

(21)申請案號：099110598

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 04 月 06 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)*

*C07K16/30 (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：9 共 146 頁

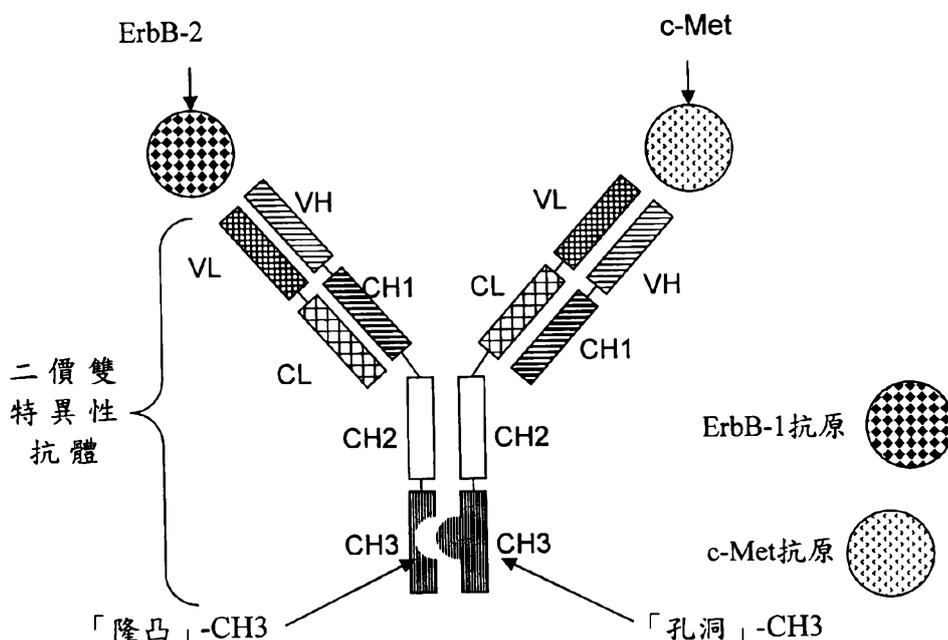
(54)名稱

雙特异性抗-ErbB-2 / 抗-c-Met 抗體

BISPECIFIC ANTI-ERBB-2/ANTI-C-MET ANTIBODIES

(57)摘要

本發明係關於針對人類 ErbB-2 及人類 C-met 之雙特异性抗體、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：099110598

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 04 月 06 日

(51)Int. Cl. : A61K39/395 (2006.01)

C07K16/30 (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：9 共 146 頁

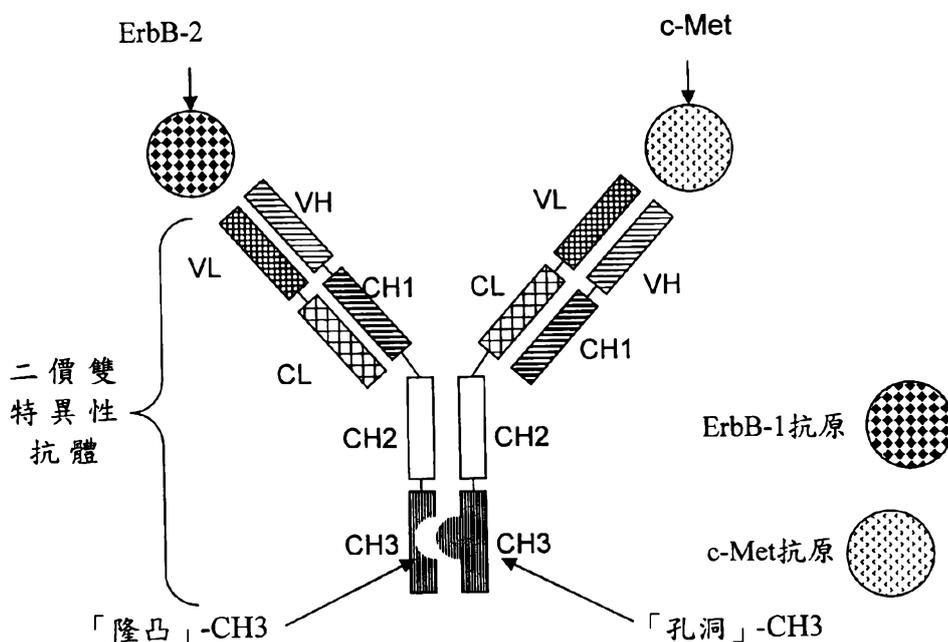
(54)名稱

雙特異性抗-ErbB-2 / 抗-c-Met 抗體

BISPECIFIC ANTI-ERBB-2/ANTI-C-MET ANTIBODIES

(57)摘要

本發明係關於針對人類 ErbB-2 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-2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-2及抗-ErbB-2抗體

ErbB蛋白家族之第二成員ErbB-2(亦稱作ERBB2、HER2；CD340、HER-2/neu、c-erb B2/neu蛋白、神經母細胞瘤/膠質母細胞瘤源癌基因同系物|v-erb-b2禽成紅細胞白血病病毒癌基因同系物2；SEQ ID NO:14)係自身不具有配體結合結構域且因此不能結合生長因子之蛋白質。然而，其與結合配體之其他EGF受體家族成員緊密結合而形成異二聚體，從而穩定配體結合並增強下游信號傳導途徑之激酶介導活化，例如彼等涉及促有絲分裂原活化之蛋白激酶及磷脂酰肌醇-3激酶者。已報導在亞型a中胺基酸654及655位(亞型b之624及625位)之等位基因變異，在此處顯示最常見等位基因Ile654/Ile655。已在多種癌症中報導此基

因之擴增及/或過表現，包括乳腺腫瘤及卵巢腫瘤。選擇性剪接產生若干種其他轉錄變異體，其中某些變異體編碼不同亞型且其他變異體尚未完全表徵。ErB-2最初鑒定為來自經化學處理大鼠之神經母細胞瘤的轉化基因之產物。neu原癌基因之活化形式得自所編碼蛋白跨膜區中之點突變(纈胺酸變為麩胺酸)(Semba, K.等人，PNAS 82 (1985) 6497-501；Coussens, L.等人，Science 230 (1985) 1132-9；Bargmann, C.I.等人，Nature 319 (1986) 226-30；Yamamoto, T.等人，Nature 319 (1986) 230-4)。

在乳癌及卵巢癌中觀察到neu之人類同系物之擴增且與預後不良有關(Slamon, D.J.等人，Science 235 (1987) 177-182；Slamon, D.J.等人，Science 244 (1989) 707-712；及US 4,968,603)。迄今為止，尚未報導人類腫瘤中存在與neu原癌基因中之點突變類似之點突變。在其他癌症中亦已觀察到HER2之過表現(通常但並非總是由基因擴增所致)，包括胃癌、子宮內膜癌、唾液腺癌、肺癌、腎癌、結腸癌、甲狀腺癌、胰腺癌及膀胱癌。尤其參見King, C.R.等人，Science 229 (1985) 974-976；Yokota, J.等人，Lancet 1 (1986) 765-767；Fukushige, S.等人，Mol Cell Biol. 6 (1986) 955-958；Guerin, M.等人，Oncogene Res. 3 (1988) 21-31；Cohen, J.A.等人，Oncogene, 4 (1989) 81-88；Yonemura, Y.等人，Cancer Res. 51 (1991) 1034-1038；Borst, M.P.等人，Gynecol. Oncol. 38 (1990) 364-366；Weiner, D.B.等人，Cancer Res. 50 (1990) 421-425；

Kern, J.A.等人, *Cancer Res.* 50 (1990) 5184-5187; Park, J.B.等人, *Cancer Res.* 49 (1989) 6605-6609; Zhau, H.E.等人, *Mol. Carcinog.* 3 (1990) 254-257; Aasland, R.等人, *Br. J. Cancer* 57 (1988) 358-363; Williams, T.M.等人, *Pathobiology* 59 (1991) 46-52; 及 McCann, A.等人, *Cancer* 65 (1990) 88-92。在前列腺癌中HER2可能過表現 (Gu, K.等人, *Cancer Lett.* 99 (1996) 185-189; Ross, J.S.等人, *Hum. Pathol.* 28 (1997) 827-833; Ross, J.S.等人, *Cancer* 79 (1997) 2162-2170; 及 Sadasivan, R.等人, *J. Urol.* 150 (1993) 126-131)。

已生成針對人類HER2蛋白產物之抗體, 例如參見 Hudziak, R.M.等人, *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 1165-1172, 其闡述一組抗-HER2抗體之生成, 該等抗體係使用人類乳腺腫瘤細胞系SK-BR-3來表徵。該組抗-HER2抗體尤其包括2C4(帕妥珠單抗 (pertuzumab))及4D5(曲妥珠單抗 (trastuzumab), Herceptin<sup>TM</sup>)抗體, 其係針對HER2細胞外結構域之不同表位。藉由在72小時後對單層實施結晶紫染色來測定SK-BR-3細胞在暴露於抗體後之相對細胞增殖。使用此分析以稱作4D5(曲妥珠單抗, Herceptin<sup>TM</sup>)之抗體獲得最大抑制, 其將細胞增殖抑制56%。在此分析中該組中之其他抗體以較低程度降低細胞增殖。另外發現抗體4D5可使HER2過表現乳腺腫瘤細胞系對TNF- $\alpha$  (US 5,677,171)之細胞毒性效應敏感。Hudziak, R.M.等人論述之HER2抗體進一步表徵於(例如)Fendly, B.M.等人,

Cancer Research 50 (1990) 1550-1558 中。

### **c-Met及抗-c-Met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:13)(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活化與預後不良有關, 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 $\alpha$ 及 $\beta$ 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)。

亦已研發出若干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、三鏈抗體或四鏈抗體、微小抗體、若干種單鏈形式(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))。

在WO 2007/024715中報導雙可變結構域免疫球蛋白，其為經改造多價多特異性結合蛋白。製備生物活性抗體二聚體之方法報導於US 6,897,044中。具有至少四個經由肽連接體彼此連接之可變結構域的多價F<sub>v</sub>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。包含三個或四個藉由連接結構彼此共價結合之Fab片段的三價或四價單特異性抗原結合蛋白報導於US 6,511,663中，該蛋白並非天然免疫球蛋白。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的混合物分離該兩種類型之多肽二聚體或優先合成該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。對抗原具有高親合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幹擾素 $\gamma$ 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-EGFR家族成員抗體及包含一或多個抗-EGFR家族成員抗體之雙特異性抗體。US 2004/0071696係關於可結合EGFR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-2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-2 及人類 c-Met 之雙特異性抗體，其包含特異性結合人類 ErbB-2 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 1 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-2 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-2 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-2 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-2 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-2 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-2 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-2 及人類 c-Met 之雙特異性抗體，其包含特異性結合人類 ErbB-2 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

該第一抗原結合位點在重鏈可變結構域中包含 SEQ ID NO: 15 之 CDR3H 區、SEQ ID NO: 16 之 CDR2H 區、及

SEQ ID NO:17之CDR1H區，且在輕鏈可變結構域中包含SEQ ID NO: 18之CDR3L區、SEQ ID NO:19之CDR2L區、及SEQ ID NO:20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: 21之CDR3H區、SEQ ID NO:22之CDR2H區、及SEQ ID NO: 23之CDR1H區，且在輕鏈可變結構域中包含SEQ ID NO: 24之CDR3L區、SEQ ID NO:25之CDR2L區、及SEQ ID NO:26之CDR1L區。

該雙特異性抗體之特徵較佳在於

該特異性結合ErbB-2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；且

該特異性結合c-Met之第二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。

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。

乳腺腫瘤經常表現較高含量之ErbB2且大部分ErbB2陽性腫瘤亦為c-Met陽性。多個先前研究顯示，乳腺腫瘤中之c-Met表現與預後不良有關(Kang, J., Y.等人，Cancer Res. 63 (2003) 1101-1105；Lengyel, E.等人，Int. J. Cancer 113 (2005) 678-82)。因此本發明雙特異性<ErbB-2-c-Met>抗體具有有價值之特性，例如抗腫瘤效能及癌細胞抑制性。

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ErbB2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ErbB2及c-Met之癌細胞上，本發明雙特異性<ErbB2-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-2及人類c-Met之雙特異性抗體，其包含特異性結合人類ErbB-2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1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-2及人類c-Met之雙特異性抗體，其包含特異性結合人類ErbB-2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-2 及人類 c-Met 之雙特異性抗體包含特異性結合人類 ErbB-2 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 1 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-2 及人類 c-Met 之雙特異性抗體包含特異性結合人類 ErbB-2 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 1 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-2 及人類 c-Met 之雙特異性抗體包含特異性結合人類 ErbB-2 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 1 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 1 小時後於流式細胞計數分析(FACS)中測量，如實例 11 中所述。在抗體暴露 1 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-2 及人類 c-Met 之雙特異性抗體，其包含特異性結合人類 ErbB-2 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 1 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 1 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 BsAB02 而言(-7% 內化設定為 0% 內化))：100

$\times$ (由單特異性二價親代 c-Met 抗體誘導之 c-Met 之內化% - 由雙特異性 ErbB-2/cMet 抗體誘導之 c-Met 之內化%)/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-2/cMet 抗體 BsAB02 顯示 c-Met 之內化為 -7%，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 37%。因此，雙特異性 ErbB-2/cMet 抗體 BsAB02 顯示 c-Met 之內化降低為  $100 \times (40 - 0)/40\% = 100\%$  (參見實例 11 中在 1 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)<sub>2</sub>。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, 2005 年 7 月 15 日中所述) 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-2 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-2

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-2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-2之結合肽。

ErbB-2(亦稱作ERBB2、HER2；CD340、HER-2/neu、c-erbB2/neu蛋白、神經母細胞瘤/膠質母細胞瘤源癌基因同系物；v-erb-b2禽成紅細胞白血病病毒癌基因同系物2；SEQ ID NO:14)係自身不具有配體結合結構域且因此不能結合生長因子之蛋白質。然而，其與結合配體之其他EGF受體家族成員緊密結合而形成異二聚體，從而穩定配體結合並增強下游信號傳導途徑之激酶介導活化，例如彼等涉及促有絲分裂原活化之蛋白激酶及磷脂酰肌醇-3激酶者。已報導在亞型a中胺基酸654及655位(亞型b之624及625位)之等位基因變異，在此處顯示最常見等位基因Ile654/Ile655。已在多種癌症中報導此基因之擴增及/或過表現，包括乳癌及卵巢腫瘤。選擇性剪接產生若干種其他轉錄變異體，其中某些變異體編碼不同亞型且其他變異體尚未完全表徵。ErB-2最初鑒定為來自經化學處理大鼠之神經母細胞瘤的轉化基因之產物。neu原癌基因之活化形式得自所編碼蛋白跨膜區中之點突變(纈胺酸變為麩胺酸)(Semba, K. 等人，PNAS 82 (1985) 6497-501；Coussens, L. 等人，Science 230 (1985) 1132-9；Bargmann, C.I. 等人，Nature 319 (1986) 226-30；Yamamoto, T. 等人，Nature 319 (1986) 230-4)。

特異性結合人類ErbB-2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-2抗體，例如2C4(帕妥珠單抗；帕妥珠單抗係鼠類抗-HER2抗體2C4之重組人類化形式且與相應製備方法一起闡述於WO 01/00245及WO 2006/007398中)及4D5(曲妥珠單抗(鼠類抗-HER2抗體4D5之重組人類化形式，Herceptin<sup>TM</sup>；曲妥珠單抗及其製備方法闡述於US 5,821,337中)抗體(Hudziak, R., M.等人，Mol. Cell. Biol. 9 (1989) 1165-1172；Fendly, B., M.等人，Cancer Research 50 (1990) 1550-1558)；或b) 藉由尤其使用人類ErbB-2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-2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:13)(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

後不良有關，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-2及人類c-Met之雙特異性抗體，其包含特異性結合人類ErbB-2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

該特異性結合ErbB-2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；且

該特異性結合c-Met之第二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。

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-2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-2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-2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；Brueggemann, 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呈重排形式之可變及恆定區。本發明之重組人類抗體已發生體內體細胞超突變。因此，重組抗體之VH及VL區之胺基酸序列雖然源自人類種系VH及VL序列且與之相關，但並非天然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 $\beta$ -片構形，CDRs可形成連接 $\beta$ -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」係指抗體在體外分析中與抗原(人類ErbB-2或人類c-Met)表位之結合，較佳在電漿共振分析(BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Sweden)中與純化野生型抗原之結合。結合親和力係以術語 $k_a$ (抗體/抗原複合物中抗體之結合速率常數)、 $k_D$ (解離常數)及 $K_D$  ( $k_D/k_a$ )定義。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 $10^{-9}$  M至 $10^{-13}$  mol/l。因此，本發明雙特異性<ErbB2-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 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 及 $\mu$ 。在所有五種抗體種類中可發現之輕鏈恆定區稱作 $\kappa$  (kappa)及 $\lambda$  (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 $\kappa$ 或 $\lambda$ 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(Fc $\gamma$ RIIIa)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 $\gamma$ 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  $\pm 3$  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 Brueggemann, 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 ( $\alpha$ -1,6- 或  $\alpha$ -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。藉由MALDI-TOF，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、WO2007/031875；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)<sub>2</sub>)。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-2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-2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-2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-2-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-2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-2-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-2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-2/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-2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-2 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-2 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-2/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氨酸(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(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-2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-2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-2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-2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-2 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-2 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-2 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-2 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-2 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-2 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-2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-2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-2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



為  $(GxS)_n$  或  $(GxS)_nG_m$ ，其中  $G$ =甘胺酸， $S$ =絲胺酸，且  $(x=3, n=6, 7$  或  $8, \text{ 且 } m=0, 1, 2$  或  $3)$  或  $(x=4, n=5, 6$  或  $7$  且  $m=0, 1, 2$  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，該連接體系 $(G_xS)_n$ ，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，該連接體系 $(G_4S)_6G_2$ 。

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：

- a) 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-連接體系 $(G_xS)_n$ ，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-連接體系 $(G_4S)_3$ 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。

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) 151-160；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)中或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 $\beta$ -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的子代。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、抗細菌及抗真菌劑、等滲劑及吸收延遲劑、及生理上相容之類似劑。較佳地，載劑適合靜脈內、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投與。熟習此項技術者應瞭解，投與路徑及/或方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，可能需要用某種材料塗佈該化合物或該化合物與該材料共投與以防止該化合物失活。舉例而言，該化合物可於適宜載劑例如脂質體或稀釋劑中投與個體。醫藥上可接受之稀釋劑包括鹽水及水性緩衝溶液。醫藥載劑包括滅菌水性溶液或分散液及用於臨時製備滅菌可注射溶液或分散液之滅菌粉劑。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」意指經腸及局部投與以外的投與方式，通常藉由注射投與，包括(但不限於)靜脈內、肌內、動脈內、鞘內、囊內、眼眶內、心內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蜘蛛膜下、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、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, 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-2 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-2>曲妥珠單抗

- SEQ ID NO:2 輕鏈可變結構域<ErbB-2>曲妥珠單抗
- SEQ ID NO:3 重鏈可變結構域<c-Met> Mab 5D5
- SEQ ID NO:4 輕鏈可變結構域<c-Met> Mab 5D5
- SEQ ID NO:5 重鏈<c-Met> Mab 5D5
- SEQ ID NO:6 輕鏈<c-Met> Mab 5D5
- SEQ ID NO:7 重鏈<c-Met> Fab 5D5
- SEQ ID NO:8 輕鏈<c-Met> Fab 5D5
- SEQ ID NO:9 人類IgG1之重鏈恆定區
- SEQ ID NO:10 人類IgG3之重鏈恆定區
- SEQ ID NO:11 人類輕鏈κ恆定區
- SEQ ID NO:12 人類輕鏈λ恆定區
- SEQ ID NO:13 人類c-Met
- SEQ ID NO:14 人類ErbB-2
- SEQ ID NO:15 重鏈CDR3H, <ErbB-2>曲妥珠單抗
- SEQ ID NO:16 重鏈CDR2H, <ErbB-2>曲妥珠單抗
- SEQ ID NO:17 重鏈CDR1H, <ErbB-2>曲妥珠單抗
- SEQ ID NO:18 輕鏈CDR3L, <ErbB-2>曲妥珠單抗
- SEQ ID NO:19 輕鏈CDR2L, <ErbB-2>曲妥珠單抗
- SEQ ID NO:20 輕鏈CDR1L, <ErbB-2>曲妥珠單抗
- SEQ ID NO:21 重鏈CDR3H, <c-Met> Mab 5D5
- SEQ ID NO:22 重鏈CDR2H, <c-Met> Mab 5D5
- SEQ ID NO:23 重鏈CDR1H, <c-Met> Mab 5D5
- SEQ ID NO:24 輕鏈CDR3L, <c-Met> Mab 5D5
- SEQ ID NO:25 輕鏈CDR2L, <c-Met> Mab 5D5

SEQ ID NO:26 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-2> 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-2> 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-2> 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 (MGWSCILFLVATATGVHS) 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，
- 在大腸桿菌中賦予氯苄西林抗性之  $\beta$ -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 1-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% CO<sub>2</sub>下培養懸浮FreeStyle™ 293-F細胞，且在轉染當天將細胞以1-2x10<sup>6</sup>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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、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 $5 \times 10^5$ /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  $\text{ng}/\text{mL}$ 之終濃度添加HGF。用含有1  $\text{mM}$  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  $\mu\text{L}$ 溶解緩衝液(50  $\text{mM}$  Tris-Cl pH 7.5、150  $\text{mM}$  NaCl、1% NP40、0.5% DOC、抑肽酶、0.5  $\text{mM}$  PMSF、1  $\text{mM}$  鈳酸鈉)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  $\mu\text{g}$ 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。

### ErbB2/Her2磷酸化分析

在添加抗體的前一天以  $5 \times 10^5$ /孔將 Sk-Br3 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  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  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  $\mu\text{L}$  溶解緩衝液 (50 mM Tris-Cl pH 7.5、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  $\mu\text{g}$  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 Y1221/22 之磷酸化特異性 Her2 抗體 (Cell Signaling, 2243) 進行顯影。用結合未磷酸化 Her2 之抗體 (Cell Signaling, 2165) 再次探測免疫印跡。

#### AKT 磷酸化分析

在添加抗體的前一天以  $5 \times 10^5$ /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  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  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 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  $\mu\text{L}$  溶解緩衝液 (50 mM Tris-Cl pH 7.5、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  $\mu\text{g}$ 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 $5 \times 10^5$ /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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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  $\text{ng}/\text{mL}$  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  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{g}$ 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(擴散分析)

在化合物處理前一天以 200  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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。

#### HUVEC 增殖分析

將 HUVEC 細胞 (Promocell, C-12200) 接種於經膠原塗佈之 96 孔板中之含有 0.5% FCS 之 EBM-2 培養基 (Promocell, C-22211) 中。第二天將對照抗體或雙特異性抗體之一系列稀釋液添加至細胞中。在培育 30 min 後添加 25 ng/mL HGF (R&D, 294-HGN) 並將細胞再培育 72 h，之後根據製造商建議藉由 cell titer glow 分析 (Promega, G7571/2/3) 以 ATP 含量形式測定細胞增殖。

#### Sk-Br3 增殖分析

a) 對於增殖研究，以 10000 細胞/孔在 96 孔細胞培養板中之低血清培養基 (RPMI 1640+4% FCS) 中接種細胞。第二天添加親代 Her2 或 c-Met 抗體以及雙特異性抗體並將細胞再培養 48 h，之後藉由 cell titer glow 分析 (Promega) 測定作為

細胞增殖指示劑之ATP。

b) 對於增殖研究，在HGF存在下，以10000細胞/孔在96孔細胞培養板中之低血清培養基(RPMI 1640+4% FCS)中接種細胞。第二天添加親代Her2或c-Met抗體以及雙特異性抗體以及25 ng/mL HGF (R&D, 294-HGN)並將細胞再培養48 h，之後藉由cell titer glow分析(Promega)測定作為細胞增殖指示劑之ATP。

### 流式細胞計數分析(FACS)

#### a) 結合分析

分離並計數C-met及ErbB-2表現細胞。以 $1.5 \times 10^5$ /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  $\mu$ L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  $\mu$ L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  $\mu$ 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術譜圖。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  $5 \times 10^5$  個細胞置於埃彭道夫管中之 50  $\mu\text{L}$  完全培養基中且與 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之各雙特異性抗體在  $37^\circ\text{C}$  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,  $4^\circ\text{C}$ , 5 min)，用 PBS+2% FCS 洗滌且與在含有 2% FCS 之 PBS 中稀釋之 50  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  Wst-1 試劑 (Roche, 11644807001) 添加至 200  $\mu\text{L}$  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 <ErbB2-c-Met> 抗體之設計

以下所表現及純化之所有雙特異性 <ErbB2-c-Met> 抗體皆包含 IgG1 亞類之恆定區或至少 Fc 部分 (SEQ ID NO: 9 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 <ErbB2-c-Met> 抗體，其係基於全長 ErbB-2 抗體 (曲妥珠單抗) 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。曲妥珠單抗及 cMet 5D5 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 特徵：	BsAB02
隆凸-孔洞結合突變	S354C:T366W/ Y349'C:T366'S: L368'A:Y407'V
全長抗體骨架，源自：	曲妥珠單抗
單鏈 Fab 片段，源自：	cMet 5D5 (人類化)
附接至抗體之 scFab 之位置	C 端隆凸重鏈
連接體 (ScFab)	(G <sub>4</sub> S) <sub>5</sub> GG
肽連接物	(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub>
ScFab 二硫鍵 VH44/ VL100 穩定	-

#### 實例 1：

#### 雙特異性抗體與 ErbB-2 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  $\mu\text{g/ml}$  抗 Fc $\gamma$  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 $^{\circ}\text{C}$  下以 5  $\mu\text{L/min}$  之流速注入單或雙特異性 ErbB2/cMet 抗體且隨後以 30  $\mu\text{L/min}$  注入人類 ErbB2 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 2: 如藉由表面電漿共振所測定之雙特異性抗體結合 ErbB2/cMet 之結合特徵。

結合特異性		BsAB02 [Mol]
c-Met	ka (1/Ms)	8,40E+03
	kd (1/s)	6,60E-05
	KD (M)	8,20E-09
		-
ErbB-2	ka (1/Ms)	9,50E+04
	kd (1/s)	<1E-06
	KD (M)	<1E-10

實例 2:

雙特異性 HER2/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, 用雙特異性抗體或對照抗體處理 A549 肺癌細胞或 HT29 結直腸癌細胞, 之後暴露於 HGF 中。然後溶解細胞並檢驗 c-Met 受體之磷酸化。兩種細胞系皆可經 HGF 刺激, 此可藉由免疫印跡中磷酸化-c-Met 特異性區帶之出現來觀察。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Her2/cMet雙特異性抗體處理後分析Her2受體磷酸化**

為確認雙特異性Her2/cMet抗體中Her2結合部分之功能性，將Sk-Br3與親代EGFR抗體或雙特異性Her2/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NRG刺激可誘導ErbB2/Her2受體磷酸化之細胞。

#### 實例4：

**在用Her2/cMet雙特異性抗體處理後分析PI3K信號傳導**

Her2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Her2及c-Met受體，可監測AKT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NRG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ErbB2/Her2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Her2/cMet雙特異性抗體處理後分析MAPK信號傳導**

c-Met受體可經由MAPK途徑傳導信號。為證實靶向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，將未經刺激細胞或經HGF處理之細胞與非特異性親代對照抗體或雙特異性抗體並行培育。或者，亦可評價具有自分泌HGF環之細胞，該HGF環可活化c-Met信號傳導。

#### 實例6：

#### 雙特異性Her2/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Her2/c-Met抗體對Sk-Br3增殖之抑制

a) Sk-Br3細胞顯示Her2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。添加親代Her2-結合抗體或雙特異性Her2/c-Met抗體可導致增值降低，而c-Met-結合抗體對增殖僅具有較小作用。

b) 為模擬出現活性Her2-c-Met受體信號傳導網絡之情景，根據所述在經HGF調整之培養基存在下實施增殖分析。在此環境中，添加任一種親代抗體對細胞增殖僅具有較小作用，如藉由cell titer glow分析所測定；而添加雙特異性抗體或親代抗體之組合可導致細胞增殖降低。

#### 實例8：

### 分析在癌細胞系 DU145 中雙特異性 Her2/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 Her2/cMet 抗體抑制 HGF 誘導之細胞-細胞擴散。

#### 實例 9：

### 雙特異性 HER2/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 之促有絲分裂效應。將 HGF 添加至 HUVEC 可使增殖增強兩倍。以與雙特異性抗體相同之濃度範圍添加人類 IgG 對照抗體對細胞增殖無影響，而 5D5 Fab 片段可抑制 HGF 誘導增殖。

#### 實例 10：

### 分析在癌細胞系 A431 中雙特異性 HER2/c-Met 抗體對 HGF 誘導細胞-細胞擴散(擴散)之抑制

HGF 誘導擴散包括細胞之形態改變，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。實時細胞分析儀(Roche)測量給定細胞培養孔之阻抗且由此可間接監測細胞形態及增殖之改變。將 HGF 添加至 A431 及 A549 細胞導致阻抗改變，監測該阻抗且其隨時間而變化。

#### 實例 11：

在表現 ErbB-2 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Her2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°C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Her2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8中。經由各抗體之內化來測量各受體之內化%(在圖8中，雙特異性<ErbB2-cMet>抗體BsAB02稱作cMet/HER2，親代單特異性二價抗體稱作<HER2>及<cMet>)。

表：在1小時後在OVCAR-8細胞上，使用FACS分析測量之雙特異性Her2/ cMet抗體與親代單特異性二價c-Met及HER2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1小時後測量， 在OVCAR-8細胞表面上之 c-Met受體%	在1小時後在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	67	33
B) 雙特異性<ErbB2-cMet> 抗體		
BsAB02	107	-7

### 實例 12：

#### 雙特異性 Her2/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 Her2/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  $1.5 \times 10^7$  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% CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ l之水及469  $\mu$ l 1M  $\text{CaCl}_2$ 溶液來製備DNA、 $\text{CaCl}_2$ 與水之溶液。向此溶液中添加938  $\mu$ l 50 mM HEPES、280 mM NaCl、1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 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°C及5%  $\text{CO}_2$ 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 x 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  $\mu$ m濾器)且以0.01% w/v之終濃度添加疊氮化鈉，並保持在4°C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 13：****雙特異性 Her2/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°C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 µl，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 µL 1 M NaOH、20 µL純水(例如得自Baker之HPLC梯度級，編號4218)、3 µL 30% v/v乙酸及20 µl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 µg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 µL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 µL 10%及2.0 µL 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 µL經合併洗脫液與1.6 µL 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 14：****在用 Her2/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  $\mu\text{m}$  管孔之遷移細胞數。

**實例 15：****雙特異性 Her2/c-Met 抗體之體外 ADCC**

本發明 Her2/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。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 Her2 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-內醯胺基-L-麩胺醯胺+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  $\mu$ l DMSO中，可用於標記存於5 ml培養基中之 $5 \times 10^6$ 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 $3 \times 10^5$  /ml。

同時，根據製造商方案(洗滌步驟：1x400 g及2x350 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 $1.5 \times 10^7$  /ml。

將100  $\mu$ l經鈣黃綠素染色之靶細胞平鋪於圓底96孔板中，添加50  $\mu$ l經稀釋抗體及50  $\mu$ l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  $\mu$ l來自各孔之上清液與100  $\mu$ l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16

#### 雙特異性Her2/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KPL4模型模擬c-Met之旁分泌活化環。KPL4在細胞表面上表現一定量之c-Met以及Her2。將KPL4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KPL4及Mrc-5細胞，且將 $1 \times 10^7$ 個KPL4細胞及 $1 \times 10^6$ 個Mrc-5細胞移植入SCID米色鼠中。在出現腫瘤且尺寸到達 $100-150 \text{ mm}^3$ 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17

#### 雙特異性Her1/c-Met抗體對OVCAR-8增殖之抑制

a) 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)表現顯著細胞表面含量之Her2及c-Met，如藉由流式細胞計數術獨立地確認(參見圖7b)。在48小時後，在CellTiterGlow™分析中測量雙特異性Her2/c-Met抗體對OVCAR-8細胞增殖之抑制。結果展示於圖9a中。對照為PBS緩衝液(磷酸鹽緩衝鹽水)。

測量顯示HER2抗體曲妥珠單抗之6%抑制(與設定為0%抑制之緩衝液對照相比)。雙特異性Her2/c-Met BsAB02 (BsAb)抗體對癌症細胞增殖產生更顯著之抑制(11%抑制)。單價c-Met抗體單臂5D5 (OA5D5)對增殖未顯示任何效應。HER2抗體曲妥珠單抗及單價c-Met抗體單臂5D5 (OA5D5)之組合產生顯著性較低之降低(6%抑制)。

b) OVCAR-8細胞依賴於HER2信號傳導。為模擬出現活性HER-c-Met-受體信號傳導網絡之情景，根據a)中所述在經HGF調節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9b中。

測量顯示Her2抗體曲妥珠單抗(2%抑制)及單價c-Met抗體單臂5D5 (OA5D5)(3%抑制)與經HGF處理之細胞相比(設定為0%抑制)幾乎無抑制效應。雙特異性Her2/c-Met抗體BsAB02 (BsAb)(17%抑制)顯示可顯著抑制OvcAR-8細胞之癌症細胞增殖。Her2抗體曲妥珠單抗與單價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-2/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-2 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-2/c-Met> 抗體之示意圖，其包含特異性結合 ErbB-2 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 (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)；

**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-2 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-2 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-2/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-2/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 8 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 9a 在 OVCAR-8 癌細胞中之增殖分析。與親代單特異性 <HER2> 及 <c-Met> 抗體相比，本發明雙特異性 <HER2/c-Met> 抗體 BsAB02 (BsAb) 對癌症細胞增殖之抑制。

**圖 9b** 在癌細胞系 OvcAR-8 中在 HGF 存在下之增殖分析 - 與親代單特異性 <HER2> 及 <c-Met> 抗體相比，本發明雙特異性 <HER2/c-Met> 抗體 BsAB02 (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> 雙特異性抗-ErbB-2/抗-c-Met 抗體

<130> 26575 FT

<140> 099110598

<141> 2010-04-06

<150> EP 09005109.5

<151> 2009-04-07

<160> 26

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重鏈可變結構域<ErbB-2>曲妥珠單抗(trastuzumab)

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 2  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 輕鏈可變結構域<ErbB-2>曲妥珠單抗

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重鏈可變結構域<c-Met>Mab 5D5

&lt;400&gt; 3

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

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 輕鏈可變結構域&lt;c-Met&gt;Mab 5D5

&lt;400&gt; 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 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> 5  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链 cMet 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 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> 6  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 輕鏈 cMet 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 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

<210> 7  
 <211> 226  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重鏈 cMet Fab 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  
 225

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

<220>  
 <223> 輕鏈 cMet Fab 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> 330  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 9

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



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> 11  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 11

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> 12  
 <211> 104

<212> PRT  
<213> 智人

<400> 12

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> 13  
<211> 1390  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 13

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



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> 14  
 <211> 1255  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 14

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu  
 1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys  
 20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His  
 35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr  
 50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val  
 65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu



Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln  
305 310 315 320

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys  
325 330 335

Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu  
340 345 350

Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys  
355 360 365

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp  
370 375 380

Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe  
385 390 395 400

Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro  
405 410 415

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg  
420 425 430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu  
435 440 445

Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly  
450 455 460

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val  
465 470 475 480

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr  
485 490 495

Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His  
500 505 510

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys  
515 520 525

Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys  
530 535 540

Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys  
545 550 555 560

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys  
565 570 575

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp  
580 585 590

Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu  
595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln  
610 615 620

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys  
625 630 635 640

Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser  
645 650 655

Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly  
660 665 670

Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg  
675 680 685

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly  
690 695 700

Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu  
705 710 715 720

Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys  
725 730 735

Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile  
740 745 750

Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu  
755 760 765

Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg  
770 775 780

Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu  
785 790 795 800

Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg  
805 810 815

Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly  
820 825 830

Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala  
835 840 845

Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe  
850 855 860

Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp  
865 870 875 880

Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg  
885 890 895

Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val  
900 905 910

Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala  
915 920 925

Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro

930		935		940
Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met				
945		950		955
				960
Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe				
		965		970
				975
Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu				
		980		985
				990
Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu				
		995		1000
				1005
Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr				
		1010		1015
				1020
Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly				
		1025		1030
				1035
Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg				
		1040		1045
				1050
Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu				
		1055		1060
				1065
Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser				
		1070		1075
				1080
Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu				
		1085		1090
				1095
Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser				
		1100		1105
				1110
Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val				
		1115		1120
				1125
Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro				
		1130		1135
				1140

Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro  
 1145 1150 1155

Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu  
 1160 1165 1170

Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly  
 1175 1180 1185

Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala  
 1190 1195 1200

Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp  
 1205 1210 1215

Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro  
 1220 1225 1230

Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr  
 1235 1240 1245

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val  
 1250 1255

<210> 15  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重鏈 CDR3H, <ErbB-2> 曲妥珠單抗

<400> 15

Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 16  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工的



<210> 20  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 輕鏈 CDR1L, <ErbB-2>曲妥珠單抗

<400> 20

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala  
1 5 10

<210> 21  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 重鏈 CDR3H, <c-Met>Mab 5D5

<400> 21

Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr  
1 5 10

<210> 22  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 重鏈 CDR2H, <c-Met>Mab 5D5

<400> 22

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

Asp

<210> 23  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>

<223> 重鏈 CDR1H, <c-Met>Mab 5D5

<400> 23

Ser Tyr Trp Leu His  
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 輕鏈 CDR3H, <c-Met>Mab 5D5

<400> 24

Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr  
1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 輕鏈 CDR2H, <c-Met>Mab 5D5

<400> 25

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 輕鏈 CDR1H, <c-Met>Mab 5D5

<400> 26

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：99110598

※申請日：99.4.6

※IPC 分類：C07K; A61K<sup>39/395</sup> (2006.01)

C07K<sup>16/30</sup> (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

雙特异性抗-ErbB-2 /抗-c-Met抗體

A61P<sup>35/00</sup> (2006.01)

BISPECIFIC ANTI-ErbB-2 / ANTI-c-Met ANTIBODIES

二、中文發明摘要：

本發明係關於針對人類 ErbB-2 及人類 C-met 之雙特异性抗體、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-2 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-2 及人類 c-Met，其包含特異性結合人類 ErbB-2 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 1 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-2 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-2 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-2 及人類 C-met，其包含特異性結合人類 ErbB-2 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  
該第一抗原結合位點在重鏈可變結構域中包含 SEQ ID NO: 15 之 CDR3H 區、SEQ ID NO: 16 之 CDR2H 區、及 SEQ ID NO: 17 之 CDR1H 區，且在輕鏈可變結構域中包含

SEQ ID NO: 18之CDR3L區、SEQ ID NO:19之CDR2L區、及SEQ ID NO:20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: 21之CDR3H區、SEQ ID NO:22之CDR2H區、及SEQ ID NO: 23之CDR1H區，且在輕鏈可變結構域中包含SEQ ID NO: 24之CDR3L區、SEQ ID NO:25之CDR2L區、及SEQ ID NO:26之CDR1L區。

5. 如請求項4之雙特異性抗體，其特徵在於

該特異性結合ErbB-2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: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。

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：

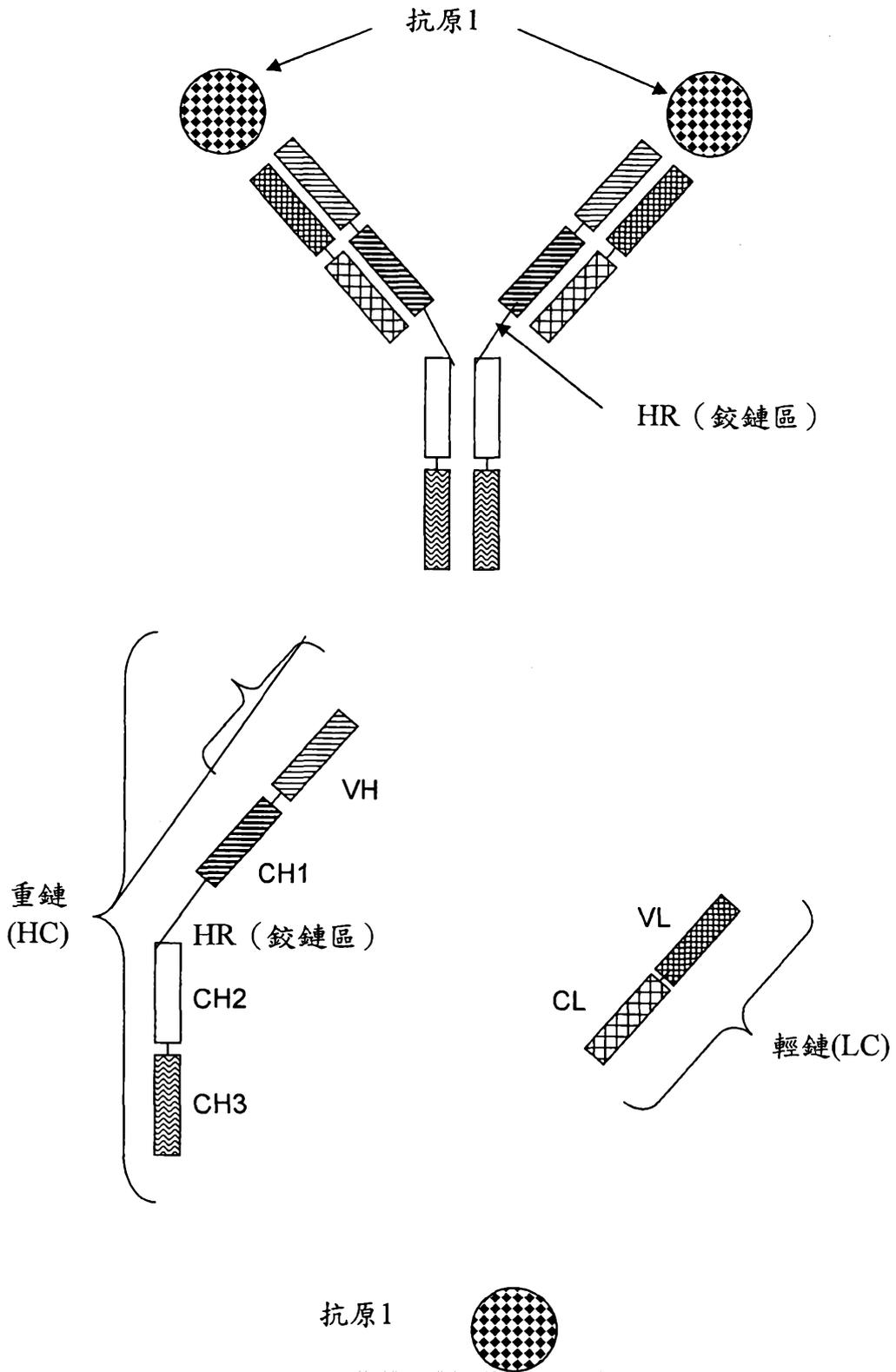


圖 1

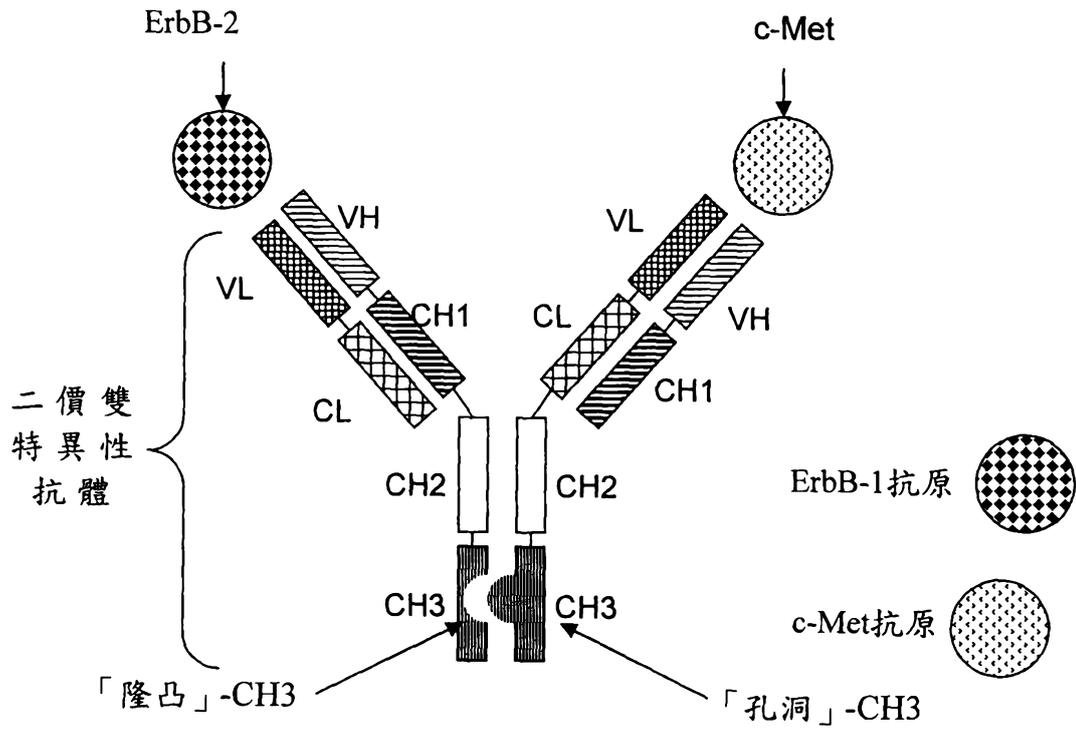


圖2a

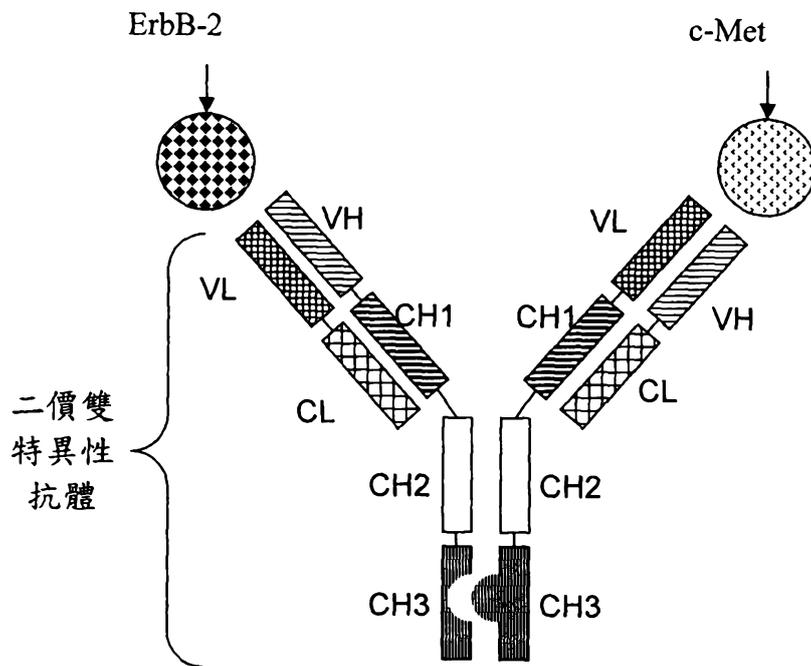


圖2b

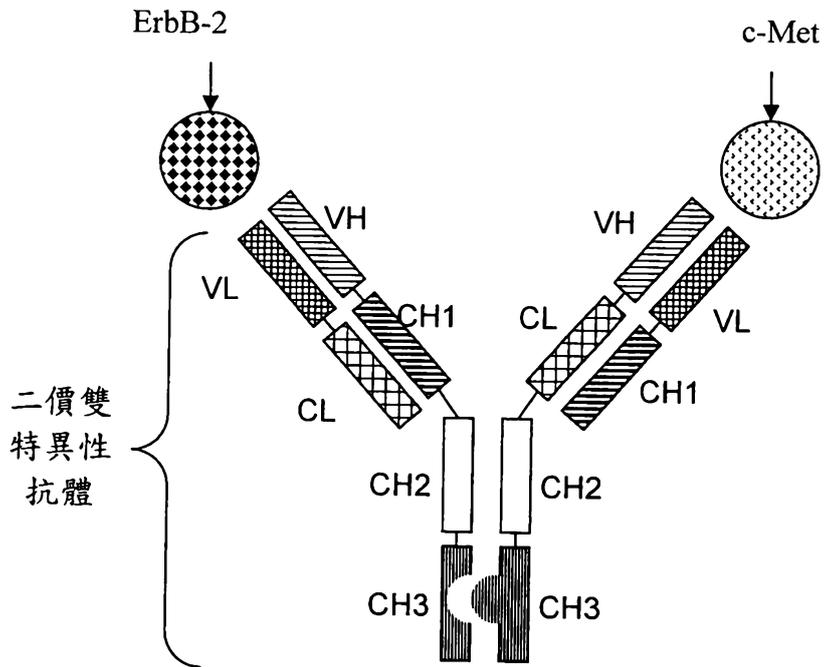


圖2c

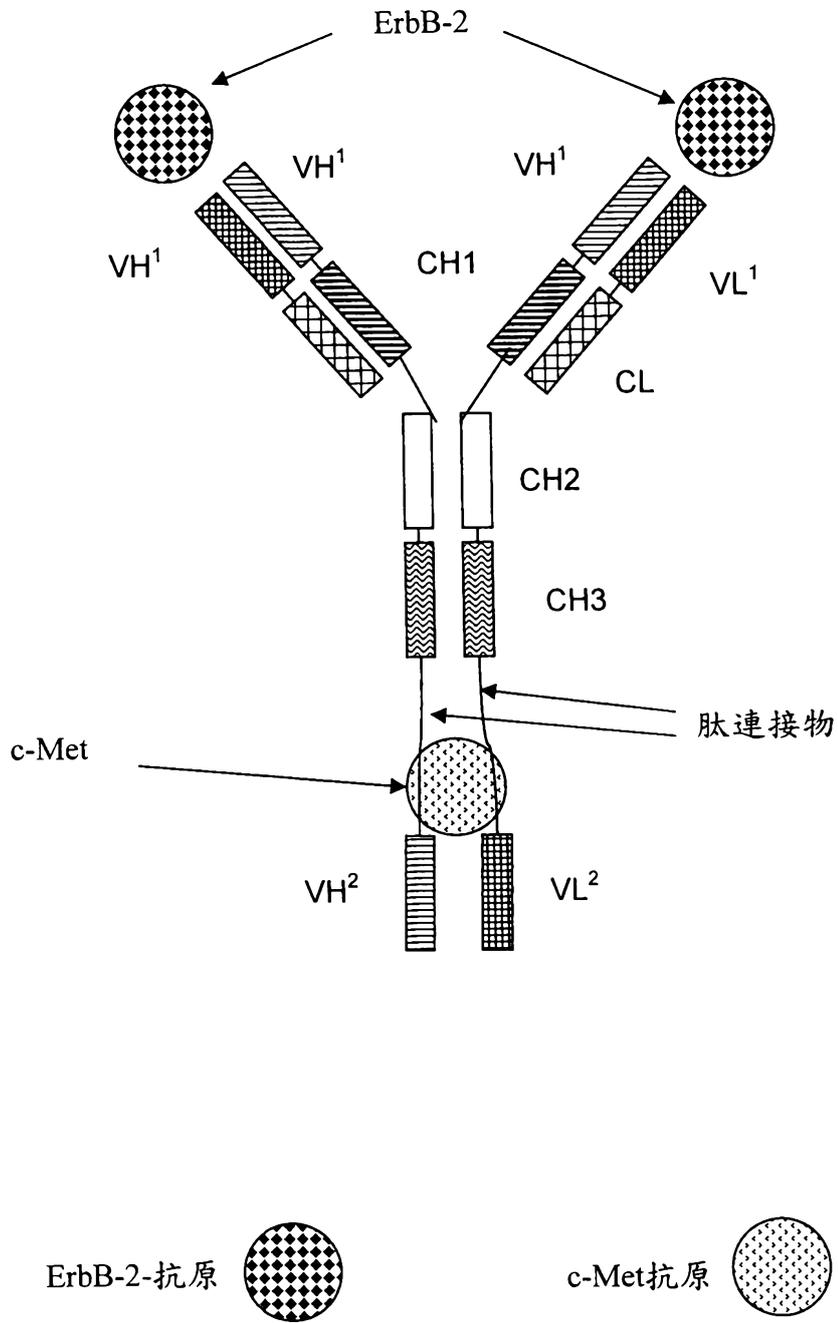


圖3a

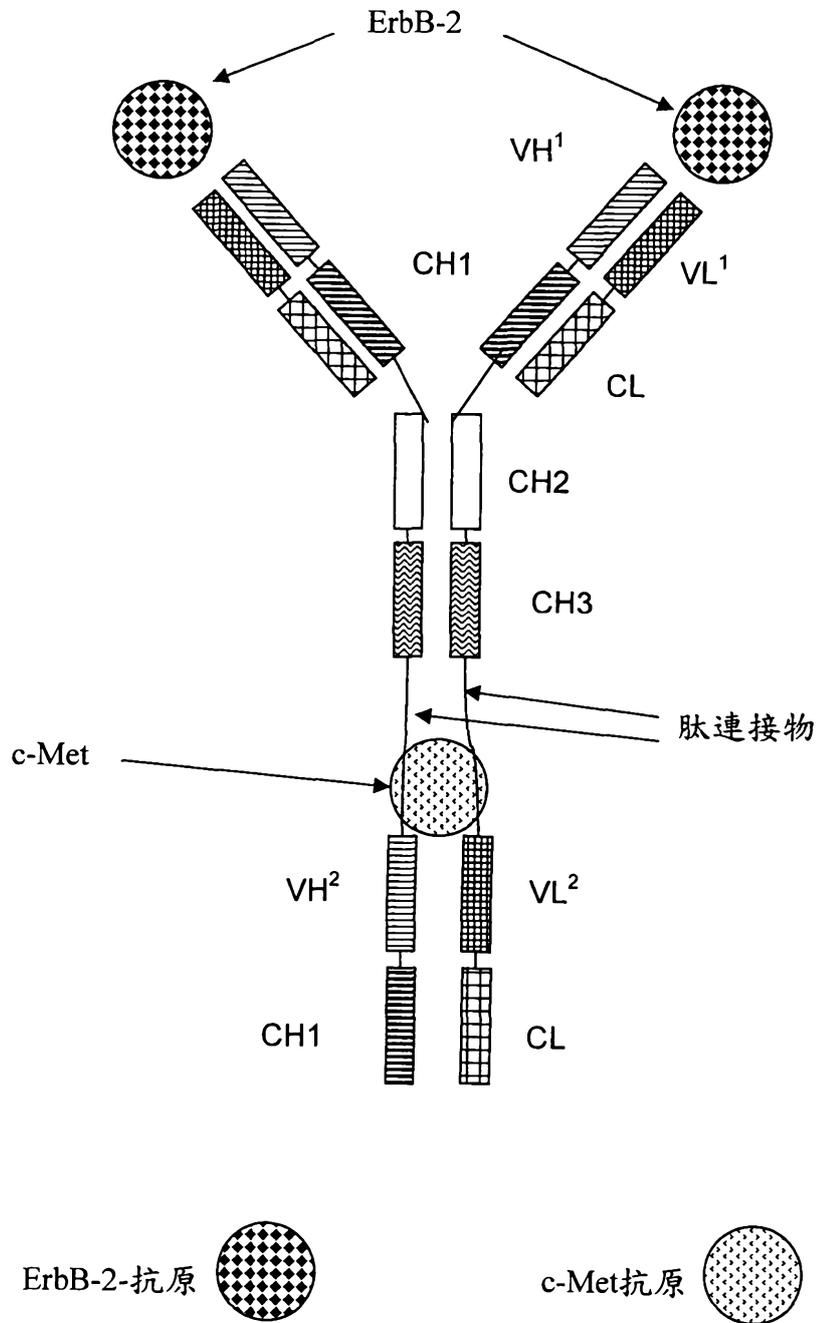


圖3b

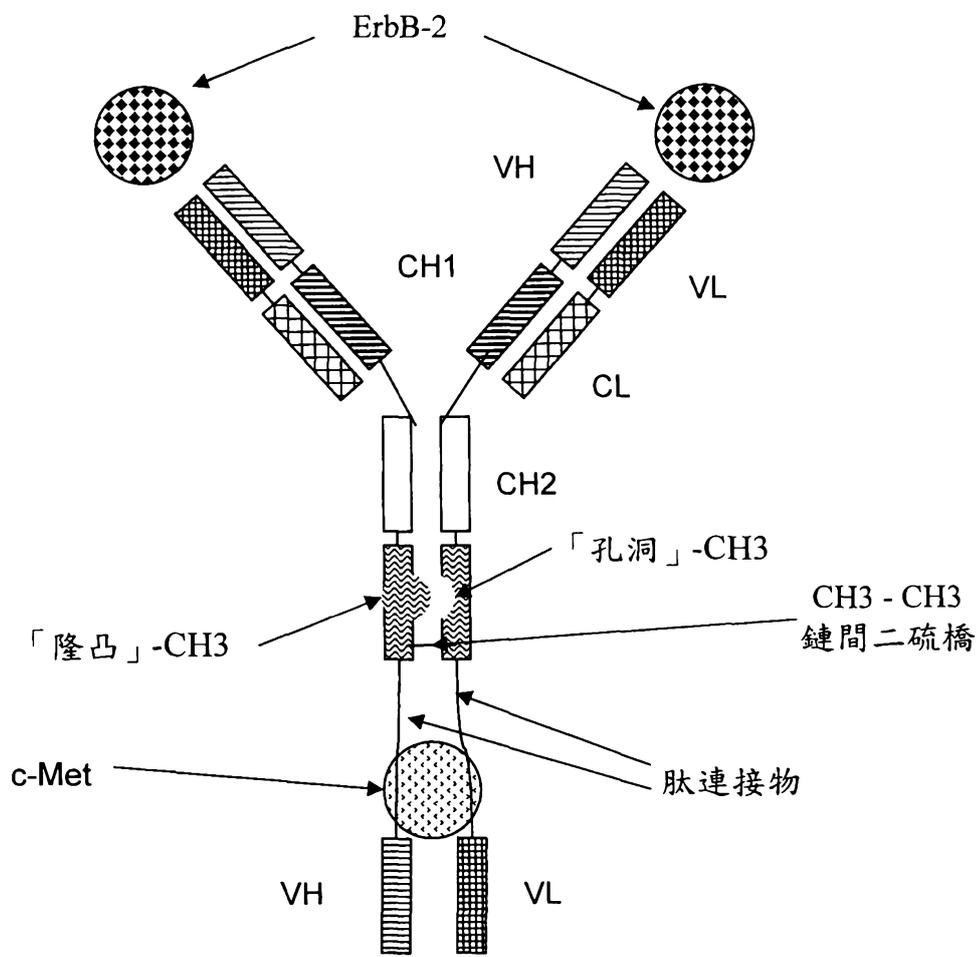


圖 3c



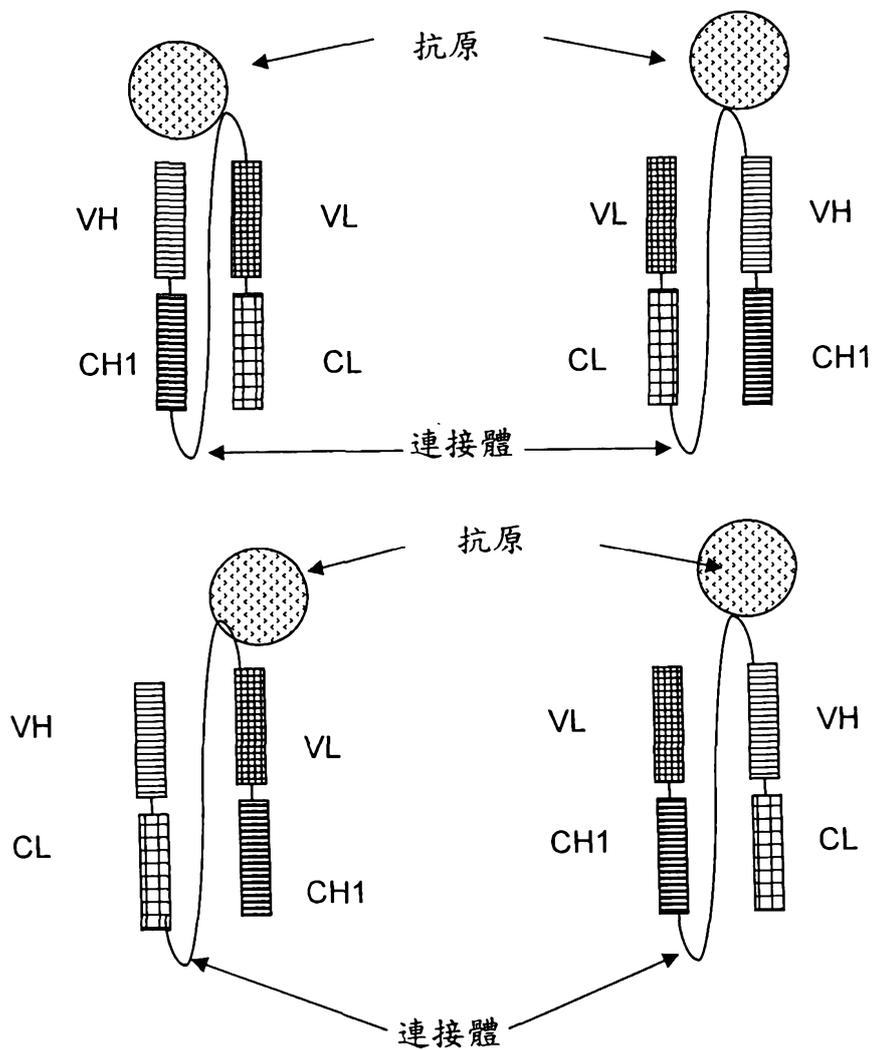


圖4a

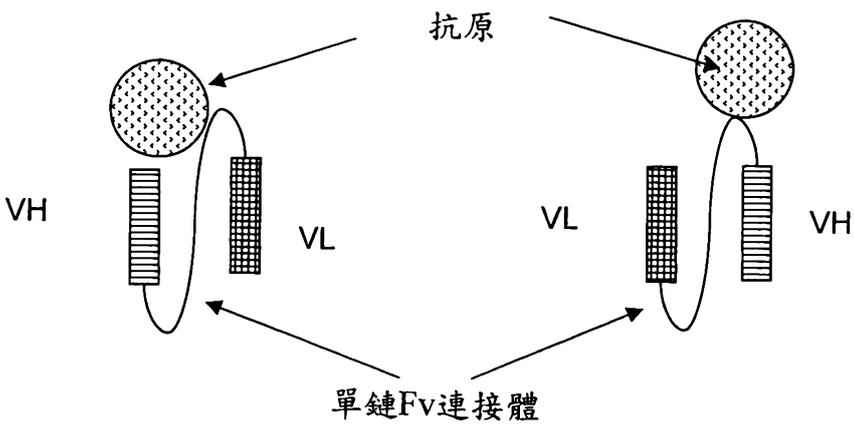


圖4b

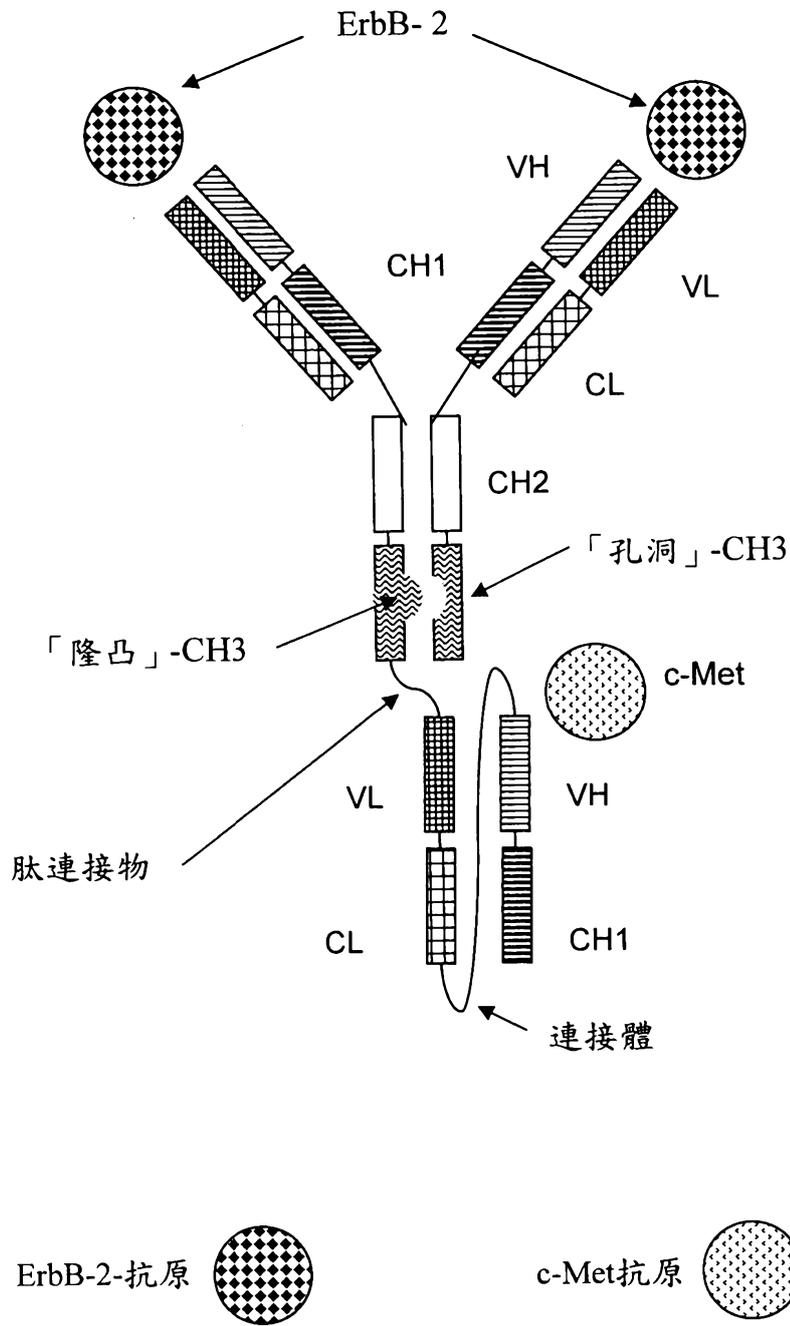
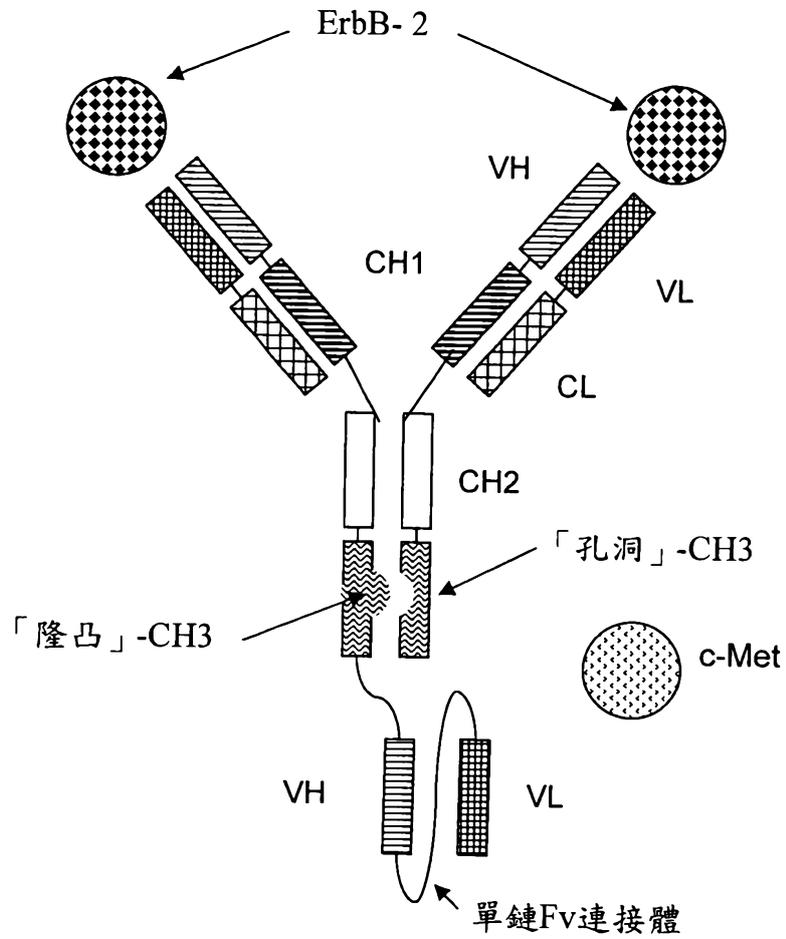


圖 5a



ErbB-2-抗原



c-Met抗原

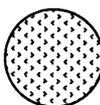


圖 5b

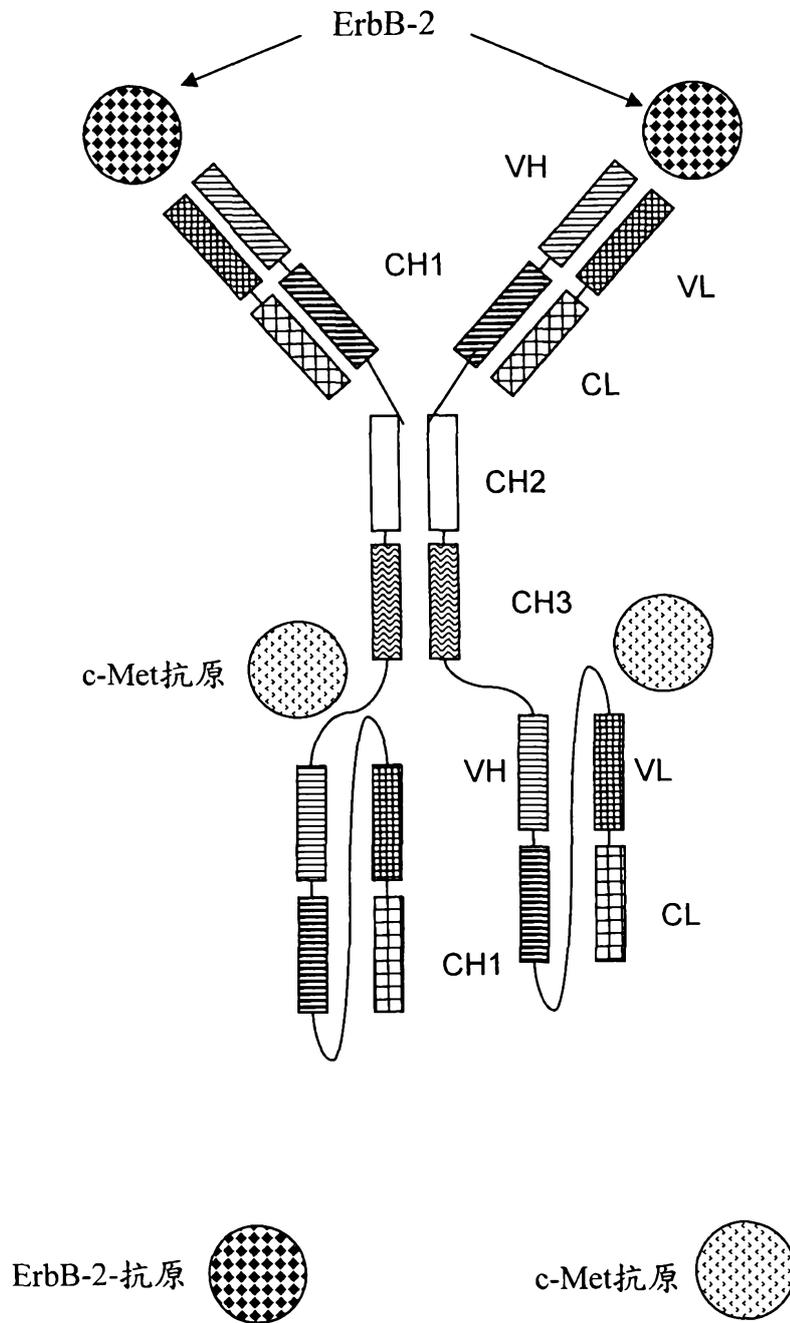


圖 6a

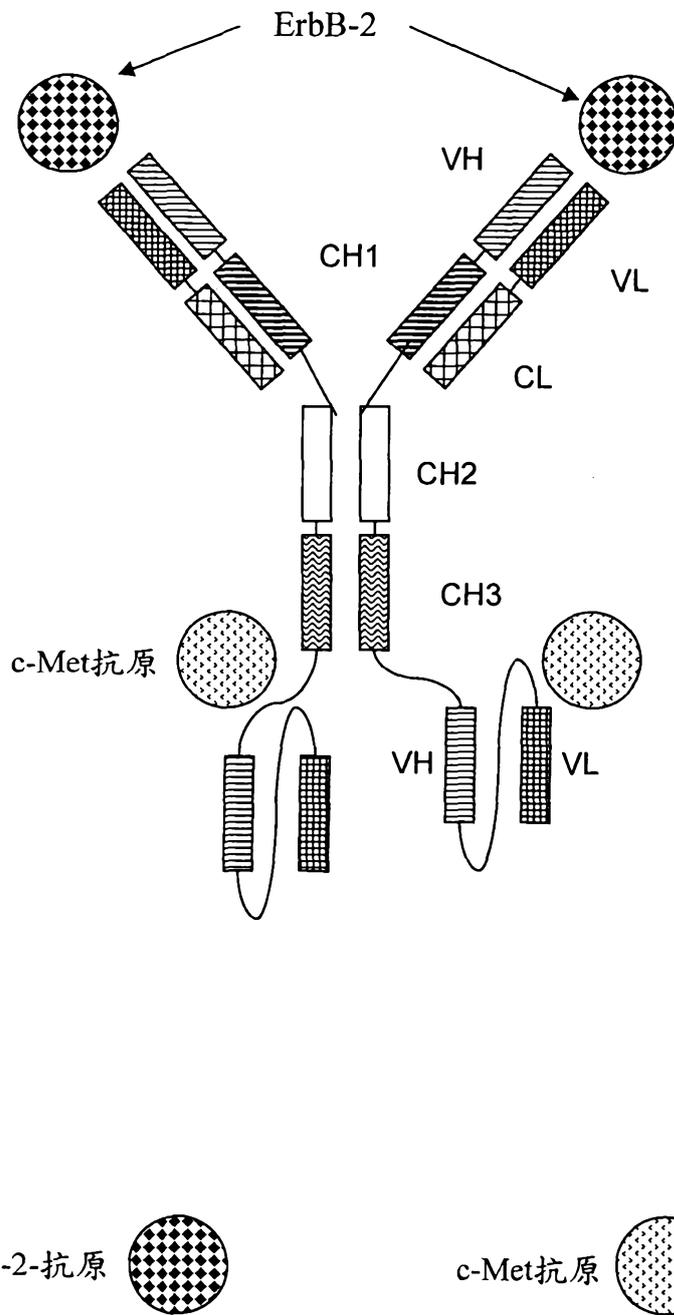


圖6b

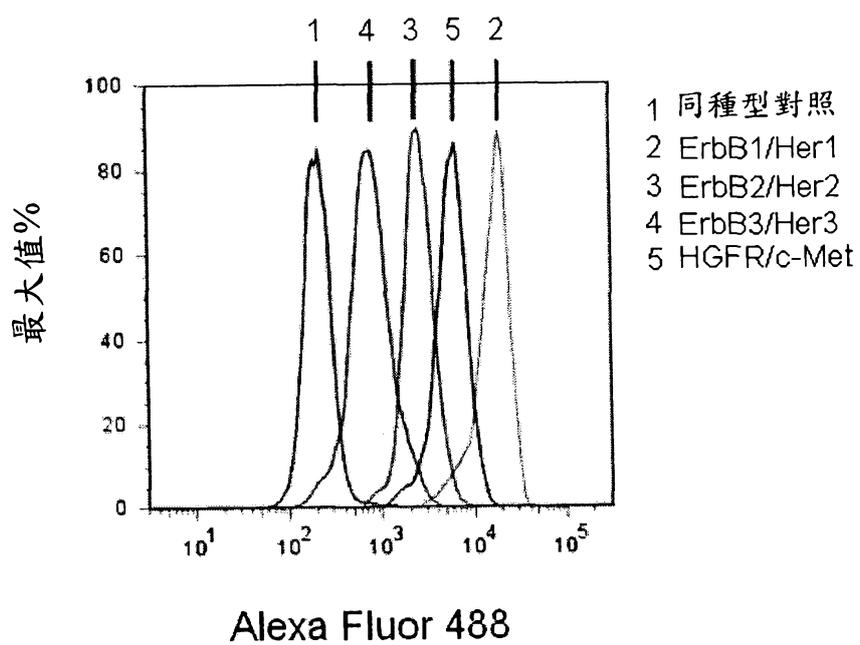


圖7a

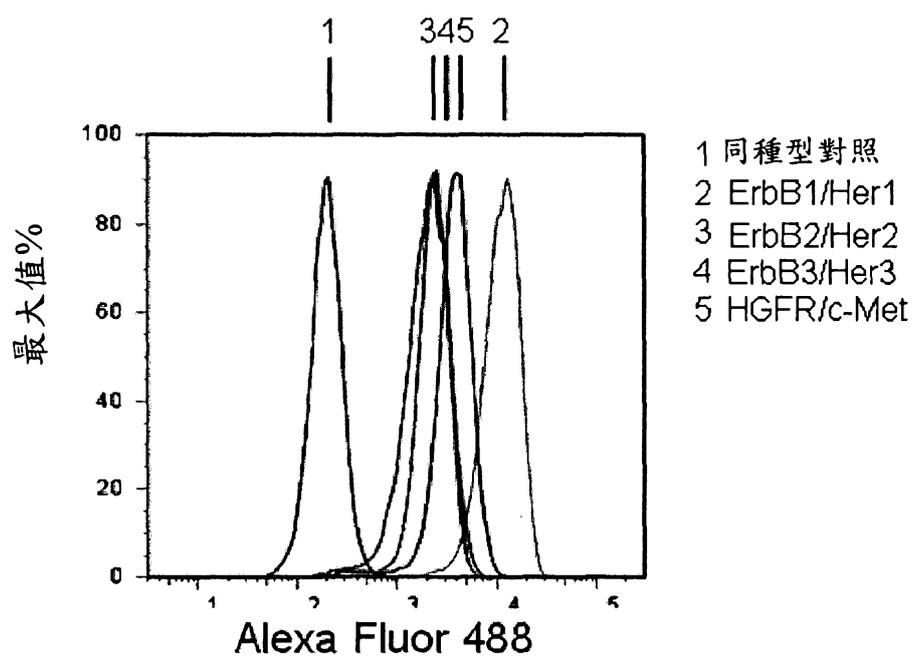


圖 7b

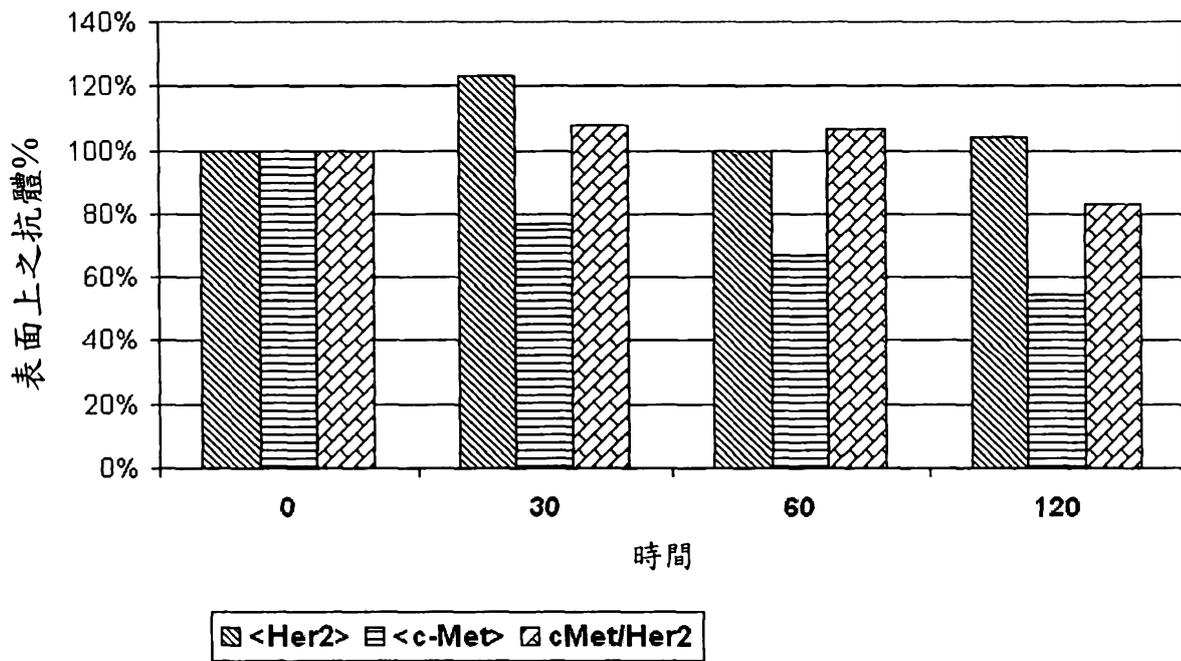


圖8

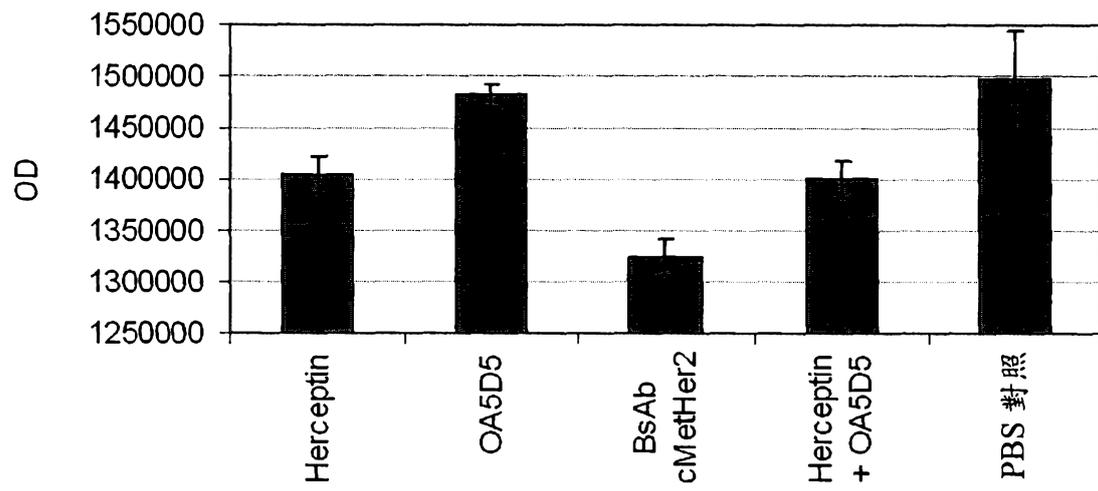


圖9a

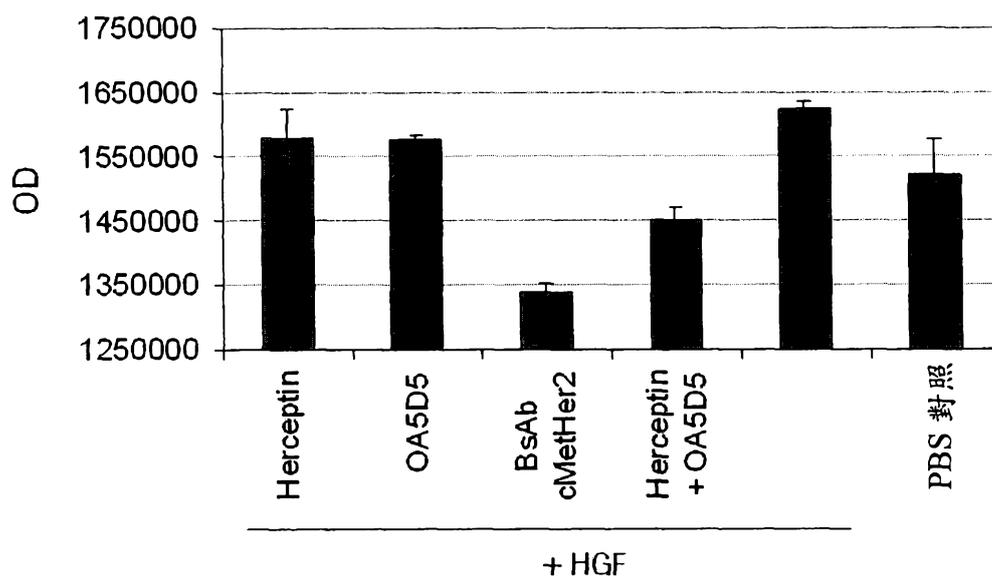


圖 9b

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)