



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I592425 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 07 月 21 日

(21)申請案號：104133865

(22)申請日：中華民國 96 (2007) 年 10 月 01 日

(51)Int. Cl. : C07K16/30 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2006/10/02 美國

60/827,851

(71)申請人：E R 施貴寶 & 聖斯有限責任公司 (美國) E. R. SQUIBB & SONS, L. L. C. (US)
美國

(72)發明人：古恩 米雪兒 KUHNE, MICHELLE R. (US)；布倫斯 彼得 BRAMS, PETER (DK)；田納麥希 多恩 TANAMACHI, DAWN M. (US)；柯曼 艾倫 KORMAN, ALAN (US)；卡德瑞利 喬瑟芬 CARDARELLI, JOSEPHINE M. (US)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

US 2003/0206909A1

WO 2006/089141A2

Gayle G. Vaday et al, Clinical Cancer Research , Vol 3-16 . 10, 5630-5639, August 15, 2004.

審查人員：莊智惠

申請專利範圍項數：54 項 圖式數：16 共 193 頁

(54)名稱

與 C X C R 4 結合之人抗體及彼之用途

HUMAN ANTIBODIES THAT BIND CXCR4 AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明提供具有高親和性與 CXCR4 專一性結合之經分離之單株抗體，特別是人單株抗體。本發明亦提供編碼本發明之抗體的核酸分子、表現載體、宿主細胞及用於表現本發明之抗體的方法。本發明亦提供包含本發明之抗體的免疫偶聯物、雙特異性分子及醫藥組成物。本發明亦提供偵測 CXCR4 之方法及利用本發明之抗 CXCR4 抗體以治療各種癌症、發炎性疾病及 HIV 感染之方法。

The present disclosure provides isolated monoclonal antibodies that specifically bind to CXCR4 with high affinity, particularly human monoclonal antibodies. Nucleic acid molecules encoding the antibodies of this disclosure, expression vectors, host cells and methods for expressing the antibodies of this disclosure are also provided. Immunoconjugates, bispecific molecules and pharmaceutical compositions comprising the antibodies of this disclosure are also provided. This disclosure also provides methods for detecting CXCR4, as well as methods for treating various cancers, inflammatory disorders and HIV infection using an anti-CXCR4 antibody of this disclosure.

指定代表圖：

抗CXCR4 Fab F7 VH

V 片段 : 3-48
D 片段 : 4-23
J 片段 : JH6b

	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L
1	CAG	GTG	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTG	GTA	CAG	CCT	GGG	GGG	TCC	CTG
	CDR1																	
55	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	GCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AGT	AGC	TAT	AGC	ATG	AAC	TGG
	CDR2																	
109	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTT	TCA	TAC	ATT	AGT	AGT	AGA
	CDR2																	
163	AGT	AGA	ACC	ATA	TAC	TAC	GCA	GAC	TCT	GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA
217	GAC	AAT	GCC	AAG	AAC	TCA	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GAC	GAG	GAC
	CDR3																	
271	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	GAT	TAC	GGT	GGT	CAA	CCC	CCT	TAC	TAC	TAC
	CDR3																	
325	TAC	TAC	GGT	ATG	GAC	GTC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	

圖1A

抗CXCR4 Fab F7 VK

V 片段 : L15
J 片段 : JK1

A I R M T Q S P S S L S A S V G D R

1 GCC ATC CGG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

CDR1

V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y

55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

CDR2

Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L

109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

CDR2

Q S G V P S R F S G S G S G T D F T

163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

CDR3

L T I S S L Q P E D F V T Y Y C Q Q

217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GTA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

CDR3

Y N S Y P R T F G Q G T K V E I K

271 TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

圖 1B

公告本

發明摘要

※申請案號：

104133865 (由96136759分割)

※申請日：096年10月01日

※IPC分類：

C01K 16/30 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

A61K 39/395 (2006.01)

與 CXCR4 結合之人抗體及彼之用途

A61P 35/00 (2006.01)

Human antibodies that bind CXCR4 and uses thereof

【中文】

本發明提供具高親和性與 CXCR4 專一性結合之經分離之單株抗體，特別是人單株抗體。本發明亦提供編碼本發明之抗體的核酸分子、表現載體、宿主細胞及用於表現本發明之抗體的方法。本發明亦提供包含本發明之抗體的免疫偶聯物、雙特異性分子及醫藥組成物。本發明亦提供偵測 CXCR4 之方法及利用本發明之抗 CXCR4 抗體以治療各種癌症、發炎性疾病及 HIV 感染之方法。

【 英文 】

The present disclosure provides isolated monoclonal antibodies that specifically bind to CXCR4 with high affinity, particularly human monoclonal antibodies. Nucleic acid molecules encoding the antibodies of this disclosure, expression vectors, host cells and methods for expressing the antibodies of this disclosure are also provided. Immunoconjugates, bispecific molecules and pharmaceutical compositions comprising the antibodies of this disclosure are also provided. This disclosure also provides methods for detecting CXCR4, as well as methods for treating various cancers, inflammatory disorders and HIV infection using an anti-CXCR4 antibody of this disclosure.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(1A、1B)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：
無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

與 CXCR4 結合之人抗體及彼之用途

Human antibodies that bind CXCR4 and uses thereof

【技術領域】

本發明關於與 CXCR4 結合之人抗體及其用途。

【先前技術】

趨化因子(chemokines)係包含約 50 個小蛋白質之家族，其可調節細胞遷移及血管新生及在腫瘤微環境中亦具有重要功能(Vicari, A. P. and Caux, C. (2002) Cytokine Growth Factor Rev. 13:143-154)。根據它們的構造，趨化因子被分成 C-C 趨化因子(包含半胱胺酸-半胱胺酸模體(motif))或 C-X-C 趨化因子(包含半胱胺酸-X-半胱胺酸模體)。與該趨化因子結合之受體因此被分別歸類為 CCR 家族或 CXCR 家族之成員。CXCR 家族的成員之一係 CXCR4，其為大多表現在淋巴球上及活化趨化性之 7 次跨膜 G 蛋白偶聯受體。CXCR4 與趨化因子 CXCL12 (SDF-1) 結合。

CXCR4 影響胚胎發生、恆定狀態及發炎。經工程化以令鼠之 CXCR4 或 SDF-1 缺損的研究顯示，CXCR4/SDF-1 路徑與器官血管化及免疫和造血系統有關

(Tachibana, K. et al. (1998) *Nature* 393:591-594)。此外，CXCR4 經顯示可作為嗜 T 淋巴細胞 HIV-1 毒株之協同受體(Feng, Y. et al. (1996) *Science* 272:872-877)。CXCR4 亦經顯示可表現於廣泛之癌細胞類型。另外，CXCR4/SDF-1 路徑經顯示與刺激許多不同腫瘤之轉移過程有關(Murphy, P. M. (2001) *N. Engl. J. Med.* 345:833-835)。舉例來說，研究顯示 CXCR4 及 SDF-1 藉由在原發腫瘤部位及轉移部位之間產生趨化梯度以調節器官特異性轉移(Muller, A. et al. (2001) *Nature* 410:50-56; Murakami, T. et al. (2002) *Cancer Res.* 62:7328-7334; Hanahan, D. et al. (2003) *Cancer Res.* 63:3005-3008)。

【發明內容】

發明簡述

本發明提供與人 CXCR4 結合及展現數種所欲特性之經分離之單株抗體，特別是人單株抗體。這些特性包括與細胞表面上所表現之天然人 CXCR4 結合的能力、抑制 SDF-1 與人 CXCR4 結合之能力、抑制於表現 CXCR4 之細胞中經 SDF-1 誘發鈣離子流動之能力、抑制表現 CXCR4 之細胞經 SDF-1 誘發之移動的能力、抑制由人臍靜脈內皮細胞(HuVECs)之毛細血管形成的能力、誘發表現 CXCR4 之細胞凋亡的能力、於活體外抑制腫瘤細胞增生之能力、於活體內抑制腫瘤細胞增生之能力、抑制 CXCR4⁺ 腫瘤細胞轉移之能力及/或增加 CXCR4⁺ 腫瘤患

者存活時間之能力。

在一方面，本發明與經分離之人單株抗體或其抗原結合部位有關，其中該抗體與表現在細胞表面上之天然人 CXCR4 結合。在一實施態樣中，該抗體亦抑制 SDF-1 與人 CXCR4 結合，較佳以 50 nM 或更低，或 30 nM 或更低，或 15 nM 或更低，或 10 nM 或更低，或 5 nM 或更低，或 3 nM 或更低之 EC_{50} 值抑制(例如抑制之 EC_{50} 值為 28.60 nM 或更低、或 12.51 nM 或更低、或 2.256 nM 或更低)。在其他實施態樣中，該抗體與細胞表面上表現之天然人 CXCR4 結合，但是不抑制 SDF-1 與人 CXCR4 結合。在其他實施態樣中，該抗體亦抑制於表現人 CXCR4 之細胞中經 SDF-1 誘發之鈣離子流動，較佳以 3 nM 或更低，或 2 nM 或更低，或 1 nM 或更低，或 0.9 nM 或更低，或 0.8 nM 或更低，或 0.7 nM 或更低、或 0.6 nM 或更低、或 0.5 nM 或更低、或 0.4 nM 或更低之 EC_{50} 值抑制(例如 0.9046 nM 或更低、0.5684 nM 或更低、或 0.3219 nM 或更低)。在其他實施態樣中，該抗體亦抑制表現人 CXCR4 細胞經 SDF-1 誘發之移動，較佳以 50 nM 或更低，或 30 nM 或更低，或 20 nM 或更低，或 15 nM 或更低之 EC_{50} 值抑制(例如 18.99 nM 或更低、或 12.44 nM 或更低)。在其他實施態樣中，該抗體亦抑制由 HuVECs 之毛細血管形成、誘導表現 CXCR4 之細胞的凋亡、於活體外抑制腫瘤細胞增生、於活體內抑制腫瘤細胞增生或誘發腫瘤細胞凋亡、抑制 CXCR4⁺ 腫瘤

細胞轉移及/或增加 CXCR4⁺ 腫瘤患者之存活時間。

較佳的是，該抗體以高親和性(諸如以 1×10^{-7} M 或更低之 K_D 值或以 5×10^{-8} M 或更低之 K_D 值)與人 CXCR4 結合。較佳的是，本發明之抗體係全長抗體(也就是包含變異區及固定區)。另外，本發明之抗體較佳係以抗宿主細胞上或人工膜中以其天然構型表現之全長人 CXCR4 製備。

在較佳之態樣中，本發明關於一種經分離之人單株抗體或其抗原結合部位，其中該抗體：

- (a) 與表現在細胞表面上之天然人 CXCR4 結合；
- (b) 抑制 SDF-1 與人 CXCR4 結合；
- (c) 抑制於表現人 CXCR4 之細胞中經 SDF-1 誘發之鈣離子流動；
- (d) 抑制表現人 CXCR4 之細胞經 SDF-1 誘發的移動；及
- (e) 抑制由人臍靜脈內皮細胞之毛細血管形成。

甚至更佳的是，該抗體亦誘導表現人 CXCR4 之細胞的凋亡及/或抑制 CXCR4⁺ 腫瘤細胞生長及/或於活體內誘發腫瘤細胞凋亡。

在其他態樣中，本發明關於經分離之人單株抗體或其抗原結合部位，其中該抗體與參考抗體交互競爭與 CXCR4 之結合，其中該參考抗體包含：

- (a) 包含 SEQ ID NO:25 之胺基酸序列的重鏈變異區及包含 SEQ ID NO:29 之胺基酸序列的輕鏈變異區；或

(b) 包含 SEQ ID NO:26 之胺基酸序列的重鏈變異區及包含 SEQ ID NO:30 之胺基酸序列的輕鏈變異區；或

(c) 包含 SEQ ID NO:27 之胺基酸序列的重鏈變異區及包含 SEQ ID NO:31 之胺基酸序列的輕鏈變異區；或

(d) 包含 SEQ ID NO:28 之胺基酸序列的重鏈變異區及包含 SEQ ID NO:32 之胺基酸序列的輕鏈變異區。

在特定實施態樣中，本發明提供一種經分離之單株抗體或其抗原結合部位，其包含為人 V_H 3-48 基因之產物或衍生自該人 V_H 3-48 基因之產物的重鏈變異區，其中該抗體與人 CXCR4 專一性結合。在其他實施態樣中，本發明提供一種經分離之單株抗體或其抗原結合部位，其包含為人 V_K L15 基因之產物或衍生自該人 V_K L15 基因之產物的輕鏈變異區，其中該抗體與人 CXCR4 專一性結合。在其他實施態樣中，本發明提供一種經分離之單株抗體或其抗原結合部位，其包含為人 V_H 3-48 基因之產物或衍生自該人 V_H 3-48 基因之產物的重鏈變異區及為人 V_K L15 基因之產物或衍生自該人 V_K L15 基因之產物的輕鏈變異區，其中該抗體與人 CXCR4 專一性結合。

在其他態樣中，本發明提供一種經分離之單株抗體或其抗原結合部位，其包含：

包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列之重鏈變異區；及包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列之輕鏈變異區，其中：

(a) 該重鏈變異區 CDR3 序列包含選自 SEQ ID NO:9-12 中之胺基酸序列的胺基酸序列及其保留性修飾；

(b) 該輕鏈變異區 CDR3 序列包含選自 SEQ ID NO:21-24 中之胺基酸序列的胺基酸序列及其保留性修飾；及

(c) 該抗體與細胞表面上所表現之天然人 CXCR4 結合。

在較佳之實施態樣中，此抗體亦具有下列一或多項特徵：抑制 SDF-1 與 CXCR4 結合、抑制於表現 CXCR4 之細胞中經 SDF-1 誘發之鈣離子流動、抑制表現 CXCR4 之細胞經 SDF-1 誘發的移動；抑制由 HuVECs 之毛細血管形成；誘導表現 CXCR4 之細胞的細胞凋亡(活體外及/或活體內)、於活體外及/或活體內抑制 CXCR4⁺ 腫瘤細胞生長，及/或抑制 CXCR4⁺ 腫瘤細胞轉移。

較佳的是，該重鏈變異區 CDR2 序列包含選自 SEQ ID NO:5-8 中之胺基酸序列的胺基酸序列及其保留性修飾；及該輕鏈變異區 CDR2 序列包含選自 SEQ ID NO:17-20 中之胺基酸序列的胺基酸序列及其保留性修飾。較佳的是，該重鏈變異區 CDR1 序列包含選自 SEQ ID NO:1-4 中之胺基酸序列的胺基酸序列及其保留性修飾；及該輕鏈變異區 CDR1 序列包含選自 SEQ ID NO:13-16 中之胺基酸序列的胺基酸序列及其保留性修飾。

較佳之組合包含：

(a) 包含 SEQ ID NO:1 之重鏈變異區 CDR1；

(b) 包含 SEQ ID NO:5 之重鏈變異區 CDR2；

(c) 包含 SEQ ID NO:9 之重鏈變異區 CDR3；

- (d) 包含 SEQ ID NO:13 之輕鏈變異區 CDR1；
- (e) 包含 SEQ ID NO:17 之輕鏈變異區 CDR2；及
- (f) 包含 SEQ ID NO:21 之輕鏈變異區 CDR3。

其他較佳之組合包含：

- (a) 包含 SEQ ID NO:2 之重鏈變異區 CDR1；
- (b) 包含 SEQ ID NO:6 之重鏈變異區 CDR2；
- (c) 包含 SEQ ID NO:10 之重鏈變異區 CDR3；
- (d) 包含 SEQ ID NO:14 之輕鏈變異區 CDR1；
- (e) 包含 SEQ ID NO:18 之輕鏈變異區 CDR2；及
- (f) 包含 SEQ ID NO:22 之輕鏈變異區 CDR3。

其他較佳之組合包含：

- (a) 包含 SEQ ID NO:3 之重鏈變異區 CDR1；
- (b) 包含 SEQ ID NO:7 之重鏈變異區 CDR2；
- (c) 包含 SEQ ID NO:11 之重鏈變異區 CDR3；
- (d) 包含 SEQ ID NO:15 之輕鏈變異區 CDR1；
- (e) 包含 SEQ ID NO:19 之輕鏈變異區 CDR2；及
- (f) 包含 SEQ ID NO:23 之輕鏈變異區 CDR3。

其他較佳之組合包含：

- (a) 包含 SEQ ID NO:4 之重鏈變異區 CDR1；
- (b) 包含 SEQ ID NO:8 之重鏈變異區 CDR2；
- (c) 包含 SEQ ID NO:12 之重鏈變異區 CDR3；
- (d) 包含 SEQ ID NO:16 之輕鏈變異區 CDR1；
- (e) 包含 SEQ ID NO:20 之輕鏈變異區 CDR2；及
- (f) 包含 SEQ ID NO:24 之輕鏈變異區 CDR3。

本發明之其他較佳抗體或其抗原結合部位包含：(a) 包含選自 SEQ ID NO:25-28 及 41-44 中之胺基酸序列的重鏈變異區；及(b) 包含選自 SEQ ID NO:29-32 及 45-48 中之胺基酸序列的輕鏈變異區；其中該抗體與 CXCR4 專一性結合。

較佳之組合包含：(a) 包含 SEQ ID NO:25 或 41 之胺基酸序列的重鏈變異區；及(b) 包含 SEQ ID NO:29 或 45 之胺基酸序列的輕鏈變異區。

其他較佳之組合包含：(a) 包含 SEQ ID NO:26 或 42 之胺基酸序列的重鏈變異區；及(b) 包含 SEQ ID NO:30 或 46 之胺基酸序列的輕鏈變異區。

其他較佳之組合包含：(a) 包含 SEQ ID NO:27 或 43 之胺基酸序列的重鏈變異區；及(b) 包含 SEQ ID NO:31 或 47 之胺基酸序列的輕鏈變異區。

其他較佳之組合包含：(a) 包含 SEQ ID NO:28 或 44 之胺基酸序列的重鏈變異區；及(b) 包含 SEQ ID NO:32 或 48 之胺基酸序列的輕鏈變異區。

本發明之其他態樣提供與任何前述抗體競爭結合 CXCR4 之抗體或其抗原結合部位。

本發明之抗體舉例來說可為全長抗體，例如 IgG1 或 IgG4 同型。或者，該抗體可為抗體片段(諸如 Fab、Fab' 或 Fab'2 片段)，或單鏈抗體。

本發明亦提供一種免疫偶聯物，其包含與治療劑(諸如細胞毒素或放射性同位素)連接之本發明之抗體或其抗

原結合部位。本發明亦提供包含本發明之抗體或其抗原結合部位之雙特異性分子，其與具有異於該抗體或其抗原結合部位之結合專一性的第二官能性基團連接。

本發明亦提供包含本發明之抗體或其抗原結合部位或免疫偶聯物或雙特異性分子及藥學上可接受之載劑的組成物。

本發明亦包含編碼本發明之抗體或其抗原結合部位之核酸分子，以及包含該核酸之表現載體及包含該表現載體之宿主細胞。本發明亦提供利用包含該表現載體之宿主細胞製備抗 CXCR4 抗體之方法，其可能包括(i) 在宿主細胞中表現該抗體及(ii) 自宿主細胞分離該抗體之步驟。

本發明之其他態樣關於調節細胞中 CXCR4 活性之方法，其中令細胞與本發明之抗體或其抗原結合部位接觸。藉由令細胞與抗體一起培養可在活體外使細胞被接觸或藉由投服抗體至個體可在活體內使細胞被接觸。在較佳之實施態樣中，該細胞為表現 CXCR4 之腫瘤細胞且該方法導致抑制腫瘤細胞生長及/或抑制腫瘤細胞轉移。在其他實施態樣中，該細胞為表現 CXCR4 之 T 細胞且該方法導致抑制 HIV 進入細胞中。在其他實施態樣中，該細胞為發炎疾病中之淋巴球且該方法導致抑制發炎。在其他實施態樣中，該細胞與血管化有關且該方法導致調節血管新生。

在其他態樣中，本發明關於一種刺激 $CD34^+$ 幹細胞自個體之骨髓移動至週邊血液之方法，該方法包含投服本發明之抗體或其抗原結合部位至個體以刺激 $CD34^+$ 幹細

胞自骨髓移動至週邊血液。該方法可進一步包含自週邊血液收集 CD34⁺ 幹細胞，諸如自體幹細胞移植之用途。

本發明之其他特性及好處將顯見於下列詳細說明及實施方式中，但不應被視為具有限制性。所有本申請書所引述之參考文獻、基因登錄號(Genbank entries)、專利及公開專利申請書的內容以參照方式明確納入此處。

發明詳細說明

本發明關於經分離之單株抗體(特別是人單株抗體)，其與細胞表面上所表現之天然人 CXCR4 專一性結合。在特定實施態樣中，本發明之抗體源自特定重鏈及輕鏈胚系序列及/或包含特定結構特性諸如 CDR 區域包含特定胺基酸序列。本發明提供經分離之抗體、製備該抗體之方法、包含該抗體之免疫偶聯物及雙特異性分子，及包含本發明之抗體、免疫偶聯物或雙特異性分子之醫藥組成物。本發明亦關於使用抗體之方法，諸如用於偵測 CXCR4，或在與 CXCR4 表現有關或涉及 CXCR4/SDF-1 途徑之疾病或異常中(諸如癌症、腫瘤轉移、HIV 感染、發炎及血管新生)用於調節 CXCR4 之活性。因此，本發明亦提供使用本發明之抗 CXCR4 抗體以治療癌症之方法，例如治療乳癌、卵巢癌、前列腺癌、非小細胞肺癌、胰癌、甲狀腺癌、黑色素癌、鼻咽癌、腎細胞癌、淋巴癌、神經母細胞瘤、膠質母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、大腸直腸癌、腎癌、骨肉瘤、急性淋巴細胞白血病或急性骨髓性白血病。此外，

本發明提供使用本發明之抗 CXCR4 抗體以抑制腫瘤轉移之方法。

爲了更清楚的了解本發明，首先定義特定名詞。其它定義如詳細說明中各處所述。

「CXCR4」一詞包括變異體(variants)、同型體(isoforms)、同源物(homologs)、直系同源物(orthologs)及旁系同源物(paralogs)。舉例來說，對CXCR4具專一性之抗體在特定情況下可能與來自非人物種之CXCR4交叉反應。在其他實施態樣中，對人CXCR4具專一性之抗體可能對人CXCR4具有完全專一性及可能不展現物種或其他類型之交叉反應。「人CXCR4」一詞係指人序列CXCR4，諸如Genbank收錄號爲P61073之人CXCR4的完整胺基酸序列(SEQ ID NO:51)。CXCR4在該領域中亦被稱爲例如LESTR、融合素(Fusin)或CD184。人CXCR4序列可能與SEQ ID NO:51之人CXCR4不同，例如具有保留性突變或非保留區之突變及該CXCR4實質上具有與SEQ ID NO:51之人CXCR4相同的生物功能。舉例來說，人CXCR4之生物功能係在CXCR4之胞外結構域中具有與本發明之抗體專一性結合的抗原決定位，或人CXCR4之生物性功能係結合趨化因子或與腫瘤轉移過程有關。

特定人CXCR4序列之胺基酸序列通常與SEQ ID NO:51之人CXCR4具有至少90%之一致性及包含當與其他物種(例如鼠)之CXCR4胺基酸序列比較時可識別該

胺基酸序列之爲人之胺基酸序列的胺基酸殘基。在特定情況下，人 CXCR4 之胺基酸序列可能與 SEQ ID NO:51 之 CXCR4 具有至少 95%，或甚至至少 96%、97%、98% 或 99% 之一致性。在特定實施態樣中，人 CXCR4 序列將顯示與 SEQ ID NO:51 之 CXCR4 不超過 10 個胺基酸的差異。在特定實施態樣中，人 CXCR4 可能顯示與 SEQ ID NO:51 之 CXCR4 不超過 5 個，或甚至不超過 4、3、2 或 1 個胺基酸的差異。一致性百分比可依此處所述測定。

「SDF-1」一詞係指基質細胞衍生因子 1，其爲 CXCR4 之配體。「SDF-1」一詞包含 SDF-1 之不同同型體，諸如 SDF-1 α 及 SDF-1 β 。人 SDF-1 α 之胺基酸序列的 Genbank 收錄號爲 NP_954637。人 SDF-1 β 之胺基酸序列的 Genbank 收錄號爲 NP_000600。人 SDF-1 亦於美國專利第 5,756,084 號中描述。SDF-1 亦稱爲 CXCL12。人 SDF-1 之胺基酸序列可異於 NP_954637 或 NP_000600 之 SDF-1，如此處所述 CXCR4 之情形。

「免疫反應」一詞係指例如淋巴球、抗原表現細胞、吞噬細胞、顆粒細胞及由上述細胞或肝臟所產生之可溶性巨分子(包括抗體、細胞激素及補體)的作用，該作用導致選擇性破壞、摧毀或清除入侵人體中之病原、受病原感染之細胞或組織、癌細胞或在自體免疫或病理性發炎的狀況中之正常人細胞或組織。

「信號轉導路徑」係指具有自細胞的一部分傳遞信號至細胞其他部分之功能的各種信號轉導分子之間的生化關

係。此處所使用的「細胞表面受體」一詞包括例如可接受信號及傳遞該信號通過細胞質膜的分子及分子複合體。本發明之「細胞表面受體」的一個例子為 CXCR4 受體。

此處所指的「抗體」一詞包括完整抗體及任何抗原結合片段(意即「抗原結合部位」)或其單鏈。「抗體」係指包含以雙硫鍵相連之至少 2 條重(H)鏈及 2 條輕(L)鏈的糖蛋白，或其抗原結合部位。每條重鏈係由一個重鏈變異區(此處縮寫為 V_H)及一個重鏈固定區組成。重鏈固定區係由 3 個結構域(C_H1 、 C_H2 及 C_H3)組成。每條輕鏈係由一個輕鏈變異區(此處縮寫為 V_L)及一個輕鏈固定區組成。輕鏈固定區係由 1 個結構域(C_L)組成。 V_H 及 V_L 區可進一步細分為高變異區(稱為互補決定區(CDR))及夾雜其間較具保留性之區域(稱為構架區(FR))。每個 V_H 及 V_L 係由 3 個 CDRs 及 4 個 FRs 組成，以下列順序自胺基端至羧基端排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鏈及輕鏈之變異區包含與抗原交互反應之結合結構域。抗體之固定區可調節免疫球蛋白與宿主組織或因子之結合，包括免疫系統之各種細胞(例如效應細胞)及典型補體系統之第一成分(C1q))。

此處所使用之抗體的「抗原結合部位」(或簡稱「抗體部位」)一詞係指具有與抗原(例如 CXCR4)專一性結合之能力之一或多個抗體片段。研究顯示抗體之抗原結合功能可由全長抗體之片段進行。抗體之「抗原結合部位」一詞所包含的結合片段例子包括(i) Fab 片段，由 V_L 、 V_H 、

C_L 及 C_{H1} 結構域所組成之單價片段；(ii) $F(ab')_2$ 片段，包含 2 個以雙硫鍵連接絞鏈區之 Fab 片段的雙價片段；(iii) Fab' 片段，其實質上為包含部分絞鏈區之 Fab (見 FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3.sup.rd ed. 1993))；(iv) 由 V_H 及 C_{H1} 結構域組成之 Fd 片段；(v) 由抗體單臂之 V_L 及 V_H 結構域所組成的 Fv 片段；(vi) dAb 片段(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546)，其由 V_H 結構域組成；(vii) 經分離之互補決定區(CDR)；及(viii) 奈米抗體，包含單一變異結構域及 2 個固定結構域之重鏈變異區。另外，雖然 Fv 片段之 2 個結構域(V_L 及 V_H)係由分開之基因編碼，可利用重組方法藉由合成連接子將它們連接，以使它們可被製備為其中 V_L 及 V_H 區域配對以形成單價分子之單一蛋白質鏈(被稱為單鏈 Fv (scFv)；見例如 Bird et al. (1988) Science 242:423-426; and Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。該單鏈抗體亦意圖被包含在抗體之「抗原結合部位」一詞內。這些抗體片段係利用該領域之技術人士所知之傳統技術獲得，及該片段係經篩選以依與完整抗體相同之方式被利用。

此處所使用之「經分離之抗體」意指實質上不含其他具有不同抗原特異性之抗體的抗體(例如與 CXCR4 專一性結合之經分離之抗體實質上不含與非 CXCR4 抗原專一性結合之抗體)。然而，與 CXCR4 專一性結合之經分離之抗體可能具有對其他抗原(諸如來自其他物種之 CXCR4

分子)之交叉反應。另外，經分離之抗體可能實質上不含其他細胞物質及/或化學物質。

此處所使用之「單株抗體」或「單株抗體組成物」係指單一分子組成物之抗體分子製劑。單株抗體組成物展現對特定抗原決定位之單一結合專一性及親和性。

此處所使用之「人抗體」一詞意圖包括具有其中構架區及 CDR 區均源自人胚系免疫球蛋白序列之變異區的抗體。另外，如果抗體包含固定區，該固定區亦源自人胚系免疫球蛋白序列。本發明之人抗體可包括非由人胚系免疫球蛋白序列所編碼之胺基酸殘基(例如由活體外隨機或定點突變或由活體內體突變所導入之突變)。然而，此處所使用之「人抗體」一詞並非意圖包括其中源自其他哺乳類物種(諸如鼠)胚系之 CDR 序列已被移殖至人構架序列之抗體。

「人單株抗體」一詞係指展現單一結合專一性之抗體，其具有其中構架區及 CDR 區均源自人胚系免疫球蛋白序列之變異區。在一實施態樣中，人單株抗體係由包括融合至永生化細胞之 B 細胞的融合瘤產生，該 B 細胞得自具有包含人重鏈轉殖基因及輕鏈轉殖基因之基因體的基因轉殖非人動物(例如基因轉殖鼠)。

此處所使用之「重組人抗體」一詞包括所有以重組方式製備、表現、生產或經分離之人抗體，諸如(a)自轉殖人免疫球蛋白基因或染色體之動物(例如鼠)或由其所製備之融合瘤分離的抗體(如下述)，(b)自經轉化以表現人抗

體之宿主細胞(例如自轉染瘤)分離之抗體，(c) 自重組、組合之人抗體庫分離的抗體，及(d) 以任何其他涉及剪接人免疫球蛋白基因序列至其他 DNA 序列之方法所製備、表現、生產或分離之抗體。該重組人抗體具有其中構架區及 CDR 區係源自人胚系免疫球蛋白序列之變異區。然而在特定實施態樣中，該重組人抗體可發生活體外突變(或使用轉殖人 Ig 序列之動物時之活體內體突變)，因此當該重組抗體之 V_H 及 V_L 區域的胺基酸序列係源自及關於人胚系 V_H 及 V_L 序列時，其為天然可能不存在活體內人抗體胚系庫中之序列。

此處所使用之「同型」係指由重鏈固定區基因所編碼之抗體類型(例如 IgM 或 IgG1)。

「識別抗原之抗體」及「具抗原專一性之抗體」之用語在此處可與「與抗原專一性結合之抗體」交換使用。

「人抗體衍生物」一詞係指任何修飾形式之人抗體，例如抗體與其他劑質或抗體之偶聯物。

「人化抗體」一詞意圖指其中源自其他哺乳類動物(諸如鼠)胚系之 CDR 序列被移植至人構架序列之抗體。其它構架區修飾可在人構架序列中進行。

「嵌合抗體」一詞意圖指其中變異區序列源自一物種及固定區序列源自其他物種之抗體，諸如其中變異區序列源自鼠抗體及固定區序列源自人抗體之抗體。

此處所使用之「與人 CXCR4 專一性結合」之抗體意圖指與人 CXCR4 (及可能是來自一或多種非人物種之

CXCR4)結合但實質上不與非 CXCR4 蛋白質結合之抗體。在特定實施態樣中，本發明之抗體與 SEQ ID NO:51 之人 CXCR4 或其變異體專一性結合。較佳的是，該抗體以 1×10^{-7} M 或更低(更佳以 5×10^{-8} M 或更低、更佳以 3×10^{-8} M 或更低、更佳以 1×10^{-8} M 或更低、甚至更佳以 5×10^{-9} M 或更低)之 K_D 值與人 CXCR4 結合。

此處所使用之「實質上不結合」蛋白質或細胞係指不結合或不以高親和性結合蛋白質或細胞，意即以 1×10^{-6} M 或更高(更佳以 1×10^{-5} M 或更高、更佳以 1×10^{-4} M 或更高、更佳以 1×10^{-3} M 或更高、甚至更佳以 1×10^{-2} M 或更高)之 K_D 值結合蛋白質或細胞。

此處所使用之「 K_{assoc} 」或「 K_a 」一詞意圖指特定抗體-抗原交互作用之結合率，然而此處所使用之「 K_{dis} 」或「 K_d 」一詞意圖指特定抗體-抗原交互作用之解離率。此處所使用之「 K_D 」一詞意圖指解離常數，其係自 K_d 與 K_a 之比(意即 K_d/K_a)求出及係以莫耳濃度(M)表示。抗體之 K_D 值可利用該領域已完整建立之方法測定。測定抗體 K_D 值之較佳方法係利用表面電漿共振技術進行，以使用生物感測器系統諸如 Biacore® 系統為佳。

此處所使用之對 IgG 抗體具有「高親和性」一詞係指抗體對目標抗原具有 1×10^{-7} M 或更低(更佳為 5×10^{-8} M 或更低、甚至更佳為 1×10^{-8} M 或更低、甚至更佳為 5×10^{-9} M 或更低及甚至更佳為 1×10^{-9} M 或更低)之 K_D 值。然而，對其他抗體同型而言「高親和性」結合可有所

不同。舉例來說，與 IgM 同型「高親和性」結合係指抗體之 K_D 值為 10^{-6} M 或更低(更佳為 10^{-7} M 或更低、甚至更佳為 10^{-8} M 或更低)。

此處所使用之「個體」一詞包括任何人或非人動物。「非人動物」一詞包括所有脊椎動物，例如哺乳類及非哺乳類，諸如非人靈長類、羊、狗、貓、馬、牛、雞、兩棲類、爬蟲類等。

本發明之不同態樣於下面更詳細地描述。

抗 CXCR4 抗體

本發明之抗體的特徵為具有抗體之特定功能性質或特性。舉例來說，抗體與在細胞表面上表現之天然人 CXCR4 結合。較佳的是，本發明之抗體以高親和性與 CXCR4 結合，例如 10^{-7} M 或更低之 K_D 值。本發明之抗 CXCR4 抗體以展現一或多項下列特徵為宜：

- (a) 與表現在細胞表面上之天然人 CXCR4 結合；
- (b) 抑制 SDF-1 與 CXCR4 結合；
- (c) 抑制於表現 CXCR4 之細胞中經 SDF-1 誘發之鈣離子流動；
- (d) 抑制表現 CXCR4 之細胞經 SDF-1 誘發的移動；
- (e) 抑制由人臍靜脈內皮細胞之毛細血管形成；
- (f) 以 10^{-7} M 或更低之 K_D 值與人 CXCR4 結合；
- (g) 誘發表現 CXCR4 之細胞的細胞凋亡；

- (h) 於活體內抑制腫瘤細胞增生；
- (i) 於活體內抑制腫瘤細胞增生及/或誘發腫瘤細胞凋亡；
- (j) 抑制 CXCR4⁺ 腫瘤細胞之轉移；及/或
- (k) 增加 CXCR4⁺ 腫瘤患者之存活時間。

在特定實施態樣中，本發明之抗體與細胞表面上之天然人 CXCR4 結合但是不抑制 SDF-1 與 CXCR4 結合及不抑制於表現 CXCR4 之細胞中經 SDF-1 誘發之鈣離子流動及不抑制表現 CXCR4 之細胞經 SDF-1 誘發的移動。在其他實施態樣中，本發明之抗體與細胞表面上之天然人 CXCR4 結合及抑制 SDF-1 與 CXCR4 結合及抑制於表現 CXCR4 之細胞中經 SDF-1 誘發之鈣離子流動但不抑制表現 CXCR4 之細胞經 SDF-1 誘發的移動。在其他實施態樣中，本發明之抗體與細胞表面上之天然人 CXCR4 結合及抑制 SDF-1 與 CXCR4 結合及抑制於表現 CXCR4 之細胞中經 SDF-1 誘發之鈣離子流動及抑制表現 CXCR4 之細胞經 SDF-1 誘發的移動。在其他實施態樣中，本發明之抗體與細胞表面上之天然人 CXCR4 結合、抑制 SDF-1 與 CXCR4 結合、抑制於表現 CXCR4 之細胞中經 SDF-1 誘發之鈣離子流動、抑制表現 CXCR4 之細胞經 SDF-1 誘發的移動及抑制由 HuVECs 之毛細血管形成。

較佳的是，本發明之抗體以 5×10^{-8} M 或更低之 K_D 值與人 CXCR4 結合，以 2×10^{-8} M 或更低之 K_D 值與人 CXCR4 結合，以 5×10^{-9} M 或更低之 K_D 值與人 CXCR4

結合，以 4×10^{-9} M 或更低之 K_D 值與人 CXCR4 結合，以 3×10^{-9} M 或更低之 K_D 值與人 CXCR4 結合，或以 2×10^{-9} M 或更低之 K_D 值與人 CXCR4 結合。

較佳的是，本發明之抗體以 50 nM 或更低之抑制 EC_{50} 值抑制 SDF-1 與人 CXCR4 結合，更佳為 30 nM 或更低，或 15 nM 或更低，或 10 nM 或更低，或 5 nM 或更低，或 3 nM 或更低(例如 28.60 nM 或更低，或 12.51 nM 或更低，或 2.256 nM 或更低之抑制 EC_{50} 值)。

較佳的是，本發明之抗體以 3 nM 或更低(更佳為 2 nM 或更低，或 1 nM 或更低，或 0.9 nM 或更低，或 0.8 nM 或更低，或 0.7 nM 或更低，或 0.6 nM 或更低，或 0.5 nM 或更低，或 0.4 nM 或更低)之抑制 EC_{50} 值抑制於表現人 CXCR4 之細胞中經 SDF-1 誘發之鈣離子流動(例如 0.9046 nM 或更低，0.5684 nM 或更低，或 0.3219 nM 或更低)。

較佳的是，本發明之抗體以 50 nM 或更低(更佳為 30 nM 或更低，或 20 nM 或更低，或 15 nM 或更低)之抑制 EC_{50} 值抑制表現人 CXCR4 之細胞經 SDF-1 誘發的移動(例如 18.99 nM 或更低，或 12.44 nM 或更低)。

評估抗體對表現在細胞表面上之天然人 CXCR4 之結合能力的標準試驗係該領域中所知，包括例如使用自然表現天然 CXCR4 或經轉染以表現天然 CXCR4 之細胞系的流式細胞分析。適當分析方法詳細描述於實施例中。表現

天然 CXCR4 之較佳細胞系為 CEM T 細胞系。實施例中亦詳細描述用於評估抑制與 SDF-1 結合、抑制 SDF-1 所誘發之鈣離子流動、抑制 SDF-1 所誘發之細胞移動、抑制 HuVECs 之毛細血管形成、於活體外及/或活體內誘導表現 CXCR4 之細胞的凋亡、抑制活體外及/或活體內 CXCR4⁺ 腫瘤細胞之生長，及/或抑制 CXCR4⁺ 腫瘤細胞轉移之適當檢測法。抗體之結合親和性亦可以標準方法測定，諸如斯科查德(Scatchard)分析法。

單株抗體 F7、F9、D1 及 E2

本發明之較佳抗體係人單株抗體 F7、F9、D1 及 E2，以實施例 1 及 2 中所述之方式加以分離及結構特徵化。F7、F9、D1 及 E2 之 V_H 胺基酸序列係分別如 SEQ ID NO: 25, 26, 27 及 28 中所示。F7、F9、D1 及 E2 之 V_L 胺基酸序列係分別如 SEQ ID NO: 29, 30, 31 及 32 中所示。此外製備替代形式之 F7、F9、D1 及 E2 (其中特定構架殘基以胚系殘基取代)，並在此處以 F7GL、F9GL、D1GL 及 E2GL 表示。F7GL、F9GL、D1GL 及 E2GL 之 V_H 胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 41, 42, 43 及 44 中所示。F7GL、F9GL、D1GL 及 E2GL 之 V_L 胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 45, 46, 47 及 48 中所示。

由於這些抗體中的每一個都可以和 CXCR4 結合，因此該 V_H 及 V_L 序列可被「混合及配對」以產生本發明之其他抗 CXCR4 結合分子。CXCR4 與該「混合及配對」

抗體之結合可利用上述及實施例中所描述之結合試驗分析(例如 CEM 細胞之流式細胞分析)。較佳的是，當 V_H 及 V_L 鏈被混合及配對時，來自特定 V_H/V_L 對之 V_H 序列係以結構類似之 V_H 序列取代。同樣的，來自特定 V_H/V_L 對之 V_L 序列以結構類似之 V_L 序列取代為宜。

因此在一態樣中，本發明提供一種經分離之單株抗體或其抗原結合部位，其包含：

(a) 包含選自 SEQ ID NO:25-28 及 41-44 中之胺基酸序列的重鏈變異區；及

(b) 包含選自 SEQ ID NO:29-32 及 45-48 中之胺基酸序列的輕鏈變異區；

其中該抗體與 CXCR4 專一性結合，特別是人 CXCR4。

較佳之重鏈及輕鏈組合包括：

(a) 包含 SEQ ID NO:25 或 41 之胺基酸序列的重鏈變異區及包含 SEQ ID NO:29 或 45 之胺基酸序列的輕鏈變異區；或

(b) 包含 SEQ ID NO:26 或 42 之胺基酸序列的重鏈變異區及包含 SEQ ID NO:30 或 46 之胺基酸序列的輕鏈變異區；或

(c) 包含 SEQ ID NO:27 或 43 之胺基酸序列的重鏈變異區及包含 SEQ ID NO:31 或 47 之胺基酸序列的輕鏈變異區；或

(d) 包含 SEQ ID NO:28 或 44 之胺基酸序列的重鏈變

異區及包含 SEQ ID NO:32 或 48 之胺基酸序列的輕鏈變異區。

在其他態樣中，本發明提供包含 F7、F9、D1 或 E2 之重鏈及輕鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 或彼等組合之抗體。F7、F9、D1 及 E2 之 V_H CDR1 的胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 1-4 中所示。F7、F9、D1 及 E2 之 V_H CDR2 的胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 5-8 中所示。F7、F9、D1 及 E2 之 V_H CDR3 的胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 9-12 中所示。F7、F9、D1 及 E2 之 V_K CDR1 的胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 13-16 中所示。F7、F9、D1 及 E2 之 V_K CDR2 的胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 17-20 中所示。F7、F9、D1 及 E2 之 V_K CDR3 的胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 21-24 中所示。該 CDR 區係利用 Kabat 系統描述(Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。

由於這些抗體中之每一個均可與 CXCR4 結合且抗原結合專一性主要係由 CDR1、CDR2、及 CDR3 區決定，該 V_H CDR1、CDR2、及 CDR3 序列及 V_K CDR1、CDR2、及 CDR3 序列可被「混合及配對」(意即來自不同抗體之 CDR 可被混合及配對，雖然每個抗體必需包含一個 V_H CDR1、CDR2、及 CDR3 及一個 V_K CDR1、CDR2、及 CDR3)以產生本發明之其他抗 CXCR4 結合分

子。CXCR4 與該「混合及配對」抗體之結合可利用上述及實施例中所描述之結合試驗分析(例如 ELISA、Biacore[®] 分析)。較佳的是，當 V_H CDR 序列被混合及配對時，來自特定 V_H 序列之 CDR1、CDR2、及/或 CDR3 序列係以結構類似之 CDR 序列取代。同樣的，當 V_K CDR 序列被混合及配對時，來自特定 V_K 序列之 CDR1、CDR2、及/或 CDR3 序列以結構類似之 CDR 序列取代為宜。對於該領域一般技術人士顯而易見的是，單株抗體 F7、F9、D1 及 E2 之新穎 V_H 及 V_L 序列可藉由以結構類似於來自此處所揭示之 CDR 序列的序列取代一或多個 V_H 及/或 V_L CDR 區序列而產生。

因此在另一態樣中，本發明提供一種經分離之單株抗體或其抗原結合部位，其包含：

(a) 包含選自 SEQ ID NO:1-4 中之胺基酸序列的重鏈變異區 CDR1；

(b) 包含選自 SEQ ID NO:5-8 中之胺基酸序列的重鏈變異區 CDR2；

(c) 包含選自 SEQ ID NO:9-12 中之胺基酸序列的重鏈變異區 CDR3；

(d) 包含選自 SEQ ID NO:13-16 中之胺基酸序列的輕鏈變異區 CDR1；

(e) 包含選自 SEQ ID NO:17-20 中之胺基酸序列的輕鏈變異區 CDR2；及

(f) 包含選自 SEQ ID NO:21-24 中之胺基酸序列的輕

鏈變異區 CDR3；

其中該抗體與 CXCR4 專一性結合，特別是人 CXCR4。

在較佳之實施態樣中，該抗體包含：

- (a) 包含 SEQ ID NO:1 之重鏈變異區 CDR1；
- (b) 包含 SEQ ID NO:5 之重鏈變異區 CDR2；
- (c) 包含 SEQ ID NO:9 之重鏈變異區 CDR3；
- (d) 包含 SEQ ID NO:13 之輕鏈變異區 CDR1；
- (e) 包含 SEQ ID NO:17 之輕鏈變異區 CDR2；及
- (f) 包含 SEQ ID NO:21 之輕鏈變異區 CDR3。

在其他較佳之實施態樣中，該抗體包含：

- (a) 包含 SEQ ID NO:2 之重鏈變異區 CDR1；
- (b) 包含 SEQ ID NO:6 之重鏈變異區 CDR2；
- (c) 包含 SEQ ID NO:10 之重鏈變異區 CDR3；
- (d) 包含 SEQ ID NO:14 之輕鏈變異區 CDR1；
- (e) 包含 SEQ ID NO:18 之輕鏈變異區 CDR2；及
- (f) 包含 SEQ ID NO:22 之輕鏈變異區 CDR3。

在其他較佳之實施態樣中，該抗體包含：

- (a) 包含 SEQ ID NO:3 之重鏈變異區 CDR1；
- (b) 包含 SEQ ID NO:7 之重鏈變異區 CDR2；
- (c) 包含 SEQ ID NO:11 之重鏈變異區 CDR3；
- (d) 包含 SEQ ID NO:15 之輕鏈變異區 CDR1；
- (e) 包含 SEQ ID NO:19 之輕鏈變異區 CDR2；及
- (f) 包含 SEQ ID NO:23 之輕鏈變異區 CDR3。

在其他較佳之實施態樣中，該抗體包含：

- (a) 包含 SEQ ID NO:4 之重鏈變異區 CDR1；
- (b) 包含 SEQ ID NO:8 之重鏈變異區 CDR2；
- (c) 包含 SEQ ID NO:12 之重鏈變異區 CDR3；
- (d) 包含 SEQ ID NO:16 之輕鏈變異區 CDR1；
- (e) 包含 SEQ ID NO:20 之輕鏈變異區 CDR2；及
- (f) 包含 SEQ ID NO:24 之輕鏈變異區 CDR3。

該領域所熟知的是，單獨之 CDR3 結構域(與 CDR1 及/或 CDR2 結構域無關)可決定抗體與偶聯抗原之結合專一性及根據共同之 CDR3 序列可預期地產生具有相同結合專一性之多重抗體。參見例如 Klimka et al., *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000) (描述僅利用鼠抗 CD30 抗體 Ki-4 之重鏈變異結構域 CDR3 製備人化抗 CD30 抗體)；Beiboer et al., *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000) (描述僅利用親代鼠 MOC-31 抗 EGP-2 抗體重鏈 CDR3 序列之重組表皮糖蛋白 2 (EGP-2) 抗體)；Rader et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998) (描述利用鼠抗整合素 $\alpha_v\beta_3$ 抗體 LM609 之重鏈及輕鏈變異區 CDR3 結構域的一組人化抗整合素 $\alpha_v\beta_3$ 抗體，其中各組成抗體在 CDR3 結構域之外包含不同序列及可具親代鼠抗體之高親和性或更高親和性以與親代鼠抗體相同之抗原決定位結合)；Barbas et al., *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994) (揭示 CDR3 結構域對抗原結合有最顯著之影響)；Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2529-2533

(1995) (描述移植 3 個抗人胎盤 DNA 之 Fabs (SI-1, SI-40 及 SI-32) 的重鏈 CDR3 序列至抗破傷風類毒素 Fab 之重鏈藉此取代現存之重鏈 CDR3 及證實單獨 CDR3 結構域可提供結合專一性) ; Ditzel et al., J. Immunol. 157:739-749 (1996) (描述其中僅轉移親代多專一性 Fab LNA3 之重鏈 CDR3 至單專一性 IgG 破傷風類毒素結合 Fab p313 抗體之重鏈足以維持該親代 Fab 結合專一性之移植試驗) ; Berezov et al., BIAjournal 8:Scientific Review 8 (2001) (描述根據抗 HER2 單株抗體之 CDR3 的肽擬物) ; Igarashi et al., J. Biochem (Tokyo) 117:452-7 (1995) (描述對應抗磷脂絲胺酸(phosphatidylserine) 抗體之 CDR3 結構域的 12 個胺基酸合成多肽) ; Bourgeois et al., J. Virol 72:807-10 (1998) (顯示源自抗呼吸道融合病毒(RSV)抗體重鏈 CDR3 結構域之單一肽可在活體外中和該病毒) ; Levi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:4374-8 (1993) (描述根據鼠抗 HIV 抗體重鏈 CDR3 結構域之肽) ; Polymenis and Stoller, J. Immunol. 152:5218-5329 (1994) (描述藉由移植 Z-DNA-結合抗體之重鏈 CDR3 區域以令 scFv 結合) ; 及 Xu and Davis, Immunity 13:37-45 (2000) (描述重鏈 CDR3 之多樣性足以令其他部分相同之 IgM 分子識別各種半抗原(hapten)及蛋白質抗原)。亦可參考美國專利第 6,951,646; 6,914,128; 6,090,382; 6,818,216; 6,156,313; 6,827,925; 5,833,943; 5,762,905 及 5,760,185 號, 其描述以單一 CDR 結構域定義之專利抗體。這些參

考資料各以參照方式整體納入此處。

因此，本發明提供包含一或多個來自源自人或非人動物抗體之重鏈及/或輕鏈 CDR3 結構域的單株抗體，其中該單株抗體可與 CXCR4 專一性結合。在特定態樣中，本發明提供包含一或多個來自非人抗體(諸如小鼠或大鼠抗體)之重鏈及/或輕鏈 CDR3 結構域的單株抗體，其中該單株抗體可與 CXCR4 專一性結合。在一些實施態樣中，該包含一或多個來自非人抗體之重鏈及/或輕鏈 CDR3 結構域的新穎抗體 (a) 可與對應之親代非人抗體競爭結合；(b) 維持對應之親代非人抗體的功能特徵；(c) 與對應之親代非人抗體的相同抗原決定位結合；及/或(d) 具有與對應之親代非人抗體類似的結合親和性。

在其他態樣中，本發明提供包含一或多個來自人抗體(例如得自非人動物之人抗體)之重鏈及/或輕鏈 CDR3 結構域的單株抗體，其中該人抗體可與 CXCR4 專一性結合。在其他態樣中，本發明提供包含一或多個來自第一人抗體(例如得自非人動物之人抗體)之重鏈及/或輕鏈 CDR3 結構域的單株抗體，其中該第一人抗體可與 CXCR4 專一性結合及其中該來自第一人抗體之 CDR3 結構域取代不具 CXCR4 結合專一性之人抗體中的 CDR3 結構域以產生可與 CXCR4 專一性結合之第二人抗體。在一些實施態樣中，該包含一或多個來自第一人抗體之重鏈及/或輕鏈 CDR3 結構域的新穎抗體(a) 可與對應之親代第一人抗體競爭結合；(b) 維持對應之親代第一人抗體之功能特徵；

(c) 與對應之親代第一人抗體之相同抗原決定位結合；及/
或(d) 具有與對應之親代第一人抗體類似的結合親和性。

具有特定胚系序列之抗體

在特定實施態樣中，本發明之抗體包含來自特定胚系重鏈免疫球蛋白基因之重鏈變異區及/或來自特定胚系輕鏈免疫球蛋白基因之輕鏈變異區。

例如在較佳之實施態樣中，本發明提供經分離之單株抗體或其抗原結合部位，其包含為人 V_H 3-48 基因之產物或衍生自該人 V_H 3-48 基因之產物的重鏈變異區，其中該抗體與 CXCR4 專一性結合。在其他較佳實施態樣中，本發明提供一種經分離之單株抗體或其抗原結合部位，其包含為人 V_K L15 基因之產物或衍生自該人 V_K L15 基因之產物的輕鏈變異區，其中該抗體與 CXCR4 專一性結合。在其他較佳實施態樣中，本發明提供一種經分離之單株抗體或其抗原結合部位，其中該抗體包含為人 V_H 3-48 基因之產物或衍生自該人 V_H 3-48 基因之產物的重鏈變異區及包含為人 V_K L15 基因之產物或衍生自該人 V_K L15 基因之產物的輕鏈變異區，其中該抗體與 CXCR4 專一性結合，特別是人 CXCR4。該抗體亦可具有一或多個如上詳述之功能特徵，諸如與表現在細胞表面上之天然 CXCR4 結合、抑制 SDF-1 與 CXCR4 結合、抑制於表現 CXCR4 之細胞中經 SDF-1 誘發之鈣離子流動、抑制表現 CXCR4 之細胞經 SDF-1 誘發的移動、抑制由 HuVECs 之毛細血

管形成、於活體外及/或活體內誘導表現 CXCR4 之細胞的細胞凋亡、於活體外及/或活體內抑制 CXCR4⁺ 腫瘤細胞生長，及/或抑制 CXCR4⁺ 腫瘤細胞轉移。

分別具有 V_H 3-48 及 V_K L15 之 V_H 及 V_K 的抗體實例係 F7、F9、D1 及 E2 抗體。

此處所使用之人抗體包含為特定胚系序列之「產物」或「衍生自該產物」的重鏈或輕鏈變異區，若該抗體之變異區係得自使用人胚系免疫球蛋白基因之系統。該系統包括以所欲抗原免疫帶有人免疫球蛋白基因之基因轉殖鼠或以所欲抗原篩選展現在噬菌體上之人免疫球蛋白基因庫。為人胚系免疫球蛋白序列之「產物」或「衍生自該產物」的人抗體可藉由比較人抗體之胺基酸序列與人胚系免疫球蛋白之胺基酸序列及篩選在序列上與人抗體之序列最接近(一致性%最高)之人胚系免疫球蛋白序列來加以識別。為特定人胚系免疫球蛋白序列之「產物」或「衍生自該產物」的人抗體相較於該胚系序列可能包含例如因天然發生之體突變或意圖導入之定點突變所導致之胺基酸差異。然而，經篩選之人抗體的胺基酸序列通常與由人胚系免疫球蛋白基因所編碼之胺基酸序列具有至少 90% 之一致性及包含當與其他物種之胚系免疫球蛋白胺基酸序列(例如鼠胚系序列)比較時可識別該人抗體之為人抗體的胺基酸殘基。在特定情況中，人抗體之胺基酸序列可能與該胚系免疫球蛋白基因所編碼之胺基酸序列具有至少 95%，或甚至至少 96%、97%、98% 或 99% 的一致性。通常，源自特

定人胚系序列之人抗體將展現不超過 10 個相較於該人胚系免疫球蛋白基因所編碼之胺基酸序列的胺基酸差異。在特定情況中，該人抗體可展現不超過 5 個或甚至不超過 4、3、2 或 1 個相較於該胚系免疫球蛋白基因所編碼之胺基酸序列的胺基酸差異。

同源抗體

在其他實施態樣中，本發明之抗體包含重鏈及輕鏈變異區，其包含與此處所述之較佳抗體的胺基酸序列同源的胺基酸序列，及其中該抗體保留本發明之抗 CXCR4 抗體所欲之功能特性。

舉例來說，本發明提供一種經分離之單株抗體或其抗原結合部位，其包含重鏈變異區及輕鏈變異區，其中：

(a) 該重鏈變異區包含與選自 SEQ ID NO: 25-28 及 41-44 中之胺基酸序列具有至少 80% 同源性之胺基酸序列；

(b) 該輕鏈變異區包含與選自 SEQ ID NO: 29-32 及 45-48 中之胺基酸序列具有至少 80% 同源性之胺基酸序列；

(c) 該抗體與表現在細胞表面上之天然人 CXCR4 結合。

此外或二者擇一地，該抗體可能具有下列一或多種功能特性：(i) 以 1×10^{-7} M 或更低之 K_D 值與人 CXCR4 結合；(ii) 抑制 SDF-1 與 CXCR4 結合；(iii) 抑制於表

現 CXCR4 之細胞中經 SDF-1 誘發之鈣離子流動；(iv) 抑制表現 CXCR4 之細胞經 SDF-1 誘發的移動；(v) 抑制由 HuVECs 之毛細血管形成；(vi) 於活體外及/或活體內誘發表現 CXCR4 之細胞的細胞凋亡；(vii) 於活體外及/或活體內抑制 CXCR4⁺ 腫瘤細胞生長；及/或(viii) 抑制 CXCR4⁺ 腫瘤細胞轉移。

在不同的實施態樣中，該抗體可為例如人抗體、人化抗體或嵌合抗體。

在其他實施態樣中，該 V_H 及/或 V_L 胺基酸序列可與前述之序列具有 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 之同源性。具有對前述序列之 V_H 及 V_L 區有高度(意即 80% 或更高)同源性之 V_H 及 V_L 區的抗體可藉由令編碼 SEQ ID NO:25-32 或 41-48 之核酸分子發生突變(例如定點或 PCR 媒介突變)得到，之後利用此處所描述之功能試驗檢測該編碼改變抗體所保留之功能(意即前述功能)。

此處所使用之二個胺基酸序列之間的同源性百分比相當於二個序列之間的一致性百分比。二序列之間的一致性百分比隨序列之間完全相同之位置數而定(意即%同源性=相同位置數/總位置數×100)，考慮到為達二序列最佳比對所需導入之間隔數及各間隔長度。比較序列及決定二序列間之一致性百分比可利用數學演算式完成，如下於非限制性實例中所述。

二個胺基酸序列之間的一致性百分比可利用 E.

Meyers 及 W. Miller 已被納入 ALIGN 程式(第二版)之演算法決定(Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)), 其使用 PAM120 權重殘基表、間隔長度罰分 12 及間隔罰分 4。此外, 二個胺基酸序列之間的一致性百分比可利用已被納入 GCG 套裝軟體中之 GAP 程式(可得自 <http://www.gcg.com>)的尼德曼及馮斯(Needleman and Wunsch) (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970))演算法決定, 其使用 Blossum 62 矩陣或 PAM250 矩陣, 及間隔權重 16、14、12、10、8、6 或 4 及長度權重 1、2、3、4、5 或 6。

此外或二者擇一地, 本發明之蛋白質序列可進一步用來作為「查詢序列(query sequence)」以進行公共資料庫搜尋, 以例如找出相關序列。該搜尋可利用 Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10 之 XBLAST 程式(第二版)進行。BLAST 蛋白質搜尋可利用 XBLAST 程式、得分=50、文字長度(wordlength)=3 進行以得到與本發明之抗體分子具同源性的胺基酸序列。要得到比較目的之間隔比對, 可利用如 Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402 中所描述之 Gapped BLAST 進行。當使用 BLAST 及 Gapped BLAST 程式時, 可利用個別程式(例如 XBLAST 及 NBLAST)之內建參數。參見 www.ncbi.nlm.nih.gov。

具保留性修飾之抗體

在特定實施態樣中，本發明之抗體包含重鏈變異區(其包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列)及輕鏈變異區(其包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列)，其中一或多個這些 CDR 序列包含以此處所描述之較佳抗體(例如 F7、F9、D1 或 E2)為基礎之特定胺基酸序列或其保留性修飾，且其中該抗體保留本發明之抗 CXCR4 抗體之所欲功能特性。在該領域所了解的是，可進行特定保留性序列修飾而不影響抗原結合性。參見例如 Brummell et al. (1993) *Biochem* 32:1180-8 (描述對沙門氏菌(*Salmonella*) 具專一性之抗體的 CDR3 重鏈結構域突變分析)；de Wildt et al. (1997) *Prot. Eng.* 10:835-41 (描述抗 UA1 抗體之突變研究)；Komissarov et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:26864-26870 (顯示在 HCDR3 中間之突變導致親和性消失或降低)；Hall et al. (1992) *J. Immunol.* 149:1605-12 (描述 CDR3 區域中單一胺基酸改變使結合活性消失)；Kelley and O'Connell (1993) *Biochem.* 32:6862-35 (描述 Tyr 殘基對抗原結合性之影響)；Adib-Conquy et al. (1998) *Int. Immunol.* 10:341-6 (描述疏水性對結合之影響)及 Beers et al. (2000) *Clin. Can. Res.* 6:2835-43 (描述 HCDR3 胺基酸突變)。因此，本發明提供一種包含重鏈變異區(其包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列)及輕鏈變異區(其包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列)之經分離之單株抗體或其抗原結合部位，其中：

(a) 該重鏈變異區 CDR3 序列包含選自 SEQ ID

NO:9-12 中之胺基酸序列的胺基酸序列及其保留性修飾；

(b) 該輕鏈變異區 CDR3 序列包含選自 SEQ ID NO:21-24 中之胺基酸序列的胺基酸序列及其保留性修飾；及

(c) 該抗體與表現在細胞表面上之天然人 CXCR4 結合。

此外或二者擇一地，該抗體可能具有下列一或多項功能特性：(i) 以 1×10^{-7} M 或更低之 K_D 值與人 CXCR4 結合；(ii) 抑制 SDF-1 與 CXCR4 結合；(iii) 抑制於表現 CXCR4 之細胞中經 SDF-1 誘發之鈣離子流動；(iv) 抑制表現 CXCR4 之細胞經 SDF-1 誘發的移動；(v) 抑制由 HuVECs 之毛細血管形成；(vi) 於活體外及/或活體內誘發表現 CXCR4 之細胞的細胞凋亡；(vii) 於活體外及/或活體內抑制 CXCR4⁺ 腫瘤細胞生長；及/或(viii) 抑制 CXCR4⁺ 腫瘤細胞轉移。

在較佳之實施態樣中，重鏈變異區 CDR2 序列包含選自 SEQ ID NO:5-8 中之胺基酸序列的胺基酸序列及其保留性修飾；及輕鏈變異區 CDR2 序列包含選自 SEQ ID NO:17-20 中之胺基酸序列的胺基酸序列及其保留性修飾。在其他較佳之實施態樣中，重鏈變異區 CDR1 序列包含選自 SEQ ID NO:1-4 中之胺基酸序列的胺基酸序列及其保留性修飾；及輕鏈變異區 CDR1 序列包含選自 SEQ ID NO:13-16 中之胺基酸序列的胺基酸序列及其保留性修飾。

在不同的實施態樣中，該抗體可為例如人抗體、人化抗體或嵌合抗體。

此處所使用之「保留性序列修飾」一詞意圖指不顯著影響或改變包含該胺基酸序列之抗體的結合特徵之胺基酸修飾。該保留性修飾包括胺基酸取代、加入及刪除。修飾可藉該領域已知之標準技術導入本發明之抗體中，諸如定點突變及 PCR-媒介性突變。保留性胺基酸取代係指其中胺基酸殘基被具有類似側鏈之胺基酸殘基取代的胺基酸取代。具類似側鏈之胺基酸殘基家族在該領域中已被定義。這些家族包括具有鹼性側鏈(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如天冬胺酸、麩胺酸)、不帶電極性側鏈(例如甘胺酸、天冬醯胺酸、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、非極性側鏈(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸)、 β 分枝側鏈(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及芳香側鏈(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)之胺基酸。因此，本發明之抗體 CDR 區中一或多個胺基酸殘基可由來自相同側鏈家族之其他胺基酸殘基取代及該改變抗體可利用此處所描述之功能試驗檢測其所保留之功能(即前述功能)。

與抗 CXCR4 抗體之相同抗原決定位結合的抗體

在其他實施態樣中，本發明提供如本發明之任一抗 CXCR4 單株抗體與人 CXCR4 上之相同抗原決定位結合

之抗體(也就是具有與本發明之任一單株抗體交叉競爭與 CXCR4 結合之能力的抗體)。在較佳之實施態樣中，用於交叉競爭試驗中之參考抗體可為單株抗體 F7 (具有分別如 SEQ ID NO:25 及 29 中所示之 V_H 及 V_L 序列)，或單株抗體 F9 (具有分別如 SEQ ID NO:26 及 30 中所示之 V_H 及 V_L 序列)，或單株抗體 D1 (具有分別如 SEQ ID NO:27 及 31 中所示之 V_H 及 V_L 序列)，或單株抗體 E2 (具有分別如 SEQ ID NO:28 及 32 中所示之 V_H 及 V_L 序列)。

該交叉競爭抗體可根據它們在標準 CXCR4 結合試驗中與 F7、F9、D1 或 E2 交叉競爭之能力來識別。舉例來說，可利用 CEM 細胞流式細胞法來顯示與本發明之抗體的交叉競爭，其中該參考抗體係經 FITC 標示及評估測試抗體抑制 FITC 標示參考抗體與 CEM 細胞結合之能力。測試抗體抑制例如 F7、F9、D1 或 E2 與人 CXCR4 結合之能力證實該受測抗體可與 F7、F9、D1 或 E2 競爭與人 CXCR4 之結合及因此如 F7、F9、D1 或 E2 般地與人 CXCR4 上之相同抗原決定位結合。在較佳之實施態樣中，與 CXCR4 上 F7、F9、D1 或 E2 之相同抗原決定位結合的抗體係人單株抗體。該人單株抗體可如實施例中所述之製備及分離。

工程化及經修飾之抗體

本發明之抗體另外可利用具有一或多個此處所揭示之 V_H 及/或 V_L 序列的抗體作為起始物質以建構經修飾之抗

體以製備，該經修飾之抗體可能具有與起始抗體不同之性質。抗體可藉由修飾一或二個變異區(即 V_H 及/或 V_L)中之一或多個殘基以建構，例如在一或多個 CDR 區中及/或在一或多個構架區中。此外或二者擇一地，抗體可藉由修飾固定區中之殘基以建構，例如改變抗體之效應功能。

在特定實施態樣中，CDR 移植可被用來建構抗體之變異區。抗體主要透過位於 6 個重鏈及輕鏈互補決定區(CDRs)中之胺基酸殘基與目標抗原交互作用。因為這個因素，個別抗體在 CDRs 之間的胺基酸序列相較於 CDRs 以外的序列更為多樣化。因為 CDR 序列負責大部分之抗體-抗原交互反應，藉由建構表現載體以表現模擬特定天然發生抗體性質之重組抗體是可能的，該表現載體包括來自特定天然發生抗體而被植入具有不同特性之不同抗體的構架區序列中的 CDR 序列(參見例如 Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; Winter 之美國專利 5,225,539 號及 Queen 等人之美國專利 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762; 及 6,180,370 號)。

因此，本發明之其他實施態樣關於一種經分離之單株抗體或其抗原結合部位，其包含包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列之重鏈變異區(該 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列包含分別選自 SEQ ID NO:1-4, SEQ ID NO:5-8, 及 SEQ ID NO:9-12 中之胺基酸序列)，及包含 CDR1、CDR2

及 CDR3 序列之輕鏈變異區(該 CDR1 、 CDR2 及 CDR3 序列包含分別選自 SEQ ID NO:13-16, SEQ ID NO:17-20, 及 SEQ ID NO:21-24 中之胺基酸序列)。因此，該抗體包含單株抗體 F7、F9、D1 或 E2 之 V_H 及 V_L CDR 序列，然而可能包含與這些抗體不同的構架序列。

該構架序列可得自包括胚系抗體基因序列之公共 DNA 資料庫或公開資料。舉例來說，人重鏈及輕鏈變異區基因之胚系 DNA 序列可見於「VBase」人胚系序列資料庫(可得自網路 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)以及 Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; and Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836; 各文獻之內容以參照方式明示納入此處。在其他實施例中，人重鏈及輕鏈變異區基因之胚系 DNA 序列可見於 Genbank 資料庫。例如，下列見於 HCo7 HuMAb 鼠中之重鏈胚系序列可得自隨附之 Genbank 收錄號：1-69 (NG_0010109, NT_024637 及 BC070333) 、 3-33 (NG_0010109 及 NT_024637) 及 3-7 (NG_0010109 及

NT_024637)。在其他實施例中，下列見於 HCo12 HuMAb 鼠中之重鏈胚系序列可得自隨附之 Genbank 收錄號：1-69 (NG_0010109, NT_024637 及 BC070333)、5-51 (NG_0010109 及 NT_024637)、4-34 (NG_0010109 及 NT_024637)、3-30.3 (CAJ556644) 及 3-23 (AJ406678)。另外人重鏈及輕鏈胚系序列之其他來源係可得自 IMGT (<http://imgt.cines.fr>)之人免疫球蛋白基因之資料庫。

抗體蛋白質序列利用一種稱為 Gapped BLAST (Altschul et al.(1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402)之序列相似性搜尋方法與匯總蛋白質序列資料庫比較，該法為熟習該項技術之人士所熟知。BLAST 係一種啟發式演算法，其中抗體序列與資料庫序列之間具統計顯著性之比對可能包含高比值片段對(HSP)之比對字。其得分無法藉由延長或剪短而提高之片段對係稱為擊中序列(hit)。簡單地說，VBASE 來源 (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php>)之核苷酸序列被轉譯及介於與包含 FR1 至 FR3 構架區之區域被保留。該資料庫序列之平均長度為 98 個殘基。與全長蛋白質完全配對之重複序列被移除。利用預設、標準參數(除低複雜性過濾被關閉外)之 blastp 程式及 BLOSUM62 取代矩陣進行蛋白質 BLAST 搜尋，過濾出 5 個最佳序列比對結果。該核苷酸序列的所有 6 個讀框被轉譯及在資料庫序列之配對片段中無終止密碼子之讀框被認為是可能的擊中序列。此接著利用 BLAST 程式 tblastx 得到證實，其轉譯所有 6 個讀

框中之抗體序列及比較該些翻譯與在所有 6 個讀框動態翻譯之 VBASE 核苷酸序列。其它人胚系序列資料庫(諸如可得自 IMGT 者(<http://imgt.cines.fr>))可如上述對 VBASE 進行類似檢索。

一致性為全長抗體序列與蛋白質資料庫之間完全一致的胺基酸配對。陽性(一致性+取代配對)非指完全一致但由 BLOSUM62 取代矩陣所引導之胺基酸取代。如果抗體序列以相同之一致性符合二個資料庫序列，具有最多陽性之擊中序列將被決定為匹配擊中序列。

用於本發明之抗體的較佳構架序列為該些結構類似本發明之篩選抗體所使用的構架序列，例如類似本發明之較佳單株抗體所使用的 V_H 3-48 構架序列(SEQ ID NO:49)及/或 V_K L15 構架序列(SEQ ID NO:50)。該 V_H CDR1、CDR2 及 CDR3 序列及 V_K CDR1、CDR2 及 CDR3 序列可被移植至與構架序列所源自之胚系免疫球蛋白基因具有相同序列之構架區，或該 CDR 序列可被移植至相較於胚系序列包含一或多個突變之構架區。例如，已經發現在特定實例中，使構架區中的殘基發生突變以維持或提高抗體之抗原結合能力係有益的(參見例如 Queen et al.之美國專利 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 及 6,180,370 號)。

其他類型之變異區修飾係使 V_H 及/或 V_K CDR1、CDR2 及/或 CDR3 區域中之胺基酸殘基突變以藉此改善所欲抗體之一或多項結合特性(例如親和性)。可進行定點突變或 PCR 媒介突變以導入突變，及可依此處所描述及

實施例中所提供之活體外或活體內試驗來評估對抗體結合或其他所欲功能特性之影響。較佳的是導入保留性修飾(如上討論)。突變可為胺基酸取代、加入或刪除，但是較佳的是取代。另外，通常在一個 CDR 區域中改變不超過 1、2、3、4 或 5 個殘基。

因此在其他實施態樣中，本發明提供包含重鏈變異區之經分離之抗 CXCR4 單株抗體或其抗原結合部位，該重鏈變異區包含(a) 包含選自 SEQ ID NO: 1-4 中之胺基酸序列或相較於 SEQ ID NO: 1-4 具有 1、2、3、4 或 5 個胺基酸取代、刪除或插入之胺基酸序列的 V_H CDR1 區；(b) 包含選自 SEQ ID NO: 5-8 中之胺基酸序列或相較於 SEQ ID NO: 5-8 具有 1、2、3、4 或 5 個胺基酸取代、刪除或插入之胺基酸序列的 V_H CDR2 區；(c) 包含選自 SEQ ID NO: 9-12 中之胺基酸序列或相較於 SEQ ID NO: 9-12 具有 1、2、3、4 或 5 個胺基酸取代、刪除或插入之胺基酸序列的 V_H CDR3 區；(d) 包含選自 SEQ ID NO: 13-16 中之胺基酸序列或相較於 SEQ ID NO: 13-16 具有 1、2、3、4 或 5 個胺基酸取代、刪除或插入之胺基酸序列的 V_K CDR1 區；(e) 包含選自 SEQ ID NO: 17-20 中之胺基酸序列或相較於 SEQ ID NO: 17-20 具有 1、2、3、4 或 5 個胺基酸取代、刪除或插入之胺基酸序列的 V_K CDR2 區；及(f) 包含選自 SEQ ID NO: 21-24 中之胺基酸序列或相較於 SEQ ID NO: 21-24 具有 1、2、3、4 或 5 個胺基酸取代、刪除或插入之胺基酸序列的 V_K CDR3

區。

本發明之工程化抗體包括該些其中 V_H 及/或 V_K 中之構架殘基已經過修飾以例如改善該抗體之性質者。通常該構架修飾係用來降低該抗體之免疫原性。例如，一種方式為「反突變」一或多個構架殘基成為該對應之胚系序列。更具體地說，經過體突變之抗體可能包含異於該抗體所源自之胚系序列的構架殘基。該殘基可藉由比較抗體構架序列與該抗體所源自之胚系序列以識別。

舉例來說，在 F7 之 V_H 區中，下列構架區胺基酸位置(使用 Kabat 計算系統)與胚系不同：1、6 及 25。一、二或所有三個這些位置藉由進行一、二或所有三個下列取代可反突變為胚系序列：Q1E、Q6E 及 A25S。較佳修飾形式之 F7 V_H 區係 F7GL V_H (其胺基酸序列係顯示於圖 5A 及 SEQ ID NO:41 中)，其具有下列構架取代：Q1E 及 Q6E。

另外，在 F7 之 V_K 區中，下列構架區胺基酸位置(使用 Kabat 計算系統)與胚系不同：1、3 及 84。一、二或所有三個這些位置藉由進行一、二或所有三個下列取代可反突變為胚系序列：A1D、R3Q 及 V84A。較佳修飾形式之 F7 V_K 區係 F7GL V_K (其胺基酸序列係顯示於圖 5B 及 SEQ ID NO:45 中)，其具有下列構架取代：A1D 及 R3Q。

另外，在 F9 之 V_H 區中，下列構架區胺基酸位置(使用 Kabat 計算系統)與胚系不同：1、6 及 25。一、二

或所有三個這些位置藉由進行一、二或所有三個下列取代可反突變為胚系序列：Q1E、Q6E 及 A25S。較佳修飾形式之 F9 V_H 區係 F9GL V_H (其胺基酸序列係顯示於圖 6A 及 SEQ ID NO:42 中)，其具有下列構架取代：Q1E 及 Q6E。

另外，在 F9 之 V_K 區中，下列構架區胺基酸位置 (使用 Kabat 計算系統) 與胚系不同：1、3、4 及 60。一、二、三或所有四個這些位置藉由進行一、二、三或所有四個下列取代可反突變為胚系序列：E1D、V3Q、L4M 及 P60S。較佳修飾形式之 F9 V_K 區係 F9GL V_K (其胺基酸序列係顯示於圖 6B 及 SEQ ID NO:46 中)，其具有下列構架取代：E1D、V3Q 及 L4M。

另外，在 D1 之 V_H 區中，下列構架區胺基酸位置 (使用 Kabat 計算系統) 與胚系不同：6、25 及 76。一、二或所有三個這些位置藉由進行一、二或所有三個下列取代可反突變為胚系序列：Q6E、A25S 及 R76K。較佳修飾形式之 D1 V_H 區係 D1GL V_H (其胺基酸序列係顯示於圖 7A 及 SEQ ID NO:43 中)，其具有下列構架取代：Q6E。

另外，在 D1 之 V_K 區中，下列構架區胺基酸位置 (使用 Kabat 計算系統) 與胚系不同：1、3、4、45 及 46。一、二、三、四或所有五個這些位置藉由進行一、二、三、四或所有五個下列取代可反突變為胚系序列：V1D、W3Q、V4M、E45K 及 L46S。較佳修飾形式之 D1 V_K 區係 D1GL V_K (其胺基酸序列係顯示於圖 7B 及 SEQ ID

NO:47 中)，其具有下列構架取代：V1D、W3Q 及 V4M。

另外，在 E2 之 V_H 區中，下列構架區胺基酸位置 (使用 Kabat 計算系統) 與胚系不同：6 及 25。一或二個這些位置藉由進行一或二個下列取代可反突變為胚系序列：Q6E 及 A25S。較佳修飾形式之 E2 V_H 區係 E2GL V_H (其胺基酸序列係顯示於圖 8A 及 SEQ ID NO:44 中)，其具有下列構架取代：Q6E。

另外，在 E2 之 V_K 區中，下列構架區胺基酸位置 (使用 Kabat 計算系統) 與胚系不同：1、3 及 4。一、二或所有三個這些位置藉由進行一、二或所有三個下列取代可反突變為胚系序列：E1D、V3Q 及 L4M。較佳修飾形式之 E2 V_K 區係 E2GL V_K (其胺基酸序列係顯示於圖 8B 及 SEQ ID NO:48 中)，其具有下列構架取代：E1D、V3Q 及 L4M。

其他種類之構架修飾與構架區或甚至一或多個 CDR 區中之一或多個殘基突變有關，以移除 T 細胞抗原決定位以藉此降低該抗體之潛在免疫原性。此方法亦稱為「去免疫化」及進一步詳細描述於 Carr 等人之美國專利公開號 20030153043 中。

除了在構架區或 CDR 區中進行的修飾之外或作為構架區或 CDR 區中所進行之修飾的替代方案，本發明之抗體可被建構以包括 Fc 區中之修飾，通常可改變該抗體之一或多個功能特性，諸如血清半衰期、補體固定、Fc 受體結合、及/或抗原依賴性細胞性細胞毒性。另外，本發

明之抗體可經化學修飾(例如該抗體可與一或多個化學基團連接)或經修飾以改變其糖基化，同樣可改變該抗體之一或多個功能特性。這些實施態樣各在下面進一步詳細描述。Fc 區中之殘基計算係 Kabat 之 EU 指數計算法。

在一實施態樣中，CH1 之絞鏈區係經修飾以使該絞鏈區中之半胱胺酸殘基數目改變，例如增加或減少。此方法進一步描述於 Bodmer 等人之美國專利第 5,677,425 號。CH1 絞鏈區中之半胱胺酸殘基數目被改變以例如促進輕鏈與重鏈之組合或增加或降低該抗體之穩定性。

在另一實施態樣中，抗體之 Fc 絞鏈區係經突變以降低該抗體之生物半衰期。更具體地說，一或多個胺基酸突變被導入 Fc 絞鏈片段之 CH2-CH3 結構域介面區中，以使該抗體相較於天然 Fc 絞鏈結構域之葡萄球菌蛋白 A (SpA) 結合具有受損之 SpA 結合。此方法進一步詳細描述於 Ward 等人之美國專利第 6,165,745 號。

在其他實施態樣中，該抗體係經修飾以增加其生物半衰期。各種方式均為可能。例如，可導入下列一或多個突變：T252L、T254S、T256F (如 Ward 之美國專利第 6,277,375 號中所述)。另一種增加生物半衰期之方式係改變該抗體之 CH1 或 CL 區以包含取自 IgG Fc 區之二個 CH2 環狀結構域的救援受體結合抗原決定位(如 Presta 等人之美國專利第 5,869,046 及 6,121,022 號中所述)。

在其他實施態樣中，該 Fc 區之改變係由不同之胺基酸殘基取代至少一個胺基酸以改變該抗體之效應功能。例

如，一或多個選自胺基酸殘基 234、235、236、237、297、318、320 及 322 中之胺基酸可被不同之胺基酸殘基取代，以使該抗體具有對效應配體改變之親和性但仍保留親代抗體之抗原結合能力。對其親和性被改變之效應配體可為例如 Fc 受體或補體之 C1 成分。此方法進一步詳細描述於 Winter 等人之美國專利第 5,624,821 及 5,648,260 號。

在另一實施例中，一或多個選自胺基酸殘基 329、331 及 322 中之胺基酸可以不同之胺基酸殘基取代，以使該抗體具有改變之 C1q 結合及/或降低或消失之補體依賴性細胞毒性(CDC)。此方法進一步詳細描述於 Idusogie 等人之美國專利第 6,194,551 號。

在其他實施例中，在胺基酸位置 231 及 239 中之一或多個胺基酸殘基被改變以藉此改變該抗體固定補體之能力。此方法進一步描述於 Bodmer 等人之 PCT 公開號 WO 94/29351 中。

在其他實施例中，該 Fc 區藉由修飾下列位置之一或多個胺基酸以爲修飾，以增加該抗體媒介抗體依賴性細胞性細胞毒性(ADCC)之能力及/或增加該抗體對 Fc γ 受體之親和性：238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、

338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 或 439。此方法進一步描述於 Presta 等人之 PCT 公開號 WO 00/42072 中。另外，人 IgG1 上之 Fc γ R1、Fc γ RII、Fc γ RIII 及 FcRn 結合位置已經定位及具有改善結合力之變異體已被描述(參見 Shields, R.L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604)。在位置 256、290、298、333、334 及 339 之特定突變經顯示可改善與 Fc γ RIII 之結合。此外，下列組合突變經顯示可改善 Fc γ RIII 結合：T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224A 及 S298A/K333A/K334A。

在另一實施態樣中，抗體之糖基化係經修飾。例如，可製備糖基化抗體(意即該抗體缺乏糖基化)。糖基化可被改變以例如增加抗體對抗原之親和性。該碳水化合物修飾藉由例如改變抗體序列中一或多個糖基化位置而達成。舉例來說，可進行導致清除一或多個變異區構架糖基化位置之一或多個胺基酸取代，以藉此清除該位置之糖基化。該去糖基化可增加抗體對抗原之親和性。該方法進一步詳細描述於 Co 等人之美國專利第 5,714,350 及 6,350,861 號。

此外或二者擇一地，可製備具有改變類型之糖基化抗體，諸如具有降低量之岩藻糖殘基的低岩藻糖基化抗體或具有增加之平分型 GlcNac 結構的抗體。該改變之糖基化模式經證實可增加抗體之 ADCC 能力。該碳水化合物修飾可藉由例如在具有改變糖基化機制之宿主細胞中表現抗體以完成。具有改變糖基化機制之細胞在該領域中已被描述

且可被用來作為在其中表現本發明之重組抗體的宿主細胞以藉此產生具有改變糖基化之抗體。舉例來說，細胞系 Ms704、Ms705 及 Ms709 缺乏岩藻糖轉移酶基因 FUT8 ($\alpha(1,6)$ 岩藻糖轉移酶)，因此在 Ms704、Ms705 及 Ms709 細胞系中所表現的抗體在它們的碳水化合物上缺乏岩藻糖。該 Ms704、Ms705 及 Ms709 FUT8^{-/-}細胞系係藉由在使用二個取代載體之 CHO/DG44 細胞中定向敲除 FUT8 基因而產生(參見 Yamane 等人及 Yamane-Ohnuki 等人(2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22 之美國專利公開號 20040110704)。在其他實施例中，Hanai 等人之 EP 1,176,195 描述具有功能缺陷之 FUT8 基因(其編碼岩藻糖轉移酶)的細胞系，因此在該細胞系中所表現的抗體藉由減少或清除該 α 1,6 鍵相關酵素展現低岩藻糖基化。Hanai 等人亦描述用於添加岩藻糖至與抗體 Fc 區域結合之 N-乙酰葡萄糖胺上之酵素活性低或不具酵素活性之細胞系，例如鼠骨髓瘤細胞系 YB2/0 (ATCC CRL 1662)。Presta 之 PCT 公開號 WO 03/035835 描述變異之 CHO 細胞系 Lec13 細胞(其連接岩藻糖至 Asn(297)連接碳水化合物之能力降低)亦導致該宿主細胞中所表現之抗體的低岩藻糖基化(亦參見 Shields, R.L. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740)。具有修飾糖基化特性之抗體亦可在雞蛋中產生，如美國專利申請號 PCT/US06/05853 中所述。或者，具有修飾糖基化特性之抗體可在植物細胞中產生，諸如浮萍 (*Lemna*)。在植物系統中生產抗體之方法係揭露於對應

Alston & Bird LLP 代理人案號 040989/314911 (2006 年 8 月 11 日提交)之美國專利申請書中。Umana 等人之 PCT 公開號 WO 99/54342 描述表現糖蛋白修飾之糖基轉移酶(例如 $\beta(1,4)$ -N-乙醯葡萄糖胺轉移酶 III (GnTIII))的工程化細胞系，以使該工程化細胞系中所表現之抗體展現導致抗體 ADCC 活性提高之平分型 GlcNac 結構增加(亦參見 Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180)。或者，抗體之岩藻糖殘基可利用岩藻糖苷酶(fucosidase)酵素切割。例如，岩藻糖苷酶 α -L-岩藻糖苷酶自抗體移除岩藻糖醯殘基(Tarentino, A.L. et al. (1975) Biochem. 14:5516-23)。

本發明所考慮之抗體的另一種修飾係聚乙二醇化(pegylation)。抗體可被聚乙二醇化以例如增加該抗體之生物(例如血清)半衰期。要聚乙二醇化抗體，該抗體或其片斷通常在其中一或多個 PEG 基團與該抗體或抗體片段連接的條件下與聚乙二醇(PEG)反應，諸如 PEG 之活性酯或乙醛衍生物。較佳的是，聚乙二醇化係透過活性 PEG 分子(或類似之活性水溶性聚合物)之醯基化反應或烷基化反應進行。此處所使用之「聚乙二醇」一詞意圖包含曾被用來衍生化其他蛋白質之任何形式的 PEG，諸如單(C1-C10)烷氧基或芳氧基聚乙二醇或聚乙二醇-順丁烯二醯亞胺。在特定實施態樣中，經聚乙二醇化之抗體係非糖基化抗體。用於聚乙二醇化蛋白質之方法係該領域所熟知且可應用於本發明之抗體。參見例如 Nishimura 等人之 EP 0 154 316 及 Ishikawa 等人之 EP 0 401 384。

抗體片段及抗體擬似物

本發明並不限於傳統抗體，其實施可透過使用抗體片段及抗體擬似物。如下面之詳細說明，目前已發展出廣泛種類之抗體片段及抗體擬似物技術，且為該領域所熟知。雖然一些技術(諸如結構域抗體、奈米抗體(Nanobodies)及單抗體(UniBodies))使用傳統抗體結構之片段或其他修飾，亦有替代性技術採用雖然是模擬傳統抗體結合但透過不同機制產生及作用之結合結構，諸如親和抗體(Affibodies)、DAR Pins、抗運載蛋白(Anticalins)、高親合性多聚體(Avimers)及多樣抗體(Versabodies)。

結構域抗體(dAbs)為抗體之最小功能性結合單位，其對應人抗體之重鏈(VH)或輕鏈(VL)的變異區。結構域抗體之分子量約為 13 kDa。Domantis 已發展出一系列大型及高度功能性之全長人 VH 及 VL dAbs 資料庫(各資料庫中有超過 1 百億個不同序列)，及使用這些資料庫篩選對治療目標具有專一性之 dAbs。與許多傳統抗體相比，結構域抗體在細菌、酵母菌及哺乳類細胞系統中表現良好。有關結構域抗體之進一步細節及其生產方法可參照美國專利 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; 6,172,197; 6,696,245; 美國序號 2004/0110941; 歐州專利申請案號 1433846 及歐洲專利 0368684 & 0616640; WO05/035572、WO04/101790、WO04/081026、WO04/058821、WO04/003019 及 WO03/002609，這些各以參照方式整體納

入此處。

奈米抗體(nanobodies)係抗體源性治療蛋白質，其包含天然發生之重鏈抗體的獨特構造及功能特性。這些重鏈抗體包含一個變異結構域(VHH)及二個固定結構域(CH2及CH3)。重要的是，該經選殖及分離之VHH結構域係完全穩定之多肽，其具有原始重鏈抗體之完整抗原結合能力。奈米抗體與人抗體之VH結構域具有高度同源性，可進一步加以人化而不喪失任何活性。重要的是，奈米抗體之免疫原性低，這已經在使用奈米抗體先導化合物之靈長動物試驗中得到證實。

奈米抗體結合傳統抗體之優勢與小分子藥物之重要性。就像傳統抗體，奈米抗體顯示高度目標專一性、對它們的目標具有高度親和性及低度內源毒性。然而，就像小分子藥物，它們可以抑制酵素及快速進入受體間隙。另外，奈米抗體極度穩定、可以注射以外之方式投服(參見例如WO 04/041867，其以參照方式整體納入本文)及容易製造。奈米抗體之其他優點包括因為其分子小而可辨識不常見或隱藏之抗原決定位、由於其獨特的三維、藥物形式彈性而以高親和性及選擇性與蛋白質目標之空腔或活性位置結合、調整半衰期及易於快速藥物回收。

奈米抗體係由單一基因編碼及在幾乎所有原核及真核宿主中均可有效生產，例如大腸桿菌(參見例如US 6,765,087，其以參照方式整體納入此處)、黴菌(例如麴菌或木黴菌)及酵母菌(例如酵母菌屬(*Saccharomyces*)、克魯

維酵母菌屬(*Kluyveromyces*)、漢遜酵母菌屬(*Hansenula*)或畢赤酵母菌屬(*Pichia*))(參見例如 US 6,838,254, 其以參照方式整體納入此處)。生產過程係可擴充的, 可生產數公斤產量之奈米抗體。由於奈米抗體相較於傳統抗體具有較佳之穩定性, 它們可被調製成爲長貨架壽命、立即可用之溶液。

奈米選殖(Nanoclone)法(參見例如 WO 06/079372, 其以參照方式整體納入此處)係用於生產抗所欲目標之奈米抗體的一種專利方法, 其根據自動高通量 B 細胞篩選及可被用於本發明中。

單抗體(UniBodies)係另一種抗體片段技術, 然而此技術係根據移除 IgG4 抗體之絞鏈區。刪除絞鏈區導致其大小實質上爲傳統 IgG4 抗體一半之分子及具有單價結合區而非 IgG4 抗體之雙價結合區。亦爲眾所周知的是 IgG4 抗體係不活潑的, 因此並不與免疫系統交互反應, 其可能有益於治療其中免疫反應並非所欲之疾病, 而單抗體具備此項優點。例如, 單抗體之功能可能爲抑制或安靜化但不殺滅它們所結合之細胞。此外, 與癌細胞結合之單抗體不會刺激癌細胞增生。另外, 由於單抗體之大小約爲傳統 IgG4 抗體的一半, 它們在較大實質腫瘤中可能顯示較佳分布及可能有益之療效。單抗體自體內清除之速率類似 IgG4 全抗體, 及可以類似完整抗體之親和性與它們的抗原結合。有關單抗體之其他細節可參照專利 WO2007/059782, 其以參照方式整體納入此處。

親和抗體(Affibody)分子代表一種以 58 個胺基酸殘基蛋白質結構域為基礎之新型親和性蛋白質，其係源自葡萄球菌蛋白質 A 之一個 IgG 結合結構域。此三螺旋束結構域曾被用來作為構建組合式噬菌體庫之支架，以所欲分子為目標之親和抗體變異體可利用噬菌體展示技術自其中篩選(Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain, *Nat Biotechnol* 1997; 15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, *Eur J Biochem* 2002; 269:2647-55)。親和抗體簡單而強健的結構加上它們的低分子量(6 kDa)，使它們適用於廣泛種類之應用，例如作為偵測試劑(Ronmark J, Hansson M, Nguyen T, et al, Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*, *J Immunol Methods* 2002; 261:199-211)及抑制受體交互作用(Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA, Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering, *Protein Eng* 2003; 16:691-7)。其他有關親和抗體之細節及其生產方法可參照美國專利 5831012 號，其以參照方式整體納入此處。

經標示之親和抗體亦可用於供決定同型之量的造影用

途。

DARPin (經設計的錨蛋白重複蛋白)係抗體擬似物 DRP (經設計的重複蛋白)技術的一個例子，此技術係被發展以探討非抗體多肽之結合能力。重複蛋白如錨蛋白或富含白胺酸之重複蛋白係無所不在的結合分子，不像抗體其發生在細胞內及細胞外。它們獨特的模組結構以重複構造單位(重複)為特色，其堆疊在一起以形成具有變異及模組目標結合表面之延長重複結構域。根據此模組化性質，可產生具有高度多樣化結合專一性之組合式多肽庫。此策略包括展現變異表面殘基之自容性重複的一致設計及它們與重複結構域之隨機組合。

DARPin 可在細菌表現系統中以非常高的產量生產，它們屬於已知最穩定的蛋白質。已經篩選出對廣泛種類之目標蛋白質(包括人受體、細胞激素、激酶、人蛋白酶、病毒及膜蛋白)具高度特異性、高度親和性之 DARPin。可獲得具有個位數奈莫耳至皮莫耳範圍之親和性的 DARPin。

DARPin 已被用於廣泛應用中，包括 ELISA、三明治式 ELISA、流式細胞計數分析(FACS)、免疫組織化學(IHC)、晶片應用、親和性純化或西方印漬法。DARPin 亦經證實在細胞內隔室中具高度活性，例如作為與綠色螢光蛋白(GFP)融合之細胞內標記蛋白。DARPin 另外被用於以 pM 範圍之 IC50 抑制病毒進入。DARPin 不僅理想地阻斷蛋白-蛋白間的交互作用，同時也可以抑制酵素。

蛋白酶、激酶及轉運子已經被成功抑制，最常見的是別構(allosteric)抑制模式。在腫瘤中非常快速及特異性地增加及非常有利的腫瘤與血之比，使得 DARPs 非常適用於活體內診斷劑或治療法。

有關 DARPs 及其他 DRP 技術之其他資訊可見於美國專利申請公開號 2004/0132028 及國際專利申請公開號 WO 02/20565，二者以參照方式整體納入此處。

抗運載蛋白(Anticalins)是另一種抗體擬似物技術，然而在此技術中該結合專一性係源自脂質運載蛋白(lipocalins)，此為在人組織及體液中天然及大量表現之低分子量蛋白質家族。脂質運載蛋白已發展為進行一系列與化學敏感性或不可溶性化合物之生理運輸及儲存有關的活體內功能。脂質運載蛋白具有強健的內部結構，其包含支持在蛋白質一端之四個環的高度保留性 β -筒體。這些環形成結合口袋的入口，在分子這個部分的結構差異與個別脂質運載蛋白之間的結合專一性差異有關。

雖然由保留性 β -片層構架所支持之超變異環的整體結構令人聯想到免疫球蛋白，但是脂質運載蛋白在大小方面與抗體有顯著不同，其係由 160-180 個胺基酸的多肽單鏈組成，僅稍大於一個免疫球蛋白結構域。

選殖脂質運載蛋白及構建它們的環以產生抗運載蛋白。結構多樣之抗運載蛋白庫已產生及利用抗運載蛋白顯示可篩選結合功能，隨後表現及生產可溶性蛋白質以在原核或真核系統中進一步分析。研究成功證實可發展出對幾

乎任何可被分離之人目標蛋白質具專一性之抗運載蛋白及可獲得奈莫耳或更高範圍之結合親和性。

抗運載蛋白亦可被調製成雙目標蛋白質，稱為雙運載蛋白(Duocalins)。雙運載蛋白與二個不同的治療目標結合於一個單體蛋白質，其利用標準製程簡單生產然而不論其二個結合結構域之結構來源為何仍可維持目標專一性及親和性。

透過單一分子調節多重目標在已知涉及一種致病因子以上之疾病中特別有利。另外，雙或多價結合形式諸如雙運載蛋白在以疾病中之細胞表面分子為標靶、調節信號轉導途徑中之協同作用或透過結合及聚集細胞表面受體以誘導提高之內化作用上具有顯著潛力。另外，雙運載蛋白之高度內部穩定性與單體抗運載蛋白類似，使雙運載蛋白具有彈性配方及運送潛力之特性。

有關抗運載蛋白之其他資訊可見於美國專利 7,250,297 及國際專利申請公開號 WO 99/16873，二者均以參照方式整體納入此處。

其他可用於本發明中之抗體擬似物技術係高親合性多聚體(Avimers)。高親合性多聚體係源自人胞外受體結構域之大型家族，其藉由活體外外子(exon)拼湊及噬菌體展示產生具有結合及抑制性質之多結構域蛋白質。連接多個獨立之結合結構域已經顯示可產生親合力(avidity)及導致相較於傳統單抗原決定位結合蛋白質改善之親和性及專一性。其它可能的好處包括在大腸桿菌中簡單而有效的生產

多目標專一性分子、改善之熱穩定性及對蛋白酶之抗性。對各種目標具亞奈莫耳親和性之高親合性多聚體已經獲得。

有關高親合性多聚體之其他資訊可見於美國專利申請公開號 2006/0286603、2006/0234299、2006/0223114、2006/0177831、2006/0008844、2005/0221384、2005/0164301、2005/0089932、2005/0053973、2005/0048512、2004/0175756，所有皆以參照方式整體納入此處。

多樣抗體(Versabodies)係另一種可用於本發明中之抗體擬似物技術。多樣抗體係含有超過 15%半胱胺酸之 3-5 kDa 小型蛋白質，其形成高二硫化物密度支架，取代典型蛋白質所含之疏水性核。以少數二硫化物取代多數疏水性胺基酸(包含疏水性核)導致較小、親水性較高(較少聚集及非特異性結合)、對蛋白酶及熱更具抗性及具有較低密度之 T 細胞抗原決定位之蛋白質，因為與 MHC 表現最有關之殘基具疏水性。所有這四種特性已知會影響免疫原性，可預期的是它們一起導致免疫原性大幅降低。

多樣抗體之靈感係來自由水蛭、蛇、蜘蛛、蠍子、蝸牛、及銀蓮花所產生之天然注射性生物醫藥品，已知它們呈現非預期之低免疫原性。從經選擇之天然蛋白質家族開始，藉由設計及篩選大小，使疏水性、溶蛋白抗原處理及抗原決定位密度最小化至遠低於天然注射性蛋白質平均值之程度。

由於多樣抗體的構造，這些抗體擬似物提供包括多價、多專一性、多種半衰期機制、組織目標模組及缺乏抗體 Fc 區之多種形式。另外，多樣抗體以高產量在大腸桿菌中製造，由於它們的親水性及小體積，多樣抗體具有高度可溶性及可備調配成高濃度。多樣抗體係極度熱穩定(它們可被煮沸)及具有延長之貨架壽命。

有關多樣抗體之其他資訊可見於美國專利申請公開號 2007/0191272，其以參照方式整體納入此處。

以上有關抗體片段及抗體擬似物技術之詳細說明並非意圖作為可用於本發明中之所有技術的完整清單。舉例來說(亦非作為限制之用)，多種其他技術包括替代性以多肽為基礎之技術諸如 Qui et al., Nature Biotechnology, 25(8) 921-929 (2007) (其以參照方式整體納入此處)所述之融合互補決定區以及以核酸為基礎之技術諸如美國專利 5,789,157、5,864,026、5,712,375、5,763,566、6,013,443、6,376,474、6,613,526、6,114,120、6,261,774 及 6,387,620 (所有皆以參照方式納入此處)中所述之 RNA 適體(aptamer)技術可用於本發明中。

抗體物理性質

本發明之抗體可進一步以抗 CXCR4 抗體之各種物理特性為特徵。根據這些物理特性可利用各種試驗來偵測及/或區別不同類型之抗體。

在一些實施態樣中，本發明之抗體在輕鏈或重鏈變異

區中可包含一或多個糖基化位置。在變異區中存在一或多個糖基化位置可能因為抗原結合改變而導致抗體免疫原性增加或抗體之 pK 值改變(Marshall et al (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala FA and Morrison SL (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick et al (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh et al (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura et al. (2000) *Mol Immunol* 37:697-706)。已知糖基化發生在包含 N-X-S/T 序列之模體中。變異區糖基化可利用 Glycoblots 試驗測試，其切割抗體以產生 Fab，接著利用測量過碘酸氧化及席夫鹼形成之試驗測試糖基化。或者，變異區糖基化可利用戴安(Dionex)公司光學色譜層析儀(Dionex-LC)檢測，其自 Fab 切割糖類成單糖及分析個別糖類含量。在一些案例中，較佳的是具有不包含變異區糖基化之抗 CXCR4 抗體。此可藉由選擇變異區不包含糖基化模體之抗體或藉由利用該領域所熟知之標準技術令糖基化模體中之殘基突變達成。

在較佳之實施態樣中，本發明之抗體不包含天冬醯胺酸異構位置。去醯胺基或異天冬胺酸作用可能分別發生在 N-G 或 D-G 序列。該去醯胺基或異天冬胺酸作用導致產生異天冬胺酸，其藉由在側鏈羧基端而非主鏈上產生結節構造而降低抗體之穩定性。異天冬胺酸之產生可利用等量試驗測量，其使用逆相 HPLC 檢測異天冬胺酸。

每個抗體將有獨特的等電點(pI)，但是抗體通常落在

pH 6 至 9.5 之範圍內。IgG1 抗體之 pI 通常落在 7-9.5 之 pH 範圍，及 IgG4 抗體之 pI 通常落在 6-8 之 pH 範圍。抗體可能具有此範圍外之 pI 值。雖然其作用大致上未知，猜測具有正常範圍以外之 pI 的抗體可能在活體內狀況下呈現一些展開及不穩定性。等電點可利用毛細管等電聚焦試驗測試，其產生 pH 梯度及可利用雷射聚焦以增加正確性(Janini et al (2002) Electrophoresis 23:1605-11; Ma et al. (2001) Chromatographia 53:S75-89; Hunt et al (1998) J Chromatogr A 800:355-67)。在一些案例中，較佳的是具有包含落在正常範圍之 pI 值的抗 CXCR4 抗體。這可藉由選擇具有正常範圍之 pI 的抗體或藉由利用該領域所熟知之標準技術令帶電表面殘基突變達成。

每個抗體將具有顯示熱穩定性之變性溫度 (Krishnamurthy R and Manning MC (2002) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71)。較高之熱穩定性表示活體內整體抗體穩定性較佳。抗體之變性溫度可利用諸如示差掃描熱量技術測量 (Chen et al (2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando et al (1999) Immunol Lett 68:47-52)。T_{M1} 表示抗體之最初展開溫度。T_{M2} 表示抗體之完全展開溫度。通常較佳的是，本發明之抗體的 T_{M1} 大於 60°C，較佳大於 65°C，甚至更加大於 70°C。或者，抗體之熱穩定性可利用圓二色譜測量 (Murray et al. (2002) J. Chromatogr Sci 40:343-9)。

在較佳之實施態樣中，選擇不會快速分解之抗體。抗

CXCR4 抗體之片段可利用毛細管電泳(CE)及 MALDI-MS 測量，以該領域中所熟知之方式進行(Alexander AJ and Hughes DE (1995) Anal Chem 67:3626-32)。

在另一較佳之實施態樣中，選擇具有最小聚集效果之抗體。聚集作用可能導致刺激非所欲之免疫反應及/或改變或不利之藥動性質。一般來說，聚集作用 25%或更低，較佳 20%或更低，甚至更佳 15%或更低，甚至更佳 10%或更低及甚至更佳 5%或更低之抗體係可接受的。聚集可利用該領域所熟知之數種技術測量，包括體積排阻管柱(SEC)高效液體色層分析(HPLC)及識別單體、雙體、三體或多體之光散射法。

構建抗體之方法

如上述討論，此處所揭示之具有 V_H 及 V_K 序列的抗 CXCR4 抗體可藉由修飾該 V_H 及/或 V_K 序列或與其連接之固定區以產生新的抗 CXCR4 抗體。因此，在本發明之其他態樣中，本發明之抗 CXCR4 抗體(例如 F7、F9、D1 或 E2)的結構特性可被用來產生結構相關之抗 CXCR4 抗體，其保留至少一項本發明之抗體的功能特性，諸如與人 CXCR4 結合。舉例來說，F7、F9、D1 或 E2 之一或多個 CDR 區或其突變可與已知之構架區及/或其他 CDRs 重組結合以產生如上述之其他重組構建之本發明之抗 CXCR4 抗體。其它種類之修飾包括該些在先前所描述者。用於構建方法之起始物質係一或多個此處所提供之 V_H 及/或 V_K

序列或其一或多個 CDR 區。要產生該工程化抗體，不需要真的製備(即表現蛋白質)具有一或多個此處所提供之 V_H 及/或 V_K 序列或其一或多個 CDR 區之抗體。而是利用該序列中所包含之資訊作為起始物質以產生源自原始序列之「第二代」序列，接著該「第二代」序列被製備及表現成為蛋白質。

因此，在其他實施態樣中，本發明提供一種用於製備抗 CXCR4 抗體之方法，其包含：

(a) 提供(i) 包含選自 SEQ ID NO:1-4 中之 CDR1 序列、選自 SEQ ID NO:5-8 中之 CDR2 序列及/或選自 SEQ ID NO:9-12 中之 CDR3 序列的重鏈變異區抗體序列；及/或(ii) 包含選自 SEQ ID NO:13-16 中之 CDR1 序列、選自 SEQ ID NO:17-20 中之 CDR2 序列及/或選自 SEQ ID NO:21-24 中之 CDR3 序列的輕鏈變異區抗體序列；

(b) 改變重鏈變異區抗體序列及/或輕鏈變異區抗體序列中至少一個胺基酸殘基以產生至少一個經改變之抗體序列；及

(c) 表現該經改變之抗體序列為蛋白質。

可使用標準分子生物學技術以製備及表現該經改變之抗體序列。

較佳的是，由經改變之抗體序列編碼之抗體係保留一項、一些或所有此處所述之抗 CXCR4 抗體之功能特性的抗體，其功能特性包括但不限於：

(i) 與表現在細胞表面上之天然人 CXCR4 結合；

- (ii) 抑制 SDF-1 與 CXCR4 結合；
- (iii) 抑制於表現 CXCR4 之細胞中經 SDF-1 誘發之鈣離子流動；
- (iv) 抑制表現 CXCR4 之細胞經 SDF-1 誘發的移動；
- (v) 抑制由 HuVECs 之毛細血管形成；
- (vi) 以 1×10^{-7} M 或更低之 K_D 值與人 CXCR4 結合；
- (vii) 誘導表現 CXCR4 之細胞的細胞凋亡；
- (viii) 於活體外抑制腫瘤細胞增生；
- (ix) 於活體內抑制腫瘤細胞增生及/或誘導腫瘤細胞之細胞凋亡；
- (x) 抑制 CXCR4⁺ 腫瘤細胞轉移；及/或
- (xi) 增加罹患 CXCR4⁺ 腫瘤個體之存活時間。

經改變之抗體的功能特性可利用該領域中可用及/或此處所描述之標準試驗檢測，諸如該些在實施例中所述者(例如流式細胞計數、結合分析、功能試驗)。

在本發明之工程化抗體方法之特定實施態樣中，突變可被隨機或選擇性導入所有或部分抗 CXCR4 抗體編碼序列之中及可篩選該導致之經修飾的抗 CXCR4 抗體之結合活性及/或其他此處所述之功能特性。突變方法已在該領域中描述。例如，Short 之 PCT 公開號 WO 02/092780 描述利用飽合突變、合成性連接組合或彼等之組合以產生及篩選抗體突變之方法。或者，Lazar 等人之 PCT 公開號

WO 03/074679 描述使用電腦篩選方法以最佳化抗體之生理化學特性之方法。

編碼本發明之抗體的核酸分子

本發明之其他態樣關於編碼本發明之抗體的核酸分子。該核酸可存在於完整細胞、細胞溶解物中或以部分純化或實質上純化之形式存在。當核酸以標準技術包括鹼/SDS 處理、CsCl 條帶分離法、管柱色層分析法、洋菜膠電泳及其他該領域所熟知之方法自其他細胞成分或其他污染物(例如其他細胞核酸或蛋白質)中被純化出來時係「經分離」或「成為實質上純化」。參見 F. Ausubel, et al., ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York。本發明之核酸可為例如 DNA 或 RNA 及可包含或不包含內含子序列。在較佳之實施態樣中，該核酸係 cDNA 分子。

本發明之核酸可利用標準分子生物學技術獲得。對於由融合瘤(例如自下詳述之帶有人免疫球蛋白基因之基因轉殖鼠製備的融合瘤)所表現之抗體來說，編碼融合瘤所製造之抗體的輕鏈及重鏈 cDNAs 可由標準 PCR 放大或 cDNA 選殖技術得到。對於得自免疫球蛋白基因庫(例如使用噬菌體展示技術)之抗體而言，編碼該抗體之核酸可自基因庫中取得。

本發明較佳之核酸分子係該些編碼 F7、F9、D1 及 E2 單株抗體之 V_H 及 V_L 序列者。編碼 F7、F9、D1 及

E2 之 V_H 序列的 DNA 序列分別顯示於 SEQ ID NO:33-36。編碼 F7、F9、D1 及 E2 之 V_L 序列的 DNA 序列分別顯示於 SEQ ID NO:37-40。

一旦獲得編碼 V_H 及 V_L 部分之 DNA 片段，可利用標準重組 DNA 技術進一步調控這些 DNA 片段，例如將變異區基因轉變為全長抗體鏈基因、成為 Fab 片段基因或成為 scFv 基因。在這些調控中，由 V_L 或 V_H 編碼之 DNA 片段係與其他編碼其他蛋白質之 DNA 片段操作性連接，諸如抗體固定區或彈性連接子。此處所使用之「操作性連接」一詞意圖指連接二個 DNA 片段以使由該二個 DNA 片段所編碼之胺基酸序列維持讀框順序(in-frame)。

該編碼 V_H 區之經分離之 DNA 可藉由令 V_H 編碼 DNA 與編碼重鏈固定區(CH1、CH2 及 CH3)之其他 DNA 分子操作性連接以轉換為全長重鏈基因。人重鏈固定區基因之序列為該領域中所知(參見 Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)及包含這些區域之 DNA 片段可藉標準 PCR 放大技術獲得。重鏈固定區可為 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 固定區，但最佳者係 IgG1 或 IgG4 固定區。對於 Fab 片段重鏈基因來說，該 V_H 編碼 DNA 可與其他僅編碼重鏈 CH1 固定區之 DNA 分子操作性連接。

該編碼 V_L 區之經分離之 DNA 可藉由操作性連接 VL

編碼 DNA 與編碼輕鏈固定區(CL)之其他 DNA 分子以轉換為全長輕鏈基因(以及 Fab 輕鏈基因)。人輕鏈固定區基因之序列為該領域中所知(參見 Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)及包含這些區域之 DNA 片段可藉標準 PCR 放大技術獲得。在較佳之實施態樣中，輕鏈固定區可為 κ 或 λ 固定區。

要產生 scFv 基因，該 V_H 及 V_L 編碼 DNA 片段係與編碼彈性連接子(例如編碼胺基酸序列 $(Gly_4-Ser)_3$)之其他片段操作性連接，以使該 V_H 及 V_L 序列可被表現為其 V_L 及 V_H 區係由該彈性連接子所連接之連續單鏈蛋白質(參見例如 Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554)。

生產本發明之單株抗體

本發明之單株抗體(mAbs)可藉由各種技術生產，包括傳統單株抗體方法例如 Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495 之標準體細胞雜交技術。雖然體細胞雜交法原則上較佳，但可以使用其他用於生產單株抗體之技術例如 B 淋巴球經病毒或腫瘤基因轉形。

用於製備雜交瘤之較佳動物系統係鼠系統。鼠之雜交瘤生產係一建立非常良好之程序。用於分離供融合之免疫

化脾細胞的免疫程序及技術為該領域所知。融合伴侶(例如鼠骨髓瘤細胞)及融合程序亦廣為所知。

本發明之嵌合或人化抗體可根據如上述製備之非人單株抗體之序列製備。編碼重鏈及輕鏈免疫球蛋白之 DNA 可利用標準分子生物學技術得自所欲之非人雜交瘤及構建以包含非鼠(例如人)免疫球蛋白序列。舉例來說，要產生嵌合抗體，可利用該領域已知之方法將鼠變異區與人固定區連接(參見例如 Cabilly 等人之美國專利 4,816,567)。要產生人化抗體，可利用該領域已知之方法將鼠 CDR 區插入人構架中(參見例如 Winter 之美國專利 5,225,539，及 Queen 等人之美國專利 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 及 6,180,370)。

在較佳之實施態樣中，本發明之抗體係人單株抗體。該與 CXCR4 結合之人單株抗體可利用帶有部分人免疫系統而非鼠系統之基因轉殖或染色體轉殖鼠產生。這些基因轉殖及染色體轉殖鼠分別包括此處所述之 HuMAb Mouse[®] 及 KM Mouse[®] 鼠，及在此處總稱為「人 Ig 鼠」。

HuMAb Mouse[®] (Medarex[®]公司)包含編碼未重新排列之人重鏈(μ 及 γ)及 κ 輕鏈免疫球蛋白序列之人免疫球蛋白基因微基因座，以及不活化該內源性 μ 及 κ 鏈基因座之目標突變(參見例如 Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474):856-859)。因此，該鼠展現減少表現鼠 IgM 或 κ ，及對免疫之反應為該導入之人重鏈及輕鏈轉殖基因經過類型轉換及體突變以產生高親合性人 IgG κ 單株抗體

(Lonberg, N. et al. (1994), *supra*; reviewed in Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93, and Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546) 。 HuMAb Mouse[®] 之製備及用途，及該鼠所攜帶之基因修飾係進一步描述於 Taylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5:647-656; Tuailon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12:821-830; Tuailon et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) *International Immunology* 6:579-591; 及 Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851，所有這些內容以參照方式整體納入此處。另外參考皆為 Lonberg and Kay 所有之美國專利 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 及 5,770,429 ; Surani 等人之美國專利 5,545,807 ; 皆為 Lonberg and Kay 所有之 PCT 公開號 WO 92/03918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97/13852、WO 98/24884 及 WO 99/45962 ; 及 Korman 等人之 PCT 公開號 WO 01/14424 。

在另一實施態樣中，本發明之人抗體可利用在轉殖基

因及轉殖染色體上帶有人免疫球蛋白序列之鼠培養，諸如帶有人重鏈轉殖基因及人輕鏈轉殖染色體之鼠。此鼠在此處被稱為「KM mouse[®]」，及詳細說明於 Ishida 等人之 PCT 公開號 WO 02/43478。

另外，表現人免疫球蛋白基因之替代性轉殖基因動物系統可得自該領域中及可被用來培養本發明之抗 CXCR4 抗體。舉例來說，可使用被稱為 Xenomouse (Abgenix, Inc) 之替代性轉殖基因系統；該鼠被描述於例如 Kucherlapati 等人之美國專利 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 及 6,162,963 中。

另外，表現人免疫球蛋白基因之替代性轉殖染色體動物系統可得自該領域中及可被用來培養本發明之抗 CXCR4 抗體。舉例來說，可使用被稱為「TC mice」之帶有人重鏈轉殖染色體及人輕鏈轉殖染色體之鼠；該鼠被描述於 Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727 中。另外，帶有人重鏈及輕鏈轉殖染色體之牛已在該領域中描述(例如 Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894 及 PCT 公開號 WO 2002/092812)及可被用來培養本發明之抗 CXCR4 抗體。

本發明之人單株抗體亦可利用供篩選人免疫球蛋白基因庫之噬菌體展示法製備。該用於分離人抗體之噬菌體展示法係該領域中已經建立者。參考例如 Ladner 等人之美國專利 5,223,409; 5,403,484 及 5,571,698; Dower 等人之美國專利 5,427,908 及 5,580,717; McCafferty 等人之美國

專利 5,969,108 及 6,172,197；及 Griffiths 等人之美國專利 5,885,793；6,521,404；6,544,731；6,555,313；6,582,915 及 6,593,081。

本發明之人單株抗體亦可利用其中經人免疫細胞重建以使免疫時可產生人抗體反應之 SCID 鼠製備。該鼠係描述於例如 Wilson 等人之美國專利 5,476,996 及 5,698,767。

在特別較佳之實施態樣中，人抗 CXCR4 抗體係利用人 Ig 鼠及噬菌體展示技術之組合製備，如 Buechler 等人之美國專利 6,794,132 中所述。更具體地說，該方法首先關於藉由以 CXCR4 抗原免疫鼠以在人 Ig 鼠(如前述之 HuMab 鼠或 KM 鼠)中獲得抗 CXCR4 抗體反應，接著自鼠之淋巴細胞分離編碼人抗體鏈之核酸及將這些核酸導入展示載體(例如噬菌體)以提供展示包之文庫。因此，各文庫之成員包含編碼人抗體鏈之核酸及各抗體鏈係由該展示包展示。接著以 CXCR4 抗原篩選該文庫以分離與 CXCR4 專一性結合之文庫成員。然後以標準方法分離及定序被選擇之文庫成員的核酸插入物，以決定該被選擇之 CXCR4 結合物的輕鏈及重鏈變異序列。該變異區可藉標準重組 DNA 技術轉換為全長抗體鏈，諸如選殖變異區至帶有人重鏈及輕鏈固定區之表現載體以使該 VH 區與 CH 區操作性連接及該 VL 區與 CL 區操作性連接。有關利用此組合之轉殖基因鼠/噬菌體展示系統製備人抗 CXCR4 抗體之進一步描述請參考實施例 1。

免疫人 Ig 鼠

當人 Ig 鼠被用來培養本發明之人抗體時，該鼠可利用純化或富集之 CXCR4 抗原及/或重組 CXCR4 製劑、或表現 CXCR4 之細胞、或 CXCR4 融合蛋白質免疫，如 Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368(6474):856-859; Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851; 及 PCT 公開號 WO 98/24884 及 WO 01/14424 所述。較佳的是，該鼠在第一次注射時為 6-16 週齡。舉例來說，經純化或重組之 CXCR4 抗原製劑(5-50 微克)可用來經腹腔免疫人 Ig 鼠。最佳的是，該用來培養本發明之抗體的免疫原包含在膜中以其天然構型存在之人 CXCR4，其非限制性實施例包括經轉染以在它們的細胞表面表現 CXCR4 之細胞、天然表現 CXCR4 之細胞(例如 CEM 細胞)及其中已融入 CXCR4 之人造膜(例如脂質體)，諸如融入 CXCR4 之磁性脂蛋白體(MPLs)(進一步描述於實施例 1 中)。

產生抗 CXCR4 之全長人單株抗體的詳細程序係描述於下面實施例 1。使用各種抗原之累積經驗顯示轉殖基因鼠對於初期以完全弗氏佐劑中之抗原腹腔(IP)免疫，接著以不完全弗氏佐劑中之抗原隔週 IP 免疫(最多共 6 次)有所反應。然而，除弗氏以外之佐劑亦被發現有效。此外，不含佐劑之完整細胞被發現具高度免疫原性。免疫反應可利用在免疫計畫之過程中自後眼窩採血所獲得之血漿檢體監

測。該血漿可以 ELISA (如下述) 檢測，及具有足夠力價之抗 CXCR4 人免疫球蛋白之鼠可被用於輸注。鼠可在犧牲及切除脾臟前 3 天以抗原經靜脈加強免疫。預期每次免疫可能需要進行 2-3 次輸注。每種抗原通常免疫介於 6 至 24 隻鼠。通常同時使用 HCo7 及 HCo12 品系。此外，HCo7 及 HCo12 二種轉殖基因可被一起培育至具有二個不同人重鏈轉殖基因(HCo7/HCo12)之單一鼠中。或者或此外，可如實施例 1 中所述使用 KM Mouse[®] 品系。

製備生產本發明之人單株抗體的雜交瘤

要製備生產本發明之人單株抗體的雜交瘤，來自免疫鼠之脾細胞及/或淋巴結細胞可被分離及融合至適當之永久化細胞系中，諸如鼠骨髓瘤細胞系。所產生之雜交瘤可經篩選以用於生產抗原專一性抗體。舉例來說，來自免疫鼠之脾淋巴球單細胞懸浮液可融合至含 50% PEG 之 1/6 數量的 P3X63-Ag8.653zo 非分泌性鼠骨髓瘤細胞(ATCC, CRL 1580)。或者，該來自免疫鼠之脾淋巴球單細胞懸浮液可利用電場電融合法融合，其使用 CytoPulse 大型腔室細胞融合電穿孔儀(CytoPulse Sciences, Inc., Glen Burnie Maryland)。細胞以約 2×10^5 被接種至平底微量盤上，隨後 2 週培養於包含 20% 胎克隆血清、18% “653” 條件培養基、5% 奧利基因(Origen)(IGEN)、4mM L-麩醯胺酸、1mM 丙酮酸鈉(sodium pyruvate)、5mM HEPES、0.055mM 2-巰基乙醇、50 單位/毫升青黴素、50 毫克/毫升鏈黴素、50

毫克/毫升健大黴素及 1 倍 HAT (Sigma;HAT 於融合 24 小時後添加)之選擇性培養基中。經過大約 2 週後，細胞可被培養於其中 HAT 以 HT 取代之培養基中。然後每個孔槽可以 ELISA 篩選人單株 IgM 及 IgG 抗體。一旦雜交瘤開始大量生長，通常可在 10-14 天後觀察培養基。該抗體分泌性雜交瘤可被重新接種及篩選，如果仍然呈現人 IgG 陽性，該單株抗體可以極限稀釋法進行至少二次之次選殖。該穩定之次選殖物接著可於活體外培養以於組織培養基中產生少量抗體以用於特徵化。

要純化人單株抗體，經選擇之雜交瘤可生長於供單株抗體純化之 2 公升旋轉培養瓶中。上清液在以 A 蛋白-瓊脂糖管柱(Pharmacia, Piscataway, N.J.)進行親合色層分析之前可經過濾及濃縮。經洗提出之 IgG 可藉膠體電泳及高效液相層析法檢查以確保純度。該緩衝溶液可被換成 PBS，及使用 1.43 之消光係數以 OD280 決定濃度。該單株抗體可被分裝及儲存於 -80°C 下。

製備生產本發明之單株抗體的轉染瘤

本發明之抗體亦可利用如該領域所熟知之重組 DNA 技術及基因轉染方法之組合於宿主細胞轉染瘤中生產(例如 Morrison, S. (1985) Science 229:1202)。

舉例來說，要表現抗體或其抗體片段，編碼部分或全長輕鏈及重鏈之 DNAs 可利用標準分子生物學技術獲得(例如利用表現所欲抗體之雜交瘤進行 PCR 放大或 cDNA

選殖)及該 DNAs 可被插入表現載體以使該基因與轉錄及轉譯控制序列操作性連接。在此背景之下，「操作性連接」一詞意圖指抗體基因被連接到載體中以使載體中之轉錄及轉譯控制序列發揮它們在調節抗體基因之轉錄及轉譯上的意圖功能。該表現載體及表現控制序列係經選擇以與所使用之表現宿主細胞相容。抗體輕鏈基因及抗體重鏈基因可被插入分開之載體中或更典型者為二個基因均被插入相同的表現載體中。抗體基因係以標準方法插入表現載體中(例如連接抗體基因片段及載體上之互補限制位置或如果限制位置不存在以鈍端連接)。此處所描述之抗體的輕鏈及重鏈變異區可被用來產生任何抗體同型之全長抗體基因，藉由將它們插入已經編碼該所欲同型之重鏈固定區及輕鏈固定區的表現載體中，以使 V_H 片段與 C_H 片段在載體中操作性連接及 V_K 片段與 C_L 片段在載體中操作性連接。此外或二者擇一地，該重組表現載體可編碼促進抗體鏈自宿主細胞分泌之信號肽。該抗體鏈基因可被選殖至載體中以使信號肽與抗體鏈基因之胺基端依讀框順序連接。信號肽可為免疫球蛋白信號肽或異源性信號肽(意即來自非免疫球蛋白之蛋白質的信號肽)。

除了抗體鏈基因之外，本發明之重組表現載體攜帶控制抗體鏈基因於宿主細胞中表現之調節序列。「調節序列」一詞意圖包括啟動子、增強子及其他控制抗體鏈基因之轉錄或轉譯的表現控制元件(例如聚腺苷酸化信號)。該調節序列係描述於例如 Goeddel 中(Gene Expression

Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))。該領域之技術人士將了解表現載體之設計(包括調節序列之選擇)視例如所選擇之欲轉形的宿主細胞、所欲蛋白質之表現量等因素而定。用於哺乳類宿主細胞表現之較佳調節序列包括在哺乳類細胞中引導大量蛋白質表現之病毒元件，諸如源自巨細胞病毒(CMV)、猿猴病毒 40 (SV40)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期啟動子(AdMLP))及多瘤病毒之啟動子及/或增強子。或者，可使用非病毒性調節序列，諸如泛素啟動子或 β -球蛋白啟動子。另外，由不同來源之序列所組成的調節元件(諸如 SR α 啟動子系統)，其包含來自 SV40 早期啟動子及第 1 型人 T 細胞白血病毒長端重複之序列(Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。

除了抗體鏈基因及調節序列之外，本發明之重組表現載體可攜帶其他序列，諸如調節宿主細胞中之載體複製的序列(例如複製來源)及可選擇之標記基因。該可選擇之標記基因有助於其中被導入載體之宿主細胞的篩選(參見例如 Axel 等人之美國專利 4,399,216、4,634,665 及 5,179,017)。舉例來說，通常該可選擇之標記基因令其中導入該載體之宿主細胞具有對藥物之抗性，諸如 G418、潮黴素(hygromycin)或甲胺喋呤(methotrexate)。較佳之可選擇標記基因包括二氫葉酸還原酶(DHFR)基因(用於甲胺喋呤選擇/放大之 dhfr-宿主細胞)及 neo 基因(用於 G418 篩選)。

要表現輕鏈及重鏈，該編碼重鏈及輕鏈之表現載體以標準技術被轉染至宿主細胞。各種形式之「轉染」用詞係意圖包含經常用於將外源性 DNA 導入至原核或真核宿主細胞之廣泛技術，例如電穿孔法、鈣-磷酸鹽沉澱法、DEAE 葡聚糖轉染及該類似法。雖然理論上有可能在原核或真核宿主細胞中表現本發明之抗體，於真核細胞及最好是哺乳類宿主細胞中表現抗體係最為適宜，因為該真核細胞及特別是哺乳類細胞比起原核細胞較有可能組合及分泌經過適當摺疊及具免疫活性之抗體。利用原核細胞表現抗體基因曾被報告無法有效地大量生產活性抗體(Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13)。

較佳之用於表現本發明之重組抗體的哺乳類宿主細胞包括中國倉鼠卵巢細胞(CHO 細胞)(包括與 DHFR 可選擇性標記一起使用之 dhfr⁻ CHO 細胞(描述於 Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220)，例如描述於 R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621)、NSO 骨髓瘤細胞、COS 細胞及 SP2 細胞。特別是當與 NSO 骨髓瘤細胞一起使用時，其他較佳之表現系統係揭示於 WO 87/04462 (所有人 Wilson)、WO 89/01036 (所有人 Bebbington)及 EP 338,841(所有人 Bebbington)之 GS 基因表現系統。當編碼抗體基因之重組表現載體被導入哺乳類宿主細胞中時，抗體係藉由在一段足以允許抗體於宿主細胞中表現或更佳為抗體分泌至其中宿主細胞生長之培養基中的時間內培養該

宿主細胞以產生。可利用標準蛋白質純化方法自培養基收集抗體。

與抗原結合之抗體的特徵

本發明之抗體可利用例如標準流式細胞儀測試與 CXCR4 之結合。由於本發明之抗體較佳地辨識以天然構型存在膜內之 CXCR4，與 CXCR4 結合之測試係適宜地以利用表現天然構型 CXCR4 之試劑的試驗(例如流式細胞儀)進行。可用於結合試驗之表現天然構型 CXCR4 試劑的非限制性實例包括天然表現 CXCR4 之細胞(例如 CEM 細胞)、經轉染以表現 CXCR4 之細胞(例如以 CXCR4 表現載體轉染之 R1610 細胞)及其中已融入 CXCR4 之脂質體(例如融入 CXCR4 之磁性脂蛋白體)，以上各進一步詳細描述於實施例中。簡單地說，在流式細胞儀試驗中，表現 CXCR4 之細胞係與測試抗體一起培養，經過清洗，與可結合測試抗體之經標示的二次試劑一起培養，再次清洗，及進行分析以偵測二次試劑與細胞之結合(例如使用 FACS 儀)。較佳的是，以流式細胞儀分析具有最高力價之鼠將被用於融合或用於進一步篩選抗體(例如以噬菌體展示篩選由鼠之 B 細胞構成之抗體庫)。

如上所述之流式細胞術亦可被用來篩選與 CXCR4 免疫原呈現陽性反應之雜交瘤。表現以高親合性與 CXCR4 結合之抗體的雜交瘤被次選殖及進一步特徵化。每個雜交瘤(其保留親代細胞之反應性(藉流式細胞術))可選擇一個

克隆以製備儲存於 -140°C 下 5-10 槽之細胞庫及用於抗體純化。

要純化抗 CXCR4 抗體，經選擇之雜交瘤可生長於供單株抗體純化之 2 公升旋轉培養瓶。上清液在以 A 蛋白-瓊脂糖管柱 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) 進行親合色層分析之前可經過濾及濃縮。經洗提出之 IgG 可藉膠體電泳及高效液相層析法檢查以確保純度。該緩衝溶液可被換成 PBS，及使用 1.43 之消光係數以 OD280 決定濃度。該單株抗體可被分裝及儲存於 -80°C 下。

要決定該選擇之抗 CXCR4 單株抗體是否與特定抗原決定位結合，每個抗體可利用商業可購得之試劑 (Pierce, Rockford, IL) 加以生物素化。使用未經標示之單株抗體及生物素化單株抗體的競爭試驗可利用其中 ELISA 盤係覆有表現 CXCR4 之細胞的全細胞 ELISA 試驗進行，及測定未經標示抗體與生物素化抗體競爭結合 CXCR4 表現細胞之能力。生物素化 mAb 結合可利用鏈親合素-鹼磷酸酶探針偵測。

要決定純化抗體之同型，可利用對特定同型之抗體具專一性之試劑進行同型 ELISAs。舉例來說，要決定人單株抗體之同型，以 1 微克/毫升之抗人免疫球蛋白在 4°C 下隔夜覆蓋微量滴定盤之孔槽。在以 1% BSA 阻斷後，該盤在室溫下與 1 微克/毫升或更少之測試單株抗體或純化同型對照組反應 1 至 2 小時。接著孔槽可與人 IgG1 或人 IgM 專一性鹼磷酸酶偶聯探針反應。試盤依上述方式培養

及分析。

抗 CXCR4 人 IgGs 可進一步利用西方印漬法測試與 CXCR4 抗原之反應。簡單地說，CXCR4 可被製備及進行十二烷基硫酸鈉聚丙稀胺膠體電泳。在電泳後，該經分離之抗原被轉移到硝酸纖維素膜，以 10%胎牛血清封閉，及利用欲測試之單株抗體探針與之雜交。人 IgG 結合可利用抗人 IgG 鹼性磷酸酶偵測及 BCIP/NBT 受質錠 (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.)呈色。

本發明之抗體的結合專一性亦可藉由監測抗體與表現 CXCR4 之細胞結合來決定，例如藉由流式細胞術。一般來說，細胞系(諸如 CHO 細胞系)可以編碼跨膜形式之 CXCR4 的表現載體轉染。該轉染蛋白質可包含較佳係在 N 端之標籤，諸如 myc-標籤，其利用針對標籤之抗體以用於偵測。本發明之抗體與 CXCR4 結合可利用培養該轉染細胞與抗體及偵測經結合之抗體以決定。抗體與該轉染蛋白質上之標籤結合可被當作陽性對照。

免疫偶聯物

在另一方面，本發明包含與治療基團(諸如細胞毒素、藥物(例如免疫抑制劑)或放射毒素)偶聯之抗 CXCR4 抗體或其片段。該偶聯物在此處係指「免疫偶聯物」。包含一或多種細胞毒素之免疫偶聯物被稱為「免疫毒素」。細胞毒素或細胞毒性劑包括任何對細胞有害(例如殺死細胞)之劑質。實例包括紫杉醇(taxol)、細胞鬆弛素 B

(cytochalasin B)、短桿菌肽 D (gramicidin D)、溴化乙錠 (ethidium bromide)、依米丁 (emetine)、絲裂黴素 (mitomycin)、依托泊苷 (etoposide)、替尼泊苷 (teniposide)、維克斯丁 (vincristine)、長春鹼 (vinblastine)、秋水仙鹼 (colchicin)、多柔比星 (doxorubicin)、柔紅比星 (daunorubicin)、二羥基蒽二酮 (dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、光輝黴素 (mithramycin)、放線菌素 D (actinomycin D)、去氫睪酮 (1-dehydrotestosterone)、糖皮質激素 (glucocorticoids)、普魯卡因 (procaine)、丁卡因 (tetracaine)、利多卡因 (lidocaine)、普萘洛爾 (propranolol)、及嘌呤黴素 (puromycin) 及彼等之類似物或相同物。治療劑亦包括例如抗代謝劑 (例如甲胺喋呤 (methotrexate)、6-巯嘌呤 (6-mercaptopurine)、6-硫鳥嘌呤 (6-thioguanine)、賽他命 (cytarabine)、5-氟尿嘧啶達卡巴嗪 (5-fluorouracil decarbazine))、烷化劑 (例如雙氯乙基甲胺 (mechlorethamine)、塞替派 (thioepa)、氯氮布西 (chlorambucil)、美法崙 (Melfalan)、卡莫司汀 (carmustine)(BSNU)、及洛莫司汀 (lomustine)(CCNU)、環磷醯胺 (cyclophosphamide)、白消安 (busulfan)、二溴甘露醇 (dibromomannitol)、鏈脲佐菌素 (streptozotocin)、絲裂黴素 C (mitomycin C) 及順 - 二氯二氨合鉑 II (cis-dichlorodiamine platinum II)(DDP)、順鉑 (cisplatin)、蒽環類 (anthracyclines) (例如柔紅比星 (daunorubicin) (舊稱柔

紅黴素(daunomycin))及多柔比星(doxorubicin))、抗生素(例如更生黴素(dactinomycin)(舊稱放線菌素(actinomycin))、博來黴素(bleomycin)、光輝黴素(mithramycin)及安曲黴素(anthracycline)(AMC))、及抗有絲分裂劑(長春新鹼(vincristine)及長春鹼(vinblastine))。

其他可與本發明之抗體偶聯之治療性細胞毒素的較佳實例包括杜卡黴素(duocarmycins)、刺孢黴素(calicheamicins)、美登素(maytansins)及奧瑞他丁(auristatins)及彼等之衍生物。刺孢黴素抗體偶聯物之實例可自商業購得(Mylotarg[®]; American Home Products)。

細胞毒素可利用該領域可得之連接子技術與本發明之抗體偶聯。曾被用於偶聯細胞毒素與抗體之連接子類型實例包括但不限於腙類(hydrazones)、硫醚類、酯類、二硫化物及含肽連接子。可選擇在溶酶體室內易受低 pH 值之切割或易受蛋白酶之切割的連接子，諸如較佳為表現在腫瘤組織中之蛋白酶如組織蛋白酶(cathepsins)(例如組織蛋白酶 B、C、D)。

關於細胞毒素之類型、連接子及供偶聯治療劑與抗體之方法的進一步討論亦可參考 Saito, G. et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P. A. et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter,

P.D. and Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264。

本發明之抗體亦可與放射活性同位素偶聯以產生細胞毒性放射性醫藥物，亦被稱為放射免疫偶聯物。可與抗體偶聯以供診斷或治療之用的放射活性同位素實例包括但不限於 131 碘、 111 銻、 90 釷及 177 鎳。用於製備放射性免疫偶聯物之方法係建立於該領域中。放射性免疫偶聯物之實例係商業可購得，包括 Zevalin[®] (IDEC Pharmaceuticals) 及 Bexxar[®] (Corixa Pharmaceuticals)，及可使用類似方法以製備使用本發明之抗體的放射性免疫偶聯物。

本發明之抗體偶聯物可被用來修飾特定生物反應，及該藥物基團不應被視為限於典型化學治療劑。舉例來說，該藥物基團可為具有所欲生物活性之蛋白質或多肽。該蛋白質可包括例如酵素活性毒素或其活性片段，諸如相思豆毒蛋白(abrin)、蓖麻毒蛋白 A (ricin A)、綠膿桿菌外毒素或白喉毒素；蛋白質諸如腫瘤壞死因子或干擾素- γ ；或生物反應修飾劑諸如淋巴激素、介白素-1 (IL-1)、介白素-2 (IL-2)、介白素-6 (IL-6)、顆粒球巨噬細胞集落刺激因子 (GM-CSF)、顆粒球集落刺激因子 (G-CSF)、或其他生長因子。

用於偶聯該治療基團與抗體之技術係廣為所知，參見例如 Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al.

(eds.), pp.243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al., Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)。

雙專一性分子

在另一方面，本發明包含包含本發明之抗 CXCR4 抗體或其片段之雙專一性分子。本發明之抗體或其抗原結合部位可衍生或連接至其他功能性分子，例如其他肽或蛋白質(例如其他抗體或受體之配體)以產生與至少二個不同結合部位或目標分子結合之雙專一性分子。本發明之抗體事實上可被衍生或連接至一個以上之其他功能性分子，以產生與二個以上不同結合部位及/或目標分子結合之多專一性分子；該多專一性分子亦意圖被包含於此處所使用之「雙專一性分子」一詞中。要產生本發明之雙專一性分

子，本發明之抗體可功能性連接(例如藉由化學偶合、基因融合、非共價連接或其他方式)至一或多個其他結合分子，諸如其他抗體、抗體片段、肽或結合擬似物，以導致雙專一性分子。

因此，本發明包括包含對 CXCR4 具有至少一個第一結合專一性及對第二目標抗原決定位具有第二結合專一性的雙專一性分子。在本發明之特定實施態樣中，該第二目標抗原決定位係 Fc 受體，例如人 Fc γ RI (CD64)或人 Fc α 受體(CD89)。因此，本發明包括可與 Fc γ R 或 Fc α R 表現效應細胞(例如單核球、巨噬細胞或多型核細胞(PMNs))及表現 CXCR4 之目標細胞結合的雙專一性分子。這些雙專一性分子令 CXCR4 表現細胞成為效應細胞之目標及刺激 Fc 受體媒介性效應細胞活性，諸如吞噬 CXCR4 表現細胞、抗體依賴性細胞媒介細胞毒性(ADCC)、細胞激素釋放或產生超氧陰離子。

在其中雙專一性分子係多專一性之本發明的實施態樣中，該分子除抗 Fc 結合專一性及抗 CXCR4 結合專一性之外可進一步包含第三結合專一性。在一實施態樣中，該第三結合專一性係抗增強因子(EF)部分，例如與細胞毒性活性有關之表面蛋白質結合的分子，其藉此增加針對目標細胞之免疫反應。「抗增強因子部分」可為與特定分子(例如抗原或受體)結合之抗體、功能性抗體片段或配體，以導致增強對 Fc 受體或目標細胞抗原之結合決定位的效應。該「抗增強因子部分」可與 Fc 受體或目標細胞抗原

結合。或者，該抗增強因子部分可結合不同於第一及第二結合專一性所結合之實體的實體。舉例來說，該抗增強因子部分可結合細胞毒性 T 細胞(例如透過 CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1 或其他導致增強對抗目標細胞之免疫反應的免疫細胞)。

在一實施態樣中，本發明之雙專一性分子包含至少一個抗體或其抗體片段為結合專一性，包括例如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、dAb 或單鏈 Fv。該抗體亦可為輕鏈或重鏈二聚體或其任何最小片段諸如 Fv 或如 Ladner 等人之美國專利 4,946,778 中所述之單鏈建構物，其內容以參照方式明示納入。

在一實施態樣中，對 Fc γ 受體之結合專一性係由單株抗體提供，其結合不被人免疫球蛋白 G (IgG)阻斷。此處所使用之「IgG 受體」一詞係指位於染色體 1 上之 8 個 γ 鏈基因之任何一個。這些基因共編碼 12 個跨膜或可溶性受體同型，它們被分成三個 Fc γ 受體類型：Fc γ RI (CD64)、Fc γ R II (CD32)及 Fc γ R III (CD16)。在一較佳之實施態樣中，該 Fc γ 受體係人高親和性 Fc γ RI。該人 Fc γ RI 係 72 kDa 之分子，其對單體 IgG 具有高親和性(10^8 - 10^9 M⁻¹)。

有關特定較佳之抗 Fc γ 單株抗體的生產及特徵係描述於 Fanger 等人之 PCT 公開號 WO 88/00052 及美國專利 4,954,617 號中，其揭示以參照方式完全納入此處。這些抗體與 Fc γ RI、Fc γ R II 或 Fc γ R III 之抗原決定位結合的位

置異於該受體之 $Fc\gamma$ 結合位置，因此它們的結合實質上不會受到生理濃度之 IgG 阻斷。可用於本發明之特定抗 $Fc\gamma RI$ 抗體係 mAb 22、mAb 32、mAb 44、mAb 62 及 mAb 197。該雜交瘤產生之 mAb 32 可得自 ATCC 登錄號 HB9469。在其他實施態樣中，該抗 $Fc\gamma$ 受體抗體係人化形式之單株抗體 22 (H22)。H22 抗體之生產及特徵係描述於 Graziano, R.F. et al. (1995) J. Immunol 155 (10):4996-5002 及 Tempest 等人之 PCT 公開號 WO 94/10332 中。該 H22 抗體生產細胞系係保存於美國菌種保存中心編號 HA022CL1 及其登錄號為 CRL 11177。

在其他較佳之實施態樣中，對 Fc 受體之結合專一性係由與人 IgA 受體(例如 Fc- α 受體($Fc\alpha RI$ (CD89)))結合之抗體提供，其結合較佳不會被人免疫球蛋白 A (IgA) 阻斷。「IgA 受體」一詞意圖包括位於染色體 19 上之一個 α 基因($Fc\alpha RI$)的基因產物。此基因已知可編碼數個 55 至 110 kDa 之非傳統切割跨膜同型。 $Fc\alpha RI$ (CD89) 係基礎表現於單核球/巨噬細胞、嗜酸性及嗜中性顆粒球上，但不表現在非效應細胞族群上。 $Fc\alpha RI$ 對 IgA1 及 IgA2 二者具有中度親和性(約 $5 \times 10^7 M^{-1}$)，當暴露於細胞激素諸如 G-CSF 或 GM-CSF 時增加(Morton, H.C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440)。四種與 IgA 配體結合結構域以外之 $Fc\alpha RI$ 結合的 $Fc\alpha RI$ 專一性單株抗體(被稱為 A3、A59、A62 及 A77)已被描述(Monteiro, R.C. et al. (1992) J. Immunol. 148:1764)。

Fc α RI 及 Fc γ RI 係本發明之雙專一性分子所使用之較佳刺激受體，因為它們(1)主要表現於免疫效應細胞上，例如單核球、PMNs、巨噬細胞及樹突細胞；(2)以高濃度表現(例如 5,000-100,000/細胞)；(3)係細胞毒性活性之媒介物(例如 ADCC、吞噬作用)；及(4)調節針對它們之抗原(包括自我抗原)的增強抗原表現。

雖然人單株抗體係較佳，其他可作為本發明之雙專一性分子之抗體係鼠、嵌合及人化單株抗體。

本發明之雙專一性分子可利用該領域已知之方法偶聯基礎結合專一性製備，例如抗 FcR 及抗 CXCR4 之結合專一性。舉例來說，該雙專一性分子之各結合專一性可分別產生然後互相偶聯。當結合專一性係蛋白質或肽，各種偶合或交聯劑可被用於共價偶聯。交聯劑之實例包括 A 蛋白、carbodiimide、N-succinimidyl-S-acetyl-thioacetate (SATA)、5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)、o-phenylenedimaleimide(oPDM)、N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate(SPDP)及 sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC)(參見例如 Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。其他方法包括該些於 Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83 及 Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139:2367-2375 中所描述者。較佳之偶聯劑係 SATA 及 sulfo-

SMCC，二者皆可得自皮爾斯化學公司(Rockford, IL)。

當結合專一性係抗體，它們可透過二個重鏈之 C 端鉸鏈區的 *sulfhydryl* 結合偶聯。在特別較佳之實施態樣中，該鉸鏈區在偶聯之前經修飾以包含奇數之 *sulfhydryl* 殘基，較佳為一個。

或者，二個結合專一性可在相同之載體中編碼及於相同的宿主細胞中表現及組合。此方法特別適用於該雙專一性分子係 $\text{mAb} \times \text{mAb}$ 、 $\text{mAb} \times \text{Fab}$ 、 $\text{Fab} \times \text{F(ab')}_2$ 或配體 $\times \text{Fab}$ 融合蛋白。本發明之雙專一性分子可為包含一個單鏈抗體及一個結合決定位之單鏈分子，或包含二個結合決定位之單鏈雙專一性分子。雙專一性分子可包含至少二個單鏈分子。用於製備雙專一性分子之方法係描述於例如美國專利號碼 5,260,203; 5,455,030; 4,881,175; 5,132,405; 5,091,513; 5,476,786; 5,013,653; 5,258,498; 及 5,482,858 中，所有皆以參照方式明示納入此處。

雙專一性分子與其特定目標之結合可經由例如酵素連接免疫吸附法(ELISA)、放射性免疫分析(RIA)、FACS 分析、生物分析(例如生長抑制)或西方印漬法確認。每種這些試驗通常使用對所欲之複合物具專一性之經標記試劑(例如抗體)來偵測所欲之蛋白質-抗體複合物之存在。舉例來說，FcR-抗體複合物可利用例如辨識及與該抗體-FcR 複合物專一性結合之酵素連接抗體或抗體片段偵測。或者，該複合物可利用任何各種其他免疫分析法偵測。舉例來說，該抗體可經放射活性標記及使用於放射免疫分析法

(RIA)(參見例如 Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, 其以參照方式納入此處)。該放射活性同位素可利用諸如 γ 計數器或閃爍計數器或自動放射線照相術 (autoradiography) 之方法偵測。

醫藥組成物

在另一態樣中，本發明提供一種組成物，例如醫藥組成物，其包含與藥學上可接受之載劑一起調合之本發明的一種單株抗體或單株抗體組合物或其抗原結合部位。該組成物可包含本發明之一種或組合(例如二或多種不同)之抗體，或免疫偶聯物或雙專一性分子。舉例來說，本發明之醫藥組成物可包含與目標抗原上之不同抗原決定位結合或具有互補活性之抗體(或免疫偶聯物或雙專一性分子)的組合物。

本發明之醫藥組成物亦可於組合療法中(意即與其它劑質組合)投服。例如，該組合療法可包括本發明之抗 CXCR4 抗體與至少一種其他抗發炎或免疫抑制劑之組合物。可用於組合療法中之治療劑實例係詳細描述於下面本發明之抗體之用途一節中。

此處所使用之「藥學上可接受之載劑」包括任何及所有生理上相容之溶劑、分散介質、塗層、抗細菌及抗真菌劑、等張及吸收延遲劑、及該類似物。較佳的是，該載劑

係適用於靜脈內、肌肉內、皮下、非經腸、脊椎或表皮投服(例如注射或輸注)。依所選擇之投服途徑而定，該活性化合物(意即抗體、免疫偶聯物或雙專一性分子)可被包覆於保護化合物不受酸作用及其他可不活化該化合物之天然條件的材質中。

本發明之醫藥組成物可包括一或多種藥學上可接受之鹽。「藥學上可接受之鹽」係指保留母化合物之所欲生物活性及不造成任何非所欲毒理作用之鹽(參見例如 Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19)。該鹽之實例包括酸添加鹽及鹼添加鹽。酸添加鹽包括該些衍生自無毒之無機酸者(諸如鹽酸、硝酸、磷酸、硫酸、氫溴酸、氫碘酸、亞磷酸及該類似物)及衍生自無毒之有機酸者(諸如脂肪族單及雙羧酸、經苯基取代之烷酸、羥基烷酸、芳香酸、脂肪族及芳香族磺酸及該類似物)。鹼添加鹽包括該些衍生自鹼土金屬者(諸如鈉、鉀、鎂、鈣及該類似物)及衍生自無毒之有機胺者(諸如 N,N'-二苳基乙二胺、N-甲基葡糖胺、氯普魯卡因(chloroprocaine)、膽鹼、二乙醇胺、乙二胺、普魯卡因及該類似物)。

本發明之醫藥組成物亦可包括藥學上可接受之抗氧化劑。藥學上可接受之抗氧化劑實例包括(1)可溶於水之抗氧化劑，諸如維生素 C、半胱胺酸鹽酸鹽、硫酸氫鈉、重亞硫酸鈉、亞硫酸鈉及該類似物；(2)可溶於油之抗氧化劑，諸如維生素 C 棕櫚酸酯、丁基羥基甲氧苯(BHA)、二丁基羥基甲氧苯(BHT)、卵磷脂、沒食子酸丙酯、天然維生

素 E (alpha-tocopherol)及該類似物；及(3)金屬螯合劑，諸如檸檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸及該類似物。

可應用於本發明之醫藥組成物中之適當水性及非水性載劑實例包括水、乙醇、多元醇(諸如甘油、丙二醇、聚乙二醇、及該類似物)及彼等之適當混合物、植物油(諸如橄欖油)及可注射之有機酯(諸如油酸乙酯)。適當流動性可藉由例如使用包覆材質(諸如卵磷脂)、維持以分散劑為例中之所需顆粒大小及使用介面活性劑以維持。

這些組成物亦可包含佐劑諸如保存劑、潤濕劑、乳化劑及分散劑。防止微生物出現可藉由上述之滅菌程序及包含各種抗細菌及抗真菌劑(例如乙酯、氯丁醇、山梨酸酚及該類似物)以確保。在組成物中包括等張劑(諸如糖、氯化鈉及該類似物)亦為所欲。此外，延長注射型醫藥形式之吸收可藉由包含延緩吸收之劑質(諸如單硬脂酸鋁及明膠)以達成。

藥學上可接受之載劑包括無菌之水性溶液或分散劑及用於立即製備無菌注射溶液或分散劑之無菌粉末。使用該用於醫藥活性物質之介質及劑質係該領域中所知。除了任何與活性化合物不相容之傳統介質或劑質之外，可考慮其於本發明之醫藥組成物中之用途。補充之活性化合物亦可被納入該組成物中。

治療組成物通常在製造及儲存的條件下必須為無菌及穩定。該組成物可被調配為溶液、微乳化物、脂質體、或

其他適用於藥物高濃度中之有序結構。該載劑可為包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、及液體聚乙二醇及該類似物)及彼等之適當混合物的溶劑或分散介質。適當流動性可藉由例如使用塗層(諸如卵磷脂)、維持以分散劑為例中之所需顆粒大小及使用介面活性劑以維持。在許多案例中，較佳的是在該組成物中包括等張劑，例如糖、多元醇諸如甘露醇、山梨醇或氯化鈉。延長注射型組成物之吸收可藉由在組成物中包含延長吸收之劑質例如單硬脂酸鹽及明膠以達成。

無菌之注射型溶液的製備可藉由將所需量之活性化合物及視需要之一或多種上述成分納入適當溶劑，接著經過無菌微過濾。一般來說，分散劑係藉由將活性化合物納入包含基礎分散介質及所需之來自上述其他成分的無菌載劑以製備。在供製備無菌注射型溶液之無菌粉末的案例中，較佳之製備方法係真空乾燥及冷凍乾燥(凍乾)，以產生含活性成分之粉末以及任何其他來自其先前經無菌過濾之溶液中的所欲成分。

可與載劑物質結合以產生單一劑型之活性成分的量，將視接受治療之個體及特定投服模式而有所不同。可與載劑物質結合以產生單一劑型之活性成分的量通常將是可產生治療效果之組成物的量。以百分率而言，此量通常介於約 0.01% 至約 99%之活性成分，較佳介於約 0.1% 至約 70%，最佳介於 1% 至約 30%之活性成分與藥學上可接受之載劑組合。

給藥方案經調整以提供最佳之所欲反應(例如治療反應)。舉例來說，可給予單次注射、在一段時間內給予數次分開投藥或可視治療情況之危急性而按比例減少或增加投藥。特別有利的是將非經腸投服之組成物調合成易於投服及劑量一致之劑量單位形式。此處所使用之劑量單位形式係指適用於供欲治療之個體單次投服之物理分離單位；每個單位包含經計算以產生所欲治療效果之預先決定量的活性化合物與所欲之藥學載劑之組合物。本發明之劑量單位形式的規格將由(a)該活性化合物之獨特特徵及所欲達成之特定治療效果，及(b)合成該治療個體之敏感性之活性化合物的固有技藝限制描述及直接視二者而定。

在投服抗體時，該劑量介於約 0.0001 至 100 毫克/公斤，及更常為 0.01 至 5 毫克/公斤之宿主體重。舉例來說，劑量可為 0.3 毫克/公斤體重、1 毫克/公斤體重、3 毫克/公斤體重、5 毫克/公斤體重或 10 毫克/公斤體重或介於 1-10 毫克/公斤之範圍內。示範性治療方式需要每週投服一次、每二週一次、每三週一次、每四週一次、每月一次、每三月一次或每三至六月一次。本發明之抗 CXCR4 抗體的較佳投服計畫包括經靜脈投服 1 毫克/公斤體重或 3 毫克/公斤體重，抗體之給予係利用下列投藥計畫之一：(i) 每四週給予六次，然後每三月；(ii) 每三週；(iii) 3 毫克/公斤體重一次接著每三週 1 毫克/公斤體重。

在一些方法中，二或多株具不同結合專一性之單株抗體係同時給予，其中每種抗體投服之劑量落在所顯示之範

圍。抗體通常在多重場合投服。在單次劑量之間的時間可為例如每週、每月、每三月或每年。間隔亦可如測量抗病患體內目標抗原之抗體的血中濃度所示而不規則。在一些方法中，劑量經過調整以達到約 1-1000 微克/毫升之血漿抗體濃度及在一些方法中約 25-300 微克/毫升。

或者，抗體可被投與為持續釋放調合物，在此情況下需要較少投與次數。劑量及頻率視抗體在病患體內之半衰期而有所不同。一般來說，人抗體顯示最長之半衰期，之後為人化抗體、嵌合抗體、及非人抗體。投與之劑量及頻率可視該治療係預防或治療而不同。在預防應用中，相當低的劑量在一段長期的時間以相對不頻繁之間隔投服。在治療應用中，相對高劑量以相對短間隔有時候需要直到疾病進展減少或終結，及較佳的是病患顯示疾病之症狀部分或完全惡化。之後，病患可投服預防療法。

在本發明之藥學組成物中之活性成分的實際劑量濃度可有所差異以獲得活性成分之量，其有效達成對特定病患所欲治療反應，組成物及投服模式而對病患無毒性。該選擇之劑量濃度將視各種藥動因子而定，包括所使用之本發明之特定組成物的活性，或其酯、鹽或胺、投服途徑、投服時間、所使用之特定化合物之排泄速率、治療期間、與所使用之特定組成物所使用之其他藥物、化合物及/或物質、接受治療之病患的年齡、性別、體重、狀況、一般健康及先前醫學歷史，及在醫學技藝中所熟知之類似因子。

本發明之抗 CXCR4 抗體的「治療有效劑量」較佳導

致疾病症狀之嚴重度減少、無疾病症狀時期之頻率及期間增加、或預防因疾病折磨所致之障礙或失能。舉例來說，在治療 CXCR4⁺ 腫瘤方面，「治療有效劑量」相對於未治療個體較佳地抑制至少約 20%之細胞生長或腫瘤生長、更佳至少約 40%、甚至更佳至少約 60%、及更佳至少約 80%。化合物抑制腫瘤生長之能力可於動物模型系統中評估人腫瘤之療效。或者，此組成物之性質可藉由檢查該化合物抑制細胞生長之能力評估，該抑制可於活體外藉由技術人士熟知之試驗測量。治療有效量之治療化合物可減少腫瘤大小，或以其他方式減輕個體之症狀。具該領域一般技藝之人士將可根據諸如個體大小、個體症狀之嚴重性及該所選擇之特定組成物或投服途徑等因素來決定該量。

本發明之組成物可使用一或多種該領域已知之多種方法經一或多種投服途徑投服。如該領域技術人士所知道的，投服之途徑及/或模式將視所欲之結果而定。本發明之抗體的較佳投服途徑包括靜脈內、肌肉內、皮內、腹腔內、皮下、脊椎或其他非經腸投服途徑例如注射或輸注。此處所使用之「非經腸投服」一詞係指除經腸及局部投服以外之投服模式，通常經注射，及包括但不限於靜脈內、肌肉內、動脈內、囊內、關節內、眶內、心內、皮內、腹腔內、經氣管、皮下、角質下、關節內、包膜下、蛛網膜下腔、脊椎內、硬膜外及胸骨內注射及輸注。

或者，本發明之抗體可經非經腸途徑投服，諸如局部、表皮或黏膜投服途徑，例如鼻內、口腔、陰道、直

腸、舌下或局部。

活性化合物可與防止化合物快速釋放之載劑一起製備，諸如控制釋放調合物，包括植入物、經皮貼布、及微膠囊釋放系統。可使用生物可分解、生物相容性之聚合物，諸如乙烯醋酸乙烯共聚物、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原、聚原酸酯、及聚乳酸。許多用於製備該調合物之方法具有專利或廣為該領域之技術人士所知。參見例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

治療組成物可以該領域所熟知之醫學設備投服。舉例來說，在較佳之實施態樣中，本發明之治療組成物可以無針之皮下注射設備投服，諸如在美國專利號 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; 或 4,596,556 中所揭示之設備。可用於本發明之眾所周知的植入物及模組實例包括：美國專利第 4,487,603 號，其揭露一種用於以控制速率給予藥物之植入式微輸注幫浦；美國專利第 4,486,194 號，其揭露一種用於經皮膚投服藥物之治療設備；美國專利第 4,447,233 號，其揭露一種用於以精準輸注速率輸送藥物之藥物輸注幫浦；美國專利第 4,447,224 號，其揭露一種用於連續輸送藥物之可變流速植入式輸注設備；美國專利第 4,439,196 號，其揭露一種具有多腔隔室之滲透性藥物輸送系統；及美國專利第 4,475,196 號，其揭露一種滲透性藥物輸送系統。這些專利以參照方式納入此處。許多其他該些植入物、輸送系統

及模組為該領域之技術人士所熟知。

在特定實施態樣中，本發明之人單株抗體可被調合以確保在活體內適當分佈。舉例來說，血腦障礙(BBB)排除許多高親水性化合物。要確保本發明之治療化合物穿越血腦障礙(若為所欲)，它們可被調合為例如脂質體。有關製造脂質體之方法，參見例如美國專利第 4,522,811; 5,374,548; 及 5,399,331 號。該脂質體可包含一或多個被選擇性輸送至特定細胞或器官中之基團，藉此促進標靶藥物輸送(參見例如 V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685)。示範性標靶基團包括葉酸或生物素(參見例如 Low 等人之美國專利 5,416,016)；甘露糖苷(Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038)；抗體(P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180)；介面活性劑 A 蛋白受體(Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134)；p120 (Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090)；亦參見 K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273。

用途及方法

本發明之抗體(特別是人抗體)、抗體組成物及方法具有多種關於診斷及治療 CXCR4 媒介疾病之活體外及活體內診斷及治療用途。舉例來說，這些分子可被投服至培養

細胞(試管內或活體外)或人類個體(例如活體內)，以治療、預防及診斷各種疾病。此處所使用之「個體」一詞意圖包括人及非人動物。非人動物包括所有脊椎動物，例如哺乳類及非哺乳類，諸如非人靈長類、羊、狗、貓、牛、馬、雞、兩棲類及爬蟲類。較佳個體包括具有由 CXCR4 活性所媒介或調節或關於 CXCR4/SDF-1 途徑之疾病的人病患。當抗 CXCR4 之抗體與其他藥劑一起投服時，該二者可以任何順序或同時投服。

由於本發明之抗體與 CXCR4 具有專一結合性，本發明之抗體可用來專一性偵測 CXCR4 在細胞表面上之表達，及另外可透過免疫親和性用來純化 CXCR4。

本發明之抗體組成物(例如人單株抗體、多專一性及雙專一性分子及免疫偶聯物)的活體內及活體外適當投服途徑為該領域中所熟知且可由該些具一般技藝之人士選擇。舉例來說，該抗體組成物可經注射投服(例如靜脈或皮下)。所使用之分子的適當劑量將視個體之年齡及體重及該抗體組成物之濃度及/或調合物而定。

如前所述，本發明之人抗 CXCR4 抗體可與一或其他多種治療劑一起投服，例如細胞毒性劑、放射毒性劑或免疫抑制劑。該抗體可與藥劑連接(成為免疫複合體)或可與藥劑分開投服。在後者情況中(分開投服)，該抗體可在該藥劑之前、之後或同時投服或可與其他已知療法一起投服，例如抗癌療法，例如放射線療法。該治療劑包括由其是抗腫瘤劑諸如多柔比星(doxorubicin)(阿黴素

(adriamycin))、順鉑硫酸博來黴素(cisplatin bleomycin sulfate)、卡莫司汀(carmustine)、氯氮布西(chlorambucil)及環磷醯胺羥基脲(cyclophosphamide hydroxyurea)，其自身僅在對病患有毒性或次毒性之濃度下才有效。順鉑(cisplatin)係以 100 毫克/公斤每四週一次之劑量經靜脈投服及阿黴素(adriamycin)係以 60-75 毫克/毫升每 21 天一次之劑量經靜脈投服。一起投服本發明之人抗 CXCR4 抗體或其抗原結合片段與化學治療劑提供二種透過不同機制作用以產生對人腫瘤細胞之細胞毒性作用的抗癌劑。這種一起投藥可解決因發生對藥物之抗性或腫瘤細胞之抗原性改變而使它們對抗體無反應的問題。

目標專一性效應細胞例如與本發明之組成物(例如人抗體、多專一性及雙專一性分子)連接之效應細胞亦可被用來作為治療劑。用來瞄準之效應細胞可為人白血球諸如巨噬細胞、嗜中性球或單核球。其他細胞包括嗜酸性球、天然殺手細胞及其他 IgG 或 IgA 受體攜帶細胞。若為所欲，效應細胞可獲取自欲接受治療之個體。目標專一性效應細胞可以在生理可接受之溶液中之細胞懸浮液投服。投服之細胞數量可在 10^8 - 10^9 但將視治療目的而有所不同。一般來說，該量將足以獲得目標細胞例如表現 CXCR4 之腫瘤細胞之定位及藉由例如吞噬作用啟動細胞殺滅。投服途徑亦可不同。

目標專一性效應細胞之療法可與其他用於移除目標細胞之技術一起進行。舉例來說，使用本發明之組成物(例

如人抗體、多專一性及雙專一性分子)及/或帶有這些組成物之效應細胞的抗癌療法可與化學療法一起使用。此外，組合免疫療法可被用來引導引起腫瘤細胞排斥之二種不同細胞毒性效應族群。例如，與抗 Fc-gamma RI 或抗 CD3 連接之抗 CXCR4 抗體可與 IgG 或 IgA 受體專一性結合劑一起使用。

本發明之雙專一性及多專一性分子亦可被用來調節效應細胞上之 FcγR 或 FcγR 濃度，諸如藉由阻斷(capping)及清除細胞表面上之受體。抗 Fc 受體之混合物亦可被用於本目的。

具有補體結合位置(諸如與補體結合之來自 IgG1、-2 或 -3 或 IgM 之部位)之本發明之組成物(例如人、人化、或嵌合抗體、多專一性及雙專一性分子及免疫偶聯物)亦可在補體存在下使用。在一實施態樣中，以本發明之結合劑活體外處理一群包含目標細胞之細胞及適當之效應細胞可藉由添加補體或血清包含補體加以補充。藉由與補體蛋白結合可促進吞噬包被本發明之結合劑的目標細胞。在另一實施態樣中，包被本發明之組成物(例如人抗體、多專一性及雙專一性分子)的目標細胞亦可被補體溶解。在另一實施態樣中，本發明之組成物不活化補體。

本發明之組成物(例如人、人化、或嵌合抗體、多專一性及雙專一性分子及免疫偶聯物)亦可與補體一起投服。因此，在本發明之範圍內係包含人抗體、多專一性或雙專一性分子及血清或補體之組成物。這些組成物的好處

在於補體與人抗體、多專一性或雙專一性分子的位置接近。或者，本發明之人抗體、多專一性或雙專一性分子及該補體或血清可分開投服。

本發明之抗體亦可與一或多種其他治療抗體或其他結合劑(諸如 Ig 融合蛋白)一起使用。可與本發明之抗 CXCR4 抗體一起投服之其他抗體或結合劑之非限制性實例包括抗 CTLA-4、PSMA、CD30、IP-10、IFN- γ 、CD70、PD-1、PD-L1、TNF、TNF-R、VEGF、VEGF-R、CCR5、IL-1、IL-18、IL-18R、CD19、Campath-1、EGFR、CD33、CD20、Her-2、CD25、gpIIb/IIIa、IgE、CD11a、 $\alpha 4$ 整合素、IFN α 及 IFNAR1 之抗體或結合劑。

亦屬於本發明之範圍內的是包含本發明之抗體組成物(例如人抗體、雙專一性或多專一性分子或免疫偶聯物)及使用說明之套組。該套組可進一步包含一或多種其他試劑，諸如免疫抑制劑、細胞毒性劑或放射毒性劑、或一或多種其他本發明之人抗體(例如具有補體活性之人抗體，其與 CXCR4 抗原上異於第一人抗體之抗原決定位結合)。

因此，以本發明之抗體組成物治療之病患可額外投服(在投服本發明之人抗體之前、同時或之後)其他治療劑，諸如細胞毒性或放射毒性劑，其可促進或增強該人抗體之治療效果。

在其他實施態樣中，該個體可額外接受調節(例如增強或抑制) Fc γ 或 Fc γ 受體之表現或活性之劑質的治療，

藉由例如以細胞激素治療個體。在以多專一性分子治療期間用於投服之較佳細胞激素包括顆粒球集落刺激因子(G-CSF)、顆粒球-巨噬細胞集落刺激因子(GM-CSF)、干擾素- γ (IFN- γ)及腫瘤壞死因子(TNF)。

本發明之組成物(例如人抗體、多專一性及雙專一性分子)亦可被用於瞄準表現 CXCR4 之細胞，例如用於標示該細胞。在該用途中，該結合劑可連接至可被偵測到之分子。因此，本發明提供在活體外或試管內用於定位表現 CXCR4 之細胞的方法。該可偵測之標記可為例如放射性同位素、螢光化合物、酵素或酵素輔助因子。

在特定實施態樣中，本發明提供用於偵測檢體中 CXCR4 抗原之存在，或測量 CXCR4 抗原之量的方法，其包含令該檢體(及對照檢體)與人單株抗體或其抗原結合部位(其與 CXCR4 專一性結合)在抗體或其部位與 CXCR4 之間可形成複合體之條件下接觸。接著偵測複合體之形成，其中檢體與對照檢體之間形成不同複合體表示該檢體中存在 CXCR4 抗原。

在另一實施態樣中，本發明之免疫偶聯物可被用於瞄準化合物(例如治療劑、標籤、細胞毒素、放射性毒素、免疫抑制劑等)至具有 CXCR4 細胞表面受體之細胞，藉由連接該化合物至抗體。因此，本發明亦提供用於定位活體外或活體內表現 CXCR4 之細胞(例如以可偵測之標籤，諸如放射性同位素、螢光化合物、酵素、或酵素輔助因子)的方法。或者，該免疫偶聯物可被用來藉由瞄準細

胞毒素或放射性毒素至 CXCR4 以殺滅具有 CXCR4 細胞表面受體之細胞。

已知 CXCR4 可被表現在廣泛種類之腫瘤細胞類型上及亦與腫瘤轉移有關。另外，作為 HIV 進入 T 細胞之輔助受體，已知 CXCR4 與 HIV 感染有關。此外，CXCR4/SDR-1 路徑已被顯示與發炎狀態有關。另外，該 CXCR4/SDF-1 路徑已被顯示與血管新生或新血管生成有關。因此，本發明之抗 CXCR4 抗體(及免疫偶聯物及雙專一性分子)可被用於下列各種臨床狀況中以調節 CXCR4 活性：

A. 癌症

已顯示 CXCR4 由多種癌症類型表現及在特定狀況下已建立 CXCR4 表現與病患預後或存活之間的逆相關。與 CXCR4 表現有關之非限制性癌症種類實例包括：乳癌 (Muller, A. et al. (2001) Nature 410:50-56)；卵巢癌 (Scotton, C. et al. (2001) Br. J. Cancer 85:891-897)；攝護腺癌 (Taichman, R. S. et al. (2002) Cancer Res. 62:1832-1837)；非小細胞肺癌 (Spano J. P. et al. (2004) Ann. Oncol. 15:613-617)；胰癌 (Koshiba, T. et al. (2000) Clin. Cancer Res. 6:3530-3535)；甲狀腺癌 (Hwang, J.H. et al. (2003) J. Clin. Endocrinol. Metab. 88:408-416)；鼻咽癌 (Wang, N. et al. (2005) J. Transl. Med. 3:26-33)；黑色素瘤 (Scala, S. et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:1835-

1841)；腎細胞癌(Staller, P. et al. (2003) *Nature* 425:307-311)；淋巴癌(Bertolini, F. et al. (2002) *Cancer Res.* 62:3530-3535)；神經母細胞瘤(Geminder, H. et al. (2001) *J. Immunol.* 167:4747-4757)；膠質母細胞瘤(Rempel, S.A. et al. (2000) *Clin. Cancer Res.* 6:102-111)；橫紋肌肉瘤(Libura, J. et al. (2002) *Blood* 100:2597-2606)；結直腸癌(Zeelenberg, I.S. et al. (2003) *Cancer Res.* 63:3833-3839)；腎癌(Schrader, A. J. et al. (2002) *Br. J. Cancer* 86:1250-1256)；骨肉瘤(Laverdiere, C. et al. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11:2561-2567)；急性淋巴細胞白血病(Crazzolaro, R. et al. (2001) *Br. J. Haematol.* 115:545-553)；及急性骨髓細胞白血病(Rombouts, E. J. C. et al. (2004) *Blood* 104:550-557)。

考慮到前述，本發明之抗 CXCR4 抗體可被用於治療癌症，包括但不限於選自乳癌、卵巢癌、攝護腺癌、非小細胞肺癌、胰癌、甲狀腺癌、鼻咽癌、黑色素瘤、腎細胞癌、淋巴癌、神經母細胞瘤、膠質母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、結直腸癌、腎癌、骨肉瘤、急性淋巴細胞白血病、及急性骨髓細胞白血病中之癌症。該抗體可被單獨使用或與其他癌症治療組合使用，諸如手術及/或放射線治療，及/或與其它抗腫瘤劑組合使用，諸如上述討論及列出之抗腫瘤劑，包括化學治療劑及其他抗腫瘤抗原抗體，諸如該些與 CD20、Her2、PSMA、Campath-1、EGFR 及該類似物結合者。

B. 病毒感染，包括 HIV 感染

CXCR4 已被顯示為 HIV 進入 T 細胞之輔助受體，及此外特定鼠抗 CXCR4 抗體已經證實可抑制 HIV 分離株進入 T 細胞(參見 Hou, T. et al. (1998) J. Immunol. 160:180-188; Carnec, X. et al. (2005) J. Virol. 79:1930-1938)。因此，CXCR4 可被用來作為病毒進入細胞之受體及抗 CXCR4 之抗體可被用來抑制該使用 CXCR4 作為受體之病毒進入細胞。因此，本發明之人抗 CXCR4 抗體可被用來抑制病毒進入細胞，其中該病毒利用 CXCR4 作為進入細胞之受體，以使病毒感染被抑制。在較佳之實施態樣中，該抗體在例如 HIV/AIDS 之治療或預防中被用來抑制 HIV 進入 T 細胞。該抗體可被單獨使用或與其他抗病毒劑一起使用，諸如抗反轉錄病毒藥物諸如 AZT 或蛋白酶抑制劑。

C. 發炎狀況

已顯示 CXCR4/SDF-1 路徑與多種發炎狀況有關，包括但不限於發炎性肝疾病(Terada, R. et al. (2003) Lab. Invest. 83:665-672)；自體免疫性關節發炎(Matthys, P. et al. (2001) J. Immunol. 167:4686-4692)；過敏性呼吸道疾病(Gonzalo, J. A. et al. (2000) J. Immunol. 165:499-508)；及牙周病(Hosokawa, Y. et al. (2005) Clin. Exp. Immunol. 141:467-474)。

因此，本發明之抑制 SDF-1 與 CXCR4 結合之人抗 CXCR4 抗體可被用來抑制發炎性疾病中之發炎，包括選自發炎性肝病、自體免疫性關節發炎、過敏性呼吸道疾病、牙周病、類風濕性關節炎、發炎性腸疾病、系統性紅斑性狼瘡、第一型糖尿病、發炎性皮膚疾病(例如乾癬、扁平苔蘚)、自體免疫性甲狀腺疾病、薛格連氏症候群、肺炎(例如慢性阻塞性肺病、肺結節病、淋巴細胞性肺炎)及發炎性腎疾病(例如 IgA 腎病變、腎小球腎炎)中之疾病。該抗體可被單獨使用或與其他抗發炎劑一起使用，諸如非固醇類抗發炎藥(NSAIDs)、皮質類固醇(例如潑尼松(prednisone)、氫化可地松(hydrocortisone)、甲胺喋呤(methotrexate)、COX-2 抑制劑、TNF 拮抗劑(例如依那西普(etanercept)、英利昔單抗(infliximab)、阿達木單抗(adalimumab))及免疫抑制劑(諸如 6-巯嘌呤(6-mercaptopurine)、硫唑嘌呤(azathioprine)及環孢靈 A(cyclosporine A)。

D. 血管新生

已經證實 SDF-1 透過吸引 CXCR4 表現之血管細胞(hemangiocytes)以誘導新血管形成(Jin, D.K. et al. (2006) Nat. Med. 12:557-567)。另外，阻斷 SDF-1/CXCR4 路徑可藉由 VEGF 非依賴性方式抑制血管新生以減輕活體內腫瘤生長(Guleng, B. et al. (2005) Cancer Res. 65:5864-5871)。另外，如實施例 2 中所示，本發明之抗體可抑制試

管內之毛細血管形成。因此，本發明之抑制 SDF-1 與 CXCR4 結合之抗 CXCR4 抗體可被用來藉由干擾 SDF-1/CXCR4 途徑以抑制血管新生。抑制血管新生可被用來例如抑制腫瘤生長或腫瘤轉移(無論該腫瘤是否為 CXCR4⁺)。該抗體可單獨使用或與其他抗血管新生劑一起使用，諸如抗 VEGF 抗體。

E. 自體幹細胞移植

週邊血液幹細胞係用於自體幹細胞移植(例如用於治療特定血液惡性疾病)之幹細胞的較佳來源。自週邊血液收集幹細胞需要令 CD34⁺幹細胞自骨髓移動至週邊血液。各種細胞激素、趨化因子及黏附分子曾被應用於調節此過程(於 Gazitt, Y. (2001) *J. Hematother. Stem Cell Res.* 10:229-236 中回顧)，包括 CXCR4 及 SDF-1 之交互作用。另外，已證實小分子 CXCR4 拮抗劑可刺激 CD34⁺幹細胞自骨髓快速移動至週邊(參見例如 Devine, S.M. et al. (2004) *J. Clin. Oncol.* 22:1095-1102; Broxmeyer, H.E. et al. (2005) *J. Exp. Med.* 201:1307-1318; Flomenberg, N. et al. (2005) *Blood* 106:1867-1874)。因此，本發明之抑制 CXCR4 活性之抗 CXCR4 抗體(意即拮抗抗體)可被用來刺激 CD34⁺幹細胞自骨髓移動至週邊血液以利該幹細胞於移植之用途(例如自體移植)，例如用於治療血液疾病，諸如多發性骨髓瘤及非何杰金氏淋巴瘤。該抗體可被單獨使用或與其它用於刺激幹細胞移動之劑質一起使用，諸如 G-

CSF 及/或 GM-CSF。因此，在另一實施態樣中，本發明提供一種刺激 $CD34^{+}$ 幹細胞自個體骨髓移動至週邊血液之方法，該方法包含投服本發明之抗 CXCR4 抗體予個體以刺激 $CD34^{+}$ 幹細胞自骨髓移動至週邊血液。該方法可進一步包含自週邊血液收集 $CD34^{+}$ 幹細胞，諸如用於自體幹細胞移植。

【圖式簡單說明】

圖 1A 顯示 F7 人單株抗體之重鏈變異區的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 33) 及胺基酸序列 (SEQ ID NO: 25)。描述 CDR1 (SEQ ID NO:1)、CDR2 (SEQ ID NO:5) 及 CDR3 (SEQ ID NO:9) 區，及指出 V、D 及 J 胚系來源。

圖 1B 顯示 F7 人單株抗體之輕鏈變異區的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 37) 及胺基酸序列 (SEQ ID NO: 29)。描述 CDR1 (SEQ ID NO:13)、CDR2 (SEQ ID NO:17) 及 CDR3 (SEQ ID NO:21) 區，及指出 V 及 J 胚系來源。

圖 2A 顯示 F9 人單株抗體之重鏈變異區的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 34) 及胺基酸序列 (SEQ ID NO: 26)。描述 CDR1 (SEQ ID NO:2)、CDR2 (SEQ ID NO:6) 及 CDR3 (SEQ ID NO:10) 區，及指出 V、D 及 J 胚系來源。

圖 2B 顯示 F9 人單株抗體之輕鏈變異區的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 38) 及胺基酸序列 (SEQ ID NO: 30)。描述 CDR1 (SEQ ID NO:14)、CDR2 (SEQ ID NO:18) 及 CDR3 (SEQ ID NO:22) 區，及指出 V 及 J 胚系來源。

圖 3A 顯示 D1 人單株抗體之重鏈變異區的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 35) 及胺基酸序列 (SEQ ID NO: 27)。描述 CDR1 (SEQ ID NO: 3)、CDR2 (SEQ ID NO: 7) 及 CDR3 (SEQ ID NO: 11) 區，及指出 V、D 及 J 胚系來源。

圖 3B 顯示 D1 人單株抗體之輕鏈變異區的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 39) 及胺基酸序列 (SEQ ID NO: 31)。描述 CDR1 (SEQ ID NO: 15)、CDR2 (SEQ ID NO: 19) 及 CDR3 (SEQ ID NO: 23) 區，及指出 V 及 J 胚系來源。

圖 4A 顯示 E2 人單株抗體之重鏈變異區的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 36) 及胺基酸序列 (SEQ ID NO: 28)。描述 CDR1 (SEQ ID NO: 4)、CDR2 (SEQ ID NO: 8) 及 CDR3 (SEQ ID NO: 12) 區，及指出 V、D 及 J 胚系來源。

圖 4B 顯示 E2 人單株抗體之輕鏈變異區的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 40) 及胺基酸序列 (SEQ ID NO: 32)。描述 CDR1 (SEQ ID NO: 16)、CDR2 (SEQ ID NO: 20) 及 CDR3 (SEQ ID NO: 24) 區，及指出 V 及 J 胚系來源。

圖 5A 顯示 F7 (SEQ ID NO: 25) 及 F7GL (SEQ ID NO: 41) 之重鏈變異區的胺基酸序列與人胚系 V_H 3-48 胺基酸序列 (SEQ ID NO: 49) 之比對 (JH6b 胚系揭示為 SEQ ID NO: 52)。

圖 5B 顯示 F7 (SEQ ID NO: 29) 及 F7GL (SEQ ID NO: 45) 之輕鏈變異區的胺基酸序列與人胚系 V_K L15 胺基酸序列 (SEQ ID NO: 50) 之比對 (JK1 胚系揭示為 SEQ ID NO: 53)。

圖 6A 顯示 F9 (SEQ ID NO: 26)及 F9GL (SEQ ID NO: 42)之重鏈變異區的胺基酸序列與人胚系 V_H 3-48 胺基酸序列 (SEQ ID NO:49)之比對(JH6b 胚系揭示為 SEQ ID NO: 52)。

圖 6B 顯示 F9 (SEQ ID NO: 30)及 F9GL (SEQ ID NO: 46)之輕鏈變異區的胺基酸序列與人胚系 V_K L15 胺基酸序列 (SEQ ID NO:50)之比對(JK1 胚系揭示為 SEQ ID NO: 53)。

圖 7A 顯示 D1 (SEQ ID NO: 27)及 D1GL (SEQ ID NO: 43)之重鏈變異區的胺基酸序列與人胚系 V_H 3-48 胺基酸序列 (SEQ ID NO:49)之比對(JH6b 胚系揭示為 SEQ ID NO: 52)。

圖 7B 顯示 D1 (SEQ ID NO: 31)及 D1GL (SEQ ID NO: 47)之輕鏈變異區的胺基酸序列與人胚系 V_K L15 胺基酸序列 (SEQ ID NO:50)之比對(JK1 胚系揭示為 SEQ ID NO: 53)。

圖 8A 顯示 E2 (SEQ ID NO: 28)及 E2GL (SEQ ID NO: 44)之重鏈變異區的胺基酸序列與人胚系 V_H 3-48 胺基酸序列 (SEQ ID NO:49)之比對(JH6b 胚系揭示為 SEQ ID NO: 52)。

圖 8B 顯示 E2 (SEQ ID NO: 32)及 E2GL (SEQ ID NO: 48)之輕鏈變異區的胺基酸序列與人胚系 V_K L15 胺基酸序列 (SEQ ID NO:50)之比對(JK1 胚系揭示為 SEQ ID NO: 53)。

圖 9 顯示抗 CXCR4 人抗體 F7、F9、D1 及 E2 與在細胞表面上表現天然人 CXCR4 之 CEM 細胞結合。

圖 10 顯示 FITC 標示之抗 CXCR4 抗體 F9 及未標示之抗 CXCR4 人抗體組之間與 CEM 細胞結合的抗體競爭。

圖 11 顯示抗 CXCR4 人抗體 F7、F9 及 D1 抑制 ^{125}I 標示之 SDF-1 與 CEM 細胞結合。

圖 12 顯示抗 CXCR4 人抗體 F7、F9 及 D1 抑制 SDF-1 於 CEM 細胞中所誘發之鈣離子流動。

圖 13 顯示抗 CXCR4 人抗體 F7 及 F9 抑制 SDF-1 所誘發之 CEM 細胞移動。

圖 14 顯示抗 CXCR4 人抗體 F7、F9 及 E2 抑制雷蒙氏(Ramos)腫瘤細胞於活體外之增生。

圖 15A-C 顯示抗 CXCR4 人抗體 F7 及 F9 於皮下腫瘤模式中抑制雷蒙氏(Ramos)腫瘤細胞於活體內之增生。圖 15A 顯示平均腫瘤體積生長曲線；圖 15B 顯示中位腫瘤體積生長曲線；圖 15C 顯示中位%體重變化。

圖 16 顯示在雷蒙氏全身性腫瘤細胞模式中以抗 CXCR4 人抗體 F9 治療之鼠的存活%。

【實施方式】

本發明進一步以下列實施例說明，其不應被視為額外限制。所有圖表及本申請案所引述之所有參考文獻、專利及公開專利申請書之內容以參照方式明白納入此處。

實施例 1：生產抗 CXCR4 之人單株抗體

抗 CXCR4 人單株抗體係利用組合方式生產，其中首先免疫表現人抗體基因之鼠以在鼠體內建立對人 CXCR4 具專一性之人免疫球蛋白庫，其次自該鼠之脾臟細胞製備人抗體庫並於噬菌體上展示，以便之後篩選表現具 CXCR4 專一性之抗體的噬菌體。此組合方式大致描述於 Buechler 等人之美國專利申請案 20030091995 號中。

抗原

R1610 細胞(中國倉鼠肺細胞系，原始描述於 Thirion, J.P. et al. (1976) Genetics 83:137-147)經編碼全長人 CXCR4 蛋白質之表現載體轉染，以使該蛋白質於該細胞表面上表現。密碼子最佳化形式之 CXCR4 cDNA 被使用於該表現載體中，其係如 Mirzabekov, T. et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:28745-28750 中所述製備。為提高細胞之免疫原性，該細胞藉由與三硝基苯磺酸(TNBS)之水溶液(商業可購得之 5% 溶液(Sigma, Cat. #P2297))培養以包覆三硝基苯酚(TNP)。更具體地說， 1×10^8 細胞以無菌 PBS 清洗一次，於室溫暗室中與 50 微升商用 5% TNBS 溶液培養 1 小時及之後以 PBS 清洗三次。該所形成之 TNP-包覆之 CXCR4 表現 R1610 細胞被當作免疫之抗原使用。最終免疫原係 100 微升經 TNP-包覆、清洗之細胞(1×10^7 細胞)加上 100 微升 Ribi 佐劑之混合物。鼠在一段時間內接

受 6 次免疫原免疫。

轉基因轉染色體之 KM Mouse[®] 品系

抗 CXCR4 之全長人單株抗體係由初步免疫 KM 品系之轉基因轉染色體鼠以製備，該鼠表現人抗體基因。在此鼠品系中，該內源性鼠 kappa 輕鏈基因已如 Chen et al. (1993) EMBO J. 12:811-820 中所述經同源性中斷及該內源性鼠重鏈基因已如 PCT 公開號 WO 01/09187 之實施例 1 中所述經同源性中斷。此外，此鼠品系帶有人 kappa 輕鏈轉基因 KCo5 (如 Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851 中所述)及亦包含攜帶人 Ig 重鏈基因座(如 PCT 公開號 WO 02/43478 中所述)之 SC20 轉染色體。在美國專利申請案號 20020199213 中亦詳細描述 KM 鼠。

KM 免疫

爲了培養抗 CXCR4 之全長人單株抗體，KM Mouse[®] 品系之鼠以經轉染以表現 CXCR4 及包覆 TNP(如上抗原部分所述)之 R1610 細胞免疫。在攜帶人抗體基因之鼠品系中培養人抗體的總體免疫計畫係描述於 Lonberg, N. et al (1994) Nature 368(6474):856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851 及 PCT 公開號 WO 98/24884 中。該鼠在第一次注射抗原時爲 6-16 週齡。

KM 鼠以含 Ribi 佐劑之抗原經腹腔(IP)、皮下(Sc)或經足墊(FP)免疫，之後以含 Ribi 佐劑之抗原每 3-21 天經 IP、Sc 或 FP 再次免疫(共免疫 6 次)。免疫反應係藉眼後採血監測。血漿係由 CXCR4 表現 R1610 細胞之 FACS 染色篩選(與未經轉染之親代 R1610 細胞比較)。具有足夠力價之抗 CXCR4 人免疫球蛋白之鼠被用來收集脾臟。

製備噬菌體展示庫及篩選抗 CXCR4 抗體

自如上述之免疫鼠收集的脾臟被用來製作表現人抗體重鏈及輕鏈之噬菌體展示庫。具體地說，自脾臟分離總 RNA、自該 RNA 製備 cDNA 及人抗體變異區 cDNA 係利用 PCR 特異性擴增，實際上如 Buechler 等人之美國專利申請號 20030091995 中所述。該人抗體變異區庫經轉殖至噬菌體表現載體中，實際上同樣如 Buechler 等人之美國專利申請號 20030091995 中所述。該噬菌體展示庫藉由與融入磁性蛋白脂質體之人 CXCR4 (CXCR4-MPL)反應以篩選具 CXCR4 親和性之噬菌體庫成員。表現 CXCR4 或其他 7 次跨膜(7TM)受體(例如 CCR5)以維持 7TM 受體天然構型之 MPLs 已於先前被描述(參見例如 Mirzabekov, T. et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18:649-654; Babcock, G.J. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:38433-38440; PCT 公開號 WO 01/49265; 美國專利申請號 20010034432)。簡單地說，使用清潔劑 CHAPSO 自經轉染之 CXCR4 表現細胞系中溶解包含抗原決定位標籤之重組人 CXCR4 及該蛋白質

係經該抗原決定位標籤被捕捉到磁珠上。在移除清潔劑時重組脂質膜，以使 CXCR4 之天然膜構型得以維持，以產生 CXCR4-MPLs。令噬菌體展示庫以 CXCR4-MPLs 篩選三次導致 CXCR4-結合劑相較於背景增加 30 倍。所欲之變異區片段經選殖至 Fab 表現載體及重新測試該 Fab 對經轉染之 CXCR4 表現細胞之抗原結合性。接著使用標準分子生物學技術自該 Fabs 生產全長抗體。

選擇 Fab 克隆 F7、F9、D1 及 E2 以供進一步分析。

實施例 2：人抗 CXCR4 單株抗體 F7、F9、D1 及 E2 之結構特徵

使用標準 DNA 定序技術以定序編碼 F7、F9、D1 及 E2 Fab 克隆(得自如實施例 1 中所述之噬菌體展示庫篩選)之重鏈及輕鏈變異區的 cDNA 序列。

F7 之重鏈變異區的核苷酸及胺基酸序列顯示於圖 1A 及分別於 SEQ ID NO:33 及 25 中。

F7 之輕鏈變異區的核苷酸及胺基酸序列顯示於圖 1B 及分別於 SEQ ID NO:37 及 29 中。

比較 F7 重鏈免疫球蛋白序列與已知之人胚系免疫球蛋白重鏈序列證實 F7 重鏈使用來自人胚系 V_H 3-48 之 V_H 片段、來自人胚系 4-23 之 D 片段、及來自人胚系 JH 6B 之 JH 片段。利用 Kabat 系統之 CDR 區分析進一步分析 F7 V_H 序列得知重鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 區之描述係如圖 1A 及分別如 SEQ ID NO:1、5 及 9 中所示。

比較 F7 輕鏈免疫球蛋白序列與已知之人胚系免疫球蛋白輕鏈序列證實 F7 輕鏈使用來自人胚系 V_K L15 之 V_L 片段及來自人胚系 JK 1 之 JK 片段。利用 Kabat 系統之 CDR 區分析進一步分析 F7 V_L 序列得知輕鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 區之描述係如圖 1B 及分別如 SEQ ID NO:13、17 及 21 中所示。

F9 之重鏈變異區的核苷酸及胺基酸序列顯示於圖 2A 及分別於 SEQ ID NO:34 及 26 中。

F9 之輕鏈變異區的核苷酸及胺基酸序列顯示於圖 2B 及分別於 SEQ ID NO:38 及 30 中。

比較 F9 重鏈免疫球蛋白序列與已知之人胚系免疫球蛋白重鏈序列證實 F9 重鏈使用來自人胚系 V_H 3-48 之 V_H 片段、來自人胚系 4-23 之 D 片段、及來自人胚系 JH 6B 之 JH 片段。利用 Kabat 系統之 CDR 區分析進一步分析 F9 V_H 序列得知重鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 區之描述係如圖 2A 及分別如 SEQ ID NO:2、6 及 10 中所示。

比較 F9 輕鏈免疫球蛋白序列與已知之人胚系免疫球蛋白輕鏈序列證實 F9 輕鏈使用來自人胚系 V_K L15 之 V_L 片段及來自人胚系 JK 1 之 JK 片段。利用 Kabat 系統之 CDR 區分析進一步分析 F9 V_L 序列得知輕鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 區之描述係如圖 2B 及分別如 SEQ ID NO:14、18 及 22 中所示。

D1 之重鏈變異區的核苷酸及胺基酸序列顯示於圖 3A 及分別於 SEQ ID NO:35 及 27 中。

D1 之輕鏈變異區的核苷酸及胺基酸序列顯示於圖 3B 及分別於 SEQ ID NO:39 及 31 中。

比較 D1 重鏈免疫球蛋白序列與已知之人胚系免疫球蛋白重鏈序列證實 D1 重鏈使用來自人胚系 V_H 3-48 之 V_H 片段、來自人胚系 4-23 之 D 片段、及來自人胚系 JH 6B 之 JH 片段。利用 Kabat 系統之 CDR 區分析進一步分析 D1 V_H 序列得知重鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 區之描述係如圖 3A 及分別如 SEQ ID NO:3、7 及 11 中所示。

比較 D1 輕鏈免疫球蛋白序列與已知之人胚系免疫球蛋白輕鏈序列證實 D1 輕鏈使用來自人胚系 V_K L15 之 V_L 片段及來自人胚系 JK 1 之 JK 片段。利用 Kabat 系統之 CDR 區分析進一步分析 D1 V_L 序列得知輕鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 區之描述係如圖 3B 及分別如 SEQ ID NO:15、19 及 23 中所示。

E2 之重鏈變異區的核苷酸及胺基酸序列顯示於圖 4A 及分別於 SEQ ID NO:36 及 28 中。

E2 之輕鏈變異區的核苷酸及胺基酸序列顯示於圖 4B 及分別於 SEQ ID NO:40 及 32 中。

比較 E2 重鏈免疫球蛋白序列與已知之人胚系免疫球蛋白重鏈序列證實 E2 重鏈使用來自人胚系 V_H 3-48 之 V_H 片段、來自人胚系 4-23 之 D 片段、及來自人胚系 JH 6B 之 JH 片段。利用 Kabat 系統之 CDR 區分析進一步分析 E2 V_H 序列得知重鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 區之描述係如圖 4A 及分別如 SEQ ID NO:4、8 及 12 中所示。

比較 E2 輕鏈免疫球蛋白序列與已知之人胚系免疫球蛋白輕鏈序列證實 E2 輕鏈使用來自人胚系 V_K L15 之 V_L 片段及來自人胚系 JK 1 之 JK 片段。利用 Kabat 系統之 CDR 區分析進一步分析 E2 V_L 序列得知輕鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 區之描述係如圖 4B 及分別如 SEQ ID NO:16、20 及 24 中所示。

令 F7、F9、D1 及 E2 之 V_H 及 V_L 區的骨架序列分析與它們所衍生自之胚系序列比較，找出各種異於胚系之骨架胺基酸殘基。在 V_H 及 V_L 片段之 N 端區域中的特定骨架殘基被選擇用於「反突變」以恢復骨架殘基成為胚系序列，因為這些 N 端部分之非胚系殘基係由用來產生實施例 1 中所描述之噬菌體展示庫的引子所編碼。具體來說，下列 F7、F9、D1 及 E2 之 V_H 及 V_L 片段的修飾形式(稱為「GL」形式，指胚系)係利用標準分子生物技術產生以取代所示之骨架位置的胚系胺基酸殘基：

F7GL V_H : Q1E, Q6E

F7GL V_K : A1D, R3Q

F9GL V_H : Q1E, Q6E

F9GL V_K : E1D, V3Q, L4M

D1GL V_H : Q6E

D1GL V_K : V1D, W3Q, V4M

E2GL V_H : Q6E

E2GL V_K : E1D, V3Q, L4M

圖 5A 顯示 F7 (SEQ ID NO: 25)及 F7GL (SEQ ID NO:

41)重鏈可變異胺基酸序列與胚系 V_H 3-48 編碼胺基酸序列(SEQ ID NO:49)之比對。該 CDR1、CDR2 及 CDR3 區係經描述。

圖 5B 顯示 F7 (SEQ ID NO: 29)及 F7GL (SEQ ID NO: 45)輕鏈可變異胺基酸序列與胚系 V_K L15 編碼胺基酸序列(SEQ ID NO:50)之比對。該 CDR1、CDR2 及 CDR3 區係經描述。

圖 6A 顯示 F9 (SEQ ID NO: 26)及 F9GL (SEQ ID NO: 42)重鏈可變異胺基酸序列與胚系 V_H 3-48 編碼胺基酸序列(SEQ ID NO:49)之比對。該 CDR1、CDR2 及 CDR3 區係經描述。

圖 6B 顯示 F9 (SEQ ID NO: 30)及 F9GL (SEQ ID NO: 46)輕鏈可變異胺基酸序列與胚系 V_K L15 編碼胺基酸序列(SEQ ID NO:50)之比對。該 CDR1、CDR2 及 CDR3 區係經描述。

圖 7A 顯示 D1 (SEQ ID NO: 27)及 D1GL (SEQ ID NO: 43)重鏈可變異胺基酸序列與胚系 V_H 3-48 編碼胺基酸序列(SEQ ID NO:49)之比對。該 CDR1、CDR2 及 CDR3 區係經描述。

圖 7B 顯示 D1 (SEQ ID NO: 31)及 D1GL (SEQ ID NO: 47)輕鏈可變異胺基酸序列與胚系 V_K L15 編碼胺基酸序列(SEQ ID NO:50)之比對。該 CDR1、CDR2 及 CDR3 區係經描述。

圖 8A 顯示 E2 (SEQ ID NO: 28)及 E2GL (SEQ ID

NO: 44)重鏈可變異胺基酸序列與胚系 V_H 3-48 編碼胺基酸序列(SEQ ID NO:49)之比對。該 CDR1、CDR2 及 CDR3 區係經描述。

圖 8B 顯示 E2 (SEQ ID NO: 32)及 E2GL (SEQ ID NO: 48)輕鏈可變異胺基酸序列與胚系 V_K L15 編碼胺基酸序列(SEQ ID NO:50)之比對。該 CDR1、CDR2 及 CDR3 區係經描述。

F7、F9、D1 及 E2 之 Fab 片段係利用標準重組 DNA 技術轉換成全長抗體。舉例來說，編碼 Fab 片段之一的 V_H 及 V_K 區之 DNA 可被選殖至帶有重鏈及輕鏈固定區之表現載體以使該變異區與固定區操作性連接。或者，不同之載體可被用於表現全長重鏈及全長輕鏈。適用於產生全長抗體之表現載體的非限制性實例包括 Black 之美國專利申請號 20050153394 中所描述之 pIE 載體。

實施例 3：抗 CXCR4 人單株抗體之結合特徵

在此實施例中，抗 CXCR4 抗體之結合特徵係以流式細胞術檢查。

在其細胞表面上表現天然人 CXCR4 之人 T 細胞系 CEM 被用來檢測 F7、F9、D1 及 E2 抗體與天然、細胞表面 CXCR4 結合之能力。全長 F7、F9、D1 及 E2 係以 1:3 連續稀釋倍數稀釋，導致自 300 nM 至 5 pM 之濃度。該抗體接著與 CEM 細胞混合及使之在以 FITC 偶聯之抗人 IgG 二次抗體偵測之前得以結合。該細胞接著利

用螢光細胞術分析。所導致之平均螢光強度係於圖 9 中之圖所示，其證實所有 4 種抗 CXCR4 抗體均與 CEM 細胞結合。與 F7、F9、D1 及 E2 結合之 EC_{50} 值分別為 21 nM、14 nM、80 nM 及 290 nM。

爲了決定抗 CXCR4 抗體群競爭與 CXCR4 結合之能力，進行競爭試驗。使用 4 種人抗 CXCR4 抗體 F9、F7、E2 及 D1 與 4 種商業可得之鼠單株抗 CXCR4 抗體 (12G5、708、716 及 717；R&D Systems 目錄標號分別爲 MAB170、MAB171、MAB172 及 MAB173)。該抗 CXCR4 抗體係以 1:3 連續稀釋倍數稀釋，導致在含有固定濃度之 FITC 標記抗 CXCR4 抗體 F9 的情況下自 300 nM 至 5 pM 之濃度。該抗體混合物接著被加入 CEM 細胞中及使之得以結合。各抗體與 F9 競爭與 CEM 細胞結合之能力係由螢光細胞術及 FITC 偵測分析。所導致之平均螢光強度係於圖 10 中之圖所示，其證實所有 7 種受測抗體(F7、E2、D1、12G5、708、716 及 717)均可與 F9 競爭與 CEM 細胞之結合，雖然 E2 抗體相較於其他抗體僅於高濃度下顯示部分抑制。

在另一組試驗中，F7 單株抗體與多種不同細胞系結合之能力係由進行 FACS 稀釋之流式細胞術檢測。增量之單株抗體(自低於 0.001 微克/毫升至高於 100 微克/毫升)係與 100,000 個細胞培養及以流式細胞術測定結合。亦決定 B_{max} 值，其顯示大約有多少 CXCR4 分子存在於每個細胞上。根據該結合曲線決定抗體結合之 EC_{50} 值，

其結果摘列於下表 1：

表 1：單株抗體 F7 與不同細胞系結合之 FACS 稀釋結果

細胞類型	EC ₅₀ 值(微克/毫升)	Bmax
Ramos	0.48	106,000
Raji	0.34	52,536
Namalwa	1.57	116,000
L540	3.69	31,868
DMS79	3.99	24,587
MDA-MB-231	9.24	14,186

Bmax=最高結合力(GMFI 單位)

結果顯示 F7 單株抗體可與 6 種受測之各種細胞系有效結合，所觀察到之最低 EC₅₀ 值出現在 Ramos 與 Raji 細胞系。這些資料同時顯示 Ramos 與 Namalwa 細胞之 CXCR4 受體表現最高及 MDA-MB-231 細胞與 DMS79 細胞最低。

在其他結合試驗中，F7 單株抗體與不同亞群之人周邊血液單核細胞(PBMCs)結合之能力受到檢測。人 PBMCs 係以標準方法分離及不同的細胞亞群係以 FACS 分離。具體地說，下列細胞亞群被分離：(i) CD3⁺，(ii) CD20⁺；(iii) CD11b⁺ 及(iv) CD14⁺。以 F7 單株抗體(33 微克/毫升)進行之流式細胞試驗顯示 F7 單株抗體相較於同型符合對照抗體可與 4 種亞群中之各種有效結合。

實施例 4：抗 CXCR4 抗體抑制 SDF-1 與 CXCR4 結

合

爲了決定抗 CXCR4 人抗體抑制 SDF-1 與 CXCR4 結合之能力，使用以碘 125 -標記之 SDF-1 與天然表現 CXCR4 之 CEM 細胞進行競爭試驗。抗 CXCR4 抗體對於阻斷 SDF-1 與 CEM 細胞結合之比較係利用標準放射線標記配體結合試驗進行。該抗 CXCR4 抗體係以 1:3 連續稀釋以產生自 300 nM 至 137 pM 之濃度範圍。該抗體在含有具 2000 Ci/mmole 特定活性之 100 pM 碘 125 -SDF-1 的情況下 (Amersham, 目錄編號 IM314-25UCI) 被加入 100 微升之 750,000 個 CEM 細胞中。屬於相同同型之不相關抗體被用來作爲陰性對照。可能結合之放射線標記配體總量係藉由允許碘 125 -SDF-1 在不含抗體之情況下於 4°C 下與 CEM 細胞結合 2 小時以決定。放射線標記配體之非專一性結合係由允許碘 125 -SDF-1 在含有 1 μ M 未經標記之 SDF-1 (Peprotech, 目錄編號 300-28A) 之情況下結合以決定。細胞相關之碘 125 -SDF-1 之量係由標準方法決定。該結果顯示於圖 11，其證實 F7 抗體提供最有效地阻斷 SDF-1 與表現在 CEM 細胞上之 CXCR4 結合。F9 及 D1 抗體亦阻斷 SDF-1 結合，雖然相較於 F7 較爲溫和。E2 抗體雖然確實與 CEM 細胞上之 CXCR4 結合 (如實施例 3 中所示)，其無法有效地阻斷 SDF-1 與 CEM 細胞上之 CXCR4 結合。F7、F9 及 D1 抑制 SDF-1 之 EC_{50} 值分別爲 2.3 nM、12.5 nM 及 28.6 nM。

實施例 5：抗 CXCR4 抗體抑制經 SDF-1 誘發之鈣離子流動

爲了決定抗 CXCR4 人抗體於 CEM 細胞中抑制經 SDF-1 誘發之鈣離子流動的能力，CEM 細胞首先以螢光染料 Calcium 3 (Molecular Devices)標記。該抗 CXCR4 抗體係以 1:3 連續稀釋倍數稀釋導致自 100 nM 至 1 pM 之濃度範圍，及允許其與 200 微升中之 200,000 個 CEM 細胞結合，及在被加入 Flexstation 機器(Molecular Devices)之前於室溫下培養 10 分鐘。使用相同同型之不相關抗體作爲陰性對照。細胞接著以終濃度 50 nM 之重組人 SDF-1 α (Peprotech)刺激，加入 500 nM 體積 22 微升以使終體積爲 222 微升。測量每個孔槽中所導致之鈣離子流動 200 秒。作爲陽性對照時，細胞在無抗體存在時係以 SDF-1 α (配製於含 0.1% BSA 或 HBS 之漢克氏緩衝鹽水(HBS)中)刺激以達到最大可能之鈣離子流動信號。爲了決定基礎值，細胞以含 0.1% BSA 之 HBS 刺激。經 SDF-1 α 刺激之鈣離子釋放係由一段時間內鈣依賴性螢光呈色測量。所形成之螢光曲線的曲線下面積被稱爲鈣離子流動之指標。由抗 CXCR4 抗體所導致之抑制鈣離子流動顯示於圖 12。資料作成圖表，及利用 GraphPad Prism 軟體及非線性曲線擬合、S 型劑量反應方程計算 EC₅₀ 值。抗體 F7、F9 及 D1 抑制經 SDF-1 α 誘發之鈣離子流動。抗體 E2 雖然確實與 CXCR4 結合(如實施例 3 中所示)，其無法顯著抑制經 SDF-1 α 誘發之鈣離子流動。F7、F9 及 D1 抑制經 SDF-1

誘發之鈣離子流動的 EC_{50} 值分別為 0.90 nM、0.32 nM 及 0.57 nM。

實施例 6：抗 CXCR4 抗體抑制 CEM 細胞經 SDF-1 誘發之移動

爲了決定抗 CXCR4 人抗體抑制 CEM 細胞經 SDF-1 誘發之移動的能力，CEM 細胞首先以 BATDA 試劑 (Perkin Elmer) 標記。該抗 CXCR4 抗體係以 1:3 連續稀釋倍數稀釋導致自 100 nM 至 1 pM 之濃度範圍，及允許其與密度爲每毫升 1 千萬個細胞之經標記之 CEM 細胞結合。使用相同同型之不相關抗體作爲陰性對照。在 96 槽 Neuroprobe 移動盤之下層腔室加入每個孔槽 30 微升之 5nM 重組人 SDF-1 α (Peprotech)，每個孔槽具有 5.7 毫米直徑之過濾膜。每個孔槽包含 5 μ M 之孔洞。含抗體及不含抗體之標記 CEM 細胞以 50 微升之體積被加在濾膜上，其濃度爲每個孔槽 50 萬個細胞。該移動盤於 37°C 下培養 2.5 小時。移動之細胞被捕捉於該盤下層腔室中，經溶解及以 Europium 偵測溶液 (Perkin Elmer) 偵測。化學冷光信號於融合儀上紀錄。由抗 CXCR4 抗體所導致之抑制經 SDF-1 α 誘發之移動係顯示於圖 13。該結果證實抗體 F7 及 F9 有效地抑制移動，然而抗體 D1 及 E2 無法顯著地抑制移動。由 F7 及 F9 抑制 CEM 細胞經 SDF-1 誘發之移動的 EC_{50} 值分別爲 12.44 nM 及 18.99 nM。

實施例 7：抗 CXCR4 抗體抑制 HuVEC 之毛細血管形成

在此實施例中，抗 CXCR4 人抗體抑制人臍靜脈內皮細胞 (HuVEC) 之毛細血管形成的能力係經檢測。Matrigel 膠經 RPMI 1:1 稀釋及注入 96 孔盤之孔槽中，讓其於 37°C 下聚合 30 分鐘。長滿 80% 之 HuVEC (來自 Cambrex, 目錄編號 CC-2519) 經胰酶消化及以每毫升 1×10^6 細胞重懸浮於含 0.5% FBS 之 RPMI 中。抗體與 HuVEC 均勻混合至終濃度 3 微克/毫升及使其於室溫下培養 30 分鐘。使用相同同型之不相關抗體或單獨使用培養基作為陰性對照。至於抑制血管形成之陽性對照，則使用鼠抗人 $\alpha v \beta 3$ (CD51/CD61) 抗體 (R&D Systems, 目錄編號 MAB3050)。含或不含抗體之 HuVEC 被加入覆有 matrigel 之孔槽中及於 37°C 下培養 18 小時。

與培養基單獨培養或與同型相符之對照抗體一起培養之 HuVEC 形成毛細血管，導致盤中分布以每個細胞 3-5 個連接或分支點之相連細胞外觀。與抗 CXCR4 人抗體或抗 $\alpha v \beta 3$ 抗體一起培養之 HuVEC 不形成毛細血管。該細胞顯得分離及不含分支點。最有效地阻斷 SDF-1 結合、經 SDF-1 誘發之鈣離子流動及經 SDF-1 誘發之移動的抗 CXCR4 抗體 (也就是 F7 及 F9) 也可最有效地抑制毛細血管形成。與 CXCR4 結合但不阻斷 SDF-1 結合或經 SDF-1 誘發效應之抗 CXCR4 抗體 E2 不抑制毛細血管形成。

實施例 8：抗 CXCR4 抗體抑制活體外腫瘤細胞增生

在此實施例中，抗 CXCR4 人抗體於活體外抑制 Ramos 腫瘤細胞(人伯基特氏(Burkitt's)淋巴瘤細胞系)增生之能力係經檢測。在此試驗中， 1×10^4 細胞/槽與增加劑量(10^{-3} 至 300 nM)之 F7 IgG4 抗體、F9 IgG1 抗體、E2 IgG1 抗體、F9 Fab' 抗體或同型對照一起培養。這些細胞與抗體一起培養 72 小時，並在培養的最後 24 小時加入 ^3H -胸腺嘧啶以監測細胞增生。經培養後，由細胞攝入之 ^3H -胸腺嘧啶係以標準技術測量。結果顯示於圖 14 之圖表中。該結果顯示 F7 IgG4、F9 IgG1 及 E2 IgG1 各個抗體均可抑制 Ramos 細胞增生，由當與這些抗體一起培養時 ^3H -胸腺嘧啶攝入下降可見，然而 F9 Fab' 片段不抑制細胞增生。這些結果顯示抗 CXCR4 人抗體具有活體外直接抗腫瘤細胞增生之效果，因此不需要二次交叉連接以達到抗增生效果。

實施例 9：抗 CXCR4 抗體抑制活體內實體腫瘤細胞增生

在此實施例中，抗 CXCR4 人抗體於活體內抑制已建立之實體腫瘤增生之能力係使用 Ramos 皮下腫瘤細胞模型檢測。在此試驗中， 10×10^6 Ramos 細胞/鼠被植入各鼠之腹脅區域及允許生長至 40 mm^3 之平均大小(以腫瘤之長 $\times$ 寬 $\times$ 高/2 計算)。該鼠接著接受腹腔(i.p.)注射第一劑抗體(選定為治療的第 0 天)及於第 7 天接受第二劑 i.p. 抗體。

接受 Fab' 片段抗體治療之鼠亦於第 3 及 10 天接受 i.p. 抗體注射。鼠之組別 (n=8) 係以 (i) 載劑；(ii) 同型對照 (15 毫克/公斤)；(iii) F7 IgG4 (15 毫克/公斤)；(iv) F9 IgG1 (15 毫克/公斤)；(v) F9 Fab' (10 毫克/公斤)；或 (vi) 抗 CD20 陽性對照 (15 毫克/公斤) 治療。在第 0 天及第 30 天之間於投藥後之規律間隔 (約 2-3 次/週) 測量腫瘤體積及鼠體重。試驗結果顯示於圖 15A、15B 及 15C 中，其顯示平均腫瘤體積 (圖 15A)、中位腫瘤體積 (圖 15B) 及體重變化中位 % (圖 15C)。該結果顯示如同陽性對照組，F7 IgG4 及 F9 IgG1 抗體顯著抑制以腫瘤體積增加測量之腫瘤細胞生長，然而 F9 Fab' 片段相較於同型對照組不抑制腫瘤細胞生長。所有治療均耐受良好，如無顯著體重改變所示。治療組間之體重差異最有可能是因為腫瘤重量所致。該結果顯示抗 CXCR4 人抗體可抑制活體內已建立之實體腫瘤生長。

實施例 10：抗 CXCR4 抗體治療於鼠全身性腫瘤細胞模型中延長存活時間

在此實施例中，抗 CXCR4 人抗體增加鼠存活時間之能力係利用 Ramos 全身性腫瘤細胞模型檢測。在此試驗中， 1×10^6 Ramos 細胞/鼠於第 0 天經靜脈 (i.v.) 注射至各鼠體內。該鼠接著於第 1 天 (也就是靜脈投予腫瘤細胞之後一天) 接受腹腔 (i.p.) 注射第一劑抗體及於第 5、8、15 及 22 天接受另外四劑 i.p. 抗體 (以陽性對照抗體治療之鼠僅

於第一天接受治療)。鼠之組別(n=8)係以(i) 載劑；(ii) 同型對照(15 毫克/公斤)；(iii) F9 IgG1 (15 毫克/公斤)；或(iv) 抗 CD19 陽性對照(15 毫克/公斤)治療。存活百分率係於第 0 天至第 50 天之間於投藥後以規律間隔(約 2-3 次/週)測量(後腿麻痺被用來當作該試驗之終點)。試驗結果顯示於圖 16 中，其顯示一段時間內之存活百分率。以載劑或同型對照治療之鼠的中位存活天數分別為 23 及 25.5 天，然而以單一劑之抗 CD19 陽性對照治療之鼠的中位存活天數為 39 天。具顯著意義的是，以 5 劑 F9 IgG1 抗體治療之組別中 100%的鼠存活至試驗終點。這些結果顯示抗 CXCR4 人抗體可於全身性腫瘤細胞模型中增加鼠之存活時間。

實施例 11：抗 CXCR4 單株抗體 F7 所誘發之細胞凋亡

在此實施例中，抗 CXCR4 單株抗體 F7 誘發不同細胞之細胞凋亡的能力係經檢測。在此細胞凋亡試驗中，10 微克/毫升之 F7 單株抗體係與 Ramos 細胞(500,000 細胞)、Namalwa 細胞(500,000 細胞)或經轉染以表現 CXCR4 之 R1610 細胞(100,000 細胞)一起培養。未經轉染之 R1610 細胞被用來做為陰性對照。抗 CXCR4 單株抗體 F7 或同型對照抗體於 37°C 下與細胞一起培養及在 24、48 及 72 小時取出 250 微升之檢體。要檢測細胞凋亡，來自不同時間點之細胞與經螢光標記之膜聯蛋白 V

(Annexin V-FITC) (第一螢光(FL1))及碘化丙啉(Propidium Iodide) (第三螢光(FL3))一起培養，然後進行流式細胞分析。在 FL1、FL3 及 FL1-FL3 雙陽性象限所收集到之細胞的組合百分比被認為是細胞凋亡。要除去背景，自 F7 單株抗體所誘發之細胞凋亡細胞百分比減去同型抗體所誘發之細胞凋亡細胞百分比。

結果摘列於下表 2：

表 2：抗 CXCR4 單株抗體 F7 誘發之細胞凋亡

細胞	時間(小時)	細胞凋亡%
R1610	72	<1
R1610-CXCR4	24	39
R1610-CXCR4	48	58
R1610-CXCR4	72	46
Ramos	24	22
Ramos	48	31
Ramos	72	22
Namalwa	24	17
Namalwa	48	24
Namalwa	72	44

細胞凋亡總百分比值經同型對照抗體所誘發之基底變化校正。

結果證實 F7 單株抗體可於 Ramos、Namalwa 及 R1610-CXCR4 細胞中誘發細胞凋亡，但 F7 不具誘發親代 R1610 細胞細胞凋亡之作用表示該反應為 CXCR4 專一性。

實施例 12：顯示抑制實體腫瘤細胞增生之其他試驗
活體內之抗 CXCR4 細胞

在此實施例中，抗 CXCR4 人抗體於活體內抑制已建立之實體腫瘤增生或誘發細胞凋亡之能力係利用類似實施例 9 中所描述之 Ramos 模型的其他腫瘤細胞模型檢測。檢測多種腫瘤細胞系。代表性之試驗及結果如下。

在一試驗中， 7.5×10^6 個 MDA-MB231 人乳癌細胞/鼠被植入每隻鼠的腹脅區域及允許生長至 100 mm^3 之平均大小(以腫瘤之長 $\times$ 寬 $\times$ 高/2 計算)，其為植入後第 7 天。鼠被隨機分配至不同治療組及於植入後第 7 天接受腹腔(i.p.)注射第一劑抗體、於植入後第 14 天接受第二劑 i.p.抗體及接著於植入後第 46 天接受第三劑。鼠之組別(n=9)係以(i)載劑(PBS)；(ii) IgG1 同型對照(15 毫克/公斤)；(iii) IgG4 同型對照(15 毫克/公斤)；(iv) F7 IgG1 (15 毫克/公斤)；或(v) F7 IgG4 (15 毫克/公斤)治療。在規律間隔測量腫瘤體積及每次間隔測量各治療組之平均及中位腫瘤體積。此試驗之結果摘列於下表 3，其顯示植入後第 52 天之平均腫瘤體積(mm^3)及腫瘤生長抑制% (TGI)，及第 59 天之中位腫瘤體積(mm^3)及% TGI：

表 3：單株抗體 F7 於活體內抑制 MDA-MB231 細胞
之腫瘤生長

治療	第 52 天		第 59 天	
	平均	TGI (%)	中位	TGI (%)
載劑	154		187	
IgG1 同型對照	172		216	
IgG4 同型對照	188		226	
F7 抗 CXCR4 IgG1	86	50	130	40
F7 抗 CXCR4 IgG4	79	58	108	52

此外，F7 IgG4 治療組中的一隻鼠在第 59 天無腫瘤。結果證實 F7 單株抗體可抑制 MDA-MB231 乳癌細胞於活體內之生長。

在第二個試驗中， 5×10^6 個 DMS79 人小細胞肺癌細胞/鼠被植入每隻鼠的腹脅區域及允許生長至 160 mm^3 之平均大小(以腫瘤之長 $\times$ 寬 $\times$ 高/2 計算)，其為植入後第 7 天。鼠被隨機分配至不同治療組及接受 Q3D $\times$ 5 (每三天 5 次)之投藥計畫的腹腔(i.p.)注射抗體。鼠之組別(n=10)係以(i) 載劑(PBS)；(ii) IgG4 同型對照(10 毫克/公斤)；或(iii) F7 IgG4 (10 毫克/公斤)治療。在規律間隔測量腫瘤體積及每次間隔測量各治療組之平均及中位腫瘤體積。此試驗之結果摘列於下表 4，其顯示植入後第 34 天之平均及中位腫瘤體積(mm^3)及腫瘤生長抑制% (TGI)：

表 4：單株抗體 F7 於活體內抑制 DMS79 細胞之腫瘤生長

治療	第 34 天			
	平均	TGI (%)	中位	TGI (%)
載劑	900		882	
IgG4 同型對照	992		903	
F7 抗 CXCR4 IgG4	620	38	599	34

結果證實 F7 單株抗體可抑制 DMS79 人小細胞肺癌細胞於活體內之生長。

在類似上述及實施例 9 中所描述之試驗中，利用其他皮下異種移植腫瘤模型檢測抗 CXCR4 抗體抑制腫瘤生長之能力。在使用 SU-DHL-6 B 細胞淋巴瘤之試驗中，結果顯示 15 毫克/公斤 F7 IgG4 單株抗體之治療導致約 60% 腫瘤生長抑制。同樣的，在使用 Namalwa 伯基特氏淋巴瘤細胞之試驗中，結果顯示 3 毫克/公斤 F7 IgG4 單株抗體之治療導致約 70% 腫瘤生長抑制。相反的，在使用 NIH-H226 肺癌細胞或 HPAC 人胰腺癌細胞之試驗中未觀察到 F7 單株抗體之腫瘤生長抑制。然而，在流式細胞計數試驗中以 F7 單株抗體染色這些細胞顯示最小化之活體外表現。雖然活體內之腫瘤細胞可利用免疫組織化學以單株抗體染色，並不清楚 CXCR4 是在腫瘤生長的哪一個階段開始表現。這顯示由這二個細胞系表現 CXCR4 並不足以允許抗 CXCR4 治療之活體內腫瘤生長抑制或誘發細胞凋亡。

實施例 13：抗 CXCR4 抗體抑制活體內肺轉移

在此實施例中，F7 抗 CXCR4 單株抗體抑制肺轉移之能力係利用 C57 鼠全身性腫瘤模型檢測。更具體地說， 0.4×10^6 個 B16-CXCR4 細胞(經轉染以表現人 CXCR4 之 B16 細胞)經靜脈注射至 30 隻 C57 品系之各鼠體內。鼠經隨機分配至三組各 10 隻鼠之組別中，接著接受(i) 載劑(PBS)；(ii) IgG4 同型對照(5 毫克/公斤)；或(iii) F7 IgG4 (5 毫克/公斤)之治療。抗體或載劑係於靜脈注射 B16-CXCR4 細胞後 30 分鐘經腹腔注射。在第 14 天採集肺臟及計算肺轉移結節之數量。結果摘列於下表 5，其顯示各組中肺轉移之平均及中位數：

表 5：單株抗體 F7 於活體內抑制肺轉移

治療	肺轉移數量		抑制肺轉移% (平均值)
	平均值	中位數	
載劑	364	397	
IgG4 同型對照	309	294	15%
F7 抗 CXCR4 IgG4	157	186	56%

結果顯示 F7 單株抗體治療導致肺轉移結節平均數下降 56%，然而同型對照抗體僅下降 15%，表示 F7 單株抗體可於全身性腫瘤模型中抑制肺轉移。

序列表

<110> MEDAREX, INC.

<120> 與CXCR4結合之人抗體及彼之用途

<130> MXI-375TW

<140>

<141>

<150> 60/827,851

<151> 2006-10-02

<160> 53

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Lys Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 10

<211> 16

<212> PRT
<213> 智人

<400> 10
Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11
Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12
Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15
Arg Thr Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 16
<211> 11

<212> PRT
<213> 智人

<400> 16
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT

<213> 智人

<400> 22

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 23

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 24

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 25

<211> 125

<212> PRT

<213> 智人

<400> 25

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

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

<210> 26

<211> 125

<212> PRT

- 6 -

<212> PRT

<213> 智人

<400> 28

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr His Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

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

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 29

Ala Ile Arg 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 Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 30

Glu Ile Val Leu 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 Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 31

Val Ile Trp Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 32

Glu Ile Val Leu 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 Gly Ile Ser Asn Trp
      20      25      30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
      35      40      45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
      85      90      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100      105

```

<210> 33
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(375)

```

<400> 33
cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc gct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20      25      30
agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt 144
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
tca tac att agt agt aga agt aga acc ata tac tac gca gac tct gtg 192
Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50      55      60
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tca ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
      65      70      75      80
ctg caa atg aac agc ctg aga gac gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
gcg aga gat tac ggt ggt caa ccc cct tac tac tac tac tac ggt atg 336
Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
      100      105      110
gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 375
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115      120      125

```

<210> 34
<211> 375
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(375)

```

<400> 34
cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1          5          10          15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc gct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt 144
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

tca tac att agt agt aga agt aga agc ata tac tac gca gac tct gtg 192
Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tca ctg tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
          65          70          75          80

ctg caa atg aac agc ctg aga gac gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

gcg aga gat tac ggt ggt caa ccc cct tac tac tac tac tac ggt atg 336
Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
          100          105          110

gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 375
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120          125

```

<210> 35
<211> 375
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(375)

```

<400> 35
gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1          5          10          15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc gct gga ttc acc ttc agt agc tat 96

```

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ala	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr		
			20					25					30				
agc	atg	aac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtt	144	
Ser	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35				40					45						
tca	tac	att	agt	agt	cgt	agt	aaa	acc	ata	tac	tac	gca	gac	tct	gtg	192	
Ser	Tyr	Ile	Ser	Ser	Arg	Ser	Lys	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val		
	50					55					60						
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	gcc	agg	aac	tca	ctg	tat	240	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Arg	Asn	Ser	Leu	Tyr		
	65				70				75						80		
ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gac	gag	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	288	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
gcg	aga	gat	tac	ggt	ggt	caa	ccc	cct	tac	tac	tac	tac	tac	ggt	atg	336	
Ala	Arg	Asp	Tyr	Gly	Gly	Gln	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met		
			100				105							110			
gac	gtc	tgg	ggc	caa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca				375	
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120					125					
 <210> 36																	
<211> 375																	
<212> DNA																	
<213> 智人																	
 <220>																	
<221> CDS																	
<222> (1)..(375)																	
 <400> 36																	
gag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gta	cag	cct	ggg	ggg	48	
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly		
	1			5				10						15			
tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	gct	gga	ttc	acc	ttc	agt	agc	tat	96	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ala	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr		
			20				25						30				
agc	atg	aac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtt	144	
Ser	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35				40					45						
tca	tac	att	agt	agt	aga	agt	aga	acc	ata	tac	tac	gca	gac	tct	gtg	192	
Ser	Tyr	Ile	Ser	Ser	Arg	Ser	Arg	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val		
	50					55					60						
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	gcc	aag	aac	tca	ctg	tat	240	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr		
	65				70				75						80		
ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gac	gag	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	288	

```

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

gcg aga gat tac ggt ggt caa ccc cct tac cac tac tac tac ggt atg 336
Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr His Tyr Tyr Tyr Gly Met
      100                      105                      110

gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 375
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115                      120                      125

<210> 37
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 37
gcc atc cgg atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48
Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
      1                      5                      10                      15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
      20                      25                      30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
      35                      40                      45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50                      55                      60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65                      70                      75                      80

gaa gat ttt gta act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg 288
Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
      85                      90                      95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100                      105

```

<210> 38
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 38

gaa att gtg ctc acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga	48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg	96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp	
20 25 30	
tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile	
35 40 45	
tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca cca agg ttc agc ggc	192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg	288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg	
85 90 95	
acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa	321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
100 105	

<210> 39

<211> 321

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 39

gtc atc tgg gtg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga	48
Val Ile Trp Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gac aga gtc acc atc act tgt cgg acg agt cag ggt att agc agc tgg	96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp	
20 25 30	
tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct gag ctc ctg atc	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile	
35 40 45	
tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc	192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	

65	70	75	80	
gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg				288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg	85	90	95	
acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa				321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	100	105		
<210> 40				
<211> 321				
<212> DNA				
<213> 智人				
<220> .				
<221> CDS				
<222> (1)..(321)				
<400> 40				
gaa att gtg ctc acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta ggg				48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	5	10	15	
gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc aac tgg				96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp	20	25	30	
tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc				144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile	35	40	45	
tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc				192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	50	55	60	
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct				240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	65	70	75	80
gaa gat ttt gcg act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg				288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg	85	90	95	
acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa				321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	100	105		
<210> 41				
<211> 125				
<212> PRT				
<213> 智人				
<400> 41				
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	5	10	15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	20	25	30	



Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 42
<211> 125
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42
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 Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 43
<211> 125
<212> PRT
<213> 智人

<400> 43
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 Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Lys Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 44
<211> 125
<212> PRT
<213> 智人

<400> 44
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr His Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 45
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<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 Gly Ile Ser Ser Trp

	20		25		30										
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile
	35					40						45			
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
	65				70					75					80
Glu	Asp	Phe	Val	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Pro	Arg
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 46
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<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 Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 47
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 47
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 Thr Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
35 40 45

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

<210> 48
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48
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 Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 49
<211> 98
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49
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 Ser Tyr
20 25 30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 50
<211> 95
<212> PRT
<213> 智人

<400> 50
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 Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

<210> 51
<211> 352
<212> PRT
<213> 智人

<400> 51
Met Glu Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu Met
1 5 10 15
Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys Phe Arg Glu Glu
20 25 30
Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile
35 40 45
Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly
50 55 60
Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu
65 70 75 80
Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val
85 90 95
Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu Cys Lys Ala Val
100 105 110
His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala

115					120					125					
Phe	Ile	Ser	Leu	Asp	Arg	Tyr	Leu	Ala	Ile	Val	His	Ala	Thr	Asn	Ser
130						135					140				
Gln	Arg	Pro	Arg	Lys	Leu	Leu	Ala	Glu	Lys	Val	Val	Tyr	Val	Gly	Val
145				150						155					160
Trp	Ile	Pro	Ala	Leu	Leu	Leu	Thr	Ile	Pro	Asp	Phe	Ile	Phe	Ala	Asn
				165					170					175	
Val	Ser	Glu	Ala	Asp	Asp	Arg	Tyr	Ile	Cys	Asp	Arg	Phe	Tyr	Pro	Asn
			180					185					190		
Asp	Leu	Trp	Val	Val	Val	Phe	Gln	Phe	Gln	His	Ile	Met	Val	Gly	Leu
		195					200					205			
Ile	Leu	Pro	Gly	Ile	Val	Ile	Leu	Ser	Cys	Tyr	Cys	Ile	Ile	Ile	Ser
	210					215					220				
Lys	Leu	Ser	His	Ser	Lys	Gly	His	Gln	Lys	Arg	Lys	Ala	Leu	Lys	Thr
225					230					235					240
Thr	Val	Ile	Leu	Ile	Leu	Ala	Phe	Phe	Ala	Cys	Trp	Leu	Pro	Tyr	Tyr
				245					250					255	
Ile	Gly	Ile	Ser	Ile	Asp	Ser	Phe	Ile	Leu	Leu	Glu	Ile	Ile	Lys	Gln
			260					265					270		
Gly	Cys	Glu	Phe	Glu	Asn	Thr	Val	His	Lys	Trp	Ile	Ser	Ile	Thr	Glu
		275					280					285			
Ala	Leu	Ala	Phe	Phe	His	Cys	Cys	Leu	Asn	Pro	Ile	Leu	Tyr	Ala	Phe
	290					295					300				
Leu	Gly	Ala	Lys	Phe	Lys	Thr	Ser	Ala	Gln	His	Ala	Leu	Thr	Ser	Val
305					310					315					320
Ser	Arg	Gly	Ser	Ser	Leu	Lys	Ile	Leu	Ser	Lys	Gly	Lys	Arg	Gly	Gly
				325					330					335	
His	Ser	Ser	Val	Ser	Thr	Glu	Ser	Glu	Ser	Ser	Ser	Phe	His	Ser	Ser
			340					345					350		

<210> 52
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 52
 Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 1 5 10 15

Thr Val Ser Ser
 20

" <210> 53
 <211> 11
 <212> PRT
 - <213> 智人
 <400> 53
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

申請專利範圍

106年3月17日修正本

1. 一種單株抗體，該單株抗體與表現於細胞表面上之人 CXCR4 專一性結合且包含重鏈變異區和輕鏈變異區，該重鏈變異區包含胺基酸序列，該胺基酸序列與由人 VH 3-48 種系免疫球蛋白基因編碼之序列 SEQ ID NO: 49 具有至少 90% 同源性，且該輕鏈變異區包含胺基酸序列，該胺基酸序列與由人 Vκ L15 種系免疫球蛋白基因編碼之序列 SEQ ID NO: 50 具有至少 90% 同源性，且該單株抗體進一步包含重鏈變異區 CDR3，該重鏈變異區 CDR3 具有 SEQ ID NO: 9 所示之胺基酸序列 DYGGQPPYYYYYGMDV，其中該單株抗體誘發表現人 CXCR4 之細胞的細胞凋亡且於活體內抑制 CXCR4⁺腫瘤細胞之生長及/或誘發 CXCR4⁺腫瘤細胞之細胞凋亡。

2. 如申請專利範圍第 1 項之單株抗體，其包含：

(a) 重鏈變異區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 1 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；重鏈變異區 CDR2，其包含 SEQ ID NO: 5 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；重鏈變異區 CDR3，其包含 SEQ ID NO: 9 所示序列之胺基酸；輕鏈變異區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 13 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；輕鏈變異區 CDR2，其包含 SEQ ID NO: 17 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；及，輕鏈變異區 CDR3，其包含 SEQ ID NO: 21 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；

(b) 重鏈變異區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 2 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；重鏈變異區 CDR2，其包含 SEQ ID NO: 6 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；重鏈變異區 CDR3，其包含 SEQ ID NO: 10 所示序列之胺基酸；輕鏈變異區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 14 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；輕鏈變異區 CDR2，其包含 SEQ ID NO: 18 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；及，輕鏈變異區 CDR3，其包含 SEQ ID NO: 22 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；或

(c) 重鏈變異區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 3 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；重鏈變異區 CDR2，其包含 SEQ ID NO: 7 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；重鏈變異區 CDR3，其包含 SEQ ID NO: 11 所示序列之胺基酸；輕鏈變異區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 15 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；輕鏈變異區 CDR2，其包含 SEQ ID NO: 19 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；及，輕鏈變異區 CDR3，其包含 SEQ ID NO: 23 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；

其中該單株抗體包含至少 1 個 CDR，該至少 1 個 CDR 包含 1 個保留性胺基酸取代，且該單株抗體保留未經修飾之抗體的與抗原決定位結合和功能性質。

3. 如申請專利範圍第 2 項之單株抗體，其包含：重

鏈變異區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 1 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；重鏈變異區 CDR2，其包含 SEQ ID NO: 5 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；重鏈變異區 CDR3，其包含 SEQ ID NO: 9 所示序列之胺基酸；輕鏈變異區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 13 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；輕鏈變異區 CDR2，其包含 SEQ ID NO: 17 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代；及，輕鏈變異區 CDR3，其包含 SEQ ID NO: 21 所示序列之胺基酸或彼之 1 個保留性胺基酸取代。

4. 如申請專利範圍第 2 項之單株抗體，其包含：

(a) 重鏈變異區和輕鏈變異區，該重鏈變異區包含 SEQ ID NO: 25 或 41 所示序列或與彼具有至少 90%同源性的序列之胺基酸，且該輕鏈變異區包含 SEQ ID NO: 29 或 45 所示序列或與彼具有至少 90%同源性的序列之胺基酸；

(b) 重鏈變異區和輕鏈變異區，該重鏈變異區包含 SEQ ID NO: 26 或 42 所示序列或與彼具有至少 90%同源性的序列之胺基酸，且該輕鏈變異區包含 SEQ ID NO: 30 或 46 所示序列或與彼具有至少 90%同源性的序列之胺基酸；或

(c) 重鏈變異區和輕鏈變異區，該重鏈變異區包含 SEQ ID NO: 27 或 43 所示序列或與彼具有至少 90%同源性的序列之胺基酸，且該輕鏈變異區包含 SEQ ID NO: 31 或

47 所示序列或與彼具有至少 90%同源性的序列之胺基酸。

5. 如申請專利範圍第 4 項之單株抗體，其包含重鏈變異區和輕鏈變異區，該重鏈變異區包含 SEQ ID NO: 25 所示序列或與彼具有至少 90%同源性的序列之胺基酸，且該輕鏈變異區包含 SEQ ID NO: 29 所示序列或與彼具有至少 90%同源性的序列之胺基酸。

6. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之單株抗體，其係 IgG1 或 IgG4 同型。

7. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之單株抗體，其抑制 SDF-1 與人 CXCR4 結合。

8. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之單株抗體，其抑制於表現人 CXCR4 之細胞中經 SDF-1 誘發之鈣離子流動。

9. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之單株抗體，其抑制表現人 CXCR4 之細胞之經 SDF-1 誘發的移動。

10. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之單株抗體，其抑制由人臍靜脈內皮細胞之毛細血管形成。

11. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之單株抗體，其抑制 CXCR4⁺腫瘤細胞轉移。

12. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之單株抗體，其延長帶有 CXCR4⁺腫瘤之個體的存活時間。

13. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之單株抗

體，其以 50 nM 或更低之 EC_{50} 值抑制 SDF-1 與人 CXCR4 結合。

14. 如申請專利範圍第 13 項之單株抗體，其以 3 nM 或更低之 EC_{50} 值抑制於表現人 CXCR4 之細胞中經 SDF-1 誘發之鈣離子流動。

15. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之單株抗體，其以 50 nM 或更低之 EC_{50} 值抑制表現人 CXCR4 之細胞之經 SDF-1 誘發的移動。

16. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之單株抗體，其

(a) 抑制 SDF-1 與人 CXCR4 結合；

(b) 抑制於表現人 CXCR4 之細胞中經 SDF-1 誘發之鈣離子流動；

(c) 抑制表現人 CXCR4 之細胞之經 SDF-1 誘發的移動；及

(d) 抑制由人臍靜脈內皮細胞之毛細血管形成。

17. 如申請專利範圍第 16 項之單株抗體，其以 50 nM 或更低之 EC_{50} 值抑制 SDF-1 與人 CXCR4 結合。

18. 如申請專利範圍第 16 項之單株抗體，其以 3 nM 或更低之 EC_{50} 值抑制於表現人 CXCR4 之細胞中經 SDF-1 誘發之鈣離子流動。

19. 如申請專利範圍第 16 項之單株抗體，其以 50 nM 或更低之 EC_{50} 值抑制表現人 CXCR4 之細胞之經 SDF-1 誘發的移動。

20. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之單株抗體，其係嵌合抗體、人化抗體或人抗體。

21. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之單株抗體，其係全長抗體。

22. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之單株抗體，其係二價 $F(ab')_2$ 片段。

23. 一種組成物，其包含如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之單株抗體及藥學上可接受之載劑。

24. 一種免疫偶聯物，其包含與治療劑連接之如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之單株抗體。

25. 如申請專利範圍第 24 項之免疫偶聯物，其中該治療劑係細胞毒素或放射性同位素。

26. 一種組成物，其包含如申請專利範圍第 24 或 25 項之免疫偶聯物及藥學上可接受之載劑。

27. 一種雙專一性分子，其包含與第二功能性部分連接之如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之單株抗體，該第二功能性部分具有與該單株抗體不同之結合專一性。

28. 一種組成物，其包含如申請專利範圍第 27 項之雙專一性分子及藥學上可接受之載劑。

29. 一種經分離之核酸，其編碼如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之單株抗體。

30. 一種表現載體，其包含如申請專利範圍第 29 項之核酸。

31. 一種宿主細胞，其包含如申請專利範圍第 30 項

之表現載體。

32. 一種用於製備抗 CXCR4 抗體之方法，其包含於如申請專利範圍第 31 項之宿主細胞中表現該抗體及自該宿主細胞分離該抗體。

33. 一種活體外調節表現 CXCR4 受體之細胞中 CXCR4 活性之方法，其包含令該細胞與如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之單株抗體接觸，藉以調節該細胞中 CXCR4 之活性。

34. 如申請專利範圍第 33 項之方法，其中該細胞係表現 CXCR4 之腫瘤細胞且該方法導致抑制該腫瘤細胞生長或抑制該腫瘤細胞轉移。

35. 如申請專利範圍第 33 項之方法，其中該細胞係表現 CXCR4 之 T 細胞且該方法導致抑制 HIV 進入該細胞。

36. 一種如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之單株抗體於製備醫藥組成物之用途，該醫藥組成物係用於調節個體之細胞中 CXCR4 之活性。

37. 一種用於調節個體之細胞中 CXCR4 的活性之醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之單株抗體。

38. 如申請專利範圍第 37 項之醫藥組成物，其係用於刺激 CD34⁺幹細胞自個體之骨髓移動至週邊血液。

39. 一種如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之單株抗體於製備醫藥組成物之用途，該醫藥組成物係用於抑

制個體之腫瘤細胞的生長或轉移。

40. 如申請專利範圍第 39 項之用途，其中該腫瘤細胞選自 B 細胞白血病、淋巴癌、急性淋巴母細胞白血病、急性骨髓性白血病、小細胞肺腫瘤、非小細胞肺癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、胰癌、甲狀腺癌、鼻咽癌、黑色素癌、腎細胞癌、神經母細胞瘤、膠質母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、大腸直腸癌、腎癌、骨肉瘤或轉移性肺癌之細胞。

41. 一種如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之單株抗體於製備醫藥組成物之用途，該醫藥組成物係用於抑制 HIV 進入個體之 T 細胞，其中該 HIV 使用 CXCR4 作為進入該 T 細胞之共受體。

42. 一種如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之單株抗體於製備醫藥組成物之用途，該醫藥組成物係用於抑制罹患發炎性疾病之個體的發炎。

43. 一種如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之單株抗體於製備醫藥組成物之用途，該醫藥組成物係用於抑制個體之血管新生。

44. 一種如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項之單株抗體於製備醫藥組成物之用途，該醫藥組成物係用於刺激 CD34⁺幹細胞自個體之骨髓移動至週邊血液。

45. 如申請專利範圍第 39 或 40 項之用途，其另包含使用另一治療劑。

46. 如申請專利範圍第 45 項之用途，其中該單株抗體包含：重鏈變異區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 1 所示序

列之胺基酸；重鏈變異區 CDR2，其包含 SEQ ID NO: 5 所示序列之胺基酸；重鏈變異區 CDR3，其包含 SEQ ID NO: 9 所示序列之胺基酸；輕鏈變異區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 13 所示序列之胺基酸；輕鏈變異區 CDR2，其包含 SEQ ID NO: 17 所示序列之胺基酸；及，輕鏈變異區 CDR3，其包含 SEQ ID NO: 21 所示序列之胺基酸。

47. 如申請專利範圍第 46 項之用途，其中該單株抗體包含重鏈變異區和輕鏈變異區，該重鏈變異區包含 SEQ ID NO: 25 所示序列之胺基酸，且該輕鏈變異區包含 SEQ ID NO: 29 所示序列之胺基酸。

48. 如申請專利範圍第 45 項之用途，其中該另一治療劑係與 CTLA-4、PD-1 或 PD-L1 結合之抗體。

49. 如申請專利範圍第 45 項之用途，其中該癌係胰癌或小細胞肺腫瘤。

50. 如申請專利範圍第 45 項之用途，其中該單株抗體與該另一治療劑一起經調製成單一醫藥組成物以供同時施予。

51. 如申請專利範圍第 45 項之用途，其中該單株抗體與該另一治療劑係各別經調製，且其中該單株抗體係於該另一治療劑之前施予。

52. 如申請專利範圍第 45 項之用途，其中該單株抗體與該另一治療劑係各別經調製，且其中該單株抗體係於該另一治療劑之後施予。

53. 如申請專利範圍第 45 項之用途，其中該單株抗

體與該另一治療劑係各別經調製，且其中該單株抗體與該另一治療劑係同時施予。

54. 如申請專利範圍第 39 或 40 項之用途，其另包含使用與 PD-1 結合之抗體，其中該腫瘤細胞係胰癌細胞。

圖式

抗CXCR4 Fab F7 VH

V 片段 : 3-48

D 片段 : 4-23

J 片段 : JH6b

```

      Q  V  Q  L  V  Q  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L
1  CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG

                                CDR1
                                -----
      R  L  S  C  A  A  A  G  F  T  F  S  S  Y  S  M  N  W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC GCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT AGC ATG AAC TGG

                                CDR2
                                -----
      V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  Y  I  S  S  R
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT TCA TAC ATT AGT AGT AGA

                                CDR2
                                -----
      S  R  T  I  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R
163 AGT AGA ACC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      D  N  A  K  N  S  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  D  E  D
217 GAC AAT GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GAC GAG GAC

                                CDR3
                                -----
      T  A  V  Y  Y  C  A  R  D  Y  G  G  Q  P  P  Y  Y  Y
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TAC GGT GGT CAA CCC CCT TAC TAC TAC

                                CDR3
                                -----
      Y  Y  G  M  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S
325 TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

圖1A

抗CXCR4 Fab F7 VK

V 片段 : L15
J 片段 : JK1

```

      A   I   R   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R
1  GCC ATC CGG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                -----
      V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A   W   Y
55  GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                -----
      Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A   S   S   L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      -----
      Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                -----
      L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   V   T   Y   Y   C   Q   Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GTA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      -----
      Y   N   S   Y   P   R   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271 TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

圖1B

抗CXCR4 Fab F9 VH

V 片段 : 3-48

D 片段 : 4-23

J 片段 : JH6b

Q V Q L V Q S G G G L V Q P G G S L
1 CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG

CDR1

R L S C A A A G F T F S S Y S M N W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC GCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT AGC ATG AAC TGG

CDR2

V R Q A P G K G L E W V S Y I S S R
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT TCA TAC ATT AGT AGT AGA

CDR2

S R S I Y Y A D S V K G R F T I S R
163 AGT AGA AGC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

D N A K N S L Y L Q M N S L R D E D
217 GAC AAT GCC AAG AAC TCA CTG TAC CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GAC GAG GAC

CDR3

T A V Y Y C A R D Y G G Q P P Y Y Y
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TAC GGT GGT CAA CCC CCT TAC TAC TAC

CDR3

Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
325 TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

圖2A

抗 CXCR4 Fab F9 VK

V 片段 : L15
J 片段 : JK1

```

      E   I   V   L   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R
1  GAA ATT GTG CTC ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
      ~~~~~
      V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A   W   Y
55  GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
      ~~~~~
      Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A   S   S   L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      ~~~~~
      Q   S   G   V   P   P   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163 CAA AGT GGG GTC CCA CCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
      ~~~~~
      L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      ~~~~~
      Y   N   S   Y   P   R   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271 TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
  
```

圖 2B

抗CXCR4 Fab D1 VH

V 片段 : 3-48

D 片段 : 4-23

J 片段 : JH6b

E V Q L V Q S G G G L V Q P G G S L
 1 GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG

CDR1

R L S C A A A G F T F S S Y S M N W
 55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC GCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT AGC ATG AAC TGG

CDR2

V R Q A P G K G L E W V S Y I S S R
 109 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT TCA TAC ATT AGT AGT CGT

CDR2

S K T I Y Y A D S V K G R F T I S R
 163 AGT AAA ACC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

D N A R N S L Y L Q M N S L R D E D
 217 GAC AAT GCC AGG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GAC GAG GAC

CDR3

T A V Y Y C A R D Y G G Q P P Y Y Y
 271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TAC GGT GGT CAA CCC CCT TAC TAC TAC

CDR3

Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
 325 TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

圖3A

抗CXCR4 Fab D1 VK

V 片段 : L15
J 片段 : JK1

```

      V   I   W   V   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R
1  GTC ATC TGG GTG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
      V   T   I   T   C   R   T   S   Q   G   I   S   S   W   L   A   W   Y
55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG ACG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                ~~~~~
      Q   Q   K   P   E   K   A   P   E   L   L   I   Y   A   A   S   S   L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT GAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      ~~~~~
      Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
      L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      ~~~~~
      Y   N   S   Y   P   R   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271 TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

圖 3B

抗CXCR4 Fab E2 VH

V 片段 : 3-48

D 片段 : 4-23

J 片段 : JH6b

E V Q L V Q S G G G L V Q P G G S L
1 GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG

CDR1

R L S C A A A G F T F S S Y S M N W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC GCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT AGC ATG AAC TGG

CDR2

V R Q A P G K G L E W V S Y I S S R
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT TCA TAC ATT AGT AGT AGA

CDR2

S R T I Y Y A D S V K G R F T I S R
163 AGT AGA ACC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

D N A K N S L Y L Q M N S L R D E D
217 GAC AAT GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GAC GAG GAC

CDR3

T A V Y Y C A R D Y G G Q P P Y H Y
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TAC GGT GGT CAA CCC CCT TAC CAC TAC

CDR3

Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
325 TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

圖4A

抗CXCR4 Fab E2 VK

V 片段 : L15
J 片段 : JK1

```

      E   I   V   L   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R
1  GAA ATT GTG CTC ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGG GAC AGA

                                CDR1
                                -----
      V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   N   W   L   A   W   Y
55  GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AAC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                -----
      Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A   S   S   L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      -----
      Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                -----
      L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCG ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      -----
      Y   N   S   Y   P   R   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271 TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

圖4B

抗 CXCR4 Fab F7 VH 區

3-48 胚系	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	S	M	N	W
F7 VH	Q	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7GL VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3-48 胚系	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	Y	I	S	S	S	S	T	I	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R
F7 VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7GL VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3-48 胚系	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	D	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R									
JH6b 胚系	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7 VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7GL VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

JH6b 胚系	Y	Y	G	M	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S																		
F7 VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7GL VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

圖5A

抗 CXCR4 Fab F7 VK 區

L15 胚系	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	G	I	S	S
F7 VK	A	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7GL VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CDR1																														
L15 胚系	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	E	K	A	P	K	S	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F
F7 VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7GL VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CDR2																														
L15 胚系	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S
F7 VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7GL VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CDR3																														
L15 胚系	Y	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JK1 胚系	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7 VK	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7GL VK	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(JK1)																														

圖5B

抗 CXCR4 Fab F9 VK 區

L15 胚系	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	G	I	S	S
F9 VK	E	-	V	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F9GL VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CDR1																														
L15 胚系	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	E	K	A	P	K	S	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F
F9 VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F9GL VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CDR2																														
L15 胚系	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S
F9 VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F9GL VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CDR3																														
L15 胚系	Y	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JK1 胚系	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F9 VK	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F9GL VK	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(JK1)																														

圖6B

抗 CXCR4 Fab D1 VH 區

3-48 胚系	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 S S Y S M N W	CDR1
D1 VH	- - - - Q - - - - - - - - - - A - - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -
D1GL VH	- - - - - - - - - - - - - - - - A - - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -
3-48 胚系	V R Q A P G K G L E W V S Y I S S S S S T I Y Y A D S V K G R F T I S R	CDR2
D1 VH	- - - - - - - - - - - - - - R - K - - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -
D1GL VH	- - - - - - - - - - - - - - R - K - - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -
3-48 胚系	D N A K N S L Y L Q M N S L R D E D T A V Y C A R	CDR3
JH6b 胚系	- - - R - Y Y Y	- - - - - - - - - -
D1 VH	- - - R -	- - - - - - - - - -
D1GL VH	- - - R -	- - - - - - - - - -
JH6b 胚系	Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S	CDR3
D1 VH	- (JH6b)	- - - - - - - - - -
D1GL VH	- (JH6b)	- - - - - - - - - -

圖7A

圖 7B

抗CXCR4 Fab E2 VH 區

3-48 胚系	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	<u>CDR1</u>	S	Y	S	M	N	W	
E2 VH	-	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
E2GL VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
3-48 胚系	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	Y	I	S	S	S	S	T	I	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	
E2 VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
E2GL VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
3-48 胚系	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	D	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R		<u>CDR3</u>								
JH6b 胚系	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	Y	Y
E2 VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E2GL VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
JH6b 胚系																																				
E2 VH																																				
E2GL VH																																				

圖8A

圖 9

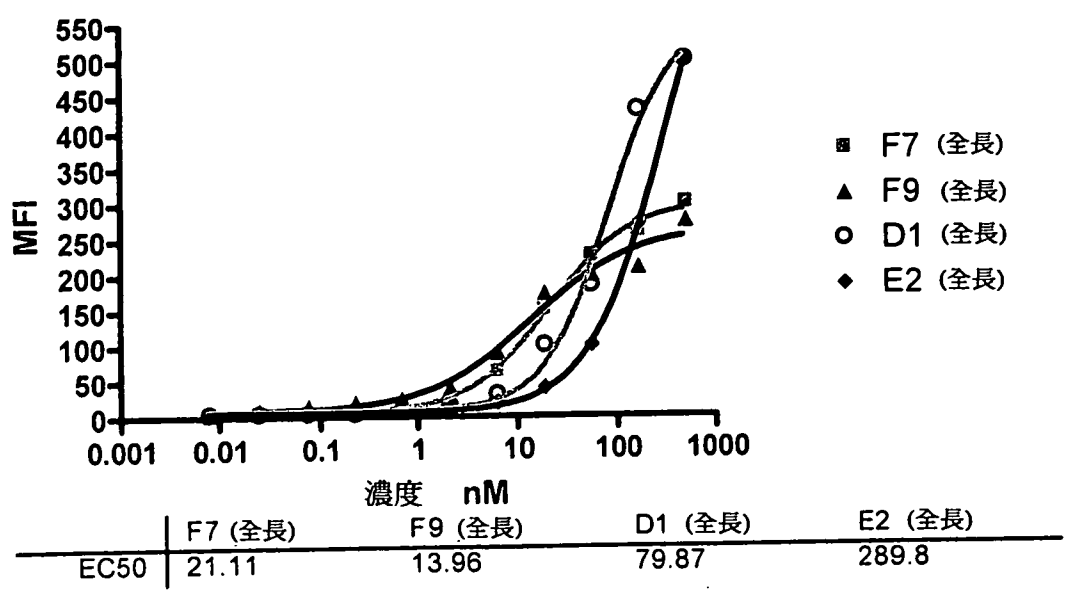


圖 10

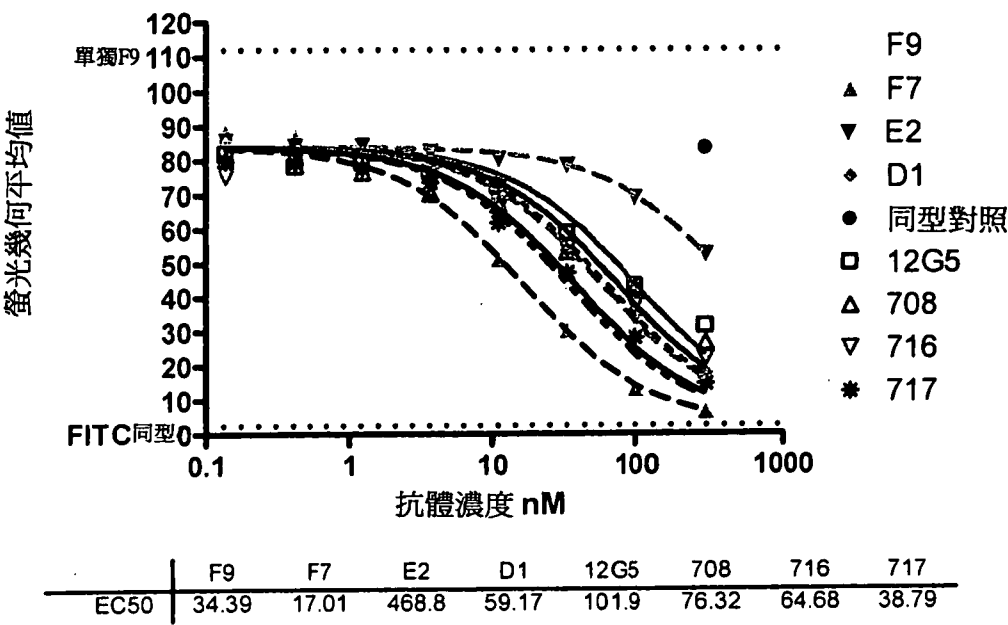


圖 11

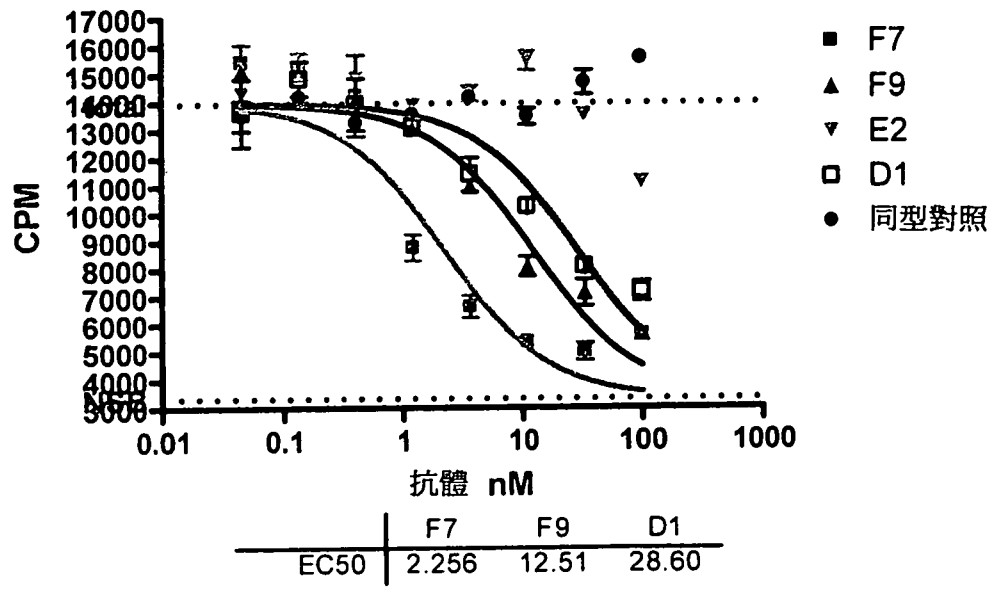


圖12

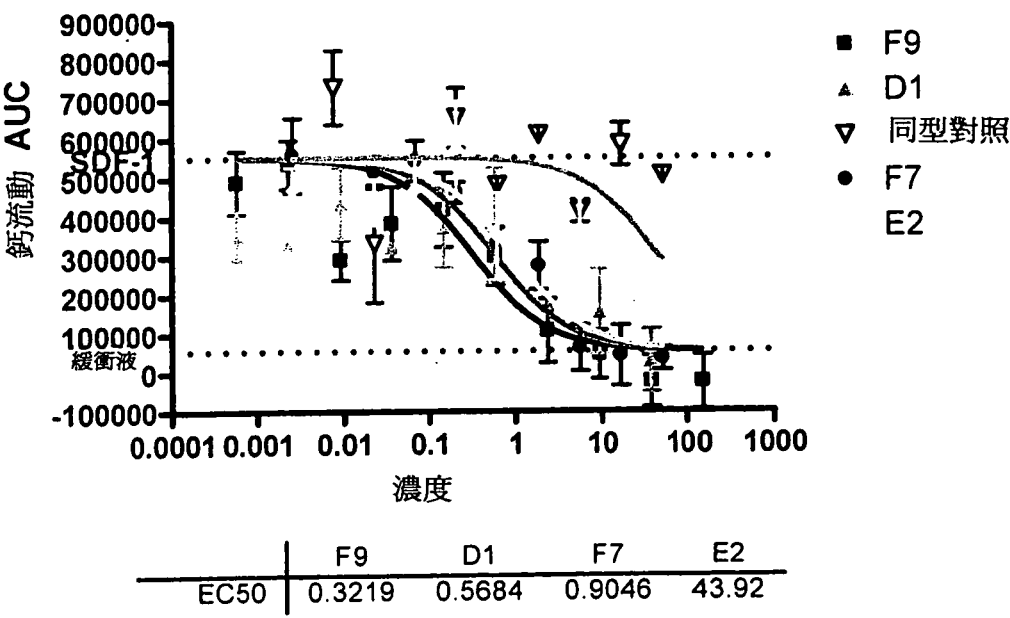


圖 13

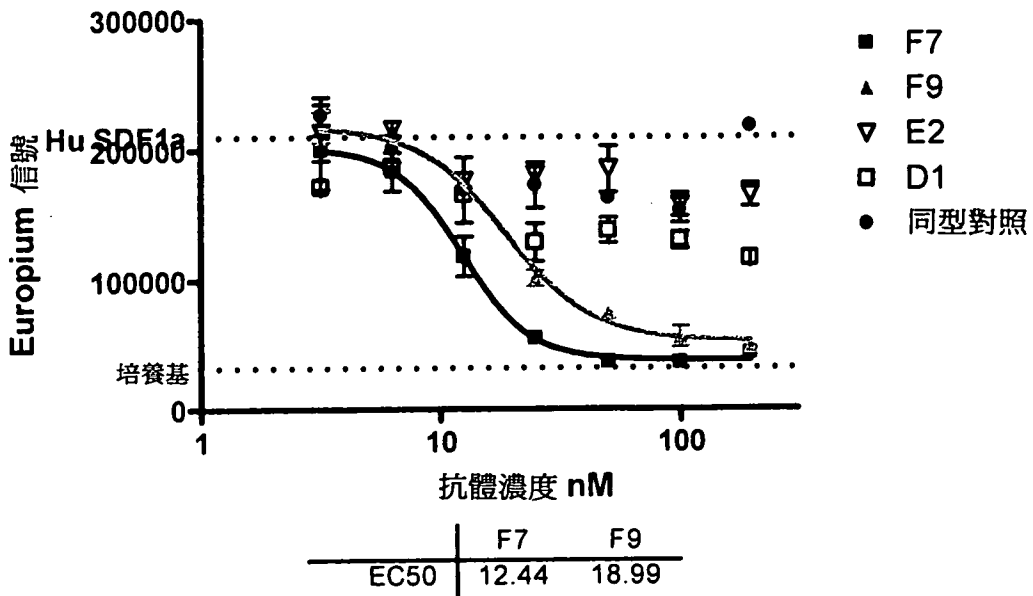


圖14

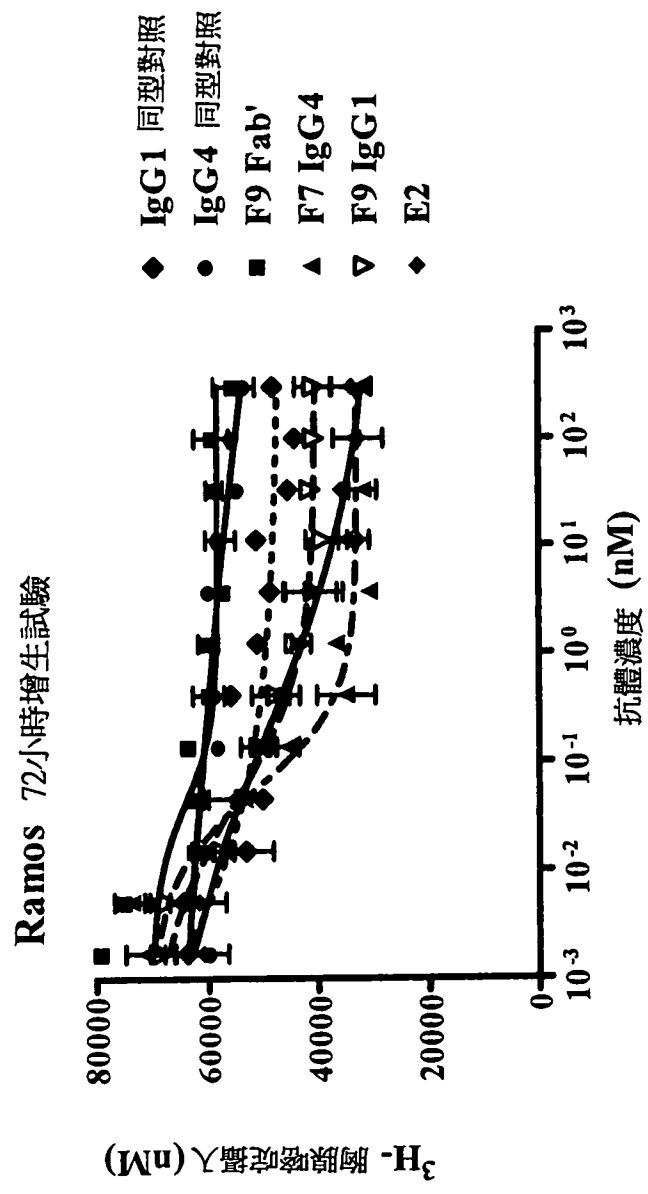


圖15

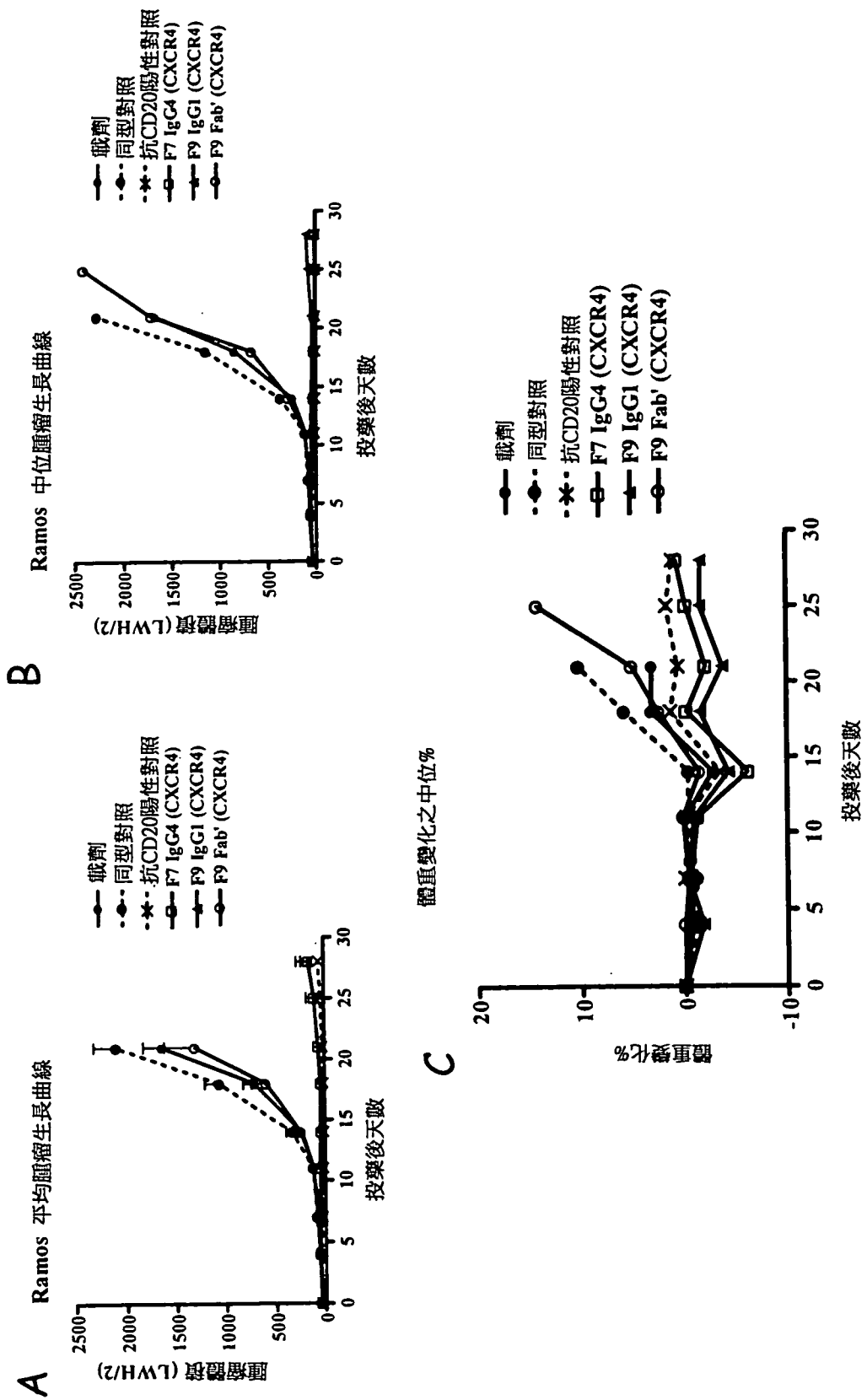


圖16

