

(21)申請案號：099110596

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 04 月 06 日

(51)Int. Cl.：

A61K39/395 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/04/07

歐洲專利局

09005109.5

(71)申請人：羅齊克雷雅公司 (瑞士) ROCHE GLYCART AG (CH)

瑞士

(72)發明人：波森梅爾 伯吉 BOSSENMAIER, BIRGIT (DE)；賓克曼 烏拉奇 BRINKMANN, ULRICH (DE)；克萊 克里斯汀 KLEIN, CHRISTIAN (DE)；尼德費爾 傑哈德 NIEDERFELLNER, GERHARD (DE)；雪弗 瓦夫崗 SCHAEFER, WOLFGANG (DE)；史甘哲 傑詹 麥可 SCHANZER, JUERGEN MICHAEL (DE)；蘇特曼 克勞帝 SUSTMANN, CLAUDIO (DE)；優瑪那 帕伯羅 UMANA, PABLO (CR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：12 項 圖式數：10 共 152 頁

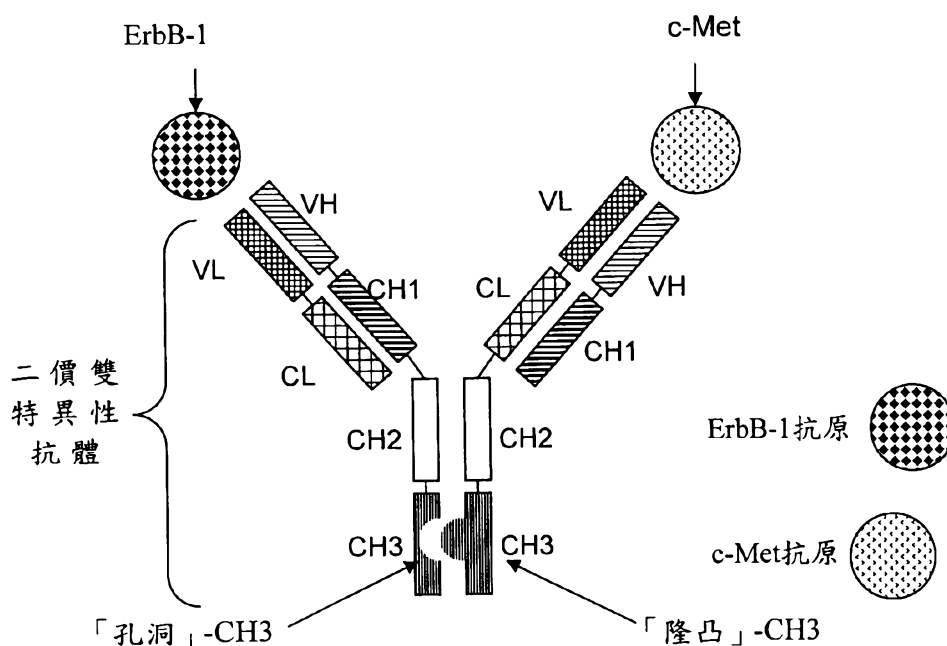
(54)名稱

雙特異性抗-E r b B - 1 / 抗-c - M e t 抗體

BISPECIFIC ANTI-ERBB-1/ANTI-C-MET ANTIBODIES

(57)摘要

本發明係關於針對人類 ErbB-1 及人類 c-Met 之雙特異性抗體、其產生方法、含有該等抗體之醫藥組合物、及其用途。



(21)申請案號：099110596

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 04 月 06 日

(51)Int. Cl.：

A61K39/395 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/04/07

歐洲專利局

09005109.5

(71)申請人：羅齊克雷雅公司 (瑞士) ROCHE GLYCART AG (CH)

瑞士

(72)發明人：波森梅爾 伯吉 BOSSENMAIER, BIRGIT (DE)；賓克曼 烏拉奇 BRINKMANN, ULRICH (DE)；克萊 克里斯汀 KLEIN, CHRISTIAN (DE)；尼德費爾 傑哈德 NIEDERFELLNER, GERHARD (DE)；雪弗 瓦夫崗 SCHAEFER, WOLFGANG (DE)；史甘哲 傑詹 麥可 SCHANZER, JUERGEN MICHAEL (DE)；蘇特曼 克勞帝 SUSTMANN, CLAUDIO (DE)；優瑪那 帕伯羅 UMANA, PABLO (CR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：12 項 圖式數：10 共 152 頁

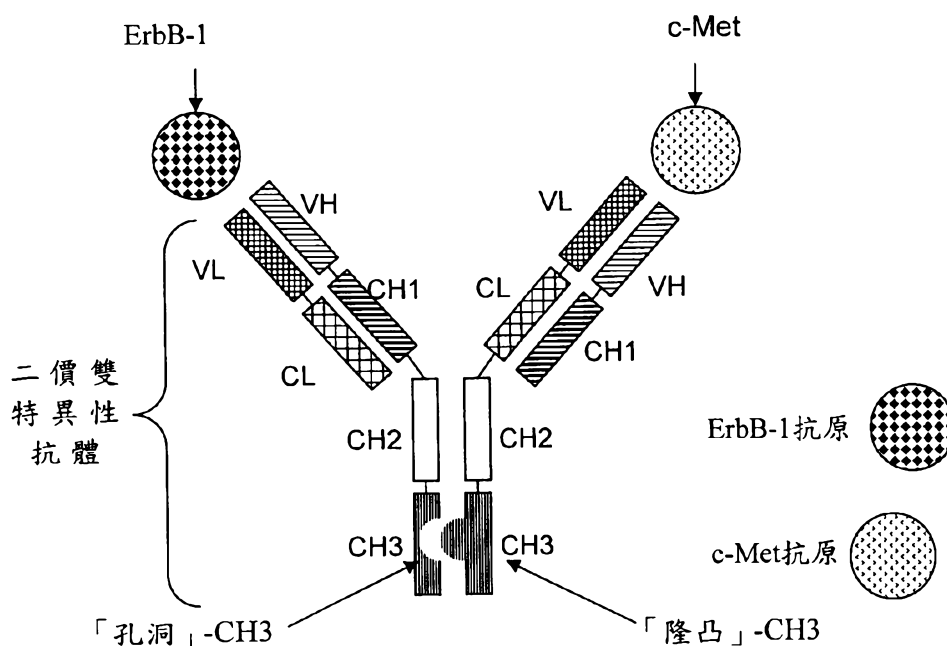
(54)名稱

雙特異性抗-E r b B - 1 / 抗-c - M e t 抗體

BISPECIFIC ANTI-ERBB-1/ANTI-C-MET ANTIBODIES

(57)摘要

本發明係關於針對人類 ErbB-1 及人類 c-Met 之雙特異性抗體、其產生方法、含有該等抗體之醫藥組合物、及其用途。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於針對人類 ErbB-1 及人類 c-Met 之雙特異性抗體、其產生方法、含有該等抗體之醫藥組合物、及其用途。

【先前技術】

ErbB 家族蛋白

ErbB 蛋白家族由 4 個成員組成：ErbB-1，亦稱作表皮生長因子受體 (EGFR)；ErbB-2，在人類中亦稱作 HER2 且在齧齒動物中亦稱作 neu；ErbB-3，亦稱作 HER3；及 ErbB-4，亦稱作 HER4。ErbB 家族蛋白係受體酪胺酸激酶且代表細胞生長、分化及存活之重要介體。

ErbB-1 及抗-ErbB-1 抗體

Erb-B1 (亦稱作 ERBB1、人類表皮生長因子受體、EGFR、HER-1 或鳥類成紅細胞白血病毒 (v-erb-b) 癌基因同源物；SEQ ID NO: 16) 係由 c-erbB 原癌基因編碼之 170 kDa 跨膜受體，且表現固有的酪胺酸激酶活性 (Modjtahedi, H. 等人, Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235；Herbst, R.S. 及 Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611)。EGFR 亦存在多種亞型及變體 (例如選擇性 RNA 轉錄物、經截短形式、多態性等)，包括 (但不限於) 彼等由 Swissprot 數據庫條目號 P00533-1、P00533-2、P00533-3 及 P00533-4 標識者。已知 EGFR 可結合各種配體，包括表皮生長因子 (EGF)、轉化生長因子- α (TGF- α)、雙調蛋白、肝素結合性 EGF (hb-EGF)、

β 細胞素、及表皮調節素(Herbst, R.S.及Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611; Mendelsohn, J.及Baselga, J., Oncogene 19 (2000) 6550-6565)。EGFR經由酪胺酸-激酶介導之信號轉導途徑調節多種細胞過程，包括(但不限於)控制細胞增殖、分化、細胞存活、細胞凋亡、血管發生、有絲分裂發生、及轉移之信號轉導途徑之活化(Atalay, G.等人, Ann. Oncology 14 (2003) 1346-1363; Tsao, A.S.及Herbst, R.S., Signal 4 (2003) 4-9; Herbst, R.S.及Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611; Modjtahedi, H.等人, Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235)。

抗-ErbB-1抗體靶向EGFR之細胞外部分，此導致阻斷配體結合且由此抑制諸如細胞增殖等下游事件(Tsao, A.S.及Herbst, R.S., Signal 4 (2003) 4-9)。已研發出包含來自兩個或更多個不同物種(例如小鼠及人類)之抗體部分之嵌合抗-ErbB-1抗體，例如參見US 5,891,996(小鼠/人類嵌合抗體，R3)或US 5,558,864(鼠類抗-EGFR MA b 425之嵌合及人類化形式)。同樣，IMC-C225(西妥昔單抗(cetuximab)，Erbix®; ImClone)係嵌合小鼠/人類抗-EGFR單株抗體(基於小鼠M225單株抗體，其在人類臨床試驗中產生HAMA反應)，已報導其可在多種異種移植模型中顯示抗腫瘤效能。(Herbst, R.S.及Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611)。IMC-C225之效能已歸因為若干種機制，包括抑制由EGFR信號傳導途徑調節之細胞事件、及可能提高抗體依賴性細胞毒性(ADCC)活性(Herbst, R.S.及Shin, D.M.,

Cancer 94 (2002) 1593-1611)。在臨床試驗中亦使用 IMC-C225，包括與放療及化療組合(Herbst, R.S.及 Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611)。最近，Abgenix公司(Fremont, CA)研發出用於治療癌症之 ABX-EGF。ABX-EGF係全人類抗 EGFR 單株抗體。(Yang, X.D. 等人，Crit. Rev. Oncol./Hematol. 38 (2001) 17-23)。

WO 2006/082515係關於源自大鼠單株抗體ICR62之人類化抗-EGFR單株抗體，且係關於其用於癌症治療之糖改造形式。

c-Met及抗-c-Met抗體

MET(間質-上皮轉型因子)係編碼蛋白 MET(亦稱作 c-Met；肝細胞生長因子受體 HGFR；HGF 受體；擴散因子受體；SF 受體；SEQ ID NO: 15)之原癌基因(Dean, M. 等人，Nature 318 (1985) 385-8；Chan, A.M. 等人，Oncogene 1 (1987) 229-33；Bottaro, D.P. 等人，Science 251 (1991) 802-4；Naldini, L. 等人，EMBO J. 10 (1991) 2867-78；Maulik, G. 等人，Cytokine Growth Factor Rev. 13 (2002) 41-59)。MET係胚胎發育及傷口癒合必需之膜受體。肝細胞生長因子(HGF)係MET受體之唯一已知配體。MET通常由上皮來源之細胞表現，而HGF之表現受限於間質來源之細胞。在HGF刺激後，MET誘導若干種生物反應，其共同引發稱作侵襲性生長之程序。癌症中之異常MET活化與預後較差有關，其中活性異常的MET誘發腫瘤生長、形成向腫瘤供應營養之新血管(血管發生)、及癌症向其他器官擴

散(轉移)。MET在多種類型之人類惡性腫瘤中解除調節，包括腎癌、肝癌、胃癌、乳癌及腦癌。通常，僅幹細胞及祖細胞表現MET，其使得該等細胞可侵襲性生長以在胚胎中生成新組織或在成人中使受損組織再生。然而，人們認為癌症幹細胞可劫持正常幹細胞表現MET之能力，且由此使得癌症可持續存留並擴散至體內其他位點。

原癌基因MET之產物係肝細胞生長因子受體且編碼酪氨酸-激酶活性。對原始單鏈前體蛋白實施轉譯後裂解以產生 α 及 β 亞單元，使其以二硫鍵連接以形成成熟受體。MET基因中之多種突變與乳突樣腎癌有關。

抗-c-Met抗體可參見(例如)US 5,686,292、US 7,476,724、WO 2004/072117、WO 2004/108766、WO 2005/016382、WO 2005/063816、WO 2006/015371、WO 2006/104911、WO 2007/126799、或WO 2009/007427。

C-Met結合肽可參見(例如)Matzke, A.等人，Cancer Res 65 (14) (2005) 6105-10及Tam, Eric, M.等人，J. Mol. Biol. 385 (2009)79-90。

多特異性抗體

最近幾年已研發出眾多種重組抗體形式，例如融合(例如)IgG抗體形式及單鏈結構域之四價雙特異性抗體(例如，參見Coloma, M.J.等人，Nature Biotech 15 (1997) 159-163；WO 2001/077342；及Morrison, S.L., Nature Biotech 25 (2007) 1233-1234)。

亦已研發出幾種不再保留抗體核心結構(IgA、IgD、

IgE、IgG或IgM)之其他新形式，例如雙鏈抗體(diabodies)、三鏈抗體(triabodies)或四鏈抗體(tetrabodies)、微小抗體、幾種單鏈形式(scFv、雙scFv)，其能結合兩種或更多種抗原(Holliger, P.等人，Nature Biotech 23 (2005) 1126-1136；Fischer, N., Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14；Shen, J.等人，Journal of Immunological Methods 318 (2007) 65-74；Wu, C.等人，Nature Biotech. 25 (2007) 1290-1297)。

所有該等形式皆使用連接體來融合抗體核心(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)與另一結合蛋白(例如scFv)或融合例如兩個Fab片段或scFv (Fischer, N., Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14)。必須牢記，可藉由維持與天然抗體之高度相似性來保留經由Fc受體結合介導之效應子功能，例如補體依賴性細胞毒性(CDC)或抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。

WO 2007/024715中報導雙可變結構域免疫球蛋白為經改造之多價及多特異性結合蛋白。一種製備生物活性抗體二聚體之方法報導於US 6,897,044中。具有至少四個可變結構域經由肽連接體彼此連接之多價F_v抗體構成物報導於US 7,129,330中。二聚及多聚抗原結合結構報導於US 2005/0079170中。包含三個或四個Fab片段藉由連接結構彼此共價結合之三價或四價單特異性抗原結合蛋白，該蛋白並非天然免疫球蛋白，報導於US 6,511,663中。在WO 2006/020258中報導四價雙特異性抗體，其可在原核及真

核細胞中有效表現，且可用於治療性及診斷性方法。一種自包含兩種類型多肽二聚體之混合物分離經由至少一個鏈間二硫鍵連接之二聚體與並非經由至少一個鏈間二硫鍵連接之二聚體或優先合成經由至少一個鏈間二硫鍵連接之二聚體的方法報導於US 2005/0163782中。雙特異性四價受體報導於US 5,959,083中。具有三個或更多個功能性抗原結合位點之經改造之抗體報導於WO 2001/077342中。

多特異性及多價抗原結合多肽報導於WO 1997/001580中。WO 1992/004053報導通常自結合相同抗原決定簇之IgG類單株抗體製備之均偶合物，其係藉由合成性交聯共價連接。對抗原具有高親和力之寡聚單株抗體報導於WO 1991/06305中，其中分泌具有兩個或更多個免疫球蛋白單體之寡聚物(通常為IgG類)，該等單體結合在一起形成四價或六價IgG分子。綿羊源抗體及經改造抗體構成物報導於US 6,350,860中，其可用於治療具有致病性干擾素 γ 活性之疾病。在US 2005/0100543中報導可靶向構成物，其係雙特異性抗體之多價載體，即可靶向構成物之每個分子皆可用作兩個或更多個雙特異性抗體之載體。遺傳改造雙特異性四價抗體報導於WO 1995/009917中。在WO 2007/109254中報導經穩定結合分子，其由經穩定scFv組成或包含該經穩定scFv。US 2007/0274985係關於包含單鏈Fab (scFab)片段之抗體形式。

WO 2008/140493係關於抗-ErbB家族成員抗體及包含一或多個抗-ErbB家族成員抗體之雙特異性抗體。US

2004/0071696係關於可結合ErbB蛋白家族成員之雙特異性抗體分子。

WO 2009111707(A1)係關於使用Met及HER拮抗劑之組合療法。WO 2009111691(A2A3)係關於使用Met及EGFR拮抗劑之組合療法。

WO 2004072117係關於誘導c-Met下調/內化之c-Met抗體，及其尤其在以ErbB-1作為第二抗原之雙特異性抗體中的潛在用途。

【發明內容】

本發明之第一態樣係特異性結合人類ErbB-1及人類c-Met之雙特異性抗體，其包含特異性結合人類ErbB-1之第一抗原結合位點及特異性結合人類c-Met之第二抗原結合位點，其特徵在於，當在2小時後於流式細胞計數分析中針對OVCAR-8細胞進行測量時，與不存在抗體時c-Met之內化相比，該雙特異性抗體顯示c-Met之內化不超過15%。

在本發明一實施例中，該抗體係特異性結合人類ErbB-1及人類c-Met之二價或三價雙特異性抗體，其包含一個或兩個特異性結合人類ErbB-1之抗原結合位點及一個特異性結合人類c-Met之抗原結合位點。

在本發明一實施例中，該抗體係特異性結合人類ErbB-1及人類c-Met之三價雙特異性抗體，其包含兩個特異性結合人類ErbB-1之抗原結合位點及一個特異性結合人類c-Met之第三抗原結合位點。

在本發明一實施例中，該抗體係特異性結合人類ErbB-1

及人類 c-Met 之二價雙特異性抗體，其包含一個特異性結合人類 ErbB-1 之抗原結合位點及一個特異性結合人類 c-Met 之抗原結合位點。

本發明之一態樣係特異性結合人類 ErbB-1 及人類 c-Met 之雙特異性抗體，其包含特異性結合人類 ErbB-1 之第一抗原結合位點及特異性結合人類 c-Met 之第二抗原結合位點，其特徵在於

- i) 該第一抗原結合位點在重鏈可變結構域中包含 SEQ ID NO: 17 之 CDR3H 區、SEQ ID NO: 18 之 CDR2H 區、及 SEQ ID NO: 19 之 CDR1H 區，且在輕鏈可變結構域中包含 SEQ ID NO: 20 之 CDR3L 區、SEQ ID NO: 21 之 CDR2L 區、及 SEQ ID NO: 22 之 CDR1L 區；且該第二抗原結合位點在重鏈可變結構域中包含 SEQ ID NO: 29 之 CDR3H 區、SEQ ID NO: 30 之 CDR2H 區、及 SEQ ID NO: 31 之 CDR1H 區，且在輕鏈可變結構域中包含 SEQ ID NO: 32 之 CDR3L 區、SEQ ID NO: 33 之 CDR2L 區、及 SEQ ID NO: 34 之 CDR1L 區；
- ii) 該第一抗原結合位點在重鏈可變結構域中包含 SEQ ID NO: 23 之 CDR3H 區、SEQ ID NO: 24 之 CDR2H 區、及 SEQ ID NO: 25 之 CDR1H 區，且在輕鏈可變結構域中包含 SEQ ID NO: 26 之 CDR3L 區、SEQ ID NO: 27 之 CDR2L 區、及 SEQ ID NO: 28 之 CDR1L 區；且該第二抗原結合位點在重鏈可變結構域中包含 SEQ ID NO: 29 之 CDR3H 區、SEQ ID NO: 30 之 CDR2H

區、及SEQ ID NO: 31之CDR1H區，且在輕鏈可變結構域中包含SEQ ID NO: 32之CDR3L區、SEQ ID NO: 33之CDR2L區、及SEQ ID NO: 34之CDR1L區。

該雙特異性抗體之特徵較佳在於

- i) 該特異性結合ErbB-1之第一抗原結合位點包含SEQ ID NO: 1之序列作為重鏈可變結構域，且包含SEQ ID NO: 2之序列作為輕鏈可變結構域；且該特異性結合c-Met之第二抗原結合位點包含SEQ ID NO: 5之序列作為重鏈可變結構域，且包含SEQ ID NO: 6之序列作為輕鏈可變結構域；或
- ii) 該特異性結合ErbB-1之第一抗原結合位點包含SEQ ID NO: 3之序列作為重鏈可變結構域，且包含SEQ ID NO: 4之序列作為輕鏈可變結構域；且該特異性結合c-Met之第二抗原結合位點包含SEQ ID NO: 5之序列作為重鏈可變結構域，且包含SEQ ID NO: 6之序列作為輕鏈可變結構域。

本發明另一態樣係本發明雙特異性抗體，其特徵在於包含IgG1或IgG3亞類之恆定區。

在一實施例中，本發明該雙特異性抗體之特徵在於，該抗體在Asn297處經糖鏈糖基化，其中該糖鏈內岩藻糖之量為65%或更低。

本發明另一態樣係編碼該雙特異性抗體鏈之核酸分子。

本發明之其他態樣係包含該雙特異性抗體之醫藥組合物、該用於治療癌症之組合物，該雙特異性抗體用於製造

用於治療癌症之藥物之用途、藉由將該雙特異性抗體投與需要治療之患者來治療患有癌症之患者之方法。

由於EGFR及c-Met係導致磷酸化及下游信號傳導級聯活化之交叉感知受體的一部分，且由於該等受體在腫瘤組織細胞表面之上調(Bachleitner-Hofmann等人，Mol. Canc. Ther, 2009, 3499-3508)，本發明雙特異性<ErbB-1-c-Met>抗體具有有價值的特性，例如抗腫瘤效能及癌細胞抑制。

本發明抗體表現價值極高之特性，例如尤其可抑制表現兩種受體ErbB1及c-Met之癌細胞之生長、對患有癌症之患者有益之抗腫瘤效能。在表現兩種受體ErbB1及c-Met之癌細胞上，本發明雙特異性<ErbB1-c-Met>抗體與其親代單特異性二價<c-Met>抗體相比表現降低之c-Met受體之內化。

【實施方式】

本發明之第一態樣係特異性結合人類ErbB-1及人類c-Met之雙特異性抗體，其包含特異性結合人類ErbB-1之第一抗原結合位點及特異性結合人類c-Met之第二抗原結合位點，其特徵在於，當在2小時後於流式細胞計數分析中對OVCAR-8細胞進行測量時，與不存在該雙特異性抗體時c-Met之內化相比，該雙特異性抗體顯示c-Met之內化不超過15%。

因此本發明係關於特異性結合人類ErbB-1及人類c-Met之雙特異性抗體，其包含特異性結合人類ErbB-1之第一抗原結合位點及特異性結合人類c-Met之第二抗原結合位

點，其中該雙特異性抗體導致當在OVCAR-8細胞-抗體培育1小時後藉由流式細胞計數分析測量時，與不存在抗體時OVCAR-8細胞上c-Met之內化相比，OVCAR-8細胞上c-Met之內化提高不超過15%。

在一實施例中，該特異性結合人類ErbB-1及人類c-Met之雙特異性抗體包含特異性結合人類ErbB-1之第一抗原結合位點及特異性結合人類c-Met之第二抗原結合位點，其特徵在於，當在2小時後於流式細胞計數分析中對OVCAR-8細胞進行測量時，與不存在該雙特異性抗體時c-Met之內化相比，該雙特異性抗體顯示c-Met之內化不超過10%。

在一實施例中，該特異性結合人類ErbB-1及人類c-Met之雙特異性抗體包含特異性結合人類ErbB-1之第一抗原結合位點及特異性結合人類c-Met之第二抗原結合位點，其特徵在於，當在2小時後於流式細胞計數分析中對OVCAR-8細胞進行測量時，與不存在該雙特異性抗體時c-Met之內化相比，該雙特異性抗體顯示c-Met之內化不超過7%。

在一實施例中，該特異性結合人類ErbB-1及人類c-Met之雙特異性抗體包含特異性結合人類ErbB-1之第一抗原結合位點及特異性結合人類c-Met之第二抗原結合位點，其特徵在於，當在2小時後於流式細胞計數分析中對OVCAR-8細胞進行測量時，與不存在該雙特異性抗體時c-Met之內化相比，該雙特異性抗體顯示c-Met之內化不超過5%。

術語「c-Met之內化」係指相對於不存在抗體時c-Met之內化，在OVCAR-8細胞(NCI細胞系名稱；購自NCI(國家

癌 症 研 究 所)OVCAR-8-NCI ; Schilder RJ 等 人 , Int J Cancer. 1990 年 3 月 15 日 ; 45(3):416-22 ; Ikediobi ON 等 人 , Mol Cancer Ther. 2006 ; 5 ; 2606-12 ; Lorenzi, P.L. 等 人 , Mol Cancer Ther 2009 ; 8(4):713-24)上由抗體誘導之 c-Met受體內化。該c-Met受體之內化係由本發明雙特異性抗體誘導,且係在2小時後於流式細胞計數分析(FACS)中測量,如實例9中所述。在抗體暴露2小時後,與不存在抗體時c-Met之內化相比,本發明雙特異性抗體在OVCAR-8細胞上顯示c-Met之內化不超過15%。在一實施例中,該抗體顯示c-Met之內化不超過10%。在一實施例中,該抗體顯示c-Met之內化不超過7%。在一實施例中,該抗體顯示c-Met之內化不超過5%。

本發明另一態樣係特異性結合人類ErbB-1及人類c-Met之雙特異性抗體,其包含特異性結合人類ErbB-1之第一抗原結合位點及特異性結合人類c-Met之第二抗原結合位點,其特徵在於,當在2小時後於流式細胞計數分析中對OVCAR-8細胞進行測量時,與由(相應)單特異性二價親代c-Met抗體誘導之c-Met之內化相比,該雙特異性抗體可使c-Met之內化降低50%或更多(在一實施例中,降低60%或更多;在另一實施例中,降低70%或更多;在一實施例中,降低80%或更多)。如下所述計算c-Met之內化之降低(使用在2小時後於流式細胞計數分析中對OVCAR-8細胞進行測量之內化%值,而將低於0之內化%值設定為0%內化,例如對於BsAB01而言(-14%內化設定為0%內化)):

$100 \times (\text{由單特異性二價親代 c-Met 抗體誘導之 c-Met 之內化 \%} - \text{由雙特異性 ErbB-1/cMet 抗體誘導之 c-Met 之內化 \%}) / \text{由單特異性二價親代 c-Met 抗體誘導之 c-Met 之內化 \%}$ 。舉例而言：雙特異性 ErbB-1/cMet 抗體 BsAB01 顯示 c-Met 之內化為 -14%，將其設定為 0%；且單特異性二價親代 c-Met 抗體 Mab 5D5 顯示 c-Met 之內化為 44%。因此，雙特異性 ErbB-1/cMet 抗體 BsAB01 顯示 c-Met 之內化降低 $100 \times (40 - 0) / 40\% = 100\%$ (參見實例 9 中在 2 小時後於流式細胞計數分析中對 OVCAR-8 細胞進行測量之內化值)。

本文所用「抗體」係指包含抗原結合位點之結合蛋白。本文所用術語「結合位點」或「抗原結合位點」表示抗體分子中實際結合配體且源自抗體之區域。術語「抗原結合位點」包括抗體重鏈可變結構域 (VH) 及 / 或抗體輕鏈可變結構域 (VL)、或 VH/VL 對，且可源自完整抗體或抗體片段，例如單鏈 Fv、VH 結構域及 / 或 VL 結構域、Fab、或 (Fab)₂。在本發明之一實施例中，抗原結合位點各自包含抗體重鏈可變結構域 (VH) 及 / 或抗體輕鏈可變結構域 (VL)，且較佳係藉由由抗體輕鏈可變結構域 (VL) 及抗體重鏈可變結構域 (VH) 組成之對來形成。

除源自抗體之抗原結合位點外，結合肽 (例如，如 Matzke, A. 等人，Cancer Res. 65 (14) (2005) 6105-10 中所述) 亦可特異性結合抗原 (例如 c-Met)。因此本發明另一態樣係特異性結合人類 ErbB-1 及人類 c-Met 之雙特異性結合分子，其包含特異性結合人類 ErbB-1 之抗原結合位點及特

異性結合人類c-Met之結合肽。因此本發明另一態樣係特異性結合人類ErbB-1及人類c-Met之雙特異性結合分子，其包含特異性結合人類c-Met之抗原結合位點及特異性結合人類ErbB-1之結合肽。

Erb-B1(亦稱作ERBB1、人類表皮生長因子受體、EGFR、HER-1或鳥類成紅細胞白血病毒(v-erb-b)癌基因同源物；SEQ ID NO: 16)係由c-erbB原癌基因編碼之170 kDa跨膜受體，且表現固有的酪胺酸激酶活性(Modjtahedi, H.等人，Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235；Herbst, R.S.及Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611)。EGFR亦存在多種亞型及變體(例如選擇性RNA轉錄物、經截短形式、多態性等)，包括(但不限於)彼等由Swissprot數據庫條目號P00533-1、P00533-2、P00533-3及P00533-4標識者。已知EGFR可結合各種配體，包括表皮生長因子(EGF)、轉化生長因子- α (TGf- α)、雙調蛋白、肝素結合性EGF (hb-EGF)、 β 細胞素、及表皮調節素(Herbst, R.S.及Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611；Mendelsohn, J.及Baselga, J., Oncogene 19 (2000) 6550-6565)。EGFR經由酪胺酸-激酶介導之信號轉導途徑調節多種細胞過程，包括(但不限於)控制細胞增殖、分化、細胞存活、細胞凋亡、血管發生、有絲分裂發生、及轉移之信號轉導途徑之活化(Atalay, G.等人，Ann. Oncology 14 (2003) 1346-1363；Tsao, A.S.及Herbst, R.S., Signal 4 (2003) 4-9；Herbst, R.S.及Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611；

Modjtahedi, H.等人, Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235)。

特異性結合人類ErbB-1之抗原結合位點及尤其重鏈可變結構域(VH)及/或抗體輕鏈可變結構域(VL)可源自a)已知抗-ErbB-1抗體, 例如IMC-C225(西妥昔單抗, Erbitux®; ImClone)(Herbst, R.S. 及 Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611)、ABX-EGF (Abgenix)(Yang, X.D.等人, Crit. Rev. Oncol./Hematol. 38 (2001) 17-23)、人類化ICR62 (WO 2006/082515)或其他抗體(例如如US 5,891,996、US 5,558,864中所述); 或b)藉由尤其使用人類ErbB-1蛋白或其核酸或片段實施之重新免疫方法或藉由噬菌體展示法獲得之新抗-ErbB-1抗體。

MET(間質-上皮過渡因子)係編碼蛋白MET之原癌基因(亦稱作c-Met; 肝細胞生長因子受體HGFR; HGF受體; 擴散因子受體; SF受體; SEQ ID NO: 15)(Dean, M.等人, Nature 318 (1985) 385-8; Chan, A.M.等人, Oncogene 1 (1987) 229-33; Bottaro, D.P.等人, Science 251 (1991) 802-4; Naldini, L.等人, EMBO J. 10 (1991) 2867-78; Maulik, G.等人, Cytokine Growth Factor Rev. 13 (2002) 41-59)。MET係胚胎發育及傷口癒合必需之膜受體。肝細胞生長因子(HGF)係MET受體之唯一已知配體。MET通常由上皮來源之細胞表現, 而HGF之表現受限於間質來源之細胞。在HGF刺激後, MET誘導若干種生物反應, 其共同引發稱作侵襲性生長之程序。癌症中之異常MET活化與預後較差有關, 其中活性異常的MET誘發腫瘤生長、形成向

腫瘤供應營養之新血管(血管發生)、及癌症向其他器官擴散(轉移)。MET在多種類型之人類惡性腫瘤中解除調節，包括腎癌、肝癌、胃癌、乳癌及腦癌。通常，僅幹細胞及祖細胞表現MET，其使得該等細胞可侵襲性生長以在胚胎中生成新組織或在成人中使受損組織再生。然而，人們認為癌症幹細胞可劫持正常幹細胞表現MET之能力，且由此使得癌症可持續存留並擴散至體內其他位點。

特異性結合人類c-Met之抗原結合位點及尤其重鏈可變結構域(VH)及/或抗體輕鏈可變結構域(VL)可源自a) 已知抗-c-Met抗體(例如如US 5,686,292、US 7,476,724、WO 2004/072117、WO 2004/108766、WO 2005/016382、WO 2005/063816、WO 2006/015371、WO 2006/104911、WO 2007/126799、或WO 2009/007427中所述)；b) 藉由(例如)尤其使用人類抗-c-Met蛋白或其核酸或片段實施之重新免疫方法或藉由噬菌體展示法獲得之新抗-c-Met抗體。

本發明另一態樣係特異性結合人類ErbB-1及人類c-Met之雙特異性抗體，其包含特異性結合人類ErbB-1之第一抗原結合位點及特異性結合人類c-Met之第二抗原結合位點，其特徵在於

- i) 該特異性結合ErbB-1之第一抗原結合位點包含SEQ ID NO: 1之序列作為重鏈可變結構域，且包含SEQ ID NO: 2之序列作為輕鏈可變結構域；且
- 該特異性結合c-Met之第二抗原結合位點包含SEQ ID NO: 5之序列作為重鏈可變結構域，且包含SEQ ID

NO: 6之序列作為輕鏈可變結構域；或

ii) 該特異性結合ErbB-1之第一抗原結合位點包含SEQ

ID NO: 3之序列作為重鏈可變結構域，且包含SEQ

ID NO: 4之序列作為輕鏈可變結構域；且

該特異性結合c-Met之第二抗原結合位點包含SEQ ID

NO: 5之序列作為重鏈可變結構域，且包含SEQ ID

NO: 6之序列作為輕鏈可變結構域。

抗體特異性係指抗體對抗原特定表位之選擇性識別。例如，天然抗體具有單特異性。本發明「雙特異性抗體」係具有兩種不同抗原結合特異性之抗體。倘若抗體具有不止一種特異性，則所識別表位可能與單一抗原或不止一種抗原相關。本發明抗體對兩種不同抗原具有特異性，即作為第一抗原之ErbB-1及作為第二抗原之c-Met。

本文所用術語「單特異性」抗體表示具有一或多個結合位點之抗體，該等結合位點各自結合相同抗原上之相同表位。

本申請案所用術語「價」表示抗體分子中存在特定數量之結合位點。因此，術語「二價」、「四價」、及「六價」分別表示在抗體分子中存在兩個結合位點、四個結合位點、及六個結合位點。本發明雙特異性抗體至少為「二價」且可為「三價」或「多價」（例如「四價」或「六價」）。

本發明抗體之抗原結合位點可含有六個互補決定區(CDR)，其不同程度地促進結合位點對抗原之親和力。存

在三個重鏈可變結構域CDR(CDRH1、CDRH2及CDRH3)及三個輕鏈可變結構域CDR(CDRL1、CDRL2及CDRL3)。CDR及框架區(FR)之範圍取決於與胺基酸序列之經編譯數據庫的比對，其中該等區域已根據各序列間之差異加以界定。本發明範圍內亦包含包括較少CDR(即其中結合特異性取決於三個、四個或五個CDR)之功能性抗原結合位點。舉例而言，不足全套6個CDR之CDR數對於結合即已足夠。在某些情形下，VH或VL結構域即足夠。

在較佳實施例中，本發明抗體另外包含一或多個人源免疫球蛋白種類之免疫球蛋白恆定區。免疫球蛋白種類包括IgG、IgM、IgA、IgD、及IgE同種型，且在IgG及IgA情形下包括其亞型。在一較佳實施例中，本發明抗體具有IgG型抗體之恆定結構域結構，且具有四個抗原結合位點。此係藉由(例如)以下方式來完成：連接一個(或兩個)特異性結合c-Met之完整抗原結合位點(例如單鏈Fab片段或單鏈Fv)與特異性結合ErbB-1之完整抗體之N或C端重鏈或輕鏈，從而產生三價雙特異性抗體(或四價雙特異性抗體)。或者可使用針對人類ErbB-1及人類c-Met之IgG樣雙特異性二價抗體，其包含免疫球蛋白恆定區，如(例如)以下文獻中所述：EP 07024867.9、EP 07024864.6、EP 07024865.3或Ridgway, J.B., Protein Eng. 9 (1996) 617-621；WO 96/027011；Merchant, A.M.等人，Nature Biotech 16 (1998) 677-681；Atwell, S.等人，J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35及EP 1870459A1。

本文所用術語「單株抗體」或「單株抗體組合物」係指具有單一胺基酸組成之抗體分子製劑。

術語「嵌合抗體」係指包含來自一種來源或物種之可變區(即結合區)及源自不同來源或物種之恆定區之至少一部分的抗體，其通常係藉由重組DNA技術來製備。包含鼠類可變區及人類恆定區之嵌合抗體較佳。本發明所涵蓋之其他較佳形式之「嵌合抗體」係彼等恆定區已相對於原始抗體進行修飾或改變從而尤其在C1q結合及/或Fc受體(FcR)結合方面獲得本發明特性者。該等嵌合抗體亦稱作「種類轉換抗體」。嵌合抗體係免疫球蛋白基因之表現產物，該等免疫球蛋白基因包含編碼免疫球蛋白可變區之DNA片段及編碼免疫球蛋白恆定區之DNA片段。製備嵌合抗體之方法涉及業內熟知之習用重組DNA及基因轉染技術。例如，參見Morrison, S.L.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855；US 5,202,238及US 5,204,244。

術語「人類化抗體」係指框架區或「互補決定區」(CDR)已經修飾而包含與親代免疫球蛋白CDR相比具有不同特異性之免疫球蛋白CDR的抗體。在一較佳實施例中，將鼠類CDR移植入人類抗體之框架區中以製備「人類化抗體」。例如，參見Riechmann, L.等人，Nature 332 (1988) 323-327；及Neuberger, M.S.等人，Nature 314 (1985) 268-270。尤佳CDR對應於嵌合抗體中彼等代表可識別上述抗原之序列者。本發明所涵蓋之其他形式之「人類化抗體」係彼等恆定區已相對於原始抗體進行額外修飾或改變從而

尤其在C1q結合及/或Fc受體(FcR)結合方面獲得本發明特性者。

本文所用術語「人類抗體」意欲包括具有源自人類種系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區之抗體。人類抗體已為當前業內所熟知(van Dijk, M.A.及van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374)。亦可在轉基因動物(例如小鼠)中產生人類抗體,該等轉基因動物在免疫後能在不產生內源免疫球蛋白之情況下產生全譜系之人類抗體或所選人類抗體。將人類種系免疫球蛋白基因陣列轉移至該等種系之突變小鼠中使得可在抗原激發後產生人類抗體(例如,參見Jakobovits, A.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A.等人, Nature 362 (1993) 255-258; Brüggemann, M.等人, Year Immunol. 7 (1993) 33-40)。人類抗體亦可在噬菌體展示文庫中產生(Hoogenboom, H.R.及Winter, G.J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D.等人, J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597)。亦可使用Cole, S.P.C.等人及Boerner, P.等人之技術來製備人類單株抗體(Cole, S.P.C.等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Liss, A.L., (1985) 77-96; 及Boerner, P.等人, J. Immunol. 147 (1991) 86-95)。如已提及之本發明嵌合及人類化抗體,本文所用術語「人類抗體」亦包含該等恆定區中經修飾從而尤其在C1q結合及/或FcR結合方面獲得本發明特性之抗體,例如藉由「種類轉換」來修飾,即,使Fc部分發生改變或突變

(例如自 IgG1 變為 IgG4 及 / 或 IgG1/IgG4 突變)。

本文所用術語「重組人類抗體」意欲包括所有藉由重組方式製備、表現、產生或分離之人類抗體，例如自諸如 NS0 或 CHO 細胞等宿主細胞或自人類免疫球蛋白基因之轉基因動物(例如小鼠)分離之抗體，或使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體表現之抗體。該等重組人類抗體具有重排形式之可變及恆定區。本發明之重組人類抗體已經活體內體細胞超突變。因此，重組抗體之 VH 及 VL 區之胺基酸序列雖然源自且相關於人類種系 VH 及 VL 序列，但可能天然不存在於活體內人類抗體種系譜中。

本文所用「可變結構域」(輕鏈可變結構域(VL)、重鏈可變區(VH))表示直接參與抗體與抗原結合之輕鏈及重鏈對中之每一者。人類輕鏈及重鏈可變結構域具有相同一般結構，且每一結構域包含四個序列高度保守之框架區(FR)，經由三個「超變區」(或互補決定區，CDR)連接。框架區採用 β -片構形，CDRs可形成連接 β -片結構之環。各鏈中之CDRs藉由框架區保持三維結構，並與另一鏈中之CDRs一起形成抗原結合位點。抗體重鏈及輕鏈之CDR3區在本發明抗體之結合特異性/親和性方面具有特別重要之作用，由此提供本發明之另一目的。

本文所用術語「超變區」或「抗體之抗原結合部分或抗原結合位點」係指抗體中負責與抗原結合之胺基酸殘基。超變區包含「互補決定區」或「CDRs」之胺基酸殘基。「框架」或「FR」區係本文所定義超變區殘基以外的可變

結構域區。因此，抗體之輕鏈及重鏈自N端至C端包含結構域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。各鏈上之CDRs係藉由該等框架胺基酸間隔。重鏈之CDR3尤其為對抗原結合貢獻最大之區域。CDR及FR區係根據Kabat等人(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))之標準定義確定。

本文所用術語「結合」或「特異性結合」係指在體外分析中抗體與抗原(人類ErbB-1或人類c-Met)表位之結合，較佳係在電漿共振分析(BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Sweden)中與純化野生型抗原之結合。結合親和力定義為術語 k_a (抗體/抗原複合物中抗體結合之速率常數)、 k_D (解離常數)及 K_D (k_D/k_a)。結合或特異性結合意指結合親和力(K_D)為 10^{-8} mol/l或更低，較佳為 10^{-9} M至 10^{-13} mol/l。因此，本發明雙特異性<ErbB1-c-Met>抗體以 10^{-8} mol/l或更低、較佳 10^{-9} M至 10^{-13} mol/l之親和力(K_D)與各特異性抗原特異性結合。

可藉由BIAcore分析(GE-Healthcare Uppsala, Sweden)來研究抗體與FcγRIII之結合。結合親和力定義為術語 k_a (抗體/抗原複合物中抗體結合之速率常數)、 k_D (解離常數)及 K_D (k_D/k_a)。

術語「表位」包括能特異性結合抗體之任何多肽決定簇。在某些實施例中，表位決定簇包括分子之化學活性表面基團，例如胺基酸、糖側鏈、磷醯基、或磺醯基，且在

某些實施例中可具有特定的三維結構特徵及/或比電荷特徵。表位係抗原中結合抗體之區域。

在某些實施例中，當抗體在蛋白質及/或高分子複合混合物中優先識別其靶抗原時，認為該抗體可特異性結合該抗原。

本申請案中所用術語「恆定區」表示抗體中除可變區以外之結構域的總和。恆定區並非直接參與抗原結合，而是表現出各種效應子功能。端視抗體重鏈恆定區之胺基酸序列，可將抗體分為以下幾類：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且其中若干種類可進一步分為多個亞類，例如IgG1、IgG2、IgG3及IgG4、IgA1及IgA2。對應於不同抗體種類之重鏈恆定區分別稱作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、及 μ 。在所有五種抗體種類中可發現之輕鏈恆定區稱作 κ (kappa)及 λ (lambda)。恆定區較佳得自人類來源。

本申請案中所用術語「得自人類來源之恆定區」表示IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亞類人類抗體之重鏈恆定區及/或輕鏈 κ 或 λ 恆定區。該等恆定區為當前業內所熟知且由(例如)Kabat, E.A.所闡述(例如，參見Johnson, G.及Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 2785-2788)。

在一實施例中，本發明雙特異性抗體包含IgG1或IgG3亞類(較佳為IgG1亞類)之恆定區，其較佳得自人類來源。在一實施例中，本發明雙特異性抗體包含IgG1或IgG3亞類(較佳為IgG1亞類)之Fc部分，其較佳得自人類來源。

IgG4亞類之抗體顯示降低之Fc受體(FcγRIIIa)結合，同時其他IgG亞類之抗體顯示較強結合。然而，Pro238、Asp265、Asp270、Asn297(喪失Fc碳水化合物)、Pro329、Leu234、Leu235、Gly236、Gly237、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434、及His435係在改變後亦可提供降低之Fc受體結合之殘基(Shields, R.L.等人，J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604；Lund, J.等人，FASEB J. 9 (1995) 115-119；Morgan, A.等人，Immunology 86 (1995) 319-324；EP 0 307 434)。

在一實施例中，本發明抗體相對於IgG1抗體及全長親代抗體具有降低之FcR結合，其在FcR結合方面屬於IgG4亞類或IgG1或IgG2亞類且在S228、L234、L235及/或D265處具有突變，及/或含有PVA236突變。在一實施例中，全長親代抗體中之突變係S228P、L234A、L235A、L235E及/或PVA236。在另一實施例中，全長親代抗體中之突變係IgG4 S228P及IgG1 L234A及L235A。

抗體恆定區直接參與ADCC(抗體依賴性細胞介導細胞毒性)及CDC(補體依賴性細胞毒性)。補體活化(CDC)係藉由使補體因子C1q與大多數IgG抗體亞類之恆定區結合來起始。C1q與抗體之結合係藉由在所謂的結合位點實施所定義之蛋白質間交互作用來引發。該等恆定區結合位點為當前業內所知且闡述於(例如)以下文獻中：Lukas, T., J.等人，J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560；Brunhouse, R.及Cebra, J., J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917；Burton,

D., R.等人, Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J., E.等人, Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E., E.等人, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M.等人, J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A.等人, Immunology 86 (1995) 319-324; 及 EP 0 307 434。該等恆定區結合位點之特徵在於(例如)胺基酸 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331及 P329(根據 Kabat之EU索引來編號)。

術語「抗體依賴性細胞毒性(ADCC)」係指人類靶細胞在效應子細胞存在下由本發明抗體溶解。較佳在效應子細胞存在下藉由用本發明抗體處理ErB-1及c-Met表現細胞之製劑來測量ADCC, 該等效應子細胞例如剛分離之PBMC或自血沉棕黃層純化之效應子細胞, 例如單核細胞或天然殺傷(NK)細胞或持久生長NK細胞系。

術語「補體依賴性細胞毒性(CDC)」表示藉由使補體因子C1q與大多數IgG抗體亞類之Fc部分結合來起始之過程。C1q與抗體之結合係藉由在所謂的結合位點實施所定義之蛋白質間交互作用來引發。該等Fc部分結合位點為當前業內已知(參見上文)。該等Fc部分結合位點之特徵在於(例如)胺基酸 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331、及 P329(根據 Kabat之EU索引來編號)。IgG1、IgG2及IgG3亞類抗體通常顯示包括C1q及C3結合在內之補體活化, 而IgG4不活化補體系統且不結合C1q及/或C3。

單株抗體之細胞介導效應子功能可藉由改造其寡糖組份來增強，如 Umana, P. 等人，Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180；及 US 6,602,684 所述。IgG1 型抗體係最常用治療性抗體，其為在各 CH2 結構域中之 Asn297 處具有保守 N-連接糖基化位點之糖蛋白。與 Asn297 附接之兩種複雜二天線 (biantennary) 寡糖包埋於 CH2 結構域之間，與多肽骨架形成廣泛接觸，且其存在為抗體介導諸如抗體依賴性細胞毒性 (ADCC) 等效應子功能所必需 (Lifely, M. R. 等人，Glycobiology 5 (1995) 813-822；Jefferis, R. 等人，Immunol. Rev. 163 (1998) 59-76；Wright, A. 及 Morrison, S. L.，Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32)。Umana, P. 等人，Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 及 WO 99/54342 顯示，中國倉鼠卵巢 (CHO) 細胞中 $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖胺基轉移酶 III (「GnTIII」)(一種催化形成二等分型 (bisected) 寡糖之糖基轉移酶) 之過表現可顯著提高抗體之活體外 ADCC 活性。Asn297 碳水化合物組成中之改變或其消除亦影響與 Fc γ R 及 C1q 之結合 (Umana, P. 等人，Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180；Davies, J. 等人，Biotechnol. Bioeng. 74 (2001) 288-294；Mimura, Y. 等人，J. Biol. Chem. 276 (2001) 45539-45547；Radaev, S. 等人，J. Biol. Chem. 276 (2001) 16478-16483；Shields, R.L. 等人，J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604；Shields, R.L. 等人，J. Biol. Chem. 277 (2002) 26733-26740；Simmons, L.C. 等人，J. Immunol. Methods 263 (2002) 133-147)。

藉由減少岩藻糖之量來增強單株抗體之細胞介導效應子功能之方法闡述於(例如)以下文獻中：WO 2005/018572、WO 2006/116260、WO 2006/114700、WO 2004/065540、WO 2005/011735、WO 2005/027966、WO 1997/028267、US 2006/0134709、US 2005/0054048、US 2005/0152894、WO 2003/035835、WO 2000/061739；Niwa, R.等人，J. Immunol. Methods 306 (2005) 151-160；Shinkawa, T.等人，J Biol Chem, 278 (2003) 3466-3473；WO 03/055993或US 2005/0249722。

在本發明一實施例中，本發明雙特異性抗體在Asn297處經糖鏈糖基化(IgG1或IgG3亞類)，其中該糖鏈內岩藻糖之量為65%或更低(根據Kabat進行編號)。在另一實施例中，該糖鏈內岩藻糖之量介於5%與65%之間，較佳介於20%與40%之間。本發明「Asn297」意指大致位於Fc區中297位之胺基酸天冬醯胺。基於抗體間之較小序列差異，Asn297亦可位於297位上游或下游之數個胺基酸(通常不超過±3個胺基酸)處，即介於294位與300位之間。

人類IgG1或IgG3之糖基化發生在Asn297處，其為核心岩藻糖化二天線複雜寡糖糖基化形式，末端為最多2個Gal殘基。人類IgG1或IgG3亞類之重鏈恆定區詳細報導於以下文獻中：Kabat, E.A.等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)；及Brüggemann, M.等人，J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-

1361 ; Love, T.W. 等人 , Methods Enzymol. 178 (1989) 515-527 。該等結構端視末端 Gal 殘基之量命名為 G0 、 G1(α -1,6- 或 α -1,3-) 或 G2 聚糖殘基 (Raju, T.S., Bioprocess Int.1 (2003) 44-53) 。抗體 Fc 部分之 CHO 類糖基化闡述於 (例如) Routier, F.H., Glycoconjugate J. 14 (1997) 201-207 中。以重組方式在未經糖基修飾之 CHO 宿主細胞中表現之抗體通常在 Asn297 處以至少 85% 之比例經岩藻糖化。全長親代抗體之經修飾寡糖可為雜合寡糖或複雜寡糖。二等分型、經還原/未岩藻糖化寡糖較佳為雜合寡糖。在另一實施例中，二等分型、經還原/未岩藻糖化寡糖為複雜寡糖。

本發明「岩藻糖之量」意指在 Asn297 處之糖鏈內，該糖相對於附接至 Asn297 之所有糖結構(例如複雜結構、雜合體結構及高甘露糖結構)之總和之量，其係藉由 MALDI-TOF 質譜法來測量且計算為平均值。岩藻糖之相對量係含岩藻糖結構相對於 N-糖苷酶 F 處理樣品中所有確定糖結構(分別例如複雜結構、雜合體結構及寡-及高-甘露糖結構)之百分比。(例如，參見 WO 2008/077546(A1))。

一實施例係製備在 Asn297 處經糖鏈糖基化之 IgG1 或 IgG3 亞類雙特異性抗體之方法，其中岩藻糖在該糖鏈內之量為 65% 或更低，且使用以下文獻中所述之程序：WO 2005/044859、WO 2004/065540、WO 2007/031875；Umana, P. 等人，Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180；WO 99/154342、WO 2005/018572、WO 2006/116260、WO

2006/114700、WO 2005/011735、WO 2005/027966、WO 97/028267、US 2006/0134709、US 2005/0054048、US 2005/0152894、WO 2003/035835或WO 2000/061739。

一實施例係製備在Asn297處經糖鏈糖基化之IgG1或IgG3亞類雙特異性抗體之方法，其中岩藻糖在該糖鏈內之量為65%或更低，且使用以下文獻中所述之程序：Niwa, R.等人，J. Immunol. Methods 306 (2005) 151-160；Shinkawa, T.等人，J Biol Chem, 278 (2003) 3466-3473；WO 03/055993或US 2005/0249722。

雙特異性抗體形式

本發明抗體具有兩個或更多個結合位點且為多特異性且較佳為雙特異性。亦即，抗體甚至在具有兩個以上結合位點(即抗體為三價或多價)之情形下亦可為雙特異性。本發明雙特異性抗體包括(例如)多價單鏈抗體、雙鏈抗體及三鏈抗體、以及具有全長抗體恆定結構域結構之抗體，該結構經由一或多個肽連接體連接其他抗原結合位點(例如單鏈Fv、VH結構域及/或VL結構域、Fab、或(Fab)₂)。抗體可為來自單一物種之全長抗體，或為嵌合抗體或人類化抗體。對於具有兩個以上抗原結合位點之抗體而言，某些結合位點可相同，只要該蛋白具有針對兩個不同抗原之結合位點即可。亦即，若第一結合位點對ErbB-1具有特異性，則第二結合位點對c-Met具有特異性，且反之亦然。

在一較佳實施例中，特異性結合人類ErbB-1及人類c-Met之本發明雙特異性抗體包含抗體(較佳為IgG1或IgG3亞

類)之Fc區。

二價雙特異性形式

可使用針對人類ErbB-1及人類c-Met且包含免疫球蛋白恆定區之雙特異性二價抗體，如(例如)以下文獻中所述：WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253或Ridgway, J.B., Protein Eng. 9 (1996) 617-621；WO 96/027011；Merchant, A.M.等人，Nature Biotech 16 (1998) 677-681；Atwell, S.等人，J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35及EP 1870459A1。

因此，在本發明一實施例中，本發明雙特異性<ErbB-1-c-Met>抗體係二價雙特異性抗體，其包含：

- a) 全長抗體中特異性結合ErbB-1之輕鏈及重鏈；及
 - b) 全長抗體中特異性結合人類c-Met之輕鏈及重鏈，
- 其中恆定結構域CL及CH1、及/或可變結構域VL及VH可彼此替代。

在本發明另一實施例中，本發明雙特異性<ErbB-1-c-Met>抗體係二價雙特異性抗體，其包含：

- a) 全長抗體中特異性結合人類c-Met之輕鏈及重鏈；及
 - b) 全長抗體中特異性結合ErbB-1之輕鏈及重鏈，
- 其中恆定結構域CL及CH1、及/或可變結構域VL及VH可彼此替代。

下文所述「隆凸-孔洞結合(knob-into-hole)」技術之實例性示意性結構參見圖2a-c。

為改良該等異二聚二價雙特異性抗-ErbB-1/抗-C-Met抗

體之產率，可藉由「隆凸-孔洞結合」技術來改變該全長抗體之CH3結構域，該技術以若干實例詳細闡述於(例如)以下文獻中：WO 96/027011；Ridgway, J., B.等人，Protein Eng 9 (1996) 617-621；及Merchant, A., M.等人，Nat Biotechnol 16 (1998) 677-681。在此方法中，改變兩個CH3結構域之交互作用表面以增強含有該兩個CH3結構域之兩條重鏈之異二聚作用。兩個CH3結構域(兩條重鏈中)之每一者皆可為「隆凸」，而另一者為「孔洞」。引入二硫橋可穩定異二聚體(Merchant, A., M.等人，Nature Biotech 16 (1998) 677-681；Atwell, S.等人，J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35)並提高產率。

因此在本發明一態樣中，該二價雙特異性抗體之特徵另外在於：

一條重鏈之CH3結構域及另一條重鏈之CH3結構域各自在包含抗體CH3結構域間之初始介面之介面處相遇；

其中該介面經改變以促進二價雙特異性抗體之形成，其中該改變之特徵在於：

a) 一條重鏈之CH3結構域經改變，

從而使得在二價雙特異性抗體內，在遇到一條重鏈之CH3結構域之初始介面的另一條重鏈之CH3結構域的初始介面內，

胺基酸殘基經具有較大側鏈體積之胺基酸殘基替代，從而在一條重鏈之CH3結構域之介面內生成突出物，其可定位於另一條重鏈之CH3結構域之介面

內的腔中，

及

b) 另一條重鏈之CH3結構域經改變，

從而使得在二價雙特異性抗體內，在遇到第一CH3結構域之初始介面的第二CH3結構域之初始介面內，

胺基酸殘基經具有較小側鏈體積之胺基酸殘基替代，由此在第二CH3結構域之介面內生成腔，其中可定位第一CH3結構域之介面內之突出物。

該具有較大側鏈體積之胺基酸殘基較佳選自由以下組成之群：精胺酸(R)、苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)。

該具有較小側鏈體積之胺基酸殘基較佳選自由以下組成之群：丙胺酸(A)、絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)、纈胺酸(V)。

在本發明一態樣中，兩個CH3結構域進一步發生以下改變：在各CH3結構域之相應位置引入半胱胺酸(C)作為胺基酸，從而可在兩個CH3結構域之間形成二硫橋。

在一較佳實施例中，該二價雙特異性抗體在「隆凸鏈」之CH3結構域中包含T366W突變且在「孔洞鏈」之CH3結構域中包含T366S、L368A、Y407V突變。亦可藉由(例如)在「隆凸鏈」之CH3結構域中引入Y349C突變且在「孔洞鏈」之CH3結構域中引入E356C突變或S354C突變來使用CH3結構域之間之另一鏈間二硫橋(Merchant, A.M等人，Nature Biotech 16 (1998) 677-681)。因此在另一較佳實施

例中，該二價雙特異性抗體在兩個CH3結構域中之一者中包含Y349C、T366W突變且在兩個CH3結構域中之另一者中包含E356C、T366S、L368A、Y407V突變；或該二價雙特異性抗體在兩個CH3結構域中之一者中包含Y349C、T366W突變且在兩個CH3結構域中之另一者中包含S354C、T366S、L368A、Y407V突變(一個CH3結構域中之額外Y349C突變與另一CH3結構域中之額外E356C或S354C突變形成鏈間二硫橋)(始終根據Kabat之EU索引來編號)。但或者或另外，亦可使用其他隆凸-孔洞結合技術，如EP 1870459A1所述。該二價雙特異性抗體之較佳實例係：在「隆凸鏈」之CH3結構域中具有R409D；K370E突變且在「孔洞鏈」之CH3結構域中具有D399K；E357K突變(始終根據Kabat之EU索引來編號)。

在另一較佳實施例中，該二價雙特異性抗體在「隆凸鏈」之CH3結構域中包含T366W突變且在「孔洞鏈」之CH3結構域中包含T366S、L368A、Y407V突變，且另外在「隆凸鏈」之CH3結構域中包含R409D；K370E突變並在「孔洞鏈」之CH3結構域中包含D399K；E357K突變。

在另一較佳實施例中，該二價雙特異性抗體在兩個CH3結構域中之一者中包含Y349C、T366W突變且在兩個CH3結構域中之另一者中包含S354C、T366S、L368A、Y407V突變；或該二價雙特異性抗體在兩個CH3結構域中之一者中包含Y349C、T366W突變且在兩個CH3結構域中之另一者中包含S354C、T366S、L368A、Y407V突變，且另外在

「隆凸鏈」之CH3結構域中包含R409D；K370E突變並在「孔洞鏈」之CH3結構域中包含D399K；E357K突變。

三價雙特異性形式

本發明之另一較佳態樣係三價雙特異性抗體，其包含

- a) 特異性結合人類ErbB-1且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成之全長抗體；及
- b) 一個特異性結合人類c-Met之單鏈Fab片段，
其中該b)中之單鏈Fab片段經由該a)中之全長抗體重鏈或輕鏈C或N端之肽連接物與該全長抗體融合。

下文所述「隆凸-孔洞結合」技術之實例性示意性結構參見圖5a。

本發明之另一較佳態樣係三價雙特異性抗體，其包含

- a) 特異性結合人類ErbB-1且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成之全長抗體；及
- b) 一個特異性結合人類c-Met之單鏈Fv片段，
其中該b)中之單鏈Fv片段經由該a)中之全長抗體重鏈或輕鏈C或N端之肽連接物與該全長抗體融合。

下文所述「隆凸-孔洞結合」技術之實例性示意性結構參見圖5b。

在一較佳實施例中，該結合人類c-Met之單鏈Fab或Fv片段經由該全長抗體重鏈C端之肽連接物與該全長抗體融合。

本發明之另一較佳態樣係三價雙特異性抗體，其包含

- a) 特異性結合人類ErbB-1且由兩個抗體重鏈及兩個抗

體輕鏈組成之全長抗體；

b) 由以下組成之多肽：

ba) 抗體重鏈可變結構域(VH)；或

bb) 抗體重鏈可變結構域(VH)及抗體恆定結構域1 (CH1)，

其中該多肽以該VH結構域之N端經由肽連接物與該全長抗體兩條重鏈中一條之C端融合；

c) 由以下組成之多肽：

ca) 抗體輕鏈可變結構域(VL)，或

cb) 抗體輕鏈可變結構域(VL)及抗體輕鏈恆定結構域 (CL)；

其中該多肽以該VL結構域之N端經由肽連接物與該全長抗體兩條重鏈中另一條之C端融合；

且其中該b)中之多肽之抗體重鏈可變結構域(VH)及該c)中之多肽之抗體輕鏈可變結構域(VL)一起形成特異性結合人類c-Met之抗原結合位點。

該等b)及c)中之肽連接物較佳相同且為具有至少25個胺基酸、較佳介於30與50個胺基酸之間之肽。

實例性示意性結構參見圖3a-c。

視需要藉由在以下位置之間引入二硫鍵經由鏈間二硫橋來連接及穩定該b)中之多肽之抗體重鏈可變結構域(VH)及該c)中之多肽之抗體輕鏈可變結構域(VL)：

i) 重鏈可變結構域44位與輕鏈可變結構域100位，

ii) 重鏈可變結構域105位與輕鏈可變結構域43位，或

iii) 重鏈可變結構域101位與輕鏈可變結構域100位(始終根據Kabat之EU索引來編號)。

引入非天然二硫橋來進行穩定之技術闡述於(例如)以下文獻中：WO 94/029350、Rajagopal等人，Prot. Engin. (1997) 1453-59；Kobayashi, H.等人，Nuclear Medicine & Biology 25 (1998) 387-393；或 Schmidt, M.等人，Oncogene 18 (1999) 1711-1721。在一實施例中，b)及c)中之多肽之可變結構域之間的可選二硫鍵介於重鏈可變結構域44位與輕鏈可變結構域100位之間。在一實施例中，b)及c)中之多肽之可變結構域之間的可選二硫鍵介於重鏈可變結構域105位與輕鏈可變結構域43位之間(始終根據Kabat之EU索引來編號)。在一實施例中，在單鏈Fab片段之可變結構域VH與VL之間未經該可選二硫鍵穩定之三價雙特異性抗體較佳。

藉由融合單鏈Fab、Fv片段與重鏈中之一者(圖5a或5b)或藉由融合不同多肽與全長抗體之兩個重鏈(圖3a-c)，獲得異二聚三價雙特異性抗體。為改良該等異二聚三價雙特異性抗-ErbB-1/抗-C-Met抗體之產率，可藉由「隆凸-孔洞結合」技術來改變該全長抗體之CH3結構域，該技術以若干個實例詳細闡述於(例如)以下文獻中：WO 96/027011；Ridgway, J.B.等人，Protein Eng 9 (1996) 617-621；及 Merchant, A.M.等人，Nat Biotechnol 16 (1998) 677-681。在此方法中，兩個CH3結構域之交互作用表面經改變以增強含有該兩個CH3結構域之兩條重鏈之異二聚化作用。兩

個CH3結構域(兩條重鏈中)之每一者皆可為「隆凸」，而另一者為「孔洞」。引入二硫橋可穩定異二聚體(Merchant, A.M.等人，Nature Biotech 16 (1998) 677-681；Atwell, S.等人，J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35)並提高產率。

因此在本發明一態樣中，該三價雙特異性抗體之特徵另外在於

全長抗體中一條重鏈之CH3結構域及全長抗體中另一條重鏈之CH3結構域各自在包含抗體CH3結構域之間之初始介面的介面處相遇；

其中該介面經改變以促進二價雙特異性抗體之形成，其中該改變之特徵在於：

a) 一條重鏈之CH3結構域經改變，

從而使得在二價雙特異性抗體內，在遇到一條重鏈之CH3結構域之初始介面的另一條重鏈之CH3結構域的初始介面內，

胺基酸殘基經具有較大側鏈體積之胺基酸殘基替代，從而在一條重鏈之CH3結構域之介面內生成突出物，其可定位於另一條重鏈之CH3結構域之介面內的腔中，

及

b) 另一條重鏈之CH3結構域經改變，

從而使得在三價雙特異性抗體內，在遇到第一CH3結構域之初始介面的第二CH3結構域之初始介面

內，

胺基酸殘基經具有較小側鏈體積之胺基酸殘基替代，由此在第二CH3結構域之介面內生成腔，其中可定位第一CH3結構域之介面內之突出物。

該具有較大側鏈體積之胺基酸殘基較佳選自由以下組成之群：精胺酸(R)、苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)。

該具有較小側鏈體積之胺基酸殘基較佳選自由以下組成之群：丙胺酸(A)、絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)、纈胺酸(V)。

在本發明一態樣中，兩個CH3結構域進一步發生以下改變：在各CH3結構域之相應位置引入半胱胺酸(C)作為胺基酸，從而可在兩個CH3結構域之間形成二硫橋。

在一較佳實施例中，該三價雙特異性抗體在「隆凸鏈」之CH3結構域中包含T366W突變且在「孔洞鏈」之CH3結構域中包含T366S、L368A、Y407V突變。亦可藉由(例如)在「隆凸鏈」之CH3結構域中引入Y349C突變且在「孔洞鏈」之CH3結構域中引入E356C突變或S354C突變來使用CH3結構域之間之另一鏈間二硫橋(Merchant, A.M.等人，Nature Biotech 16 (1998) 677-681)。因此在另一較佳實施例中，該三價雙特異性抗體在兩個CH3結構域之一者中包含Y349C、T366W突變且在兩個CH3結構域中之另一者中包含E356C、T366S、L368A、Y407V突變；或該三價雙特異性抗體在兩個CH3結構域之一者中包含Y349C、T366W突變且在兩個CH3結構域中之另一者中包含

S354C、T366S、L368A、Y407V突變(一個CH3結構域中之額外Y349C突變與另一CH3結構域中之額外E356C或S354C突變形成鏈間二硫橋)(始終根據Kabat之EU索引來編號)。但或者或另外，亦可使用其他隆凸-孔洞結合技術，如EP 1870459A1所述。該三價雙特異性抗體之較佳實例係：在「隆凸鏈」之CH3結構域中具有R409D；K370E突變且在「孔洞鏈」之CH3結構域中具有D399K；E357K突變(始終根據Kabat之EU索引來編號)。

在另一較佳實施例中，該三價雙特異性抗體在「隆凸鏈」之CH3結構域中包含T366W突變且在「孔洞鏈」之CH3結構域中包含T366S、L368A、Y407V突變，且另外在「隆凸鏈」之CH3結構域中包含R409D；K370E突變並在「孔洞鏈」之CH3結構域中包含D399K；E357K突變。

在另一較佳實施例中，該三價雙特異性抗體在兩個CH3結構域中之一者中包含Y349C、T366W突變且在兩個CH3結構域中之另一者中包含S354C、T366S、L368A、Y407V突變；或該三價雙特異性抗體在兩個CH3結構域中之一者中包含Y349C、T366W突變且在兩個CH3結構域中之另一者中包含S354C、T366S、L368A、Y407V突變，且另外在「隆凸鏈」之CH3結構域中包含R409D；K370E突變並在「孔洞鏈」之CH3結構域中包含D399K；E357K突變。

本發明之另一實施例係三價雙特異性抗體，其包含

a) 特異性結合人類ErbB-1且由以下組成之全長抗體：

aa) 兩個抗體重鏈，其在N端至C端方向上由以下組

成：抗體重鏈可變結構域(VH)、抗體重鏈恆定結構域1 (CH1)、抗體鉸鏈區(HR)、抗體重鏈恆定結構域2 (CH2)及抗體重鏈恆定結構域3 (CH3)；及

ab) 兩個抗體輕鏈，其在N端至C端方向上由以下組成：抗體輕鏈可變結構域(VL)、及抗體輕鏈恆定結構域(CL) (VL-CL)；及

b) 一個特異性結合人類c-Met之單鏈Fab片段，

其中該單鏈Fab片段係由抗體重鏈可變結構域(VH)及抗體恆定結構域1 (CH1)、抗體輕鏈可變結構域(VL)、抗體輕鏈恆定結構域(CL)及連接體組成，且其中該等抗體結構域及該連接體在N端至C端方向上具有以下順序中之一種：

ba) VH-CH1-連接體-VL-CL，或 bb) VL-CL-連接體-VH-CH1；

其中該連接體係具有至少30個胺基酸、較佳具有介於32與50個之間之胺基酸的肽；

且其中該b)中之單鏈Fab片段經由該a)中之全長抗體的重鏈或輕鏈C或N端(較佳位於重鏈C端)之肽連接物與該全長抗體融合；

其中該肽連接物係具有至少5個胺基酸、較佳具有介於10與50個之間之胺基酸之肽。

在此實施例中，三價雙特異性抗體較佳在兩個CH3結構域中之一者中包含T366W突變且在兩個CH3結構域中之另一者中包含T366S、L368A、Y407V突變，且該三價雙特

異性抗體更佳在兩個CH3結構域中之一者中包含Y349C、T366W突變且在兩個CH3結構域中之另一者中包含S354C(或E356C)、T366S、L368A、Y407V突變。在該實施例中，三價雙特異性抗體視需要在「隆凸鏈」之CH3結構域中包含R409D；K370E突變並在「孔洞鏈」之CH3結構域中包含D399K；E357K突變。

本發明之另一實施例係三價雙特異性抗體，其包含

- a) 特異性結合人類ErbB-1且由以下組成之全長抗體：
 - aa) 兩個抗體重鏈，其在N端至C端方向上由以下組成：抗體重鏈可變結構域(VH)、抗體重鏈恆定結構域1(CH1)、抗體鉸鏈區(HR)、抗體重鏈恆定結構域2(CH2)及抗體重鏈恆定結構域3(CH3)；及
 - ab) 兩個抗體輕鏈，其在N端至C端方向上由以下組成：抗體輕鏈可變結構域(VL)、及抗體輕鏈恆定結構域(CL)(VL-CL)；及
- b) 一個特異性結合人類c-Met之單鏈Fv片段，

其中該b)中之單鏈Fv片段經由該a)中之全長抗體的重鏈或輕鏈C或N端(較佳位於重鏈C端)之肽連接物與該全長抗體融合；且

其中該肽連接物係具有至少5個胺基酸、較佳具有介於10與50個之間之胺基酸之肽。

在此實施例中，三價雙特異性抗體較佳在兩個CH3結構域中之一者中包含T366W突變且在兩個CH3結構域中之另

一者中包含T366S、L368A、Y407V突變，且該三價雙特異性抗體更佳在兩個CH3結構域中之一者中包含Y349C、T366W突變且在兩個CH3結構域中之另一者中包含S354C(或E356C)、T366S、L368A、Y407V突變。在該實施例中，三價雙特異性抗體視需要在「隆凸鏈」之CH3結構域中包含R409D；K370E突變並在「孔洞鏈」之CH3結構域中包含D399K；E357K突變。

因此一較佳實施例係三價雙特異性抗體，其包含

a) 特異性結合人類ErbB-1且由以下組成之全長抗體：

aa) 兩個抗體重鏈，其在N端至C端方向上由以下組成：抗體重鏈可變結構域(VH)、抗體重鏈恆定結構域1 (CH1)、抗體鉸鏈區(HR)、抗體重鏈恆定結構域2 (CH2)及抗體重鏈恆定結構域3 (CH3)；及

ab) 兩個抗體輕鏈，其在N端至C端方向上由以下組成：抗體輕鏈可變結構域(VL)、及抗體輕鏈恆定結構域(CL) (VL-CL)；及

b) 一個特異性結合人類c-Met之單鏈Fv片段，

其中該b)中之單鏈Fv片段經由該a)中之全長抗體的重鏈C端之肽連接物與該全長抗體融合(產生兩個抗體重鏈-單鏈Fv融合肽)；且

其中該肽連接物係具有至少5個胺基酸之肽。

本發明之另一實施例係三價雙特異性抗體，其包含

a) 特異性結合人類ErbB-1且由以下組成之全長抗體：

aa) 兩個抗體重鏈，其在N端至C端方向上由以下組成：抗體重鏈可變結構域(VH)、抗體重鏈恆定結構域1 (CH1)、抗體鉸鏈區(HR)、抗體重鏈恆定結構域2 (CH2)及抗體重鏈恆定結構域3 (CH3)；及

ab) 兩個抗體輕鏈，其在N端至C端方向上由以下組成：抗體輕鏈可變結構域(VL)、及抗體輕鏈恆定結構域(CL)；及

b) 由以下組成之多肽：

ba) 抗體重鏈可變結構域(VH)；或

bb) 抗體重鏈可變結構域(VH)及抗體恆定結構域1 (CH1)，

其中該多肽以該VH結構域之N端經由肽連接物與該全長抗體兩條重鏈中一條之C端融合(產生抗體重鏈-VH融合肽)，其中該肽連接物係具有至少5個胺基酸、較佳具有介於25與50個之間之胺基酸之肽；

c) 由以下組成之多肽：

ca) 抗體輕鏈可變結構域(VL)，或

cb) 抗體輕鏈可變結構域(VL)及抗體輕鏈恆定結構域(CL)；

其中該多肽以該VL結構域之N端經由肽連接物與該全長抗體兩條重鏈中另一條之C端融合(產生抗體重鏈-VL融合肽)；

其中該肽連接物與b)中之肽連接物相同；

且其中該b)中之多肽之抗體重鏈可變結構域(VH)及該c)中之多肽之抗體輕鏈可變結構域(VL)一起形成特異性結合人類c-Met之抗原結合位點。

在此實施例中，三價雙特異性抗體較佳在兩個CH3結構域中之一者中包含T366W突變且在兩個CH3結構域中之另一者中包含T366S、L368A、Y407V突變，且該三價雙特異性抗體更佳在兩個CH3結構域中之一者中包含Y349C、T366W突變且在兩個CH3結構域中之另一者中包含S354C(或E356C)、T366S、L368A、Y407V突變。在該實施例中，三價雙特異性抗體視需要在「隆凸鏈」之CH3結構域中包含R409D；K370E突變並在「孔洞鏈」之CH3結構域中包含D399K；E357K突變。

在本發明另一態樣中，本發明三價雙特異性抗體包含

a) 結合人類ErbB-1且由兩個抗體重鏈VH-CH1-HR-CH2-CH3及兩個抗體輕鏈VL-CL組成之全長抗體；

(其中兩個CH3結構域中之一者較佳包含Y349C、T366W突變且兩個CH3結構域中之另一者包含S354C(或E356C)、T366S、L368A、Y407V突變)；

b) 由以下組成之多肽：

ba) 抗體重鏈可變結構域(VH)；或

bb) 抗體重鏈可變結構域(VH)及抗體恆定結構域1(CH1)，

其中該多肽以該VH結構域之N端經由肽連接物與該全長抗體兩條重鏈中一條之C端融合；

c) 由以下組成之多肽：

ca) 抗體輕鏈可變結構域(VL)，或

cb) 抗體輕鏈可變結構域(VL)及抗體輕鏈恆定結構域(CL)；

其中該多肽以該VL結構域之N端經由肽連接物與該全長抗體兩條重鏈中另一條之C端融合；

且其中該b)中之多肽之抗體重鏈可變結構域(VH)及該c)中之多肽之抗體輕鏈可變結構域(VL)一起形成特異性結合人類c-Met之抗原結合位點。

四價雙特異性形式

在一實施例中，本發明多特異性抗體係四價，其中特異性結合人類c-Met之抗原結合位點可抑制c-Met二聚化(例如，如WO 2009/007427中所述)。

在本發明一實施例中，該抗體係特異性結合人類ErbB-1及人類c-Met之四價雙特異性抗體，其包含兩個特異性結合人類ErbB-1之抗原結合位點及兩個特異性結合人類c-Met之抗原結合位點，其中該等特異性結合人類c-Met之抗原結合位點可抑制c-Met二聚化(例如，如WO 2009/007427中所述)。

因此，本發明另一態樣係四價雙特異性抗體，其包含

a) 特異性結合人類c-Met且由兩個抗體重鏈及兩個抗體

輕鏈組成之全長抗體；及

- b) 兩個相同的特異性結合ErbB-1之單鏈Fab片段，
其中該b)中之單鏈Fab片段經由該a)中之全長抗體的重鏈或輕鏈C或N端之肽連接物與該全長抗體融合。

因此，本發明另一態樣係四價雙特異性抗體，其包含

- a) 特異性結合人類ErbB-1且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成之全長抗體；及

- b) 兩個相同的特異性結合人類c-Met之單鏈Fab片段，
其中該b)中之單鏈Fab片段經由該a)中之全長抗體的重鏈或輕鏈C或N端之肽連接物與該全長抗體融合。

實例性示意性結構參見圖6a。

因此，本發明另一態樣係四價雙特異性抗體，其包含

- a) 特異性結合ErbB-1且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成之全長抗體；及

- b) 兩個相同的特異性結合人類c-Met之單鏈Fv片段，
其中該b)中之單鏈Fv片段經由該a)中之全長抗體的重鏈或輕鏈C或N端之肽連接物與該全長抗體融合。

因此，本發明另一態樣係四價雙特異性抗體，其包含

- a) 特異性結合人類c-Met且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成之全長抗體；及

- b) 兩個相同的特異性結合ErbB-1之單鏈Fv片段，
其中該b)中之單鏈Fv片段經由該a)中之全長抗體的重鏈或輕鏈C或N端之肽連接物與該全長抗體融合。

實例性示意性結構參見圖6b。

在一較佳實施例中，該等結合人類c-Met或人類ErbB-1之單鏈Fab或Fv片段經由該全長抗體重鏈C端之肽連接物與該全長抗體融合。

本發明之另一實施例係四價雙特異性抗體，其包含

a) 特異性結合人類ErbB-1且由以下組成之全長抗體：

aa) 兩個相同抗體重鏈，其在N端至C端方向上由以下組成：抗體重鏈可變結構域(VH)、抗體重鏈恆定結構域1 (CH1)、抗體鉸鏈區(HR)、抗體重鏈恆定結構域2 (CH2)及抗體重鏈恆定結構域3 (CH3)；及

ab) 兩個相同抗體輕鏈，其在N端至C端方向上由以下組成：抗體輕鏈可變結構域(VL)、及抗體輕鏈恆定結構域(CL) (VL-CL)；及

b) 兩個特異性結合人類c-Met之單鏈Fab片段，

其中該等單鏈Fab片段係由抗體重鏈可變結構域(VH)及抗體恆定結構域1 (CH1)、抗體輕鏈可變結構域(VL)、抗體輕鏈恆定結構域(CL)及連接體組成，且其中該等抗體結構域及該連接體在N端至C端方向上具有以下順序中之一種：

ba) VH-CH1-連接體-VL-CL，或 bb) VL-CL-連接體-VH-CH1；

其中該連接體係具有至少30個胺基酸、較佳具有介於32與50個之間之胺基酸的肽；

且其中該b)中之單鏈Fab片段經由該a)中之全長抗體

的重鏈或輕鏈C或N端之肽連接物與該全長抗體融合；

其中該肽連接物係具有至少5個胺基酸、較佳具有介於10與50個之間之胺基酸之肽。

三價或四價形式中所用術語「全長抗體」表示由兩個「全長抗體重鏈」及兩個「全長抗體輕鏈」組成之抗體(參見圖1)。「全長抗體重鏈」係在N端至C端方向上由以下組成之多肽：抗體重鏈可變結構域(VH)、抗體重鏈恆定結構域1(CH1)、抗體鉸鏈區(HR)、抗體重鏈恆定結構域2(CH2)及抗體重鏈恆定結構域3(CH3)，縮寫為VH-CH1-HR-CH2-CH3；且在抗體為IgE亞類之情形下視需要包括抗體重鏈恆定結構域4(CH4)。「全長抗體重鏈」較佳為在N端至C端方向上由VH、CH1、HR、CH2及CH3組成之多肽。「全長抗體輕鏈」係在N端至C端方向上由以下組成之多肽：抗體輕鏈可變結構域(VL)、及抗體輕鏈恆定結構域(CL)，縮寫為VL-CL。抗體輕鏈恆定結構域(CL)可為 κ (kappa)或 λ (lambda)。兩個全長抗體鏈經由CL結構域與CH1結構域之間及全長抗體重鏈鉸鏈區之間之多肽內二硫鍵連接在一起。典型全長抗體之實例係天然抗體，例如IgG(例如IgG1及IgG2)、IgM、IgA、IgD、及IgE。本發明全長抗體可來自單一物種(例如人類)，或其可為嵌合抗體或人類化抗體。本發明全長抗體包含兩個各自由VH及VL對形成之抗原結合位點，二者可特異性結合相同抗原。該全長抗體重鏈或輕鏈之C端表示該重鏈或輕鏈C端之最後

一個胺基酸。該全長抗體重鏈或輕鏈之N端表示該重鏈或輕鏈N端之最後一個胺基酸。

本發明所用術語「肽連接物」表示胺基酸序列較佳具有合成來源之肽。使用本發明該等肽連接物來融合單鏈Fab片段與全長抗體之C或N端以形成本發明多特異性抗體。較佳地，b)中之該等肽連接物係胺基酸序列長度為至少5個胺基酸、較佳長度為5至100個、更佳為10至50個胺基酸之肽。在一實施例中，該肽連接物係 $(GxS)_n$ 或 $(GxS)_nG_m$ ，其中G=甘胺酸，S=絲胺酸，且 $(x=3, n=3, 4, 5 \text{ 或 } 6, \text{ 且 } m=0, 1, 2 \text{ 或 } 3)$ 或 $(x=4, n=2, 3, 4 \text{ 或 } 5 \text{ 且 } m=0, 1, 2 \text{ 或 } 3)$ ，較佳地 $x=4$ 且 $n=2$ 或 3 ，更佳地 $x=4, n=2$ 。較佳地，在VH或VH-CH1多肽及VL或VL-CL多肽(圖7a-c)經由兩個相同肽連接物與全長抗體C端融合之三價雙特異性抗體中，該等肽連接物係具有至少25個胺基酸之肽，較佳為具有30至50個胺基酸之肽，且該肽連接物更佳為 $(GxS)_n$ 或 $(GxS)_nG_m$ ，其中G=甘胺酸，S=絲胺酸，且 $(x=3, n=6, 7 \text{ 或 } 8, \text{ 且 } m=0, 1, 2 \text{ 或 } 3)$ 或 $(x=4, n=5, 6 \text{ 或 } 7 \text{ 且 } m=0, 1, 2 \text{ 或 } 3)$ ，較佳地 $x=4$ 且 $n=5, 6, 7$ 。

「單鏈Fab片段」(參見圖2a)係由以下組成之多肽：抗體重鏈可變結構域(VH)、抗體恆定結構域1(CH1)、抗體輕鏈可變結構域(VL)、抗體輕鏈恆定結構域(CL)及連接體，其中該等抗體結構域及該連接體在N端至C端方向上具有以下順序中之一種：a) VH-CH1-連接體-VL-CL，b) VL-CL-連接體-VH-CH1，c) VH-CL-連接體-VL-CH1或d) VL-

CH1-連接體-VH-CL；且其中該連接體係具有至少30個胺基酸、較佳具有介於32與50個之間之胺基酸的多肽。經由CL結構域與CH1結構域之間之天然二硫鍵來穩定該等單鏈Fab片段a) VH-CH1-連接體-VL-CL、b) VL-CL-連接體-VH-CH1、c) VH-CL-連接體-VL-CH1及d) VL-CH1-連接體-VH-CL。術語「N端」表示N端之最後一個胺基酸。術語「C端」表示C端之最後一個胺基酸。

術語「連接體」在本發明中係結合單鏈Fab片段來使用，且表示胺基酸序列較佳具有合成來源之肽。使用本發明該等肽來連接a) VH-CH1與VL-CL、b) VL-CL與VH-CH1、c) VH-CL與VL-CH1或d) VL-CH1與VH-CL，從而形成以下本發明單鏈Fab片段：a) VH-CH1-連接體-VL-CL、b) VL-CL-連接體-VH-CH1、c) VH-CL-連接體-VL-CH1或d) VL-CH1-連接體-VH-CL。單鏈Fab片段之內之該連接體係胺基酸序列長度為至少30個胺基酸、長度較佳為32至50個胺基酸之肽。在一實施例中，該連接體係 $(G_xS)_n$ ，其中G=甘胺酸，S=絲胺酸($x=3$ ， $n=8、9$ 或 10 且 $m=0、1、2$ 或 3)或($x=4$ 且 $n=6、7$ 或 8 且 $m=0、1、2$ 或 3)，較佳地 $x=4$ ， $n=6$ 或 7 且 $m=0、1、2$ 或 3 ，更佳地 $x=4$ ， $n=7$ 且 $m=2$ 。在一實施例中，該連接體係 $(G_4S)_6G_2$ 。

在一較佳實施例中，在該單鏈Fab片段中，該等抗體結構域及該連接體在N端至C端方向上具有以下順序中之一種：

a) VH-CH1-連接體-VL-CL，或b) VL-CL-連接體-VH-

CH1，更佳為VL-CL-連接體-VH-CH1。

在另一較佳實施例中，在該單鏈Fab片段中，該等抗體結構域及該連接體在N端至C端方向上具有以下順序中之一種：

b) VH-CL-連接體-VL-CH1 或 b) VL-CH1-連接體-VH-CL。

視需要，在該單鏈Fab片段中，除CL結構域與CH1結構域之間之天然二硫鍵以外，抗體重鏈可變結構域(VH)及抗體輕鏈可變結構域(VL)亦藉由在以下位置之間引入二硫鍵而經二硫鍵穩定：

- i) 重鏈可變結構域44位與輕鏈可變結構域100位，
- ii) 重鏈可變結構域105位與輕鏈可變結構域43位，或
- iii) 重鏈可變結構域101位與輕鏈可變結構域100位(始終根據Kabat之EU索引來編號)。

該單鏈Fab片段之進一步二硫鍵穩定係藉由在單鏈Fab片段之可變結構域VH與VL之間引入二硫鍵來達成。引入非天然二硫橋來穩定單鏈Fv之技術闡述於(例如)以下文獻中：WO 94/029350；Rajagopal, V. 等人，Prot. Engin. (1997) 1453-59；Kobayashi, H. 等人，Nuclear Medicine & Biology 25 (1998) 387-393；或 Schmidt, M. 等人，Oncogene 18 (1999) 1711-1721。在一實施例中，本發明抗體中所包括單鏈Fab片段可變結構域之間之可選二硫鍵介於重鏈可變結構域44位與輕鏈可變結構域100位之間。在一實施例中，本發明抗體中所包括單鏈Fab片段可變結構

域之間之可選二硫鍵介於重鏈可變結構域105位與輕鏈可變結構域43位之間(始終根據Kabat之EU索引來編號)。

在一實施例中，在單鏈Fab片段可變結構域VH與VL之間未經該可選二硫鍵穩定之單鏈Fab片段較佳。

「單鏈Fv片段」(參見圖2b)係由以下組成之多肽：抗體重鏈可變結構域(VH)、抗體輕鏈可變結構域(VL)、及單鏈-Fv-連接體，其中該等抗體結構域及該單鏈-Fv-連接體在N端至C端方向上具有以下順序中之一種：a) VH-單鏈-Fv-連接體-VL、b) VL-單鏈-Fv-連接體-VH；較佳為a) VH-單鏈-Fv-連接體-VL，且其中該單鏈-Fv-連接體係胺基酸序列長度為至少15個胺基酸之多肽，在一實施例中長度為至少20個胺基酸。術語「N端」表示N端之最後一個胺基酸。術語「C端」表示C端之最後一個胺基酸。

術語「單鏈-Fv-連接體」在用於單鏈Fv片段中時表示胺基酸序列較佳具有合成來源之肽。該單鏈-Fv-連接體係胺基酸序列長度為至少15個胺基酸、在一實施例中長度為至少20個胺基酸且長度較佳介於15與30個胺基酸之間之肽。在一實施例中，該單鏈-連接體係 $(GxS)_n$ ，其中G=甘胺酸，S=絲胺酸， $(x=3$ 且 $n=4、5$ 或 $6)$ 或 $(x=4$ 且 $n=3、4、5$ 或 $6)$ ，較佳地 $x=4$ ， $n=3、4$ 或 5 ，更佳地 $x=4$ ， $n=3$ 或 4 。在一實施例中，該單鏈Fv-連接體係 $(G_4S)_3$ 或 $(G_4S)_4$ 。

此外，該等單鏈Fv片段較佳經二硫鍵穩定。該單鏈抗體之進一步二硫鍵穩定係藉由在單鏈抗體之可變結構域之間引入二硫鍵來達成，且闡述於(例如)以下文獻中：WO

94/029350 ; Rajagopal, V. 等人 , Prot. Engin. 10 (1997) 1453-59 ; Kobayashi, H. 等人 , Nuclear Medicine & Biology 25 (1998) 387-393 ; 或 Schmidt, M. 等人 , Oncogene 18 (1999) 1711 -1721 。

在經二硫鍵穩定之單鏈Fv片段之一實施例中，本發明抗體中所包括單鏈Fv片段之可變結構域之間之二硫鍵對各單鏈Fv片段而言獨立地選自：

- i) 重鏈可變結構域44位與輕鏈可變結構域100位，
- ii) 重鏈可變結構域105位與輕鏈可變結構域43位，或
- iii) 重鏈可變結構域101位與輕鏈可變結構域100位。

在一實施例中，本發明抗體中所包括單鏈Fv片段之可變結構域之間之二硫鍵介於重鏈可變結構域44位與輕鏈可變結構域100位之間。

在一實施例中，本發明雙特異性Her1/c-Met抗體可在不存在HGF時將A431(ATCC編號CRL-1555)癌症細胞增殖抑制至少30%(在48小時後測量，參見實例7a)。

在一實施例中，本發明雙特異性Her1/c-Met抗體可在不存在HGF時將A431(ATCC編號CRL-1555)癌症細胞增殖抑制至少30%(在48小時後測量，參見實例7b)。

本發明抗體係藉由重組方式來產生。因此，本發明一態樣係編碼本發明抗體之核酸，且另一態樣係包含該編碼本發明抗體之核酸之細胞。用於重組製造之方法廣泛為當前業內所知且包含在原核及真核細胞中表現蛋白質及隨後分離抗體以及通常將其純化至醫藥上可接受之純度。對於上

述抗體在宿主細胞中之表現，藉由標準方法將編碼各經修飾輕鏈及重鏈的核酸插入表現載體中。在適宜原核或真核宿主細胞(例如CHO細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、HEK293細胞、COS細胞、PER.C6細胞、酵母或大腸桿菌(E.coli)細胞)中進行表現，且自該等細胞(上清液或溶解後細胞)回收抗體。重組產生抗體之通用方法已為當前業內所熟知且闡述於(例如)以下綜述文獻中：Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202；Geisse, S.等人，Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282；Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161；Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880。

藉由習用免疫球蛋白純化程序以適當方式自培養基分離雙特異性抗體，該等純化程序為(例如)蛋白質A-瓊脂糖法、羥基磷灰石層析法、凝膠電泳、透析或親和層析法。編碼單株抗體之DNA及RNA可使用習用程序容易地分離並測序。可使用雜交瘤細胞作為該DNA及RNA之來源。分離後，可將DNA立即插入表現載體中，隨後將其轉染至原本不產生免疫球蛋白之宿主細胞(例如HEK 293細胞、CHO細胞、或骨髓瘤細胞)中以在宿主細胞中實現重組單株抗體之合成。

藉由將適宜核苷酸變化引入抗體DNA或藉由核苷酸合成來製備雙特異性抗體之胺基酸序列變體(或突變體)。然而，僅能在極有限之範圍內(例如上文所述)實施該等修飾。舉例而言，該等修飾不改變諸如IgG同種型及抗原結

合等上述抗體特徵，但可提高重組產生之產率、增強蛋白質穩定性或有利於純化。

本申請案中所用術語「宿主細胞」表示可經改造以生成本發明抗體之任何種類的細胞系統。在一實施例中，使用HEK293細胞及CHO細胞作為宿主細胞。本文所用表述「細胞」、「細胞系」及「細胞培養物」可互換使用且所有該等名稱皆包括其子代。因此，詞語「轉化體」及「轉化細胞」包括原代個體細胞及源自其之培養物而不考慮轉移次數。亦應瞭解，所有子代之DNA含量可能因特意或無意的突變而不完全相同。本發明包括最初轉化細胞中經篩選具有相同功能或生物活性之變體之子代。

在NS0細胞中之表現闡述於(例如)Barnes, L.M.等人, Cytotechnology 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M.等人, Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270中。瞬時表現闡述於(例如)Durocher, Y.等人, Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9中。可變結構域之選殖闡述於以下文獻中: Orlandi, R.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; 及 Norderhaug, L.等人, J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87。較佳瞬時表現系統(HEK 293)闡述於 Schlaeger, E.-J. 及 Christensen, K., Cytotechnology 30 (1999) 71-83; 及 Schlaeger, E.-J., J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199中。

舉例而言，適用於原核生物之控制序列包括啟動子、

(視需要)操縱子序列、及核糖體結合位點。已知真核細胞可利用啟動子、增強子及多聚腺苷酸化信號。

當一核酸與另一核酸序列具有功能性關係時，該核酸係「可操作連接的」。舉例而言，若前序列或分泌前導序列之DNA表現為參與多肽分泌之前蛋白，則該前序列或分泌前導序列之DNA可操作連接至該多肽之DNA；若啟動子或增強子可影響編碼序列之轉錄，則該啟動子或增強子可操作連接至該編碼序列；或若核糖體結合位點之定位有助於轉譯，則該核糖體結合位點可操作連接至該編碼序列。一般而言，「可操作連接」意指所連接DNA序列係鄰接序列且在分泌前導序列情況下係鄰接序列且處於閱讀框內。然而，增強子無需鄰接。藉由在便利的限制位點處接合可完成連接。若不存在該等位點，則根據習用慣例可使用合成性寡核苷酸銜接子或連接體。

藉由標準技術實施抗體純化以消除細胞組份或其他污染物(例如其他細胞核酸或蛋白質)，該等技術包括鹼/SDS處理、CsCl區帶法、管柱層析法、瓊脂糖凝膠電泳法、及其他業內熟知方法。參見 Ausubel, F. 等人編輯，Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。已有多種不同方法被人們所接受且廣泛用於蛋白質純化，例如使用微生物蛋白質實施之親和層析(例如蛋白質A或蛋白質G親和層析)、離子交換層析(例如陽離子交換(羧甲基樹脂)、陰離子交換(胺基乙基樹脂)及混合型交換)、嗜硫菌吸附(例如使用 β -

巰基乙醇及其他SH配體)、疏水作用或芳香族吸附層析(例如使用苯基-瓊脂糖、氮雜-親芳烴(arenophilic)樹脂、或間-胺基苯基硼酸)、金屬螯合親和層析(例如使用Ni(II)-及Cu(II)-親和性材料)、尺寸排除層析及電泳方法(例如凝膠電泳、毛細管電泳)(Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102)。

本文所用表述「細胞」、「細胞系」及「細胞培養物」可互換使用且所有該等名稱皆包括子代。因此，詞語「轉化體」及「轉化細胞」包括原代個體細胞及源自其之培養物而不考慮轉移次數。亦應瞭解，所有子代之DNA含量可能因特意或無意的突變而不完全相同。本發明包括最初轉化細胞中經篩選具有相同功能或生物活性之變體之子代。倘若意欲使用獨特名稱，則可根據上下文來確定。

本文所用術語「轉化」係指將載體/核酸轉移至宿主細胞中之過程。若使用不具有牢固細胞壁障壁之細胞作為宿主細胞，則可藉由例如磷酸鈣沉澱法來實施轉染，如Graham, F.L.及van der Eb, A.J., Virology 52 (1973) 456-467中所述。然而，亦可使用將DNA引入細胞中之其他方法，例如細胞核注射或原生質體融合。若使用原核細胞或含有牢固細胞壁構造之細胞，則一種轉染方法係(例如)使用氯化鈣進行鈣處理，如Cohen, S., N.等人，PNAS. 69 (1972) 2110-2114所述。

本文所用「表現」係指將核酸轉錄為mRNA之過程及/或隨後將經轉錄mRNA(亦稱作轉錄物)轉譯為肽、多肽或蛋

白質之過程。轉錄物及所編碼多肽共稱為基因產物。若多核苷酸源自基因組DNA，則在真核細胞中之表現可包括mRNA之剪接。

「載體」係核酸分子，具體而言為自主複製的核酸分子，其將插入核酸分子轉移至宿主細胞中及/或宿主細胞之間。該術語包括主要用於將DNA或RNA插入細胞(例如染色體整合)之載體、主要用於複製DNA或RNA之複製載體、及用於DNA或RNA轉錄及/或轉譯之表現載體。該術語亦包括可提供不止一種上述功能之載體。

「表現載體」係在引入適宜宿主細胞時可轉錄並轉譯為多肽之多核苷酸。「表現系統」通常係指包括可用於產生期望表現產物之表現載體的適宜宿主細胞。

醫藥組合物

本發明之一態樣係包含本發明抗體之醫藥組合物。本發明另一態樣係本發明抗體用於製造醫藥組合物之用途。本發明另一態樣係製造包含本發明抗體之醫藥組合物之方法。在另一態樣中，本發明提供組合物(例如醫藥組合物)，其含有與醫藥載劑調配在一起之本發明抗體。

本發明一實施例係本發明雙特異性抗體，其用於治療癌症。

本發明另一態樣係該醫藥組合物，其用於治療癌症。

本發明另一態樣係本發明抗體之用途，其用於製造治療癌症之藥物。

本發明另一態樣係藉由將本發明抗體投與需要治療之患

者來治療癌症患者之方法。

本文所用「醫藥載劑」包括任何及所有溶劑、分散介質、包衣、抗細菌及抗真菌試劑、等滲劑及吸收延遲劑、及生理上相容之類似試劑。較佳地，載劑適合於靜脈內、肌內、皮下、非經腸、經脊柱或經表皮投與(例如藉由注射或輸注)。

本發明組合物可藉由多種業內已知方法來投與。熟習此項技術者應瞭解，投與路徑及/或模式可隨期望效果而變化。為藉由某些投與路徑投與本發明化合物，需要用某種材料塗佈該化合物或將該化合物與該材料共投與以防止該化合物失活。舉例而言，投與個體之化合物可存於適宜載劑中，例如脂質體或稀釋劑。醫藥上可接受之稀釋劑包括鹽水及水性緩衝溶液。醫藥載劑包括無菌水性溶液或分散液及用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液之無菌粉劑。該等介質及試劑於醫藥活性物質中之應用為業內已知。

本文所用片語「非經腸投與」及「以非經腸方式投與」意指除經腸及局部投與以外的投與模式，通常係藉由注射來投與且包括(但不限於)靜脈內、肌內、動脈內、鞘內、莢膜內、眼眶內、心內、真皮內、腹膜腔內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊柱內、硬膜外及胸骨內注射及輸注。

本文所用術語「癌症」係指增殖性疾病，例如淋巴瘤、淋巴細胞性白血病、肺癌、非小細胞肺(NSCL)癌、細支氣管肺泡細胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭或頸癌、皮

膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、結腸癌、乳癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、陰戶癌、霍奇金病(Hodgkin's Disease)、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌症、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、膀胱癌、腎臟或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、間皮瘤、肝細胞癌、膽管癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、脊椎腫瘤、腦幹膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、許旺細胞瘤(schwannoma)、室管膜瘤、髓母細胞瘤、腦膜瘤、扁平細胞癌、垂體腺瘤及尤文肉瘤(Ewings sarcoma)，包括任一上述癌症之難治性形式，或一或多種上述癌症之組合。

本發明另一態樣係本發明雙特異性抗體或該醫藥組合物，其用作抗血管生成劑。該抗血管生成劑可用於治療癌症，尤其可用於治療實體腫瘤及其他血管疾病。

本發明一實施例係本發明雙特異性抗體，其用於治療血管疾病。

本發明另一態樣係本發明抗體用於製造治療血管疾病之藥物之用途。

本發明另一態樣係藉由向需要治療之患者投與本發明抗體來治療患有血管疾病之患者的方法。

術語「血管疾病」包括癌症、炎症性疾病、動脈粥樣硬化、缺血、創傷、敗血病、COPD、哮喘、糖尿病、AMD、視網膜病變、中風、肥胖症、急性肺損傷、出血、

血管滲漏(例如細胞因子誘導血管滲漏)、過敏症、格雷夫氏病(Graves' Disease)、橋本自身免疫性甲狀腺炎(Hashimoto's Autoimmune Thyroiditis)、自發性血小板缺乏紫斑症、巨細胞動脈炎、類風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡(SLE)、狼瘡性腎炎、克羅恩氏病(Crohn's Disease)、多發性硬化症、潰瘍性結腸炎、尤其實體腫瘤、眼內新生血管型症候群(例如增殖性視網膜病或老年性黃斑退化症(AMD))、類風濕性關節炎、及銀屑病(Folkman, J.等人, J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M.等人, Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239; 及 Garner, A., Vascular diseases, Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A.及 Klintworth, G. K.(編輯), 第2版, Marcel Dekker, New York (1994) 1625-1710)。

該等組合物亦可含有佐劑, 例如防腐劑、潤濕劑、乳化劑及分散劑。可藉由上述消毒程序及藉由引入各種抗細菌及抗真菌劑來確保防止存在微生物, 該等抗細菌及抗真菌劑為(例如)對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸及諸如此類。亦可期望該等組合物包括等滲劑, 例如糖、氯化鈉及諸如此類。另外, 可藉由引入延遲吸收之試劑(例如單硬脂酸鋁及明膠)來實現可注射醫藥形式之長效吸收。

不管選擇何種投與路徑, 可藉由熟習此項技術者已知之習用方法將可以適宜水合形式使用之本發明化合物及/或本發明醫藥組合物調配為醫藥上可接受之劑型。

本發明醫藥組合物中活性成份之實際劑量程度可改變,

以獲得活性成份可有效地使特定患者、組合物及投與模式達成期望治療反應且對患者無毒性之量。所選劑量程度取決於各種藥代動力學因素，包括本發明所用特定組合物之活性、投與路徑、投與時間、所用特定化合物之排泄速率、治療持續時間、與所用特定化合物組合使用之其他藥物、化合物及/或材料、所治療患者之年齡、性別、體重、身體狀況、一般健康狀況及先前病史、及醫學領域熟知的類似因素。

組合物之無菌及流動性程度應使其可藉由注射器來遞送。除水以外，載劑較佳為等滲緩衝鹽水溶液。

例如，可藉由使用諸如卵磷脂等包衣、藉由在分散物情形下維持所需粒徑及藉由使用表面活性劑來維持適當流動性。在許多情形下，組合物中較佳包括等滲劑，例如糖、多元醇(例如甘露醇或山梨醇)、及氯化鈉。

現在已發現，針對人類 ErbB-1 及人類 c-Met 之本發明雙特異性抗體具有有價值的特徵，例如生物或醫藥活性。

提供以下實例、序列表及圖來幫助理解本發明，本發明之實際範圍陳述於隨附申請專利範圍中。應瞭解，可對各程序實施修改而不偏離本發明之精神。

胺基酸序列說明

SEQ ID NO: 1 重鏈可變結構域<ErbB-1>西妥昔單抗

SEQ ID NO: 2 輕鏈可變結構域<ErbB-1>西妥昔單抗

SEQ ID NO: 3 重鏈可變結構域<ErbB-1>人類化 ICR62

SEQ ID NO: 4 輕鏈可變結構域<ErbB-1>人類化 ICR62

- SEQ ID NO: 5 重鏈可變結構域<c-Met> Mab 5D5
- SEQ ID NO: 6 輕鏈可變結構域<c-Met> Mab 5D5
- SEQ ID NO: 7 重鏈<c-Met> Mab 5D5
- SEQ ID NO: 8 輕鏈<c-Met> Mab 5D5
- SEQ ID NO: 9 重鏈<c-Met> Fab 5D5
- SEQ ID NO: 10 輕鏈<c-Met> Fab 5D5
- SEQ ID NO: 11 人類IgG1之重鏈恆定區
- SEQ ID NO: 12 人類IgG3之重鏈恆定區
- SEQ ID NO: 13 人類輕鏈κ恆定區
- SEQ ID NO: 14 人類輕鏈λ恆定區
- SEQ ID NO: 15 人類 c-Met
- SEQ ID NO: 16 人類 ErbB-1
- SEQ ID NO: 17 重鏈CDR3H, <ErbB-1>西妥昔單抗
- SEQ ID NO: 18 重鏈CDR2H, <ErbB-1>西妥昔單抗
- SEQ ID NO: 19 重鏈CDR1H, <ErbB-1>西妥昔單抗
- SEQ ID NO: 20 輕鏈CDR3L, <ErbB-1>西妥昔單抗
- SEQ ID NO: 21 輕鏈CDR2L, <ErbB-1>西妥昔單抗
- SEQ ID NO: 22 輕鏈CDR1L, <ErbB-1>西妥昔單抗
- SEQ ID NO: 23 重鏈CDR3H, <ErbB-1>人類化ICR62
- SEQ ID NO: 24 重鏈CDR2H, <ErbB-1>人類化ICR62
- SEQ ID NO: 25 重鏈CDR1H, <ErbB-1>人類化ICR62
- SEQ ID NO: 26 輕鏈CDR3L, <ErbB-1>人類化ICR62
- SEQ ID NO: 27 輕鏈CDR2L, <ErbB-1>人類化ICR62
- SEQ ID NO: 28 輕鏈CDR1L, <ErbB-1>人類化ICR62

SEQ ID NO: 29 重鏈 CDR3H, <c-Met> Mab 5D5

SEQ ID NO: 30 重鏈 CDR2H, <c-Met> Mab 5D5

SEQ ID NO: 31 重鏈 CDR1H, <c-Met> Mab 5D5

SEQ ID NO: 32 輕鏈 CDR3L, <c-Met> Mab 5D5

SEQ ID NO: 33 輕鏈 CDR2L, <c-Met> Mab 5D5

SEQ ID NO: 34 輕鏈 CDR1L, <c-Met> Mab 5D5

實驗程序

實例

材料及方法

重組 DNA 技術

使用標準方法來處理 DNA，如以下文獻中所述：
Sambrook, J. 等人，Molecular cloning: A laboratory manual；
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,
New York, 1989。根據製造商說明書來使用分子生物學試劑。

DNA 及蛋白質序列分析及序列資料管理

關於人類免疫球蛋白輕鏈及重鏈核苷酸序列之一般資訊
闡述於以下文獻中：Kabat, E., A. 等人，(1991) Sequences
of Proteins of Immunological Interest，第 5 版，NIH 出版號
91-3242。根據 EU 編號法對抗體鏈之胺基酸進行編號
(Edelman, G.M. 等人，PNAS 63 (1969) 78-85；Kabat, E.A.
等人，(1991) Sequences of Proteins of Immunological
Interest，第 5 版，NIH 出版號 91-3242)。使用 GCG (Genetics
Computer Group，Madison，Wisconsin) 之軟體包 (10.2 版)

及Infomax之Vector NTI Advance suite(8.0版)來對序列實施創建、製圖、分析、注釋及說明。

DNA測序

藉由用SequiServe (Vaterstetten, Germany)及Geneart AG (Regensburg, Germany)實施雙鏈測序法來測定DNA之序列。

基因合成

藉由Geneart AG (Regensburg, Germany)自藉由自動化基因合成產生之合成性寡核苷酸及PCR產物來製備期望基因片段。將兩側具有單數個限制性內切核酸酶裂解位點之基因片段選殖至pGA18 (ampR)質粒中。質粒DNA係自經轉化細菌純化且藉由UV光譜法來測定濃度。藉由DNA測序來確認亞選殖基因片段之DNA序列。以類似方式藉由使用兩側BamHI及XbaI限制性位點之基因合成來製備DNA序列，該DNA序列編碼經修飾「隆凸-孔洞結合」<ErbB-1>抗體重鏈，該抗體重鏈在CH3結構域中具有S354C及T366W突變且具有/不具有藉由肽連接物連接的C端<c-Met>5D5 scFab VH區；以及「隆凸-孔洞結合」<ErbB-1>抗體重鏈，該重鏈具有Y349C、T366S、L368A及Y407V突變且具有/不具有藉由肽連接物連接之C端<c-Met>5D5 scFab VL區。最後，使用兩側BamHI及XbaI限制性位點來合成編碼<ErbB-1>抗體及<c-Met>5D5抗體之未經修飾重鏈及輕鏈的DNA序列。所有構成物皆經設計而具有編碼前導肽(MGWSCIILFLVATATGVHS)之5'端DNA序列，該前導肽

靶向真核細胞中之分泌蛋白。

表現質粒之構建

使用 Roche 表現載體來構建編碼所有重鏈及輕鏈 scFv 融合蛋白之表現質粒。該載體係由以下元件組成：

- 作為選擇標記之抗潮黴素基因，
- 愛潑斯坦-巴爾病毒(Epstein-Barr virus) (EBV)之複製起點 oriP，
- 來自載體 pUC18 之複製起點，其容許此質粒在大腸桿菌中複製，
- 在大腸桿菌中賦予氨苄西林抗性之 β -內醯胺酶基因，
- 來自人類巨細胞病毒(HCMV)之立即早期增強子及啟動子，
- 人類 I-免疫球蛋白多聚腺苷酸化(「多聚 A」)信號序列，及
- 獨特的 BamHI 及 XbaI 限制性位點。

包含重鏈或輕鏈構成物以及具有 C 端 VH 及 VL 結構域之「隆凸-孔洞結合」構成物的免疫球蛋白融合基因係藉由基因合成來製備且將其選殖至所述 pGA18 (ampR) 質粒中。用 BamHI 及 XbaI 限制性酶(Roche Molecular Biochemicals)來消化具有合成 DNA 片段及 Roche 表現載體之 pG18 (ampR) 質粒且實施瓊脂糖凝膠電泳。然後將編碼重鏈及輕鏈之經純化 DNA 片段接合至經分離 Roche 表現載體 BamHI/XbaI 片段，從而產生最終表現載體。將最終表現載體轉化至大腸桿菌細胞中，分離表現質粒 DNA (Miniprep) 且對其實施限

制性酶分析及DNA測序。使正確純系在150 ml LB-Amp培養基中生長，再次分離質粒DNA (Maxiprep)並藉由DNA測序來確認序列完整性。

免疫球蛋白變體在HEK293細胞中之瞬時表現

根據製造商說明書藉由使用FreeStyle™ 293表現系統 (Invitrogen, USA)瞬時轉染人類胚腎293-F細胞來表現重組免疫球蛋白變體。簡言之，在FreeStyle™ 293表現培養基中在37°C /8% CO₂下培養懸浮FreeStyle™ 293-F細胞，且在轉染當天將細胞以 $1-2 \times 10^6$ 活細胞/ml之密度接種於新鮮培養基中。在Opti-MEM® I培養基 (Invitrogen, USA)中使用325 µl 293fectin™ (Invitrogen, Germany)及250 µg重鏈及輕鏈質粒DNA以1:1莫耳比及250 ml之最終轉染體積來製備DNA-293fectin™複合物。在Opti-MEM® I培養基 (Invitrogen, USA)中使用325 µl 293fectin™ (Invitrogen, Germany)及250 µg「隆凸-孔洞結合」重鏈1及2及輕鏈質粒DNA以1:1:2之莫耳比及250 ml之最終轉染體積來製備「隆凸-孔洞結合」DNA-293fectin複合物。在轉染後7天藉由以14000 g離心30分鐘來收穫含有抗體之細胞培養上清液且經由無菌濾器(0.22 µm)過濾。在純化前將上清液儲存在-20°C下。

雙特異性抗體及對照抗體之純化

藉由使用Protein A-Sepharose™ (GE Healthcare, Sweden)之親和層析及Superdex200尺寸排除層析自細胞培養上清液純化三價雙特異性抗體及對照抗體。簡言之，將無菌過濾細胞培養上清液施加至經PBS緩衝液(10 mM Na₂HPO₄、

1 mM KH_2PO_4 、137 mM NaCl及2.7 mM KCl, pH 7.4)平衡之HiTrap ProteinA HP (5 ml)管柱上。用平衡緩衝液洗去未結合蛋白。用0.1 M檸檬酸鹽緩衝液(pH 2.8)洗脫抗體及抗體變體，且用0.1 ml 1 M Tris (pH 8.5)來中和含有蛋白質之流份。然後，彙集所洗脫蛋白質流份，用Amicon Ultra離心過濾裝置(MWCO: 30 K, Millipore)濃縮至3 ml體積並裝載至經20 mM Histidin、140 mM NaCl (pH 6.0)平衡之Superdex200 HiLoad 120 ml 16/60凝膠過濾管柱(GE Healthcare, Sweden)上。彙集含有經純化雙特異性抗體及對照抗體以及低於5%之高分子量凝集體之流份且以1.0 mg/ml之等份儲存於-80°C下。藉由用木瓜蛋白酶消化經純化5D5單株抗體且隨後藉由蛋白A層析移除摻雜的Fc結構域來產生Fab片段。在經20 mM Histidin、140 mM NaCl (pH 6.0)平衡之Superdex200 HiLoad 120 ml 16/60凝膠過濾管柱(GE Healthcare, Sweden)上進一步純化未結合Fab片段，將其彙集且以1.0 mg/ml等份儲存於-80°C下。

純化蛋白質之分析

藉由在280 nm下測量光密度(OD)使用基於胺基酸序列計算出之莫耳消光係數來確定經純化蛋白質樣品之蛋白質濃度。藉由在存在及不存在還原劑(5 mM 1,4-二硫蘇糖醇)時使用考馬斯亮藍(Coomassie brilliant blue)染色實施SDS-PAGE來分析雙特異性抗體及對照抗體之純度及分子量。根據製造商說明書來使用NuPAGE® Pre-Cast凝膠系統(Invitrogen, USA)(4-20% Tris-甘胺酸凝膠)。在200 mM

KH_2PO_4 、250 mM KCl (pH 7.0)運行緩衝液中於25°C下使用 Superdex 200 分析型尺寸排除管柱 (GE Healthcare, Sweden)藉由高效SEC來分析雙特異性抗體及對照抗體樣品之凝集體含量。以0.5 ml/min之流速將25 μg 蛋白質注入管柱上且經50分鐘實施等度洗脫。對於穩定性分析，將1 mg/ml濃度之純化蛋白質在4°C及40°C下培育7天且隨後藉由高效SEC來評估。在藉由用肽-N-糖苷酶F (Roche Molecular Biochemicals)實施酶處理移除N-聚糖後，藉由奈升電噴霧Q-TOF質譜來驗證經還原雙特異性抗體輕鏈及重鏈之胺基酸骨架之完整性。

c-Met磷酸化分析

在實施HGF刺激前一天以 5×10^5 /孔將A549細胞接種於6孔板中之含有0.5% FCS(胎牛血清)之RPMI中。第二天，經一小時用含有0.2% BSA(牛血清白蛋白)之RPMI替代生長培養基。然後將5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 雙特異性抗體添加至培養基中且將細胞培育10分鐘，之後再經10分鐘以50 ng/mL之終濃度添加HGF。用含有1 mM鈣酸鈉之冰冷PBS將細胞洗滌一次，之後將其置於冰上並在細胞培養板中用100 μL 溶解緩衝液(50 mM Tris-Cl pH7.5、150 mM NaCl、1% NP40、0.5% DOC、抑肽酶、0.5 mM PMSF、1 mM鈣酸鈉)進行溶解。將細胞溶解產物轉移至埃彭道夫(eppendorf)管中並在冰上使溶解繼續進行30分鐘。使用BCA方法(Pierce)來測定蛋白質濃度。在4-12% Bis-Tris NuPage凝膠(Invitrogen)上分離30-50 μg 溶解產物且將凝膠上之蛋白質轉移至硝酸

纖維素膜上。用含有5% BSA之TBS-T將膜封閉1小時且根據製造商說明書用針對Y1230、1234、1235之磷酸化特異性c-Met抗體(44-888, Biosource)進行顯影。用結合未磷酸化c-Met之抗體(AF276, R&D)再次探測免疫印跡。

ErbB1/Her1磷酸化分析

在添加抗體的前一天以 5×10^5 /孔將A431細胞接種於6孔板中之含有10% FCS(胎牛血清)之RPMI中。第二天，將5 μ g/mL對照抗體或雙特異性抗體添加至培養基中且將細胞再培育1小時。用含有1 mM鈣酸鈉之冰冷PBS將細胞洗滌一次，之後將其置於冰上並在細胞培養板中用100 μ L溶解緩衝液(50 mM Tris-Cl pH7.5、150 mM NaCl、1% NP40、0.5% DOC、抑肽酶、0.5 mM PMSF、1 mM鈣酸鈉)進行溶解。將細胞溶解物轉移至埃彭道夫管中並在冰上使溶解進行30分鐘。使用BCA方法(Pierce)來測定蛋白質濃度。在4-12% Bis-Tris NuPage凝膠(Invitrogen)上分離30-50 μ g溶解產物且將凝膠上之蛋白質轉移至硝酸纖維素膜上。用含有5% BSA之TBS-T將膜封閉1小時且根據製造商說明書用針對Y1173之磷酸化特異性EGFR抗體(sc-12351, Santa Cruz)進行顯影。用結合未磷酸化EGFR之抗體(06-847, Upstate)再次探測免疫印跡。

AKT磷酸化分析

在添加抗體的前一天以 5×10^5 /孔將A431細胞接種於6孔板中之含有10% FCS(胎牛血清)之RPMI中。第二天，將5 μ g/mL對照抗體或雙特異性抗體添加至培養基中且將細胞

再培育1小時。然後用25 ng/mL HGF (R&D, 294-HGN)將細胞亞群再刺激15 min。用含有1 mM鈳酸鈉之冰冷PBS將細胞洗滌一次，之後將其置於冰上並在細胞培養板中用100 μ L溶解緩衝液(50 mM Tris-Cl pH7.5、150 mM NaCl、1% NP40、0.5% DOC、抑肽酶、0.5 mM PMSF、1 mM鈳酸鈉)進行溶解。將細胞溶解物轉移至埃彭道夫管中並在冰上使溶解進行30分鐘。使用BCA方法(Pierce)來測定蛋白質濃度。在4-12% Bis-Tris NuPage凝膠(Invitrogen)上分離30-50 μ g溶解產物且將凝膠上之蛋白質轉移至硝酸纖維素膜上。用含有5% BSA之TBS-T將膜封閉1小時且根據製造商說明書用針對Thr308之磷酸化特異性AKT抗體(Cell Signaling, 9275)進行顯影。用結合肌動蛋白之抗體(Abcam, ab20272)再次探測免疫印跡。

ERK1/2磷酸化分析

在添加抗體的前一天以 5×10^5 /孔將A431細胞接種於6孔板中之含有10% FCS(胎牛血清)之RPMI中。第二天，將5 μ g/mL對照抗體或雙特異性抗體添加至培養基中且將細胞再培育1小時。然後用25 ng/mL HGF (R&D, 294-HGN)將細胞亞群再刺激15 min。用含有1 mM鈳酸鈉之冰冷PBS將細胞洗滌一次，之後將其置於冰上並在細胞培養板中用100 μ L溶解緩衝液(50 mM Tris-Cl pH7.5、150 mM NaCl、1% NP40、0.5% DOC、抑肽酶、0.5 mM PMSF、1 mM鈳酸鈉)進行溶解。將細胞溶解物轉移至埃彭道夫管中並在冰上使溶解進行30分鐘。使用BCA方法(Pierce)來測定蛋白質濃

度。在4-12% Bis-Tris NuPage凝膠(Invitrogen)上分離30-50 μg 溶解產物且將凝膠上之蛋白質轉移至硝酸纖維素膜上。用含有5% BSA之TBS-T將膜封閉1小時且根據製造商說明書用針對 Thr202/Tyr204 之磷酸化特異性 Erk1/2 抗體 (CellSignaling, Nr.9106)進行顯影。用結合肌動蛋白之抗體 (Abcam, ab20272)再次探測免疫印跡。

細胞-細胞擴散分析(擴散分析)

在化合物處理前一天以200 μL 總體積將A549(4000細胞/孔)或A431(8000細胞/孔)接種於96孔E-板(Roche, 05232368001)中之含有0.5% FCS之RPMI中。用實時細胞分析機過夜監測細胞黏附及細胞生長，每15 min掃描一次以監測阻抗。第二天，將細胞與5 μL 之各抗體稀釋液在PBS中一起預培育，且每5分鐘掃描一次。在30分鐘後，添加2.5 μL 具有20 ng/mL終濃度之HGF溶液並使實驗繼續再進行72小時。經180分鐘每分鐘掃描一次來監測即時變化，之後在剩餘時間內每15分鐘掃描一次。

流式細胞計數分析(FACS)

a) 結合分析

分離並計數c-Met及ErbB-1表現細胞。以 1.5×10^5 /孔將細胞接種於96孔錐形板中。使細胞旋轉沉降(1500 rpm, 4°C, 5 min)且在冰上及50 μL 各雙特異性抗體存於含有2% FCS(胎牛血清)之PBS中之系列稀釋液中培育30 min。再次使細胞旋轉沉降並用200 μL 含有2% FCS之PBS洗滌一次，之後再次與在含有2% FCS的PBS中稀釋之針對人類Fc且偶

合藻紅蛋白之抗體(Jackson ImmunoResearch, 109116098)一起培育30 min。使細胞旋轉沉降且用200 μ L含有2% FCS之PBS洗滌兩次，使其再懸浮於BD細胞固定溶液(BD Biosciences)中且在冰上培育至少10 min。藉由流式細胞計數術(FACS Canto, BD)測定細胞之平均螢光強度(mfi)。藉由至少兩次一式兩份的獨立染色來測定mfi。使用FlowJo軟體(TreeStar)進一步處理流式細胞計數譜圖。使用XLFit 4.0 (IDBS)及劑量反應一點式模型205來測定半最大結合。

b) 內化分析

分離並計數細胞。將 5×10^5 個細胞置於埃彭道夫管中之50 μ L完全培養基中且與5 μ g/mL之各雙特異性抗體在37°C下一起培育。在指定時間點後將細胞儲存在冰上，直至時程結束。此後，將細胞轉移至FACS管中，旋轉沉降(1500 rpm, 4°C, 5min)，用PBS+2% FCS洗滌且與在含有2% FCS之PBS中稀釋之50 μ L針對人類Fc且偶合藻紅蛋白之第二抗體(Jackson ImmunoResearch, 109116098)一起培育30分鐘。再次使細胞旋轉沉降，用PBS+2% FCS洗滌並藉由流式細胞計數術(FACS Canto, BD)測定螢光強度。

Cell Titer Glow分析

使用cell titer glow分析(Promega)來量化細胞活力及增殖。根據製造商說明書來實施分析。簡言之，在96孔板中以100 μ L之總體積將細胞培養期望時間段。對於增殖分析，自培育器中移出細胞且將其於室溫下置放30 min。添加100 μ L cell titer glow試劑且將多孔板置於定軌振盪器上

並保持 2 min。在 15 min 後於微量板讀數器 (Tecan) 上量化發光。

Wst-1 分析

根據終點法分析來實施 Wst-1 活力及細胞增殖分析，從而檢測代謝活性細胞數。簡言之，將 20 μ L Wst-1 試劑 (Roche, 11644807001) 添加至 200 μ L 培養基中。將 96 孔板再培育 30 min 至 1 h 直至染料顯著顯影。在微量板讀數器 (Tecan) 上於 450 nm 波長下量化染色強度。

雙特異性 <ErbB1-c-Met> 抗體之設計

以下所表現及純化之所有雙特異性 <ErbB1-c-Met> 抗體皆包含 IgG1 亞類之恆定區或至少 Fc 部分 (SEQ ID NO: 11 之人類 IgG1 恆定區)，其最後如下文所述經修飾。

在表 1 中：已經或可根據上述通用方法來表現並純化三價雙特異性 <ErbB1-c-Met> 抗體，其係基於全長 ErbB-1 抗體 (西妥昔單抗或人類化 ICR62) 及一個來自 C-Met 抗體 (cMet 5D5) 之單鏈 Fab 片段 (基本結構示意圖參見圖 5a)，且具有表 1 中所示之各特徵。西妥昔單抗或人類化 ICR62 之相應 VH 及 VL 闡述於序列表中。

表 1：

分子名稱 雙特異性抗體之scFab-Ab-命名	BsAB01	BsAB03
特徵：		
隆凸-孔洞結合突變	S354C: T366W/ Y349'C: T366'S: L368'A: Y407'V	S354C: T366W/ Y349'C: T366'S: L368'A: Y407'V
全長抗體骨架源自：	西妥昔單抗	人類化ICR62
單鏈Fab片段，源自：	cMet 5D5 (人類化)	cMet 5D5 (人類化)
附接至抗體之scFab之位置	C端隆凸重鏈	C端隆凸重鏈
連接體(ScFab)	(G ₄ S) ₅ GG	(G ₄ S) ₅ GG
肽連接物	(G ₄ S) ₂	(G ₄ S) ₂
ScFab二硫鍵 VH44/ VL100穩定	-	-

實例 1：

雙特異性抗體與 ErbB-1 及 c-Met 之結合

(表面電漿共振)

使用標準結合分析在 25°C 下測定結合親和力，例如表面電漿共振技術(BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Sweden)。對於親和力測量，在 SPR 儀器(Biacore T100)上藉由標準胺偶合及封阻化學方法使 30 µg/ml 抗 Fcγ 抗體(來自山羊，Jackson Immuno Research)偶合至 CM-5 感受器晶片表面。在偶聯後，在 25°C 下以 5 µL/min 之流速注入單或雙特異性 ErbB1/cMet 抗體且隨後以 30 µL/min 注入人類 ErbB1 或 c-Met ECD 之連續稀釋液(0 nM 至 1000 nM)。使用 PBS/0.1% BSA 作為結合實驗之運行緩衝液。然後用 10 mM 甘胺酸-

HCl (pH 2.0)溶液之60s脈衝使晶片再生。

表：如藉由表面電漿共振所測定之雙特異性抗體結合 ErbB1/cMet之結合特徵。

結合特異性		BsAB01 [Mol]
c-Met	ka (1/Ms)	1,10E+04
	kd (1/s)	5,80E-05
	KD (M)	5,50E-09
ErbB-1	ka (1/Ms)	1,54E+06
	kd (1/s)	8,84E-04
	KD (M)	5,75E-10

實例 2：

雙特異性 Her1/c-Met 抗體形式對 HGF 誘導 c-Met 受體磷酸化之抑制

為確認雙特異性 Her1/c-Met 抗體中 c-Met 部分之功能性，實施 c-Met 磷酸化分析。在此實驗中，用雙特異性抗體或親代對照抗體處理 A549 肺癌細胞或 A431 結直腸癌細胞，之後暴露於 HGF 中。親代抗體或雙特異性抗體之結合可導致對受體磷酸化之抑制。或者，亦可使用具有自分泌 HGF 環之細胞(例如 U87MG)且在存在或不存在親代抗體或雙特異性抗體時評價 c-Met 受體磷酸化。

實例 3：

在用 Her1/cMet 雙特異性抗體處理後分析 Her1 受體磷酸化

為確認雙特異性 Her1/cMet 抗體中 EGFR 結合部分之功能性，將 A431 與親代 EGFR 抗體或雙特異性 Her1/cMet 抗體一

起培育。親代抗體或雙特異性抗體而非無關IgG對照抗體之結合可導致受體磷酸化之抑制。或者，亦可在存在或不存在親代抗體或雙特異性抗體時使用經EGF刺激可誘導ErbB1/Her1受體磷酸化之細胞。

實例4：

在用Her1/cMet雙特異性抗體處理後分析PI3K信號傳導

EGFR以及c-Met受體可經由PI3K途徑傳導信號，該途徑傳遞促有絲分裂信號。為證實同時靶向EGFR及c-Met受體，可監測AKT之磷酸化，其係PI3K途徑中之下游靶。出於此目的，將未經刺激細胞、經EGF或HGF處理之細胞、或經兩種細胞因子處理之細胞並行地與非特異性親代對照抗體或雙特異性抗體一起培育。或者，亦可評價過表現ErbB1/Her1及/或具有自分泌HGF環之細胞，該HGF環可活化c-Met信號傳導。AKT係PI3K途徑中之主要下游信號傳導組份，且此蛋白質之磷酸化係經由此途徑傳導信號之關鍵指示。

實例5：

在用Her1/cMet雙特異性抗體處理後分析MAPK信號傳導

ErbB1/Her1及c-Met受體可經由MAPK途徑傳導信號。為證實靶向ErbB1/Her1及c-Met受體，可監測ERK1/2之磷酸化，其係MAPK途徑中之主要下游靶。出於此目的，將未經刺激細胞、經EGF或HGF處理之細胞、或經兩種細胞因子處理之細胞並行地與非特異性親代對照抗體或雙特異性抗體一起培育。或者，亦可評價過表現ErbB1/Her1及/或具

有自分泌HGF環之細胞，該HGF環可活化c-Met信號傳導。

實例6：

雙特異性Her1/c-Met抗體形式對HGF誘導HUVEC增殖之抑制

可實施HUVEC增殖分析來證實HGF之血管生成及促有絲分裂效應。向HUVEC中添加HGF可導致細胞增殖增強，此可由c-Met結合抗體以劑量依賴性方式來抑制。

實例7：

雙特異性Her1/c-Met抗體對A431增殖之抑制

a) A431細胞顯示Her1之高細胞表面含量及c-Met之中高細胞表面表現，如流式細胞計數術所獨立地確認。在48小時後，在CellTiterGlow™分析中測量雙特異性Her1/c-Met抗體對A431增殖之抑制。結果展示於圖8a中。對照為PBS緩衝液。

第二次測量顯示EGFR抗體西妥昔單抗之29%抑制(與設定為0%抑制之緩衝液對照相比)。雙特異性Her1/c-Met BsAB01 (BsAb)抗體對癌症細胞增殖產生更顯著之抑制(38%抑制)。單價c-Met抗體單臂5D5 (OA5D5)顯示對增殖無任何影響。EGFR抗體西妥昔單抗及單價c-Met抗體單臂5D5 (OA5D5)之組合產生顯著性較低之降低(20%抑制)。

b) A431主要依賴於EGFR信號傳導。為模擬出現活性EGFR - c-Met-受體信號傳導網絡之情景，根據a)中所述在經HGF調整之培養基存在下實施進一步增殖分析(在48小時後實施CellTiterGlow™分析)。結果展示於圖8b中。

第二次測量顯示，EGFR抗體西妥昔單抗(0%抑制)及單價c-Met抗體單臂5D5 (OA5D5)(1%抑制)幾乎沒有抑制效應。雙特異性Her1/c-Met抗體BsAB01 (BsAb)(39%抑制)顯示可顯著抑制A431細胞之癌症細胞增殖。EGFR抗體西妥昔單抗與單價c-Met抗體單臂5D5 (OA5D5)之組合以顯著性較低之程度使細胞增殖降低(20%抑制)。

實例8：

分析在癌細胞系DU145中雙特異性Her1/c-Met抗體形式對HGF誘導細胞-細胞擴散(擴散)之抑制

HGF誘導擴散誘導細胞之形態改變，從而導致細胞變圓、細胞產生偽足樣突出、紡錘體樣結構及獲得一定運動性。雙特異性Her1/cMet抗體抑制HGF誘導之細胞-細胞擴散。

實例9：

在表現ErbB-1及c-Met之癌細胞系中分析抗體介導之受體內化

已顯示將細胞與特異性結合Her1或c-Met之抗體一起培育可誘發受體內化。為評價雙特異性抗體之內化能力，將實驗設置設計為研究抗體誘導之受體內化。出於此目的，在37℃下將OVCAR-8細胞(NCI細胞系名稱；購自NCI(國家癌症研究所)OVCAR-8-NCI；Schilder RJ等人，Int J Cancer. 1990年3月15日；45(3):416-22；Ikediobi ON等人，Mol Cancer Ther. 2006；5；2606-12；Lorenzi, P.L.等人，Mol Cancer Ther 2009；8(4):713-24)(其表現Her1以及

c-Met，如藉由流式細胞計數術所確認-參見圖 7b)與各一級抗體一起培育不同時間段(例如 0、30、60、120 分鐘=0、0.5、1、2 小時(h))。藉由將細胞快速冷卻至 4°C 來終止細胞過程。使用特異性結合一級抗體 Fc 之二級螢光體偶合抗體來檢測與細胞表面結合之抗體。抗體-受體複合物之內化耗盡了細胞表面之抗體-受體複合物且導致平均螢光強度降低。在 OvcAR-8 細胞中研究內化。結果展示於下表及圖 9 中。經由各抗體之內化來測量各受體之內化%(在圖 9 中，雙特異性<ErbB1-cMet>抗體 BsAB01 稱作 cMet/HER1，親代單特異性二價抗體稱作<HER1>及<cMet>)。

表：在 2 小時(2 h)後在 OVCAR-8 細胞上，使用 FACS 分析測量之雙特異性 Her1/cMet 抗體與親代單特異性二價 c-Met 抗體之 c-Met 受體內化%的比較。將在 0 h(=不存在抗體時)細胞表面上 c-Met 受體之測量%設定為細胞表面上 c-Met 受體之 100%。

抗體	在 2 h 後測量之 OVCAR-8 細胞表 面上 c-Met 受體之 %	在 2 h 後，OVCAR-8 細胞上 c-Met 之內化% (ATCC 編號 CRL-1555) (=100-細胞表面上之抗體%)
A) 單特異性		
<c-Met> 親代抗體		
Mab 5D5	54	44
B) 雙特異性<ErbB1- cMet> 抗體		
BsAB01	114	-14

實例10

雙特異性Her1/c-Met抗體之糖改造形式之製備

在MPSV啟動子及合成性多聚A位點上游之控制下將雙特異性Her1/c-Met抗體之DNA序列亞選殖至哺乳動物表現載體中，各載體具有EBV OriP序列。

雙特異性抗體係使用磷酸鈣轉染方法藉由用哺乳動物雙特異性抗體表現載體共轉染HEK293-EBNA細胞來產生。藉由磷酸鈣方法來轉染指數性生長之HEK293-EBNA細胞。對於糖改造抗體之產生，用兩種額外質粒共轉染細胞，一種用於融合GnTIII多肽表現(GnT-III表現載體)，且一種用於甘露糖苷酶II表現(高爾基體甘露糖苷酶II表現載體)，其比率分別為4:4:1:1。在T燒瓶中使用補加有10% FCS之DMEM培養基使細胞以黏附單層培養物形式生長，且在其鋪滿50%至80%時進行轉染。對於T150燒瓶之轉染，在轉染前24小時將 1.5×10^7 個細胞接種於25 ml補加有FCS(最終濃度為10% V/V)之DMEM培養基中，且將細胞在37°C下於具有5% CO₂氣氛之培育器中置放過夜。對於欲轉染之各T150燒瓶，藉由混合94 µg總質粒載體DNA(輕鏈與重鏈表現載體各一半)、終體積為469 µl之水及469 µl 1 M CaCl₂溶液來製備DNA、CaCl₂與水之溶液。向此溶液中添加938 µl 50 mM HEPES、280 mM NaCl、1.5 mM Na₂HPO₄溶液(pH 7.05)，立即混合10秒且在室溫下靜置20秒。用10 ml補加有2% FCS之DMEM稀釋懸浮液，且將其添加至T150中來代替已有培養基。然後添加另外13 ml轉染培養

基。在37℃及5% CO₂下將細胞培育約17至20小時，然後將培養基替換為25 ml DMEM, 10% FCS。在轉染後第7天藉由以210×g離心15 min來收穫經調整培養基，對溶液實施無菌過濾(0.22 μm濾器)且以0.01% w/v之終濃度添加疊氮化鈉，並保持在4℃下。

所分泌非岩藻糖化雙特異性糖改造抗體係藉由以下方式來純化：實施蛋白A親和層析，之後實施陽離子交換層析，且最後在Superdex 200管柱(Amersham Pharmacia)上實施尺寸排除層析步驟，且將緩衝液更換為25 mM磷酸鉀、125 mM氯化鈉、100 mM甘胺酸溶液(pH 6.7)並收集純淨的單體IgG1抗體。使用分光光度計根據在280 nm下之吸光度來估計抗體濃度。

藉由所述MALDI/TOF-MS來分析附接至抗體Fc區域之寡糖。藉由PNGaseF消化自抗體酶促釋放寡糖，其中使抗體固定在PVDF膜上或固定在溶液中。所得含有所釋放寡糖之消化溶液直接經製備用於MALDI/TOF-MS分析，或經EndoH糖苷酶進一步消化，之後製備為用於MALDI/TOF-MS分析之樣品。

實例 11

雙特異性Her1/c-Met抗體糖結構之分析

為確定含有岩藻糖與非岩藻糖(無岩藻糖)之寡糖結構之相對比率，藉由MALDI-Tof-質譜法來分析純化抗體材料之經釋放聚糖。為此，在37℃下將抗體樣品(約50 μg)與存於0.1 M磷酸鈉緩衝液(pH 6.0)中之5 mU N-糖苷酶

F(Prozyme編號GKE-5010B)一起培育過夜，以自蛋白質骨架中釋放寡糖。隨後，使用NuTip-Carbon吸量管管嘴(得自Glygen: NuTip1-10 μ l，目錄Nr編號NT1CAR)分離所釋放聚糖結構並進行除鹽。在第一步驟中，藉由依次用3 μ L 1 M NaOH、20 μ L純水(例如得自Baker之HPLC梯度級，編號4218)、3 μ L 30% v/v乙酸及20 μ l純水(同上)洗滌來準備NuTip-Carbon吸量管管嘴以供結合寡糖。為此，將各溶液裝載至NuTip-Carbon吸量管管嘴中之層析材料頂部且加壓使其經過管嘴。此後，藉由將上述N-糖苷酶F消化物上下抽吸四至五次來使對應於10 μ g抗體之聚糖結構結合至NuTip-Carbon吸量管管嘴中之材料上。以上述方式用20 μ L純水洗滌與NuTip-Carbon吸量管管嘴中之材料結合之聚糖，且分別用0.5 μ L 10%及2.0 μ L 20%乙腈逐步洗脫。在此步驟中，將各洗脫溶液填充於0.5 mL反應容器中且各自上下抽吸四至五次。合併兩種洗脫液以供藉由MALDI-Tof質譜法來分析。在此測量中，在MALDI靶上混合0.4 μ L經合併洗脫液與1.6 μ L SDHB基質溶液(2,5-二羥基苯甲酸/2-羥基-5-甲氧基苯甲酸[Bruker Daltonics編號209813]，以5 mg/ml溶於20%乙醇/5 mM NaCl中)且用經適當調整之Bruker Ultraflex TOF/TOF儀器加以分析。以例行方式記錄單次實驗之50-300次脈衝並進行加和。藉由flex分析軟體(Bruker Daltonics)評估所得譜圖並確定所檢測各峰之質量。隨後，藉由比較各結構(例如分別具有或不具有岩藻糖之複雜結構、雜合體結構及寡-或高-甘露糖結構)質量之

計算值與理論預期值來將各峰分為含有岩藻糖或無岩藻糖(非岩藻糖)之聚糖結構。

為確定雜合體結構之比率，同時用N-糖苷酶F及糖苷內切酶H消化抗體樣品。N-糖苷酶F自蛋白質骨架釋放所有N-連接聚糖結構(複雜結構、雜合體結構及寡-及高甘露糖結構)，且糖苷內切酶H另外在聚糖還原端之兩個GlcNAc殘基之間裂解所有雜合體型聚糖。隨後藉由MALDI-Tof質譜法以與上述用於N-糖苷酶F消化樣品相同之方式處理並分析該消化物。藉由比較N-糖苷酶F消化物與經合併N-糖苷酶F/內切酶H消化物之模式，使用指定糖結構之信號的降低程度來估計雜合體結構之相對含量。

根據個別糖結構峰高度與所檢測所有糖結構峰高度之和之比來計算各種糖結構之相對含量。岩藻糖含量係含岩藻糖結構相對於N-糖苷酶F處理樣品中所鑒定所有糖結構(分別例如複雜結構、雜合體結構及寡-及高-甘露糖結構)之百分比。非岩藻糖化程度係無岩藻糖結構相對於N-糖苷酶F處理樣品中所鑒定所有糖結構(分別例如複雜結構、雜合體結構及寡-及高-甘露糖結構)之百分比。

實例 12：

在用 Her1/cMet 雙特異性抗體處理後分析細胞遷移

活性 c-Met 信號傳導之一重要態樣係誘導遷移及侵入程序。c-Met 抑制性抗體之效能可藉由測量對 HGF 誘導細胞遷移之抑制來確定。出於此目的，在不存在或存在雙特異性抗體或 IgG 對照抗體時用 HGF 處理 HGF 可誘導癌細胞系

A431，且在Acea實時細胞分析儀上使用具有阻抗讀數器之CIM板以時間依賴性方式測量穿過8 μm 管孔之遷移細胞數。

實例 13

雙特異性Her1/c-Met抗體之體外ADCC

本發明Her1/cMet雙特異性抗體在表現兩種受體之細胞上顯示降低之內化(與相應單特異性親代c-Met抗體相比)。內化降低強有力地支持對該等抗體進行糖改造之理論，此乃因延長抗體-受體複合物在細胞表面上之暴露時間使得更有可能被Nk細胞所識別。內化降低及糖改造可理解為抗體依賴性細胞毒性(ADCC)相對於親代抗體有所增強。證實該等效應之體外實驗設置可設計為使用在細胞表面上表現Her1及cMet二者之癌細胞(例如A431)及效應子細胞(例如Nk細胞系或PBMC細胞系)。使腫瘤細胞與親代單特異性抗體或雙特異性抗體一起預培育最多24 h，之後添加效應子細胞系。量化細胞溶解且使得可辨別單-與雙特異性抗體。

用胰蛋白酶/EDTA(Gibco編號25300-054)收集指數生長期之靶細胞(例如PC-3，DSMZ編號ACC 465，前列腺腺癌，在Ham's F12營養混合物+2 mM L-內鹽胺基-L-麩胺鹽胺+10% FCS中培養)。在實施洗滌步驟並檢查細胞數量及活力後，在37°C下於細胞培育器中用鈣黃綠素(Invitrogen編號C3100MP；在1個小瓶中，鈣黃綠素再懸浮於50 μl DMSO中，可用於標記存於5 ml培養基中之 5×10^6 個細胞)

將所需等份樣品標記30 min。此後，用AIM-V培養基將細胞洗滌三次，檢查細胞數量及活力並將細胞數量調整至 $3 \times 10^5/\text{ml}$ 。

同時，根據製造商方案(洗滌步驟： $1 \times 400 \text{ g}$ 及 $2 \times 350 \text{ g}$ ，每次10 min)藉由密度梯度離心法(Histopaque-1077，Sigma編號H8889)來準備作為效應子細胞之PBMC。檢查細胞數量及活力並將細胞數量調節至 $1.5 \times 10^7/\text{ml}$ 。

將100 μl 經鈣黃綠素染色之靶細胞平鋪於圓底96孔板中，添加50 μl 經稀釋抗體及50 μl 效應子細胞。在某些實驗中將靶細胞與Redimune® NF液體(ZLB Behring)混合，濃度為10 mg/ml Redimune。

使用自發溶解作為對照，其係藉由在不存在抗體之情形下共培養靶細胞及效應子細胞來測定；且使用最大溶解作為對照，其係僅藉由靶細胞之1% Triton X-100溶解來測定。在37°C下於加濕細胞培育器中將板培育4小時。

根據製造商說明書使用細胞毒性檢測套組(LDH檢測套組，Roche編號1 644 793)藉由測量自受損細胞釋放之LDH來評價靶細胞之殺滅。簡言之，將100 μl 來自各孔之上清液與100 μl 來自套組之受質於透明平底96孔板中混合。在ELISA讀數器中於490 nm下經至少10 min測定受質顏色反應之Vmax值。如下所述計算特定抗體介導殺滅百分比： $((A-SR)/(MR-SR) \times 100$ ，其中A係在特定抗體濃度下之平均Vmax，SR係自發釋放之平均Vmax且MR係最大釋放之平均Vmax。

實例 14

雙特異性 Her1/cMet 抗體在具有旁分泌 HGF 環之皮下異種移植模型中之體內效能

經 Mrc-5 細胞共注射之皮下 A549 模型模擬 c-Met 之旁分泌活化環。A549 在細胞表面上表現 c-Met 以及 Her1。將 A549 及 Mrc-5 細胞在標準細胞培養條件下維持於對數生長期。以 10:1 之比注射 A549 及 Mrc-5 細胞，且將 1×10^7 個 A549 細胞及 1×10^6 個 Mrc-5 細胞移植入 SCID 米色鼠中。在出現腫瘤且尺寸到達 100-150 mm³ 後開始處理。用 20 mg/kg(抗體/小鼠)之負荷劑量處理小鼠，且隨後每週一次用 10 mg/kg(抗體/小鼠)處理。每週兩次測量腫瘤體積且並行監測動物體重。比較單一處理及單一抗體之組合與使用雙特異性抗體之治療。

實例 15

雙特異性 Her1/cMet 抗體在具有旁分泌 HGF 環之皮下異種移植模型中之體內效能

經 Mrc-5 細胞共注射之皮下 A431 模型模擬 c-Met 之旁分泌活化環。A431 在細胞表面上表現 c-Met 以及 Her1。將 A431 及 Mrc-5 細胞在標準細胞培養條件下維持於對數生長期。以 10:1 之比注射 A431 及 Mrc-5 細胞，且將 1×10^7 個 A431 細胞及 1×10^6 個 Mrc-5 細胞移植入 SCID 米色鼠中。在出現腫瘤且尺寸到達 100-150 mm³ 後開始處理。用 20 mg/kg(抗體/小鼠)之負荷劑量處理小鼠，且隨後每週一次用 10 mg/kg(抗體/小鼠)處理。每週兩次測量腫瘤體積且並行監測動物體

重。比較單一處理及單一抗體之組合與使用雙特異性抗體之治療。

實例 16

雙特異性 Her1/cMet 抗體對 Ovcara-8 增殖之抑制

a) Ovcara-8 細胞顯示 Her1 之高細胞表面含量及 c-Met 之中高細胞表面表現，如流式細胞計數術所獨立地確認。在 48 小時後，在 CellTiterGlow™ 分析中測量雙特異性 Her1/c-Met 抗體對 Ovcara-8 增殖之抑制。結果展示於圖 10a 中。對照為 PBS 緩衝液。

EGFR 抗體西妥昔單抗未顯示抑制(與設定為 0% 抑制之緩衝液對照相比)。雙特異性 Her1/c-Met BsAB01 (BsAb) 抗體對癌症細胞增殖產生較小但顯著之抑制(8% 抑制)。單價 c-Met 抗體單臂 5D5 (OA5D5) 對增殖未顯示任何效應。EGFR 抗體西妥昔單抗與單價 c-Met 抗體單臂 5D5 (OA5D5) 之組合幾乎不降低增殖(2% 抑制)。

b) 可用 HGF 進一步刺激 Ovcara-8。為模擬出現活性 EGFR - c-Met- 受體信號傳導網絡之情景，根據 a) 中所述在經 HGF 調整之培養基存在下實施進一步增殖分析(在 48 小時後實施 CellTiterGlow™ 分析)。結果展示於圖 10b 中。

添加 HGF 可導致增殖增強(10%)。與僅用 HGF 處理之細胞(其設定為 0% 抑制)相比，EGFR 抗體西妥昔單抗以及單價 c-Met 抗體單臂 5D5 (OA5D5) 僅對增殖顯示較小抑制效應(2%、7%)。雙特異性 Her1/c-Met 抗體 BsAB01 (BsAb)(15% 抑制)顯示可顯著抑制 Ovcara-8 細胞之癌症細胞增殖。EGFR

抗體西妥昔單抗與單價c-Met抗體單臂5D5 (OA5D5)之組合以顯著性較低之程度使細胞增殖降低(10%抑制)。

【圖式簡單說明】

圖1 不含CH4結構域之全長抗體的示意性結構，其可以兩對重鏈及輕鏈特異性結合第一抗原1，該等重鏈及輕鏈以典型順序包含可變結構域及恆定結構域。

圖2a-c 二價雙特異性<ErbB-1/c-Met>抗體之示意性結構，其包含：a)全長抗體中特異性結合人類ErbB-1之輕鏈及重鏈；及b)全長抗體中特異性結合人類c-Met之輕鏈及重鏈，其中恆定結構域CL及CH1、及/或可變結構域VL及VH彼此替代，該等鏈經隆凸-孔洞結合技術修飾。

圖3 本發明三價雙特異性<ErbB-1/c-Met>抗體之示意圖，其包含特異性結合ErbB-1之全長抗體，該全長抗體上融合有

a) 圖3a：兩個多肽VH及VL(VH及VL結構域二者一起形成特異性結合c-Met之抗原結合位點)；

b) 圖3b：兩個多肽VH-CH1及VL-CL(二者中之VH及VL結構域一起形成特異性結合c-Met之抗原結合位點)；

圖3c：本發明三價雙特異性抗體之示意圖，其包含特異性結合ErbB-1之全長抗體，該全長抗體上融合有兩個多肽VH及VL(VH及VL結構域二

者一起形成特異性結合c-Met之抗原結合位點)且具有「隆凸及孔洞」；

圖3d：本發明三價雙特異性抗體之示意圖，其包含特異性結合ErbB-1之全長抗體，該全長抗體融合有兩個多肽VH及VL(VH及VL結構域二者一起形成特異性結合c-Met之抗原結合位點，其中該VH及VL結構域在VH44位與VL100位之間包含鏈間二硫橋)且具有「隆凸及孔洞」。

圖4 4a：四種可能的單鏈Fab片段之示意性結構

4b：兩種單鏈Fv片段之示意性結構

圖5 三價雙特異性<ErbB-1/c-Met>抗體之示意性結構，其包含全長抗體及一個單鏈Fab片段(圖5a)或一個單鏈Fv片段(圖5b)-具有隆凸及孔洞之雙特異性三價抗體之實例。

圖6 四價雙特異性<ErbB-1/c-Met>抗體之示意性結構，其包含全長抗體及兩個單鏈Fab片段(圖6a)或兩個單鏈Fv片段(圖6b) - c-Met結合位點源自c-Met二聚化抑制性抗體。

圖7a 在表皮樣癌細胞系A431中ErbB1/2/3及c-Met之細胞表面表現之流式細胞計數分析。

圖7b 在卵巢癌細胞系OVCAR-8中ErbB1/2/3及c-Met之細胞表面表現之流式細胞計數分析。

圖8a 在癌細胞系A431中之增殖分析-與親代單特異性<HER1>及<c-Met>抗體相比，本發明雙特異性

<HER1/c-Met>抗體BsAB01 (BsAb)對癌症細胞增殖之抑制。

圖 8b 在癌細胞系 A431 中在 HGF 存在下之增殖分析 - 與親代單特異性 <HER1> 及 <c-Met> 抗體相比，本發明雙特異性 <HER1/c-Met> 抗體 BsAB01 (BsAb) 對癌症細胞增殖之抑制。

圖 9 在 OVCAR-8 癌細胞中之內化分析，在第 0、30、60 及 120 分鐘 (=0、0.5、1 及 2 小時) 測量。

圖 10a 在 OVCAR-8 癌細胞中之增殖分析。與親代單特異性 <HER1> 及 <c-Met> 抗體相比，本發明雙特異性 <HER1/c-Met> 抗體 BsAB01 (BsAb) 對癌症細胞增殖之抑制。

圖 10b 在癌細胞系 A431 中在 HGF 存在下之增殖分析 - 與親代單特異性 <HER1> 及 <c-Met> 抗體相比，本發明雙特異性 <HER1/c-Met> 抗體 BsAB01 (BsAb) 對癌症細胞增殖之抑制。

序 列 表

<110> 瑞士商羅齊克雷雅公司
<120> 雙特异性抗-ErbB-1/抗-c-Met 抗體
<130> 26066 FT
<140> 099110596
<141> 2010-04-06
<150> 09005109.5
<151> 2009-04-07
<160> 34
<170> PatentIn version 3.2
<210> 1
<211> 119
<212> PRT
<213> 小家鼠(mus musculus)
<400> 1

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 2

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 3
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重鏈可變結構域<ErbB-1>人類化 ICR62

<400> 3

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

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

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 輕鏈可變結構域<ErbB-1>人類化 ICR62

<400> 4

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 5
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重鏈可變結構域<c-Met> Mab 5D5

<400> 5

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 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
50 55 60

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

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

Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 6
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 輕鏈可變結構域<c-Met> Mab 5D5

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 7
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 重鏈 cMet Mab 5D5

<400> 7

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 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
 50 55 60

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

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

Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

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

Lys

<210> 8
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 輕鏈 cMet Mab 5D5

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重鏈 cMet Fab 5D5

<400> 9

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 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
50 55 60

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

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

Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr His
225

<210> 10
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 輕鏈 cMet Fab 5D5

<400> 10

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

201039848

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr	20	25	30
Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys	35	40	45
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val	50	55	60
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr	65	70	75
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln	85	90	95
Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile	100	105	110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp	115	120	125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn	130	135	140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu	145	150	155
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp	165	170	175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr	180	185	190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser	195	200	205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	210	215	220

<210> 11
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 11

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 12
<211> 377
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

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

35

40

45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 14
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 14

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 1 5 10 15

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

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 35 40 45

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 50 55 60

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 85 90 95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100

<210> 15
 <211> 1390
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 15

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
 1 5 10 15

Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys
 20 25 30

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
 35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
 50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys
 65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
 85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
 100 105 110

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
 115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
 130 135 140

Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
 145 150 155 160

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
 165 170 175

Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe

180

185

190

Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
 195 200 205

His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
 210 215 220

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
 225 230 235 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
 245 250 255

Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
 260 265 270

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
 275 280 285

His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
 290 295 300

Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
 305 310 315 320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
 325 330 335

Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
 340 345 350

Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
 355 360 365

Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
 370 375 380

Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg
 385 390 395 400

Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
405 410 415

Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
420 425 430

Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly
435 440 445

Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
450 455 460

Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
465 470 475 480

Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu
485 490 495

Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
500 505 510

Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
515 520 525

Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys
530 535 540

Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile
545 550 555 560

Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu
565 570 575

Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg
580 585 590

Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu
595 600 605

Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys
610 615 620

Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile
625 630 635 640

Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
645 650 655

Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly
660 665 670

Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg
675 680 685

His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
690 695 700

Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
705 710 715 720

Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
725 730 735

Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
740 745 750

Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn
755 760 765

Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg
770 775 780

Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys
785 790 795 800

Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys
805 810 815

Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp
820 825 830

Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val
835 840 845

Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp
850 855 860

Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys
865 870 875 880

Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val
885 890 895

Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys
900 905 910

Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp
915 920 925

Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Thr Ala
930 935 940

Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln
945 950 955 960

Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His
965 970 975

Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro Thr
980 985 990

Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala Thr Phe Pro
995 1000 1005

Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln
1010 1015 1020

Val Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu Thr Ser Gly

1025		1030		1035
Asp Ser	Asp Ile Ser Ser	Pro Leu Leu Gln Asn Thr	Val His Ile	
1040		1045	1050	
Asp Leu	Ser Ala Leu Asn Pro	Glu Leu Val Gln Ala	Val Gln His	
1055		1060	1065	
Val Val	Ile Gly Pro Ser Ser	Leu Ile Val His Phe	Asn Glu Val	
1070		1075	1080	
Ile Gly	Arg Gly His Phe Gly	Cys Val Tyr His Gly	Thr Leu Leu	
1085		1090	1095	
Asp Asn	Asp Gly Lys Lys Ile	His Cys Ala Val Lys	Ser Leu Asn	
1100		1105	1110	
Arg Ile	Thr Asp Ile Gly Glu	Val Ser Gln Phe Leu	Thr Glu Gly	
1115		1120	1125	
Ile Ile	Met Lys Asp Phe Ser	His Pro Asn Val Leu	Ser Leu Leu	
1130		1135	1140	
Gly Ile	Cys Leu Arg Ser Glu	Gly Ser Pro Leu Val	Val Leu Pro	
1145		1150	1155	
Tyr Met	Lys His Gly Asp Leu	Arg Asn Phe Ile Arg	Asn Glu Thr	
1160		1165	1170	
His Asn	Pro Thr Val Lys Asp	Leu Ile Gly Phe Gly	Leu Gln Val	
1175		1180	1185	
Ala Lys	Gly Met Lys Tyr Leu	Ala Ser Lys Lys Phe	Val His Arg	
1190		1195	1200	
Asp Leu	Ala Ala Arg Asn Cys	Met Leu Asp Glu Lys	Phe Thr Val	
1205		1210	1215	
Lys Val	Ala Asp Phe Gly Leu	Ala Arg Asp Met Tyr	Asp Lys Glu	
1220		1225	1230	

Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val Lys
1235 1240 1245

Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys
1250 1255 1260

Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr
1265 1270 1275

Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr
1280 1285 1290

Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys
1295 1300 1305

Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys
1310 1315 1320

Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser
1325 1330 1335

Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val His Val Asn
1340 1345 1350

Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu
1355 1360 1365

Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp Thr Arg Pro
1370 1375 1380

Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser
1385 1390

<210> 16
<211> 1210
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
 20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
 35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
 50 55 60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
 65 70 75 80

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
 85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
 100 105 110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
 115 120 125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
 130 135 140

His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
 145 150 155 160

Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
 165 170 175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
 180 185 190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
 195 200 205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg

210

215

220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
 225 230 235 240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
 245 250 255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
 260 265 270

Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
 275 280 285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
 290 295 300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
 305 310 315 320

Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
 325 330 335

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
 340 345 350

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
 355 360 365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
 370 375 380

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
 385 390 395 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
 405 410 415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
 420 425 430

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
 435 440 445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
 450 455 460

Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
 465 470 475 480

Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
 485 490 495

Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
 500 505 510

Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
 515 520 525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
 530 535 540

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
 545 550 555 560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
 565 570 575

Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
 580 585 590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
 595 600 605

Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
 610 615 620

Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
 625 630 635 640

Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu
645 650 655

Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His
660 665 670

Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
675 680 685

Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
690 695 700

Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
705 710 715 720

Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
725 730 735

Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
740 745 750

Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
755 760 765

Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
770 775 780

Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
785 790 795 800

Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
805 810 815

Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
820 825 830

Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
835 840 845

Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
850 855 860

Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
865 870 875 880

Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
885 890 895

Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
900 905 910

Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
915 920 925

Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
930 935 940

Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys
945 950 955 960

Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
965 970 975

Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
980 985 990

Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp
995 1000 1005

Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe
1010 1015 1020

Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu
1025 1030 1035

Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn
1040 1045 1050

Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg



1065

Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
1205 1210

<400> 17

Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 18
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 18

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 19

Asn Tyr Gly Val His
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 20

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr
1 5

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 21

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His

1 5 10

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重鏈 CDR3H, <ErbB-1>人類化 ICR62

<400> 23

Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala
1 5 10

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重鏈 CDR2H, <ErbB-1>人類化 ICR62

<400> 24

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重鏈 CDR1H, <ErbB-1>人類化 ICR62

<400> 25

Asp Tyr Lys Ile His
1 5

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 輕鏈 CDR3L, <ErbB-1>人類化 ICR62

<400> 26

Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr

1 5

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 輕鏈 CDR2L, <ErbB-1>人類化 ICR62

<400> 27

Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr

1 5

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 輕鏈 CDR1L, <ErbB-1>人類化 ICR62

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重鏈 CDR3H, <c-Met> Mab 5D5

<400> 29

Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 30

<211> 17
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重鏈 CDR2H, <c-Met> Mab 5D5

<400> 30

Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 重鏈 CDR1H, <c-Met> Mab 5D5

<400> 31

Ser Tyr Trp Leu His
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 輕鏈 CDR3L, <c-Met> Mab 5D5

<400> 32

Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 輕鏈 CDR2L, <c-Met> Mab 5D5

<400> 33

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 輕鏈CDR1L, <c-Met> Mab 5D5

<400> 34

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 99110596

※申請日： 99-04-06

※IPC 分類： ~~C07K~~; A61K^{39/395} (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

雙特異性抗-ErbB-1 /抗-c-Met抗體

C07K^{16/28} (2006.01)

A61P^{35/00} (2006.01)

BISPECIFIC ANTI-ErbB-1 /ANTI-c-Met ANTIBODIES

二、中文發明摘要：

本發明係關於針對人類 ErbB-1 及人類 c-Met 之雙特異性抗體、其產生方法、含有該等抗體之醫藥組合物、及其用途。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to bispecific antibodies against human ErbB-1 and against human c-Met, methods for their production, pharmaceutical compositions containing said antibodies, and uses thereof.

七、申請專利範圍：

1. 一種雙特異性抗體，其特異性結合人類 ErbB-1 及人類 c-Met，其包含特異性結合人類 ErbB-1 之第一抗原結合位點及特異性結合人類 c-Met 之第二抗原結合位點，其特徵在於在流式細胞計數分析中在 2 小時後對 OVCAR-8 細胞測量時，與該雙特異性抗體不存在下 c-Met 之內化相比，該雙特異性抗體顯示 c-Met 之內化不超過 15%。
2. 如請求項 1 之雙特異性抗體，其特徵在於其為二價或三價抗體，包含一個或兩個特異性結合人類 ErbB-1 之抗原結合位點及一個特異性結合人類 c-Met 之第三抗原結合位點。
3. 如請求項 2 之抗體，其特徵在於包含
 - a) 特異性結合 ErbB-1 且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成之全長抗體；及
 - b) 一個特異性結合人類 c-Met 之單鏈 Fab 片段，其中 b) 中該單鏈 Fab 片段經由 a) 中該全長抗體重鏈或輕鏈 C 或 N 端之肽連接物與該全長抗體融合。
4. 一種雙特異性抗體，其特異性結合人類 ErbB-1 及人類 c-Met，其包含特異性結合人類 ErbB-1 之第一抗原結合位點及特異性結合人類 c-Met 之第二抗原結合位點，其特徵在於
 - i) 該第一抗原結合位點在重鏈可變結構域中包含 SEQ ID NO: 17 之 CDR3H 區、SEQ ID NO: 18 之 CDR2H 區、及 SEQ ID NO: 19 之 CDR1H 區，且在輕鏈可變結

構域中包含SEQ ID NO: 20之CDR3L區、SEQ ID NO: 21之CDR2L區、及SEQ ID NO: 58之CDR1L區或SEQ ID NO: 22之CDR1L區；及

該第二抗原結合位點在重鏈可變結構域中包含SEQ ID NO: 30之CDR3H區、SEQ ID NO: 31之CDR2H區、及SEQ ID NO: 32之CDR1H區，且在輕鏈可變結構域中包含SEQ ID NO: 33之CDR3L區、SEQ ID NO: 34之CDR2L區、及SEQ ID NO: 35之CDR1L區；

- ii) 該第一抗原結合位點在該重鏈可變結構域中包含SEQ ID NO: 23之CDR3H區、SEQ ID NO: 24之CDR2H區、及SEQ ID NO: 25之CDR1H區，且在該輕鏈可變結構域中包含SEQ ID NO: 26之CDR3L區、SEQ ID NO: 27之CDR2L區、及SEQ ID NO: 28之CDR1L區或SEQ ID NO: 29之CDR1L區；及

該第二抗原結合位點在該重鏈可變結構域中包含SEQ ID NO: 30之CDR3H區、SEQ ID NO: 31之CDR2H區、及SEQ ID NO: 32之CDR1H區，且在該輕鏈可變結構域中包含SEQ ID NO: 33之CDR3L區、SEQ ID NO: 34之CDR2L區、及SEQ ID NO: 35之CDR1L區。

5. 如請求項4之雙特異性抗體，其特徵在於

- i) 該特異性結合ErbB-1之第一抗原結合位點包含序列SEQ ID NO: 1作為重鏈可變結構域，且包含序列SEQ ID NO: 2作為輕鏈可變結構域；及

該特異性結合 c-Met 之第二抗原結合位點包含序列 SEQ ID NO: 5 作為重鏈可變結構域，且包含序列 SEQ ID NO: 6 作為輕鏈可變結構域；或

ii) 該特異性結合 ErbB-1 之第一抗原結合位點包含序列 SEQ ID NO: 3 作為重鏈可變結構域，且包含序列 SEQ ID NO: 4 作為輕鏈可變結構域；及

該特異性結合 c-Met 之第二抗原結合位點包含序列 SEQ ID NO: 5 作為重鏈可變結構域，且包含序列 SEQ ID NO: 6 作為輕鏈可變結構域。

6. 如請求項 1 至 5 中任一項之雙特異性抗體，其特徵在於包含 IgG1 或 IgG3 亞類之恆定區。
7. 如請求項 1 至 5 中任一項之雙特異性抗體，其特徵在於該抗體係在 Asn297 經糖鏈糖基化，其中該糖鏈內岩藻糖之量為 65% 或更低。
8. 一種核酸，其編碼如請求項 1 至 7 中任一項之雙特異性抗體。
9. 一種醫藥組合物，其包含如請求項 1 至 7 中任一項之雙特異性抗體。
10. 如請求項 9 之醫藥組合物，其用於治療癌症。
11. 如請求項 1 至 5 中任一項之雙特異性抗體，其用於治療癌症。
12. 一種如請求項 1 至 7 中任一項之雙特異性抗體之用途，其用於製造治療癌症之藥物。

八、圖式：

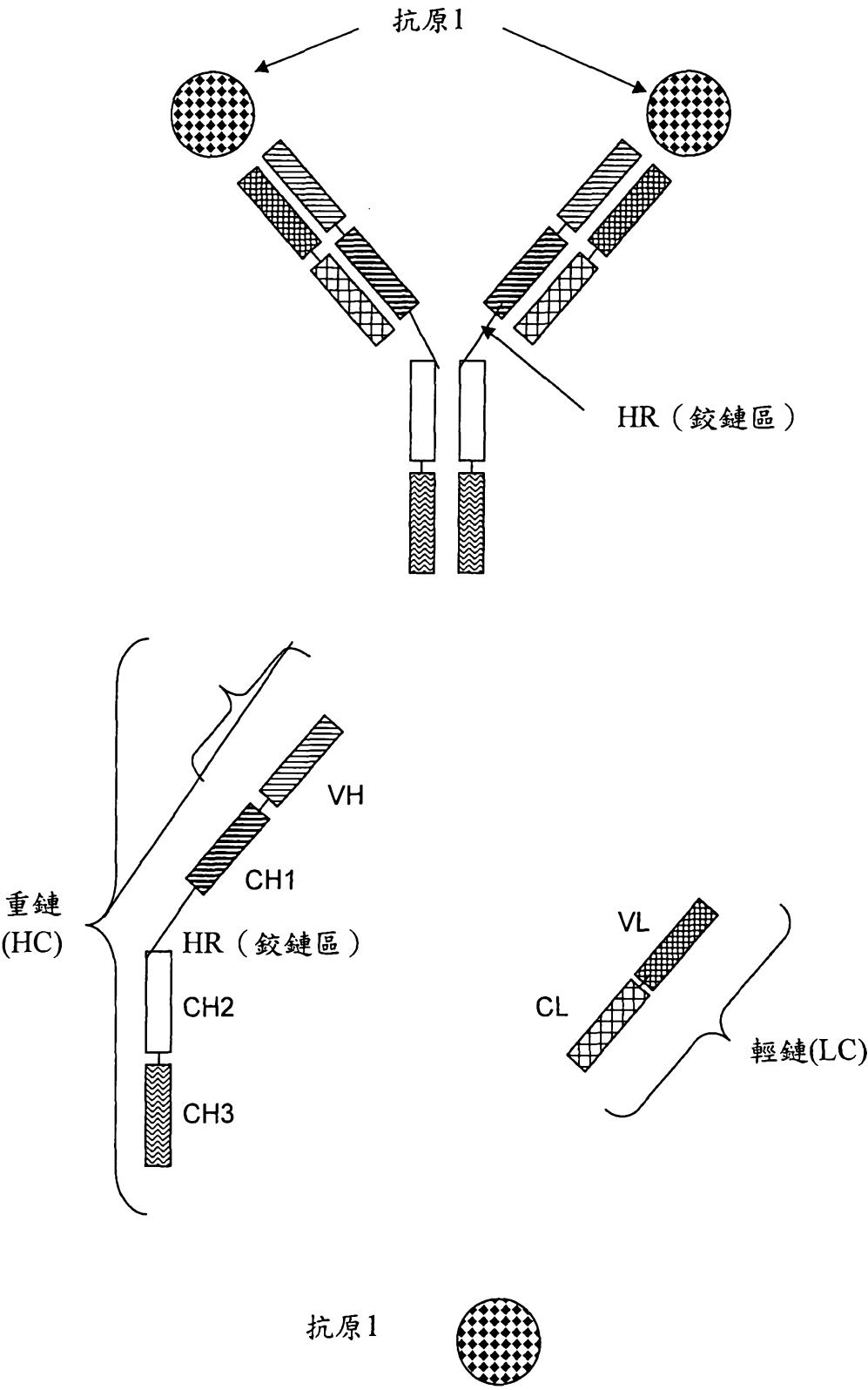


圖 1

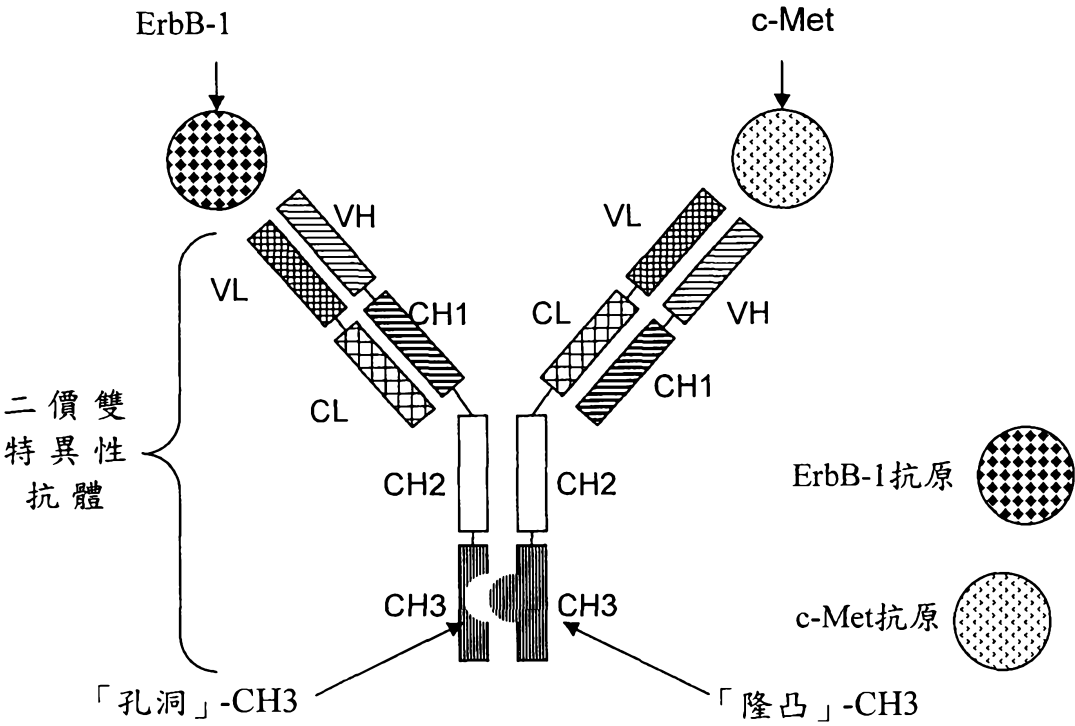


圖 2a

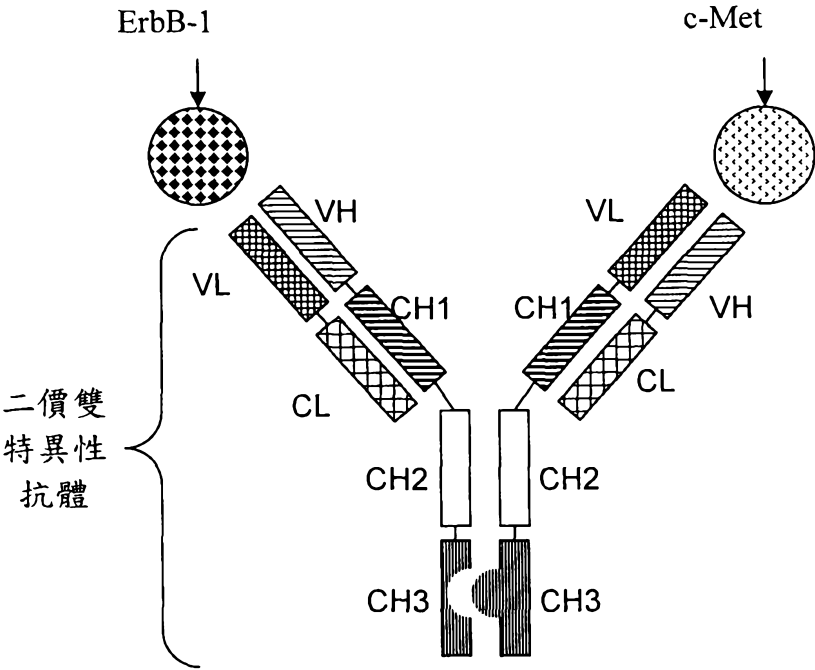


圖 2b

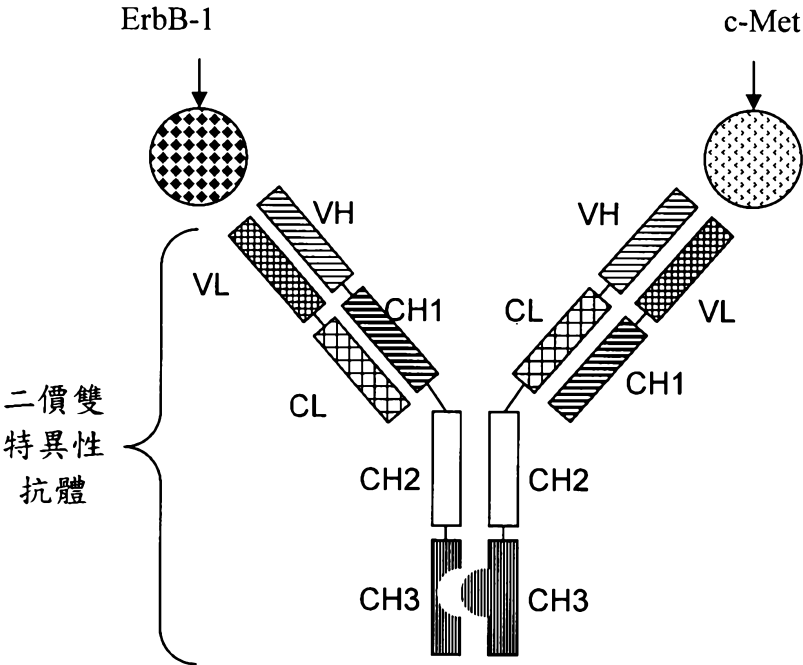


圖 2c

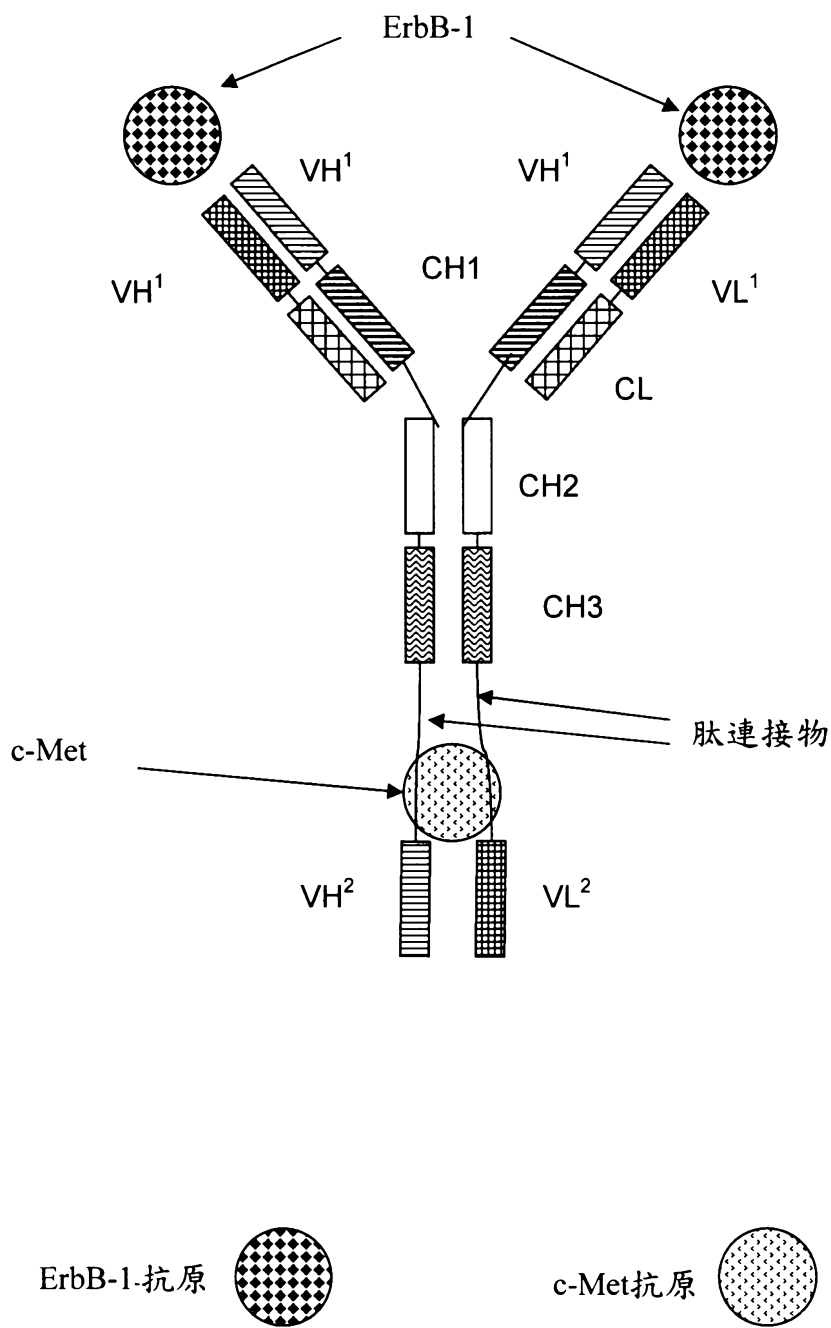


圖 3a

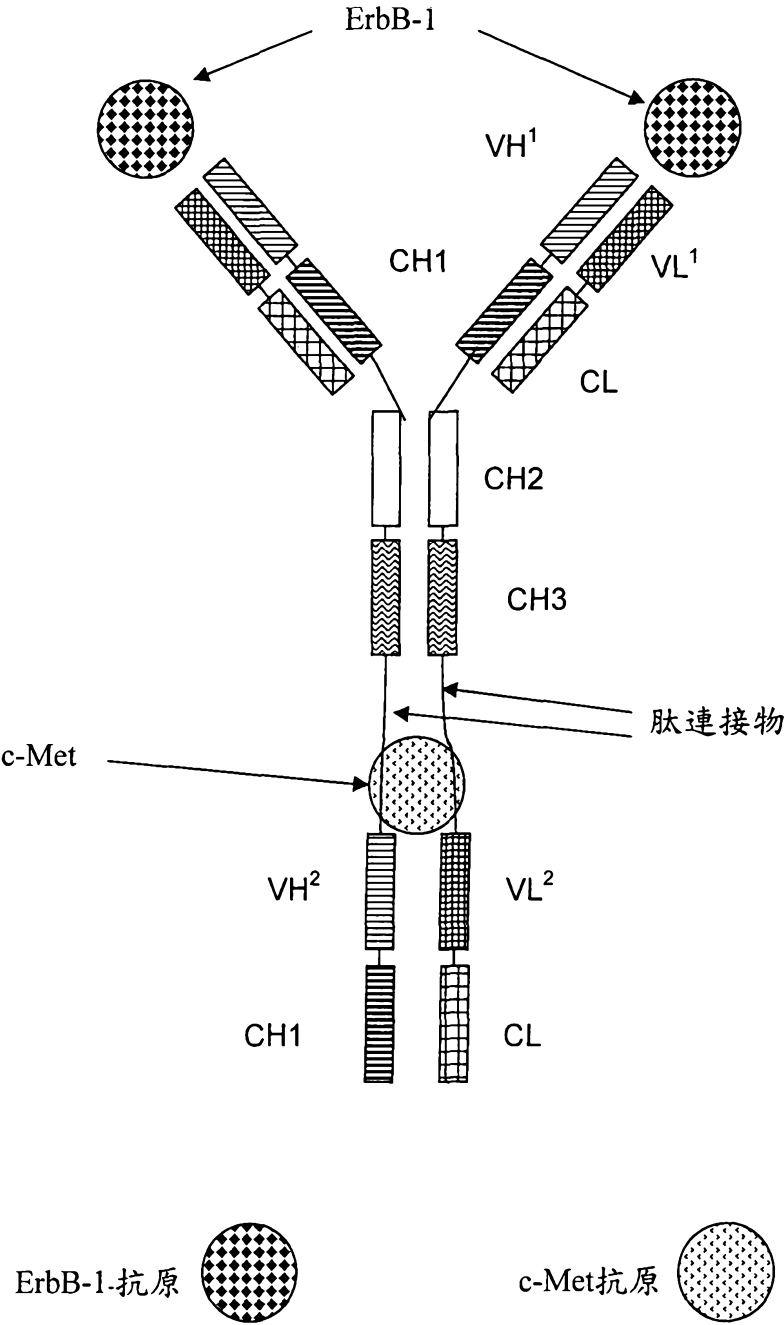


圖 3b

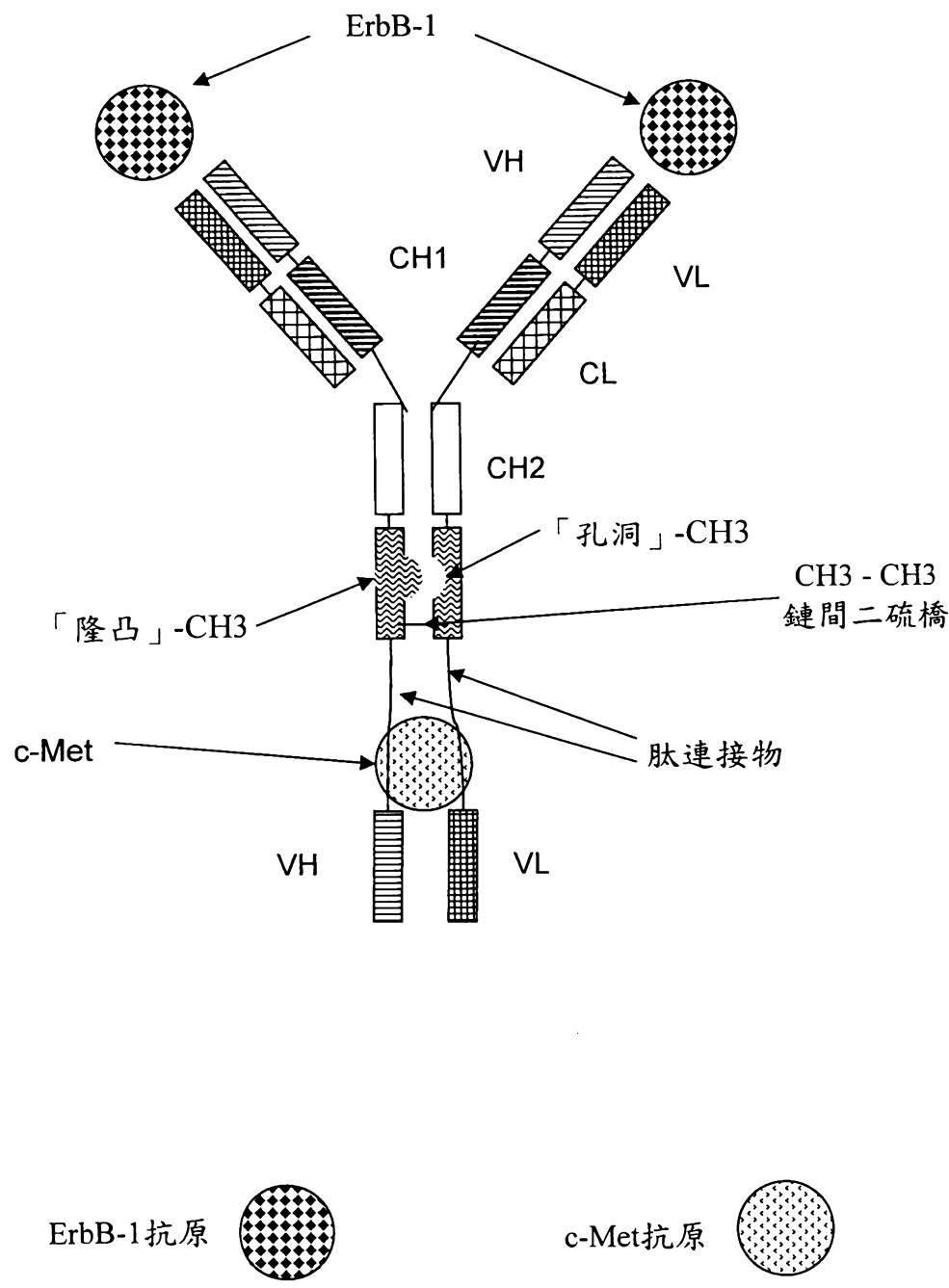
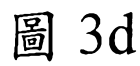


圖 3c



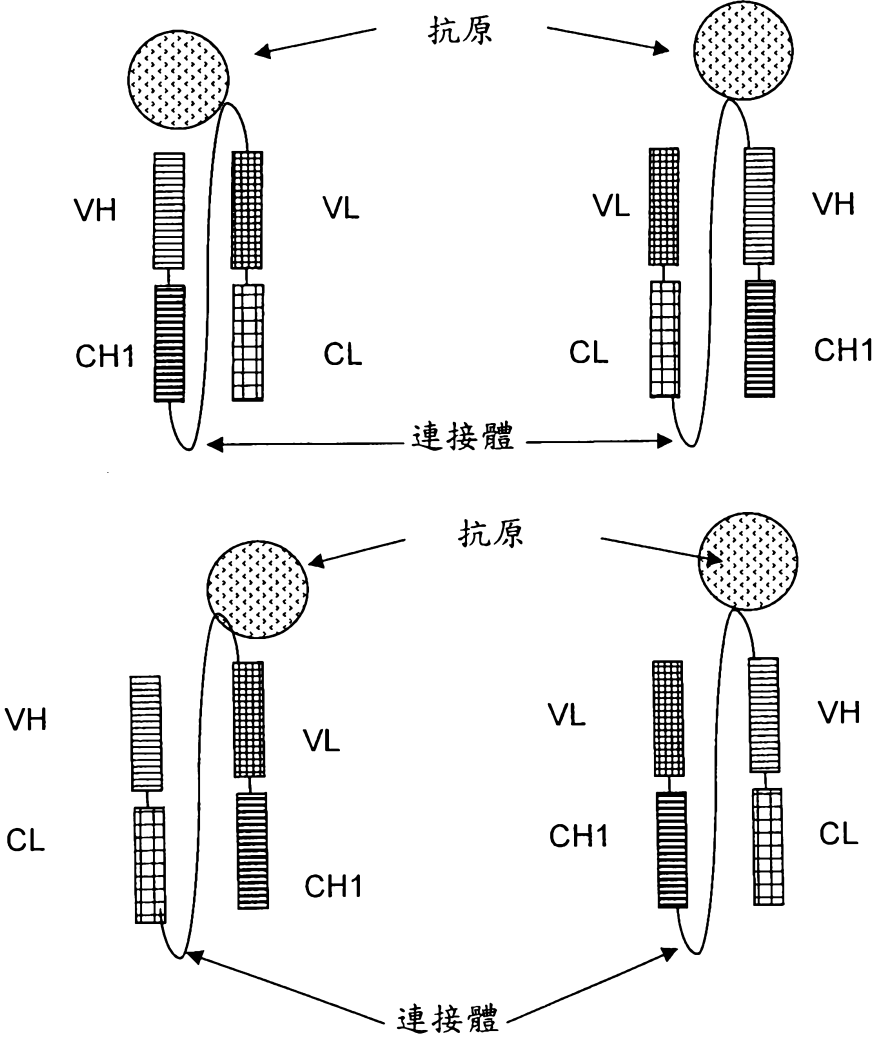


圖 4a

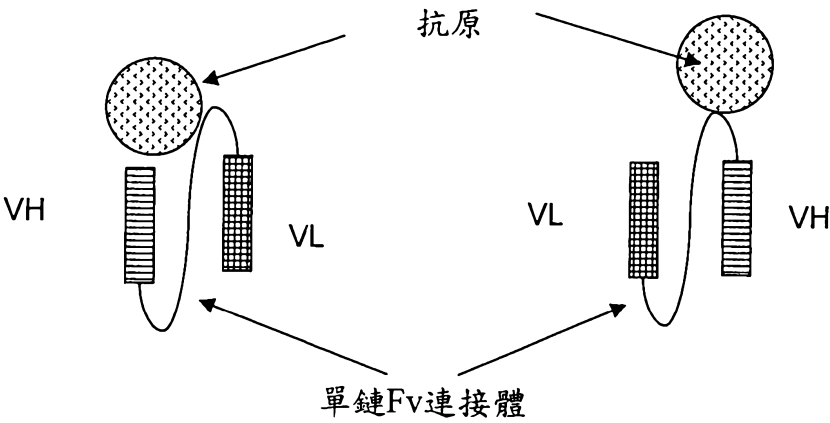


圖 4b

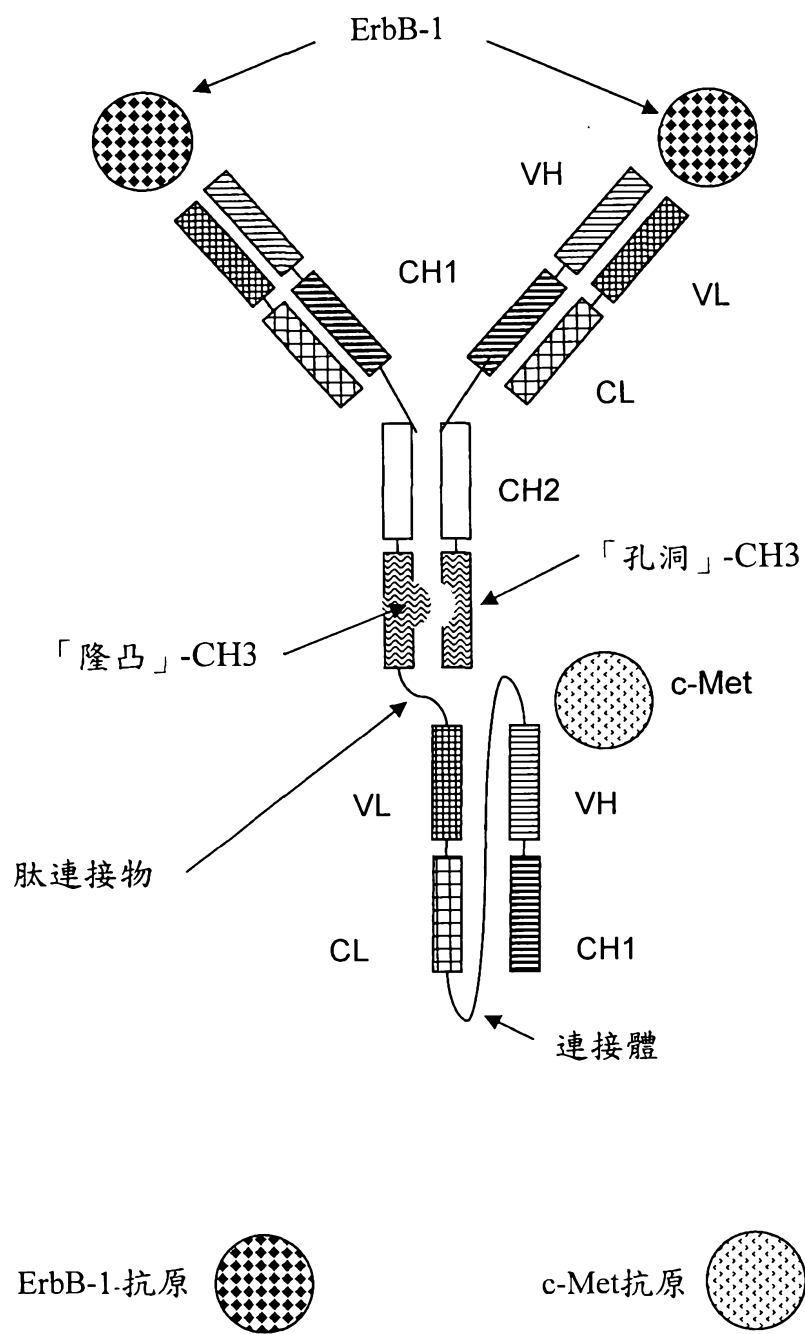


圖 5a

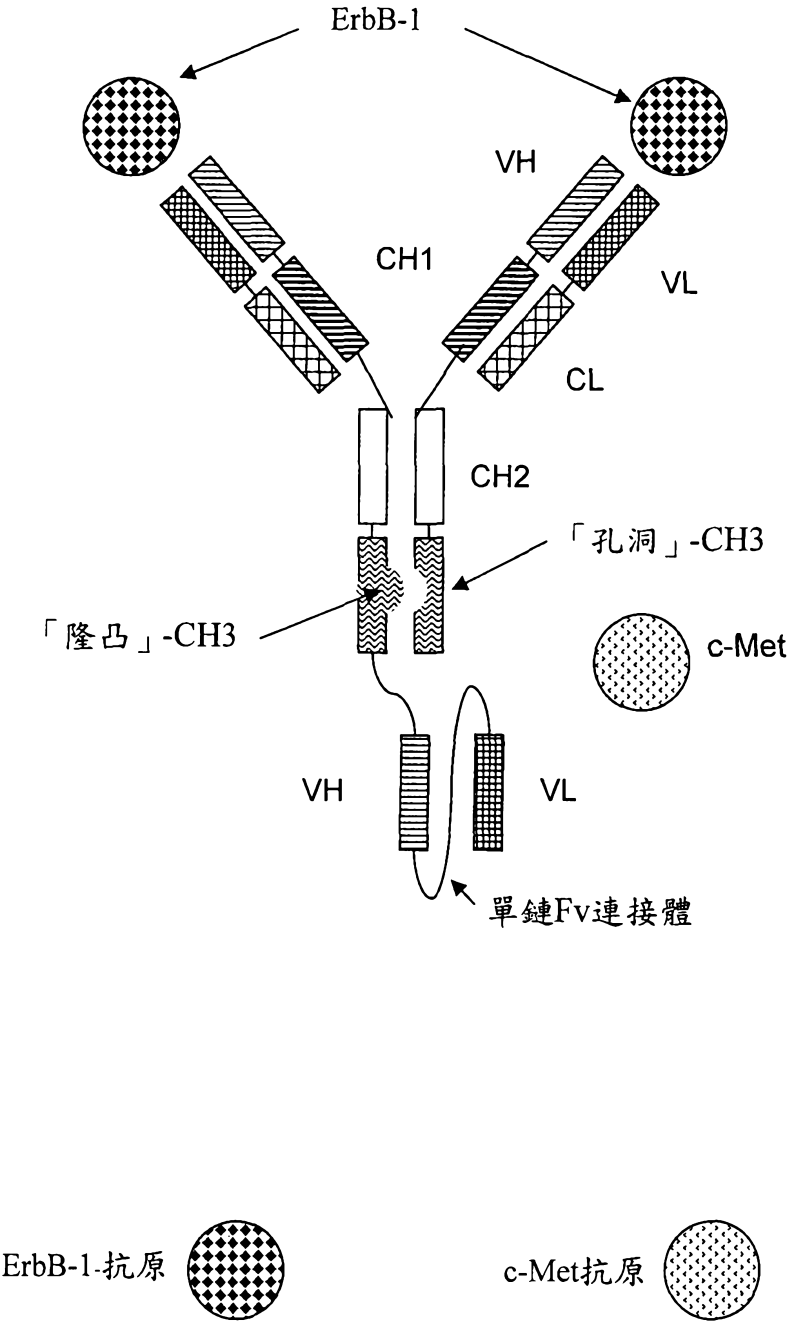


圖 5b

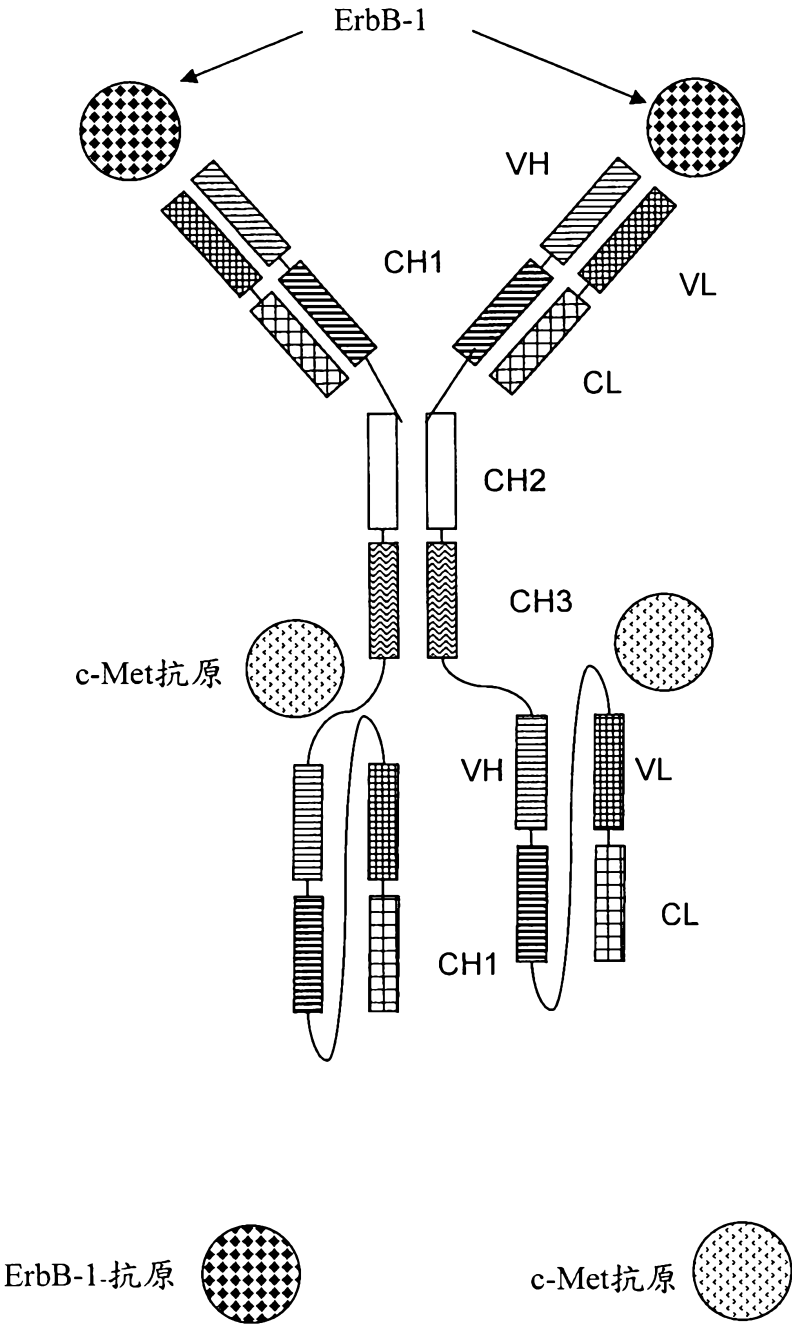


圖 6a

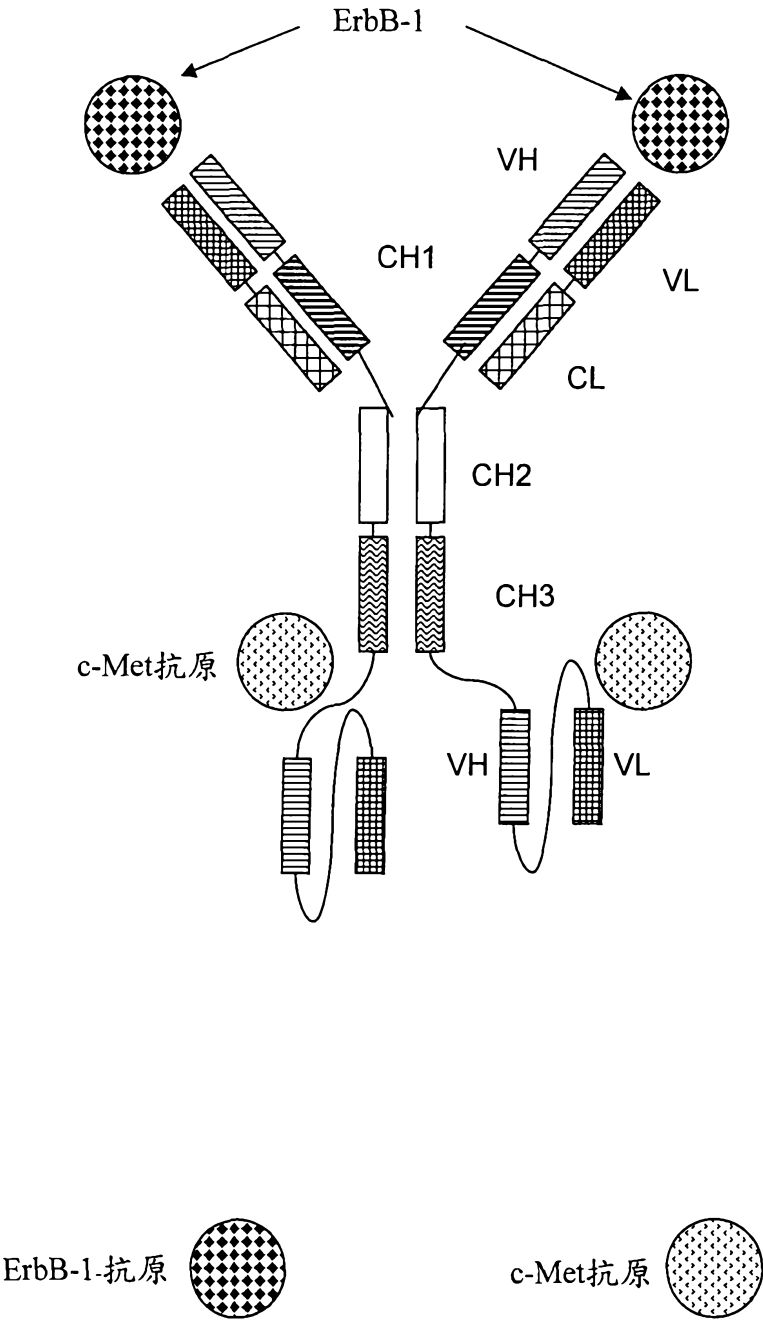


圖 6b

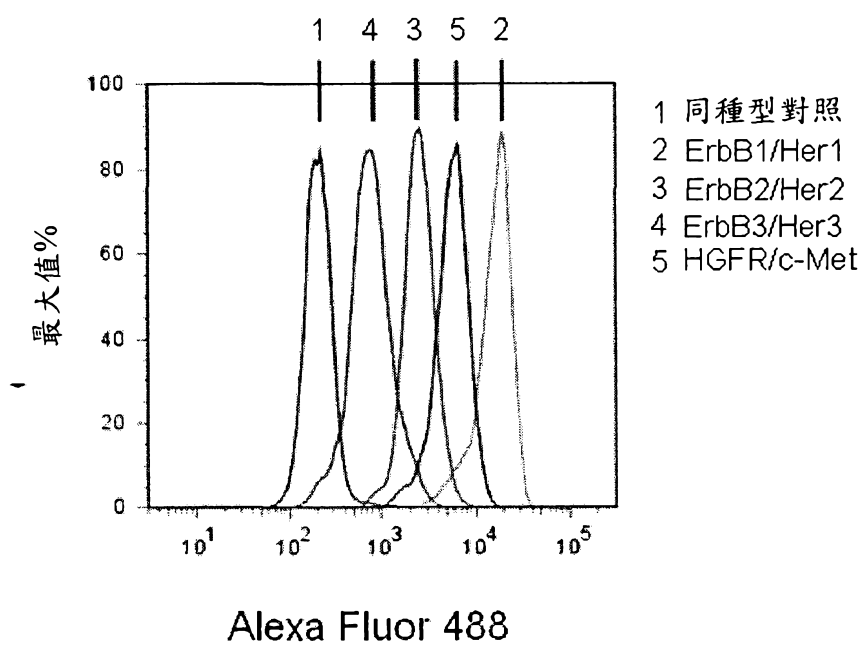


圖 7a

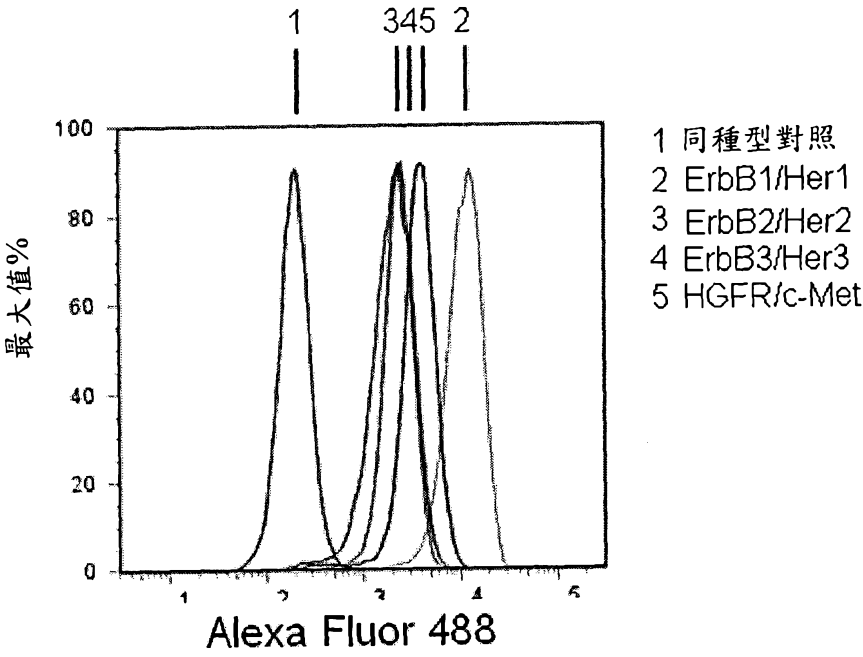


圖 7b

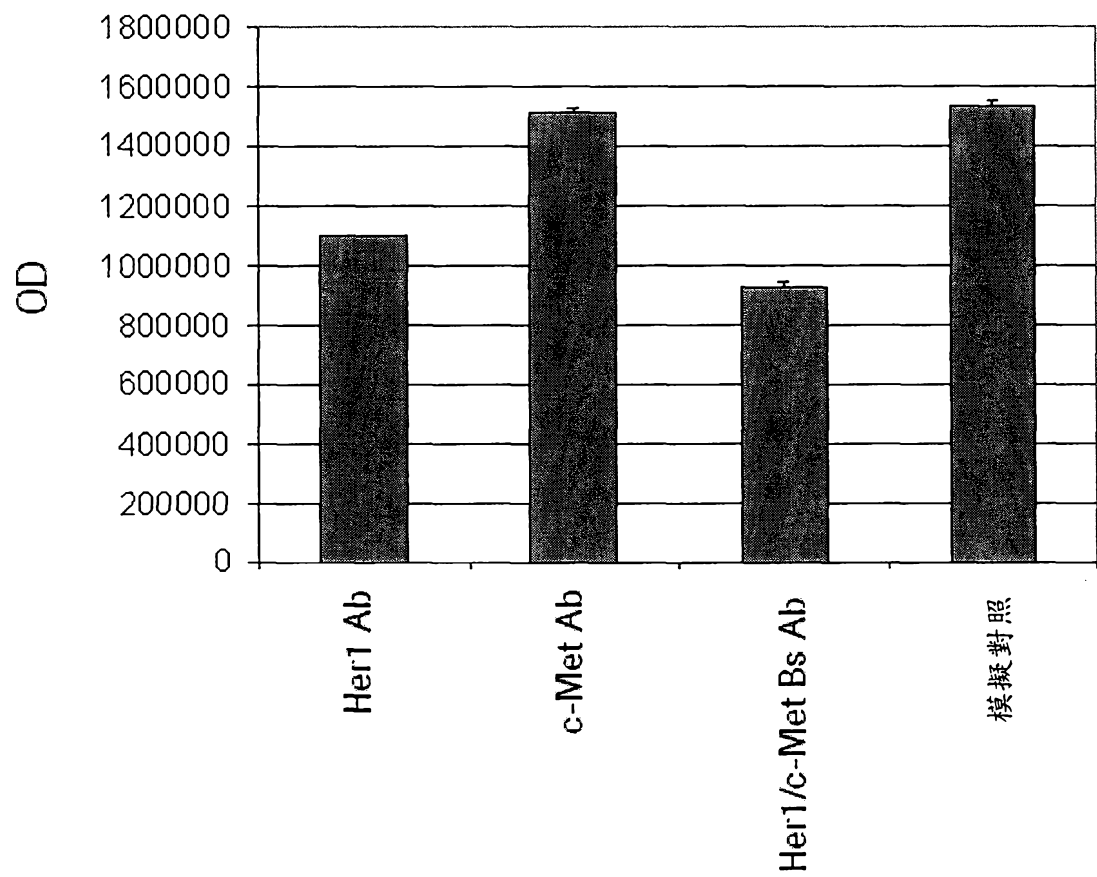


圖 8a

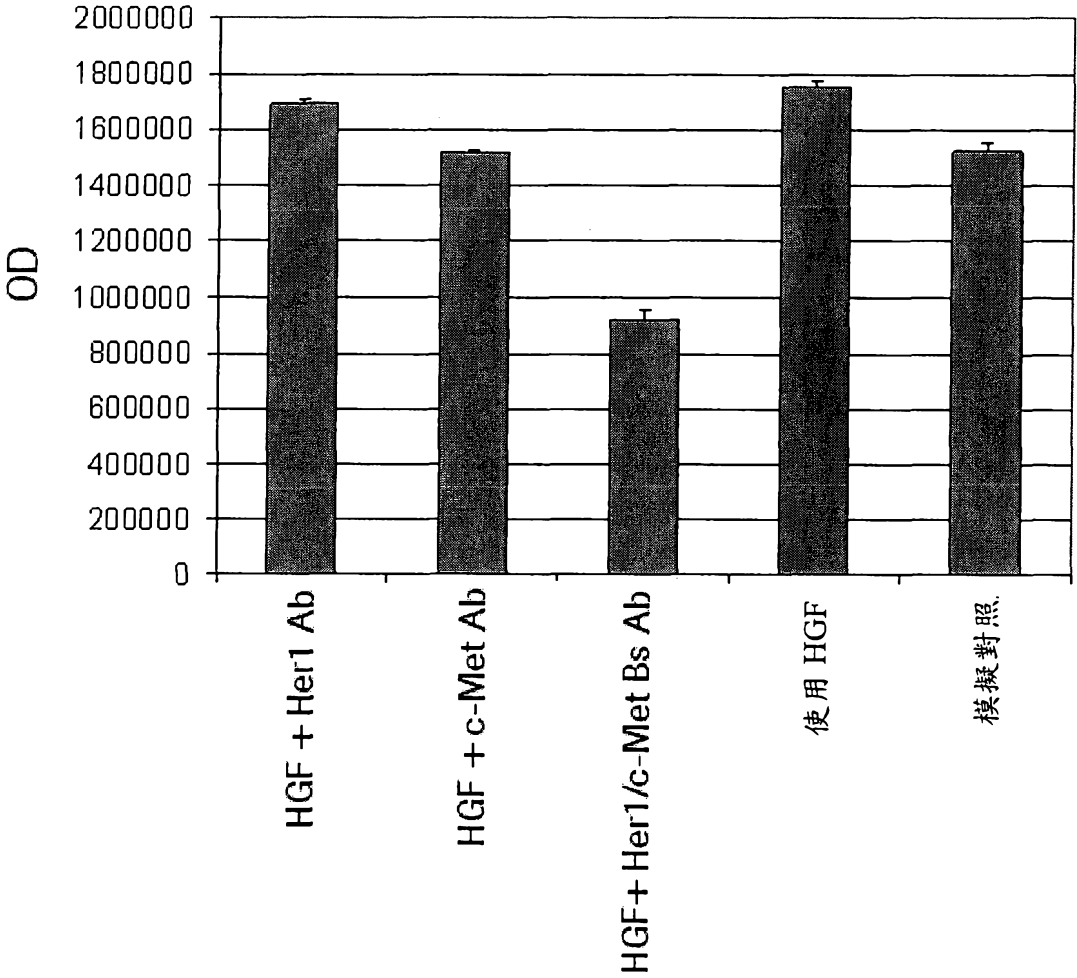


圖 8b

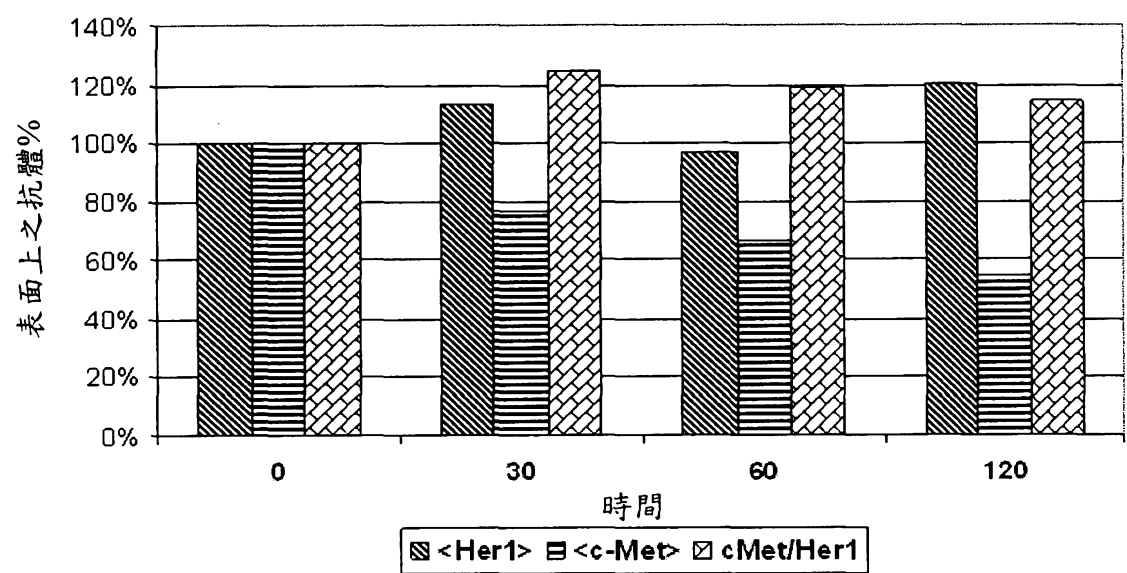


圖 9

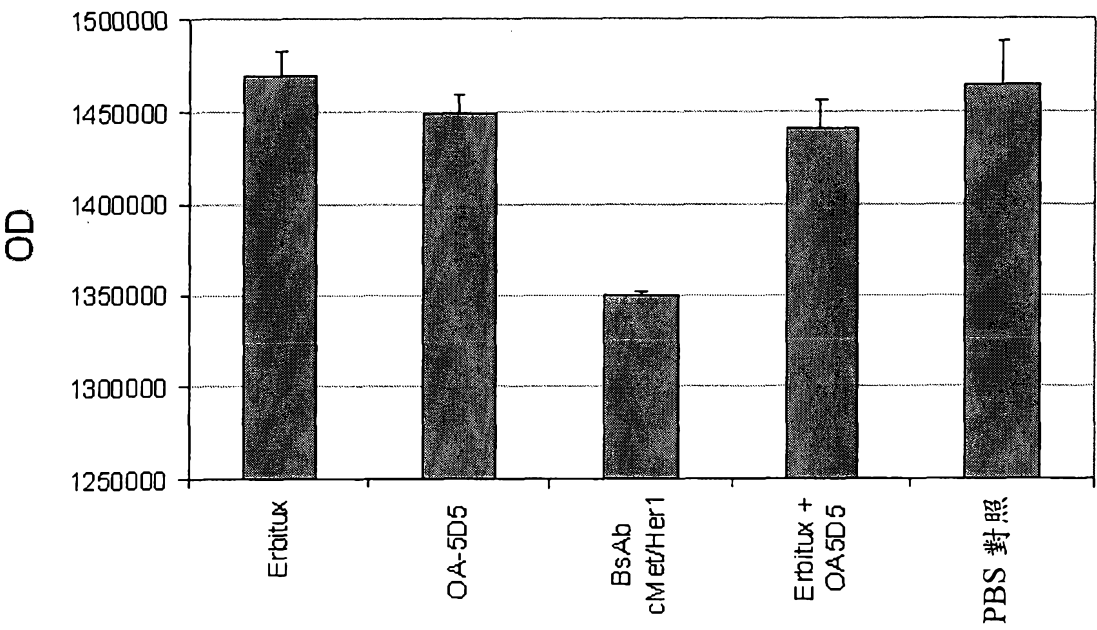


圖 10a

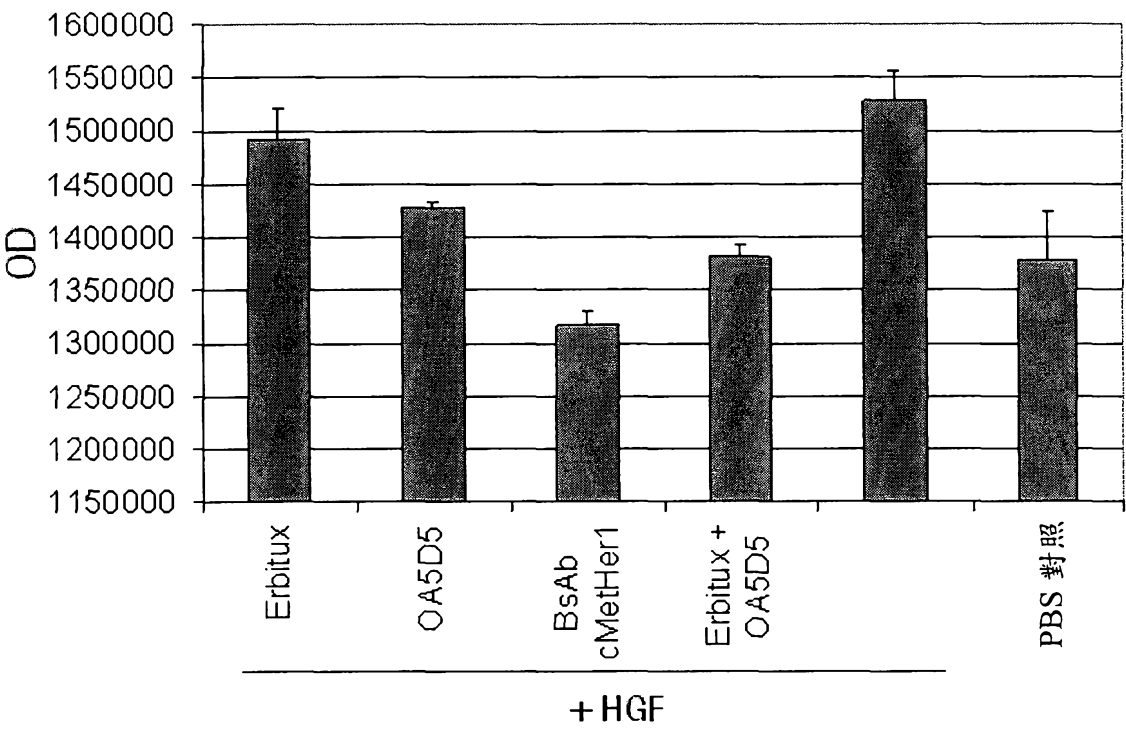


圖 10b

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (2a) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)