



(21)申請案號：098141150 (22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 02 日

(51)Int. Cl. : G01N33/68 (2006.01) C12N15/13 (2006.01)

(30)優先權：2008/12/02 世界智慧財產權組織 PCT/IB2008/055664  
2009/06/05 美國 61/184,406

(71)申請人：皮爾法伯製藥公司 (法國) PIERRE FABRE MEDICAMENT (FR)  
法國

(72)發明人：構特斯區 利萊恩 GOETSCH, LILIANE (FR)；渥區 希爾瑞 WURCH, THIERRY (FR)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

(56)參考文獻：

WO 2006/116260A2 WO 2007/016285A2  
Cavacini LA et al., "Influence of heavy chain constant regions on antigen binding and HIV-1 neutralization by a human monoclonal antibody", The Journal of Immunology, vol.155 no.7, p. 3638-3644, 1995

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：17 共 106 頁

## (54)名稱

用於調控單株抗體之拮抗活性的方法

PROCESS FOR THE MODULATION OF THE ANTAGONISTIC ACTIVITY OF A MONOCLONAL ANTIBODY

## (57)摘要

本發明是有關於抗體工程領域以及，更特別地，有關於一種用於篩選抗體和/或調節抗體的促效/拮抗活性的方法。更特別地，本發明涉及一種增進一針對拮抗一特定標的分子的單株抗體，或者它的一個二價功能性片段或衍生物之拮抗活性的方法，該抗體能夠抑制該標的分子之一或多種生物活性，其中該方法包含有該樞紐區域的重新配置的一階段，該階段是由該樞紐區域的胺基酸序列的一修飾(藉由刪除、加入或者取代至少一胺基酸)所構成。

本發明亦有關於可應用於此一調節方法的多肽以及所得到的抗體。

The present invention relates to the antibody engineering field and, more particularly, to a process for the screening of antibodies and/or the modulation of the agonistic/antagonistic activity of antibodies. More particularly, the invention concerns a process of improving the antagonistic activity of a monoclonal antibody directed against a specific target molecule, or a divalent functional fragment or derivative thereof, said antibody being capable of inhibiting one or more of the biological activities of said target molecule, wherein said process comprises a stage of reconfiguration of the hinge region consisting of a modification of the amino acid sequence of said hinge region by the deletion, the addition or the substitution of at least one amino acid. The invention also relates to polypeptides useful for such a modulation method and the obtained antibodies.

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

#### 發明領域

本發明是有關於抗體工程領域以及，更特別地，有關於一種用於篩選抗體和/或調節抗體的促效(agonistic)/拮抗(antagonistic)活性的方法。更特別地，本發明涉及一種用於藉由基因工程(genetic engineering)來調節一單株抗體、或者它的一個二價功能性片段(functional fragment)或者衍生物之拮抗活性的方法。本發明亦有關於可應用於此一調節方法的多肽(polypeptide)以及所得到的抗體。

### 【先前技術】

#### 發明背景

術語“抗體(antibody)”、“抗體(antibodies)”或者“免疫球蛋白(immunoglobulin)”就最廣意而言被交替地使用，並且包括單株抗體(例如，全長或者完整的單株抗體)、多株抗體、多價抗體(multivalent antibodies)或者多特異性抗體(multispecific antibodies)[例如，雙特異性抗體(bispecific antibodies)，只要它們展現出所欲的生物活性(Biology activity)]。

更特別地，諸如此類的分子在於一包含有藉由雙硫鍵而被交互-連結(inter-connected)的至少二個重(heavy, H)鏈以及二個輕(light, L)鏈的糖蛋白(glycoprotein)。各個重鏈包含有一重鏈變異區域(heavy chain variable region)[或者領域(domain)](在此被縮寫成HCVR或者VH)以及一重鏈恆定

區域(heavy chain constant region)。該重鏈恆定區域包含有三個領域，CH1、CH2以及CH3。各個輕鏈包含有一輕鏈變異區域(在此被縮寫成LCVR或者VL)以及一輕鏈恆定區域(light chain constant region)。該輕鏈恆定區域包含有一個領域，CL。該等VH以及VL區域可被進一步細分成高變異性(hypervariability)的區域，被稱為互補決定區域(complementarity determining regions, CDR)，被散佈以較為守恆的(conserved)區域[被稱為框架區域/framework regions, FR]]。各個VH以及VL是由3個CDRs以及4個FRs所構成，由胺基-端(amino-terminus)至羧基-端(carboxy-terminus)以下列的順序被排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。該等重以及輕鏈的變異區域含有一與一抗原交互作用的結合領域(binding domain)。該等抗體的恆定區域可以媒介免疫球蛋白結合至宿主組織或者因子，包括免疫系統(immune system)的各種不同細胞[例如，效應子細胞(effector cells)以及典型補體系統(classical complement system)的第一組分(first component)(Clq)]。

免疫球蛋白的重鏈可被區分為三個功能性區域(functional regions)：Fd區域(Fd region)、樞紐區域(hinge region)、Fc區域(Fc region)[可結晶的片段(fragment crystallizable)]，它們是藉由一彈性樞紐區域而被連結。該Fd區域包含有VH與CH1領域，並且組合以輕鏈而形成Fab-抗原-結合片段(Fab-the antigen-binding fragment)。Fc片段是造成免疫球蛋白效應子功能(immunoglobulin effector

functions)的原因，免疫球蛋白效應子功能包括，例如，補體結合(complement fixation)以及結合至效應子細胞的同源Fc受體(cognate Fc receptor)。在IgG、IgA以及IgD免疫球蛋白類型(immunoglobulin classes)中所發現到的樞紐區域，作用有如一容許Fab部分相對於Fc區域在空間內自由地移動的彈性間隔子(flexible spacer)。相對於恆定區域，樞紐領域在結構上是不同的，於免疫球蛋白類型以及亞型(subclasses)之間在序列以及長度這兩個方面變化。

根據結晶學研究(crystallographic studies)，免疫球蛋白樞紐區域可以在結構上以及在功能上被進一步細分為三個區域：上樞紐(upper hinge)、核心(core)以及下樞紐(lower hinge)(Shin et al., Immunological Reviews 130:87, 1992)。上樞紐包括自CH1的羧基端至在限制移動的樞紐中的第一個殘基(residue)[一般而言是在兩個重鏈之間形成一個鏈間雙硫鍵(interchain disulfide bond)的第一個半胱氨酸殘基(cysteine residue)]的胺基酸(amino acids)。上樞紐區域的長度與抗體的節段彈性(segmental flexibility)相關聯。核心樞紐區域含有重鏈間雙硫橋(inter-heavy chain disulfide bridges)。下樞紐區域結合CH2領域的胺基末端並且包括在該CH2領域中的殘基。人類IgG1的核心樞紐區域含有序列Cys-Pro-Pro-Cys，當藉由雙硫鍵形成而被二聚(dimerized)時，會導致一咸信作用有如一樞軸(pivot)的環八肽(cyclic octapeptide)，因此賦予彈性。為免疫球蛋白樞紐區域多肽序列的結構以及彈性所容許的構形改變(conformational

changes)可影響抗體之Fc部分的效應子功能。

一般來說，就製備鼠類來源(murine origin)的單株抗體或者它們的功能性片段而言，可以參照特別是在手冊“抗體(Antibodies)”(Harlow and Lane, Antibodies : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988)中所述的技術或者由Kohler以及Milstein (Nature, 256:495-497, 1975)所述的由融合瘤製備的技術。接而，單株抗體可以，例如，在親合力管柱(affinity column)[感興趣的受體或者它的含有被該單株抗體所特異性地辨識的抗原決定位(epitope)的片段之一者已經被預先地固定化]上被純化。更特別地，該等單株抗體可藉由在蛋白質A (protein A)和/或G上的層析法(chromatography)，繼之以或者未繼之以離子-交換層析法(ion-exchange chromatography)[旨在消除殘留的蛋白質汙染物(protein contaminants)以及DNA與LPS]，就其本身而論繼之以或者未繼之以在交聯瓊脂糖凝膠 (Sephrose gel) 上的排除層析法 (exclusion chromatography)而被純化，俾以消除因為二聚物(dimers)或者其他集合體(multimers)存在的潛在聚集物。以一甚至更佳的方式，所有的這些技術可同時地或者依次地被使用。

### 【發明內容】

#### 發明概要

按照依據本發明之一抗體的功能性片段，意欲要特定地表示一個抗體片段，諸如Fv、scFv [sc為單鏈(single chain)]、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、scFv-Fc片段或者雙鏈抗體

(diabodies), 或者任一種半衰期時間(half-life time)會藉由化學修飾(chemical modification){諸如, 添加聚(烷撐)二醇[poly(alkylene) glycol](諸如聚(乙)二醇[poly(ethylene) glycol]]["聚乙二醇化(PEGylation)"](聚乙二醇化的片段被稱為 Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')<sub>2</sub>-PEG 或者 Fab'-PEG)["PEG"為聚(乙)二醇]}, 或者藉由併入一脂質體(liposome)中而被增加的片段, 該等片段具有原始抗體的獨特CDRs的至少一者。

較佳地, 這些功能性片段將是Fv、scFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab')、scFv-Fc類型或者雙鏈抗體的片段, 它們通常具有如同它們所系出之抗體的結合的特異性(specificity)。依據本發明, 本發明的抗體片段可始於諸如上述的抗體藉由諸如以酵素[諸如, 胃蛋白酶(pepsin)或者木瓜蛋白酶(papain)]的消化(digestion)和/或藉由化學還原切割雙硫橋的方法而被獲得。以另一種方式, 被包含於本發明中的抗體片段可藉由同樣對於熟習於此技藝人士所熟知的基因重組(genetic recombination)的技術, 或者另外藉由, 例如, 以自動肽合成儀(automatic peptide synthesizers)(諸如, 那些由 Applera公司等所供應者)的方式的肽合成(peptide synthesis)而被獲得。

如此處所用的, 術語“拮抗劑(antagonist)”意指一能夠抑制一標的分子(target molecule)[諸如, 一細胞外(extracellular)或者穿膜(transmembrane)受體]的一或多種生物活性(biological activities)的分子。拮抗劑可藉由干擾一

受體結合至一配位子(ligand)以及反之亦然、藉由減低受體磷酸化、和/或藉由無能(incapacitating)或者殺死(killing)已經被一配位子所活化的細胞來作用。拮抗劑可完全地阻斷受體-配位子交互作用或者可藉由競爭、構形的改變、脫落(shedding)或者向下調節(downregulation)來實質地減低此等交互作用。就本發明的目的而言，所有藉由一拮抗劑的干預(intervention)的此等特點應被視為等效的。

如此處所用的，術語“促效劑(agonist)”意指任一種能夠活化一標的分子的一或多種生物活性的化合物[包括一蛋白質、一多肽(polypeptide)、一肽(peptide)、一抗體、一抗體片段、一綴合物(conjugate)、一大分子(large molecule)、一小分子(small molecule)]。

在治療性抗體的研究中，通常預期獲得盡可能有如拮抗劑的抗體。

拮抗劑抗體之典型實例是賀癌平(Herceptin)、帕妥珠單抗(Pertuzumab)、西妥昔單抗(Cetuximab)、抗-VEGFR(anti-VEGFR)或者抗-IGF-1R(anti-IGF-1R)抗體。

作為一特定的實例，可舉出由Genentech所生產的抗-c-Met 5D5抗體(anti-c-Met 5D5 antibody)[WO 96/38557]，該抗體當被單獨加入各種不同的模型中時表現有如一強力的促效劑。為了解決這個技術問題，這個抗體必須被建造成一Fab片段或者一單價抗體(monovalent antibody)[獨臂5D5(one-armed 5D5)]以具有一拮抗活性。因此，此種抗體不能被視為一抗體，而是一片段，並且因為“完全抗體(full

antibody)”型式而不會表現出所有優點[無效應子功能、減低的清除作用 (clearance) 以及半衰期 (如在 20<sup>th</sup> EORTC-NCI-AACR 研討會，Geneva，10月21-24日，2008 的海報411中所描述的，要比習知的二價抗體快2倍)]。

熟習技藝者(artisan)將認知到：效應子功能包括，例如，C1q結合；補體依賴性細胞毒性(complement dependent cytotoxicity)；Fc受體結合；抗體-依賴性細胞-媒介的細胞毒性 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)；吞噬作用(phagocytosis)；與細胞表面受體[例如，B細胞受體(B cell receptor；BCR)]的向下調節以及有如例如，1998年4月14日所發證的美國專利案號5,739,277中所述的，經由回收受體結合配位子(salvage receptor binding ligand)(FcRn)的併入來延長半衰期。

本發明的進步性方面之一者是解決此等技術問題，亦即，在保留一“完全二價(full divalent)”型式的同時增進一抗體的拮抗活性。

在此必須被提出的是：本發明可被應用來調節人類抗體的促效/拮抗活性，該人類抗體是藉由“人類小鼠(human mice)”[生產人類免疫球蛋白的經遺傳修飾的小鼠 (genetically modified mice)]的免疫作用或者使用噬菌體呈現技術(phage display techniques)來建造源自於選定的 scFv、Fab或者任一種其他等效片段的完整抗體而被獲得。

另一個典型的技術問題可能在一鼠類抗體的嵌合(chimerization)和/或人類化(humanization)的過程中被碰

到。為熟習此技藝者所熟知的是：即使一鼠類抗體的嵌合和/或人類化的方法在理論上是相當容易的，也不是這麼容易去處理此一鼠類抗體的嵌合和/或人類化而不會喪失全部或者部分的初始特性(initial properties)。嵌合(chimeric)或者人類化(humanized)抗體可能喪失部分它的ADCC、CDC、拮抗/促效、結合、(TBC)...活性。本發明涉及，更特別地，在一嵌合和/或人類化方法之後修飾一鼠類抗體的促效/拮抗活性。

作為一特定的實例，之後被描述為224G11、2274H1以及11E1的一系列抗-cMet抗體(anti-cMet antibodies)(它們表現有如強力的拮抗劑鼠類抗體)，當被嵌合至一人類IgG1型式上時成為一部分促效劑(partial agonists)。這個由強力拮抗劑到部分促效劑的轉變會導致活體內活性(*in vivo* activity)在異種移植模型(xenograft models)中的一個完全喪失。

本發明意欲解決這些問題並且更特別地是有關於一種增進一針對拮抗一特異性標的分子的單株抗體、或者它的一個二價功能性片段或衍生物之拮抗活性的方法，該抗體能夠抑制該標的分子的一或多種生物活性，其中該方法包含有該樞紐區域的重新配置(reconfiguration)的一階段，該階段是由該樞紐區域的胺基酸序列的一修飾(藉由刪除、加入或者取代至少一胺基酸)所構成。

清楚的是，詞句“增進拮抗活性(improving the antagonistic activity)”必須是以它的最廣義(亦即，有如所想

要的結果)被解釋。機械上，此種結果可藉由一抗體的一內在拮抗活性(intrinsic antagonistic activity)的增進和/或一內在促效活性(intrinsic agonistic activity)的減低而被獲得。

更特別地，在定量藥理學(quantitative pharmacology)中術語的基本定義是以國際藥理學聯合會(International Union of Pharmacology, IUPHAR)委員會按照受體命名法(receptor Nomenclature)(參見，Neubig et al., 2003)所給予的最新建議為基礎。

#### 圖式簡單說明

本發明的其他特徵以及優點呈現在具有實施例以及圖式的後續說明中，其中：

第1A以及1B圖：一系列被製造有如一人類IgG1/ $\kappa$ 同型物的鼠類以及對應嵌合抗-c-Met Mabs對A549細胞在c-Met受體磷酸化上的效用。

第1A圖：被計算為與c-Met磷酸化(藉由HGF [100 ng/ml])的最大刺激(maximal stimulation)相比之百分比(percentage)的促效劑效用。

第1B圖：被計算為抑制c-Met磷酸化(藉由HGF [100 ng/ml])的最大刺激之百分比的拮抗劑效用。

第2A以及2B圖：於鼠類224G11 Mab以及含有各種不同經建造的樞紐區域的嵌合224G11 Mabs之間對A549細胞在c-Met受體磷酸化上的比較。

第2A圖：被計算為與c-Met磷酸化(藉由HGF [100 ng/ml])的最大刺激相比之百分比的促效劑效用。

第2B圖：被計算為抑制c-Met磷酸化(藉由HGF [100 ng/ml])的最大刺激之百分比的拮抗劑效用。

第3A與3B、4以及5圖：c-Met二聚作用(c-Met dimerization)以及活化BRET模型(BRET models)。

第6A以及6B圖：藉由嵌合以及人類化224G11形式的c-Met辨識。

第7A、7B以及7C圖：鼠類以及嵌合抗體於活體外(*in vitro*)在NCI-H441細胞之HGF-誘發的增生上的效用。NCI-H441細胞被平盤培養在一無-血清(*serum-free*)培養基中，在平盤培養24小時之後，(第7A圖) m11E1與[11E1] chim、(第7B圖) m227H1與[227H1] chim或者(第7C圖) m224G11與[224G11] chim在HGF不存在或者存在的情況下被加入。黑色箭頭表示在HGF不存在↙或者存在↘的情況下以細胞單獨予以平盤培養的井(wells)。一鼠類IgG1 (mIgG1)被導入作為一同型物對照組。

第8圖：鼠類以及嵌合224G11 Mabs在NCI-H441異種移植模型(xenograft model)上的活體內比較。

第9A以及9B圖：鼠類224G11Mab以及此抗體之各種不同的嵌合(chimeric)與人類化(humanized)型式在活體外NCI-H441細胞的HGF-誘發之增生上的效用。NCI-H441被平盤培養在無-血清培養基中。在平盤培養24小時之後，要被測試的抗體在HGF不存在或者存在的情況下被加入，在區塊(第9A圖)中，鼠類m224G11、嵌合IgG1 [224G11] chim、人類化IgG1 [224G11][Hz1]、[224G11][Hz2]、

[224G11][Hz3]型式被顯示，在區塊(第9B圖)中，鼠類m224G11以及各種不同的嵌合IgG1形式([224G11] chim、[224G11][MH chim]、[224G11][MUP9H chim]、[224G11][MMCH chim]、[224G11][TH7 chim])被呈現。黑色箭頭表示在HGF不存在◀或者存在▶的情況下以細胞單獨予以平盤培養的井。一鼠類IgG1被導入作為針對促效劑活性的一負對照組。m5D5被使用作為一劑量-依賴性完全促效劑對照組(dose-dependent full agonist control)。

第10圖：鼠類224G11 Mab以及此抗體之各種不同嵌合與人類化型式在活體外NCI-H441細胞的HGF-誘發之增生上的效用。NCI-H441被平盤培養在無-血清培養基中。在平盤培養24小時之後，要被測的試抗體在HGF不存在或者存在的情況下被加入。鼠類m224G11、[224G11] chim、[224G11][TH7 chim] IgG1嵌合形式以及[224G11][TH7 Hz1]、[224G11][TH7 Hz3]被呈現。黑色箭頭表示在HGF不存在◀或者存在▶的情況下以細胞單獨予以平盤培養的井。一鼠類IgG1被導入作為針對促效劑活性的一負對照組。m5D5被使用作為一劑量-依賴性完全促效劑對照組。

第11A至11B以及12A至12B圖：本發明的一系列抗-c-Met Mabs [具有經建造的樞紐(engineered hinge)]對A549細胞在c-Met受體磷酸化上的效用。

第11A以及11B圖：被計算為與c-Met磷酸化(藉由HGF [100 ng/ml])的最大刺激相比之百分比的促效劑效用。

第12A以及12B圖：被計算為抑制c-Met磷酸化(藉由

HGF [100 ng/ml])的最大刺激之百分比的拮抗劑效用。

第13A以及13B圖：c-Met二聚作用以及活化BRET模型。

第14A圖：被計算為與c-Met磷酸化(藉由HGF [100 ng/ml])的最大刺激相比之百分比的促效劑效用。

第14B圖：被計算為抑制c-Met磷酸化(藉由HGF [100 ng/ml])的最大刺激之百分比的拮抗劑效用。

第15圖：c-Met二聚作用以及活化BRET模型。

第16圖：不同形式的Mab 214B2在PC3細胞附著上的效用的顯微鏡分析(microscope analysis)。

第17圖：不同形式的Mab 214B2在PC3細胞附著上之效用的分析[使用ATP分析(ATP assay)]。在各井中附著的細胞(adhered cells)之數目是使用PC3標準曲線(PC3 standard curve)(從0至200 000細胞/井)而被決定。結果被呈現如下：未經處理的細胞被視為參考組(100%)，而經處理的細胞被呈現有如參考組的%。

## 【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

術語‘促效劑’代表一結合至一受體並且改變該受體狀態而導致一刺激性或者增加的生物反應(biological response)的配位子(任一種類的分子)。促效劑可扮演作為完全促效劑(full agonists)或者部分促效劑(partial agonist)：

-完全促效劑：當由一促效劑所誘發的受體刺激達到系統的最大反應能力(maximal response capability)，那麼它將產生系統最大反應並且在那個系統中是一個完全促效劑。

數個促效劑可引起相同的最大反應，它們在那個實驗系統中全是完全促效劑。

-部分促效劑：一個在一給定的組織中、於指定的條件下不能引起一與一完全促效劑在相同系統中經由相同受體所能夠作用般一樣大的效用(即使當在高濃度下被施用時，藉此所有受體應被佔據)。部分促效劑通常亦是部分拮抗劑，因為在一完全促效劑的共-存在下，它們會減低該完全促效劑的最大反應至它們自己的最大反應。完全對部分促效劑的命名(designation)是系統-依賴的，並且一個用於一系統或者量測中的完全促效劑在另一者中可能是一個部分促效劑。

術語‘拮抗劑’代表一減低另一種藥物(通常是一促效劑)的作用的分子。許多拮抗劑與促效劑作用在相同的受體巨分子(macromolecule)。

-當在拮抗劑以及促效劑的共-存在下系統的反應對應於該系統的基礎(無任何配位子)活性時，拮抗作用(antagonism)的效力可以是完全拮抗作用。

-當由拮抗劑以及促效劑的共-存在所引起的最大抑制(即使在一高濃度下被施用，藉此所有的受體應被拮抗劑所佔據)超過該系統的基礎活性時，一拮抗劑可以扮演作為一部分促效劑。

-當促效劑與拮抗劑彼此互斥時，拮抗作用可能是競爭性的。這可能是因為促效劑以及拮抗劑競爭相同的結合位址(binding site)或者組合重疊的相鄰位址(adjacent sites)。一

第三種可能性是不同的位址被涉入，然而它們以促效劑與拮抗劑無法同時被結合的方式來影響受體巨分子。

-當促效劑以及拮抗劑可同時地被結合至受體時，非競爭性拮抗作用(Noncompetitive antagonism)被觀察到；在對於促效劑的結合有或沒有任何效用的情形下，拮抗劑結合會減低或者防止促效劑的作用。

刪除、加入或者取代可典型地藉由任一種為熟習技藝者所熟知的方法被做出。

數個方法可由熟習技藝者所運用，俾以在一給定的DNA序列中產生加入、刪除或者插入(insertions)。在無限制下可被舉出：使用胰臟DNase I (pancreatic DNase I)的DNA的部分消化、使用限制酶(restriction enzymes)的DNA的部分消化、以連接子-為基礎的插入突變體(linker-based insertion mutants)、使用BAL31核酸酶、DNase I或者外核酸酶III (exonuclease III)的刪除突變體(deletion mutants)之巢聚形式(nested sets)。這些方法在實驗室手冊[諸如，分子選殖，一實驗室手冊(Molecular Cloning, A laboratory manual)(Sambrook, Fritsch以及Maniatis)]中被廣泛地描述。數種以PCR-為基礎的(PCR-based)方法亦可被採用，俾以在一DNA分子中產生刪除、插入或者位址-指引的突變誘發(site-directed mutagenesis)，諸如，重疊延伸PCR (overlap extension PCR)(Wurch et al., 1998)，但不限於此一種。為了執行定點突變，數種其他的技術可被使用，作為實例，但不限於可被列舉的這一些：依據單(single)或者雙-引子

(double-primer) 方法的以寡核苷酸為基礎的突變發生 (oligonucleotide based mutagenesis)，以尿嘧啶併入 (uracil incorporation) 為基礎的 Kunkel 方法 (Kunkel method) (Kunkel, 1985)。這些方法是在實驗室手冊 [諸如，分子選殖，一實驗室手冊 (Sambrook、Fritsch 以及 Maniatis)] 中被廣泛地描述。

作為一額外的非限制性實例，可以被舉出的是：加入一脯氨酸 (Proline) 至或者相鄰於該樞紐區域。

在本發明之方法的一較佳具體例中，該修飾是選自於：

- i) 刪除該樞紐區域胺基酸序列的至少一胺基酸；和/或
- ii) 加入至少一個雙硫橋至該樞紐區域內。

為了闡明本發明，第一個方面 (i) 將首先被詳細說明而第二方面 (ii) 之後將被詳細說明。必須被瞭解的是：此順序僅是因為本申請案的書寫，以及如同在之後將是顯而易見的，這二個方面具有同樣的重要性。

在一個特定的具體例中，一種修飾該樞紐區域的胺基酸序列的方法將由刪除該樞紐區域胺基酸序列的至多 2、3 或者 4 個胺基酸所構成。

本發明的一個特定方面是：該單株抗體是一個二價抗體。實際上，如下面所見到的，有可能調節一抗體的促效/拮抗活性 (藉由修飾該抗體的結構)。首次，發明人報導一種就抗體而言在保留一個二價形式的同時調節此種促效/拮抗活性的原創方法，旨在保持良好的特性 (諸如長的半衰期或者效應子功能)。

在此亦可被提及的是：即使一單株抗體之樞紐區域的

修飾(為了增加效應子功能)已經在習知技藝中被報導,相反地,不曾被報導的是,這樣一種至該樞紐區域內的修飾在調節一單株抗體的促效/拮抗活性是有利的。清楚的是,就現存的先前技藝而言本發明的主體是新穎的以及有進步性的。

作為一依據於本發明的方法的一個方面,該單株抗體是一種嵌合抗體(chimeric antibody)。

依據“嵌合”抗體,意欲表示一種含有一衍生自一給定物種之一抗體的天然變異(輕鏈與重鏈)區域,組合以一異源於(heterologous to)該給定物種(例如,小鼠、馬、兔子、狗、母牛、雞等等)之物種之一抗體的輕鏈與重鏈恆定區域。

依據本發明的嵌合類型的抗體或者它們的片段可藉由使用一基因重組的技術被製備。例如,嵌合抗體可以藉由選殖一重組型DNA[含有一啟動子(promoter)與一編碼(coding)一個依據本發明的非-人類(non-human)(特別地,鼠類)單株抗體之變異區域的序列,以及一編碼人類抗體之恆定區域的序列]而被製造。由此一重組型基因所編碼的本發明的一嵌合抗體將會是,例如,一小鼠-人嵌合體(mouse-man chimera),這個抗體的特異性是由衍生自鼠類DNA的變異區域所決定,而它的同型物(isotype)是由衍生自人類DNA的恆定區域所決定。關於製備嵌合抗體的方法,有可能,例如,意指文件Verhoeyn等人(BioEssays, 8:74, 1988)、Morrison 等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6851-6855, 1984)或者美國專利案號4,816,567。

作為依據本發明的方法的另一個方面，該單株抗體是一種人類化抗體(humanized antibody)。

依據“人類化抗體”，意欲表示一含有衍生自一非人類來源(non-human origin)之一抗體的CDR區域的抗體，該抗體分子的其它部分是衍生自一個(或者來自於數個)人類抗體或者生殖細胞(germline)序列。更甚者，為了保留結合的親合力(affinity)，骨架(skeleton)的節段(segments)的一些殘基(稱為FR)可以被修飾(Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988)。

依據本發明的人類化抗體或者它們的片段可以藉由為熟習此技藝者所熟知的技術(諸如，例如，那些被描述於文件Singer et al., J. Immun. 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10: 1-142, 1992; 或者Bebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992中者)被製備。

其它的人類化(humanization)方法是熟習於此技藝人士所熟知為，例如，由Protein Design Lab (PDL)在專利申請案EP 0 451 216、EP 0 682 040、EP 0 939 127、EP 0 566 647或者US 5,530,101、US 6,180,370、US 5,585,089以及US 5,693,761中所描述的“CDR移植(CDR Grafting)”方法。下列這些專利申案亦可以被舉出：US 5,639,641、US 6,054,297、US 5,886,152以及US 5,877,293。

作為依據本發明之方法的另一個方面，該單株抗體是

一種人類抗體(human antibody)。

術語“人類抗體”包括所有具有一或多個衍生自人類免疫球蛋白序列的變異以及恆定區域的抗體。在一個較佳具體例中，所有的變異以及恆定領域(或者區域)是衍生自人類免疫球蛋白序列(完全人類抗體)。換句話說，它包括任一種具有衍生自人類生殖細胞免疫球蛋白序列的變異以及恆定區域(若存在的話)的抗體(亦即，它具有胺基酸序列是對應於那個由一人類所製造出的一個抗體所具者和/或已使用任一種為熟習此技藝人士所熟知的用於製造人類抗體的技術而被做出者)。

在一個具體例中，人類單株抗體是由一融合瘤(hybridoma)所製造出，該融合瘤包括一被融合至一永生化細胞(immortalized cell)的B細胞(B cell)，該B細胞是得自於一具有一包含有一人類重鏈轉殖基因(heavy chain transgene)以及一個輕鏈轉殖基因(light chain transgene)的基因轉殖非人類動物(transgenic non-human animal)[例如，一基因轉殖小鼠(transgenic mouse)]。

作為用於此種基因轉殖小鼠的實例，可以被舉出的是XENOMOUSE<sup>TM</sup>，它是一種包含有人類免疫球蛋白基因座(immunoglobulin loci)的大片段並且在小鼠抗體製造上是不足的經建造之小鼠品系(engineered mouse strain)(Green at al., 1994, Nature Genetics, 7:13-21)。XENOMOUSE<sup>TM</sup>製造一完全人類抗體的似-成人的(adult-like)人類總和(repertoire)，並且產生抗原-特異性(antigen-specific)人類單

株抗體。一個第二代XENOMOUSE<sup>TM</sup>含有大約80%的人類抗體總合 (Green & Jakobovits, 1998, J. Exp. Med., 188:483-495)。

任一種為熟習此技藝者所熟知的技術[諸如，噬菌體呈現技術(phage display technique)]亦可以被使用於產生依據本發明的人類抗體。

依據本發明的方法可以被用於任一類型的包含有一樞紐區域的免疫球蛋白(亦即，IgA、IgD以及IgG)。

作為一實例，就IgA同型物而言，一IgA1的樞紐區域包含有胺基酸序列PSTPPTPSPSTPPTSPS (序列辨識編號8) 而一IgA2的樞紐區域包含有胺基酸序列PPPPP (序列辨識編號9)。

以一種類似的方式，一IgD的樞紐區域包含有胺基酸序列SPKAQASSVPTAQPPAEGSLAKATTAPATTRNTRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTP (序列辨識編號10)。

作為本發明的一特定具體例，被偏好的是使用一IgG，包括，例如，IgG1、IgG2、IgG3或者IgG4。

對應於IgG樞紐區域之各種不同同型物的個別胺基酸序列是：

PKSCDKTHTCPPCP (序列辨識編號11)針對一IgG1，

RKCCVECPCP (序列辨識編號7)針對一IgG2，

LKTPLFTGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKS  
CDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP (序列辨識編號12)針對一IgG3，以及

SKYGPPCPSCP (序列辨識編號13)針對一IgG4。

仍是更特別地，被偏好的是使用一IgG1。事實上，在治療性抗體的領域中，以及更特別地在癌症的治療中，被偏好的是生產IgG1，俾以獲得除了被連結至特異性結合到一經標靶之抗原(targeted antigen)的功能之外的效應子功能(諸如ADCC以及CDC)。

本發明的方法的特徵在於該單株抗體是一種IgG1。

“標的分子(Target molecule)”，落在本發明的意義之內，是有關於任一種單株抗體能夠特異性地結合至它或者調節活性的分子。一般而言，此種標的分子可被稱為“抗原(antigen)”。

作為可被一單株抗體所標靶之標的分子的非限定實例，可以被舉出的是可溶性配位子(soluble ligands)、受體[諸如，穿膜受體(transmembrane receptors)、膜腫瘤標記(membrane tumoral markers)等等]。

在一個較佳具體例中，該標的分子是一穿膜受體。

詞句“穿膜受體”是有關於一種跨越一個細胞之細胞膜的蛋白質，帶有具有結合至一配位子的能力之蛋白質的細胞外領域(extracellular domain)以及具有一在配位子結合之後可被改變(被增加或者被減低)的活性(諸如一蛋白質激酶)的細胞內領域(intracellular domain)。換句話說，穿膜受體典型地是膜主體蛋白(integral membrane proteins)，它們典型地存在以及作用於細胞的細胞膜之內，但亦在一些次細胞區間(subcellular compartments)以及胞器(organelles)的細

胞膜中。在膜的一側結合至一信號分子(signalling molecule) 或者有時至一對這樣的分子，穿膜受體起始一在另一側的反應。以此方式，它們在細胞溝通(cellular communications) 以及訊息轉導(signal transduction)上扮演一個獨特以及重要的角色。

許多穿膜受體是組合以二或多個共同運作並且可以在配位子結合、脫落或者處於它們的“活化”週期的另一階段時解離的蛋白質次單元(protein subunits)所構成。它們通常根據它們的分子結構(molecular structure)，或者因為儘管結構是未知的(除了少數的受體以外)而根據它們假設的(以及有時經實驗確認的)細胞膜拓樸學(membrane topology)被分類。最簡單的多肽鏈(polypeptide chains)被預測僅會跨越脂質雙層(lipid bilayer) 1次，而其它會跨越多如7次[所謂的G蛋白質-偶合受體(G-protein coupled receptors)或者GPCRs] 或者更多次。

像是任一膜主體蛋白，一穿膜受體可被細分為三個部分或者領域(domains)：一細胞外領域(extracellular domain)、一穿膜領域(transmembrane domain)以及一細胞內領域(intracellular domain)。

該細胞外領域是受體在細胞或者胞器外側突出於細胞膜的一個部分。若受體的多肽鏈跨越雙層數次，外領域(external domain)可以包含有數個突出於細胞膜的“環(loops)”。按照定義，受體的一個主要功能是辨識一特異性配位子[例如，一神經傳導物(neurotransmitter)或者激素

(hormone)]並且對該特異性配位子起反應[雖然某些受體亦對穿膜電位(transmembrane potential)的改變起反應]，並且在許多受體中這些配位子結合至細胞外領域。

在存在有結構證據的大多數受體中，穿膜 $\alpha$ 螺旋(transmembrane alpha helices)構成穿膜領域的大部分。在某些受體[諸如菸鹼酸乙醯膽鹼受體(nicotinic acetylcholine receptor)]中，穿膜領域形成一蛋白質-排列的孔(protein-lined pore)，或者離子通道(ion channel)。在藉由適當配位子結合而活化一細胞外領域時，該孔變成對離子(接而通過)是可進入的。在其它受體中，穿膜領域被推測在配位子結合之後經歷一會細胞內地發揮一效用的構形改變(conformational change)。在一些受體[諸如7TM超家族(7TM superfamily)的成員]中，穿膜領域可以含有一配位子結合袋(ligand binding pocket)。

受體的細胞內[或者細胞質(cytoplasmic)]領域與細胞或者胞器的內部交互作用而接替信號。就這個交互作用而言有二種根本上不同的方式：a)細胞內領域經由特異性蛋白質-蛋白質交互作用(protein-protein-interactions)與效應子蛋白質(effector proteins)溝通，該等效應子蛋白質依次沿著一信號鏈(signal chain)發送信號到它的目的地，以及b)利用酵素連結的受體(enzyme-linked receptors)，細胞內領域具有酵素活性(enzymatic activity)。一般而言，這是一種酪胺酸激酶活性(tyrosine kinase activity)。該酵素活性可亦位在一與細胞內領域相關聯的酵素上。

有數種方式供細胞去調節一穿膜受體的活性。它們大多數是經由細胞內領域來運作。最為重要的方式是磷酸化以及內化(internalization)[參見泛素(ubiquitin)]或者次級傳訊子級聯(second messenger cascades)(諸如cAMP、IP、Ca<sup>2+</sup>或者cGMP)的活化。

所有表現出酵素活性的膜蛋白質(membrane proteins)亦可以藉由帶有被描述於本發明中之修飾的抗體而被標靶。可以被舉出作為一實施例，但在無限制下：基質金屬蛋白酶(matrix metalloprotease, MMP)家族、“一去整合蛋白以及一金屬蛋白酶領域蛋白酶(a disintegrin and a metalloprotease domain protease)”(ADAM)家族、腺苷酸環化酶(adenylate cyclases)...

所有作用有如離子通道、孔以及轉運體(transporter)的膜蛋白亦可以藉由帶有被描述於本發明中之修飾的抗體而被標靶。可以被舉出作為一實例，但在無限制下：鈉通道家族(sodium channel family)、鉀通道家族(potassium channel family)、菸鹼酸乙醯膽鹼受體家族(nicotinic acetylcholine receptor family)、 $\sigma$ 受體(sigma receptors)、單胺轉運體家族(monoamine transporter family)。

更廣泛地，所有被辨識為針對一給定疾病的特異性標記(specific markers)的膜蛋白亦可以藉由一抗體處理(antibody treatment)被標靶，該抗體亦可以藉由被描述於本發明中的修飾而被改良。

在本發明的一個較佳具體例中，該穿膜受體是選自於

由下列所構成的群組：酪胺酸激酶受體 (tyrosine kinase receptor)、四跨膜蛋白 (tetraspanin) 以及 GPCRs。

在一個更佳具體例中，該穿膜受體是一優先地選自由下列所構成之群組中的酪胺酸激酶受體：IGF-1R、c-Met、RON、Axl、VEGF、VEGFR、Her-2neu、ErbB 家族的同型二聚物以及異型二聚物 (homodimers and heterodimers of the ErbB family) 等等。

在本申請案中，以及更特別地在下列說明書中，序列將參考 IMGT 被定義。IMGT 獨特編號已經被定義，俾以比較不論是抗原受體、鏈類型 (chain type) 或者物種 [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997); Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. 以及 Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)] 的變異領域。在 IMGT 獨特編號中，守恆的胺基酸總是具有相同的位置，例如，半胱胺酸 23 (cysteine 23) (1st-CYS)、色胺酸 41 (tryptophan 41) [守恆的 -TRP (CONSERVED-TRP)]、疏水性胺基酸 89 (hydrophobic amino acid 89)、半胱胺酸 104 (cysteine 104) (2nd-CYS)、苯丙胺酸或者色胺酸 118 (phenylalanine or tryptophan 118) (J-PHE 或者 J-TRP)。IMGT 獨特編號提供框架區域 (framework regions) (FR1-IMGT：位置 1 至 26、FR2-IMGT：39 至 55、FR3-IMGT：66 至 104 以及 FR4-IMGT：118 至 128) 以及互補決定區域 (complementarity determining regions)

(CDR1-IMGT : 27 至 38 、 CDR2-IMGT : 56 至 65 以及 CDR3-IMGT : 105 至 117) 的一標準化定限 (standardized delimitation) 。當間隙 (gaps) 代表未被佔用的位置 (unoccupied positions) 時，CDR-IMGT 長度 (被顯示在括號之間並且藉由點所分開，例如 [8.8.13]) 成為重要的資訊。IMGT 獨特編號被使用在命名為 IGMT Colliers de Perles [Ruiz, M. 以及 Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002); Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)] 的 2D 圖示 (2D graphical representations) 中以及在 IGMT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. 以及 Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)] 的 3D 結構中。

對於熟習此技藝的人士而言，將依據所述發明將 IGMT 系統調換成任一種其它的編號系統 [例如，Kabat 編號系統 (Kabat numbering system)] 將會是明顯的。

用於所有物種的所有 IG 以及 TR V- 區域等 (TR V-REGIONS) 的 IGMT 獨特編號仰賴變異區域之結構的高度守恆 (high conservation) 。這個在排列大於 5 000 序列之後所建立的編號納入考量並且結合框架 (framework, FR) 與互補決定區域 (complementarity determining regions, CDR) 的定義、來自於 X-射線繞射研究 (X-ray diffraction studies) 的結構資料以及高變異性環的特徵鑑定 (the characterization of the hypervariable loops) 。FR-IMGT 以及 CDR-IMGT 區域的定限 (delimitations) 已經被定義。相似地，IMGT 獨特編號已

被運用於C-領域(C-DOMAIN)，並且容許似-Ig領域(Ig-like domains)的精確定限。C-領域對應於完整的C-區域(C-REGION)，對應於大部分的C-區域或者僅對應於部分的C-區域，端視免疫球蛋白(IG)類型而定。

用於C-領域(IG以及TR)的IMGT編號被衍生作為用於V-領域(V-DOMAIN)的IMGT編號[源自於用於V-區域(V-REGION)的主要TMGT獨特編號(princeps IMGT unique numbering)，高至位置104]。胺基酸位置可因此易於在C-領域以及V-領域之間被比較。

為了精確地定位樞紐區域(Hinge regions)，C-領域的IMGT編號被運用來精確地定位CH1以及CH2領域。樞紐區域包括在IMGT-CH1的最後一個殘基以及IMGT-CH2的第一個殘基之間的所有胺基酸殘基。

所有其它涵括相同樞紐領域的免疫球蛋白編號架構(諸如，Kabat或者A. Honegger)皆被包括在本發明中。

作為本發明的一個較佳實例，根據如上所述的IMGT編號系統，一IgG1的樞紐區域的胺基酸序列包含有殘基H1至H14(具有對應於上樞紐的節段H1至H9以及對應於核心樞紐的節段H10至H14節段)。更特別地，人類IgG1樞紐區域包含有胺基酸序列PKSCDKTHTCPPCP(序列辨識編號11)，而鼠類IgG1樞紐區域包含有胺基酸序列PRDCGCKPCICT(序列辨識編號14)。

表 1

樞紐區域	編號	人類-IgG1 (序列辨識 編號11)	鼠類IgG1 (序列辨識 編號14)	人類-IgG2 (序列辨識 編號7)	人類IgG4 (序列辨識 編號11)
上樞紐	H1	P	P	-	-
	H2	K	R	R	S
	H3	S	D	K	K
	H4	C	C	C	Y
	H5	D	G	-	-
	H6	K	-	-	-
	H7	T	C	C	G
	H8	H	K	V	P
	H9	T	P	E	P
核心樞紐	H10	C	C	C	C
	H11	P	I	P	P
	H12	P	-	P	S
	H13	C	C	C	C
	H14	P	T	P	P

在本發明的一個較佳具體例中，一個修飾被認為旨在減低編碼一個二價抗體的樞紐區域之蛋白質序列的長度。更特別地，依據本發明的方法包含有一個在該樞紐區域中刪除至少一胺基酸序列的步驟。

如先前所提及的，被偏好的是刪除該樞紐區域的至多2個胺基酸。

如先前所提及的，被偏好的是刪除該樞紐區域的至多3個胺基酸。

如先前所提及的，被偏好的是刪除該樞紐區域的至多4個胺基酸。

在本發明之方法的一個特定用途中，該修飾是由至少一選自於在位置H1、H2、H3、H5、H6、H7、H8、H9、H11、H12或者H14的胺基酸之一胺基酸的刪除所構成。

更特別地，發明人已經證實：特定殘基的指涉以及本發明的一個特別的進步性方面是由特定殘基的選擇所構成。

在一IgG1的較佳實例中，在位置H1的胺基酸是由一脯胺酸(Proline)所構成；在位置H2的胺基酸在人類形式中是由一離胺酸(Lysine)而在鼠類形式中是由一精胺酸(Arginine)所構成；在位置H3的胺基酸在人類形式中是由一絲胺酸(Serine)而在鼠類形式中是由一天冬胺酸(Aspartate)所構成；在位置H5的胺基酸在人類形式中是由一天冬胺酸而在鼠類形式中是由一甘胺酸(Glycine)所構成；在位置H6的胺基酸由一離胺酸所構成；在位置H8的胺基酸由在人類形式中是由一組胺酸(Histidine)而在鼠類形式中是由一離胺酸所構成；在位置H9的胺基酸在人類形式中是由一蘇胺酸(Threonine)而在鼠類形式中是由一脯胺酸所構成；在位置H11的胺基酸序列在人類形式中是由一脯胺酸而在鼠類形式中是由一個異白胺酸(Isoleucine)所構成；以及在位置H12的胺基酸序列在人類形式中是由一脯胺酸所構成。

依據一個較佳具體例，這個刪除必須在“上樞紐”區域中被做出。

在一個更佳的具體例中，以一IgG1為例，相較於由胺基酸H10至H14所構成的“核心樞紐”，這個刪除是由胺基酸H1至H9所構成的“上樞紐”的部分。

在本申請案中，胺基酸編號是顧及如上所述的IMGT系統而被做出。明顯的是：任一種其它的編號系統(具有編號

的修飾但未涉及在樞紐區域中殘基的本質)必須被視為等效的。作為一實例，以Kabat系統重新編號本發明的已鑑定出的胺基酸部分(依據IMGT系統)必須被視為等效的。

本發明的另一個方面是以刪除至少一半胱胺酸(Cysteine)至“上樞紐”區域內為基礎，較佳地位於位置H4。

本發明的另一個方面是以加入至少一雙硫橋(disulfide bridge)至該樞紐區域內為基礎。

更特別地，本發明的方法的特徵在於：該修飾是由導入至少一半胱胺酸至“上樞紐”區域內所構成。

依據發明人，一似乎合理的解釋是依據由減低長度和/或導入另一個雙硫橋所造成的樞紐的可能“僵化(rigidification)”。此種“僵化”將容許維持抗體的一適當空間構型(spatial conformation)，因而，帶有一增進的拮抗活性。

清楚的是：任一種旨在僵化該樞紐區域的方法必須被視為一依據本發明的方法的等效方法。

一個半胱胺酸的導入可藉由加入此一胺基酸被做出，該加入是藉由任一種為熟習此技藝者所熟知的方法被做出。

另一個將一半胱胺酸導入至該樞紐區域內的較佳方式是由取代至少一胺基酸所構成。

更特別地，一個將一半胱胺酸導入至該樞紐區域內的較佳方式是由取代至少一選自於從H1至H9的胺基酸所構成。諸如此類的一個取代可藉由任一種為熟習技藝者所熟知的方法被做出。

更特別地，本發明的方法包含有以一半胱胺酸取代在位置H7的蘇胺酸至該“上樞紐”區域內。

在另一個具體例中，本發明的方法包含有以一半胱胺酸取代在位置H6的離胺酸至該“上樞紐”區域內。

在又另一個具體例中，本發明的方法包含有以一半胱胺酸取代在位置H1的脯胺酸至該“上樞紐”區域內。

在又另一個具體例中，本發明的方法包含有以一半胱胺酸取代在位置H2的離胺酸至該“上樞紐”區域內。

在又另一個具體例中，本發明的方法包含有以一半胱胺酸取代在位置H3的絲胺酸至該“上樞紐”區域內。

在又另一個具體例中，本發明的方法包含有以一半胱胺酸取代在位置H5的天冬胺酸至該“上樞紐”區域內。

在又另一個具體例中，本發明的方法包含有以一半胱胺酸取代在位置H8的組胺酸至該“上樞紐”區域內。

在又另一個具體例中，本發明的方法包含有以一半胱胺酸取代在位置H9的蘇胺酸至該“上樞紐”區域內。

依據另一個具體例，有可能藉由改變編碼該樞紐區域的胺基酸序列整體來減低該樞紐區域的長度和/或加入一個雙硫橋。

作為一個較佳的實例，本發明的方法之修飾是由以IgG2樞紐區域的胺基酸H1至H14來替代IgG1樞紐區域的該胺基酸H1至H4胺基酸所構成，較佳地當被意欲要增進其拮抗活性的該單株抗體是一IgG1抗體時。

在另一個應用中，本發明是有關於一種篩選有關一針

對拮抗一特異性標的分子的拮抗劑單株抗體，或者它的一個二價功能性片段或衍生物的方法，該抗體能夠抑制該標的分子的一或多種生物活性，其中該方法包含有下列步驟：

(a) 選擇一具有一抑制該標的分子的一或多種生物活性之初始位準(initial level)的初始抗體(initial antibody)，

(b) 藉由本發明的方法修飾該初始抗體之該樞紐區域的胺基酸序列，

(c) 評估該步驟(b)之經修飾的抗體關於它抑制該標的分子的一或多種生物活性的能力，以及

(d) 作為一正向結果，選擇具有該標的分子之該一或多種生物活性之一抑制位準是高於該抑制的初始位準之步驟(c)的抗體。

初始抗體可以在現有的抗體中被選擇，諸如，沒有限定，對IGF-1R、c-Met、RON、Axl、CD151、VEGF、VEGFR、Her-2neu、ErbB家族的同型二聚物以及異型二聚物的抗體拮抗劑。作為非限制性的較佳實例，該初使抗體可由賀癌平(Herceptin)、帕妥珠單抗(Pertuzumab)、西妥昔單抗(Cetuximab)、抗-VEGFR或者抗-IGF-1R抗體所構成。

“抑制位準(Inhibition level)”，落在本發明的意義內，例示說明一抗體的拮抗活性。此種抑制位準可藉由任一種為熟習技藝者所熟知的方法[諸如，沒有限定，諸如a)直接細胞計數(direct cell counting)或者使用 $^3\text{H}$ 胸腺嘧啶( $^3\text{H}$  Thymidine)、四氮唑鹽(tetrazoline salts)或者任何其他評估增生(proliferation)的螢光方法(fluorescent means)、b)監測

訊息轉導 (signal transduction) 的西方墨點法 (western blotting)、磷酸-ELISA (phospho-ELISA) 或者  $\alpha$ -篩選分析 (alpha-screen assays)、c) 用於二聚作用分析 (dimerization assay) 的 BRET 或者 FRET 分析、d) 監測移行 (migration)、入侵 (invasion)、血管生成 (angiogenesis) 或者型態發生 (morphogenesis) 的顯微鏡或者螢光方法以及 e) 用於活體內評估 (*in vivo* evaluations) 的腫瘤的卡尺量測 (calliper measurement)] 而被決定。

這個篩選方法可被使用於改良經證實的抗體或者作為用於研究或者臨床前 (pre-clinical) 抗體的一篩選階段。

依據本發明的另一個方面是有關於一種可藉由本發明的方法而獲得之針對拮抗一特異性的標的分子的單株抗體、或者它的二價功能性片段或衍生物，該抗體的特徵在於其包含有一選自於由下列所構成之群組中的樞紐區域胺基酸序列：序列辨識編號 1 (PRDCGCKPCICT)、序列辨識編號 2 (PKSCGCKPCICT)、序列辨識編號 3 (PKSCGCKPCICP)、序列辨識編號 4 (PRDCGCKPCPPCP)、序列辨識編號 5 (PRDCGCHTCPPCP)、序列辨識編號 6 (PKSCDCHTCPPCP)、序列辨識編號 7 (RKCCVECPCPPCP)、序列辨識編號 22 (CKSCDKTHTCPCPPCP)、序列辨識編號 23 (PCSCDKTHTCPCPPCP)、序列辨識編號 24 (PKCCDKTHTCPCPPCP)、序列辨識編號 25 (PKSCCKTHTCPCPPCP)、序列辨識編號 26 (PKSCDCTHTCPCPPCP)、序列辨識編號 27

(PKSCDKCHTCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 28  
 (PKSCDKTCTCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 29  
 (PKSCDKTHCCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 30  
 (PKSCDKTHTCCPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 31  
 (PKSCDKTHTCPCCP) 、 序 列 辨 識 編 號 32  
 (PKSCDKTHTCPPCC) 、 序 列 辨 識 編 號 33  
 (PSCDKTHTCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 34  
 (PKSCDTHTCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 35  
 (PKSCDKTHCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 36  
 (KCDKTHTCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 37 (PSCKTHTCPPCP) 、  
 序 列 辨 識 編 號 38 (PKSCDTHCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 39  
 (PKSCTHTCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 40 (PKSCDKTTCPCP) 、  
 序 列 辨 識 編 號 41 (PKSCDKTHCPPC) 、 序 列 辨 識 編 號 42  
 (PKSCDCHTCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 43  
 (PKSCDCTHCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 44  
 (PCSKHTHTCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 45 (PSCCTHTCPPCP) 、  
 序 列 辨 識 編 號 46 (PSCDKHCCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 47  
 (PKSTHTCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 48 (PKSCTCPPCP) 或者序  
 列 辨 識 編 號 49 (PKSCDKCVECPCP) 。

藉由實施本發明的方法而被獲得的一較佳單株抗體的特徵可以是在於其包含一選自於由下列所構成之群組中的胺基酸序列：序列辨識編號1 (PRDCGCKPCICT)、序列辨識編號2 (PKSCGCKPCICT)、序列辨識編號3 (PKSCGCKPCICP)、序列辨識編號4 (PRDCGCKPCPPCP)、

序列辨識編號5 (PRDCGCHTCPPCP)、序列辨識編號6  
 (PKSCDCHCPPCP)、序列辨識編號7 (RKCCVECPCP)、序  
 列辨識編號22 (CKSCDKTHTCPPCP)、序列辨識編號23  
 (PCSCDKTHTCPPCP)、序列辨識編號24  
 (PKCCDKTHTCPPCP)、序列辨識編號25  
 (PKSCCKTHTCPPCP)、序列辨識編號26  
 (PKSCDCTHTCPPCP)、序列辨識編號27  
 (PKSCDKCHTCPPCP)、序列辨識編號28  
 (PKSCDKTCTCPPCP)、序列辨識編號29  
 (PKSCDKTHCCPPCP)、序列辨識編號30  
 (PKSCDKTHTCCPCP)、序列辨識編號31  
 (PKSCDKTHTCPCCP)、序列辨識編號32  
 (PKSCDKTHTCPPCC)、序列辨識編號33  
 (PSCDKTHTCPPCP)、序列辨識編號34  
 (PKSCDTHTCPPCP)、序列辨識編號35  
 (PKSCDKTHCPPCP)、序列辨識編號36  
 (KCDKTHTCPPCP)、序列辨識編號37 (PSCKTHTCPPCP)、  
 序列辨識編號38 (PKSCDTHCPPCP)、序列辨識編號39  
 (PKSCTHTCPPCP)、序列辨識編號40 (PKSCDKTTCP)  
 序列辨識編號41 (PKSCDKTHCPPC)、序列辨識編號42  
 (PKSCDCHTCPPCP)、序列辨識編號43  
 (PKSCDCTHCPPCP)、序列辨識編號44  
 (PCSCKHTCPPCP)、序列辨識編號45 (PSCCTHTCPPCP)、  
 序列辨識編號46 (PSCDKHCCPPCP)、序列辨識編號47

(PKSTHTCPPCP)、序列辨識編號48 (PKSCTCPPCP)或者序列辨識編號49 (PKSCDKCVECPCP)。

在一個較佳具體例中，該單株抗體是一種人類抗體，更佳的是一種IgG1抗體。

本發明亦有關於一編碼一如前所述的單株抗體(亦即，包含有一選自於由下列所構成之群組中的樞紐區域胺基酸序列)之經分離的核酸(nucleic acid)：序列辨識編號1 (PRDCGCKPCICT)、序列辨識編號2 (PKSCGCKPCICT)、序列辨識編號3 (PKSCGCKPCICP)、序列辨識編號4 (PRDCGCKPCPPCP)、序列辨識編號5 (PRDCGCHTCPPCP)、序列辨識編號6 (PKSCDCHCPPCP)、序列辨識編號7 (RKCCVECPCP)、序列辨識編號22 (CKSCDKTHTCPPCP)、序列辨識編號23 (PCSCDKTHTCPPCP)、序列辨識編號24 (PKCCDKTHTCPPCP)、序列辨識編號25 (PKSCCKTHTCPPCP)、序列辨識編號26 (PKSCDCTHTCPPCP)、序列辨識編號27 (PKSCDKCHTCPPCP)、序列辨識編號28 (PKSCDKTCTCPPCP)、序列辨識編號29 (PKSCDKTHCCPPCP)、序列辨識編號30 (PKSCDKTHTCCPCP)、序列辨識編號31 (PKSCDKTHTCPCCP)、序列辨識編號32 (PKSCDKTHTCPCC)、序列辨識編號33 (PSCDKTHTCPPCP)、序列辨識編號34

(PKSCDTHTCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 35  
 (PKSCDKTHCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 36  
 (KCDKTHTCPPCP)、序列辨識編號37 (PSCKTHTCPPCP) 、  
 序 列 辨 識 編 號 38 (PKSCDTHCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 39  
 (PKSCTHTCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 40 (PKSCDKTTCP) 、  
 序 列 辨 識 編 號 41 (PKSCDKTHCPPC) 、 序 列 辨 識 編 號 42  
 (PKSCDCHTTPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 43  
 (PKSCDCTHCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 44  
 (PCSKHTTPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 45 (PSCCTHTTPCP) 、  
 序 列 辨 識 編 號 46 (PSCDKHCCPPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 47  
 (PKSTHTTPCP) 、 序 列 辨 識 編 號 48 (PKSCTTPCP) 或者序  
 列 辨 識 編 號 49 (PKSCDKCVECPPCP) 。

依據本發明的又另一個方面，本發明是有關於一種經分離的核酸，特徵在於它是選自於下列核酸：

a) 一編碼一依據本發明之人工樞紐區域(artificial hinge region)的核酸(DNA或者RNA)、它的對應RNA核酸或者它的互補序列(complementary sequence)；

b) 一經分離的核酸序列[包含有一選自於由下列所構成之群組中的核酸序列(nucleic sequence): 序列辨識編號15至序列辨識編號21、序列辨識編號50至序列辨識編號77]、它的對應RNA核酸或者它的互補序列；以及

c) 一具有至少18個核苷酸的核酸，能夠在高度嚴苛(high stringency)的條件下與序列序列辨識編號15至21以及50至77的至少一者雜交。

較佳地，本發明包含有一經分離的核酸，它包含有一選自於由下列所構成之群組中的核酸序列：序列辨識編號15至序列辨識編號21以及序列辨識編號50至序列辨識編號77。

本發明的部分亦是一表現載體(expression vector)或者一經轉形的宿主細胞(transformed host cell)，它們包含有一如前所述之經分離的核酸以及，更特別地，一包含有一選自於由下列所構成之群組中的核酸序列之經分離的核酸：序列辨識編號15至序列辨識編號21以及序列辨識編號50至序列辨識編號77、它的對應RNA核酸以及它的互補序列。

按照核酸(nucleic acid)、核酸(nucleic)或者核酸序列(nucleic acid sequence)、聚核苷酸(polynucleotide)、寡核苷酸(oligonucleotide)、聚核苷酸序列(polynucleotide sequence)、核苷酸序列(nucleotide sequence)，將被中立地使用在本發明中的術語，意欲表示核苷酸[經修飾或未經修飾、容許一核酸的一片段或一區域被定義、含有或不含有非天然核苷酸，以及能夠對應於一雙股DNA(double-stranded DNA)、一單股DNA(single-stranded DNA)還有該等DNAs的轉錄產物(transcription products)]的精確鍵連(precise linkage)。

在此必須被瞭解的是：本發明並不涉及在它們的天然染色體環境中(也就是說在天然狀態中)的核苷酸序列。其涉及已經被分離和/或被純化[也就是說它們已經被直接地或者間接地(例如，藉由複製)被選擇]的序列，它們的環境已

經至少被部份地修飾。在此同樣意欲表示藉由基因重組(例如，以宿主細胞的方法)所獲得或者藉由化學合成所獲得之經分離的核酸。

一在高度嚴苛的條件下的雜交(hybridization)意指溫度條件以及離子強度(ionic strength)條件是以一種它們容許維持在互補DNA的2個片段之間的雜交的方式而被選擇。經由詳細說明，為了定義上述聚核苷酸片段，下列雜交步驟的高度嚴苛的條件是有利的。

DNA-DNA或者DNA-RNA雜交以2個步驟被執行：(1)在42°C下於含有5 x SSC [1 x SSC 對應於一為0.15 M NaCl + 0.015 M檸檬酸鈉溶液(sodium citrate solution)]、50%的甲醯胺(formamide)、7%的十二基硫酸鈉(sodium dodecyl sulfate, SDS)、10 x丹哈特氏(Denhardt's)、5%硫酸葡聚糖(dextran sulfate)以及1%鮭魚精子DNA (salmon sperm DNA)]的磷酸鹽緩衝液(phosphate buffer)(20 mM, pH 7.5)中歷時3小時的預雜交(prehybridization)；(2)在一視探針(probe)的尺寸而定的溫度(亦即：42°C，針對>100個核苷酸的一探針尺寸)下歷時20小時的實際雜交，繼之以在20°C下於2 x SSC + 2%的SDS中2次20分鐘的清洗、在20°C下於0.1 x SSC + 0.1%的SDS中1次20分鐘的清洗。最後一次的清洗是於60°C(針對>100個核苷酸的一探針尺寸)下在0.1 x SSC + 0.1 %的SDS中歷時30分鐘而被完成。依據Sambrook等人的教示(1989, Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor)，上述高度嚴苛的雜交條件(針對一

具有限定尺寸的聚核苷酸)可藉由熟習此技藝的人士針對具有較大或者較小尺寸的寡核苷酸而被改變。

本發明同樣是有關於一種包含有一依據本發明之核酸的載體。

本發明特別地旨在含有一依據本發明的核苷酸序列的選殖(cloning)和/或表現載體。

依據本發明的載體較佳地含有在一既定的宿主細胞中容許被轉譯的核苷酸序列的表現和/或分泌的要素(element)。該載體因此必須含有一啟動子(promoter)、轉譯的起始(initiation)以及終止(termination)的信號，以及調節轉錄的適當(appropriate)區域。它必須能夠在宿主細胞中以一穩定的方式被維持(maintained)著並且能夠選擇性地具有指定分泌被轉譯的蛋白質的特定信號。這些各種不同的要素是藉由熟習此技藝之人士隨著所使用的宿主細胞的一功能而被選擇以及被最佳化。對此效用，依據本發明的核苷酸序列可以被插入至在一被選定的宿主內的自發性複製載體(autonomous replication vector)內，或者為被選定的宿主的整合性載體(integrative vectors)中。

此等載體是由熟習此技藝的人士依據目前所使用的方法被製備，並且所形成的選殖株(clones)可藉由標準方法[諸如，脂質體轉染(lipofection)、電穿孔(electroporation)、熱休克(thermal shock)或者化學方法]被導入至一適當的宿主內。

依據本發明的載體是，例如，質體或者病毒來源

(plasmidic or viral origin)的載體。它們可應用於轉形宿主細胞，俾以選殖或者表現依據本發明的核苷酸序列。

本發明同樣包含有被轉形以或者包含有一依據本發明的載體的宿主細胞。

宿主細胞可以選自於原核 (prokaryotic) 或者真核 (eukaryotic) 系統 [例如，細菌細胞但也有酵母菌細胞或者動物細胞，特別是哺乳動物細胞 (mammalian cells)]。同樣有可能使用昆蟲細胞 (insect cells) 或者植物細胞 (plant cells)。

### 實施例1：嵌合Mabs的構築以及c-Met受體磷酸化狀態的功能性評估

數個標靶一原型酪胺酸激酶受體 (prototypical tyrosine kinase receptor) (c-Met受體) 的小鼠Mabs被重排 (reformatted) 有如帶有小鼠變異領域 (variable domains) 以及人類恆定領域 (constant domains) 的嵌合Mabs。它們的內在活性 (intrinsic activities) 是根據一監測配位子 (HGF)- 依賴性 c-Met 受體磷酸化的抑制的功能性分析而被分析。

在小鼠變異領域序列 (VH, VL) 的PCR-選殖時，嵌合Mabs在一帶有小鼠VH或者VL序列的 {*Nhe1-Bcl1*} 的限制片段 (restriction fragment) 接合至一帶有一IgG1免疫球蛋白的一人類輕鏈C<sub>κ</sub> 或者一人類重鏈 [CH1-樞紐-CH2-CH3] 的恆定領域之完整編碼序列的pCEP4載體 (InVitrogen, US) 內之後而被構築。所有的選殖步驟是依據有如在實驗室手冊 (Sambrook and Russel, 2001) 中所述的習知分子生物學技術或者依據供應商的指引 (instructions) 被執行。各個基因建構

物是藉由使用 Big Dye 終止子循環定序套組 (Big Dye terminator cycle sequencing kit)(Applied Biosystems, US)的核苷酸定序而被充分地確認並且使用一3100基因分析儀 (3100 Genetic Analyzer)(Applied Biosystems, US)予以分析。對應嵌合Mabs的製造是使用被生長在無血清培養基 Excell 293 (SAFC Biosciences)[被補充以6 mM 麩醯胺酸 (glutamine)]中的懸浮-適應的(suspension-adapted) HEK293 EBNA細胞(InVitrogen, US)而被執行。暫時性轉染(transient transfection)是使用線性(linear) 25 kDa 聚乙亞胺 (polyethyleneimine, PEI)(Polysciences)而被執行。培養過程(cultivation process)是根據細胞可活性(cell viability)以及 Mab 製造而被監測。Mabs是使用一在一蛋白質A樹脂 (Protein A resin)(GE Healthcare, US)上的習知層析方法 (conventional chromatography approach)而被純化。

所有不同形式的Mabs是以適合於(suitable with)功能性評估的位準被製造。生產率位準(productivity levels)典型地落在範圍介於15以及30 mg/l之間的經純化的Mabs。

功能性評估是對A549人類肺癌細胞而被執行。c-Met 受體磷酸化狀態是使用一特異性捕捉ELISA分析而在細胞溶胞產物(cell lysates)上被監測。一山羊抗-c-Met Mab (goat anti-c-Met Mab)(R&D, ref AF276)被使用作為捕捉抗體 (capture antibody)，而偵測抗體(detection antibody)對應於一抗-磷酸-c-Met Mab (anti-phospho-c-Met Mab)(Biosource ref KHO0281)。發光讀數(Luminescence readings)被紀錄在

一 Mithras LB920 多模式培養盤讀取儀 (Mithras LB920 multimode plate reader)(Berthold)上。

所有三種鼠類Mabs 11E1、224G11以及227H1在c-Met受體磷酸化上產生可相比擬的內在活性：它們本身幾乎沒有促效劑活性(少於HGF效用的5%，第1A圖)，以及HGH [100 ng/ml]-誘發的c-Met受體磷酸化的一個強烈抑制(>HGH效用的70%抑制，第1B圖)。非常令人驚訝地，藉由僅僅修飾Mab's的恆定領域由一小鼠IgG1/ $\kappa$ 轉換成人類IgG1 $\kappa$ ，所形成的嵌合Mabs之內在活性的一個完全修飾被觀察到(第1A至第1B圖)。事實上，強烈的促效作用(agonism)(就c11E1而言達到HGF效用的20%，第1A圖)被觀察到與一拮抗劑效力(antagonist efficacy)上的重大減低(就c224G11而言僅剩餘HGF效用的抑制的60%，第1B圖)相關聯。這個效用與抗體的變異領域無涉，因為就所探究的三種Mabs [11E1、224G11以及227H1單株抗體藉由鼠類融合瘤(hybridoma)被分泌並且被描述於以編號WO 2009/007427被公開的PCT專利申請案中]而言相同的現象被觀察到。

## 實施例2：經建造的樞紐型式之設計、選殖以及製造

根據上面所做的觀察，假設在小鼠IgG1重排至人類IgG1 Mabs內之後所觀察到的受損的藥理學圖譜(pharmacological profiles)是因為人類IgG1領域。

在一方面，在文獻中已熟知的是：c-Met受體的活化與它的二聚作用相關聯，而且c-Met受體二聚作用的抑制可能

會抑制c-Met受體磷酸化與下游信號。

在另一方面，Mabs本質上因為它們先天的結構基礎而為二價分子，並且因而它們可作用有如c-Met受體二聚作用的誘導物(inducers)。

因此，假設藉由限制嵌合Mabs的構型彈性[諸如，旋轉、彎曲或者擺動(wagging)](參見Roux et al., 1997)，有可能重新獲得親代小鼠Mabs之感興趣的內在活性[強烈的拮抗作用(antagonism)以及微弱的促效作用(agonism)]。這個假設是藉由分析小鼠以及人類IgG1樞紐區域(亦被意指為IgG1 H-區域)之個別序列而被強化：

小鼠IgG1 H-區域 PRDCGCKPCICT (序列辨識編號1)

人類IgG1 H-區域 PKSCDKTHTCPPCP (序列辨識編號11)

人類IgG2 H-區域 RKCCVECPCPP (序列辨識編號7)

這個排列顯示：當相較於人類IgG1 H-區域時，小鼠IgG1 H-區域是較短的並且含有一個額外的雙硫橋(Cys)。其亦顯示人類IgG2 H-區域在它的長度(11 AA)以及雙硫橋的數目(4)這兩方面類似那個小鼠IgG1 H-區域所具者。

因此，推測人類IgG1 H-區域之增高的剛性可能是藉由導入穩定突變(stabilizing mutations)[諸如，Cys殘基]和/或藉著縮短這個特定節段(segment)而被獲得。這個推定的H-區域之增高的剛性可能是與經建造的人類IgG1 Mabs之增

進的功能性特性相關聯。

一具有7種經建造的型式的第一系列已藉由製造嵌合H-區域(在介於小鼠以及人類序列之間的N-端或者C-端樞紐部分的交換)被設計(表2)。一個IgG2等效物的建構亦被執行。

表2

WT-IgG2		WT-IgG1		變異體(variants)				
Hu-IgG <sub>2</sub>	Hu-IgG <sub>1</sub>	Mu-IgG <sub>1</sub>	MH-IgG <sub>1</sub>	MMCH-IgG <sub>1</sub>	MMH-IgG <sub>1</sub>	MUP9H-IgG <sub>1</sub>	MUC7H-IgG <sub>1</sub>	TH7CΔβ, 9-IgG <sub>1</sub>
-	P	P	P	P	P	P	P	P
R	K	R	R	K	K	R	R	K
K	S	D	D	S	S	D	D	S
C	C	C	C	C	C	C	C	C
-	D	G	G	G	G	G	G	D
-	K	-	-	-	-	-	-	-
C	T	C	C	C	C	C	C	C
V	H	K	K	K	K	K	H	H
E	T	P	P	P	P	P	T	-
C	C	C	C	C	C	C	C	C
P	P	I	I	I	I	P	P	P
P	P	-	-	-	-	P	P	P
C	C	C	C	C	C	C	C	C
P	P	T	T	T	P	P	P	P

為了評估在H-區域內導入一個額外的半胱胺酸殘基，或者製造出至少一胺基酸的一刪除，或者同時地結合在H-區域內一半胱胺酸的加入以及至少一胺基酸的刪除的影響，一具有28個在H-區域中的突變體(mutants)的額外系列被設計以及被構築。

這個具有樞紐突變體的新穎系列被描述於表3中。

表3

	#01	#02	#03	#04	#05	#06	#07	#08	#09	#10	#11	#12	#13	#14
C1	C	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
C2	P	C	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
C3	P	K	C	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
C5	P	K	S	C	C	K	T	H	T	C	P	P	C	P
C6	P	K	S	C	D	C	T	H	T	C	P	P	C	P
C7	P	K	S	C	D	K	C	H	T	C	P	P	C	P
C8	P	K	S	C	D	K	T	C	T	C	P	P	C	P
C9	P	K	S	C	D	K	T	H	C	C	P	P	C	P
C11	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	C	P	C	P
C12	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	C	C	P
C14	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	C
Δ2	P	-	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ6	P	K	S	C	D	-	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ9	P	K	S	C	D	K	T	H	-	C	P	P	C	P
Δ1-3	-	K	-	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ2-5	P	-	S	C	-	K	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ6-9	P	K	S	C	D	-	T	H	-	C	P	P	C	P
Δ5-6	P	K	S	C	-	-	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ8-11	P	K	S	C	D	K	T	-	T	C	-	P	C	P
Δ9-14	P	K	S	C	D	K	T	H	-	C	P	P	C	-
C7Δ6	P	K	S	C	D	-	C	H	T	C	P	P	C	P
C6Δ9	P	K	S	C	D	C	T	H	-	C	P	P	C	P
C2Δ5-7	P	C	S	C	-	K	-	H	T	C	P	P	C	P
C5Δ2-6	P	-	S	C	C	-	T	H	T	C	P	P	C	P
C9Δ2-7	P	-	S	C	D	K	-	H	C	C	P	P	C	P
Δ4-5-6	P	K	S	-	-	-	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ5-6-7-8	P	K	S	C	-	-	-	-	T	C	P	P	C	P
IgG1/IgG2	P	K	S	C	D	K	C	V	E	C	P	P	C	P

作為一個樞紐建造的實例，一小鼠抗-c-Met Mab (anti-c-Met Mab)(被稱為224G11)的變異領域(重以及輕鏈)被選擇。

在一第一例中，這些小鼠序列被融合至人類恆定領域 [Cκ](就輕鏈而言)以及[CH1-樞紐-CH2-CH3](就人類IgG1重

鏈而言)。樞紐區域的修飾是藉由以帶有所欲修飾的等效部分交換一{Nhe1-Bcl1}限制片段而被執行，各個個別的{Nhe1-Bcl1}片段是藉由全面性基因合成(global gene synthesis) (Genecust, LU)而被合成。所有新的樞紐突變體在相同基礎上被構築。

所有的選殖步驟是依據有如在實驗室手冊(Sambrook and Russel, 2001)中所述的習知分子生物學技術或者依據供應商的指引被執行。各個基因建構物是藉由使用Big Dye終止子循環定序套組(Applied Biosystems, US)的核苷酸定序被充分地確認並且使用一3100基因分析儀(Applied Biosystems, US)予以分析。

懸浮-適應的HEK293 EBNA細胞(suspension-adapted HEK293 EBNA cells)(Invitrogen, US)被按慣例地生長於在一迴轉式震盪器(orbital shaker)(110 rpm旋轉速度)上的250 ml培養瓶的50 ml無-血清培養基Excell 293 (SAFC Biosciences)[被補充以6 mM麩醯胺酸(glutamine)]中。暫時性轉染是以 $2 \cdot 10^6$ 細胞/ml使用呈一為1 mg/ml的最終濃度而被配製於水中的線性25 kDa聚乙亞胺(PEI)(Polysciences)混合以質體DNA(就重相對於輕鏈質體比例為1:1而言，最終濃度為1.25  $\mu$ g/ml)而被執行。在轉染後4小時，培養物被稀釋以一份體積的新鮮培養基，俾以達到一為 $10^6$ 細胞/ml的最終細胞密度。培養過程是根據細胞可活性以及Mab製造而被監測。典型地，培養物被維持歷時4至5天。Mabs是使用一在一蛋白質A樹脂(GE Healthcare, US)上的習知層析方

法而被純化。

所有不同形式的Mabs是以適合於功能性評估的位準而被製造。生產率位準典型地範圍落在15以及30 mg/L的經純化的Mabs之間。

### 實施例3：經建造的Mabs在一磷酸-c-Met-特異性ELISA分析中的評估

A549細胞被加種(seeded)至一個12多重井(multiwell, MW)培養盤的一完全生長培養基[F12K+10 % FCS]中。在以HGF [100 ng/ml]刺激之前，細胞被挨餓歷時16小時，並且在配位子刺激之前的15分鐘各個要被測試的Mab以它為30  $\mu$ g/ml的最終濃度被添加。冰-冷(ice-cold)的溶解緩衝液(lysis buffer)在加入HGF的15分鐘之後被加入以停止磷酸化反應。細胞被機械地刮除且細胞胞溶產物是藉由在4°C下以13000 rpm離心歷時10分鐘而被收集以及對應於上清液相(supernatant phase)。蛋白質內含物是使用一BCA套組(Pierce)予以定量並且被儲存在-20°C直到使用。c-Met的磷酸化狀態是藉由ELISA而被定量。一山羊抗-c-Met Mab (R&D, ref AF276)被使用作為一捕捉抗體(在4°C下過夜塗覆)以及在一利用TBS-BSA 5%緩衝液的飽和步驟[在室溫(room temperature, RT)下1小時]之後，25  $\mu$ g的蛋白質胞溶產物被添加至經塗覆的96MW培養盤的各井中。在一個於室溫下的90分鐘培育(incubation)之後，培養盤被清洗4次並且偵測抗體被加入(抗-磷酸-c-Met Mab，針對拮抗在位置1230、1234以及1235的經磷酸化的Tyr殘基)。在一額外的1

小時培育以及4次清洗之後，一被偶合至HRP的抗-兔抗體(anti-rabbit antibody)(Biosource)在室溫下被加入歷時1小時，而發光偵測(luminescence detection)是藉由加入發光胺(Luminol)被執行。發光讀數是在一Mithras LB920多模式培養盤讀取儀(Berthold)上。

一系列具有重鏈樞紐領域之經建造的型式被構築以及在c-Met受體磷酸化分析中被分析。如在第2A圖中所示，相較於224G11[IgG1-Chim]，就以IgG2-為主的建構物而言以及就一些經建造的IgG1/ $\kappa$ 建構物[MH、MUP9H以及TH7，第2A圖]而言，與hIgG1/ $\kappa$ 同型物相關聯的促效劑效用的一重大減低被觀察到。在224G11[MH-IgG1](含有一全鼠類樞紐區域)以及224G11[TH7](含有大部分人類經建造的IgG1樞紐區域)的情況下，最微弱以及可相比擬的促效作用活性被獲得。一個在拮抗劑效力上的伴隨增加亦被獲得[第2B圖]。因此，與鼠類224G11變異領域相關聯之以IgG2-為主以及經建造的以hIgG1/ $\kappa$ -為基礎的TH7樞紐突變體被這兩者生成幾乎類似於那個小鼠224G11 Mab所具者的功能活性。然而，224G11[MMCH-IgG1-chim]與224G11[IgG1-chim]之促效/拮抗活性的比較證實：一增加的拮抗活性可以藉由抗體建造被獲得而不拘於此種抗體的內在促效特性。

一第二系列之具有重鏈樞紐領域之經建造的型式被構築並且在c-Met受體磷酸化分析中被分析。如在第11A圖中所示，在重鏈樞紐領域中的胺基酸取代(導入半胱胺酸殘基)會修飾抗體的促效劑效用。更確切地，在一個方面，一些

經突變的型式展現出要比c224G11微弱的促效劑效用，有如例如c224G11[C2]、c224G11[C3]、c224G11[C5]、c224G11[C6]或者c224G11[C7]，而其他會增加促效劑效用(有如c224G11[C11]、c224G11[C12]以及c224G11[C14])。更甚者，在重鏈樞紐領域中的胺基酸刪除(與胺基酸取代相關聯或不相關聯)亦會修飾抗體的促效劑特性[第11B圖]。例如，c224G11[Δ1-3]、c224G11[Δ4-5-6]、c224G11[Δ5-6-7-8]、c224G11[C7Δ6]、c224G11[C6Δ9]、c224G11[C2Δ5-7]、c224G11[C5Δ2-6]或者c224G11[C9Δ2-7]顯示出一要比c224G11微弱的促效劑效用，而c224G11[Δ8-11]展現一較強的促效劑效用。有如c224G11[TH7]，所有展現出一較微弱的促效劑效用的新型式在拮抗劑效力上顯示出一伴隨的增加[第12A以及第12B圖]，而那些展現出一較強烈的促效劑效用者具有一較微弱的拮抗劑效力。

在本申請案中，方括號(square brackets)的使用不是必要的以及，作為一實例，引用[224G11][IgG2chim]必須被視為等同於224G11IgG2chim。以一相同的方式，為了表示抗體是一鼠類抗體，詞句鼠類(murine)或者字母m可被加入；為了表示抗體是一嵌合抗體，詞句chim或者字母c可被加入；以及為了表示抗體是一人類化抗體，詞句hum或者字母h可被加入。作為一實例，嵌合抗體c224G11IgG2可以被意指為c224G11IgG2、c224G11[IgG2]、c[224G11]IgG2、c[224G11][IgG2]、224G11IgG2chim、224G11[IgG2chim]、[224G11]IgG2chim或者[224G11][IgG2chim]。

符號 $\Delta$ 表示刪除。

#### 實施例4：BRET分析

在一個第一組實驗中，被監控到的是：不相關的小鼠IgG1、人類IgG1以及人類IgG2在這兩種BRET模型中不具有HGF-誘發的BRET信號的效用(第3圖)。那些Mabs被進一步使用作為對照組。

小鼠224G11 Mab ([224G11] chim)、小鼠11E1 Mab ([11E1] chim)以及小鼠227H1 Mab ([227H1] chim)之IgG1嵌合形式在c-Met二聚作用以及c-Met活化BRET模型上的效用接著被評估。

雖然小鼠224G11 Mab在c-Met二聚作用模型(c-Met dimerization model)上會抑制59%的HGF誘發的BRET信號，[224G11] chim Mab僅只抑制29% (第4圖)。因為[224G11] chim以及m224G11抗體抑制34.5%以及56.4%的HGF誘發的BRET信號，[224G11] chim抗體在抑制HGF誘發的c-Met活化上亦是效用較差的(第5圖)。更甚者，單獨m224G11在c-Met活化上不具有效用，而[224G11] chim在c-Met活化上具有一部分促效劑效用(對應於32.9%的HGF誘發的信號)。[224G11] chim的這個部分促效劑效用亦可在c-Met二聚作用BRET模型上被看到，因為單獨[224G11] chim誘發一BRET增加(對應於46.6%的HGF-誘發的信號，與就m224G11而言的21.3%比對)。

具有重鏈樞紐領域之第二系列經建造的型式的促效劑效力在c-Met活化BRET模型中被評估(第13A以及13B圖)。

相對於c224G11在c-Met活化上具有一部分促效劑效用，包含有胺基酸取代、胺基酸刪除或者這兩者的不同樞紐經突變之嵌合形式的224G11抗體（就c224G11[C2]、c224G11[C3]、c224G11[C5]、c224G11[C6]、c224G11[C7]、c224G11[Δ1-3]、c224G11[Δ4-5-6]、c224G11[Δ5-6-7-8]、c224G11[C7Δ6]、c224G11[C6Δ9]、c224G11[C2Δ5-7]、c224G11[C5Δ2-6]或者c224G11[C9Δ2-7]而言）在單獨c-Met活化上顯示出沒有顯著的效用。相反的，其他樞紐經突變的嵌合形式（有如c224G11[Δ6]、c224G11[C11]、c224G11[C12]以及c224G11[C14]）顯示出增加的促效劑效用。

#### 實施例5：藉由嵌合以及人類化224G11形式的c-Met辨識

一個直接ELISA已被建立，俾以決定各種不同嵌合以及人類化形式在重組型c-Met上的結合能力。簡言之，來自於R&D系統(R&D Systems)的重組型二聚c-Met以在1.25 μg/ml被塗覆於96-井Immunlon II培養盤上。在一於4°C下的過夜培育之後，井以一0.5%明膠(gelatine)/PBS溶液予以飽和。在加入要被測試的抗體[2倍稀釋(dilution)]之前，培養盤接而在37°C下被培育歷時1小時。在加入一用於偵測鼠類抗體的山羊抗-小鼠IgG HRP以及一用於嵌合與人類化抗體辨識的山羊抗-人類κ輕鏈HRP之前，培養盤被培育額外的一小時。在以H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M中和(neutralization)之前，培養盤被培育歷時1小時以及過氧化酶(peroxydase)受質TMB Uptima被加入歷時5分鐘(mn)。被呈現在第6A以及6B圖中的結果顯

示：所有被測試的形式就C-Met辨識而言是可相比擬的。

### 實施例6：鼠類以及嵌合抗體在活體外NCI-H441之HGF- 誘發的細胞增生上的效用

來自於ATCC的NCI-H441細胞被按慣例地培養在RPMI 1640培養基(Invitrogen Corporation, Scotland, UK)、10% FCS (Invitrogen Corporation)、1% L-麩醯胺酸(Invitrogen Corporation)中。關於增生分析，細胞在使用的3天前被劃分，藉此在平盤培養之前它們是在生長的匯聚期(confluent phase)。NCI-H441細胞以一為 $3.75 \times 10^4$ 細胞/井的密度被平盤培養於96-井組織培養盤的200  $\mu$ l無血清培養基(RPMI 1640培養基加上1% L-麩醯胺酸)中。在平盤培養24小時之後，在以一為400 ng/ml (5 nM)的最終濃度加入HGF歷時額外的142小時之前，要被測試的抗體被加入至NCI-H441並且在37°C下被培育歷時30分鐘。針對各個抗體所試驗的劑量範圍是由10至0.0097  $\mu$ g/ml (在各井中的最終濃度)。在此實驗中，一鼠類IgG1 Mab被加入作為一鼠類同型物對照組，以及被測試的抗體是下列抗體：m224G11、m11E1、m227H1以及它們的人類IgG1嵌合形式(分別被表示為[224G11] chim、[11E1] chim以及[227H1] chim)。以單獨細胞-/+ HGF予以平盤培養的井亦被包括。接而細胞以0.25  $\mu$ Ci的 $^3$ H胸腺嘧啶( $^3$ H]Thymidine)(Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden)予以脈衝歷時7小時又30分鐘。 $^3$ H胸腺嘧啶被併入三氯乙酸(trichloroacetic acid)-不可溶的DNA內的量(magnitude)是藉由液體閃爍計數(liquid scintillation

counting)被定量。結果被表示為一非轉換的cpm資料(non transformed cpm data)，俾以較好評估隨著抗-c-Met Mabs (當被單獨加入至腫瘤細胞中)而發生的潛在內在促效劑活性。

在第7A、第7B以及第7C圖中所述的結果證實：如同預期的，不論何種被測試的劑量，當被單獨添加至腫瘤細胞時，鼠類抗體展現無促效劑效用。儘管同型物對照組就這個同型物對照組在本實驗中所觀察到的高cpm變異，沒有HGF-誘發的增生的顯著抑制被觀察到。當單獨被添加時，相較於mIgG1同型物對照組Mab或者單獨細胞，鼠類m224G11或者m11E1或者m227H1皆未顯示任何促效劑效用。達致78%、80%或者80%的劑量依賴性抗-增生活性(dose dependent anti-proliferative activities)是分別地就m224G11、m11E1或者m227H1 Mabs而言{ %抑制計算(% inhibition calculation) :  $100 - [(cpm_{細胞+要被測試的Mab} - 平均cpm_{背景mIgG1}) \times 100 / (平均cpm_{細胞+單獨HGF} - 平均cpm_{細胞})]$  }。令人驚訝地，當單獨被添加時，這3種Mabs的嵌合形式以接近於分別針對[11E1] chim以及[227H1]使用HGF所觀察到的生長刺激誘發一顯著的、劑量-依賴性促效劑效用。對於這2種展現出特別高的內在促效劑活性的抗體來說，拮抗劑效用以53%以及21%抑制效用(相較於就它們的2種鼠類形式所觀察到的80%)被顯著地減低。使用嵌合[224G11] chim所觀察到的促效劑效用亦是劑量依賴性的，但它要比就[11E1] chim以及[227H1] chim所觀察到的還

低。然而這個促效作用在HGF-誘發的增生的活體外抑制上具有一衝擊(由就鼠類m224G11而言78%轉移至就它的嵌合形式而言50%)。為了決定此種“較低的(lower)”活體外內在促效劑活性是否相符於一未被改變的活體內效用，m224G11以及[224G11] chim這兩者被生產以供活體內測試。在先前研究中，由於30 µg/小鼠劑量已被證實一顯著的活體內活性，那個劑量被選擇用於活體內評估。

#### **實施例7：鼠類以及嵌合224G11 Mabs在NCI-H441異種移植模型(xenograft model)上的活體內比較**

NCI-H441是衍生自乳頭狀肺腺癌(papillary lung adenocarcinoma)，表現高位準的c-Met並且證實c-Met RTK的組成性磷酸化(constitutive phosphorylation)。

為了評估抗體在NCI-H441異種移植模型上的活體內效用，6至8週大的無胸腺小鼠(athymic mice)被豢養在加蓋有濾網的滅菌鼠籠(filter-topped cages)中、被維持在無菌條件(sterile conditions)中並且依據法國以及歐洲指導方針(French and European guidelines)被操作。小鼠被皮下地(subcutaneously)注射以 $9 \times 10^6$ 細胞。接而，在細胞植入之後的6天，腫瘤是可測得的(大約 $100 \text{ mm}^3$ )，具有相當腫瘤尺寸的動物被區分成具有6隻小鼠的群組，並且首先以一為60 µg抗體/小鼠的裝填劑量(loading dose)予以治療並且接而一周2次地以各個要被測試的抗體的1 mg/劑量。小鼠被追蹤以供觀察異種移植生長速率。腫瘤體積以下列公式被計算： $\pi (\text{Pi})/6 \times \text{長度} \times \text{寬度} \times \text{高度}$ 。在第8圖中所述的結果

證實：如預期的，即便在低測試劑量下，缺乏促效劑活性的鼠類Mab在活體內表現如有強力的拮抗劑。相對於使用鼠類Mab所觀察到的，嵌合抗體呈現出一非常短暫的活體內活性，而且在D20細胞注射之後腫瘤完全地逃過治療(treatment)。這個實驗清楚地證實：活體內促效劑效用的增加(導致拮抗劑活性的一減低)亦是拮抗劑活性的顯著活體內喪失的原因。

**實施例8：鼠類224G11 Mab以及此抗體之各種不同的嵌合與人類化型式於活體外在NCI-H441的HGF-誘發的增生上的效用**

來自於ATCC的NCI-H441細胞被按慣例地培養在RPMI 1640培養基(Invitrogen Corporation, Scotland, UK)、10% FCS (Invitrogen Corporation)、1% L-麩醯胺酸(Invitrogen Corporation)中。關於增生分析，細胞在使用的3天前被劃分，藉此在平盤培養之前它們是在生長的一匯聚期。NCI-H441細胞以一為 $3.75 \times 10^4$ 細胞/井的密度被平盤培養於96-井組織培養盤的200  $\mu$ l無血清培養基(RPMI 1640培養基加上1% L-麩醯胺酸)中。在平盤培養24小時之後，在以一為400 ng/ml (5 nM)的最終濃度加入HGF歷時額外的142小時之前，要被測試的抗體被添加至NCI-H441並且在37°C下被培育歷時30分鐘。針對各個抗體所試驗的劑量範圍是由10至0.0097  $\mu$ g/ml (在各井中的最終濃度)。在此實驗中，鼠類IgG1 Mab被加入作為一鼠類同型物對照組以及作為一促效劑負對照組。被測試的抗體是下列抗體：i) m224G11；

ii)它的人類IgG1嵌合形式(分別被表示為[224G11] chim、[224G11][MH chim]、[224G11][MUP9H chim]、[224G11][MMCH chim]、[224G11][TH7 chim]iii)它的人類化IgG1形式(分別被描述為[224G11][Hz1]、[224G11][Hz2]、[224G11][Hz3]。以單獨細胞-/+ HGF予以平盤培養的井亦被包括。全數的5D5抗體(來自於Genetech,商業上可得於ATCC有如一融合瘤細胞株)被導入作為一完全促效劑正對照組,並且之後被稱為m5D5。接而細胞以0.25  $\mu$ Ci的 $^3$ H胸腺嘧啶(Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden)予以脈衝歷時7小時又30分鐘。 $^3$ H胸腺嘧啶被併入三氯乙酸-不可溶的DNA內的量是藉由液體閃爍計數而被定量。結果被表示為一非轉換的cpm資料,俾以較好評估伴隨著抗-c-Met Mabs(當被單獨加入至腫瘤細胞中)而發生的潛在內在促效劑活性。

在第9A圖中所述的結果證實:如同預期的,同型物對照組或者m224G11在NCI-H441增生上皆未展現出任何的促效劑活性。同型物對照組在HGF-誘發的細胞增生上沒有影響,而m224G11當以一為10  $\mu$ g/ml的最終濃度被加入時顯示出一為66%的抑制。被使用作為一促效劑對照組的m5D5,如預期的,當被單獨加入至細胞時顯示出一完全劑量依賴性促效劑效用。有如已被觀察到的,[224G11] chim Mab展現出一顯著的劑量-依賴性促效劑效用,而這個嵌合形式的一個減低的抑制活性被觀察到:就鼠類形式而言為19%而非66%。相較於m224G11形式,3種IgG1人類化Mabs當單獨

被加入時證實一劑量依賴性促效劑效用。[224G11][Hz1]、[224G11][Hz2]以及[224G11][Hz3]具有大約46、30以及35%的可相比擬的拮抗劑活性。這些活性是顯著地要比針對m224G11所觀察到的活性還低。在第9B圖中，各種不同的IgG1嵌合形式被測試。相較於[224G11] chim形式當被單獨添加至NCI-H441細胞時展現出一劑量-依賴性促效劑效用，[224G11][MH chim]、[224G11][MUP9H chim]、[224G11][MMCH chim]、[224G11][TH7 chim]形式沒有顯著的內在促效劑效用。它們的拮抗劑活性(就[224G11][MH chim]、[224G11][MUP9H chim]、[224G11][MMCH chim]以及[224G11][TH7 chim]而言分別達到79、78、84以及93%的抑制)要比針對m224B11 Mab所觀察到的活性(57%)還低。

#### 實施例9：224G11 Mab的各種不同IgG1嵌合以及人類化形式的活體外效用

來自於ATCC的NCI-H441細胞被按慣例地培養在RPMI 1640培養基(Invitrogen Corporation, Scotland, UK)、10% FCS (Invitrogen Corporation)、1% L-麩醯胺酸(Invitrogen Corporation)中。關於增生分析，細胞在使用的3天前被劃分，藉此在平盤培養之前它們是在生長的一匯聚期。NCI-H441細胞以一為 $3.75 \times 10^4$ 細胞/井的密度被平盤培養於96-井組織培養盤的200  $\mu$ l無血清培養基(RPMI 1640培養基加上1% L-麩醯胺酸)中。在平盤培養24小時之後，在以一為400 ng/ml (5 nM)的最終濃度加入HGF歷時額外的142小時之前，要被測試的抗體被加入至NCI-H441並且在37°C

下被培育歷時30分鐘。針對各個抗體所試驗的劑量範圍是由10至0.0097  $\mu\text{g/ml}$  (在各井中的最終濃度)。在此實驗中，鼠類IgG1 Mab被加入作為一針對促效劑活性的背景負對照組，以及被測試的抗體是下列抗體：i) m224G11、ii)它的人類IgG1嵌合形式(分別被表示為[224G11] chim、[224G11][TH7 chim] iii)它的人類化抗體IgG1形式(分別被描述為[224G11][TH7 Hz1]，[224G11][TH7 Hz3])。以單獨細胞-/+ HGF予以平盤培養的井亦被包括。全數的5D5抗體(來自於Genetech，商業上可得於ATCC有如一融合瘤細胞株被)被導入作為一完全促效劑正對照組，並且之後被稱為m5D5。接而細胞以0.25  $\mu\text{Ci}$ 的 $^3\text{H}$ 胸腺嘧啶(Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden)予以脈衝歷時7小時又30分鐘。 $^3\text{H}$ 胸腺嘧啶被併入三氯乙酸(trichloroacetic acid)-不可溶的DNA內的量是藉由液體閃爍計數而被定量。結果被表示為一非轉換的cpm資料，俾以較好評估隨著抗-c-Met Mabs (當被單獨加入至腫瘤細胞中)而發生的潛在內在促效劑活性。

第10圖顯示m224G11 Mab展現出普通的抑制效用(74%抑制)。嵌合IgG1形式[224G11] chim具有如同預期的一劑量依賴性內在促效劑效用，並且相較於鼠類形式具有一較低的拮抗劑效用：33%對74%抑制。[224G11][TH7 chim]在此實驗中具有一非常微弱的促效劑活性。此外，它展現出一接近於一針對鼠類Mab所注意到的高度抑制效用(81%)。2個人類化形式不具有內在促效劑效用並且具有一接近於針對鼠類Mab或者[224G11][TH7 chim]所觀察到的拮抗劑活

性(就[224G11][TH7 Hz1]以及[224G11][TH7 Hz3]而言分別有67以及76%抑制)。

**實施例10：關於經建造的[TH7]樞紐區域的同型物切換  
(isotype switching)**

為了評估由[TH7]樞紐序列(對應於PKSCDCHCPPCP)至人類IgG1之外的免疫球蛋白同型物骨架(backbones)內所誘發的藥理學特性的調節，我們在基因上將上述的[TH7]序列轉移至人類IgG2以及IgG4骨架內。樞紐區域的修飾是藉由以一帶有[TH7]修飾的等效部分交換一{Nhe1I-Bcl1}限制片段而被執行，該{Nhe1I-Bcl1}片段是藉由全面性基因合成(Genecust, LU)而被合成。選殖步驟是依據有如在實驗室手冊(Sambrook and Russel, 2001)中所述的習知分子生物學技術或者依據供應商的指引被執行。各個基因建構物是藉由使用Big Dye終止子循環定序套組(Applied Biosystems, US)的核苷酸定序被充分地確認並且使用一3100基因分析儀(3100 Genetic Analyzer)(Applied Biosystems, US)予以分析。分別就TH7-經建造的人類IgG2以及IgG4同型物的胺基酸以及核苷酸序列(僅重鏈，輕鏈是相同於被使用於所有其他以IgG1為基礎的建構物的c224G11/人類C $\kappa$ )而言，所形成的序列被描述為序列辨識編號78、79、80以及81。這些新穎的建構物被應用於如上面在實施例2中所述的嵌合224G11抗-c-Met Mab。

對應之經建造的抗體，c224G11[IgG2TH7]以及c224G11[IgG4TH7]，是藉由在懸浮-適應的HEK293 EBNA

細胞中的暫時性表現而如上所述被製造。

**實施例11：經建造的 Mabs c224G11[IgG2TH7] 以及  
c224G11[IgG4TH7] 在一磷酸 -c-Met- 特異性  
ELISA 分析以及 BRET 分析中的評估**

TH7 樞紐亦被導入 IgG2 以及 IgG4 嵌合 224G11 Mabs 上並且在 c-Met 受體磷酸化分析中被測試。如同在第 14A 以及第 14B 圖中所示，c224G11[IgG2TH7] 以及 c224G11[IgG4TH7] 僅誘發一微弱的促效劑效用，但顯著地要比 c224G11 Mab 微弱並且展現出相當於 224G11 Mab 之鼠類形式 (m224G11) 的拮抗劑效用。這個結果在 c-Met 活化 BRET 模型上被證實 (第 15 圖)，而 c224G11[IgG2TH7] 以及 c224G11[IgG4TH7] 亦顯示出一要比 c224G11 Mab 還弱的促效劑。

因此，被導至 IgG2 或者 IgG4 Mab 形式上的 TH7 樞紐突變產生具有要比 c224G11[TH7] 相似之特性的功能性抗體 (functional antibodies)。

**實施例12：細胞附著分析 (cell adhesion assay)**

PC3 前列腺癌細胞是利用胰蛋白酶 (trypsin) 而從培養皿 (dishes) 被脫離，以無-血清 F12k 培養基予以清洗 3 次並且被再散浮 (resuspended) 於相同的培養基中。細胞 (100,000 細胞/井) 被平盤培養於經塗覆以呈 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的黏蛋白 1 (Laminin1) 的 96-井培養盤上。要被測試的下列形式的抗-CD151 Mab 以 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的最終濃度同時地被加入：鼠類 IgG1 Mab m214B2、未經修飾之嵌合 IgG1 抗體形式 (被稱為 c214B2) 以及具有 TH7 修飾的嵌合 IgG1 抗體形式 (被稱為

cTH7-214B2)。

CD151是一個屬於四跨膜蛋白家族(tetraspanin family)的膜蛋白，而抗-CD151 Mab 214B2 (由一鼠類融合瘤所製造的)被描述在已公開的專利申請案WO 2009/136070中。

鼠類以及人類IgG1抗體被使用作為同型物對照組抗體。最終條件是如下：100000細胞/井以及呈10  $\mu\text{g/ml}$ 的抗體。在於37°C下的1小時培育之後，培養盤被輕拍並且以無-血清F12k培養基予以清洗2次。在分析之前，100  $\mu\text{l}$ 的無-血清F12k培養基被分配至各井中。為了評估抗體在細胞附著的效用井，在一相位差顯微鏡(phase-contrast microscope)下被拍攝(photographed)(第16圖)。接而附著之細胞的數目是使用一ATP分析(ATP assay)被決定(第17圖)。

鼠類214B2以及嵌合TH7-214B2抗體能夠修飾細胞-對-細胞交互作用(cell-to-cell interactions)(第16圖)以及等效地增加PC3細胞附著(第17圖)，而在c214B2的未經修飾之嵌合形式(c214B2)的情況下沒有效用(相當於人類IgG1同型物對照組抗體)被觀察到。

### 【圖式簡單說明】

第1A以及1B圖：一系列被製造有如一人類IgG1/ $\kappa$ 同型物的鼠類以及對應嵌合抗-c-Met Mabs對A549細胞在c-Met受體磷酸化上的效用。

第1A圖：被計算為與c-Met磷酸化(藉由HGF [100 ng/ml])的最大刺激(maximal stimulation)相比之百分比(percentage)的促效劑效用。

第1B圖：被計算為抑制c-Met磷酸化(藉由HGF [100 ng/ml])的最大刺激之百分比的拮抗劑效用。

第2A以及2B圖：於鼠類224G11 Mab以及含有各種不同經建造的樞紐區域的嵌合224G11 Mabs之間對A549細胞在c-Met受體磷酸化上的比較。

第2A圖：被計算為與c-Met磷酸化(藉由HGF [100 ng/ml])的最大刺激相比之百分比的促效劑效用。

第2B圖：被計算為抑制c-Met磷酸化(藉由HGF [100 ng/ml])的最大刺激之百分比的拮抗劑效用。

第3A與3B、4以及5圖：c-Met二聚作用(c-Met dimerization)以及活化BRET模型(BRET models)。

第6A以及6B圖：藉由嵌合以及人類化224G11形式的c-Met辨識。

第7A、7B以及7C圖：鼠類以及嵌合抗體於活體外(*in vitro*)在NCI-H441細胞之HGF-誘發的增生上的效用。NCI-H441細胞被平盤培養在一無-血清(*serum-free*)培養基中，在平盤培養24小時之後，(第7A圖) m11E1與[11E1] chim、(第7B圖) m227H1與[227H1] chim或者(第7C圖) m224G11與[224G11] chim在HGF不存在或者存在的情況下被加入。黑色箭頭表示在HGF不存在◀或者存在▶的情況下以細胞單獨予以平盤培養的井(wells)。一鼠類IgG1 (mIgG1)被導入作為一同型物對照組。

第8圖：鼠類以及嵌合224G11 Mabs在NCI-H441異種移植模型(xenograft model)上的活體內比較。

第9A以及9B圖：鼠類224G11Mab以及此抗體之各種不同的嵌合(chimeric)與人類化(humanized)型式在活體外NCI-H441細胞的HGF誘發之增生上的效用。NCI-H441被平盤培養在無-血清培養基中。在平盤培養24小時之後，要被測試的抗體在HGF不存在或者存在的情況下被加入，在區塊(第9A圖)中，鼠類m224G11、嵌合IgG1 [224G11] chim、人類化IgG1 [224G11][Hz1]、[224G11][Hz2]、[224G11][Hz3]型式被顯示，在區塊(第9B圖)中，鼠類m224G11以及各種不同的嵌合IgG1形式([224G11] chim、[224G11][MH chim]、[224G11][MUP9H chim]、[224G11][MMCH chim]、[224G11][TH7 chim])被呈現。黑色箭頭表示在HGF不存在◀或者存在▶的情況下以細胞單獨予以平盤培養的井。一鼠類IgG1被導入作為針對促效劑活性的一負對照組。m5D5被使用作為一劑量-依賴性完全促效劑對照組(dose-dependent full agonist control)。

第10圖：鼠類224G11 Mab以及此抗體之各種不同嵌合與人類化型式在活體外NCI-H441細胞的HGF-誘發之增生上的效用。NCI-H441被平盤培養在無-血清培養基中。在平盤培養24小時之後，要被測的試抗體在HGF不存在或者存在的情況下被加入。鼠類m224G11、[224G11] chim、[224G11][TH7 chim] IgG1嵌合形式以及[224G11][TH7 Hz1]、[224G11][TH7 Hz3]被呈現。黑色箭頭表示在HGF不存在◀或者存在▶的情況下以細胞單獨予以平盤培養的井。一鼠類IgG1被導入作為針對促效劑活性的一負對照組。m5D5被

使用作為一劑量-依賴性完全促效劑對照組。

第11A至11B以及12A至12B圖：本發明的一系列抗-c-Met Mabs [具有經建造的樞紐(engineered hinge)]對A549細胞在c-Met受體磷酸化上的效用。

第11A以及11B圖：被計算為與c-Met磷酸化(藉由HGF [100 ng/ml])的最大刺激相比之百分比的促效劑效用。

第12A以及12B圖：被計算為抑制c-Met磷酸化(藉由HGF [100 ng/ml])的最大刺激之百分比的拮抗劑效用。

第13A以及13B圖：c-Met二聚作用以及活化BRET模型。

第14A圖：被計算為與c-Met磷酸化(藉由HGF [100 ng/ml])的最大刺激相比之百分比的促效劑效用。

第14B圖：被計算為抑制c-Met磷酸化(藉由HGF [100 ng/ml])的最大刺激之百分比的拮抗劑效用。

第15圖：c-Met二聚作用以及活化BRET模型。

第16圖：不同形式的Mab 214B2在PC3細胞附著上的效用的顯微鏡分析(microscope analysis)。

第17圖：不同形式的Mab 214B2在PC3細胞附著上之效用的分析[使用ATP分析(ATP assay)]。在各井中附著的細胞(adhered cells)之數目是使用PC3標準曲線(PC3 standard curve)(從0至200 000細胞/井)而被決定。結果被呈現如下：未經處理的細胞被視為參考組(100%)，而經處理的細胞被呈現有如參考組的%。

### 【主要元件符號說明】

(無)

## 序列表

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT  
 Liliane, GOETSCH  
 Thierry, WURCH

<120> 用於調控單株抗體之拮抗活性的方法

<130> D27128

<150> IB2008/055664  
 <151> 2008-12-02

<150> US 61/184406  
 <151> 2009-06-05

<160> 81

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 1

Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr  
 1                   5                   10

<210> 2  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 2

Pro Lys Ser Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr  
 1                   5                   10

<210> 3  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 3

Pro Lys Ser Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Pro  
 1                   5                   10

<210> 4  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 4

Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 5

Pro Arg Asp Cys Gly Cys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 6  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 6

Pro Lys Ser Cys Asp Cys His Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智慧人

<400> 7

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 8  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 智慧人

<400> 8

Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser  
 1 5 10 15

Pro Ser

<210> 9  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智慧人

<400> 9

Pro Pro Pro Pro Pro  
 1 5

<210> 10  
 <211> 56  
 <212> PRT  
 <213> 智慧人

<400> 10

Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala Gln Pro Gln Ala  
 1 5 10 15

Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn  
 20 25 30

Thr Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln  
 35 40 45

Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro  
 50 55

<210> 11  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 智慧人

<400> 11

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 12  
 <211> 63  
 <212> PRT  
 <213> 智慧人

<400> 12

Leu Lys Thr Pro Leu Phe Thr Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg  
 1 5 10 15

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys  
 20 25 30

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro  
 35 40 45

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro  
 50 55 60

<210> 13  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 智慧人

<400> 13

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro  
 1 5 10

<210> 14  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 家鼯鼠

<400> 14

Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr  
 1 5 10

<210> 15  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 15  
 cccccgggact gtgggtgcaa gccttgcaatt tgtacc 36

<210> 16  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 16  
 cccaagagct gtgggtgcaa gccttgcaatt tgtacc 36

<210> 17  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列



<400> 22

Cys Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 23

Pro Cys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 24

Pro Lys Cys Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 25

Pro Lys Ser Cys Cys Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 26

Pro Lys Ser Cys Asp Cys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 27  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 27

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Cys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 28  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 28

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Cys Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 29  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 29

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Cys Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 30  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 30

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Cys Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 31  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域  
 <400> 31  
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Cys Cys Pro  
 1 5 10

<210> 32  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域  
 <400> 32

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Cys  
 1 5 10

<210> 33  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域  
 <400> 33

Pro Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 34  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域  
 <400> 34

Pro Lys Ser Cys Asp Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 35  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域  
 <400> 35

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10

<210> 36  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 36

Lys Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10

<210> 37  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 37

Pro Ser Cys Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10

<210> 38  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 38

Pro Lys Ser Cys Asp Thr His Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10

<210> 39  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 39

Pro Lys Ser Cys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10

<210> 40  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 40

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Thr Cys Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 41  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 41

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Cys Pro Pro Cys  
 1 5 10

<210> 42  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 42

Pro Lys Ser Cys Asp Cys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 43  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 43

Pro Lys Ser Cys Asp Cys Thr His Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 44  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 44

Pro Cys Ser Cys Lys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 45  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 45

Pro Ser Cys Cys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 46  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 46

Pro Ser Cys Asp Lys His Cys Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 47  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 47

Pro Lys Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 48  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 48

Pro Lys Ser Cys Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 49  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 49

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 50  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 50  
 tgcaagagct gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 51  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 51  
 ccctgcagct gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 52  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 52  
 cccaagtgt gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 53  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 53  
 cctaagagct gttgcaagac ccacacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 54  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 54  
 cccaagagct gcgactgcac ccacacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 55  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 55  
 cccaagagct gcgacaagtg ccacacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 56  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 56  
 cccaagagct gcgacaagac ctgtacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 57  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 57  
 cccaagagct gcgacaagac ccaactgctgt cccccctgcc ct 42

<210> 58  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 58  
 cccaagagct gcgacaagac ccacacctgt tgccccctgcc ct 42

<210> 59  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 59  
 cccaagagct gcgacaagac ccacacctgt ccoctgctgcc ct 42

<210> 60  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 60  
 cccaagagct gcgacaagac ccacacctgt cccccttget gc 42

<210> 61  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 61  
 cccagctgcg acaagaccca cacctgtccc ccoctgccct 39

<210> 62  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 62  
 cccaagagct gcgacaccca cacctgtccc ccoctgccct 39

<210> 63  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 63

cccaagagct gcgacaagac ccaactgcccc ccctgcccct	39
<210> 64	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工修飾的樞紐區域	
<400> 64	
aagtgcgaca agacccacac ctgtcccccc tgcct	36
<210> 65	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工修飾的樞紐區域	
<400> 65	
cccagctgca agacccacac ctgtcccccc tgcct	36
<210> 66	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工修飾的樞紐區域	
<400> 66	
cccaagagct gcgacaccca ctgccccccc tgcct	36
<210> 67	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工修飾的樞紐區域	
<400> 67	
cccaagagct gcacccacac ctgtcccccc tgcct	36
<210> 68	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工修飾的樞紐區域	
<400> 68	
cccaagagct gcgacaagac cacctgtccc tgcct	36

<210> 69  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域  
  
 <400> 69  
 cccaagagct gcgacaagac ccaactgcccc ccoctgc 36  
  
 <210> 70  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域  
  
 <400> 70  
 cccaagagct gcgactgcca cacctgtccc ccoctgcct 39  
  
 <210> 71  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域  
  
 <400> 71  
 cccaagagct gcgactgcac ccaactgcccc ccoctgcct 39  
  
 <210> 72  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域  
  
 <400> 72  
 cctgcagct gcaagcacac ctgtcccccc tgccct 36  
  
 <210> 73  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域  
  
 <400> 73  
 cctagctgct gcaeccacac ctgtcccccc tgccct 36

<210> 74  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 74  
 cccagctgcg acaagcactg ctgccccccc tgcct 36

<210> 75  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 75  
 cccaagagca cccacacctg tcccccttgt cct 33

<210> 76  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 76  
 cccaagagct gcacctgtcc cccttgtcct 30

<210> 77  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 77  
 cccaagagct gcgataagtg cgtggagtgc cccccttgtc ct 42

<210> 78  
 <211> 445  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 78

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr  
 20 25 30  
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190  
 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser  
 195 200 205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Cys His  
 210 215 220  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255  
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln  
 260 265 270  
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285  
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300  
 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320  
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 79

<211> 446

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工修飾的樞紐區域

<400> 79

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr  
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile  
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

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

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190  
 Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser  
 195 200 205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Cys His  
 210 215 220  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240  
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255  
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270  
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285  
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320  
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335  
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 340 345 350  
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 355 360 365  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 370 375 380  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400  
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 405 410 415  
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430  
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 435 440 445

<210> 80  
 <211> 1338  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工修飾的樞紐區域

&lt;400&gt; 80

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60  
 agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120  
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180  
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtctcttc cacagcttac 240  
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgccc ccggctctgag 300  
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360  
 accaagggcc caagcgtggt cccgctagcc cctgcagca gaagcaccag cgagagcaca 420  
 gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttggaaac 480  
 agcggagccc tgaccagcgg cgtgcacacc tttccagccg tgctgcagag cagcggcctg 540  
 tacagcctga gcagcgtggt gacagtgccc agcagcaact tcggcaccca gacctacacc 600  
 tgtaacgtgg accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaccgtgga gcccaagagc 660  
 tgcgattgcc actgcccccc ttgtcctgct cctcctgtgg ccggaccagc cgtgttcctg 720  
 ttcccccaa agcccaagga caccctgatg atcagccgga cccccgaagt gacctgctg 780  
 gtggtggacg tgtcccacga ggaccccgag gtgcagttca attggtacgt ggacggcctg 840  
 gaggtgcaca acgccaagac caagccccgg gaggaacagt tcaacagcac cttccgggtg 900  
 gtgtccctgc tgaccgtggt gcaccaggac tggtgaacg gcaaagagta caagtgcaag 960  
 gtctccaaca agggcctgcc tgccccatc gagaaaacca tcagcaagac caagggccag 1020  
 cctcgggagc ctccaggtgta caccctgccc cccagccggg aggaaatgac caagaaccag 1080  
 gtgtccctga cctgtctggt gaaaggcttc taccocagcg atatcgcctg ggagtgggag 1140  
 agcaacggcc agcccagaaa caactacaag accaccccc ccatgctgga cagcgacggc 1200  
 agcttcttcc tgtactccaa actgaccgtg gataagagcc ggtggcagca gggcaacgtg 1260  
 ttcagctgca gcgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acaccagaa gtccctgagc 1320  
 ctgagccccg gcaaatga 1338

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 1341

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工修飾的樞紐區域

&lt;400&gt; 81

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60

agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcaactgggt gaggcagagt	120
ctggggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagcca acaatggcct ggctaactat	180
aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac	240
atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcaagtgt actactgcgc ccggtctgag	300
atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcaactgcac tgaccgtctc ctccgccagc	360
accaagggcc caagcgtggt cccgctagcc ccctgcagca gaagcaccag cgagagcaca	420
gocgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttggaac	480
agcggagccc tgaccagcgg cgtgcacacc tttccagccg tgctgcagag cagcggcctg	540
tacagcctga gcagcgtggt gacagtgctt agcagcagcc tgggcaccaa gacctacacc	600
tgtaacgtgg accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agcgggtgga gccaagagc	660
tgcgattgcc actgcccccc ttgccctgcc cctgagttcc tgggcggacc cagcgtgttc	720
ctgttcccc caaagcccaa ggacaccctg atgatcagcc ggacccccga agtgaccctgc	780
gtggtggtgg acgtgtccca ggaagatccc gaggtgcagt tcaactggta cgtggacggc	840
gtggaggtgc acaacgccaa gaccaagccc cgggaggaac agttcaacag cacctaccgg	900
gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gaactggctga acggcaaaga gtacaagtgc	960
aaggtgtcca acaagggcct gccagcagc atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc	1020
cagcctagag aaccccaggt gtacaccctg cccccagcc aggaagagat gaccaagaac	1080
caggtgtccc tgacctgtct ggtgaaaggc ttctaccca gcgatatcgc cgtggagtgg	1140
gagagcaaag gccagcccga gaacaactac aagaccacc cccctgtgct ggacagcgac	1200
ggcagcttct tctgtactc ccggtgacc gtggacaaga gccggtggca ggaaggcaac	1260
gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacaccca gaagtcctg	1320
agcctgagcc tgggcaaatg a	1341

# 公告本

## 發明專利說明書

I631341

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98141150

※申請日：98.12.2

※IPC 分類：

G01N33/68 (2006.01)

C12N15/13

一、發明名稱：(中文/英文)

(2006.01)

用於調控單株抗體之拮抗活性的方法

PROCESS FOR THE MODULATION OF THE ANTAGONISTIC  
ACTIVITY OF A MONOCLONAL ANTIBODY

二、中文發明摘要：

本發明是有關於抗體工程領域以及，更特別地，有關於一種用於篩選抗體和/或調節抗體的促效/拮抗活性的方法。更特別地，本發明涉及一種增進一針對拮抗一特定標的分子的單株抗體，或者它的一個二價功能性片段或衍生物之拮抗活性的方法，該抗體能夠抑制該標的分子之一或多種生物活性，其中該方法包含有該樞紐區域的重新配置的一階段，該階段是由該樞紐區域的胺基酸序列的一修飾(藉由刪除、加入或者取代至少一胺基酸)所構成。

本發明亦有關於可應用於此一調節方法的多肽以及所得到的抗體。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to the antibody engineering field and, more particularly, to a process for the screening of antibodies and/or the modulation of the agonistic/antagonistic activity of antibodies. More particularly, the invention concerns a process of improving the antagonistic activity of a monoclonal antibody directed against a specific target molecule, or a divalent functional fragment or derivative thereof, said antibody being capable of inhibiting one or more of the biological activities of said target molecule, wherein said process comprises a stage of reconfiguration of the hinge region consisting of a modification of the amino acid sequence of said hinge region by the deletion, the addition or the substitution of at least one amino acid.

The invention also relates to polypeptides useful for such a modulation method and the obtained antibodies.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 ( ) 圖。(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

## 七、申請專利範圍：

1. 一種增進一針對拮抗一特異性標的分子的單株抗體、或其二價功能性片段之拮抗活性的方法，該抗體能夠抑制該標的分子的一或多種生物活性，其中該方法包含有一個由下列修飾所組成之樞紐區域重新配置的階段，該修飾係藉由刪除、加入或者取代至少一胺基酸而修飾該樞紐區域的胺基酸，且其中該藉由修飾其胺基酸序列所獲得的經重新配置的樞紐區域成為一具有選自於下列所組成之群組之一序列的樞紐區域：序列辨識編號1至序列辨識編號7、序列辨識編號22至序列辨識編號29、序列辨識編號33至序列辨識編號39，以及序列辨識編號41至序列辨識編號49。
2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該單株抗體是一二價抗體。
3. 如申請專利範圍第1或2項之方法，其中該單株抗體是一嵌合抗體。
4. 如申請專利範圍第1或2項之方法，其中該單株抗體是一人類化抗體。
5. 如申請專利範圍第1或2項之方法，其中該單株抗體是一人類抗體。
6. 如申請專利範圍第1或2項之方法，其中該單株抗體是一IgG1。
7. 如申請專利範圍第1或2項之方法，其中該標的分子是一穿膜受體。

8. 如申請專利範圍第7項的方法，其中該穿膜受體是選自於由下列所構成的群組：酪胺酸激酶受體、四穿膜蛋白以及GPCRs。
9. 一種篩選有關一針對拮抗一特異性標的分子的拮抗劑單株抗體、或其二價功能性片段的方法，該抗體能夠抑制該標的分子的一或多種生物活性，其中該方法包含有下列步驟：
  - (a) 選擇一具有一抑制該標的分子的一或多種生物活性之初始位準的初始抗體，
  - (b) 藉由申請專利範圍第1至8項之一者的方法修飾該初始抗體之樞紐區域的胺基酸序列，
  - (c) 評估步驟(b)之經修飾的抗體關於它抑制該標的分子之一或多種生物活性的能力，以及
  - (d) 作為一正向的結果，選擇具有該標的分子之該一或多種生物活性的一抑制位準是高於該抑制的初始位準之步驟(c)的抗體。
10. 一種單株抗體，其特徵在於它包含有一選自於由下列所構成之群組中的胺基酸序列：序列辨識編號2至序列辨識編號6、序列辨識編號22至序列辨識編號26、序列辨識編號28、序列辨識編號29、序列辨識編號33、序列辨識編號35至序列辨識編號39，以及序列辨識編號41至序列辨識編號49。
11. 如申請專利範圍第10項之單株抗體，其中該抗體是一種人類抗體。

12. 如申請專利範圍第 10 或 11 項之單株抗體，其中該抗體是一種 IgG1 抗體。
13. 一種編碼有關如申請專利範圍第 10 至 12 項中任一項的單株抗體之經分離的核酸。
14. 如申請專利範圍第 13 項之經分離的核酸，其中該核酸包含有一選自於由下列所構成之群組中的核酸序列：序列辨識編號 16 至序列辨識編號 20、序列辨識編號 50 至序列辨識編號 54、序列辨識編號 56、序列辨識編號 57、序列辨識編號 61、序列辨識編號 63、序列辨識編號 67，以及序列辨識編號 69 至序列辨識編號 77。