合來製備治療調配物(Remington's Pharmaceutical Sciences (第20版增刊), A. Gennaro編，2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.)。可接受之載劑包括鹽水或緩衝液，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水聚合物，諸如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、精胺酸或離胺酸；單醣、二醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖醇，諸如甘露糖醇或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；及/或非離子界面活性

劑，諸如TWEEN™、PLURONICS™或PEG。

調配物視情況但較佳含有醫藥學上可接受之鹽，較佳為氯化鈉，且其較佳處於約生理學濃度下。本發明之調配物視情況可含有醫藥學上可接受之防腐劑。在一些實施例中，防腐劑濃度介於0.1%至2.0%(通常為v/v)之範圍內。適合之防腐劑包括醫藥技術中已知之防腐劑。苯甲醇、苯酚、間甲酚、對羥基苯甲酸甲酯及對羥基苯甲酸丙酯為較佳防腐劑。本發明之調配物視情況可包括濃度為0.005%至0.02%之醫藥學上可接受之界面活性劑。

本文中之調配物亦可含有一種以上為所治療之特定適應症必需之活性化合物，較佳為具有互補活性、彼此無不利影響的活性化合物。此等分子宜以有效達成預期目的之量組合存在。

活性成分亦可截留於例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合所製備之微囊中，例如分別含於膠狀藥物傳遞系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊)或巨乳液中的羥甲基纖維素或明膠微囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微囊。此等技術揭示於Remington's Pharmaceutical Sciences(同上文)中。

可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適合實例包括含有抗體之固體疏水性聚合物的半滲透基質，該等基質呈成形物品形式，例如膜或微囊。持續釋放基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如聚(甲基丙烯酸2-羥乙酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸交酯(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與γ乙基-

L-麩胺酸鹽之共聚物、不可降解性乙烯-乙酸乙烯酯、可降解性乳酸-乙醇酸共聚物(諸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物及乙酸亮丙瑞林構成的可注射微球體))及聚-D-(-)-3-羥丁酸。儘管諸如乙烯-乙酸乙烯酯與乳酸-乙醇酸之聚合物能夠使分子釋放逾100天，但某些水凝膠釋放蛋白質的時段更短。當囊封抗體長時間保留於體內時，其因在37℃下暴露於水分而會變性或聚集，導致生物活性損失及免疫原性之可能變化。視所涉及之機制而定，可設計合理策略以達成穩定化。舉例而言，若發現聚集機制為經由硫基-二硫鍵互換形成分子間S-S鍵，則穩定化可藉由修飾硫氫基殘基、自酸性溶液凍乾、控制水分含量、使用適當添加劑及開發特定聚合物基質組合物來實現。

本文所述之抗體及抗體片段可根據已知方法投與人類個體，諸如團式靜脈內投與或在一定時段藉由連續輸注投與、藉由肌肉內、腹膜內、腦脊髓內、皮下、關節內、滑膜內、鞘內、經口、表面或吸入途徑投與。若廣泛副作用或毒性與HER(例如EGFR、HER2、HER3、HER4等)拮抗相關，則可能尤其需要局部投與。離體策略亦可用於治療應用。離體策略包括用編碼抗體或抗體片段之聚核苷酸轉染或轉導獲自個體之細胞。接著使經轉染或轉導之細胞返回至個體。該等細胞可為多種類型中任一種，包括(但不限於)造血細胞(例如骨髓細胞、巨噬細胞、單核細胞、樹突狀細胞、T細胞或B細胞)、纖維母細胞、上皮細胞、內皮細胞、角質細胞或肌細胞。

在一個實例中，抗體或抗體片段可局部投與，例如藉由直接注射投與(當病症或腫瘤位置允許時)，且可定期重複注射。抗體或抗體片段亦可全身性傳遞至個體或直接傳遞至腫瘤細胞，例如在外科切除腫瘤之後傳遞至腫瘤或腫瘤床，以預防或減少局部復發或轉移。

適用於預防或治療疾病的本發明抗體劑量(單獨使用或與一或多種其他額外治療劑組合使用時)係視以下因素而定：欲治療之疾病類型、抗體類型、疾病嚴重度及病程、抗體投與是否出於預防目的或治療目的、先前療法、患者臨床史及對抗體之反應，及主治醫師之判斷。抗體宜一次性或經一系列治療投與患者。視疾病類型及嚴重度而定，約1 μg/kg至20 mg/kg(例如0.1 mg/kg-15 mg/kg)抗體可為投與患者之初始候選劑量，不論例如一或多次分別投與或連續輸注。視上述因素而定，一種典型日劑量可介於約1 μg/kg至100 mg/kg或多於100 mg/kg之範圍內。對於數日或更長期間之重複投與，視病狀而定，一般會持續治療直至疾病症狀出現預期之抑制為止。抗體之一種例示性劑量在約0.05 mg/kg至約20 mg/kg之範圍內。因此，可向患者投與約0.5 mg/kg、2.0 mg/kg、4.0 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg或20 mg/kg(或其任何組合)中之一或多種劑量。此等劑量可間歇地投與，例如每週或每兩週，或每三週投與(例如使得患者接受約二至約二十，或例如約六劑抗體)。可投與初始較高速效劑量(loading dose)，接著投與一或多次較低劑量。例示性給藥方案包含投與約4 mg/kg之初始

速效劑量，接著約2 mg/kg抗體之每週維持劑量。然而，其他給藥方案可適用。此療法之進程易用習知技術及檢定來監測。

組合療法

可將本發明之抗體與具有抗癌特性之第二化合物於醫藥組合調配物中組合或於給藥方案中依組合療法組合。醫藥組合調配物或給藥方案中之第二化合物可具有與組合中抗體互補之活性，使得其彼此無不利影響。本發明之抗體亦可與放射療法組合使用。

第二化合物可為化學治療劑、細胞毒性劑、細胞激素、生長抑制劑、抗激素劑及/或保心藥。此等分子宜以有效達成預定目的之量組合存在。含有本發明抗體之醫藥組合物亦可具有治療有效量之化學治療劑，諸如微管蛋白形成抑制劑、拓撲異構酶抑制劑、DNA嵌入劑或DNA結合劑。

其他治療方案可與根據本發明鑑別之抗癌劑投與組合。組合療法可以同時或依序方案投與。當依序投與時，組合療法可分兩次或兩次以上投與來投與。組合投與包括使用各別調配物或單一醫藥調配物共投與，及依任一順序連續投與，其中連續投與存在時間間隔，但兩種(或所有)活性劑同時發揮其生物活性。

此組合療法之實例包括與化學治療劑組合，化學治療劑諸如埃羅替尼(TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.)、硼替佐米(VELCADE®, Millenium Pharm.)、氟維司群(FASLODEX®, AstraZeneca)、舒尼替尼(SU11248, Pfizer)、來曲唑

(FEMARA®, Novartis)、甲磺酸伊馬替尼(GLEEVEC®, Novartis)、PTK787/ZK 222584(Novartis)、奧賽力鉑(Eloxatin®, Sanofi)、5-FU(5-氟尿嘧啶)、甲醯四氫葉酸、雷帕黴素(Sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth)、拉帕替尼(TYKERB®, GSK572016, GlaxoSmithKline)、洛那法尼(SCH 66336)、索拉非尼(BAY43-9006, Bayer Labs.)及吉非替尼(IRESSA®, AstraZeneca)、AG1478、AG1571(SU 5271；Sugen)；烷化劑，諸如噻替派及CYTOXAN®環磷醯胺；烷基磺酸鹽，諸如白消安、英丙舒凡及哌泊舒凡；抗葉酸劑抗贅生藥，諸如培美曲塞(pemetrexed)(ALIMTA® Eli Lilly)，氮丙啶，諸如苯唑多巴、卡波醌、米特多巴及尤利多巴；伸乙基亞胺及甲基密胺，包括六甲蜜胺、三伸乙基蜜胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基磷醯胺及三伸乙基硫代磷醯胺；乙醯精寧(尤其布拉他辛及布拉他辛酮)；喜樹鹼(包括合成類似物拓朴替康)；苔蘚蟲素；卡利斯塔叮；CC-1065(包括其阿多來新、卡折來新及比折來新合成類似物)；念珠藻環肽(尤其念珠藻環肽1及念珠藻環肽8)；海兔毒素；多卡米辛(包括合成類似物KW-2189及CB1-TM1)；艾榴素；盤克斯塔叮；沙考的汀；海綿素；氮芥，諸如苯丁酸氮芥、萘氮芥、環磷醯胺、雌莫司汀、異環磷醯胺、甲二氯二乙胺、鹽酸甲二氯二乙胺氧化物、美法侖、新恩比興、膽固醇對苯乙酸氮芥、松龍苯芥、曲磷胺、尿嘧啶芥；亞硝基尿素，諸如卡莫司汀、氯脲黴素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀及雷莫司汀；抗生素，諸

如烯二炔抗生素、刺孢黴素、刺孢黴素γ1I及刺孢黴素ωI1；達米辛，包括達米辛A；雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽；埃斯培拉黴素；以及新抑癌素發色團及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團、阿克拉黴素、放線菌素、胺茴黴素、偶氮絲胺酸、博萊黴素、放線菌素C、卡拉比辛、洋紅黴素、嗜癌菌素、色黴素、更生黴素、道諾黴素、地托比星、6-重氮-5-側氧基-L-正白胺酸、ADRIAMYCIN®小紅莓(包括(N-嗎啉基)-小紅莓、氰基N-嗎啉基-小紅莓、2-N-吡咯啉基-小紅莓及去氧小紅莓)、表柔比星、依索比星、黃膽素、麻西羅黴素、絲裂黴素(諸如絲裂黴素C)、黴酚酸、諾加黴素、橄欖黴素、培洛黴素、泊非黴素、嘌呤黴素、奎那黴素、羅多比星、鏈黑菌素、鏈脲黴素、殺結核菌素、烏苯美司、淨司他丁、左柔比星；抗代謝物，諸如甲胺喋呤及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如迪諾特寧、甲胺喋呤、蝶羅呤、三甲曲沙；嘌呤類似物，諸如氟達拉濱、6-巰基嘌呤、噻咪嘌呤、硫鳥嘌呤；嘧啶類似物，諸如安西他濱、阿紮胞苷、6-氮雜尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、雙去氧尿苷、去氧氟尿苷、依諾他濱、氟尿苷；雄激素，諸如卡普睾酮、丙酸屈他雄酮、環硫雄醇、美雄烷、睾內酯；抗腎上腺藥劑，諸如胺魯米特、米托坦、曲洛司坦；葉酸補充劑，諸如夫羅林酸；醋葡醛內酯；醛磷醯胺醣苷；胺基乙醯丙酸；恩尿嘧啶；安吖啶；倍思塔布；比生群；艾達曲克；得弗伐胺；秋水仙胺；地吖醌；艾弗利散；依利醋銨；艾普塞隆；乙環氧啶；硝酸鎵；羥

基脲；香菇多糖；羅尼達寧；美登素類，諸如美登素及安絲菌素；丙脒腙；米托蒽醌；莫哌達醇；硝拉維林；噴司他汀；苯來美特；吡柔比星；洛索蒽醌；足葉草酸；2-乙基醯肼；丙卡巴肼；PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生；根瘤菌素；西佐糖；鍺螺胺；細交鏈孢菌酮酸；三亞胺醌；2,2',2"-三氯三乙胺；單端孢黴毒素(尤其T-2毒素、弗納庫林A、桿孢菌素A及胺癸叮)；烏拉坦；長春地辛；達卡巴嗪；甘露莫司汀；二溴甘露醇；二溴衛矛醇；雙溴丙基哌嗪；甲托辛；阿拉伯糖(「Ara-C」)；環磷醯胺；噻替派；紫杉醇，例如太平洋紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE™(太平洋紫杉醇之不含十六醇聚氧乙烯醚之白蛋白奈米粒子調配物)(American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois)及TAXOTERE®多西他賽(doxetaxel)(Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France)；苯丁酸氮芥；GEMZAR®吉西他濱；6-硫鳥嘌呤；巯基嘌呤；甲胺喋呤；鉑類似物，諸如順鉑及卡鉑；長春鹼；鉑；依託泊苷(VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌；長春新鹼；NAVELBINE®長春瑞賓；諾凡特龍；替尼泊甙；依達曲沙；道諾黴素；胺基蝶呤；希羅達(xeloda)；伊班膦酸鹽；CPT-11；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；類視黃素，諸如視黃酸；卡培他濱；及上述任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

此組合療法亦包括：(i)用以調節或抑制激素對腫瘤作用的抗激素劑，諸如抗雌激素及選擇性雌激素受體調節劑(SERMs)，包括例如他莫昔芬(包括NOLVADEX®他莫昔芬)、雷洛昔芬、曲洛昔芬、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬、克沃昔芬、LY117018、奧那司酮及FARESTON·托瑞米芬；(ii)抑制芳香酶(其調節腎上腺中之雌激素產生)之芳香酶抑制劑，諸如4(5)-咪唑、胺魯米特、MEGACE®乙酸甲地孕酮、AROMASIN®依西美坦、福美司坦、法屈唑、RIVISOR®伏羅唑、FEMARA®來曲唑及ARIMIDEX®阿那曲唑；(iii)抗雄激素，諸如氟他胺、尼魯米特、比卡魯胺、亮丙立德及戈舍瑞林；以及曲沙他濱(1,3-二氧戊環核苷胞嘧啶類似物)；(iv)蛋白激酶抑制劑；(v)脂質激酶抑制劑；(vi)反義寡核苷酸，尤其抑制涉及黏附細胞增殖之信號傳導路徑中基因之表現的反義寡核苷酸，諸如PKC-α、Ralf及H-Ras；(vii)核糖核酸酶，諸如VEGF表現抑制劑(例如ANGIOZYME®核糖核酸酶)及HER2表現抑制劑；(viii)疫苗，諸如基因療法疫苗，例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗及VAXID®疫苗；PROLEUKIN® rIL-2；LURTOTECAN®拓撲異構酶1抑制劑；ABARELIX® rmRH；(ix)抗血管生成劑，諸如貝伐單抗(bevacizumab)(AVASTIN®, Genentech)；及(x)上述任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

此等化學治療劑之製備及給藥時程可根據製造商說明書或熟習此項技術者經驗決定來使用。此化學療法之製備及

給藥時程亦描述於Chemotherapy Service, (1992) M.C. Perry編，Williams & Wilkins, Baltimore, Md中。

組合療法可提供「協同作用」且顯示「協同效應」，亦即各活性成分一起使用時所達成之作用大於分別使用該等化合物所產生之作用的總和。當各活性成分：(1)共調配且於合併之單位劑量調配物中同時投與或傳遞時；(2)以各別調配物交替或並行傳遞時；或(3)依據一些其他方案傳遞時，可達成協同效應。當依交替療法傳遞時，可在依序投與或傳遞化合物(例如由各別注射器不同注射)時達成協同效應。一般而言，在交替治療期間，依序(亦即一系列)投與有效劑量之各活性成分，而在組合治療中，一起投與有效劑量之兩種或兩種以上活性成分。

製品及套組

本發明之另一實施例為含有適用於治療癌症之物質的製品。該製品包含容器及容器上或連接於容器之標記或藥品說明書。適合之容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可由諸如玻璃或塑膠之各種材料形成。容器容納有效治療病狀之組合物且可具有無菌接取孔(例如容器可為具有可由皮下注射針刺穿之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)。組合物中至少一種活性劑為本發明之多特異性抗體或抗體片段抗體。標記或藥品說明書指示組合物係用於治療特定病狀。標記或藥品說明書可進一步包含向患者投與抗體組合物之說明。亦涵蓋包含本文所述之組合療法的製品及套組。

藥品說明書係指治療產品之商業包裝中通常所包括之說明，其含有關於適應症、用法、劑量、投藥、禁忌及/或關於此等治療產品使用之警告的資訊。在一個實施例中，藥品說明書指示組合物係用於治療實體腫瘤，諸如結腸直腸癌、肺癌及/或乳癌。

另外，製品可進一步包含第二容器，該容器包含醫藥學上可接受之緩衝液，諸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林葛爾氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液。其可進一步包括就商業及使用者觀點而言所需之其他物質，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

亦提供適用於各種目的，例如用於自細胞純化或免疫沈澱HER受體的套組。為分離及純化EGFR及/或HER2及/或HER3及/或HER4，該套組可含有EGFR/HER2及/或EGFR/HER3及/或EGFR/HER4抗體與珠粒(例如SEPHAROSE®珠粒)偶合物。可提供含有供活體外(例如在ELISA或西方墨點法(Western blot)中)偵測及定量所需HER受體之抗體的套組。如同製品，該套組包含容器及容器上或連接於容器之標記或藥品說明書。容器容納包含至少一種本發明之多特異性抗體或抗體片段之組合物。可包括含有例如稀釋劑及緩衝劑或對照抗體之其他容器。該標記或藥品說明書可提供組合物之描述以及預定活體外或診斷用途之說明。

以上書面說明視為足以使熟習此項技術者能夠實施本發明。以下實例僅出於說明目的而提供，且不意欲以任何方

式限制本發明之範疇。實際上，熟習此項技術者依據以上說明可顯而易知除本文所示及所述者外之本發明之各種修改且該等修改屬於隨附申請專利範圍之範疇內。

除非另外規定，否則實例中所提及之市售試劑係根據製造商說明書使用。以下實例中及整篇本說明書中以ATCC寄存編號鑑別之彼等細胞的來源為美國菌種保存中心(American Type Culture Collection), Manassas, VA。除非另作說明，否則本發明使用重組DNA技術之標準程序，諸如上文及以下教科書中所述之標準程序：Sambrook等人，同上文；Ausubel等人，**Current Protocols in Molecular Biology** (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989)；Innis等人，**PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications** (Academic Press, Inc.: N.Y., 1990)；Harlow等人，**Antibodies: A Laboratory Manual** (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 1988)；Gait, **Oligonucleotide Synthesis** (IRL Press: Oxford, 1984)；Freshney, **Animal Cell Culture**, 1987；Coligan等人，**Current Protocols in Immunology**, 1991。

實例

實例1

分離及表徵結合人類EGFR之抗體

材料

酶及M13-KO7輔助噬菌體係購自New England Biolabs。大腸桿菌XL1-Blue購自Stratagene。牛血清白蛋白(BSA)、

卵白蛋白及Tween 20係購自Sigma。中性鏈親和素(Neutravidin)、酪蛋白及Superblock係購自Pierce。抗M13結合辣根過氧化酶(HRP)係購自Amersham Pharmacia。Maxisorp免疫培養盤係購自NUNC(Roskilde, Denmark)。四甲基聯苯胺(TMB)受質係購自Kirkegaard及Perry Laboratories(Gaithersburg, MD)。

文庫構築

基於人類化4D5(h4D5，曲妥珠單抗)之人類抗體構架產生噬菌體呈現抗體文庫，其中側鏈與長度多樣性合併成第一文庫(文庫1)中之重鏈互補決定區(CDR1、CDR2、CDR3)，及第二文庫(文庫2)中之重鏈CDR及輕鏈CDR3(仍集中於重鏈之多樣化)，如(Lee等人，J. Mol. Biol, 340: 1073-1093 (2004))所述。如(Lee等人，J. Mol. Biol, 340: 1073-1093 (2004))所述來構築文庫，除了適當修飾所用簡幷寡核苷酸外。

分選兩文庫

直接對文庫1及文庫2進行標靶(hEGFR-ECD-Fc(人類EGFR細胞外域與人類IgG1之Fc區之融合物)及EGFRvIII-Fc)結合選擇。EGFRvIII-Fc蛋白為缺少大部分域II(E1-P353(不包括信號肽))之EGFR變異體與hIgG1之Fc區的融合物。參看Kuan, C-T等人，Endocrine-Related Canc. 8: 83-96 (2001)；Bigner, S H等人，Cancer Research , 50: 8017-8022 (1990)。將含有100微升/孔之標靶抗原(hEGFR-ECD-Fc、EGFRvIII-Fc)(5 μg/ml)的PBS(0.05 M碳酸鈉緩衝液，

pH 9.6)塗布於96孔Nunc Maxisorp培養盤上(在4℃下維持隔夜或在室溫下維持2小時)。用交替阻斷劑阻斷培養盤。在第一輪選擇中，將10^{13}個噬菌體/毫升(3-5 OD/ml)之噬菌體溶液與所塗抗原一起培育18小時。如下在各輪選擇中降低噬菌體輸入：第1輪3-5 O.D/ml，第2輪3 O.D/ml，第3輪0.5~1 O.D/ml及第4輪輸入0.1~0.5 O.D/ml。所稀釋之噬菌體在冰上培育30分鐘。將1 μM Fc融合蛋白添加至來自第3輪之所阻斷噬菌體中以移除Fc結合物。在免疫培養盤上培育噬菌體溶液(100微升/孔(8個塗有標靶抗原之孔及2個未塗孔))以允許結合於固定抗原(第1輪隔夜，其餘各輪歷時2小時)之後，以PBS及0.05% Tween 20連續洗滌免疫培養盤至少十次。在室溫下用100微升/孔之100 mM HCl溶離所結合之噬菌體20分鐘。藉由添加1/10體積1 M Tris(pH 11.0)及BSA直至最終0.1%來中和所溶離噬菌體(自所塗孔溶離)及本底噬菌體(自未塗孔溶離)。計算每個塗有抗原之免疫培養盤孔之噬菌體回收率且與未塗抗原之阻斷孔之噬菌體回收率相比較以研究呈現特異性結合標靶抗原之Fab的噬菌體純系之富集。所溶離之噬菌體於大腸桿菌中擴增且用於其他各輪選擇。

hEGFR結合純系之高產量表徵

選擇來自第4輪之隨機純系用於篩檢且使用噬菌體ELISA來檢定，其中對結合於標靶及抗gD與結合不相關蛋白質(BSA、HER2、抗EGFR抗體、曲妥珠單抗)加以比較。

用1 μg/ml標靶、抗gD及不相關蛋白質塗布384孔格式免疫培養盤(在4℃下維持隔夜或在室溫下維持2小時)，且用含有1% BSA之PBS阻斷1小時。使大腸桿菌XL1-Blue中之噬菌體質體純系生長於150 μl補充有卡本西林(carbenicillin)及M13-KO7輔助噬菌體之2YT培養液中；使培養物在37℃下在96孔格式中在震盪下生長隔夜。將含有噬菌體之培養物上清液在PBST(含0.05% Tween 20及0.5%(w/v)BSA之PBS)中稀釋五倍。將30 μl混合物添加至384孔所塗盤之各象限中且在室溫下培育1小時。用PBT(含0.05% Tween 20之PBS)洗滌培養盤且與在PBST中稀釋5000倍至1 nM之抗M13抗體辣根過氧化酶結合物一起培育30分鐘。洗滌培養盤，用TMB受質顯色約五分鐘，以1.0 M H_3PO_4淬滅，且用分光光度法在450 nm下讀取。

結合抗gD抗體及標靶而不結合非特異性蛋白質之純系視為特異性陽性。VH文庫允許分離針對EGFR-ECD-Fc與EGFRvIII-Fc之特異性結合物。

溶液結合競爭ELISA

藉由溶液結合競爭ELISA測定所選結合純系之結合親和力。

使大腸桿菌XL1-Blue中之所選噬菌體質體純系生長於20 ml補充有卡本西林、康黴素(Kanamycin)及M13-KO7輔助噬菌體之2YT培養液中；使培養物在30℃下在震盪下生長隔夜。藉由在20% PEG/2.5 M NaCl中重複沈澱兩次來純化噬菌體之上清液，再懸浮於PBS中，且用分光光度法在268

nM下讀取以便測定濃度(OD/ml)。

在塗有1 μg/ml hEGFR-ECD-Fc之免疫培養盤上滴定純化之噬菌體以測定溶液競爭ELISA之最佳濃度。

將在450 nM下得到1 OD/ml信號之稀釋液用於溶液結合檢定，其中首先將噬菌體與遞增濃度之抗原(hEGFR-ECD)一起培育一小時且接著轉移至塗有抗原之免疫培養盤中維持15分鐘以捕捉未結合之噬菌體。IC_{50}依溶液結合期中將噬菌體與固定抗原結合抑制50%的抗原濃度計算。在室溫下進行溶液結合競爭ELISA。所選純系之IC_{50}值介於36.2 nM至>1000 nM之範圍內。

噬菌體呈現F(ab)zip轉化為人類IgG

為精確測定親和力、特異性及其他特性，以游離hIgG形式表現所選純系。

將輕鏈及重鏈之可變域選殖於先前為在哺乳動物細胞中短暫表現人類IgG所設計之載體中。(Leet等人，J. Mol. Biol. 23:340:1073-1093 (2004))。

用限制酶消化噬菌體質體DNA之V_L區域，從而使DNA上游編碼CDR L1(*Eco*RV)之區域與下游編碼CDR L3(*Kpn*I)之區域分裂。

用限制酶消化噬菌體質體DNA之V_H區域，從而使DNA上游編碼CDR H1(*Apa*I)之區域與下游編碼CDR H3(*Bsiw*I)之區域分裂。

所分泌之游離IgG係用蛋白質A親和力層析加以純化且於塗有hEGFR之免疫培養盤上以直接結合ELISA加以測

試。

比較抗hEGFR抗原決定基

研究所分離之抗EGFR抗體與另一種已知可結合於EGFR之域III的抗hEGFR抗體競爭的能力以測定由抗hEGFR抗體識別之抗原決定基。

在競爭性ELISA格式中進行檢定。對於競爭性ELISA，將EGFR-ECD-Fc以2 μg/ml固定於Maxisorp免疫培養盤上。由所塗EGFR-ECD-Fc捕捉固定濃度之抗EGFR抗體(或非特異性抗體對照物)，且添加純化之所選抗EGFR噬菌體-Fab，且用α-M13-HRP結合物偵測。經阻斷而未結合塗有EGFR-ECD-Fc培養盤的抗體可能共有重疊的抗原決定基。

進行TGF-α競爭性ELISA時，首先由所塗抗人類Fc抗體捕捉EGFR-ECD-Fc，接著由EGFR-ECD-Fc捕捉固定濃度之TGF-α。添加純化之噬菌體-Fab，且用α-M13-HRP結合物偵測。

最後，評估所選純系與具有暴露及缺失之EGFR域之構築體的結合以證實先前競爭性ELISA。命名為D1之純系與抗EGFR抗體競爭且可能在域III結合EGFR。

實例2

表徵針對人類表皮生長因子受體之抗體

抑制配位體結合

為測定所選抗EGFR抗體D1是否抑制^{125}I-EGF結合於H1666細胞(ATCC CRL-5885, Manassas, Va.)，如下在配位

體結合檢定中測試經純化之IgG型式之D1。將H1666細胞塗於12孔培養盤中。次日移除生長培養基且在室溫下用200 nM抗體預處理細胞2小時。添加20微升/孔之經放射性標記之EGF(使用濃度低於細胞株之Kd)且在室溫下再處理細胞2小時。用結合緩衝液洗滌細胞且溶解、轉移，且使用iso Data γ-計數器對樣本計數。將未標記EGF用作冷競爭劑(cold competitor)。結果顯示D1抑制^{125}I-EGF配位體結合於H1666細胞。

抑制穩定轉染之EGFR-NR6細胞中TGF-α誘導之EGFR磷酸化

為測定抗EGFR抗體D1是否選擇性阻斷TGF-α誘導之EGFR磷酸化，將穩定轉染之EGFR-NR6細胞進行血清饑餓2-3小時且與各種濃度之D1一起預培育2小時。用1 nM TGF-α刺激細胞。對全部細胞溶胞物進行SDS-PAGE分析，且用抗磷酸化酪胺酸及抗EGFR作為內參考物來探測免疫墨點。將市購之抗EGFR抗體用作陽性對照物。資料顯示在基於細胞之檢定中D1抑制TGF-α誘導之EGFR磷酸化。

實例3

D1之親和力成熟

文庫構築

使用如(Lee等人，Blood, 108, 3103-3111, 2006)所述之寡核苷酸定點突發誘變來產生兩個噬菌體呈現文庫(L3/H3及L3/H1H2文庫)。文庫模板載體含有嵌於CDR-L3中之終

止密碼子(TAA)，其在突變誘發反應期間可使用經由編碼CDR-L3(所有文庫)、CDR-H3(L3/H3文庫)、CDR-H2及CDR H1(L3/H1H2文庫)之序列黏接的簡并寡核苷酸來修復。根據Kunkel等人(Methods Enzymol. 1987; 154:367-82)之方法進行文庫突變誘發反應。寡核苷酸依不同比率組合以精細調節多樣性，從而反映在天然譜中所選位置之胺基酸頻率。如(Lee等人，2004，同上文)所述，將每個文庫之突變誘發產物彙集於一個反應池中且電穿孔置於大腸桿菌SS320細胞中且在補充KO7輔助噬菌體的情況下生長。

文庫分選及篩檢

親和力改良選擇時，第一輪對噬菌體文庫進行針對hEGFR-ECD-Fc之培養盤分選，接著進行三輪溶液分選。

以遞增之選擇嚴格性進行三輪溶液分選。在4℃下用5 μg/ml中性鏈親和素塗布免疫培養盤隔夜且用Superblock(Pierce)及PBST阻斷。將3-5 OD/ml所增殖之噬菌體與100 nM生物素標記EGFR-ECD之Superblock溶液一起預培育，接著稀釋10倍且添加至經阻斷之免疫培養盤中維持5-10分鐘。將培養盤洗滌8次，溶離噬菌體且增殖以供下一輪溶液分選，同時將噬菌體輸入(0.5 OD/ml)及生物素標記EGFR-ECD之濃度降至1 nM。

高產量親和力篩檢ELISA(單點競爭)

挑選最後一輪溶液分選所產生之隨機純系以供篩檢且使用噬菌體單點競爭ELISA來檢定，其中比較與(或未與)hEGFR-ECD一起預培育之噬菌體上清液對標靶的結

合。

使大腸桿菌XL1-Blue中之噬菌體質體純系生長於150 μl補充有卡本西林及M13-KO7輔助噬菌體之2YT培養液中；使培養物在37℃下在96孔格式中在震盪下生長隔夜。將含有噬菌體之培養液上清液在PBST(含0.05% Tween 20及0.5%(w/v)BSA之PBS)(含或不含5 nM EGFR-EC)中稀釋五倍。依據以下方程式計算OD降低率(%)：

OD_{450nm}降低率(%)=(含競爭劑之孔的OD_{450nm})/(無競爭劑之孔的OD_{450nm})*100

選擇OD降低率大於25%之純系以供溶液結合競爭ELISA。

溶液結合競爭ELISA

藉由如上所述之溶液結合競爭ELISA測定藉由單點ELISA所選之結合純系的結合親和力。

如上所述來測定一種利用D1親本純系親和力成熟所選之純系(D1.5)的噬菌體IC50。D1.5之IC50為0.39 nM。使用與上述相同之限制位點及為在哺乳動物細胞中短暫表現鼠類IgG所設計的載體，將D1.5重組為mIgG2A以便進一步表徵。

實例4

表徵呈游離mIgG形式之經改良抗EGFR抗體

BIAcore量測

在BIAcore^{TM}-2000上使用表面電漿共振檢定測定抗

EGFR mIgG2A之親和力。將以約150個反應單元(RU)固定於CM5晶片上之mIgG D1.5用於BIAcore檢定。在25℃下以30 μL/min注射12.5 nM至200 nM遞增濃度之EGFR-ECD。藉由扣減空白流動室(blank flow cell)之RU來修正結合反應。動力學分析係使用k_{on}及k_{off}同時擬合之1:1朗繆爾模型(Languir model)。藉由此方法測定之D1.5之KD為1.2 nM。

抗原決定基定位

評估所選純系與具有暴露及缺失之EGFR域之構築體的結合以證實自親本純系遺傳之結合抗原決定基。選自D1分選之親和力改良純系D1.5在域III結合EGFR。

抑制EGFR-NR6細胞中TGF-α誘導之EGFR磷酸化

測試D1.5以測定其是否以高於親本純系之效能抑制TGF-α誘導之EGFR磷酸化。針對EGFR-NR6細胞測試抗體且如以上實例2中所述進行檢定。市購抗EGFR抗體用作陽性對照物。

結果顯示，當與親本純系D1相比時，D1.5對配位體誘導EGFR磷酸化顯示更大之抑制。

抑制H1666細胞之細胞增殖

進行檢定以測定D1.5是否抑制以中等程度表現EGFR、HER2及HER3之NSCLC癌細胞株H1666的細胞增殖。以5000個細胞之密度將H1666細胞(ATCC CRL-5885, Manassas, Va.)接種於96孔培養盤中。次日用含有各種濃度抗體(至多50 μg/ml)之含1%血清培養基同時處理細胞。3天後添加阿拉馬藍(Alamar Blue)且使用螢光計偵測螢光。以

RFU表示結果。

結果顯示，D1.5對細胞生長顯示之抑制大於D1。

A431異種移植研究

使用A431異種移植模型驗證親和力成熟之抗EGFR抗體D1.5之活體內功效。A431細胞為EGFR擴增之細胞且對抗EGFR劑反應充分。在nu/nu小鼠中進行研究且將市購抗EGFR抗體用作參考物。

第一步，在競爭性ELISA中評估D1.5與鼠類EGFR之交叉反應性。用hEGFR-ECD-Fc塗布免疫培養盤。將mEGFR-ECD-Fc之連續稀釋液與固定濃度之D1.5一起培育。結果顯示D1.5與鼠類EGFR交叉反應。為評估活體內功效研究所需之給藥，首先以單次劑量(50 mg/kg)注射D1.5且藉由ELISA量測血清IgG濃度。D1.5清除較迅速且在注射後七天看到濃度減小。功效研究(A431異種移植模型)揭示D1.5完全抑制腫瘤生長。D1.5在50 mg/kg下與抗EGFR抗體一樣有效。其較低劑量組(25 mg/kg)效能降低之原因在於抗體之較快清除。(圖1)

實例5

輕鏈文庫設計及雙特異性抗體篩檢

文庫設計及構築

設計基於D1.5模板之文庫以便使抗體輕鏈之胺基酸組成及CDR長度多樣化。定製隨機化位置之子集以代表位於此等位點之天然譜之一部分的胺基酸，而其餘位點經隨機化可包括所有20種天然存在之胺基酸。另外，CDR L3中之

隨機化位置係經定製且偏向於模板之天然序列，因為考慮此CDR對於結合D1.5為重要的。各種長度之CDR L1為三種含有位置28-33之密碼子之寡核苷酸的混合物。對於較長L1，NNK係插入位置30與31之間。

位置	28	29	30	31	32	33
CDR-L1	$G_{70}A_{70}C_{70}$	RTT	NNK	NNK	TAC	STA
	$G_{70}A_{70}C_{70}$	RTT	NNK	NNK	DGG	STA
	$G_{70}A_{70}C_{70}$	RTT	NNK	NNK	NMT	STA

對於CDR L2，四種寡核苷酸係依1:1:2:10混合。

	50	51	52	53
CDR-L2	NKK	GST	TCC	NNK
	TGG	GST	TCC	NNK
	KGG	GST	TCC	TMT
	NKK	GST	TCC	TMT

N=A/C/G/T，D=A/G/T，V=A/C/G，B=C/G/T，H=A/C/T，K=G/T，M=A/C，R=A/G，S=G/C，W=A/T，Y=C/T。

*$G_{70}A_{70}C_{70}$允許70%指定核苷酸及10%其他三者中每一者編碼約50% Glu及50%其他胺基酸。參看美國專利公開案第20080069820號及Bostrom, J.等人，Science 323:1610-1614(2009)。

CDR L3之多樣性係源自以下寡核苷酸之混合物。D1.5 CDR_L3寡核苷酸

F693 ACTTATTAC TGT CAG CAA 878 NNK 776 RST CCT

TAC ACG TTC GGA(SEQ ID: 70)

F694 ACTTATTAC TGT CAG CAA 878 TAC 776 RST CCT TAC ACG TTC GGA(SEQ ID: 71)

F695 ACTTATTAC TGT CAG CAA DGG NNK 776 577 CCT TAC ACG TTC GGA(SEQ ID: 72)

F696 ACTTATTAC TGT CAG CAA KMT NNK 776 577 CCT TAC ACG TTC GGA(SEQ ID: 73)

F697 ACTTATTAC TGT CAG CAA 878 NNK 776 NNK CCT TAC ACG TTC GGA(SEQ ID: 74)

F698 ACTTATTAC TGT CAG CAA DGG NNK NNK RST CCT TAC ACG TTC GGA(SEQ ID: 75)

F699 ACTTATTAC TGT CAG CAA KMT NNK NNK RST CCT TAC ACG TTC GGA(SEQ ID: 76)

5=70% A，6=70% G，7=70% C，8=70% T(其餘三種核苷酸為10%)

在所有文庫中，親本純系序列可使重鏈保持恆定。所有文庫模板均含有嵌於CDR L1中之終止密碼子，從而防止噬菌體呈現抗體庫成員中存在模板輕鏈。

藉由突變誘發法(Kunkel突變誘發)，使用含有終止密碼子之單股DNA模板與針對三種CDR L1、L2及L3之寡核苷酸組同時黏接來構築文庫。藉由電穿孔將突變誘發所產生之文庫DNA轉型於細菌細胞菌株SS320中且以輔助噬菌體KO7來生長。針對呈現度(藉由偵測位於輕鏈c端之gD標籤)及單點ELISA格式中結合一級抗原(EGFR)之保持力來評估

來自所構築文庫之單一菌落。所評估之來自D1.5文庫之單一菌落平均35%顯示高呈現度及所保持之EGFR結合特性。

分離雙特異性純系之文庫分選及篩檢

以抗gD抗體作為捕捉標靶、對文庫進行首輪結合選擇以排除已缺失或不表現Fab基因之純系，且用hEGFR-ECD-Fc進行結合選擇，接著為4輪所塗抗原選擇(HER2-ECD、HER2-ECD-Fc、HER2-I-III-Fc、HER3-ECD-Fc、HER4-ECD-Fc(在各情況下，融合構築體中之Fc為來自hIgG1之補體結合片段))。或者，對其直接進行標靶結合選擇而不用抗gD及hEGFR-ECD-Fc預選擇。

如以上實例3中所述進行各輪培養盤選擇。選擇第3輪及第4輪之隨機純系以供篩檢且使用噬菌體ELISA來檢定，其中將結合於標靶及抗gD與結合不相關蛋白質(BSA)相比較以檢查非特異性結合。結合抗gD抗體及標靶而不結合非標靶蛋白質對照物(諸如牛血清白蛋白、其他IgG)之純系視為特異性陽性。

藉由PCR擴增陽性純系之輕鏈可變域區域且定序。對陽性特異性結合物之DNA序列分析揭示1種針對EGFR與HER2之獨特結合物(D1.5-201(SEQ ID NO: 36))，7種針對EGFR與HER3之獨特結合物(D1.5-100(SEQ ID NO: 40)、D1.5-103(SEQ ID NO: 41)、D1.5-113(SEQ ID NO: 42)、D1.5-115(SEQ ID NO: 43)、D1.5-116(SEQ ID NO: 44)、D1.5-121(SEQ ID NO: 45)、D1.5-122(SEQ ID NO: 46))，1種針對EGFR與HER4之獨特結合物(D1.5-400，(SEQ ID

NO: 39))。

九種雙特異性純系中有八種保留HVR L3中位置93之脯胺酸，因為在此位置採用脯胺酸(在位置96具有酪胺酸)可使D1.5對EGFR之親和力顯著提高(相較於D1.5之親本純系D1)，此可能為保持結合EGFR之促成因素。

評估雙特異性hEGFR/HER2、hEGFR/HER3、hEGFR/HER4噬菌體純系特異性

為測定九種具有雙活性之純系是否對其同源標靶具有特異性，在直接培養盤ELISA格式中評估其與一組抗原之結合。

在4℃下將2 μg/ml多種蛋白質塗布於免疫培養盤上隔夜。用含有1% BSA之PBST阻斷培養盤，且將如實例1中所述生長之噬菌體-Fab上清液之稀釋液塗覆於培養盤維持30分鐘。

如實例1中所述來洗滌培養盤且記錄結合信號且加以分析。結果顯示所有具有雙特異性之純系均對其同源標靶具有特異性。將純系D1.5-4及親本純系D1.5用作對照物。(圖2)

實例6

表徵呈游離mIgG形式之具有雙特異性之抗體

使用與上述相同之限制位點及先前為在哺乳動物細胞中短暫表現鼠類IgG所設計之載體，將所有具有雙特異性之純系均重組為mIgG2A以便進一步表徵。

抑制EGFR-NR6細胞中TGF-α l誘導之EGFR磷酸化

為測定七種具有雙特異性之所選抗體是否阻斷TGF-α誘導之EGFR磷酸化，如實例2中所述來處理穩定轉染之EGFR-NR6細胞。圖3中之資料顯示EGFR/HER3及EGFR/HER抗體在高濃度下抑制TGF-α誘導之EGFR磷酸化。市購抗EGFR抗體用作陽性對照物。

對純系D1.5-100及D1.5-103之劑量反應顯示，純系D1.5-100喪失其親本純系(D1.5)抑制EGFR磷酸化之高效能。然而，在此檢定中D1.5-103具有與D1.5類似之效能。

抗EGFR/HER3抗體抑制神經調節蛋白-1結合於HER3

為測定所選抗EGFR/HER3抗體是否可抑制神經調節蛋白-1結合於HER3-ECD-Fc蛋白，在放射性標記之配位體結合檢定中測試純化之IgG。

在Nunc分裂帶孔(Nunc break-apart strip well)中進行結合檢定。在4℃下用100 μl含有5 mg/ml山羊抗人類Ab之50 mM碳酸鹽緩衝液(pH 9.6)塗布培養盤隔夜。用洗滌緩衝液(PBS/0.005% Tween20)沖洗培養盤兩次且用100 μl 1% BSA/PBS阻斷30分鐘。移除緩衝液且各孔與200 ng HER3-ECD-Fc之1% BSA/PBS溶液培育1.5小時。用洗滌緩衝液沖洗培養盤三次且使含於1% BSA/PBS中之抗體在4℃下預結合於HER3-IgG隔夜。添加^{125}I-HRG且在室溫下培育培養盤2小時。沖洗培養盤三次且使用100系列Iso Data γ-計數器對個別孔計數。(圖4)結果顯示所有七種對EGFR及HER3具有雙特異性之抗體均可抑制神經調節蛋白-1結合於HER3-ECD-Fc。

抗EGFR/HER4抗體抑制神經調節蛋白-1結合於HER4

為測定所選抗EGFR/HER4抗體D1.5-400是否可抑制神經調節蛋白-1結合於HER4-ECD-Fc，進行如上所述之配位體結合檢定。使用25 ng HER4-ECD-Fc來代替HER3-ECD-Fc。結果顯示D1.5-400抑制神經調節蛋白-1結合於HER4。

抑制MCF7細胞中神經調節蛋白-1誘導之HER2/HER3磷酸化

為測定七種對EGFR及HER3具有雙特異性之所選抗體是否可抑制MCF7細胞中神經調節蛋白-1誘導之HER2/HER3磷酸化，在受體磷酸化檢定中對該等抗體加以測試：將MCF-7(ATCC HTB 22, Manassas, Va.)塗於12孔培養盤中。在血清饑餓之後，將細胞與指定抗體(75 μg/ml或150 μg/ml)一起培育2小時。用0.5 nM HRG刺激細胞8分鐘且在SDS-PAGE上運作全部細胞溶胞物且以抗磷酸化HER3、抗pTyr或抗微管蛋白作為內參考物來探測西方墨點。(圖5)結果顯示所有抗EGFR/HER3抗體在高濃度下均抑制神經調節蛋白-1誘導之EGFR/HER3磷酸化。帕妥珠單抗(Pmab)用作陽性對照物。

抑制MDA-175細胞增殖

為測定抗EGFR/HER3抗體對HRG驅動之細胞生長的生長抑制潛力，將MDA-175細胞(ATCC HTB 25, Manassas, Va.)(20000個細胞/孔)塗於96孔培養盤中。次日用含有各種濃度抗體(至多50 μg/ml)之含1%血清培養基同時處理細胞。4天或5天之後，添加阿拉馬藍且使用螢光計偵測螢光。結果以RFU表示。選擇MDA-175細胞，因為其生長為

HRG刺激自分泌之結果。抗EGFR/HER3抗體D1.5-100及純系D1.5-122顯示抑制MDA-175細胞生長。帕妥珠單抗(Pmab)用作陽性對照物。(圖6)

實例7

D1.5-100及1.5-103、抗hEGFR/HER3雙特異性抗體之突變誘發定位研究

使用組合噬菌體呈現文庫(Vajdos等人，J. Biol. Biol. 320:415-28 (2002))進行丙胺酸及同系物鳥槍式掃描分析以研究各抗體與其兩個抗原EGFR及HER3之間的相互作用。

對抗原(hEGFR及HER3)進行結合選擇以分離功能純系、隨後進行DNA定序能夠對各不同位置之野生型/突變型比率進行計算。接著利用此等比率測定所掃描之各側鏈對EGFR及HER3結合之作用。

結果能夠對結合EGFR及HER3之功能互補位進行定位。

D1.5-100及D1.5-103鳥槍式文庫設計

使用噬菌體呈現文庫掃描CDR中暴露於溶劑之殘基，其中使野生型殘基變化為丙胺酸或野生型(丙胺酸掃描)或變化為同系物殘基或野生型(同系物掃描)。除Wt/丙胺酸或Wt/同系物殘基之外，遺傳密碼子之性質需要文庫中包括一些其他取代。構築各別的重鏈及輕鏈丙胺酸及同系物掃描文庫。簡幷範圍為1.3×10^5至7.5×10^7。

構築鳥槍式掃描文庫

如前所述構築文庫，例外之處為藉由kunkel突變誘發(Oligo F220: TCT TGT GAC AAA ACT CAC AGT GGC GGT

GGC TCT GGT)(SEQ ID NO: 77)自原始質體移除白胺酸拉鏈之後，使單一Fab表現於與M13基因-3小鞘蛋白之C端域融合之噬菌體的表面上。

輕鏈丙胺酸及同系物掃描文庫在HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3中具有終止密碼子，且重鏈丙胺酸及同系物文庫在各重鏈HVR中含有終止密碼子。藉由先前所述之方法(Sidhu等人，J. Mol. Biol. 338:299-310 (2004))，使用Kunkel突變誘發(Kunkel等人，1987，同上文)在各別終止模板上構築文庫。丙胺酸掃描文庫為噬菌體呈現文庫，其使所選側鏈變化為野生型或丙胺酸。同系物掃描意謂噬菌體呈現文庫使所選側鏈變化為野生型或類似胺基酸。

文庫選擇

用5 μg/ml捕捉標靶(EGFR-ECD-Fc、HER3-ECD-Fc或蛋白質-L)塗布NUNC 96孔Maxisorp免疫培養盤且用1% BSA(w/v)之PBS溶液阻斷。如(Lee等人，2004，同上文)所述，用KO7輔助噬菌體(NEB)增殖選自上述文庫之噬菌體。將文庫噬菌體溶液以10^{13}個噬菌體粒子/毫升之濃度添加至所塗培養盤中且在室溫下培育1-2小時。用PBST洗滌培養盤8次且接著以0.1 M HCl溶離所結合之噬菌體30分鐘。如前所述測定各輪選擇後之富集。在2輪標靶選擇之後，自各文庫選擇多個隨機純系以便如(Sidhu等人，2004，同上文)所述進行定序。

利用結合純系之DNA序列測定各不同位置之野生型/突變比率。利用比率評估各所選側鏈對抗原之結合作用。將

抗原選擇所得之wt/mut比率除以呈現選擇所得之wt/mut比率可定量評估各突變對抗原結合親和力之影響(功能比$F_{wt/mut}$)。若該比率大於1，則突變為有害的。若該比率小於1，則突變為有利的。對2500種純系定序。

基於丙胺酸及同系物掃描結果，在已知抗HER2抗體4D5-Fv之結構上對結合EGFR及HER3之抗體D1.5-100之熱點定位。如圖7中所示，定位表明對於EGFR結合係重鏈起主導作用，且對於HER3結合係重鏈與輕鏈共同起作用。酸性(E、D)殘基對結合EGFR與HER3，尤其結合HER3起重要作用。

親和力成熟

圖8說明使用上述鳥槍式文庫對D1.5-100進行親和力成熟。在此親和力成熟策略中，如前所述分選D1.5-100重鏈同系物文庫。在HER3-ECD-Fc所塗培養盤上進行兩輪培養盤分選與三輪溶液選擇之後，在遞增之嚴格度下分選出標靶(EGFR-ECD及HER3-ECD-Fc)。挑選單一純系且在單點ELISA中加以評估以分離保持雙結合活性之純系。在所評估之94種純系中有79種顯示結合EGFR/HER3，而11種喪失EGFR結合且顯示特異性結合HER3。

藉由單點競爭分離純系

挑選最後一輪分選所得之單一菌落且如實例1中所述使噬菌體生長。用1 μl/ml之EGFR-ECD-Fc塗布384孔。為使各菌落生長，將25 μl噬菌體上清液或ELISA緩衝液與25 μl EGFR-ECD(50 nM)及HER3-ECD-Fc(10 nM)一起培育。將4

μl培育物添加至EGFR-ECD-Fc所塗培養盤中，且將培養盤洗滌八次。添加60 μl 1/5000抗M13-HRP結合物抗體，將培養盤洗滌八次且用TMB+H_3PO_4顯色。

使用以下單點競爭方案來選擇八種顯示對EGFR及HER3之抑制大於D1.5-100之獨特純系：

1.挑選最後一輪分選所得之單一菌落且如前所述使噬菌體生長；

2.用1 μg/ml之EGFR-ECD-Fc塗布384孔培養盤；

3.為使各菌落生長，將25 μl噬菌體上清液或ELISA緩衝液與25 μl EGFR-ECD(50 nM)及HER3-ECD-Fc(10 nM)一起培育；

4.將4 μl培育物添加至EGFR-ECD-Fc所塗培養盤中；

5.將培養盤洗滌8次；

6.添加60 μl 1/5000抗M13-HRP結合物抗體；

7.將培養盤洗滌8次；

8.用TMB+H_3PO_4使培養盤顯色。

選擇8種顯示對EGFR與HER3之抑制大於D1.5-100之獨特純系(DL6，SEQ ID NO: 63；DL7，SEQ ID NO: 64；DL8，SEQ ID NO: 65；DL9，SEQ ID NO: 66；DL10，SEQ ID NO: 67；DL11，SEQ ID NO: 28；DL12，SEQ ID NO: 68；DL13，SEQ ID NO: 69)。對於抗HER3抗體，選擇7種顯示對HER3之抑制大於D1.5-100之獨特純系。

表徵親和力成熟雙特異性及抗HER3抗體

藉由直接結合於一組多種蛋白質來評估所選親和力成熟

雙特異性抗體之結合特異性，如實例5中所述。如圖9中所示，所選抗體對EGFR與HER3顯示結合特異性。

如實例1中所述計算兩種所選雙特異性抗體(DL7及DL11)之IC50值且與D1.5-100親本純系相比較。兩種所選雙特異性抗體對HER3-ECD-Fc顯示相似之親和力且對EGFR顯示提高之親和力。DL1.5-100對EGFR-ECD之IC50為44 nM，對HER3-FC之IC50為0.1 nM；DL7對EGFR-ECD之IC50為6.1 nM，對HER3-FC之IC50為0.25 nM；DL11對EGFR-ECD之IC50為5.7 nM，對HER3-FC之IC50為0.43 nM。

如前所述藉由直接結合於一組多種蛋白質來評估所選抗HER3抗體之結合特異性。所選抗體(DL3.5、DL3.6、DL3.7)僅對HER3顯示結合特異性。

如上所述計算所選抗體之噬菌體IC50值且與D1.5-100親本純系相比較。所有抗體(DL3.1-3.7)對HER3-ECD-Fc均顯示提高之親和力，其中IC50在1 nM與3.8 nM之間。親本DL1.5-100具有4.6 nM之IC50。

使用上述競爭ELISA對所選雙特異性抗體及抗HER3抗體之結合與HER3域III蛋白質(N端His標籤)之結合進行比較。EGFR/HER3與單特異性抗HER3抗體對HER3 ECD-Fc及HER3域III構築體具有相似親和力(噬菌體IC50)。

將所選親和力成熟雙特異性抗體及抗HER3抗體重組為mIgG2A且如上所述在競爭ELISA中確認。與D1.5-100親本純系相比，mIgG2A雙特異性抗體對EGFR-ECD與HER3域

III顯示提高之親和力。

使用BIAcore 300對親和力成熟之EGFR/HER3抗體DL7及DL11以及抗HER3特異性抗體DL3.6及DL3.7進行動力學分析，將各抗體(DL1.5-100、DL7、DL11、DL3.6、DL3.7)之純化mIgG2A偶合於CM5晶片上，且使抗原(EGFR-ECD、HER3域III、HER3-ECD)之多種稀釋液在實例4中所述之條件下在所塗晶片上流動。每次抗原注射之間再生CM5晶片。最後使用1:1結合分析與質量轉移來測定KD。親和力成熟EGFR/HER3抗體DL7及DL11對兩種標靶均具有改良之KD(M)。

為評估親和力成熟抗體DL7、DL11及親本抗體D1.5對EGFR之抑制功能，用各種量之抗體(至多20 μg/ml)將僅表現EGFR之EGFR-NR6細胞預處理一小時且隨後由TGFα(5 nM)誘導EGFR磷酸化。使用抗磷酸化酪胺酸抗體偵測抗體對受體磷酸化之抑制。MAPK活化之抑制亦呈劑量依賴性方式。抗體DL11抑制EGFR及ERK1/2磷酸化比DL7更有效。(圖10A)

比較DL7、DL11及單特異性抗HER3抗體DL3.6對HER3轉活化(transactivation)之抑制功能(圖10B)。用指定量之抗體(至多50 μg/ml)預處理表現HER2、HER3及EGFR之MCF-7細胞一小時，且由HRG誘導HER3活化及HER3轉磷酸化。使用抗磷酸化HER3抗體偵測對HER3磷酸化之抑制。下游信號傳導分子ERK1/2以及Akt之抑制呈劑量依賴性方式。DL11又比DL7更有效。

將DL11之生長抑制功能與市購抗EGFR抗體帕妥珠單抗及抗HER3抗體之生長抑制功能或DL3.6、D1.5或D1.5與DL3.6組合的生長抑制功能相比較。用HRG(3 nM)刺激H1666細胞(ATCC CRL-5885, Manassas, Va.)(一種表現HER2、HER3、EGFR及EGFR配位體之NSCLC細胞株)(6000個細胞/孔)生長。以劑量依賴性方式測試抗體且與所有其他單特異性抗體之生長抑制特徵相比較。如圖11A中所示，DL11抑制細胞生長的程度大於單特異性抗體或其組合。

當使用經HRG(3 nM)+TGFα(6 nM)刺激生長之H1666細胞重複檢定時獲得類似結果。(圖11B)

將DL11對HCA-7細胞之生長抑制功能與抗EGFR抗體帕妥珠單抗及抗HER3抗體或DL3.6、D1.5或D1.5與DL3.6組合對HCA-7細胞之生長抑制功能相比較。HCA-7為表現HER2、HER3及EGFR之結腸直腸細胞株。在1%血清存在下用HRG(3 nM)刺激細胞生長。以劑量依賴性方式測試抗體且3天後使用阿拉馬藍試劑偵測細胞存活率。如圖12A中所示，DL11顯示比所有其他處理優良之生長抑制特徵。

如聯繫圖12A所述研究對HCA-7細胞生長之抑制，例外之處為用HRG(3 nM)加TGFα(5 nM)刺激生長。如圖12B中所示，DL11顯示比所有其他處理優良之生長抑制特徵。

研究與抗EGFR抗體帕妥珠單抗及抗HER3抗體相比，DL11對Calu-3生長之抑制。NSCLC細胞株Calu-3(ATCC HTB-55, Manassas, Va.)過度表現HER2且具有正常含量之

HER3及EGFR。在1%血清存在下用HRG(3 nM)刺激細胞生長(10,000個細胞/孔)，且以劑量依賴性方式測試抗體。如圖13中所示，DL11顯示比單特異性抗體優良之活性。

實例8

對D1.5-201及D1.5-201-2(抗hEGFR/HER2雙特異性抗體)之突變誘發定位研究

對D1.5-201進行親和力成熟時，針對所選胺基酸設計輕鏈軟/同系物文庫。將一些軟殘基軟隨機化，其中野生型殘基頻率為50%。使用編碼野生型殘基或同系物殘基之密碼子使一些殘基隨機化。一些同系物隨機化允許存在除野生型及同系物外之1或2個額外殘基。最終，一些殘基未改變。

圖14說明用於D1.5-201親和力成熟的另一分選策略。在此策略中，如前所述分選D1.5-201輕鏈軟/同系物文庫。在遞增之嚴格度下對HER2/ECD進行三輪交替培養盤/溶液分選之後，挑選單一純系且在單點ELISA中加以評估以分離對EGFR及HER2保持雙結合活性之純系。在所評估純系中，77/192顯示結合EGFR與HER2。

測定所選親和力成熟EGFR/HER2雙特異性抗體之輕鏈可變區之序列(D1.5-201(SEQ ID NO: 36)、D1.5-201-2(SEQ ID NO: 37)、D1.5-201-3(SEQ ID NO: 38))。如前所述計算兩種所選親和力成熟雙特異性抗體(D1.5-201-2、D1.5-201-3)之噬菌體IC50且與D1.5-201親本純系相比較。兩種親和力成熟雙特異性抗體均對HER2-ECD及EGFR-ECD顯

示提高之親和力。

實例9

DL11親和力成熟

如上所述進一步對DL11進行親和力成熟，產生兩種對EGFR及HER3具有特異性之其他雙特異性抗體(DL11b及DL11f)及兩種對HER3具有特異性之抗體(DL3-11fb及DL3-11f)。DL11b之重鏈及輕鏈胺基酸序列分別展示於SEQ ID NO: 12及13中。DL11f之重鏈及輕鏈胺基酸序列分別展示於SEQ ID NO: 14及13中。DL3-11b之重鏈及輕鏈胺基酸序列分別展示於SEQ ID NO: 19及13中，且DL3-11f之重鏈及輕鏈胺基酸序列分別展示於SEQ ID NO: 20及13中。

Biacore親和力檢定

在以下Biocore檢定中測定DL11b及DL11f對其EGFR及HER3標靶之結合親和力。與DL11相比，DL11b與DL11f均對其標靶顯示改良之親和力。

在BIAcore™ 2000儀器(GE Healthcare, BIAcore Life Sciences, Piscataway, NJ)上使用表面電漿共振進行量測。將編碼人類EGFR(胺基酸1-637)及人類HER3(胺基酸1-640)之細胞外域(ECD)的cDNA選殖於含有編碼人類IgG1之Fc區的序列之哺乳動物表現載體中以產生人類Fc融合蛋白。藉由短暫性轉染中國倉鼠卵巢細胞來產生重組人類EGFR-IgG1(2.65 mg/ml)、人類HER3-IgG1(3.35 mg/ml)且經由蛋白質A親和力層析加以純化。將編碼人類EGFR之細胞外域(胺基酸1-637)的cDNA選殖於含有N端旗標序列(N-terminal

flag sequence)之哺乳動物表現載體中。

測定呈Fab與IgG抗體形式之DL11f的結合親和力。對於Fab檢定，DL11f Fab為分析物且在CM5晶片上流動，在晶片上使用BIAcore人類抗體捕捉套組(BR-1008-39，批次10020611)首先捕捉不同配位體(人類EGFR-Fc及人類HER3-Fc)。在25℃下以30微升/分鐘之流速注射DL11f Fab於PBS(0.05% Tween20)中之2倍連續稀釋液(在0.244-250 nM範圍內)。在Fc融合物配位體及分析物每次注射之間，使用3 M氯化鎂(5 μl，流速為10微升/分鐘)使感應晶片再生。為測定DL11f Fab對人類EGFR及人類HER3 Fc融合蛋白之親和力常數，自所觀測之測試感應圖中扣減來自參考細胞之信號。使用製造商提供之BIAcore評估軟體4.1版(GE Healthcare)，根據1:1朗繆爾結合模型藉由非線性回歸擬合數據來計算動力學常數。代表性濃度之DL11f Fab(125 nM)的兩次重複測定對於所有Fc融合蛋白均得到極類似之擬合及動力學常數。DL11f Fab以1.92 nM之KD值結合於人類EGFR-Fc且以0.39 nM之KD值結合於人類HER3-Fc。

探究第二實驗條件以獲得呈IgG形式之DL11f的結合動力學。此處，將DL11f人類IgG1固定於感應晶片CM5上，且將單體人類EGFR-ecd及人類HER3-ecd用作分析物。在25℃下以30微升/分鐘之流速注射人類EGFR-ecd及人類HER3-ecd於PBS(0.05% Tween20)中的2倍連續稀釋液(在0.244-250 nM範圍內)。如針對Fab來測定結合動力學。

DL11f分別以19.9 nM及2.63 nM之KD值結合於人類EGFR-ecd及人類HER3-Fc。在兩個實驗中，均觀測到DL11f抗體對HER3之親和力始終為對EGFR之親和力的5-8倍。實驗2中所見之對兩種受體的親和力均比實驗1更弱的原因可在於EGFR ecd或HER3 ecd呈分析物形式含於溶液中與受體呈Fc融合物形式固定於流動室晶片上之間的差異。此等呈游離ECD形式之多域受體當含於溶液中時可能會遭遇結合能之較多熵損失(entropic penalty)，因此產生較弱親和力。

在各別Biacore分析中，在類似條件下，DL11b對EGFR及HER3顯示的結合親和力與DL11f類似。

DL3-11b及DL3-11f損失特異性結合於EGFR之能力，而保留特異性結合於HER3之能力。

抑制MDA-175細胞增殖

如上所述研究DL11b及DL11f對MDA-175細胞增殖之抑制。DL11b與DL11f抑制MDA-175細胞增殖的程度均與DL11抗體類似。圖15。DL11、DL11f及DL11b之IC50均為約0.8-1.0 μg/ml。

抑制MCF7中神經調節蛋白-1誘導之HER3磷酸化

為測定DL11f是否可抑制MCF7細胞中神經調節蛋白-1誘導之HER3磷酸化，如實例6所述進行受體磷酸化檢定。結果顯示DL11f以劑量依賴性方式抑制神經調節蛋白-1誘導之HER3磷酸化。圖16。

抑制穩定轉染之EGFR-NR6細胞中TGF-α誘導之EGFR磷

酸化

為測定DL11f是否選擇性阻斷TGF-α誘導之EGFR磷酸化，如實例2中所述進行受體磷酸化檢定。圖16中之資料顯示DL11f在此基於細胞之檢定中以劑量依賴性方式抑制TGF-α誘導之EGFR磷酸化。

DL11及DL11f在活體內模型中抑制腫瘤生長

使用HCA-7腫瘤移植模型檢定法測定DL11及DL11f對活體內腫瘤生長之影響。如下進行檢定。

將HCA-7腫瘤片皮下移植於SCID米色小鼠(Charles River Laboratories, San Diego, CA)中。當腫瘤達到100至250 mm^3之平均體積時，將腫瘤尺寸類似之小鼠隨機分為如下處理組(n=9個/組)：媒劑(PBS)、帕妥珠單抗(10 mg/kg)、D1.5(25 mg/kg)、D1.5+DL3.6(各25 mg/kg)、DL11(25 mg/kg)或DL11f(25 mg/kg)。腹膜內投與處理，開始為隨機分組當天之2倍速效劑量(20或50 mg/kg)且每週一次繼續處理總共三次。研究期間一週兩次以測徑規量測腫瘤。將小鼠圈養於標準之齧齒動物微隔離籠(rodent microisolator cage)中。設定動物房間之環境控制以保持約70°F之溫度，約40%-60%之相對濕度及約14小時亮/10小時暗之循環。根據ILAR實驗動物管理及使用指南(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)來維持小鼠，且該研究已由Genentech之機構動物管理及使用委員會(Institutional Animal Care and Use Committee/IACUC)審查及批准。

DL11與DL11f在此異種移植模型中可同等有效地減小平

均腫瘤體積。圖17。

DL11f在非小細胞肺癌模型中具有活性

在具有源自人類NSCLC細胞株H358(ATCC CRL-5807, Manassas, Va.)之已建立腫瘤的小鼠中測試抗體。以基質膠(matrigel)將5×10^6個H358細胞皮下接種於CB17 SCID小鼠中。將腫瘤尺寸類似之動物隨機分為如下處理組(n=9個/組)：媒劑(DL11f調配物緩衝液)、D1.5(25 mg/kg)、DL3.11b(25 mg/kg)、DL11f(30 mg/kg)或D1.5+DL3.11b(各25 mg/kg)。腹膜內投與處理，開始為隨機分組當天之2倍速效劑量(50或60 mg/kg)且每週一次繼續處理總共四次。研究期間一週兩次以測徑規量測腫瘤。

如圖18中所示，雙特異性抗體DL11f在此NSCLC模型中具有活性且抑制腫瘤生長比抗EGFR特異性與抗HER3特異性抗體之組合(D1.5+DL3.11b)更有效。

實例10

DL3.6親和力成熟

如上所述進一步對DL3.6進行親和力成熟，產生其他抗HER3抗體。與親本抗體DL3.6相比，DL3.6b對其標靶顯示提高的親和力。DL3.6b之重鏈及輕鏈胺基酸序列分別展示於SEQ ID NO: 17及13中。

如圖19及20中所示，DL3-11b、DL3.6及DL3.6b抑制HRG誘導之HER3磷酸化及MDA-175細胞增殖。如上所述進行檢定。

實例11

Fadu異種移植模型、頭頸鱗狀細胞癌模型中之活體內活性

在具有源自Fadu細胞(ATCC HTB-43, Manassas, Va.)之已建立腫瘤的小鼠中測試市購抗EGFR抗體DL11f及抗HER3抗體。將5×10^6個FaDu細胞皮下接種於CB17 SCID小鼠中。將腫瘤尺寸類似之動物隨機分為如下處理組(n=9個/組)：媒劑(DL11f調配物緩衝液)、抗EGFR抗體(25 mg/kg)、抗HER3抗體(50 mg/kg)及DL11f(25 mg/kg)。腹膜內投與處理，開始為隨機分組當天之2倍速效劑量(分別50或100 mg/kg)且每週一次繼續處理總共四次。研究期間一週兩次以測徑規量測腫瘤。

如圖21中所示，DL11f在FaDu頭頸癌模型中具有活性且抑制腫瘤生長比抗EGFR特異性抗體或抗HER3特異性抗體均更有效。

實例12

BxPC3異種移植模型(一種HER3驅動之胰臟模型)中之活體內活性

在具有源自胰臟細胞株BxPC3(ATCC CRL-1687, Manassas, Va.)之已建立腫瘤的小鼠中測試抗EGFR抗體DL11f及抗HER3抗體帕妥珠單抗。將10×10^6個BxPC3細胞皮下接種於CB17 SCID小鼠中。將腫瘤尺寸類似之動物隨機分為如下處理組(n=8個/組)：媒劑(DL11f調配物緩衝液)、抗EGFR抗體(25 mg/kg)、帕妥珠單抗(25 mg/kg)、抗HER3抗體(50 mg/kg)及DL11f(25 mg/kg)。腹膜內投與處理，開始為隨機分組當天之2倍速效劑量(50或100 mg/kg)

且每週一次繼續處理總共四次。研究期間一週兩次以測徑規量測腫瘤。

DL11f在BxPC3胰臟癌模型中具有活性且延遲腫瘤生長比抗EGFR特異性抗體或抗HER3特異性抗體均更有效。(圖22)

實例13

NSCLC Calu-3異種移植模型中之活體內活性

在具有源自NSCLC株Calu-3(ATCC HTB-55, Manassas, Va.)之已建立腫瘤的小鼠中測試市購抗EGFR抗體DL11f，及抗HER3抗體。將5×10^6個Calu-3細胞皮下接種於SCID米色小鼠中。將腫瘤尺寸類似之動物隨機分為如下處理組(n=9個/組)：媒劑(DL11f調配物緩衝液)、抗EGFR抗體(25 mg/kg)、抗HER3抗體(25 mg/kg)及DL11f(25 mg/kg)。腹膜內投與處理，開始為隨機分組當天之2倍速效劑量(50)且每週一次(抗HER3每週兩次)繼續處理總共四次(八次)。研究期間一週兩次以測徑規量測腫瘤。

DL11f在Calu-3非小細胞肺癌模型中具有活性且延遲腫瘤生長比抗EGFR特異性抗體或抗HER3特異性抗體均更有效。(圖23)

實例14

表皮A431異種移植模型中之活體內活性

在具有源自表皮樣細胞株A431(ATCC CRL-2592, Manassas, Va.)之已建立腫瘤的小鼠中測試市購抗EGFR抗體DL11f，及抗HER3抗體。將5×10^6個A431細胞皮下接種

於SCID米色小鼠中。將腫瘤尺寸類似之動物隨機分為如下處理組(n=8個/組)：媒劑(DL11f調配物緩衝液)、抗EGFR抗體(12.5 mg/kg)、抗HER3(50 mg/kg)及DL11f(12.5及25 mg/kg)。隨機分組當天腹膜內一次性投與處理。研究期間一週兩次以測徑規量測腫瘤。

由於DL11f在小鼠體內比抗EGFR抗體清除更快，因此DL11f係以2倍於抗EGFR抗體之濃度給藥以實現類似之暴露程度。總而言之，DL11f以及抗EGFR抗體在A431表皮癌症模型中抑制腫瘤生長。(圖24)

實例15

帶有來源於患者之乳癌MAXF449之異種移植物的裸小鼠中之活體內活性

在Oncotest GmbH, Freiburg, Germany測試市購抗EGFR抗體DL11f及抗HER3抗體。自供體患者直接移植腫瘤之後，Oncotest使患者腫瘤(如乳腺癌MAXF 449)以裸小鼠之皮下異種移植物形式繼代。根據Oncotest之方案，將腫瘤尺寸類似之動物隨機分為如下處理組(n=10個/組)：DL11f(30 mg)、抗EGFR抗體(30 mg/kg)、抗HER3(60 mg/kg)及媒劑(DL11f調配物緩衝液)。腹膜內投與處理，開始為隨機分組當天之2倍速效劑量(分別60或120 mg/kg)且每週一次繼續處理總共四次。

DL11f及抗HER3在MAXF44乳癌模型中抑制腫瘤生長，而抗EGFR抗體無效(圖25)。

實例16

前列腺DU145異種移植模型中之活體內活性

在Piedmont Research Center, Morrisville根據Piedmont之方案測試市購抗EGFR抗體DL11f及抗HER3抗體。將腫瘤尺寸類似之動物隨機分為如下處理組(n=10個/組)：DL11f(25 mg)、抗EGFR抗體(25 mg/kg)、抗HER3(50 mg/kg)及媒劑(DL11f調配物緩衝液)。腹膜內投與處理，開始為隨機分組當天之2倍速效劑量(分別50或100 mg/kg)且每週一次繼續處理總共四次。DL11f在DU145前列腺癌模型中具有活性且抑制腫瘤生長比抗EGFR特異性抗體或抗HER3特異性抗體均更有效。(圖26)

實例17

帶有來源於患者之卵巢癌OVXF550之異種移植物的裸小鼠中之活體內活性

在Oncotest GmbH, Freiburg, Germany測試市購抗EGFR抗體DL11f及抗HER3抗體。自供體患者直接移植腫瘤之後，Oncotest使患者腫瘤(如卵巢癌OVXF550)以裸小鼠之皮下異種移植物形式繼代。根據Oncotest之方案，將腫瘤尺寸類似之動物隨機分為如下處理組(n=10個/組)：DL11f(30 mg)、抗EGFR抗體(30 mg/kg)、抗HER3抗體(60 mg/kg)及媒劑(DL11f調配物緩衝液)。腹膜內投與處理，開始為隨機分組當天之2倍速效劑量(分別為60或120 mg/kg)且每週一次繼續處理總共五次。

DL11f在OVFX550卵巢癌模型中具有活性。(圖27)

實例18

DL11f在活體外及活體內介導抗體依賴性細胞之細胞毒性(ADCC)

DL11f在活體外介導ADCC。將A431、H292(ATCC CRL-1848, Manassas, Va.)、FaDu、BxPC3及MDA 468(ATCC HTB-132, Manassas, Va.)細胞(皆獲自ATCC)塗於存在指定濃度抗體之96孔培養盤中。在37℃下預培育30分鐘之後，添加所分離之末梢血液單核細胞(PBMC)且在37℃下繼續再培育4小時。4小時之後，離心培養盤且收集上清液。根據Promega CytoTox-One均質膜完整性檢定程序測定上清液中之LDH活性。為測定細胞介導細胞毒性之百分比，計算平均吸光度且扣減本底吸光度。如圖28中所示，DL11f以劑量依賴性方式減輕表現EGFR之細胞株的ADCC。

將N297A之胺基酸取代引入DL11f中以缺失效應功能。N297為FcRγ及/或補體結合所必需。DL11f-N297A在活體外不顯示ADCC。正如所料，該突變未影響DL11f在活體外之生長抑制功能。(圖29)

在具有源自NSCLC細胞株H292(ATCC CRL-1848, Manassas, Va.)之已建立腫瘤的小鼠中測試DL11f及DL11f-N297A。將5×10^6個A431細胞皮下接種於C.B17-SCID小鼠中。將腫瘤尺寸類似之動物隨機分為如下處理組(n=10個/組)：媒劑(DL11f調配物緩衝液)、DL11f(6 mg/kg)及DL11f-N297A(6 mg/kg)。隨機分組當天腹膜內一次性投與處理。研究期間一週兩次以測徑規量測腫瘤。最初，DL11f及DL11f N297A藉由抑制HER路徑信號傳導而等效

地抑制腫瘤生長。但當劑量減小時，DL11f由於其ADCC能力而顯示比DL11f N297A更長久之抗腫瘤活性。(圖30)

實例19

在獼猴體內DL11f毒性小於西妥昔單抗

進行研究以測定DL11f及西妥昔單抗之相對毒性。將獼猴分為三個組且如下給予DL11f或西妥昔單抗(Capital Wholesale Drug, Columbus, OH)，每週一次歷時六週：

第1組：西妥昔單抗25 mg/kg；

第2組：DL11f 25 mg/kg；

第3組：DL11f 12.5 mg/kg。

所有3個給予西妥昔單抗之動物在第3劑與第4劑之間均產生皮膚病變，表示有毒性。已基於在西妥昔單抗之FDA批准期間所進行之先前獼猴研究預計到此結果。此時，研究中給予DL11f之動物皆未顯示毒性徵兆。

接受25 mg/kg劑量之DL11f的動物之一在第6劑後一週產生皮膚病變。此病變量測為約4 cm×7 cm且為極輕度的且與西妥昔單抗處理之動物中所觀測到之病變相比，侷限於較小區域。

基於此毒物學研究中之毒性動力學參數分析，在給予25 mg/kg各種測試化合物之動物中，西妥昔單抗與DL11f之暴露相似。

在以下條件下進行第二個較大規模研究。

將獼猴分為六個組且如下藉由靜脈內投藥來給予DL11f或媒劑對照物，每週一次歷時十二週：

第1組： 10個猴(5個雄性/5個雌性) 媒劑對照物

第2組： 10個猴(5個雄性/5個雌性) DL11f 5 mg/kg

第3組： 10個猴(5個雄性/5個雌性) DL11f 15 mg/kg

第4組： 10個猴(5個雄性/5個雌性) DL11f 30 mg/kg

第5組： 4個猴(2個雄性/2個雌性) 媒劑對照物

第6組： 4個猴(2個雄性/2個雌性) DL11f 30 mg/kg

在研究期間或在最後給予DL11f後之回收期間，該等動物皆未顯示任何明顯之皮膚毒性。

亦在獼猴中進行單次劑量靜脈內投藥PK研究。在此研究中，每組3個猴靜脈內給予1、10或30 mg/kg DL11f。所探究之劑量範圍的PK呈非線性，與針對其他靶向EGFR之抗體所見之可飽和清除率一致。

本說明書中引用或參考之所有專利、專利申請案、專利申請公開案及其他公開案均以全文引用的方式併入本文中，其引用的程度如同各獨立專利、專利申請案、專利申請公開案或公開案經特定及個別指明以引用的方式併入本文中一般。

【圖式簡單說明】

圖1展示在A431異種移植模型中抗EGFR抗體D1.5抑制腫瘤生長。

圖2展示具有雙特異性之純系的結合特異性。

圖3展示使用具有雙特異性之所選抗體(抗EGFR/HER3及抗EGFR/HER2抗體)抑制TGF-α誘導之EGFR磷酸化。

圖4展示抗EGFR/HER3抗體阻斷神經調節蛋白-1與HER3-ECD-Fc結合。

圖5展示抗EGFR/HER3雙特異性抗體抑制MCF7細胞中HRG誘導之受體磷酸化。

圖6展示抗EGFR/HER3抗體抑制MDA-175細胞之細胞增殖。

圖7為展示4D5-Fv結構上所定位之D1.5-100熱點的影像。

圖8概括使用鳥槍式文庫(shotgun libraries)使D1.5-100 EGFR-HER3抗體親和力成熟之策略。

圖9展示兩種所選親和力成熟抗體(DL7及DL11)對EGFR與HER3均具有特異性。

圖10：A)展示親和力成熟抗體DL7及DL11與親本抗體D1.5對EGFR之抑制功能比較。B)展示親和力成熟抗體DL7及DL11與單特異性抗HER3抗體DL3.6對HER3轉活化(transactivation)之抑制功能比較。

圖11A)提供之曲線圖展示DL11相較於帕妥珠單抗(pertuzumab)、抗EGFR抗體及抗HER3抗體，或DL3.6、D1.5，或D1.5與DL3.6之組合對H1666細胞(一種表現HER2、HER3、EGFR及EGFR配位體、生長經HRG刺激之NSCLC細胞株)之生長抑制功能的比較。B)提供之曲線圖展示DL11相較於帕妥珠單抗、抗EGFR抗體及抗HER3抗體，或DL3.6、D1.5，或D1.5與DL3.6之組合對H1666 HSCLC細胞株(生長經HRG及TGFα刺激)之生長抑制功能的

比較。

圖12A)提供之曲線圖展示DL11相較於pMab、抗EGFR抗體及抗HER3抗體對HCA-7細胞(一種表現HER2、HER3及EGFR之結腸直腸癌細胞株)增殖之抑制。以HRG刺激細胞生長。B)提供之曲線圖展示如圖12A中之HCA-7細胞生長之抑制，例外之處為細胞生長係經HRG加TGFα刺激。

圖13展示Calu-3細胞(一種過度表現HER2且具有正常含量之HER3及EGFR的NSCLC細胞株)增殖之抑制。細胞生長係經HRG刺激且抗體係以劑量依賴性方式測試。

圖14概括D1.5-201之親和力成熟的分選策略。

圖15展示DL11、DL11b及DL11f對MDA-175細胞增殖之抑制。

圖16展示DL11f抑制神經調節蛋白-1誘導之HER3磷酸化及TGFα誘導之EGFR磷酸化。

圖17為展示DL11及DL11f在HCA-7腫瘤移植模型中抑制腫瘤生長之曲線圖。

圖18為展示DL11f在H358 NSCLC異種移植模型中抑制腫瘤生長之曲線圖。

圖19展示DL3-11b、DL3.6b及DL3.6對HRG誘導之HER3磷酸化的抑制。

圖20：DL3-11b、DL3.6b及DL3.6對MDA-175細胞增殖的抑制。

圖21為展示DL11f在FaDu癌症模型中抑制腫瘤生長之曲線圖。

圖22為展示DL11f在BxPC3胰臟癌模型中抑制腫瘤生長之曲線圖。

圖23為展示DL11f在Calu-3非小細胞肺癌模型中抑制腫瘤生長之曲線圖。

圖24為展示DL11f在A431表皮癌模型中抑制腫瘤生長之曲線圖。

圖25為展示DL11f在MAXF44乳癌模型中抑制腫瘤生長之曲線圖。

圖26為展示DL11f在DU145前列腺癌模型中抑制腫瘤生長之曲線圖。

圖27為展示DL11f在OVXF550卵巢癌模型中抑制腫瘤生長之曲線圖。

圖28展示DL11f誘導若干細胞株之ADCC。

圖29展示DL11f-N297A缺乏ADCC活性。

圖30展示DL11f及DL11f-N297A在H292 NSCLC癌症模型中抑制腫瘤生長。

圖31A-C為提供關於針對EGFR拮抗劑療法所觀測到的非臨床及臨床毒性之資訊的表格。

圖32為提供關於皮疹/脫屑及痤瘡/痤瘡樣皮疹之分級之資訊的表格。

圖33提供具有Kabat編號之若干抗HER抗體之重鏈可變域及輕鏈可變域的胺基酸比對。圖33A展示以下抗體之輕鏈可變域：D1(SEQ ID NO: 58)；D1.5(SEQ ID NO: 24)；D1.5-100(SEQ ID NO: 40)；DL11(SEQ ID NO: 27)；

DL11b(SEQ ID NO: 29)；DL11f(SEQ ID NO: 29)。圖33B展示以下抗體之重鏈可變域：D1(SEQ ID NO: 25)；D1.5(SEQ ID NO: 25)；D1.5-100(SEQ ID NO: 25)；DL11(SEQ ID NO: 28)；DL11b(SEQ ID NO: 28)；DL11f(SEQ ID NO: 30)。

序列表

<110> 美商建南德克公司

<120> 抗-HER抗體

<130> P4203

<140> 099108332
<141> 2010-03-19

<150> 61/210562
<151> 2009-03-20

<160> 79

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 1

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 2
<211> 228
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 2

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His
225

<210> 3
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Pro Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 4
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 4

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 5
<211> 220
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 5

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

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

Glu Asn Gly Tyr Ala Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Gly Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Ala Ala Pro Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 6
<211> 220
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 6

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

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

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Ser Thr Phe Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 7
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 7

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Phe Pro Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Ala Pro Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 8
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 8

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Ala Ser Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 9
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 9

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 10
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 10

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Ala Ser Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 11
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 11

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 12
<211> 228
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 12

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His
225

<210> 13
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 13

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Ala Thr Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 14
<211> 228
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 14

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

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

40 45

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His
225

<210> 15
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 15

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 16
<211> 228
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 16

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Ala Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His
225

<210> 17
<211> 228
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 17

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Ala Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His
225

<210> 18
<211> 216
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 18

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Leu Phe Tyr
20 25 30

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

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

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

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Pro Ala
85 90 95

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

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

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

135 140

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

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

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

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

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 19
<211> 228
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 19

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ser Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His
225

<210> 20
<211> 228
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 20

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ser Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His
225

<210> 21
<211> 218
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 21

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

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

Tyr Ile Ala Pro Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Leu
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 22
<211> 218
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 22

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

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

Tyr Tyr Ala Pro Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Tyr Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Leu
85 90 95

Pro Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 23
<211> 218
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 23

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

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

Tyr Phe Ala Pro Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Leu
85 90 95

Pro Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 24
<211> 108
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 24

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Pro Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 25
<211> 121
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 25

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26
<211> 108
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 26

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 27
<211> 108
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 27

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 28
<211> 121
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 28

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 29
<211> 108
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 29

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Ala Thr Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 30
<211> 121
<212> PRT

<220>
<223> 合成

<400> 30

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 31
<211> 108
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 31

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 32
<211> 121
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 32

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Ala Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 33
<211> 121
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 33

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Ala Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

85 90 95

Ala Arg Glu Ala Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 121
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 34

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ser Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 121
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 35

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ser Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
<211> 112
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 36

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

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

Tyr Ile Ala Pro Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Leu
85 90 95

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

<210> 37
<211> 112
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 37

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

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

Tyr Tyr Ala Pro Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Tyr Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Leu
85 90 95

Pro Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 38
<211> 112
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 38

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

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

Tyr Phe Ala Pro Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Leu
85 90 95

Pro Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 39
<211> 110
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 39

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Leu Phe Tyr
20 25 30

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

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

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

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Pro Ala
85 90 95

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

<210> 40
<211> 108
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 40

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 41
<211> 114
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 41

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Leu Gly Asp Ser

20 25 30

Glu Asn Gly Tyr Ala Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Gly Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Ala Ala Pro Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg

<210> 42
<211> 114
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 42

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

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

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Ser Thr Phe Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg

<210> 43
<211> 108
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>

<400> 43

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Phe Pro Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Ala Pro Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 44
<211> 108
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 44

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Ala Ser Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 45
<211> 108
<212> PRT
<213> 人造序列

<223> 合成

<400> 45

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 46
<211> 108
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 46

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Ala Ser Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Pro Glu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 47

Phe Thr Gly Asn Trp Ile His
1 5

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 48

Leu Ser Gly Asp Trp Ile His
1 5

<210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 49

Val Gly Glu Ile Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Asp
1 5 10

<210> 50
<211> 12
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 50

Leu Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp
1 5 10

<210> 51
<211> 12
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 51

Val Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp
1 5 10

<210> 52
<211> 14
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 52

Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Tyr Glu Ala Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 53
<211> 14
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 53

Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 54

Asp Leu Ala Thr Asp Val Ala
1 5

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 55

Asn Ile Ala Thr Asp Val Ala
1 5

<210> 56
<211> 4
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 56

Ser Ala Ser Phe
1

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 57

Ser Glu Pro Glu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 58
<211> 108
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 58

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 59

Phe Ser Gly Asp Trp Ile His
1 5

<210> 60
<211> 12
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 60

Val Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Ala Tyr Thr Asp
1 5 10

<210> 61
<211> 14
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 61

Ala Arg Glu Ala Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 62

Phe Thr Gly Asp Trp Ile His
1 5

<210> 63
<211> 121
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 63

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 64
<211> 121
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 64

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 65
<211> 121
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 65

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 66
<211> 121
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 66

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67
<211> 121
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 67

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Ser Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 68
<211> 121
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 68

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69
<211> 121
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 69

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 70
<211> 45
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(23)
<223> n為A、C、G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> N為G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> n為A、C、G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> N為A或G

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> n為A或G

<400> 70
acttattact gtcagcaann nnnnnnnnst ccttacacgt tcgga 45

<210> 71
<211> 45
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> n為A、C、G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> n為A、C、G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> n為A或G

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> n為G或C

<400> 71
acttattact gtcagcaann ntacnnnnnt ccttacacgt tcgga 45

<210> 72
<211> 45
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> n為A、G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(30)
<223> n為A、C、G或T

<400> 72
acttattact gtcagcaang gnnnnnnnnn ccttacacgt tcgga 45

<210> 73
<211> 45
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> n為G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n為A或C

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> n為A、C、G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> n為G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(39)
<223> n為A、C、G或T

<400> 73
acttattact gtcagcaann tnnnnnnnnn ccttacacgt tcgga 45

<210> 74
<211> 45
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(23)
<223> n為A、C、G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> n為G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(29)
<223> n為A、C、G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> n為G或T

<400> 74
acttattact gtcagcaann nnnnnnnnnn ccttacacgt tcgga 45

<210> 75
<211> 45
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> n為A、G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(26)
<223> n為A、C、G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> n為G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> n為A或G

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> n為G或C

<400> 75
acttattact gtcagcaang gnnnnnnnnt ccttacacgt tcgga 45

<210> 76
<211> 45
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> n為G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n為A或C

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> n為A、C、G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> n為G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(26)
<223> n為A、C、G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> n為G或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> n為A或G

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> n為G或C

<400> 76
acttattact gtcagcaann tnnnnnnnnt ccttacacgt tcgga 45

<210> 77
<211> 36
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 77
tcttgtgaca aaactcacag tggcggtggc tctggt 36

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 78

Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5

<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成

<400> 79

Ser Tyr Pro Thr Pro Tyr Thr
1 5

201036637

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：99108332

※申請日：99、3、19　　※IPC 分類：C07K; A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

抗-HER抗體

ANTI-HER ANTIBODIES

二、中文發明摘要：

本發明提供抗HER抗體，包括多特異性抗HER抗體，包含此等抗體之組合物，及使用此等抗體之方法。本文亦提供EGFR/HER3多特異性抗體，毒性小於傳統EGFR拮抗劑。

三、英文發明摘要：

The invention provides anti-HER antibodies, including multi-specific anti-HER antibodies, compositions comprising and methods of using these antibodies. Also provided herein are EGFR/HER3 multispecific antibodies that are less toxic than traditional EGFR antagonists.

七、申請專利範圍：

1. 一種抗體，其包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體之毒性小於EGFR拮抗劑之毒性。
2. 如請求項1之抗體，其中該毒性為皮膚毒性。
3. 如請求項1之抗體，其中該EGFR拮抗劑為西妥昔單抗(cetuximab)。
4. 如請求項1之抗體，其中該抗體抑制EGFR及HER3中至少一者之生物活性。
5. 如請求項2之抗體，其中該抗體抑制EGF結合於EGFR。
6. 如請求項2之抗體，其中該抗體抑制TGF-α誘導之EGFR磷酸化。
7. 如請求項1之抗體，其中該抗體抑制腫瘤細胞生長。
8. 如請求項1之抗體，其中該抗體結合於EGFR之域III。
9. 如請求項1之抗體，其中該抗體以小於10^{-6} M之Kd結合於EGFR及HER3。
10. 如請求項9之抗體，其中該抗體以小於10^{-6} M之Kd結合於EGFR且以小於10^{-7} M之Kd結合於HER3。
11. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含

(a)包含LSGDWIH之胺基酸序列(SEQ ID NO: 48)的HVR-H1；

(b)包含VGEISAAGGYTD之胺基酸序列(SEQ ID NO: 51)的HVR-H2；及

(c)包含ARESRVSFEAAMDY之胺基酸序列(SEQ ID NO: 53)的HVR-H3；及

(d)包含NIATDVA之胺基酸序列(SEQ ID NO: 55)的HVR-L1；

(e)包含SASF之胺基酸序列(SEQ ID NO: 56)的HVR-L2；及

(f)包含SEPEPYT之胺基酸序列(SEQ ID NO: 57)的HVR-L3。

12. 如請求項1之抗體，其包含

(a)與SEQ ID NO: 30之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之重鏈可變域；

(b)與SEQ ID NO: 29之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之輕鏈可變域；或

(c)如(a)中之重鏈可變域及如(b)中之輕鏈可變域。

13. 如請求項12之抗體，其包含SEQ ID NO: 30之重鏈可變域。

14. 如請求項12之抗體，其包含SEQ ID NO: 29之輕鏈可變域序列。

15. 一種抗體，其包含SEQ ID NO: 30之重鏈可變域序列及SEQ ID NO: 29之輕鏈可變域序列。

16. 如請求項1之抗體，其中該抗體為全長IgG1抗體。

17. 一種分離之核酸，其編碼如請求項1之抗體。

18. 一種宿主細胞，其包含如請求項17之核酸。

19. 一種抗體，其包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含

(a)包含LSGDWIH之胺基酸序列(SEQ ID NO: 48)的

HVR-H1；

(b)包含VGEISAAGGYTD之胺基酸序列(SEQ ID NO: 51)的HVR-H2；及

(c)包含ARESRVSFEAAMDY之胺基酸序列(SEQ ID NO: 53)的HVR-H3；及

(d)包含NIATDVA之胺基酸序列(SEQ ID NO: 55)的HVR-L1；

(e)包含SASF之胺基酸序列(SEQ ID NO: 56)的HVR-L2；及

(f)包含SEPEPYT之胺基酸序列(SEQ ID NO: 57)的HVR-L3。

20. 一種抗體，其包含特異性結合於EGFR及HER3之抗原結合域，其中該抗體包含

(a)與SEQ ID NO: 30之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之重鏈可變域；

(b)與SEQ ID NO: 29之胺基酸序列具有至少95%序列一致性之輕鏈可變域；或

(c)如(a)中之重鏈可變域及如(b)中之輕鏈可變域。

21. 如請求項20之抗體，其包含SEQ ID NO: 30之重鏈可變域。

22. 如請求項20之抗體，其包含SEQ ID NO: 29之輕鏈可變域序列。

23. 一種產生抗體之方法，其包含培養如請求項18之宿主細胞以產生該抗體。

24. 一種免疫結合物(immunoconjugate)，其包含如請求項1之抗體及細胞毒性劑。

25. 一種醫藥調配物，其包含如請求項1之抗體及醫藥學上可接受之載劑。

26. 一種如請求項1之抗體的用途，其用於製造供治療患有癌症之個體的藥物。

27. 如請求項26之用途，其中該癌症包含表現EGFR及HER3之細胞。

28. 如請求項26之用途，其中該癌症係選自由以下組成之群：乳癌、結腸直腸癌、胰臟癌、頭頸癌、黑色素瘤、卵巢癌、前列腺癌及非小細胞肺癌。

29. 一種如請求項1之抗體的用途，其用於製造供抑制個體中HER受體之生物活性的藥物。

30. 如請求項1之抗體，其適用作藥物。

31. 如請求項1之抗體，其用於治療癌症。

32. 如請求項27之抗體，其中該癌症為乳癌、結腸直腸癌、胰臟癌、頭頸癌、黑色素瘤、卵巢癌、前列腺癌或非小細胞肺癌。

33. 如請求項1之抗體，其用於抑制HER受體之生物活性。

八、圖式：

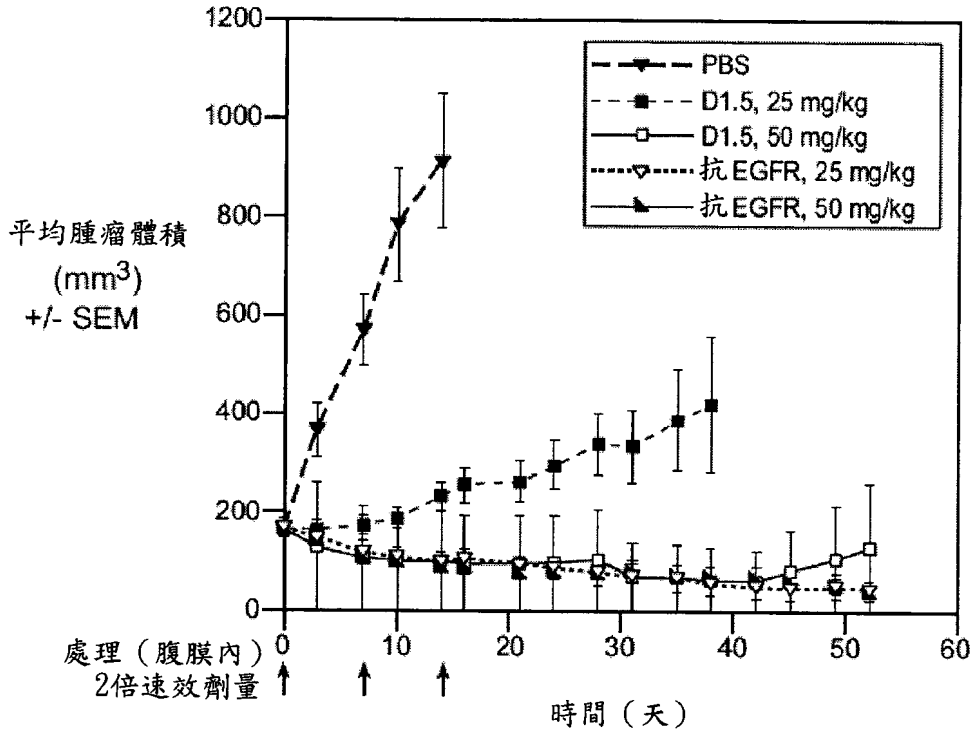

1200
1000
800
600
400
200
0
平均腫瘤體積
(mm3)
+/- SEM
PBS
D1.5, 25 mg/kg
D1.5, 50 mg/kg
抗EGFR, 25 mg/kg
抗EGFR, 50 mg/kg
處理（腹膜內）
2倍速效劑量
0
10
20
30
40
50
60
時間（天）

圖1

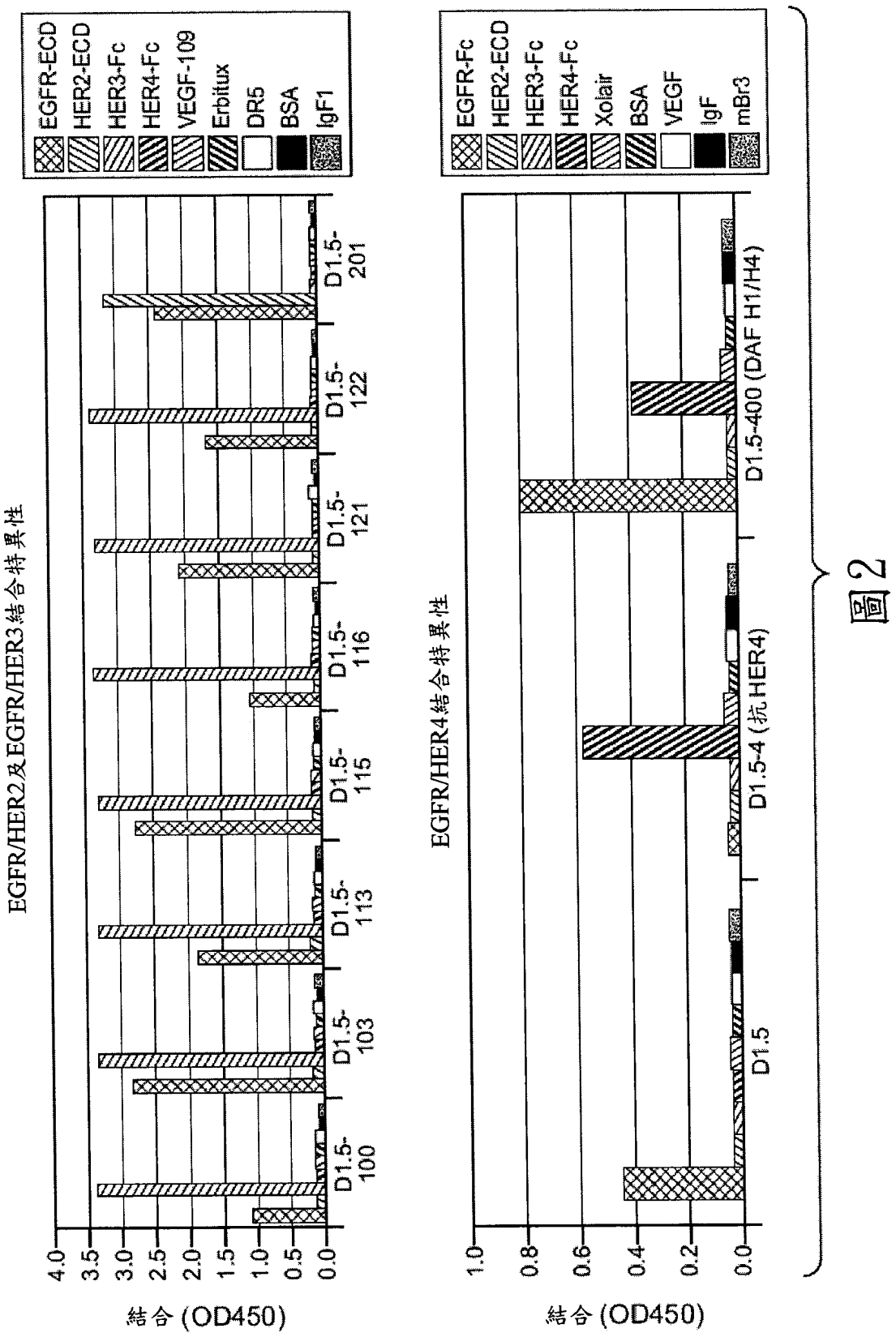

EGFR/HER2及EGFR/HER3結合特異性
EGFR-ECD
HER2-ECD
HER3-Fc
HER4-Fc
VEGF-109
Erbitux
DR5
BSA
IgF1
結合 (OD450)
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
D1.5-100
D1.5-103
D1.5-113
D1.5-115
D1.5-116
D1.5-121
D1.5-122
D1.5-201
EGFR/HER4結合特異性
EGFR-Fc
HER2-ECD
HER3-Fc
HER4-Fc
Xolair
BSA
VEGF
IgF
mBr3
結合 (OD450)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
D1.5
D1.5-4 (抗 HER4)
D1.5-400 (DAF H1/H4)

圖2

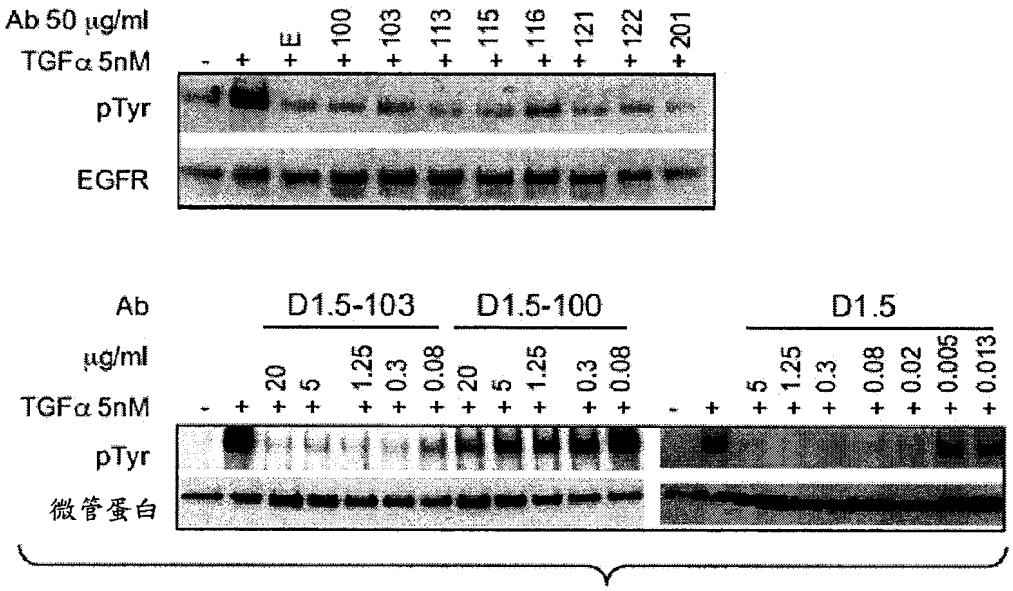

Ab 50 μg/ml
TGFα 5nM
pTyr
EGFR
E
100
103
113
115
116
121
122
201
Ab
D1.5-103
D1.5-100
D1.5
μg/ml
20
5
1.25
0.3
0.08
0.02
0.005
0.013
微管蛋白

圖3

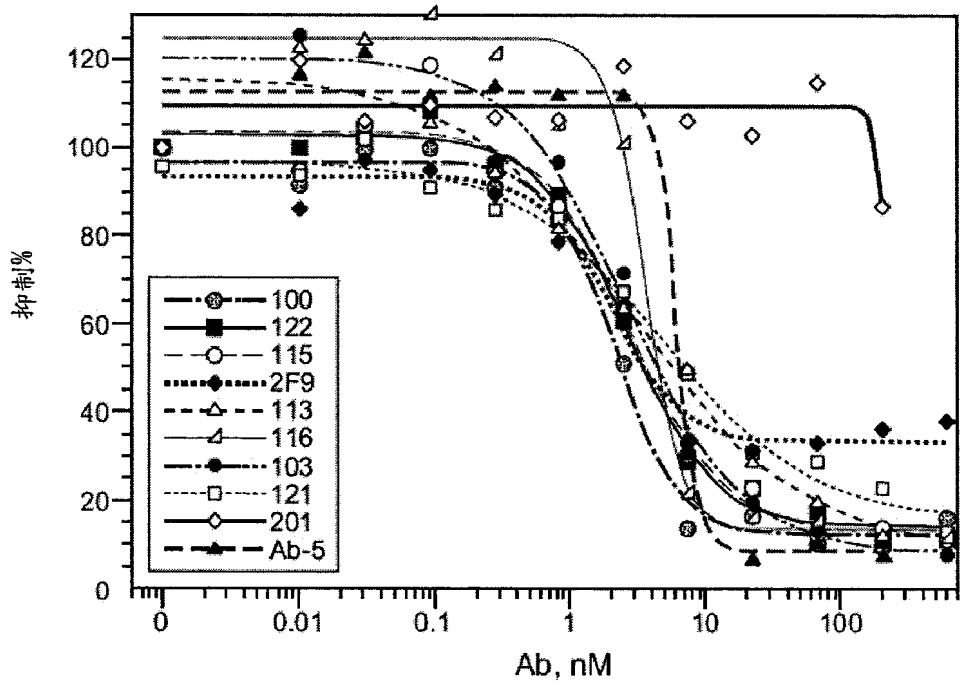

抑制%
Ab, nM
100
122
115
2F9
113
116
103
121
201
Ab-5

圖4

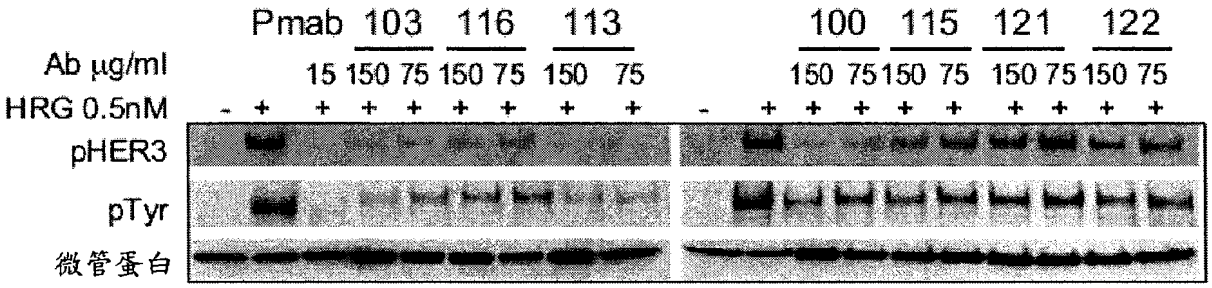
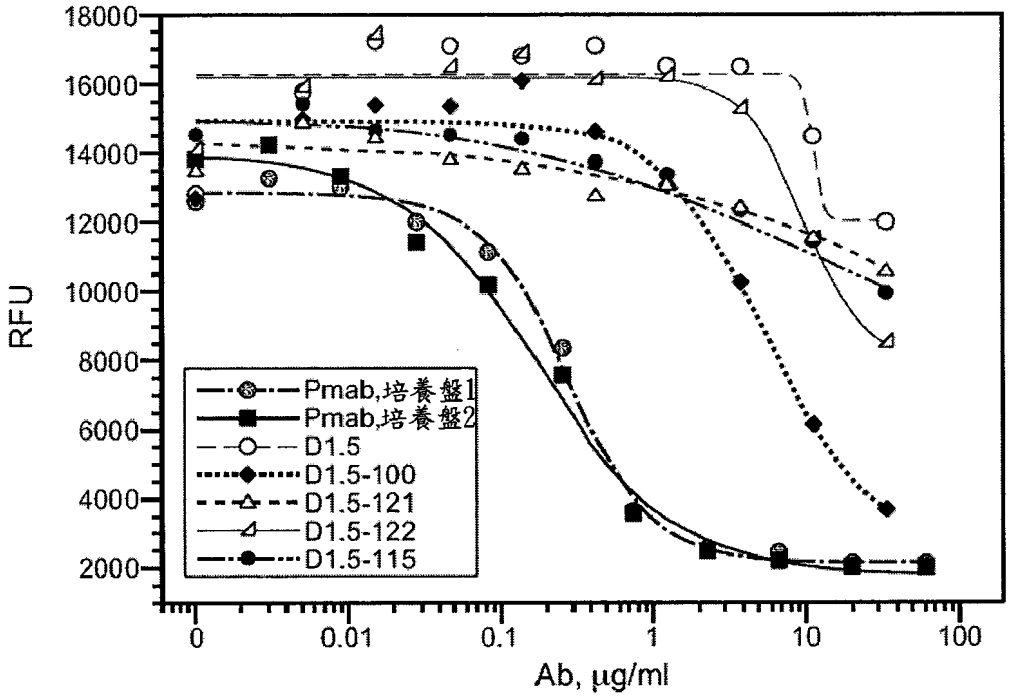

Pmab 103 116 113 100 115 121 122
Ab μg/ml 15 150 75 150 75 150 75 150 75 150 75 150 75 150 75
HRG 0.5nM - + + + + + + + + - + + + + + + + +
pHER3
pTyr
微管蛋白

圖5


18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
RFU
Pmab,培養盤1
Pmab,培養盤2
D1.5
D1.5-100
D1.5-121
D1.5-122
D1.5-115
0
0.01
0.1
1
10
100
Ab, μg/ml

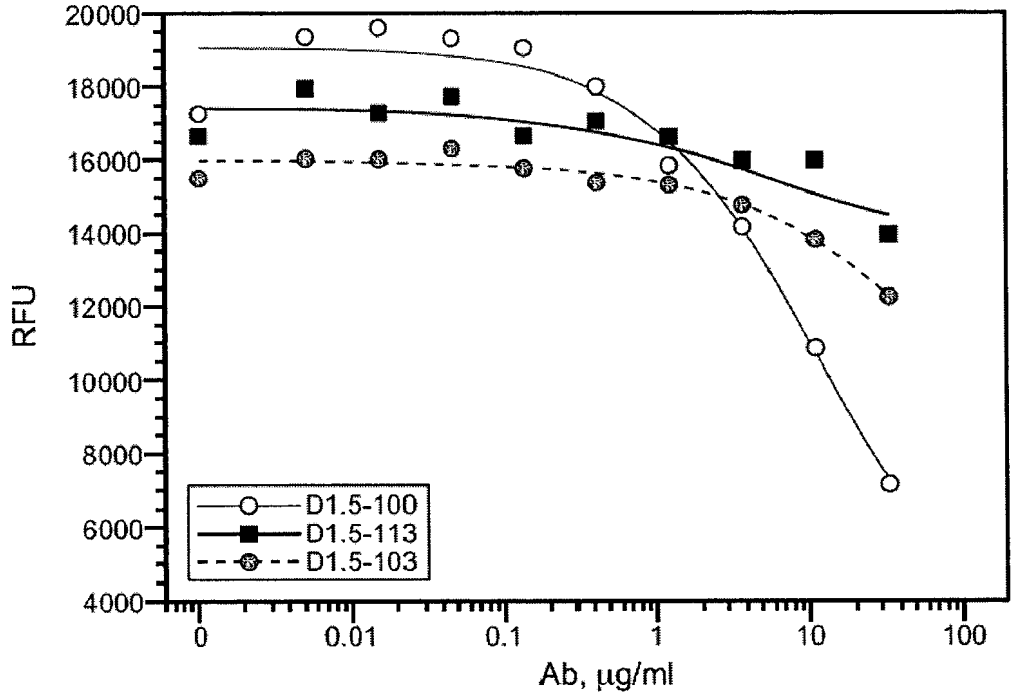
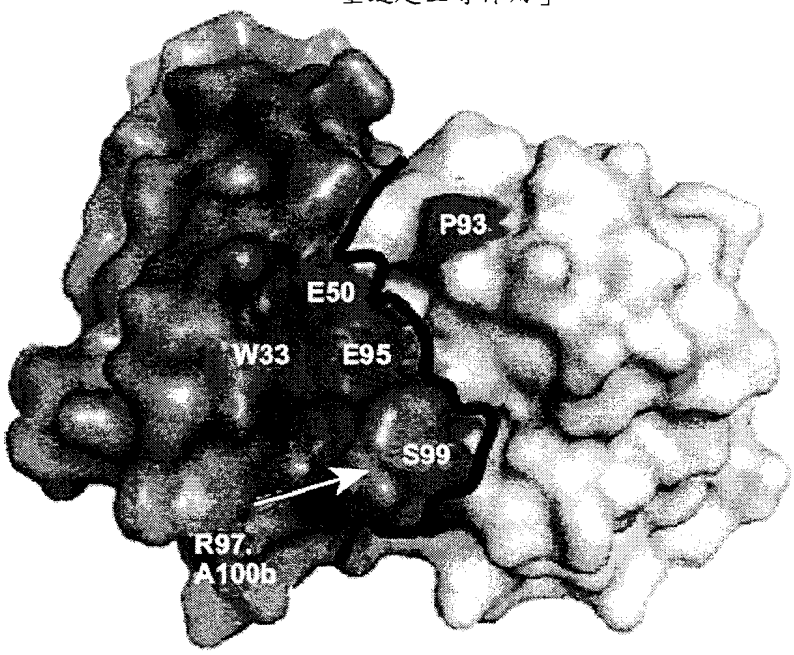

20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
RFU
D1.5-100
D1.5-113
D1.5-103
0
0.01
0.1
1
10
100
Ab, μg/ml

圖6

圖7

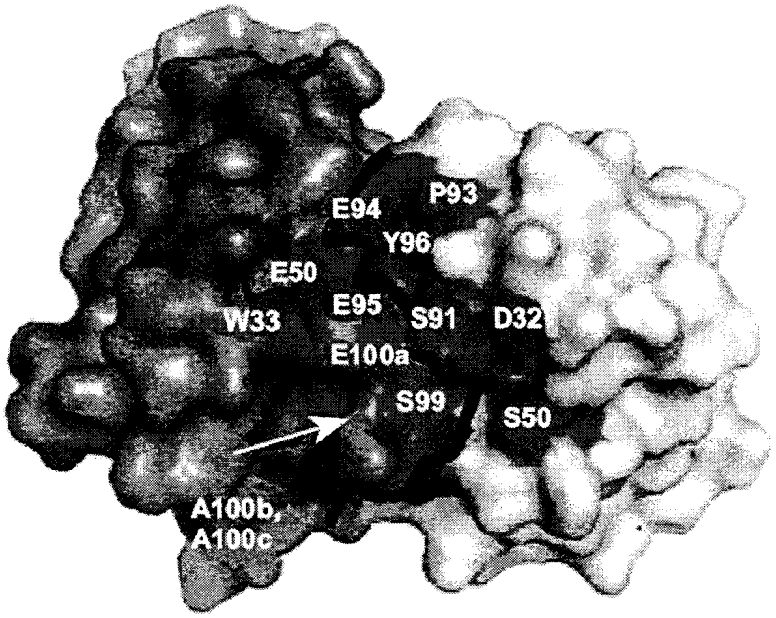
EGFR

「重鏈起主導作用」



HER3

「重鏈與輕鏈共同起作用」



抗體親和力成熟策略

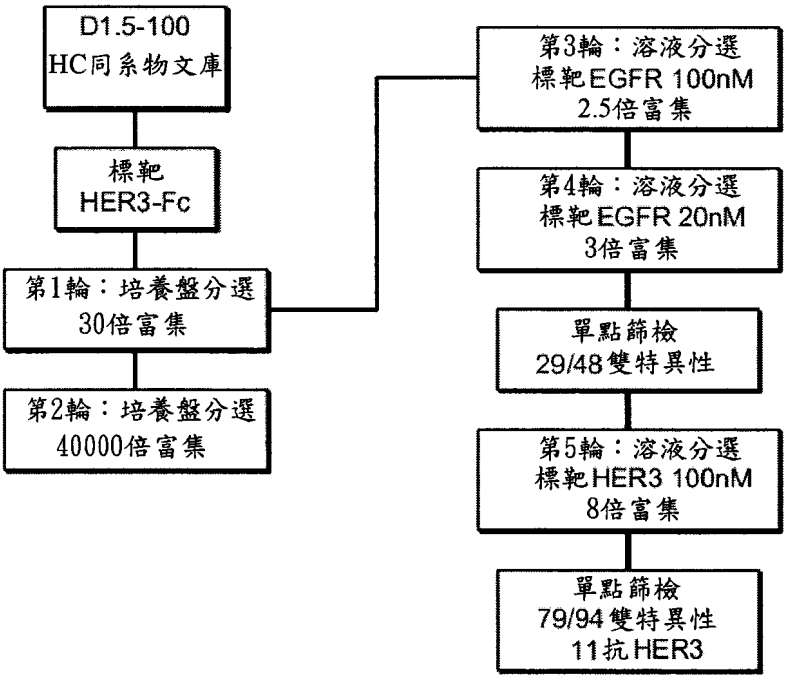


圖8

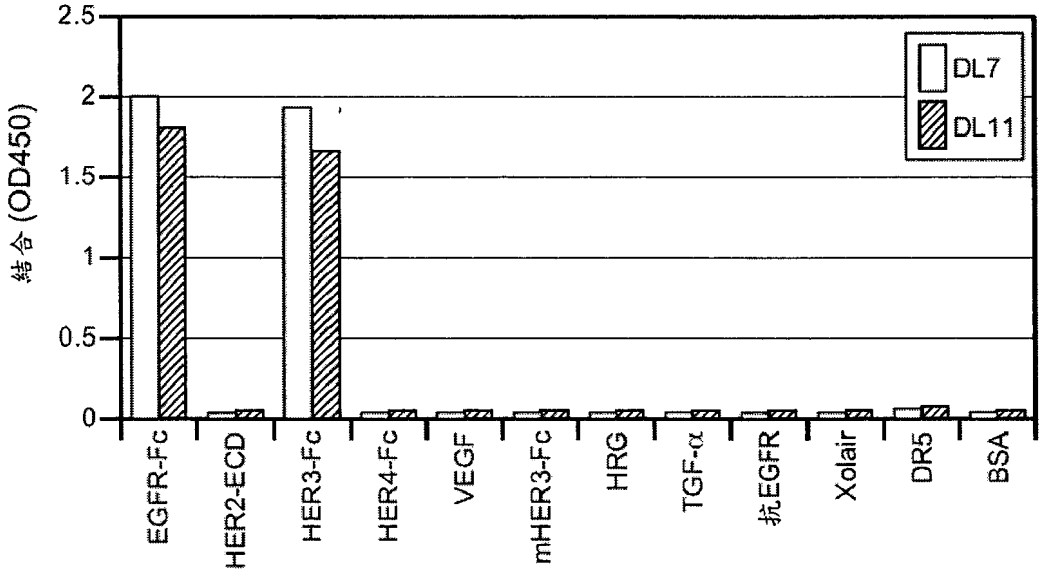


圖9

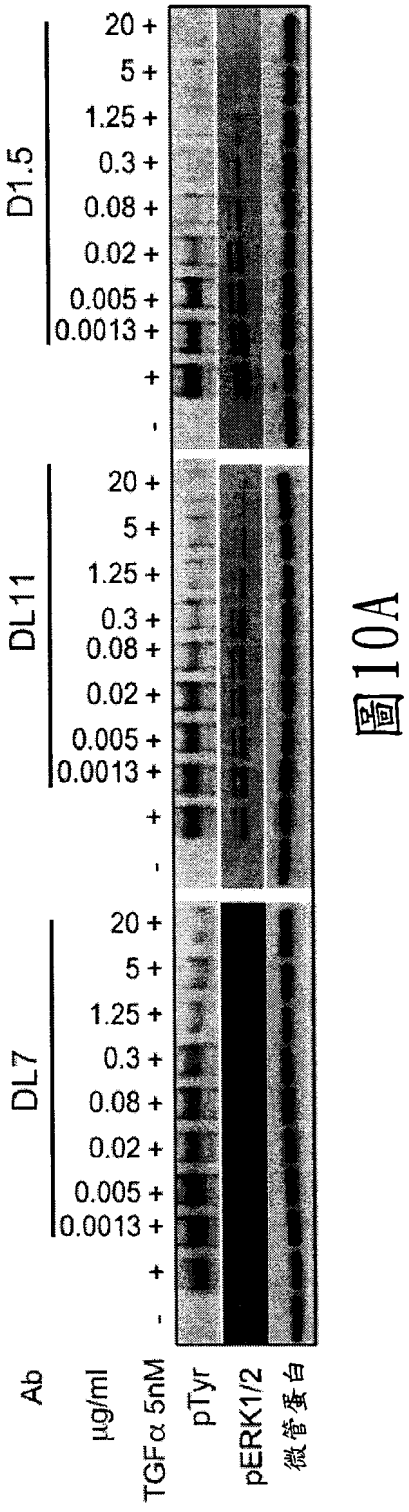

Ab
μg/ml
TGFα 5nM
pTyr
pERK1/2
微管蛋白
DL7
20 +
5 +
1.25 +
0.3 +
0.08 +
0.02 +
0.005 +
0.0013 +
+
-
DL11
20 +
5 +
1.25 +
0.3 +
0.08 +
0.02 +
0.005 +
0.0013 +
+
-
D1.5
20 +
5 +
1.25 +
0.3 +
0.08 +
0.02 +
0.005 +
0.0013 +
+
-

圖10A

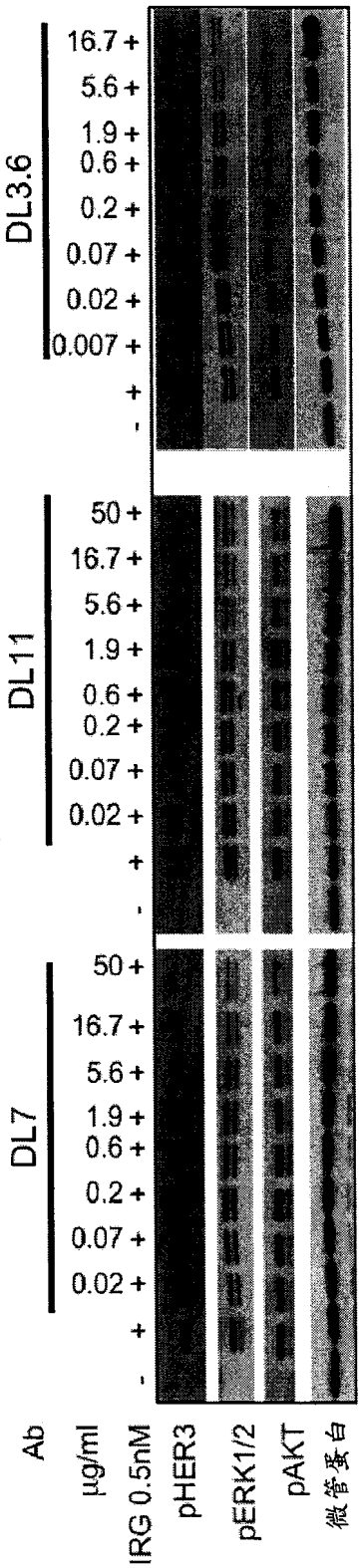
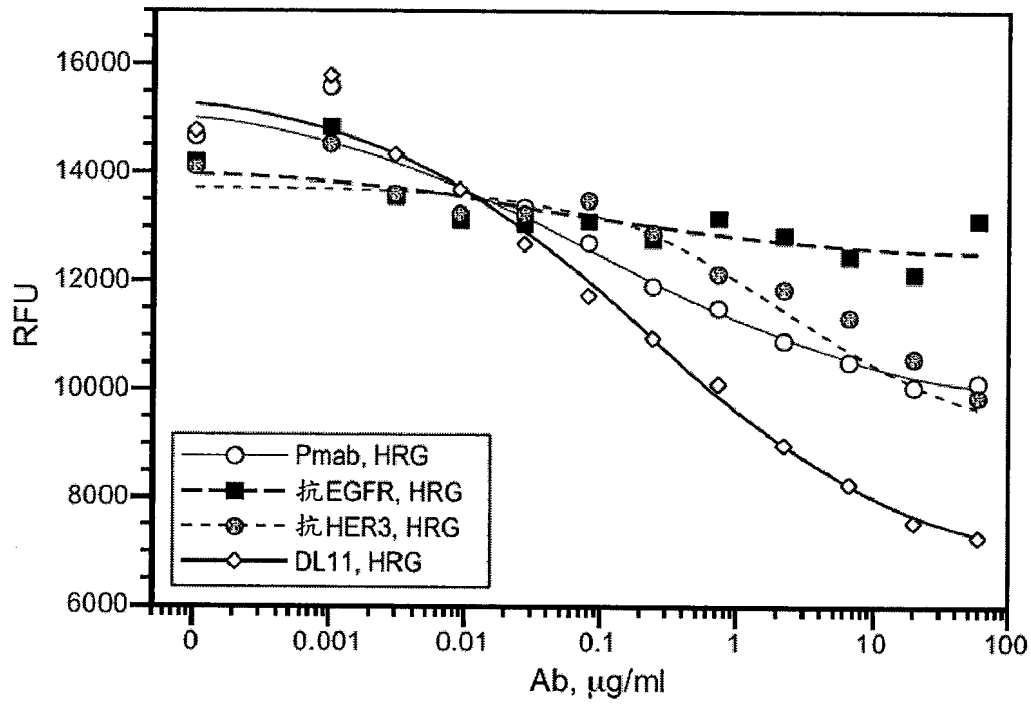

Ab
μg/ml
IRG 0.5nM
pHER3
pERK1/2
pAKT
微管蛋白
DL7
50 +
16.7 +
5.6 +
1.9 +
0.6 +
0.2 +
0.07 +
0.02 +
+
-
DL11
50 +
16.7 +
5.6 +
1.9 +
0.6 +
0.2 +
0.07 +
0.02 +
+
-
DL3.6
16.7 +
5.6 +
1.9 +
0.6 +
0.2 +
0.07 +
0.02 +
0.007 +
+
-

圖10B


16000
14000
12000
10000
8000
6000
RFU
Pmab, HRG
抗EGFR, HRG
抗HER3, HRG
DL11, HRG
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Ab, μg/ml

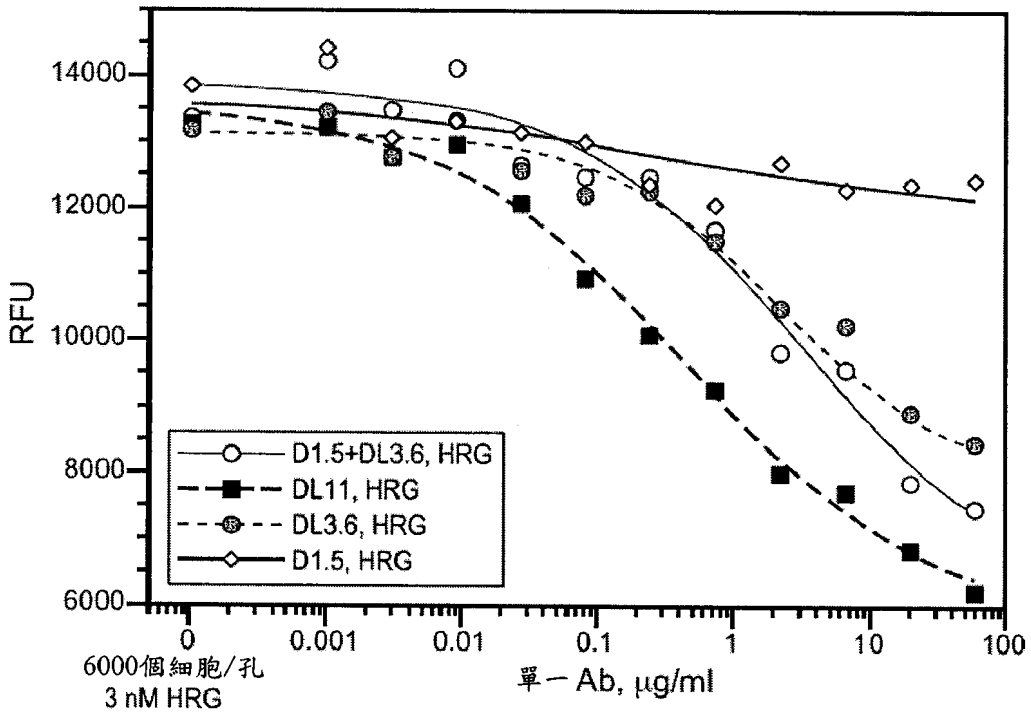

14000
12000
10000
8000
6000
RFU
D1.5+DL3.6, HRG
DL11, HRG
DL3.6, HRG
D1.5, HRG
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
6000個細胞/孔
3 nM HRG
單一Ab, μg/ml

圖11A

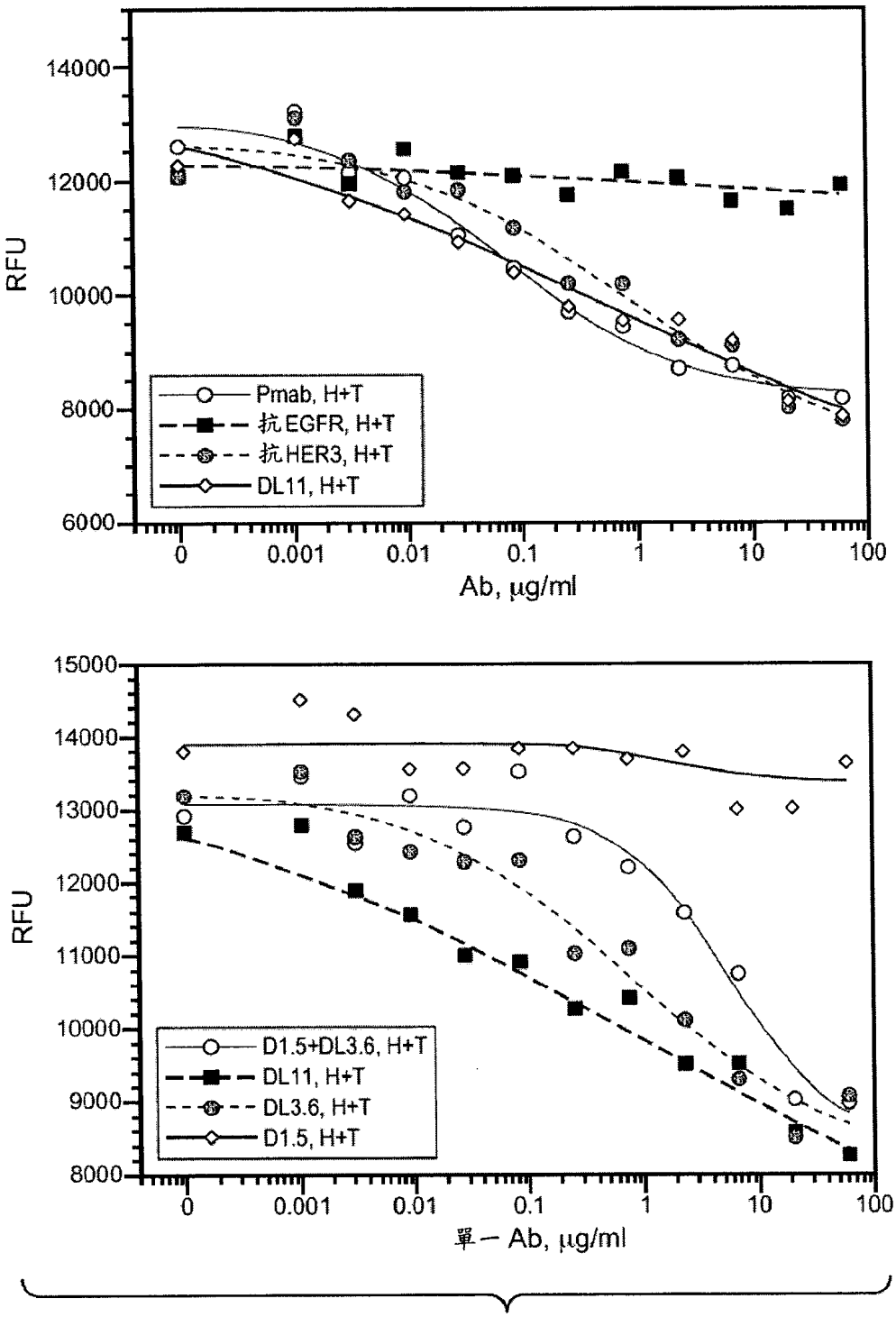
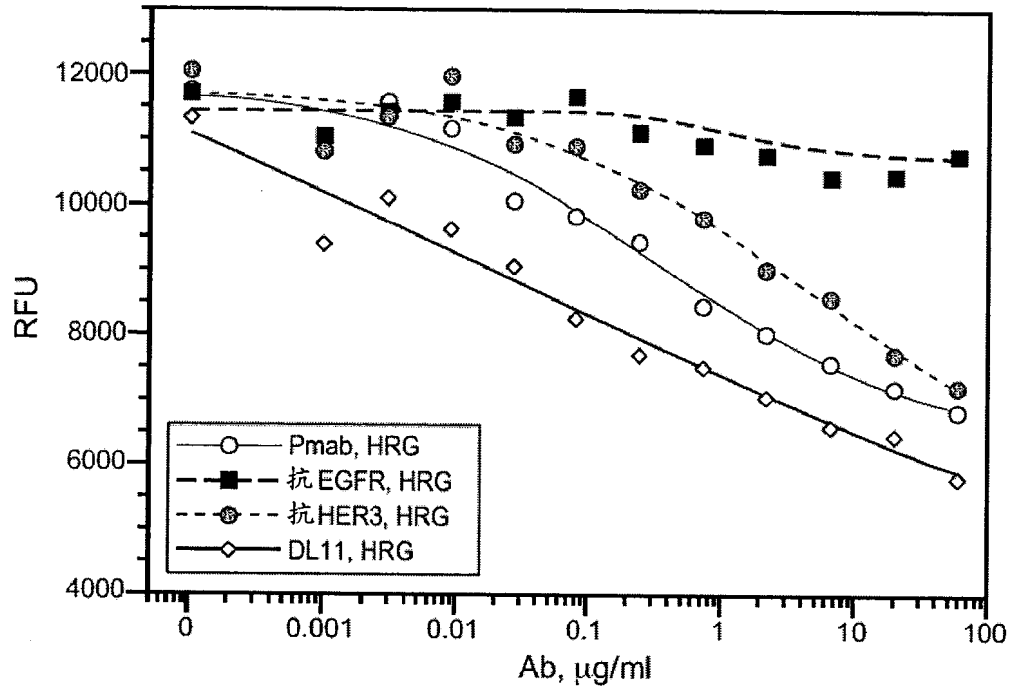

14000
12000
10000
8000
6000
RFU
Pmab, H+T
抗EGFR, H+T
抗HER3, H+T
DL11, H+T
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Ab, μg/ml
15000
14000
13000
12000
11000
10000
9000
8000
RFU
D1.5+DL3.6, H+T
DL11, H+T
DL3.6, H+T
D1.5, H+T
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
單一 Ab, μg/ml

圖11B


12000
10000
8000
6000
4000
RFU
Pmab, HRG
抗EGFR, HRG
抗HER3, HRG
DL11, HRG
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Ab, μg/ml

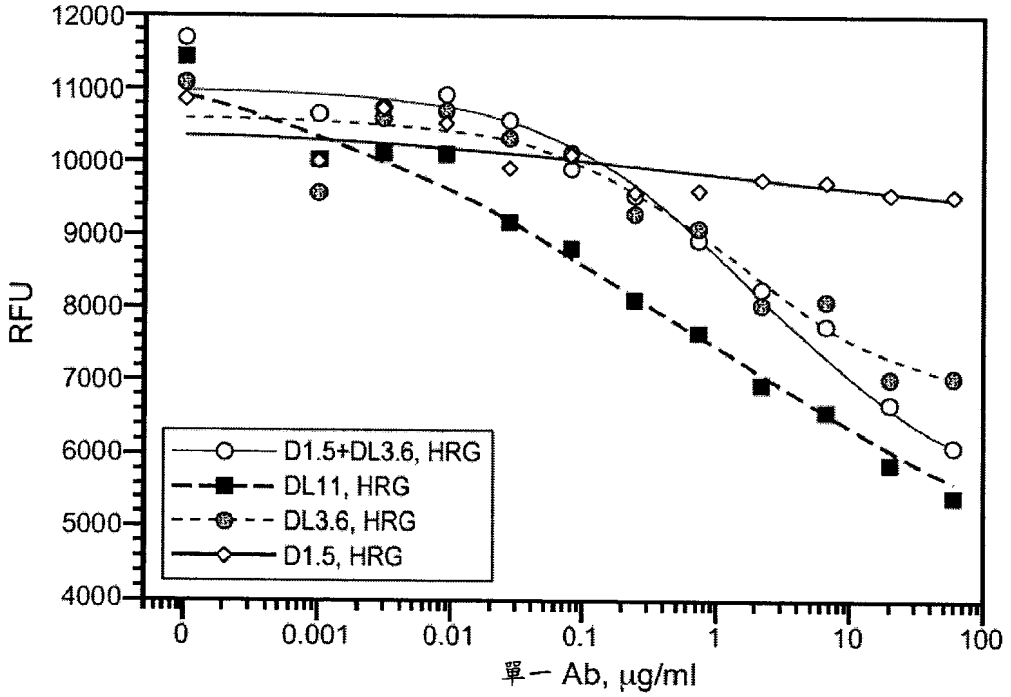
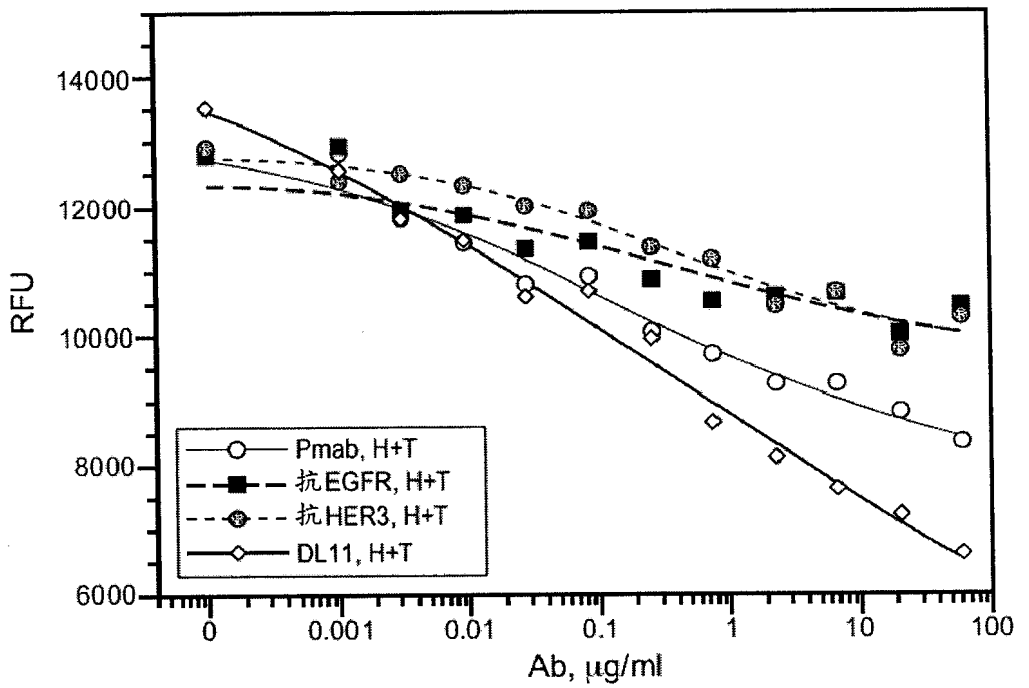

12000
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
RFU
D1.5+DL3.6, HRG
DL11, HRG
DL3.6, HRG
D1.5, HRG
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
單一 Ab, μg/ml

圖12A


14000
12000
10000
8000
6000
RFU
Pmab, H+T
抗EGFR, H+T
抗HER3, H+T
DL11, H+T
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Ab, μg/ml

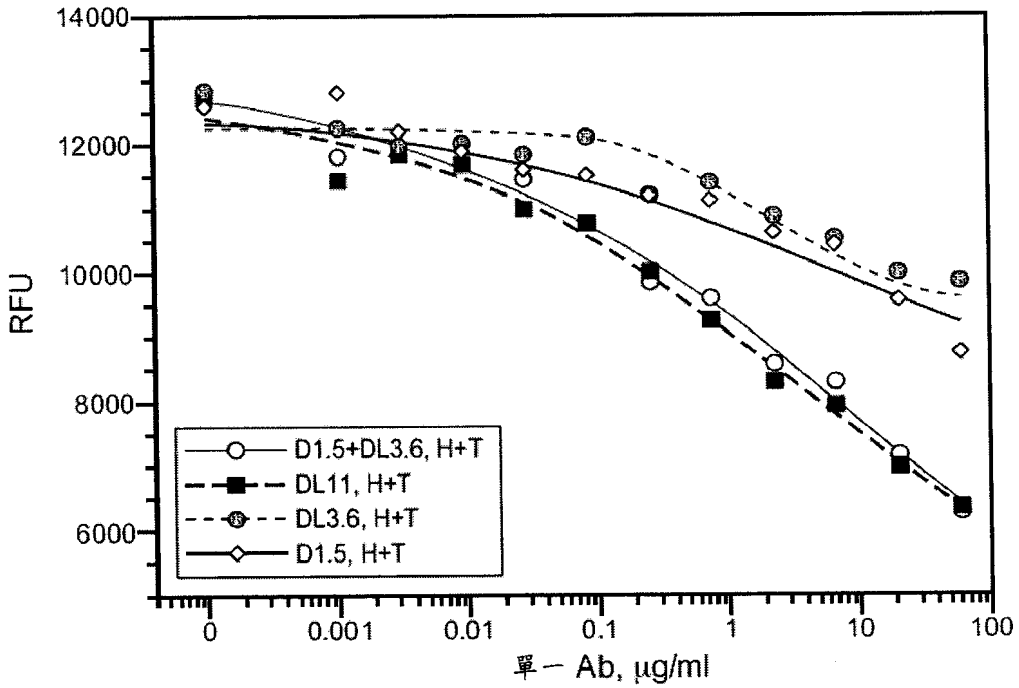
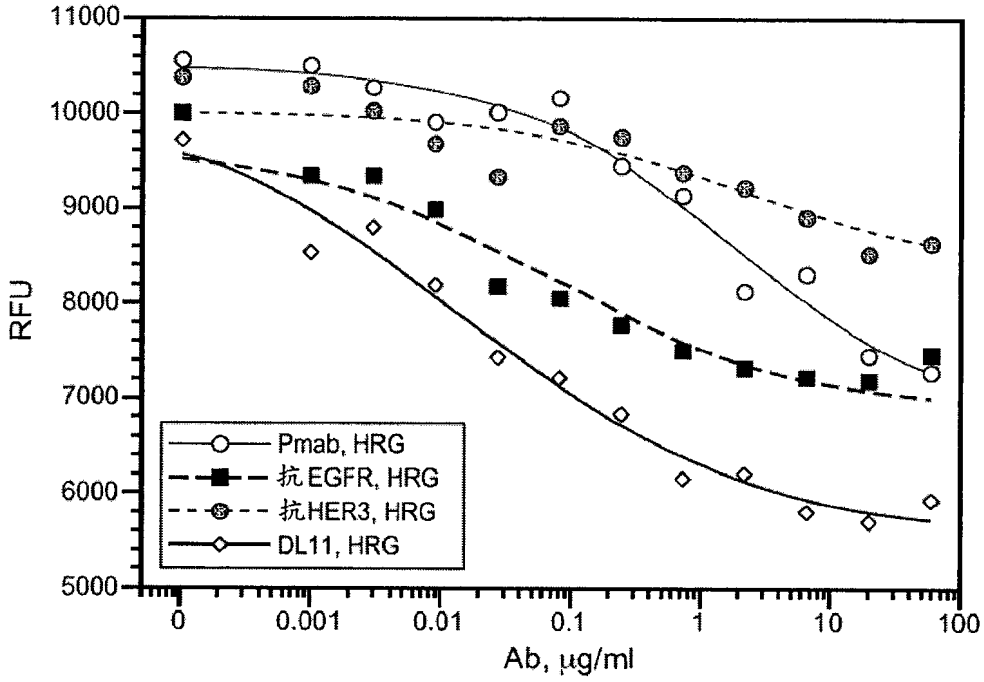

14000
12000
10000
8000
6000
RFU
D1.5+DL3.6, H+T
DL11, H+T
DL3.6, H+T
D1.5, H+T
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
單一 Ab, μg/ml

圖12B


11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
RFU
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Ab, μg/ml
Pmab, HRG
抗EGFR, HRG
抗HER3, HRG
DL11, HRG

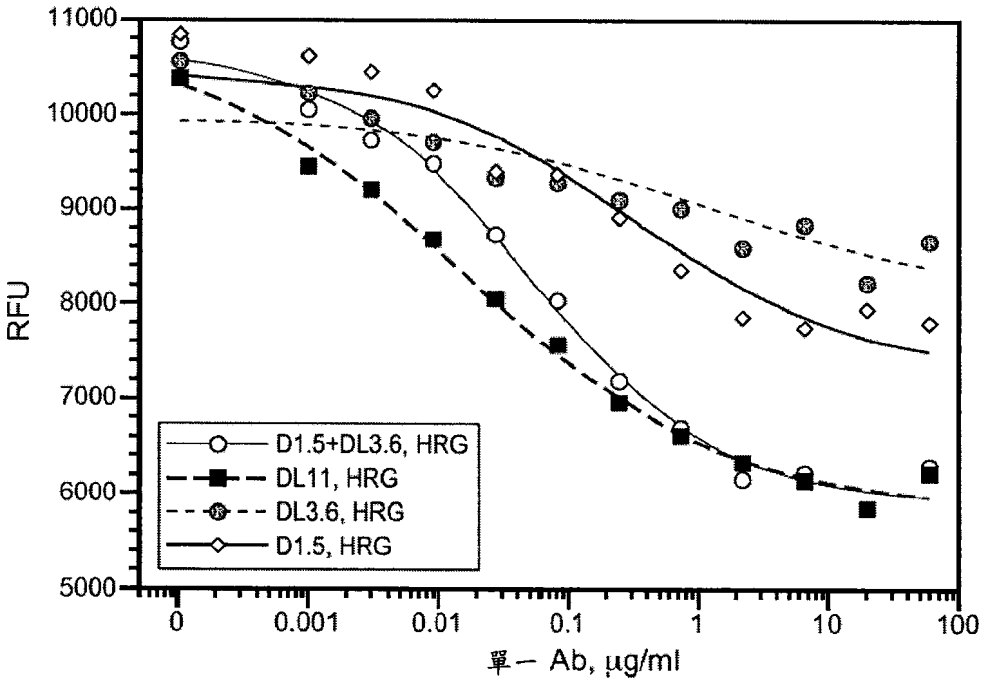

11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
RFU
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
單一 Ab, μg/ml
D1.5+DL3.6, HRG
DL11, HRG
DL3.6, HRG
D1.5, HRG

圖13

D1.5-201 EGFR-HER2雙特異性親和力成熟策略

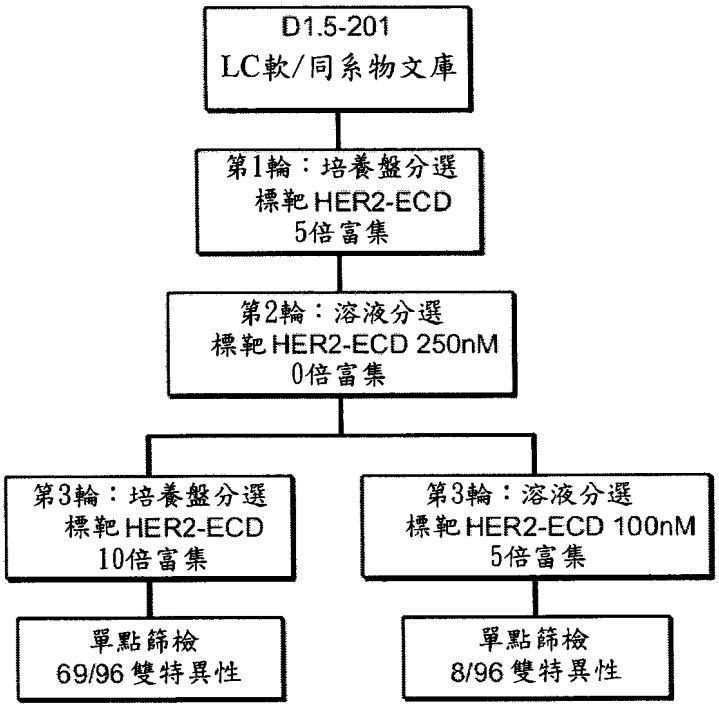


圖14

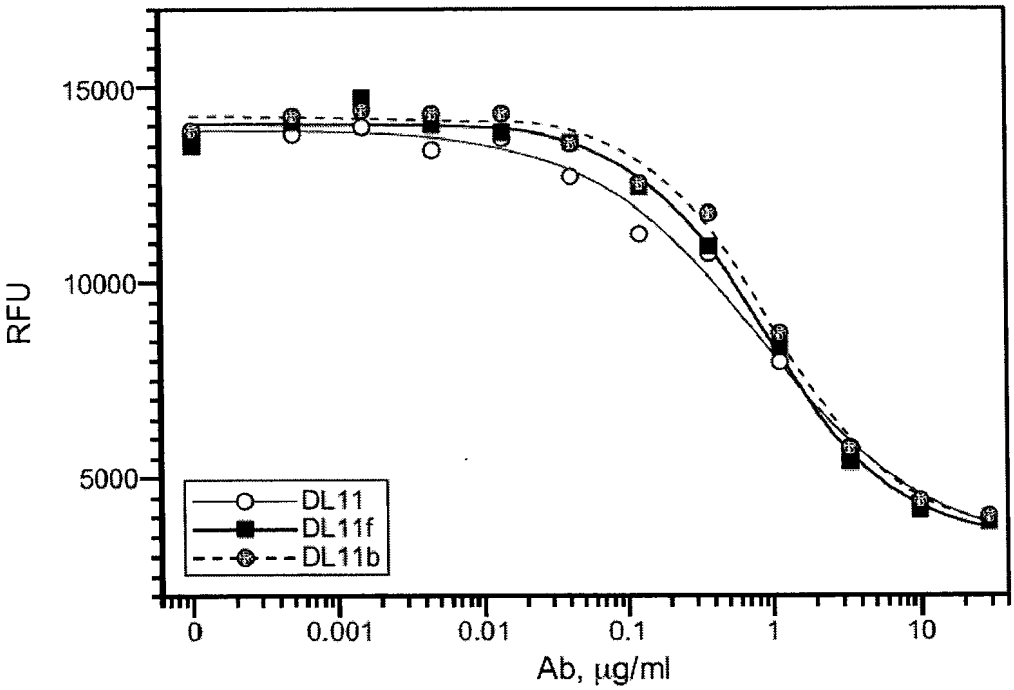


圖15

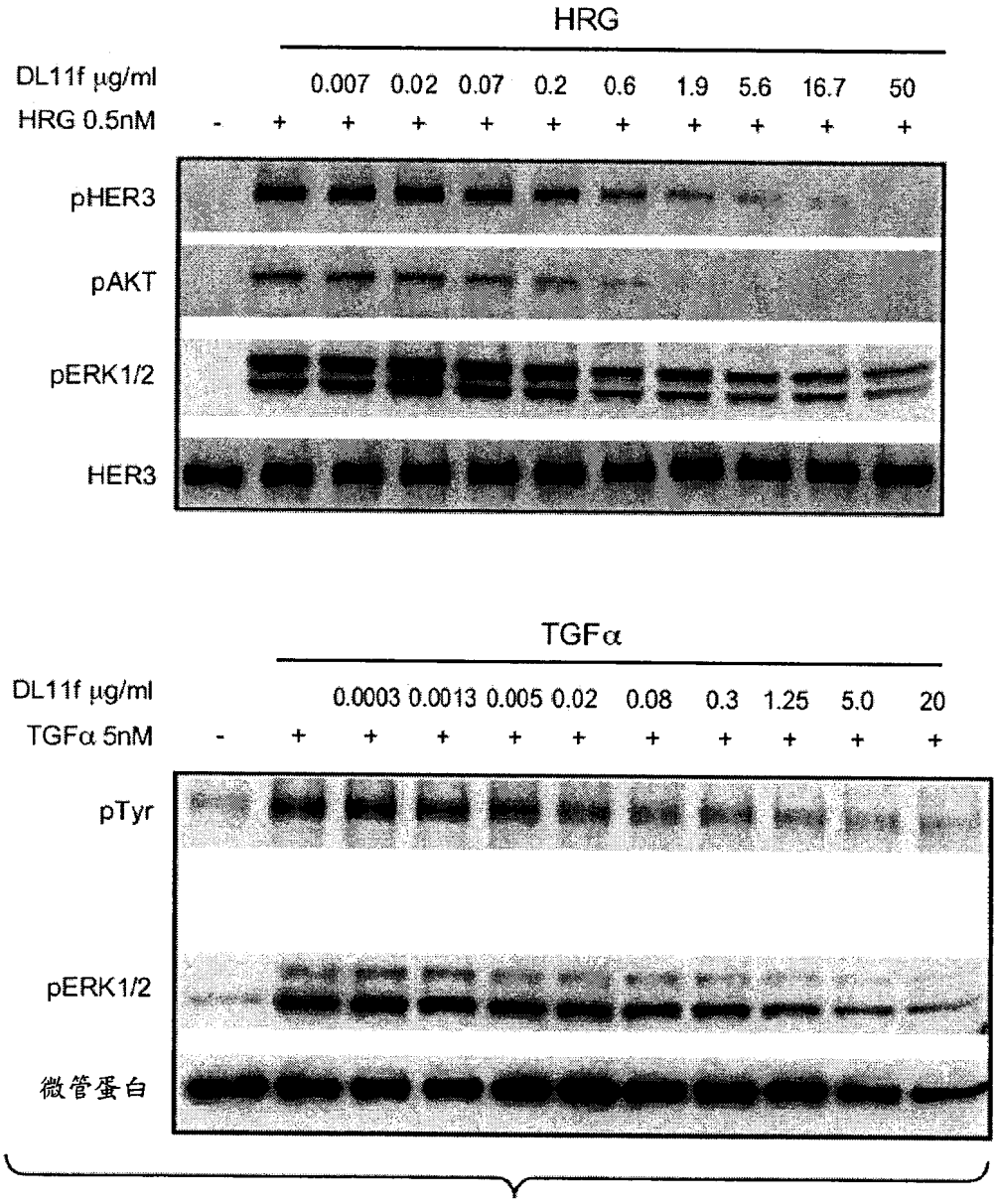

HRG
DL11f μg/ml
0.007 0.02 0.07 0.2 0.6 1.9 5.6 16.7 50
HRG 0.5nM
- + + + + + + + + + +
pHER3
pAKT
pERK1/2
HER3
TGFα
DL11f μg/ml
0.0003 0.0013 0.005 0.02 0.08 0.3 1.25 5.0 20
TGFα 5nM
- + + + + + + + + + +
pTyr
pERK1/2
微管蛋白

圖16

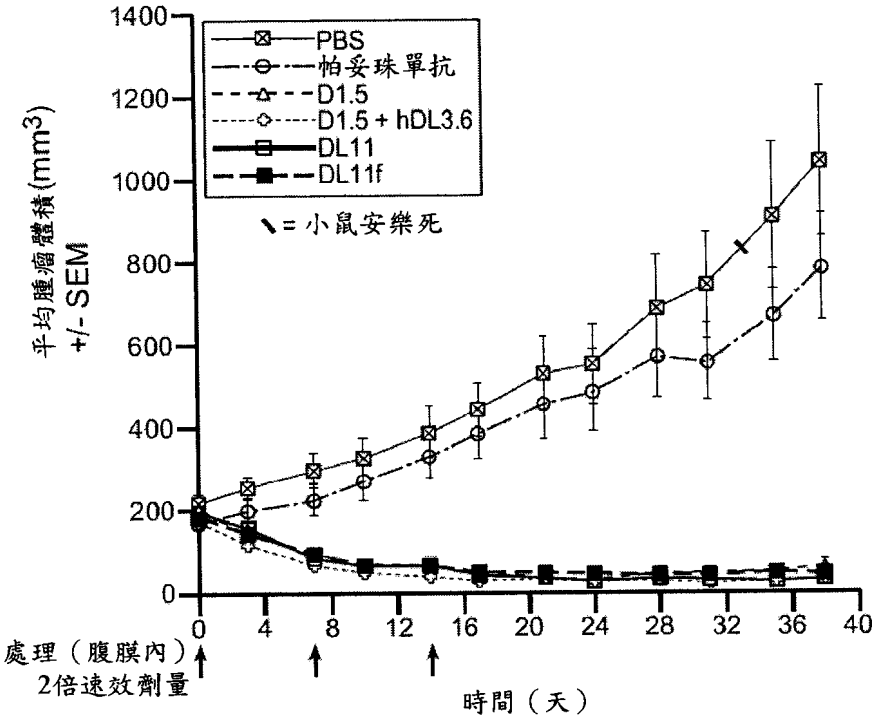

PBS
帕妥珠單抗
D1.5
D1.5 + hDL3.6
DL11
DL11f
= 小鼠安樂死
平均腫瘤體積(mm3)
+/- SEM
處理（腹膜內）
2倍速效劑量
時間（天）

圖17

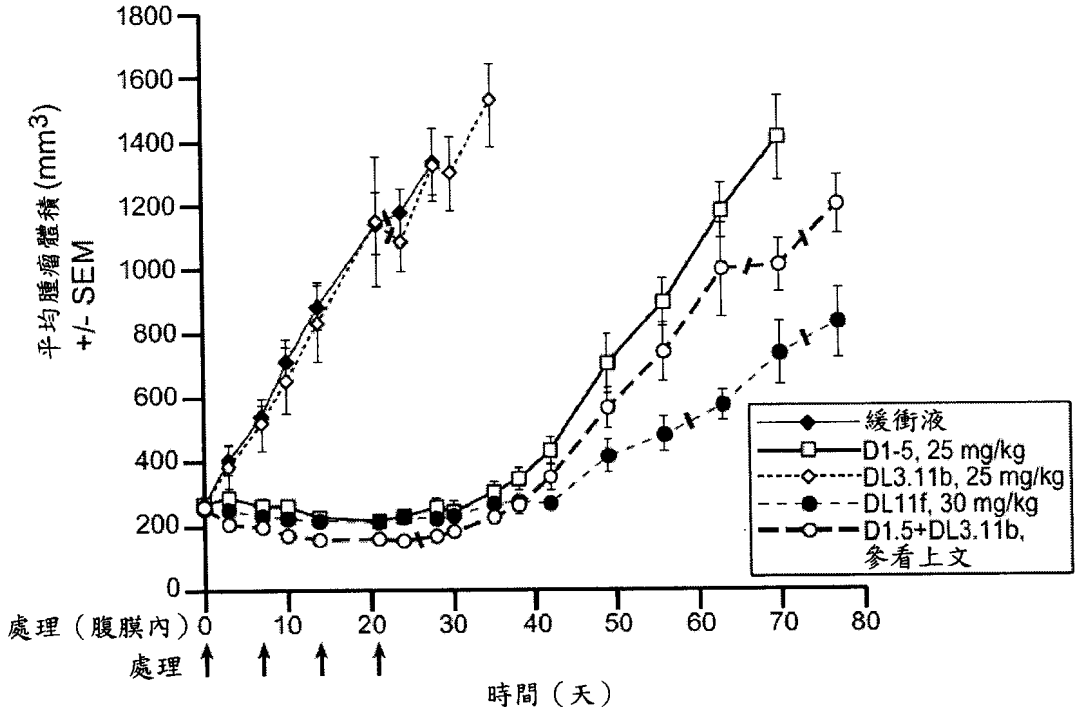
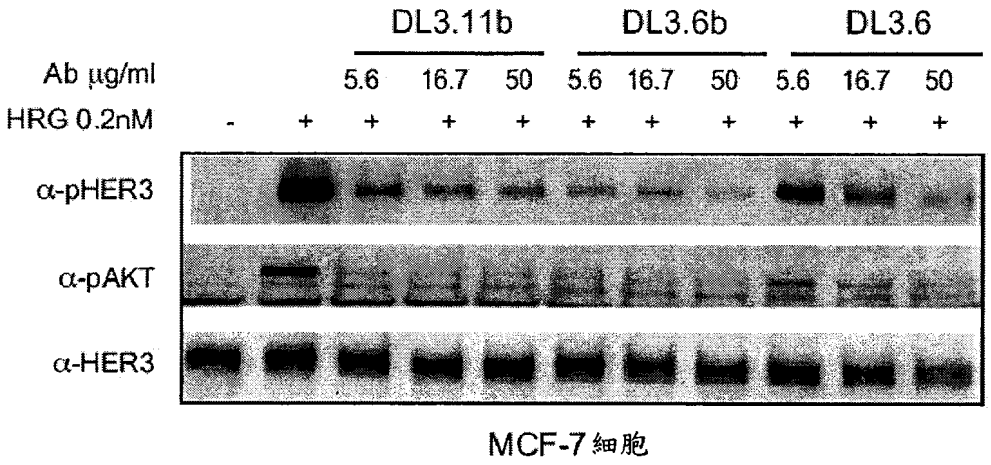

緩衝液
D1-5, 25 mg/kg
DL3.11b, 25 mg/kg
DL11f, 30 mg/kg
D1.5+DL3.11b,
參看上文
平均腫瘤體積 (mm3)
+/- SEM
處理（腹膜內）
處理
時間（天）

圖18



MCF-7細胞

圖19

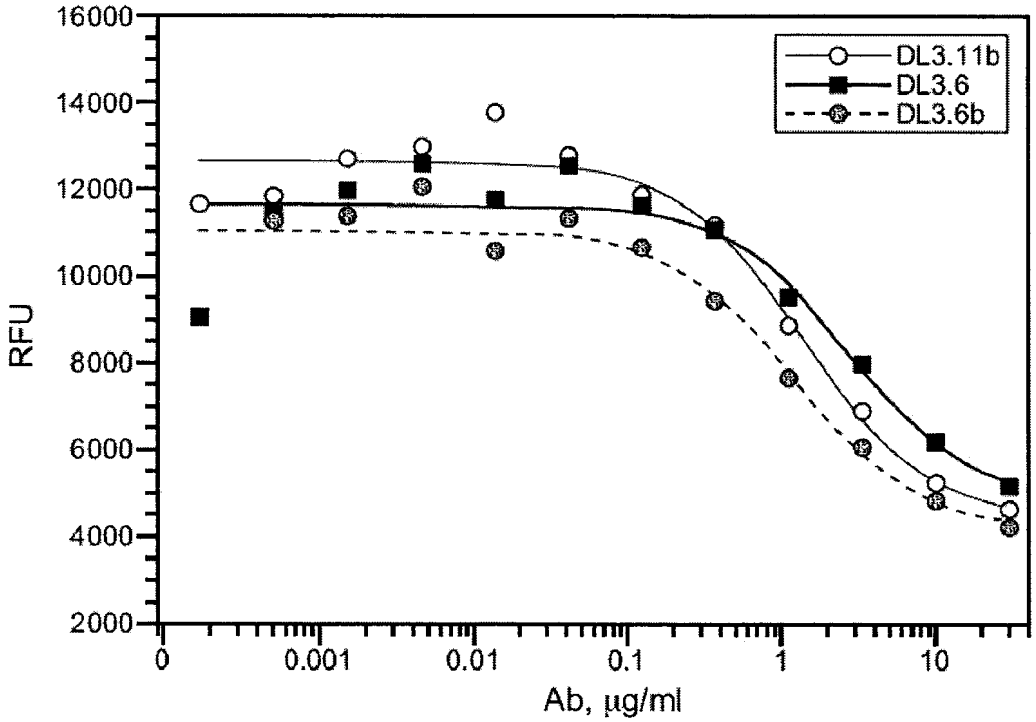


圖20

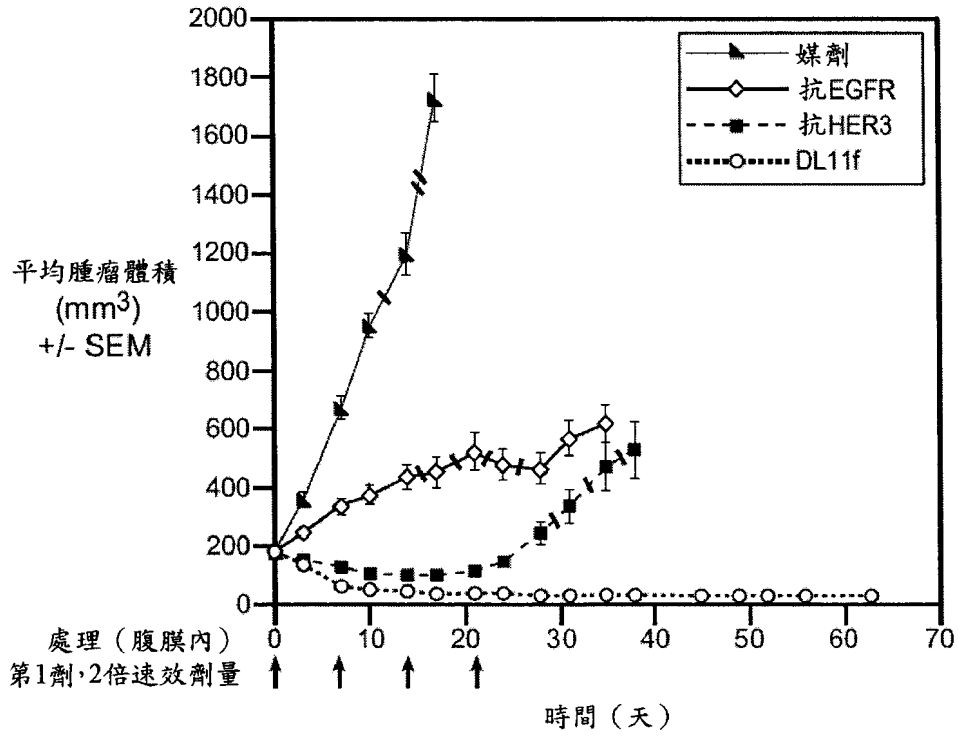

媒劑
抗EGFR
抗HER3
DL11f
平均腫瘤體積
(mm3)
+/- SEM
處理（腹膜內）
第1劑，2倍速效劑量
時間（天）

圖21

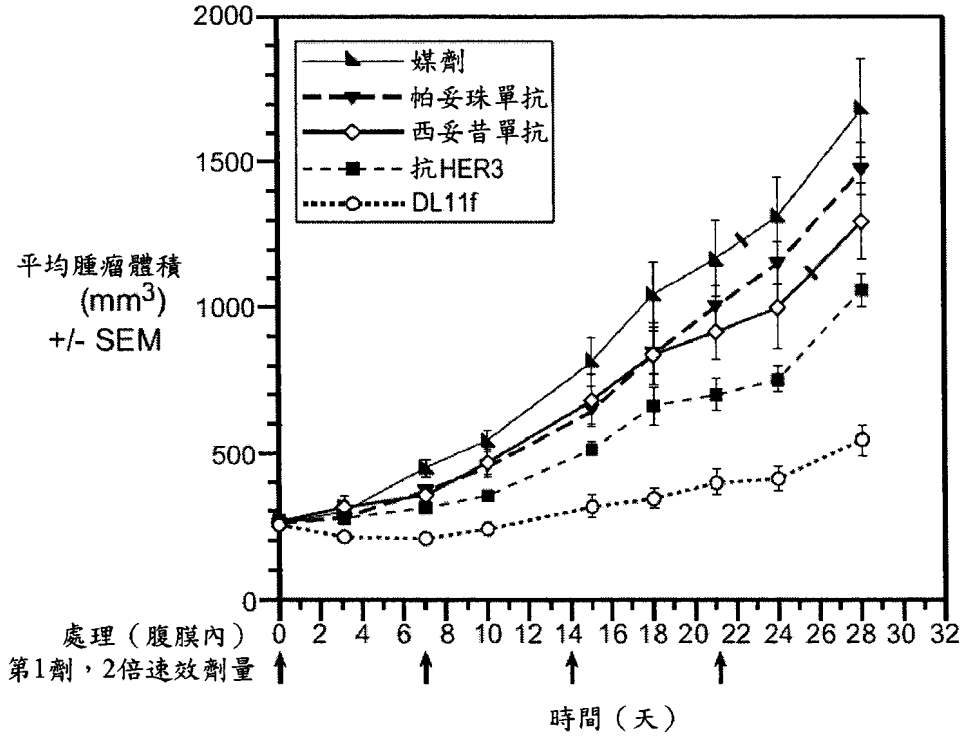

媒劑
帕妥珠單抗
西妥昔單抗
抗HER3
DL11f
平均腫瘤體積
(mm3)
+/- SEM
處理（腹膜內）
第1劑，2倍速效劑量
時間（天）

圖22

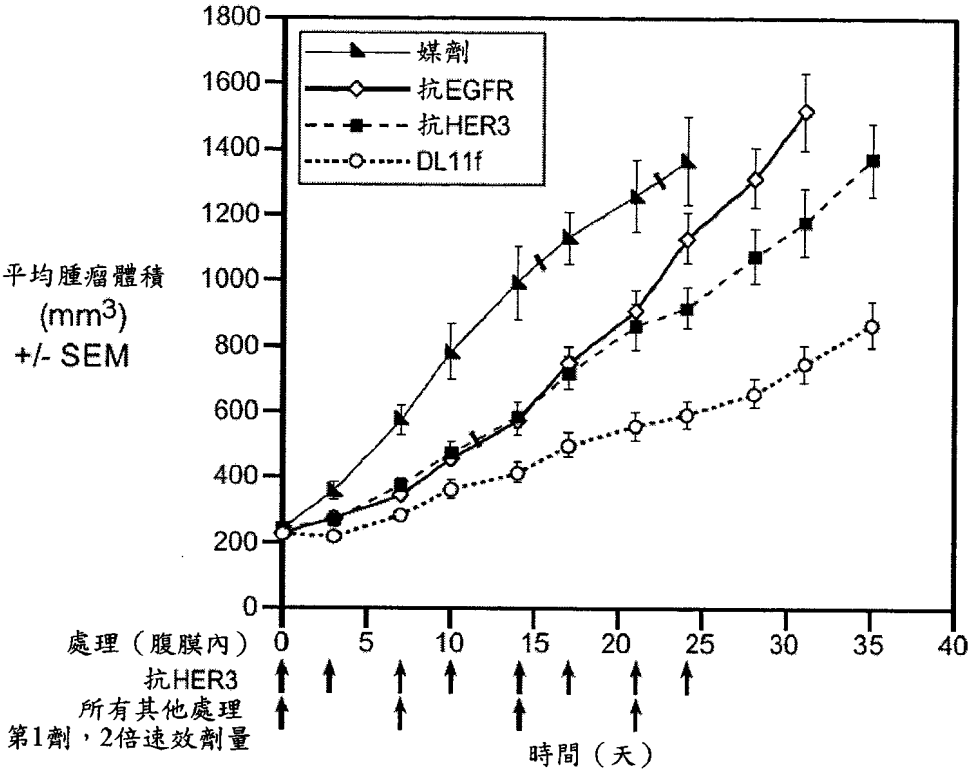

媒劑
抗EGFR
抗HER3
DL11f
平均腫瘤體積
(mm3)
+/- SEM
處理（腹膜內）
抗HER3
所有其他處理
第1劑，2倍速效劑量
時間（天）

圖23

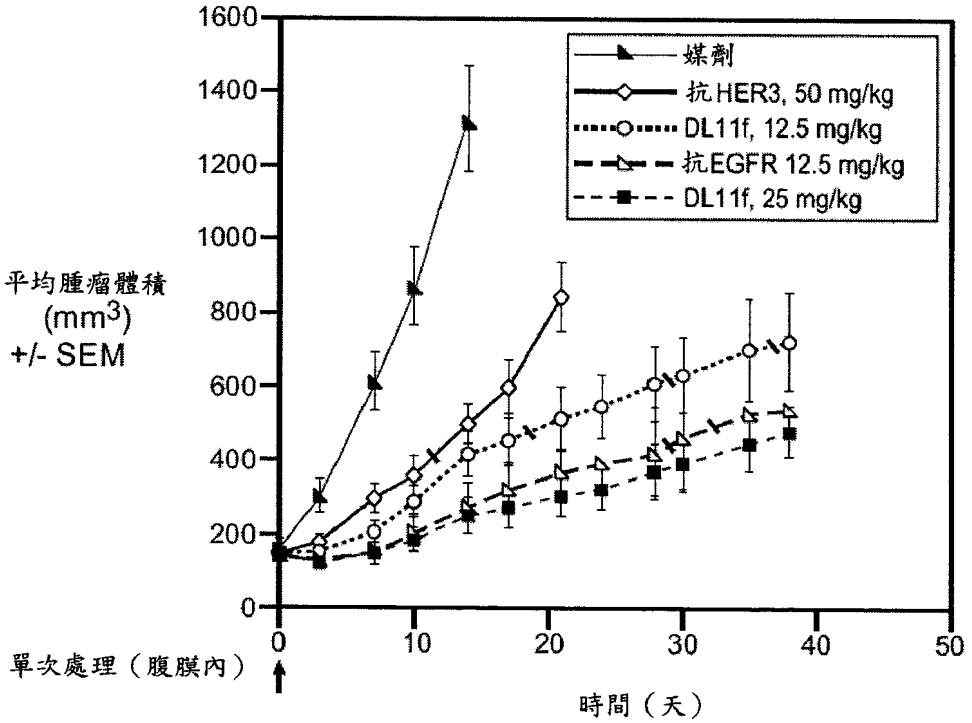

媒劑
抗HER3, 50 mg/kg
DL11f, 12.5 mg/kg
抗EGFR 12.5 mg/kg
DL11f, 25 mg/kg
平均腫瘤體積
(mm3)
+/- SEM
單次處理（腹膜內）
時間（天）

圖24

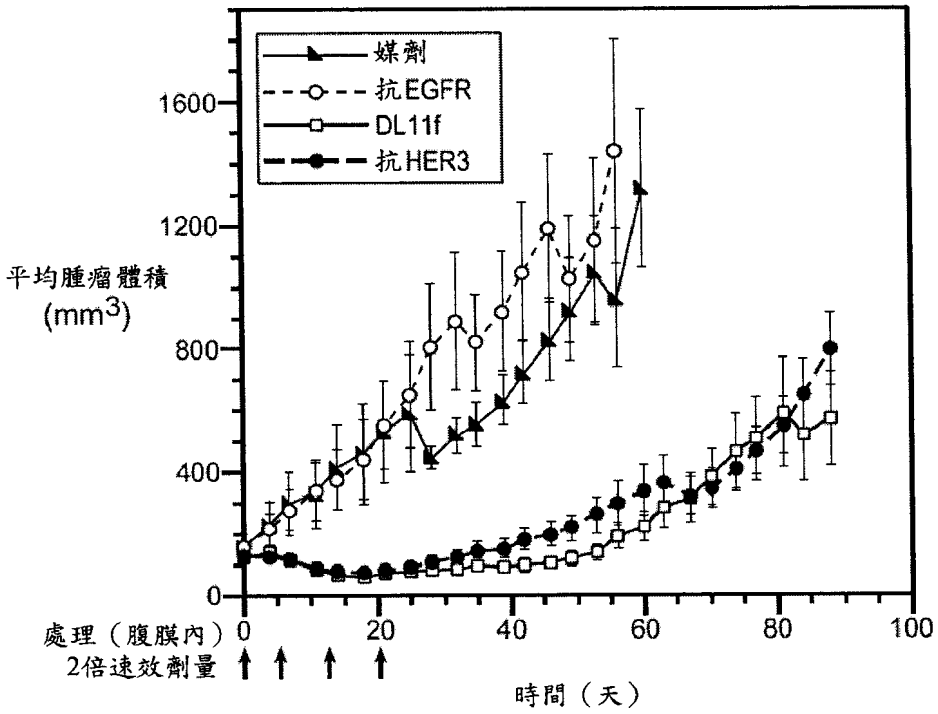

媒劑
抗EGFR
DL11f
抗HER3
平均腫瘤體積
(mm3)
1600
1200
800
400
0
處理（腹膜內）
2倍速效劑量
0
20
40
60
80
100
時間（天）

圖25

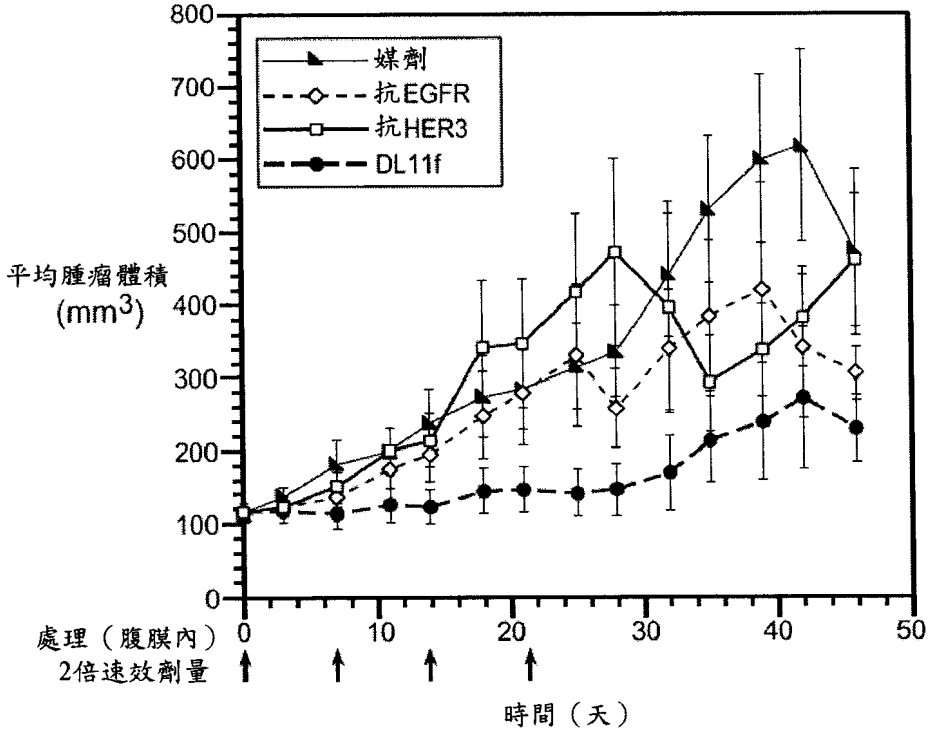

媒劑
抗EGFR
抗HER3
DL11f
平均腫瘤體積
(mm3)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
處理（腹膜內）
2倍速效劑量
0
10
20
30
40
50
時間（天）

圖26

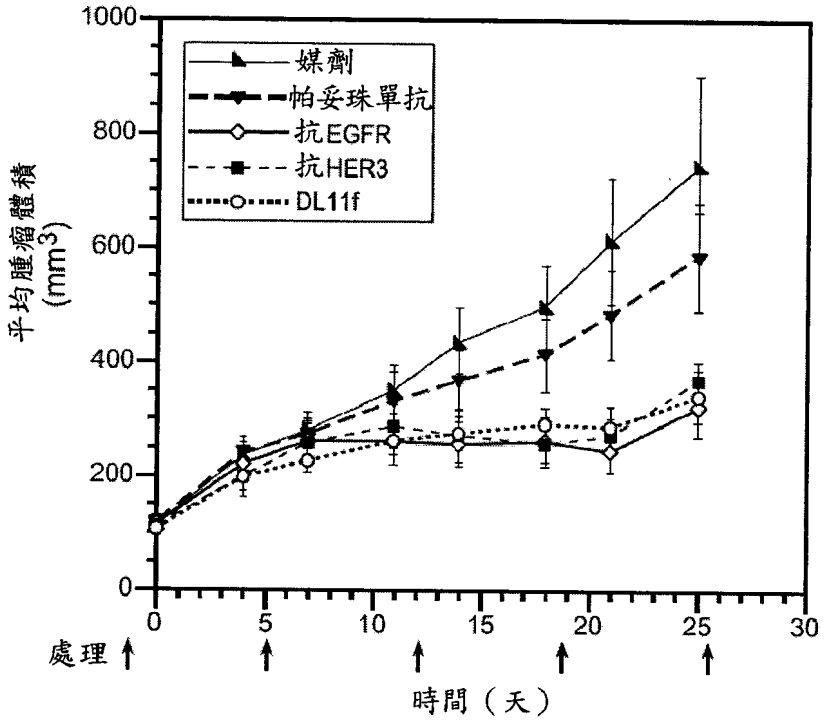

媒劑
帕妥珠單抗
抗EGFR
抗HER3
DL11f
平均腫瘤體積 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
處理
時間（天）

圖27

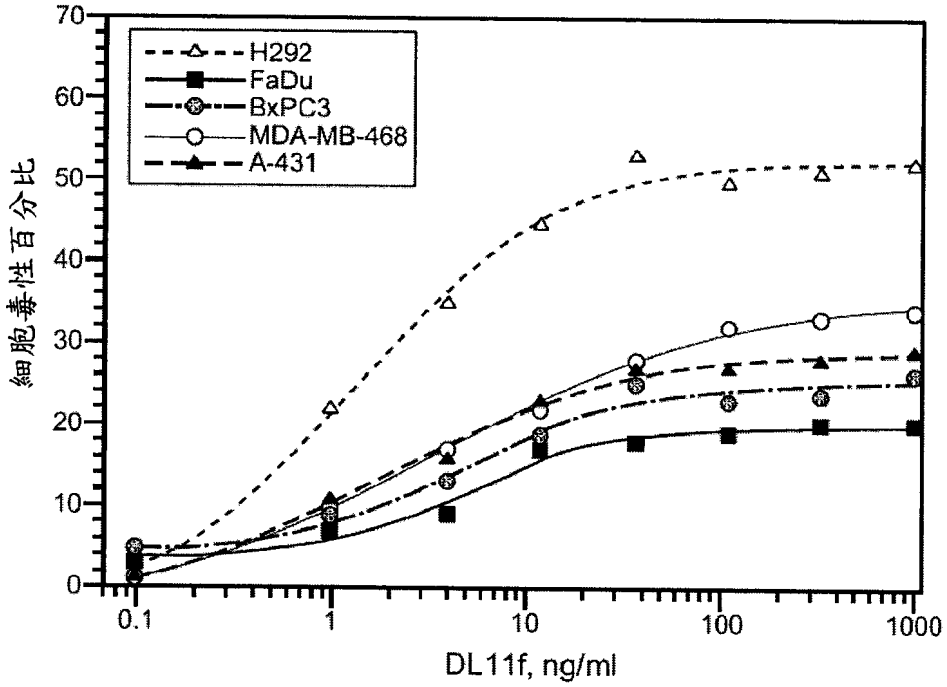

H292
FaDu
BxPC3
MDA-MB-468
A-431
細胞毒性百分比
70
60
50
40
30
20
10
0
0.1
1
10
100
1000
DL11f, ng/ml

圖28

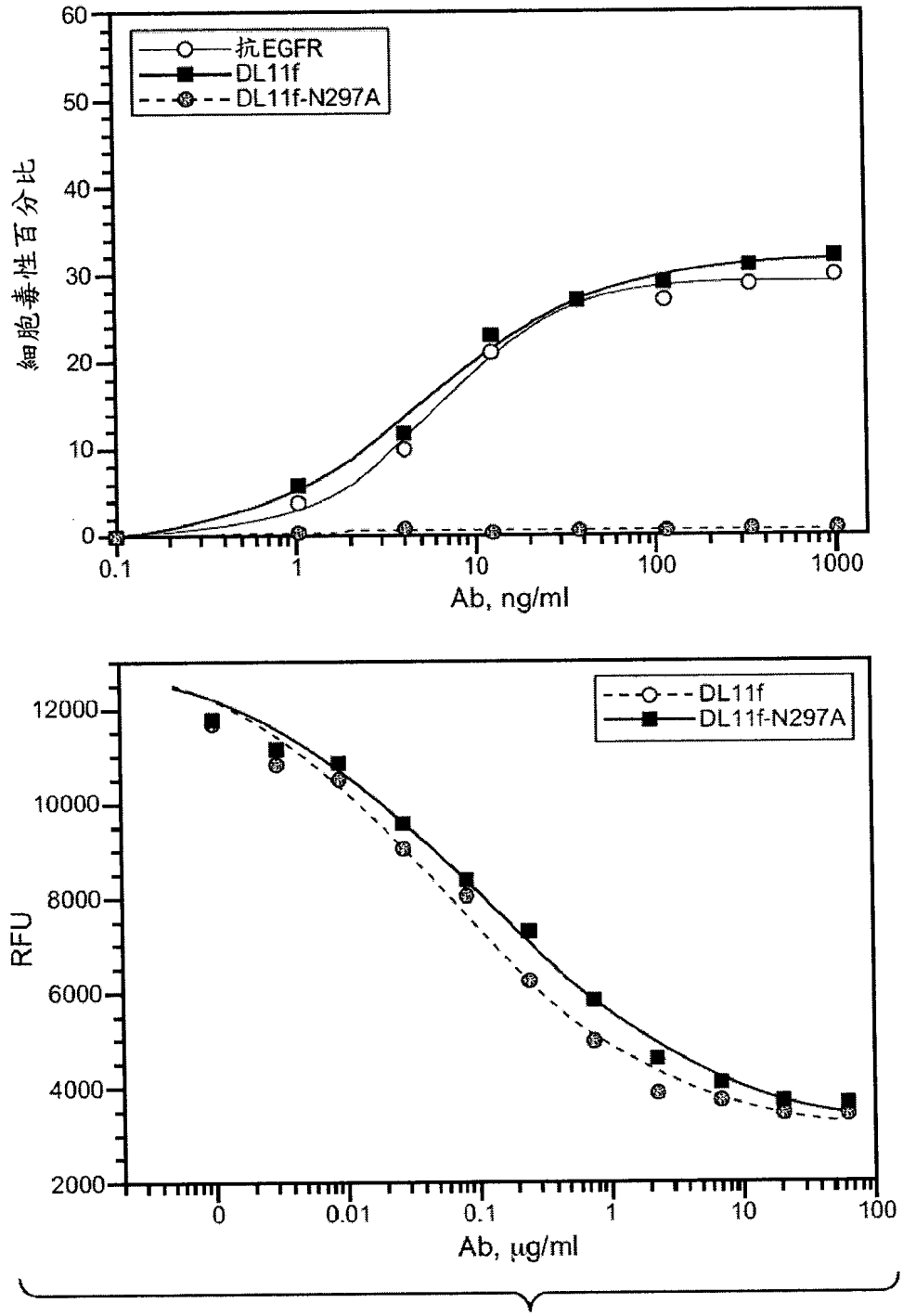

抗EGFR
DL11f
DL11f-N297A
細胞毒性百分比
Ab, ng/ml
DL11f
DL11f-N297A
RFU
Ab, μg/ml

圖29

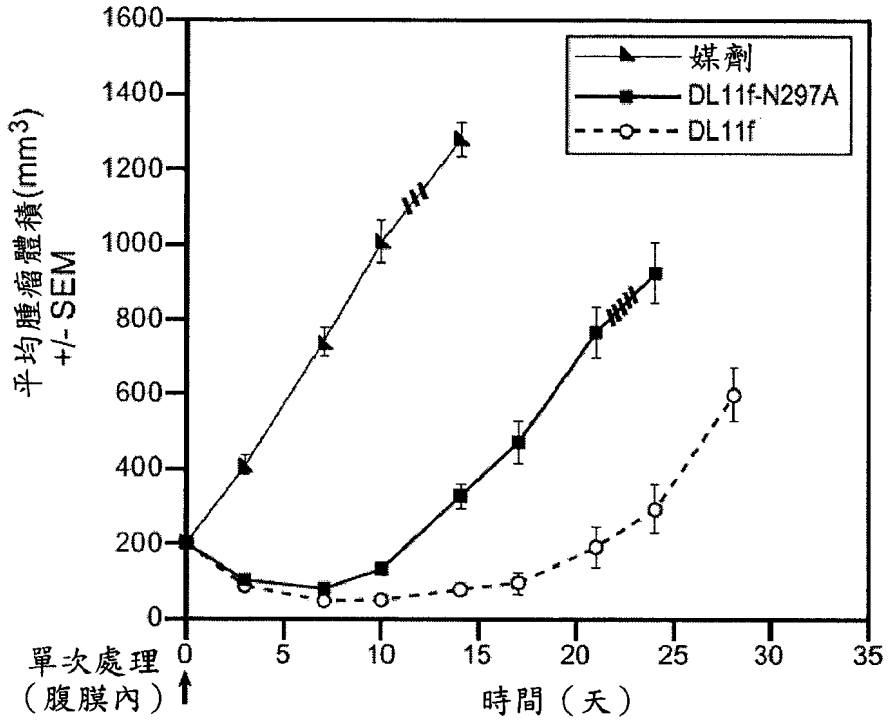

1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
平均腫瘤體積(mm3)
+/- SEM
媒劑
DL11f-N297A
DL11f
單次處理
（腹膜內）
0
5
10
15
20
25
30
35
時間（天）

圖30

EGFR拮抗劑	非臨床資料	臨床資料
ERBITUX® （西妥昔單抗） Imclone （BLA編號：125084） 特異性結合於EGFR之細胞外域的重組人類/小鼠嵌合單株抗體	在獼猴中進行之9個月重複劑量毒性研究。 劑量及療法：每週投與一次歷時9個月，基於BSA，劑量為每週人類暴露量之約0.4-4倍（每週7.5 mg/kg、24 mg/kg及75 mg/kg） 主要測試物品相關毒性： 所有劑量下輕度至重度皮膚病變（身體不同部分之鱗屑形成、紅斑、皮炎、裂口、創傷、疹）。 嚴重度及發作依賴於劑量。高劑量、中劑量及低劑量分別在研究第15天、第22天及第64天發作。 嚴重皮膚病變之繼發性併發症為細菌感染或敗血症，高劑量組中處於瀕死狀態之動物50%隨後進行安樂死。	所有試驗之西妥昔單抗給藥方案均相同：第1天給予20 mg之測試劑量，接著為400 mg/m^{2}初始劑量且接著為放射治療期間（6-7週）或疾病或不可接受之毒性進展之前的250 mg/m^{2}劑量。 臨床試驗中亦報導皮膚毒性（痤瘡樣皮疹、皮膚乾燥及裂口及發炎性及傳染性後遺症（例如眼瞼外緣眼炎、唇炎、蜂巢組織炎、囊腫）。報導繼發性併發症，包括金黃素葡萄球菌（S. aureus）敗血症及需要切開及引流之膿腫。 頭頸鱗狀細胞癌臨床試驗結果：西妥昔單抗單獨治療之患者76%報導患有痤瘡樣皮疹，其中1%視為嚴重，相比之下，放射治療之患者僅10%報導患有痤瘡樣皮疹。 結腸直腸癌試驗結果：西妥昔單抗治療之患者89%報導患有痤瘡樣皮疹，其中11%視為嚴重。

圖31A

EGFR拮抗劑	非臨床資料	臨床資料
TARCEVA® （鹽酸埃羅替尼）OSI Pharms /Genentech （NDA編號021743） 抑制與EGFR相關之酪胺酸激酶之細胞內磷酸化的小分子	在史泊格多利大白鼠（Sprague-Dawley rat）中進行6個月經口毒性研究且在米格魯犬（Beagle dog）中進行12個月經口毒性研究。 NDA概述中列有標靶毒性位點且清單中包括皮膚毒性位點。 大鼠研究結果： 劑量-每天1 m/kg、5 m/kg及10 m/kg 臨床研究結果：高劑量組中第50天出現皮膚病變，描述為口鼻痂。 組織病理學研究結果：在每天5 mg/kg下，2/15雄性及2/15雌性，及在每天10 mg/kg下，11/15雄性及11/15雌性出現皮膚退化及發炎。組織病理學研究未發現對照組出現皮膚病變。 犬研究結果： 劑量-每天2.5 mg/kg、7.5 mg/kg及15 mg/kg。 臨床徵兆：所有劑量組均包括皮膚發紅（分別出現於2/8、3/8及5/8犬中）及口腔黏膜發紅（分別出現於4/8、6/8及8/8犬中）。研究結果中之發作時間隨劑量提高而減小。	給藥方案為每日150 mg，攝入食物前2小時給予。 臨床試驗研究結果： 一般耐受良好。最頻繁出現之毒性包括皮疹及腹瀉。後兩種毒性有時導致劑量減小或治療中止。

圖31B

EGFR拮抗劑	非臨床資料	臨床資料
VECTIBIX® 帕尼單抗 Amgen （BLA編號125147） 針對人類EGFR之完全人類化重組單株抗體	在獼猴中進行多個重複劑量毒性研究。此等研究報導在4、13或26週治療期間、在7.5、15、30或60 mg/kg之劑量下出現嚴重皮膚毒性。 <u>26週研究結果</u>： 劑量：每劑7.5、15及30 mg/kg，一週一次團式靜脈內給藥。 <u>研究結果總結</u>：所有劑量組出現輕度至重度皮膚毒性（紅斑、發炎、蒂狀物（crus）（通常與繼發性感染相關）、鱗狀皮膚（皮屑狀）、毛皮損失、擦傷及/或眼瞼腫脹及眼睛發紅）、表皮脫落、敗血病及死亡（LD、MD及HD中分別為2、6及6個）。另外，所有劑量組中偶爾報導有丘疹及/或潰瘍/壞死。 <u>組織病理學研究結果</u>： 所有劑量組動物皮膚出現輕度至顯著表皮角化病，伴有表皮棘皮症、角化不全症。15與30 mg/kg劑量組之嚴重度相同且7.5 mg/kg劑量組之嚴重度稍微降低。未測定NOAEL。 劑量為所建議之每2週6 mg/kg人類劑量的1.25至10倍且為所建議之每週2.5 mg/kg劑量的約3-24倍（當調整至人類體重時）。	給藥方案為疾病進展前每2週每日6 mg/kg。 <u>臨床試驗研究結果</u>： 所報導之最嚴重不良事件之一為皮膚毒性併發傳染性後遺症及敗血性死亡。 789個轉移性結腸直腸癌患者90%報導患有皮膚病變（痤瘡樣皮疹、搔癢、皮膚乾燥、表皮脫落、皮膚裂口及甲溝炎）。此等患者為2級嚴重度，其中12%患者具有3級嚴重度。在患者中（在非臨床上觀測不到），7%患者亦報導患有1級或2級口腔炎及口黏膜炎。嚴重皮膚毒性之發展確實導致繼發性感染（敗血症）且在少數情況下甚至導致死亡，但最通常需要減小或中斷劑量。 標記審查包括針對皮膚毒性之盒式警告（Boxed Warning）部分。

圖31C

不良事件	簡稱	1級	2級	3級	4級	5級
皮疹/脫屑	皮疹	無相關症狀之黃斑或丘疹或紅斑	具有搔癢或其他相關症狀之黃斑或丘疹或紅斑：或覆蓋< 50%體表面積（BSA）之其他病變	嚴重之全身性紅皮病或黃斑、丘疹或小泡疹；覆蓋≥ 50% BSA之脫屑	全身性、剝落性、潰瘍性或大皰性皮炎	死亡
皮疹：痤瘡/痤瘡樣	痤瘡	未指示介入	指示介入	與疼痛、毀容、潰瘍或脫屑相關	-	死亡

圖32

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
D1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q							D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q
D1-5	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q							D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q
D1.5-100	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q							D	L	A	T	D	V	A	W	Y	Q
DL11	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q							D	L	A	T	D	V	A	W	Y	Q
DL11b	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q							N	I	A	T	D	V	A	W	Y	Q
DL11f	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q							N	I	A	T	D	V	A	W	Y	Q

Kabat#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	A	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
D1	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
D1-5	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
D1.5-100	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
DL11	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
DL11b	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
DL11f	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P

Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	A	B	C	D	E	F	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
D1	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P							P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
D1-5	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	P	T	P							Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
D1.5-100	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	E	P	E	P							Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
DL11	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	E	P	E	P							Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
DL11b	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	E	P	E	P							Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
DL11f	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	E	P	E	P							Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R

圖33A

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40	41
D1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	T	G	N	W	I	H			W	V	R	Q	A	P
D1-5	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	T	G	N	W	I	H			W	V	R	Q	A	P
D1.5-100	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	T	G	N	W	I	H			W	V	R	Q	A	P
DL11	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	L	S	G	D	W	I	H			W	V	R	Q	A	P
DL11b	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	L	S	G	D	W	I	H			W	V	R	Q	A	P
DL11f	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	L	S	G	D	W	I	H			W	V	R	Q	A	P

Kabat#	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	a	b	c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
D1	G	K	G	L	E	W	V	G	E	I	S	P			S	G	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L
D1-5	G	K	G	L	E	W	V	G	E	I	S	P			S	G	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L
D1.5-100	G	K	G	L	E	W	V	G	E	I	S	P			S	G	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L
DL11	G	K	G	L	E	W	L	G	E	I	S	A			A	G	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L
DL11b	G	K	G	L	E	W	L	G	E	I	S	A			A	G	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L
DL11f	G	K	G	L	E	W	V	G	E	I	S	A			A	G	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L

Kabat#	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	101	102	103	104	105	106	107	108	109
D1	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	E	S	R	V	S	Y	E	A	A									M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V
D1-5	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	E	S	R	V	S	Y	E	A	A									M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V
D1.5-100	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	E	S	R	V	S	Y	E	A	A									M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V
DL11	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	E	S	R	V	S	F	E	A	A									M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V
DL11b	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	E	S	R	V	S	F	E	A	A									M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V
DL11f	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	E	S	R	V	S	F	E	A	A									M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V

圖33B

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 21 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)