



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201039854 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：099106511

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 03 月 05 日

(51)Int. Cl. : *A61K47/42 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*

(30)優先權：2009/03/06 美國 61/158,331

(71)申請人：建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：伊蘇 歐夕 ESUE, OSI (NG)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：28 項 圖式數：8 共 109 頁

(54)名稱

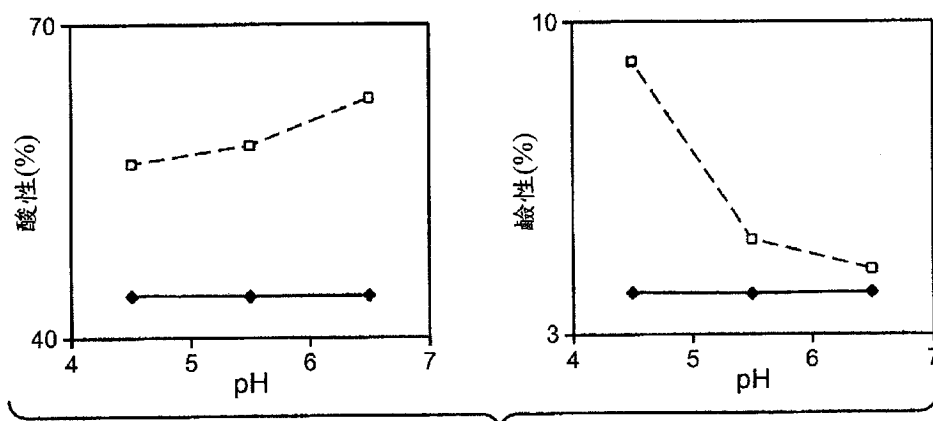
抗體調配物

ANTIBODY FORMULATION

(57)摘要

本發明闡述一種調配物，其包含治療有效量之抗體，視情況未經預先凍乾，使 pH 保持於約 4.5 至約 6.5 範圍內之緩衝液，及視情況表面活性劑；以及該調配物之用途。

藉由icIEF測量之電荷變體隨pH值之變化。該圖顯示T0時(菱形)及於40°C下培育4週後(正方形)之數據(pH值研究)





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201039854 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：099106511

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 03 月 05 日

(51)Int. Cl. : A61K47/42 (2006.01) A61K39/395 (2006.01)

(30)優先權：2009/03/06 美國 61/158,331

(71)申請人：建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：伊蘇 歐夕 ESUE, OSI (NG)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：28 項 圖式數：8 共 109 頁

(54)名稱

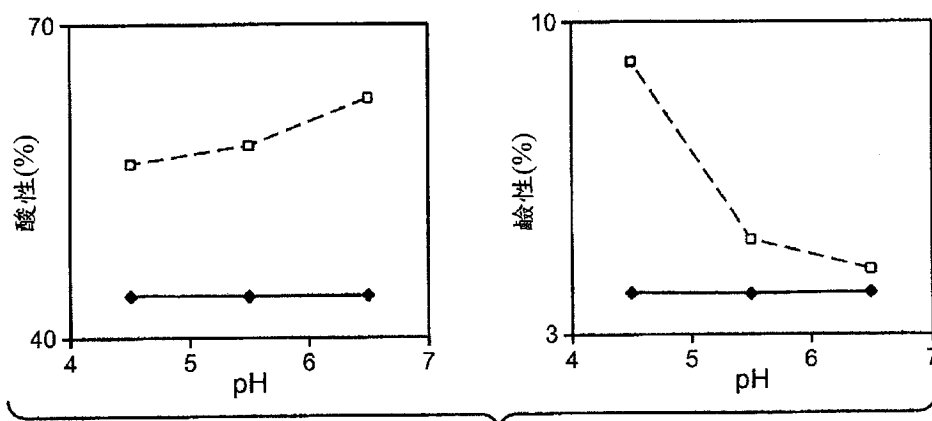
抗體調配物

ANTIBODY FORMULATION

(57)摘要

本發明闡述一種調配物，其包含治療有效量之抗體，視情況未經預先凍乾，使 pH 保持於約 4.5 至約 6.5 範圍內之緩衝液，及視情況表面活性劑；以及該調配物之用途。

藉由icIEF測量之電荷變體隨pH值之變化。該圖顯示T0時(菱形)及於40°C下培育4週後(正方形)之數據(pH值研究)



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於包含抗體之調配物。

本申請案主張2009年3月6日申請之美國臨時申請案第61/158,331號之優先權及權益，該案之說明書以全文引用的方式併入本文中。

【先前技術】

在過去幾年裏，生物技術之進步使得能夠利用重組DNA技術來產生各種用於醫藥應用之蛋白質。由於蛋白質較傳統有機及無機藥物大且更複雜(例如，除複雜的三維結構之外亦具有多個官能團)，因此該等蛋白質之調配物會造成特殊問題。為使蛋白質保持生物活性，調配物必須將蛋白質之胺基酸的至少核心序列之構象完整性保存完好，而且同時防止蛋白質之多個官能團發生降解。蛋白質之降解路徑可涉及化學不穩定性(例如，涉及藉由鍵形成或斷裂產生新化學實體之蛋白質修飾之任何過程)或物理不穩定性(例如，蛋白質高級結構之變化)。化學不穩定性可由去鹽胺、外消旋作用、水解、氧化、 β 消去或二硫化物交換而引起。物理不穩定性可由例如變性、聚集、沉澱或吸附而引起。最常見之三種蛋白質降解路徑係蛋白質聚集、去鹽胺及氧化。Cleland等人，*Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10(4): 307-377 (1993)。

用於醫藥應用之蛋白質包括抗體。可用於療法之抗體的一個實例係結合氧化型LDL之抗體。當前業內需要包含適

於治療用途之抗體(例如抗-oxLDL抗體)之穩定的水性醫藥調配物。

【發明內容】

本發明提供包含治療有效量之抗體、使pH值保持介於約4.5至約6.5之間之緩衝液及可選的表面活性劑的調配物。在某些實施例中，該調配物可在約2-8°C之溫度下穩定至少12個月。通常，此產生可用於例如醫藥應用之水性調配物。在本發明之某些實施例中，調配物係穩定的水性調配物。在某些實施例中，調配物係穩定的水性醫藥調配物。

本發明至少部分係關於鑒定組胺酸與精胺酸之組合(pH 4.5至6.5)是否可作為尤其有用之用於調配單株抗體、尤其易於聚集之全長抗體之緩衝液。該調配物可延緩其中之抗體產物之降解。在本發明之某些實施例中，組胺酸與精胺酸緩衝液係組胺酸-乙酸鹽與精胺酸-乙酸鹽緩衝液(pH 5.0至6.0)。在本發明之某些實施例中，組胺酸與精胺酸緩衝液係組胺酸-琥珀酸鹽與精胺酸-琥珀酸鹽緩衝液(pH 4.5至6.5)。在本發明之某些實施例中，調配物係無菌的。

本發明之緩衝液調配物具有4.5至6.5之pH值，例如，5.0至6.0之pH值、5.25至5.75之pH值或5.3至5.6之pH值。在本發明之某些實施例中，該調配物具有5.5或約5.5之pH值。在本發明之某些實施例中，該調配物具有5.6或約5.6之pH值。

因此，在一個態樣中，本發明係關於在組胺酸-乙酸鹽與精胺酸-乙酸鹽緩衝液(pH 4.5至6.5)中包含單株抗體之調

配物。在又一實施例中，該調配物係(例如)穩定的醫藥調配物。

因此，在一個態樣中，本發明係關於在組胺酸-琥珀酸鹽與精胺酸-琥珀酸鹽緩衝液(pH 4.5至6.5)中包含單株抗體之調配物。在又一實施例中，該調配物係(例如)穩定的醫藥調配物。

在某些實施例中，緩衝液中組胺酸乙酸鹽或組胺酸琥珀酸鹽之濃度係自約5 mM至約100 mM。在某些實施例中，組胺酸乙酸鹽或組胺酸琥珀酸鹽之濃度係約20 mM。在某些實施例中，緩衝液中精胺酸乙酸鹽或精胺酸琥珀酸鹽之濃度係自約50 mM至約500 mM。在某些實施例中，精胺酸乙酸鹽或精胺酸琥珀酸鹽之濃度係約150 mM。

本發明之調配物可視情況包含表面活性劑。在某些實施例中，表面活性劑係聚山梨醇酯(例如，聚山梨醇酯20)。在某些實施例中，表面活性劑之濃度係自0.0001%至約1.0%。在某些實施例中，表面活性劑之濃度係自約0.01%至約0.1%。在一個實施例中，表面活性劑之濃度係0.02%。該調配物可視情況包含甲硫胺酸(例如，以約5 mg/ml或5 mg/ml之濃度)。該調配物可視情況包含螯合劑，例如，EDTA、EGTA等。在某些實施例中，調配物中EDTA之濃度係1 mM EDTA。

通常，該等調配物之抗體濃度係自約10 mg/ml至約250 mg/ml。在某些實施例中，抗體濃度係自約100 mg/ml至250 mg/ml。在某些實施例中，抗體濃度係自約150 mg/ml

至約 200 mg/ml。在某些實施例中，抗體濃度係自約 25 mg/ml至約 200 mg/ml。

在另一態樣中，本發明係關於一種醫藥調配物，其包含：(a)約 10 mg/ml至約 250 mg/ml之量的易於去醯胺或聚集之全長IgG1抗體；(b)組胺酸-乙酸鹽與精胺酸-乙酸鹽緩衝液，pH 4.5至6.5；及(c)約0.01%至約0.1%之量的聚山梨醇酯 20。

在另一態樣中，本發明係關於一種醫藥調配物，其包含：(a)約 10 mg/ml至約 250 mg/ml之量的易於聚集之全長IgG1抗體；(b)組胺酸-琥珀酸鹽與精胺酸-琥珀酸鹽緩衝液，pH 4.5至6.5；及(c)約0.01%至約0.1%之量的聚山梨醇酯 20。

在某些實施例中，該抗體係單株抗體。在某些實施例中，該單株抗體係全長抗體(例如，IgG1、IgG4等)。在某些實施例中，該單株抗體係抗體片段(例如，包含抗原結合區)。例如，抗體片段係Fab或F(ab')₂片段。在某些實施例中，該單株抗體係人類化抗體。在某些實施例中，該單株抗體易於聚集。在某些實施例中，該抗體未經受預先凍乾。

在某些實施例中，該單株抗體結合 ox-LDL。在另一態樣中，本發明係關於一種醫藥調配物，其包含存於pH值為約4.5至約6.5之組胺酸與精胺酸緩衝液中之結合 ox-LDL之抗體及表面活性劑。在某些實施例中，該 oxLDL抗體包含可變輕鏈及可變重鏈胺基酸序列(分別為圖2中之SEQ ID

No. 3及4)及視情況恆定區(H及L)(分別為圖2中之SEQ ID NO: 6及7)。在某些實施例中，該抗-oxLDL抗體包含由圖1之核酸(SEQ ID NO: 1及2)編碼之VH及VL。

本發明亦係關於包含以下之醫藥調配物：約10 mg/ml至約200 mg/ml之量的ox-LDL抗體、組胺酸-乙酸鹽與精胺酸-乙酸鹽緩衝液及聚山梨醇酯20，其中該調配物之pH值係自約4.5至約6.5。

本發明亦係關於包含以下之醫藥調配物：約10 mg/ml至約200 mg/ml之量的ox-LDL抗體、組胺酸-琥珀酸鹽與精胺酸-琥珀酸鹽緩衝液及聚山梨醇酯20，其中該調配物之pH值係自約4.5至約6.5。

本發明亦係關於一種製品，其包含容納穩定之水性醫藥調配物的容器，該調配物包含治療有效量之抗體、使pH值保持介於約4.5至約6.5之間的緩衝液及可選的表面活性劑。在本發明之某些實施例中，緩衝液係組胺酸-乙酸鹽與精胺酸-乙酸鹽緩衝液(pH 5.0至6.0)。在本發明之某些實施例中，緩衝液係組胺酸-琥珀酸鹽與精胺酸-琥珀酸鹽緩衝液(pH 5.0至6.0)。在某些實施例中，緩衝液之pH值係5.5。在某些實施例中，緩衝液之pH值係5.6。本發明亦係關於具有可由注射器刺穿之塞子的小瓶或罐(例如，不銹鋼罐)，在該小瓶或罐的內部包含調配物(視情況呈冰凍形式)。在某些實施例中，將小瓶或罐儲存於約2-8°C下。在某些實施例中，小瓶係3 cc、20 cc或50 cc的小瓶。

而且，本發明提供製備醫藥調配物之方法，其包含：(a)

製備單株抗體調配物；及(b)評價調配物中單株抗體之物理穩定性、化學穩定性或生物活性。

在再一態樣中，本發明係關於穩定水性醫藥調配物中之抗體之方法，其藉由將治療有效量之抗體、使pH值保持介於約4.5至約6.5之間之緩衝液及可選的表面活性劑組合來實施。在本發明之某些實施例中，緩衝液係組胺酸-乙酸鹽與精胺酸-乙酸鹽緩衝液(pH 4.5至6.5)。在本發明之某些實施例中，緩衝液係組胺酸-琥珀酸鹽與精胺酸-琥珀酸鹽緩衝液(pH 4.5至6.5)。

本發明亦提供減少治療性單株抗體之聚集之方法，其包含將該抗體調配於組胺酸-乙酸鹽與精胺酸乙酸鹽緩衝液(pH 4.5至6.5)中。本發明亦提供減少治療性單株抗體之聚集之方法，其包含將該抗體調配於組胺酸-琥珀酸鹽與精胺酸琥珀酸鹽緩衝液(pH 4.5至6.5)中。

在本發明之調配物及方法之某些實施例中，調配物係穩定的。在一個實施例中，調配物可在約25°C下穩定儲存至少12個月。在一個實施例中，調配物可在約5°C下穩定儲存至少12個月。在一個實施例中，調配物可在約-20°C下穩定儲存至少12個月。在一個實施例中，調配物可在約5°C下穩定儲存至少24個月。在一個實施例中，調配物可在約-20°C下穩定儲存至少24個月。

在本發明之調配物及方法之某些實施例中，調配物係用於靜脈內(IV)、皮下(SQ)或肌內(IM)投予。在一個實施例中，調配物係用於IV投予且抗體濃度係自約10 mg/ml至約

250 mg/ml。在另一實例中，調配物係用於SQ投予且抗體濃度係自約80 mg/ml至約250 mg/ml。

另外，本發明係關於治療個體疾病或病症之方法，其包含向個體投予可有效治療該疾病或病症之量的調配物。

在又一態樣中，本發明係關於治療哺乳動物之方法，其包含向哺乳動物投予治療有效量之本發明所揭示之水性醫藥調配物，其中該哺乳動物患有需要用該調配物中之抗體進行治療之病症。在再一態樣中，本發明提供治療個體動脈粥樣硬化之方法，其包含向該個體投予可有效治療動脈粥樣硬化之量的醫藥調配物。在抗體結合 ox-LDL 之情況下，擬治療病症之實例包括動脈粥樣硬化。

彼等熟習此項技術者可明瞭本發明之該等及其他態樣。

【實施方式】

定義

I. 定義

在詳細描述本發明之前，應瞭解本發明並不限於特定組合物或生物系統，其當然可以變化。亦應瞭解，本文所用之術語僅係出於描述特定實施例之目的，而不意欲加以限制。除非本文另外明確指出，否則本說明書及隨附申請專利範圍中所用之單數形式「一個」及「該」包括多數對象。因此，例如，提及「一個分子」視情況包括兩個或更多個該等分子之組合及諸如此類。

術語「醫藥調配物」係指一種製劑，其呈容許活性成份之生物活性有效之形式且不含有對欲投予調配物之個體具

有不可接受之毒性的其他組份。該等調配物係無菌的。
「醫藥上可接受」之賦形劑(媒劑、添加劑)係彼等可適度地投予至個體哺乳動物以提供所用活性成份之有效劑量者。

「無菌(sterile)」調配物係無菌性的(asceptic)或不含或基本上不含所有活微生物及其孢子。

在本文中，「冰凍」調配物係處於低於0°C之溫度下的調配物。通常，冰凍調配物未經冰凍乾燥，亦未經受預先(或隨後)凍乾。在某些實施例中，冰凍調配物包含用於儲存之冰凍藥物物質(存於不銹鋼罐中)或冰凍藥物產品(存於最終小瓶構造中)。

「穩定的」調配物係在儲存時其中之蛋白質基本上保留其物理穩定性及/或化學穩定性及/或生物活性之調配物。較佳地，調配物在儲存時基本上保留其物理及化學穩定性以及其生物活性。儲存期通常基於調配物之預期存架壽命加以選擇。此項技術中現有各種測量蛋白質穩定性之分析技術，且綜述於(例如)*Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee編輯，Marcel Dekker公司，紐約，N.Y., Pubs. (1991)及Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993)。穩定性可在所選溫度下在所選時間段內進行測量。在某些實施例中，調配物可在約40°C下穩定至少約2-4週、及/或可在約5°C下穩定至少3個月、及/或可在約5°C下穩定至少6個月、及/或可在約5°C下穩定至少12個月、及/或可在約-20°C下穩定至少3個月或至少1年。在某

些實施例中，調配物可在約25°C下穩定至少6個月、及/或可在約25°C下穩定12個月、及/或可在約5°C下穩定6個月、及/或可在約5°C下穩定12個月、及/或可在約-20°C下穩定至少6個月、及/或可在約-20°C下穩定至少12個月、及/或可在5°C或-20°C下穩定至少兩年。在某些實施例中，調配物在對調配物實施冰凍(例如，冰凍至-70°C)與解凍後、例如在1個、2個或3個冰凍與解凍循環後仍然穩定。穩定性可以各種不同方式定性地及/或定量地進行評價，包括評價聚集體形成(例如利用尺寸排除層析、藉由測量混濁度及/或藉由目測)；藉由利用陽離子交換層析、圖像毛細管等電聚焦(icIEF)或毛細管區帶電泳來評定電荷異質性；胺基末端或羧基末端序列分析；質譜分析；SDS-PAGE分析以比較縮減的(reduced)抗體與完整抗體；肽圖(例如胰蛋白酶或LYS-C)分析；評價抗體之生物活性或抗原結合功能等。不穩定性可涉及以下中的任何一或多種：聚集、去醯胺(例如Asn去醯胺)、氧化(例如Met氧化)、異構化(例如Asp異構化)、修剪(clipping)/水解/分裂(例如鉸鏈區分裂)、琥珀醯亞胺形成、未成對半胱胺酸、N-末端延長、C-末端加工、糖基化差異等。

若在目視檢查顏色及/或透明度時，或如藉由紫外光散射或藉由尺寸排除層析所測量，蛋白質未顯示或顯示非常少的聚集、沉澱及/或變性跡象，則該蛋白質在醫藥調配物中「保留其物理穩定性」。

若在給定時間時蛋白質之化學穩定性使得認為如下文所

界定該蛋白質仍保留其生物活性，則該蛋白質在醫藥調配物中「保留其化學穩定性」。化學穩定性可藉由檢測及定量蛋白質之化學改變形式來評定。化學改變可涉及尺寸改變(例如修剪)，其可利用例如尺寸排除層析、SDS-PAGE及/或基質輔助之雷射解吸電離/飛行時間質譜(MALDI/TOF MS)進行評價。其他類型之化學改變包括電荷改變(例如，由於去醯胺而發生)，其可藉由例如離子交換層析或icIEF進行評價。

若抗體在給定時間時之生物活性在醫藥調配物製備時所呈現生物活性的約10%以內(在分析誤差以內)(例如，如在抗原結合分析中所測定)，則該抗體在該醫藥調配物中「保留其生物活性」。抗體之其他「生物活性」分析在下文中予以詳細描述。

在本發明中，單株抗體之「生物活性」係指該抗體結合抗原之能力。其可進一步包括抗體結合抗原並引起可測量之生物反應(其可在活體外或在活體內測量)。該活性可為拮抗性的或激動性的。

本發明之「去醯胺」單株抗體係其中一或多個天冬醯胺殘基被衍生化成(例如)天冬胺酸或異天冬胺酸之單株抗體。

「易於去醯胺」之抗體係包含一或多個已發現傾向於去醯胺之殘基的抗體。

「易於聚集」之抗體係已發現尤其在冰凍及/或攪動時與其他抗體分子聚集之抗體。

「易於分裂」之抗體係已發現(例如)在其鉸鏈區斷裂成兩個或更多個片段之抗體。

所謂「減少去醯胺、聚集或分裂」意指阻止調配於不同pH值下或調配於不同緩衝液中之單株抗體發生去醯胺、聚集或分裂或降低與該單株抗體有關的去醯胺、聚集或分裂的量。

所調配之抗體較佳地基本上純淨且期望地基本上均質(例如，不含雜質蛋白質等)。「基本上純淨」之抗體意指基於組合物之總重量組合物包含至少約90重量%之抗體、較佳地至少約95重量%之抗體。「基本上均質」之抗體意指基於組合物之總重量組合物包含至少約99重量%之抗體。

「等滲」意指目標調配物具有與人類血液基本上相等之滲透壓。等滲調配物通常具有自約250 mOsm至350 mOsm之滲透壓。等滲性可利用例如蒸氣壓或冰凍型滲透壓計測量。

本文所用之「緩衝液」係指藉由其酸-鹼共軛組份之作用來抵抗pH變化的緩衝溶液。本發明之緩衝液具有pH於約4.5至約7.0、或約4.5至約6.5、或約5.0至約6.0之範圍內，或具有約5.5之pH，或具有5.5之pH，或具有約5.6之pH，或具有5.6之pH。可將pH控制在該範圍內之緩衝液的實例包括乙酸鹽、琥珀酸鹽、琥珀酸鹽、葡萄糖酸鹽、組胺酸、檸檬酸鹽、甘胺鹽甘胺酸及其他有機酸緩衝液。

「組胺酸緩衝液」係包含組胺酸離子之緩衝液。組胺酸

緩衝液之實例包括組胺酸氯化物、組胺酸乙酸鹽、組胺酸磷酸鹽、組胺酸硫酸鹽、組胺酸琥珀酸鹽等。在一個實施例中，發現本發明實例中鑒定之組胺酸緩衝液係組胺酸乙酸鹽。在該一個實施例中，組胺酸乙酸鹽緩衝液係藉由乙酸(液體)滴定L-組胺酸(游離鹼，固體)來製備。在某些實施例中，組胺酸緩衝液或組胺酸-乙酸鹽緩衝液之pH為4.5至6.5。在一個實施例中，該緩衝液之pH為5.5。在一個實施例中，發現本發明實例中鑒定之組胺酸緩衝液係組胺酸琥珀酸鹽。在一個實施例中，組胺酸-琥珀酸鹽緩衝液之pH為4.5至6.5。在一個實施例中，該緩衝液之pH為5.5。在一個實施例中，該緩衝液之pH為5.6。

「組胺酸精胺酸緩衝液」係包含組胺酸離子及精胺酸離子之緩衝液。組胺酸精胺酸緩衝液之實例包括組胺酸氯化物-精胺酸氯化物、組胺酸乙酸鹽-精胺酸乙酸鹽、組胺酸磷酸鹽-精胺酸磷酸鹽、組胺酸硫酸鹽-精胺酸硫酸鹽、組胺酸琥珀酸鹽-精胺酸琥珀酸鹽等。在一個實施例中，發現本發明實例中鑒定之組胺酸-精胺酸緩衝液係組胺酸乙酸鹽-精胺酸乙酸鹽。在該一個實施例中，組胺酸乙酸鹽緩衝液係藉由乙酸(液體)滴定L-組胺酸(游離鹼，固體)及藉由乙酸(液體)滴定L-精胺酸(游離鹼，固體)來製備。在一個實施例中，組胺酸-精胺酸緩衝液之pH為4.5至6.5。在一個實施例中，該緩衝液之pH為5.5。在一個實施例中，發現本發明實例中鑒定之組胺酸-精胺酸緩衝液係組胺酸琥珀酸鹽-精胺酸琥珀酸鹽。在一個實施例中，組胺酸琥珀酸鹽-精胺酸琥珀酸鹽。

珀酸鹽-精胺酸琥珀酸鹽緩衝液之pH為4.5至6.5。在一個實施例中，該緩衝液之pH為5.5。在一個實施例中，該緩衝液之pH為5.6。

在本發明中，「表面活性劑(surfactant)」係指表面活性劑(surface-active agent)，較佳為非離子型表面活性劑。本發明表面活性劑之實例包括聚山梨醇酯(例如，聚山梨醇酯20及聚山梨醇酯80)；泊洛沙姆(poloxamer)(例如泊洛沙姆188)；Triton；十二烷基硫酸鈉(SDS)；月桂基硫酸鈉；辛基糖苷鈉；月桂基-、肉豆蔻基-、亞油基-或硬脂基-磺基甜菜鹼；月桂基-、肉豆蔻基-、亞油基-或硬脂基-肌胺酸；亞油基-、肉豆蔻基-或鯨蠟基-甜菜鹼；月桂醯胺丙基-、椰油醯胺丙基-、亞油醯胺丙基-、肉豆蔻醯胺丙基-、棕櫚醯胺丙基-或異硬脂醯胺丙基-甜菜鹼(例如月桂醯胺丙基)；肉豆蔻醯胺丙基-、棕櫚醯胺丙基-或異硬脂醯胺丙基-二甲基胺；甲基椰油基牛磺酸鈉或甲基油基牛磺酸二鈉；及 MONAQUAT™ 系列(Mona Industries 公司，Paterson, N.J.)；聚乙二醇、聚丙二醇、及乙二醇與丙二醇之共聚物(例如 Pluronic、PF68等)等。在一個實施例中，本發明之表面活性劑係聚山梨醇酯20。

在藥物學意義上，在本發明上下文中，抗體之「治療有效量」係指可有效預防或治療病症的量，其中該抗體對於該病症之治療有效。「病症」係可能受益於用該抗體治療之任何病狀。此包括慢性及急性病症或疾病，包括使哺乳動物易患所討論病症之彼等病理學病狀。

「防腐劑」係例如可視情況包括於調配物中以實質上減少其中之細菌作用由此促進產生可多次使用之調配物的化合物。潛在的防腐劑之實例包括十八烷基二甲基苄基氯化銨、氯化六甲雙銨、苯紫氯銨(烷基苄基二甲基氯化銨之混合物，其中烷基係長鏈化合物)及苄索氯銨。其他類型之防腐劑包括芳香族醇，例如苯酚、丁基及苄基醇；對羥基苯甲酸烷基酯，例如對羥基苯甲酸甲基酯或對羥基苯甲酸丙基酯；鄰苯二酚、間苯二酚、環己醇、3-戊醇及間-甲酚。在一個實施例中，本發明之防腐劑係苄基醇。

「多元醇」係含有多個羥基之物質，且包括糖(還原糖及非還原糖)、糖醇及糖酸。多元醇可視情況包括於調配物中。在某些實施例中，本發明之多元醇具有小於約600 kD(例如，介於約120 kD至約400 kD範圍內)之分子量。

「還原糖」含有半縮醛基團，其可還原金屬離子或與離胺酸及蛋白質中之其他胺基共價反應，而「非還原糖」不具有還原糖之該等特性。還原糖之實例係果糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖及葡萄糖。非還原糖包括蔗糖、海藻糖、山梨糖、松三糖及棉子糖。糖醇之實例係甘露糖醇、木糖醇、赤蘚糖醇、蘇糖醇、山梨糖醇及甘油。糖酸包括L-葡萄糖酸鹽及其金屬鹽。當期望調配物冰凍-解凍穩定時，在冰凍溫度(例如-20°C)下不結晶(結晶會使調配物中之抗體不穩定)之多元醇較佳。在某些實施例中，多元醇之實例係諸如蔗糖及海藻糖等非還原糖，其中由於海藻糖之溶液穩定性，海藻糖

於蔗糖。

本文所用之抗-OxLDL抗體係結合LDL中之蛋白質抗原(例如, ApoB-100)的抗體。參見例如, IEI-E3、LDO-D4、KTT-B8及2-DO3(例如, 在WO 2004/030607中)。ApoB-100係LDL之蛋白質組份, 其係人類血清中膽固醇之重要載體。LDL之氧化係其至致動脈粥樣化顆粒之轉化中的重要步驟, 且氧化修飾促使脂紋(早期可見的動脈粥樣硬化病變)之初始形成。

抗-oxLDL抗體之實例係2-DO3, 其為針對氧化型LDL之完全人類單株IgG1抗體。在圖1中給出編碼抗體2DO3之可變重鏈及可變輕鏈的多核苷酸序列, 且分別指定為SEQ ID NO: 1及SEQ ID NO: 2。在圖2中給出抗體2DO3之可變重鏈及可變輕鏈的胺基酸序列, 且分別指定為SEQ ID NO: 3及SEQ ID NO: 4。恆定區H及L分別指定為SEQ ID NO: 6及7, 如圖2。2-DO3亦係指具有至少WO 2004/030607之圖3中所給出之VH及VL序列(或美國專利第20040202653號之SEQ ID No. 27及28)及WO 2007/025781之表2中所列示之抗體的CDR序列的抗體。

抗-oxLDL抗體之生物活性將結合ox-LDL, 且視情況例如會抑制斑塊形成並防止發生動脈粥樣硬化病變(例如, 如Schiopu等人, 2004; WO 2004/030607; 美國專利第6,716,410號中之動物模型中所闡述)。其他活性包括在治療數週後有效誘導主動脈中之預先存在之既定動脈粥樣硬化斑塊消退(例如, WO 2007/025781)。

動脈粥樣硬化係多因子疾病，其優先發生於呈現包括以下之生物化學風險因子之個體中：吸煙、高血壓、糖尿病、高膽固醇血症、血漿低密度脂蛋白(LDL)及三酸甘油酯升高、高纖維蛋白原血症及高血糖症。動脈粥樣硬化係一種引起大型及中型動脈之最內層(內膜)變厚的慢性疾病。動脈粥樣硬化會降低血流量，且可能造成受侵襲血管所供應之器官中缺血及組織破壞。動脈粥樣硬化病變會在人類中持續發展幾十年，其導致諸如冠狀動脈缺血及腦缺血及血栓栓塞性疾病及心肌梗塞及腦梗塞等併發症。

動脈粥樣硬化係包括急性心肌梗塞、中風及外周動脈疾病在內之心血管疾病之主要原因。該疾病係由血管之細胞外基質中脂蛋白(主要為LDL)之積聚而引發。該等LDL顆粒聚集並經歷氧化修飾。氧化型LDL具有毒性並造成血管損傷。就許多方面而言，動脈粥樣硬化代表對包括炎症及纖維化在內之此損傷的反應。

「治療」係指治療性治療及預防性(prophylactic或preventative)措施二者。彼等需要治療者包括已患有病症者以及需預防病症者。

對治療來說，「哺乳動物」係指歸類為哺乳動物之任何動物，包括人類、家畜及農場動物、以及動物園、運動場的動物或寵物，例如狗、馬、貓、牛等。較佳地，哺乳動物係人類。

本文中之術語「抗體」係以最廣泛含義使用，且具體包括單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗

體(例如，雙特異性抗體)及抗體片段，只要其呈現期望生物活性即可。

「經分離」抗體係已經鑒定並自其天然環境組份中分離及/或回收之抗體。其天然環境之雜質組份係會干擾抗體之研究、診斷或治療用途之物質，且可包括酶、激素及其他蛋白質性溶質或非蛋白質性溶質。在一些實施例中，將抗體純化至(1)如藉由例如Lowry方法所測定，含有95重量%以上之抗體，且在一些實施例中含有99重量%以上之抗體；(2)藉由使用例如旋杯式序列分析儀測定，達足以獲得至少15個N-末端或內部胺基酸序列殘基之程度；或(3)均質性，藉由還原或非還原條件下之SDS-PAGE使用例如考馬斯藍(Coomassie blue)或銀染色測量。既然不應存在至少一種抗體天然環境組份，因此經分離抗體包括重組細胞內之原位抗體。然而，經分離的抗體通常應藉由至少一個純化步驟來製備。

「天然抗體」通常為約150,000道爾頓之異四聚體糖蛋白，其由兩條相同輕鏈(L)及兩條相同重鏈(H)構成。每一輕鏈經由一個共價二硫鍵連接至重鏈，而在不同免疫球蛋白同種型之重鏈中二硫鍵之數目會有所變化。每一重鏈及輕鏈亦具有規則地間隔開之鏈內二硫橋鍵。每一重鏈在一端具有可變結構域(V_H)，後接多個恆定結構域。每一輕鏈在一端具有可變結構域(V_L)且在其另一端具有恆定結構域；輕鏈之恆定結構域與重鏈之第一恆定結構域對齊，而輕鏈之可變結構域與重鏈之可變結構域對齊。據認為特定

胺基酸殘基可形成介於輕鏈與重鏈可變結構域之間的連接區。

術語「恆定結構域」係指免疫球蛋白分子之一部分，其相對於免疫球蛋白之含有抗原結合位點之其他部分-可變結構域具有較保守之胺基酸序列。恆定結構域含有重鏈之 C_{H1} 、 C_{H2} 及 C_{H3} 結構域(統稱為CH)及輕鏈之CHL(或CL)結構域。

抗體之「可變區」或「可變結構域」係指抗體之重鏈或輕鏈的胺基末端結構域。可將重鏈之可變結構域稱為「VH」。可將輕鏈之可變結構域稱為「VL」。該等結構域通常係抗體之最可變部分且含有抗原結合位點。

術語「可變」係指該事實：在抗體之間可變結構域之某些部分的序列存在廣泛差異且可用於實現每一特定抗體對其特定抗原之結合及特異性。然而，此可變性在整個抗體可變結構域中並非均勻分佈。在輕鏈及重鏈可變結構域二者中均主要集中在三個稱作超變區(HVR)之區段上。可變結構域之保守程度較高的部分稱為框架區(FR)。天然重鏈及輕鏈的可變結構域各包含四個主要採用 β 薄片構造的由三個HVR連接之FR區，其形成連接 β 薄片結構且在一些情況下形成 β 薄片結構之一部分的環。每條鏈之HVR可就近經由FR區形成一體，且在與來自另一條鏈之HVR合為一體時可促進抗體之抗原結合位點的形成(參見Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，National Institute of Health, Bethesda, MD (1991))。恆定

結構域並不直接參與抗體與抗原之結合，但可呈現多種效應子功能，例如抗體參與抗體依賴性細胞毒性。

根據抗體之恆定結構域之胺基酸序列，可將來自任何脊椎動物物種之抗體(免疫球蛋白)的「輕鏈」指定為兩種完全不同之類型(稱作卡帕(κ)及蘭姆達(λ))中的一種。

本文所用之術語IgG「同種型」或「亞類」意指由其恆定區之化學及抗原特徵所界定之免疫球蛋白的任一亞類。

端視抗體重鏈之恆定結構域之胺基酸序列，可將抗體(免疫球蛋白)歸類為不同種類。存在五種主要的免疫球蛋白種類：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且可將該等種類中之若干種類進一步劃分成亞類(同種型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於不同免疫球蛋白種類之重鏈恆定結構域分別稱作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。不同免疫球蛋白種類之亞單元結構及三維構造已為熟習此項技術者所熟知，且概述於(例如)Abbas等人，*Cellular and Mol. Immunology*，第4版(W.B. Saunders公司，2000)。抗體可為較大融合分子之一部分，該分子係由抗體與一或多種其他蛋白質或肽之共價或非共價結合而形成。

術語「全長抗體」、「完整抗體」及「全抗體」在本文中可互換使用，其均指實質上完整形式之抗體，而非如下文所界定之抗體片段。該等術語尤其指具有含有Fc區之重鏈的抗體。

就本發明而言，「裸抗體」係未偶聯至細胞毒性部分或放射性標記之抗體。

「抗體片段」包含完整抗體之一部分，較佳包含其抗原結合區。抗體片段之實例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 及 Fv 片段；雙抗體(diabody)；線性抗體；單鏈抗體分子；及自抗體片段形成之多特異性抗體。

抗體經木瓜蛋白酶消化可產生兩個相同的稱作「Fab」片段之抗原結合片段(每一片段具有單個抗原結合位點)及剩餘「Fc」片段，「Fc」片段之名稱反映了其易於結晶之能力。經胃蛋白酶處理產生 F(ab')₂ 片段，該片段具有兩個抗原結合位點且仍然能夠交聯抗原。

「Fv」係含有完整之抗原結合位點的最小抗體片段。在一個實施例中，雙鏈 Fv 種類由一個重鏈可變結構域與一個輕鏈可變結構域呈緊密非共價結合形式之二聚體組成。在單鏈 Fv (scFv) 種類中，一個重鏈可變結構域與一個輕鏈可變結構域可經由柔性肽連接子共價連接，以便該輕鏈與重鏈可以類似於雙鏈 Fv 種類之「二聚體」結構相結合。以此構造，每一可變結構域之三個 HVR 相互作用從而在該 VH-VL 二聚體的表面上界定抗原結合位點。該六個 HVR 共同賦予該抗體以抗原結合特異性。然而，即使單個可變結構域(或僅包含三個對抗原具有特異性的 HVR 的半個 Fv)亦具有識別及結合抗原之能力，但其親和性較整個結合位點為低。

Fab 片段含有重鏈可變結構域及輕鏈可變結構域，且亦含有輕鏈之恆定結構域及重鏈之第一恆定結構域(CH1)。Fab' 片段因在重鏈 CH1 結構域之羧基末端增加了若干殘基

而與Fab片段有所不同，該等殘基包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸。本文中Fab'-SH特指恆定結構域之一或多個半胱胺酸殘基具有游離硫醇基之Fab'。F(ab')₂抗體片段起初形成時係二者之間具有鉸鏈半胱胺酸的Fab'片段對。亦已知抗體片段之其他化學偶合。

「單鏈Fv」或「scFv」抗體片段包含抗體之VH及VL結構域，其中該等結構域存在於單一多肽鏈中。通常，scFv多肽另外包含位於VH結構域與VL結構域之間之多肽連接子，其使scFv能夠形成期望之抗原結合結構。有關scFv之綜述可參見(例如)Pluckthün, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第113卷, Rosenberg及Moore編輯, (Springer-Verlag, 紐約, 1994), 第269-315頁。

術語「雙抗體」係指具有兩個抗原結合位點之抗體片段，該等片段包含在同一多肽鏈(VH-VL)中相互連接之重鏈可變結構域(VH)與輕鏈可變結構域(VL)。藉由使用因過短而無法使同一鏈上之兩個結構域配對之連接子，迫使該等結構域與另一鏈上之互補結構域配對並形成兩個抗原結合位點。雙抗體可為二價或雙特異性的。雙抗體更詳細地闡述於(例如)歐洲專利第404,097號；WO 1993/01161；Hudson等人, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)；及Hollinger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)。三抗體(Triabody)及四抗體(tetrabody)亦闡述於Hudson等人, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)中。

本文所用之術語「單株抗體」係指自實質上同源之抗體

群獲得之抗體，例如，除可能存在極少量(例如)天然存在之突變外，構成該群體之各個抗體均相同。因此，修飾詞「單株」表示該抗體之特徵在於其不是分立抗體之混合物。在某些實施例中，該單株抗體通常包括包含結合靶之多肽序列的抗體，其中結合靶之多肽序列係藉由包括自多數多肽序列選擇單一靶結合多肽序列之過程而獲得。例如，該選擇過程可為自多數純系(例如雜交瘤純系、噬菌體純系或重組DNA純系之集合體)選擇單一純系。應瞭解，可進一步改變所選擇之靶結合序列，以例如改良對靶之親和性、人類化該靶結合序列、改良其在細胞培養物中之產生、降低其活體內免疫原性、產生多特異性抗體等，且包含該經改變靶結合序列之抗體亦為本發明之單株抗體。與通常包括針對不同決定子(表位)之不同抗體之多株抗體製劑相比，單株抗體製劑之每一單株抗體皆針對抗原上之單一決定子。除其特異性外，單株抗體製劑之優勢還在於其通常不含有其他免疫球蛋白雜質。

修飾詞「單株」表示抗體之特徵在於自實質上同源之抗體群獲得，且不應理解為需要藉由任一特定方法來產生抗體。例如，可根據本發明使用之單株抗體可藉由多種技術來製備，包括(例如)雜交瘤方法(例如，Kohler及Milstein，*Nature*，256:495-97 (1975)；Hongo等人，*Hybridoma*，14 (3): 253-260 (1995)；Harlow等人，*Antibodies: A Laboratory Manual*，(冷泉港實驗室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)，第2版，1988)；

Hammerling 等人，*Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981))、重組DNA方法(參見，例如，美國專利第4,816,567號)、噬菌體呈現(phage-display)技術(參見，例如，Clackson等人，*Nature*，352: 624-628 (1991)；Marks等人，*J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992)；Sidhu等人，*J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004)；Lee等人，*J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004)；Fellouse，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004)；及Lee等人，*J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004))、及用於在具有部分或全部編碼人類免疫球蛋白序列之人類免疫球蛋白基因座或基因的動物中產生人類或人類樣抗體的技術(參見，例如WO 1998/24893；WO 1996/34096；WO 1996/33735；WO 1991/10741；Jakobovits等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993)；Jakobovits等人，*Nature* 362: 255-258 (1993)；Bruggemann等人，*Year in Immunol.* 7:33 (1993)；美國專利第5,545,807號；第5,545,806號；第5,569,825號；第5,625,126號；第5,633,425號；及第5,661,016號；Marks等人，*Bio/Technology* 10: 779-783 (1992)；Lonberg等人，*Nature* 368: 856-859 (1994)；Morrison，*Nature* 368: 812-813 (1994)；Fishwild等人，*Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996)；Neuberger，*Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996)；及Lonberg及Huszar，*Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995))。

本發明之單株抗體具體而言包括「嵌合」抗體，其中重鏈及/或輕鏈的一部分與源自特定物種或屬於特定抗體種類或亞類之抗體的對應序列相同或同源，而鏈之其餘部分與源自另一物種或屬於另一抗體種類或亞類之抗體的對應序列相同或同源；以及此等抗體之片段，只要其呈現期望生物活性即可(參見例如美國專利第4,816,567號；及Morrison等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。嵌合抗體包括PRIMATIZED®抗體，其中抗體之抗原結合區源自藉由例如用所研究抗原免疫短尾猴而產生之抗體。

「人類化」形式的非人類(例如，鼠科動物)抗體係含有最少量源自非人類免疫球蛋白之序列的嵌合抗體。在一個實施例中，人類化抗體係人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中來自接受者之HVR之殘基經來自非人類物種(例如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物)之HVR(供體抗體)且具有期望特異性、親和性及/或能力之殘基所替代。在一些情況下，人類免疫球蛋白之FR殘基由對應非人類殘基所替代。此外，人類化抗體可包含接受者抗體或供體抗體中不存在之殘基。可實施該等修飾以進一步改良抗體性能。通常，人類化抗體包含實質上全部的至少一個、且通常兩個可變結構域，其中全部的或實質上全部的超變環對應於非人類免疫球蛋白之超變環，且全部的或實質上全部的FR為人類免疫球蛋白序列之FR。人類化抗體亦視情況包含免疫球蛋白恆定區(Fc)(通常為人類免疫球蛋白之恆定區)之至

少一部分。更多細節可參見(例如)Jones等人, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann等人, *Nature* 332:323-329 (1988); 及 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。亦可參見例如, Vaswani及Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle及Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); 及美國專利第6,982,321號及第7,087,409號。

「人類抗體」係具有與人類產生的抗體及/或已使用任何本文所揭示用於製造人類抗體之技術製得的抗體相一致之胺基酸序列者。此人類抗體之定義明確排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。人類抗體可利用熟習此項技術者所習知之各種技術來製備, 包括噬菌體-呈現庫(libraries)。Hoogenboom及Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks等人, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)。亦可使用闡述於Cole等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第77頁(1985); Boerner等人, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)中之方法來製備人類單株抗體。亦參見van Dijk及van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001)。可藉由向經改良以響應抗原攻擊產生人類抗體但內源性基因座已失能之轉基因動物(例如, 經免疫異種小鼠(xenomice))投予抗原來製備人類抗體(關於XENOMOUSETM技術可參見例如美國專利第6,075,181號及第6,150,584號)。關於經由人類B-細胞雜交

瘤技術產生之人類抗體亦可參見(例如)Li等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)。

「物種依賴性抗體」係具有如下特徵之抗體：與來自第一哺乳動物物種之抗原之結合親和性比與來自第二哺乳動物物種之該抗原之同源物之結合親和性強。通常，物種依賴性抗體與人類抗原「特異性結合」(例如，結合親和性(Kd)值不超過約 1×10^{-7} M，較佳不超過約 1×10^{-8} M且較佳不超過約 1×10^{-9} M)，但其對來自第二非人類哺乳動物物種之抗原同源物之結合親和性的強度係其對人類抗原之結合親和性的至多約1/50，或至多約1/500，或至多約1/1000。物種依賴性抗體可為上述各類抗體中之任一種，但較佳係人類化抗體或人類抗體。

本文所用之術語「超變區」、「HVR」或「HV」係指抗體可變結構域中序列高度可變及/或結構上形成所定義環之區域。通常，抗體包含六個HVR；三個在VH中(H1、H2、H3)且三個在VL中(L1、L2、L3)。在天然抗體中，H3及L3展示六個HVR之最大多樣性，且據信尤其H3在賦予抗體精確特異性中發揮獨一無二的作用。參見，例如，Xu等人，*Immunity* 13:37-45 (2000)；Johnson及Wu，*Methods in Molecular Biology* 248:1-25(Lo編輯，Human Press，Totowa，NJ，2003)。事實上，僅由重鏈組成之天然存在之駱駝抗體在不存在輕鏈下具有功能且穩定。參見，例如，Hamers-Casterman等人，*Nature* 363:446-448 (1993)；Sheriff等人，*Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996)。

本文使用且涵蓋多個HVR之描述。Kabat互補性決定區(CDR)係基於序列可變性且使用最為廣泛(Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版。Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。而Chothia係指結構環之位置(Chothia及Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。AbM HVR代表介於Kabat HVR與Chothia結構環之間的折衷方案, 且用於Oxford Molecular之AbM抗體建模軟體中。

「接觸(contact)」HVR係基於對可獲得複雜晶體結構之分析。下文敘述來自該等HVR中之每一者的殘基。

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

HVR可包含下述「延伸HVR」：VL中之24-36或24-34 (L1)、46-56或50-56 (L2)及89-97或89-96 (L3)及VH中之26-35 (H1)、50-65或49-65 (H2)及93-102、94-102或95-102 (H3)。對於該等定義中之每一者根據Kabat等人(見上文)將可變結構域殘基編號。

「框架」或「FR」殘基係除本文所定義HVR殘基以外之彼等可變結構域殘基。

術語「如於Kabat中編號之可變結構域殘基」或「如於Kabat中編號之胺基酸位置」及其變型係指Kabat等人(見上文)中用於所彙編抗體之重鏈可變結構域或輕鏈可變結構域之編號系統。使用該編號系統，實際線性胺基酸序列可含有更少或額外之對應於可變結構域FR或HVR之縮短或插入之胺基酸。例如，重鏈可變結構域可包括在H2之殘基52後之單一胺基酸插入(根據Kabat編號之殘基52a)及重鏈FR殘基82後之插入殘基(例如根據Kabat編號之殘基82a、82b及82c等)。可藉由用「標準」Kabat編號序列比對抗體序列之同源區域來確定給定抗體之殘基之Kabat編號。

通常在涉及可變結構域中之殘基(大致為輕鏈之殘基1-107及重鏈之殘基1-113)時使用Kabat編號系統(例如，Kabat等人，*Sequences of Immunological Interest*. 第5版 .Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。通常在涉及免疫球蛋白重鏈恆定區中之殘基時使用「EU編號系統」或「EU索引」(例如，在上文Kabat等人之文獻中所報告之EU索引)。「如於Kabat中之EU索引」係指人類IgG1 EU抗體之殘基編號。

表述「線性抗體」係指闡述於Zapata等人(1995 *Protein Eng*, 8(10):1057-1062)中之抗體。簡言之，該等抗體包含一對串聯Fd區段(VH-CH1-VH-CH1)，其與互補輕鏈多肽共同形成一對抗原結合區。線性抗體可具有雙特異性或單特

異性。

本文所用之「庫(library)」係指多數抗體或抗體片段序列(例如, 本發明之多肽)或編碼該等序列之核酸, 該等序列之不同之處在於根據本發明方法向該等序列中引入的變體胺基酸之組合。

「噬菌體呈現(phage display)」係以與噬菌體(例如, 絲狀噬菌體)顆粒表面上之至少一部分外殼蛋白組成之融合蛋白形式呈現變體多肽之技術。噬菌體呈現之應用係基於以下事實: 在隨機化蛋白變體之大型庫中可快速有效地對以高親和性與靶抗原結合之彼等序列進行分類。在噬菌體上展示肽及蛋白質庫已用於在上百萬種多肽中篩選具有特定結合特性者。多價噬菌體呈現方法已用於經由與絲狀噬菌體之基因 III 或基因 VIII 融合來展示隨機小肽及小蛋白。Wells 及 Lowman (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:355-362, 及其中所引用之參考文獻。在單價噬菌體呈現中, 蛋白質或肽庫與基因 III 或其一部分融合, 且在野生型基因 III 蛋白存在下以低程度表現, 從而使噬菌體顆粒展示一拷貝融合蛋白或不展示融合蛋白。相對於多價噬菌體其親和力效應降低, 從而使得分類係基於固有配體親和性來進行, 且使用可簡化 DNA 處理之噬菌粒載體。Lowman 及 Wells (1991) *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 3:205-0216。

「噬菌粒」係具有細菌複製起點(例如 ColE1)及噬菌體基因間隔區之拷貝之質粒載體。噬菌粒可用於任何已知噬

菌體，包括絲狀噬菌體及 λ 形噬菌體。通常，質粒亦含有針對抗生素抗性之可選標記。選殖入該等載體中之DNA區段可作為質粒增殖。當向含有該等載體之細胞提供增殖噬菌體顆粒所需要之所有基因時，質粒複製模式改變為滾環式複製以生成質粒DNA一條鏈之拷貝且封裝噬菌體顆粒。噬菌粒可形成感染性或非感染性噬菌體顆粒。此術語包括含有噬菌體外殼蛋白基因或其片段之噬菌粒，該基因或其片段與異源多肽基因連接作為基因融合體以使異源多肽展示於噬菌體顆粒之表面上。

II. 實施本發明之方式

本發明係關於包含抗體之調配物。利用業內可以利用之用於產生抗體之技術來製備調配物中之抗體，實例性方法在下文部分中更詳細地予以闡述。通常，調配物係穩定的水性調配物。在某些實施例中，調配物係醫藥調配物。

抗體針對所研究之抗原。較佳地，抗原係生物學上重要的多肽，並且將抗體投予至患有病症之哺乳動物可在此哺乳動物體內產生治療益處。然而，本發明亦涵蓋針對非多肽抗原之抗體。

當抗原係多肽時，其可為跨膜分子(例如受體)或配體，例如生長因子。實例性抗原包括分子，例如 ox-LDL；ox-ApoB100；腎素；生長激素，包括人類生長激素及牛生長激素；生長激素釋放因子；甲狀旁腺激素；促甲狀腺激素；脂蛋白； α -1-抗胰蛋白酶；胰島素A-鏈；胰島素B-鏈；胰島素原；濾泡刺激激素；降鈣素；促黃體生成激

素；胰高血糖素；凝血因子，例如因子VIII、因子IX、組織因子及溫韋伯氏因子(von Willebrands factor)；抗凝血因子，例如蛋白質C；心房利尿鈉因子；肺表面活性劑；纖溶酶原激活物，例如尿激酶或人類尿或組織型纖溶酶原激活物(t-PA)；鈣蟾肽；凝血酶；造血生長因子；腫瘤壞死因子- α 及腫瘤壞死因子- β ；腦啡肽酶；RANTES(受激活調節之正常T細胞表現及分泌因子)；人類巨噬細胞炎性蛋白(MIP-1- α)；血清白蛋白，例如人類血清白蛋白；苗勒氏抑制物(Muellerian-inhibiting substance)；鬆弛素A-鏈；鬆弛素B-鏈；鬆弛素原；小鼠促性腺激素相關肽；微生物蛋白，例如 β -內醯胺酶；DNA酶；IgE；細胞毒性T-淋巴細胞相關抗原(CTLA)，例如CTLA-4；抑制素；激活素；血管內皮生長因子(VEGF)；VEGFR受體，激素或生長因子受體；蛋白質A或D；類風濕因子；神經營養因子，例如骨源性神經營養因子(BDNF)、神經營養蛋白-3、神經營養蛋白-4、神經營養蛋白-5或神經營養蛋白-6(NT-3、NT4、NT-5或NT-6)、或神經生長因子，例如NGF- β ；血小板源性生長因子(PDGF)；成纖維細胞生長因子，例如aFGF及bFGF；表皮生長因子(EGF)；轉化生長因子(TGF)，例如TGF- α 及TGF- β ，包括TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4或TGF- β 5；胰島素樣生長因子-I及胰島素樣生長因子-II(IGF-I及IGF-II)；des(1-3)-IGF-I(腦IGF-I)、胰島素樣生長因子結合蛋白；CD蛋白，例如CD3、CD4、CD8、CD19及CD20；紅細胞生成素；骨誘導因

子；免疫毒素；骨形態生成蛋白(BMP)；干擾素，例如干擾素- α 、干擾素- β 及干擾素- γ ；集落刺激因子(CSF)，例如，M-CSF、GM-CSF及G-CSF；白細胞介素(IL)，例如，IL-1至IL-10；超氧化物歧化酶；T-細胞受體；表面膜蛋白；衰變加速因子；病毒抗原，例如，AIDS被膜之一部分；轉運蛋白；歸巢受體；地址素；調節蛋白；整合素，例如CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4及VCAM；腫瘤相關抗原，例如HER2、HER3或HER4受體；及任一上文所列示多肽之片段。

在本發明之某些實施例中，本發明所涵蓋之抗體的分子靶標包括ox-LDL。在一個實施例中，本發明抗體係結合人類ox-LDL之抗體。在一個實施例中，本發明抗體係結合人類ox-ApoB100之抗體。

A.調配物之製備

在製備目標抗體後(例如，用於製備可如本發明所揭示進行調配之抗體的技術在下文詳細描述且已為熟習此項技術者所習知)，製備包含其之醫藥調配物。在某些實施例中，擬調配之抗體未經受預先凍乾，且本發明之目標調配物係水性調配物。在某些實施例中，抗體係全長抗體。在一個實施例中，調配物中之抗體係抗體片段，例如F(ab')₂，在此情形下可能需要解決全長抗體時不會發生之問題(例如將抗體修剪成Fab)。藉由考慮例如期望之劑量體積及投予方式來決定存在於調配物中之抗體之治療有效量。調配物中之實例性抗體濃度係自約0.1 mg/ml至約250

mg/ml、或自約10 mg/ml至約200 mg/ml或自約50 mg/ml至約175 mg/ml。

所製備之水性調配物在pH緩衝溶液中包含抗體。本發明之緩衝液具有介於約4.5至約6.5範圍內之pH值。在某些實施例中，pH值介於pH 5.0至6.0範圍內、或介於pH 5.25至5.75範圍內或介於pH 5.3至5.6範圍內。在本發明之某些實施例中，該調配物具有5.5或約5.5之pH值。可將pH值控制在此範圍內之緩衝液的實例包括乙酸鹽(例如組胺酸乙酸鹽、精胺酸乙酸鹽、乙酸鈉)、琥珀酸鹽(例如組胺酸琥珀酸鹽、精胺酸琥珀酸鹽、琥珀酸鈉)、葡萄糖酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸緩衝液及其組合。端視(例如)緩衝液及調配物之期望等滲性而定，緩衝液之濃度可為約1 mM至約600 mM。在某些實施例中，所含組胺酸之濃度係自約5 mM至100 mM，而精胺酸之濃度係自50 mM至500 mM。在一個實施例中，緩衝液係組胺酸乙酸鹽(約20 mM)-精胺酸乙酸鹽(約150 mM)，pH 5.5。在某些實施例中，緩衝液係組胺酸琥珀酸鹽(約20 mM)-精胺酸琥珀酸鹽(約150 mM)，pH 5.5。

可視情況向抗體調配物中添加表面活性劑。實例性表面活性劑包括非離子型表面活性劑，例如聚山梨醇酯(例如，聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80等)或泊洛沙姆(例如，泊洛沙姆188)。所添加表面活性劑的量應可減少所調配抗體之聚集及/或使調配物中之微粒形成最小化及/或減少吸附。例如，表面活性劑可以自約0.001%至約0.5%、較佳地

自約0.005%至約0.2%且較佳地自約0.01%至約0.1%的量存在於調配物中。在一個實施例中，調配物不包含表面活性劑。

在一個實施例中，調配物含有上文所確定之試劑(例如，抗體、緩衝液及/或表面活性劑)且實質上不含一或多種防腐劑，例如苺基醇、苯酚、間-甲酚、氯丁醇及苺索氯銨。在一個實施例中，調配物不包含防腐劑。在另一實施例中，防腐劑可包括於調配物中，尤其在調配物係多劑量調配物時。防腐劑之濃度可介於約0.1%至約2%範圍內，較佳地自約0.5%至約1%。調配物可包括一或多種其他醫藥上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑，例如彼等闡述於Remington's Pharmaceutical Sciences，第16版，Osol, A. 編輯(1980)中者，條件係其不會不利地影響調配物之期望特徵。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對接受者無毒性，且包括：其他緩衝劑；共溶劑；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；螯合劑，例如EDTA；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；可生物降解之聚合物，例如聚酯；及/或鹽形成抗衡離子。

儘管在本發明中對於螯合劑之各個描述通常針對EDTA，但應瞭解本發明亦涵蓋其他金屬離子螯合劑。金屬離子螯合劑已為彼等熟習此項技術者所熟知，且包括(但不一定限於)胺基聚羧酸鹽、EDTA(乙二胺四乙酸)、EGTA(乙二醇-雙(β -胺基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸)、NTA(次氮基三乙酸)、EDDS(乙二胺二琥珀酸鹽)、

PDTA(1,3-丙二胺四乙酸)、DTPA(二伸乙基三胺五乙酸)、ADA(β -丙胺酸二乙酸)、MGCA(甲基甘胺酸二乙酸)等。另外，本發明之一些實施例包含膦酸鹽/膦酸螯合劑。在某些實施例中，調配物含有甲硫胺酸。

本發明調配物亦可視需要含有一種以上用於所治療特定適應症之蛋白質，較佳為彼等不會不利地影響其他蛋白質之具有互補活性之蛋白質。例如，當抗體係抗-oxLDL抗體時，其可與另一藥劑(例如，3-羥基-3-甲基戊二醯基-輔酶A (HMG-CoA)還原酶抑制劑，例如，他汀類藥物(statins))組合。可與抗-oxLDL抗體組合之分子的實例包括但不限於(例如)阿托伐他汀(atorvastatin)、西立伐他汀(cerivastatin)、氟伐他汀(fluvastatin)、洛伐他汀(lovastatin)、美伐他汀(mevastatin)、普伐他汀(provastatin)、瑞舒伐他汀(rosuvastatin)、辛伐他汀(simvastatin)等。該等蛋白質適合以對預期目的有效的量組合存在。通常，他汀類藥物經調配用於經口投予。

擬用於活體內投予之調配物必須係無菌的。此可在製備調配物之前或之後藉由通過無菌過濾膜實施過濾容易地達成。

B.調配物之投予

按照習知方法將調配物投予至需要用抗體進行治療之哺乳動物(較佳為人類)，例如，作為濃注藥物靜脈內投予或經一段時間連續輸注、藉由肌內、腹膜腔內、腦室脊柱內、皮下、關節內、滑膜內、鞘內、經口、局部或吸入途

徑。在一個實施例中，藉由靜脈內投予將調配物投予至哺乳動物。出於該等目的，可例如使用注射器或經由靜脈管路(IV line)來注射調配物。在一個實施例中，藉由皮下投予將調配物投予至哺乳動物。

抗體之適合劑量(「治療有效量」)將端視下列因素而定：例如，擬治療之病狀、病狀之嚴重程度及病程、投予該抗體之目的是預防抑或治療、先前療法、患者之臨床史及對抗體之反應、所用抗體之類型及主治醫師之判斷。適合將抗體一次性地或經一系列治療投予至患者，且可在自診斷起的任何時間投予至患者。抗體可作為唯一治療投予，或可與可用於治療所討論病狀之其他藥物或療法結合投予。

作為一般建議，所投予抗體之治療有效量會介於約0.1 mg/kg至約50 mg/kg患者體重範圍內，無論經一次抑或多次投予，所用抗體之典型範圍為約0.3 mg/kg至約20 mg/kg、或約0.3 mg/kg至約15 mg/kg、或約0.3 mg/kg至約25 mg/kg或約0.3 mg/kg至約30 mg/kg，例如，每天投予一次、或每週投予一次或每兩個月投予一次。然而，亦可使用其他劑量方案。該療法之進度易於藉由習用技術加以監測。

在本發明之某些實施例中，所投予之調配物係抗-oxLDL抗體調配物。動脈壁上大多數膽固醇之沈積係源於LDL。LDL係人類血清中膽固醇之重要載體，且LDL之氧化係其至致動脈粥樣化顆粒之轉化中之重要步驟。為所有

動脈粥樣硬化階段之特徵之炎性過程的激活及調節可與對抗氧化型LDL之免疫反應相關聯。動脈粥樣硬化係急性MI、中風及外周動脈疾病之主要原因。在抗-oxLDL抗體之情形下，可投予治療有效量之抗體來治療動脈粥樣硬化。例如，抗-oxLDL抗體可在高風險患者中用於心血管事件之二級預防及/或降低動脈粥樣硬化之致命風險。該等心血管事件係動脈壁上致動脈粥樣化沈積物之直接結果，其包括但不限於急性心肌梗塞(MI)、中風及外周動脈疾病。同樣亦可利用抗-oxLDL抗體之其他活性。例如，已顯示抗-oxLDL抗體可抑制斑塊形成並預防發生動脈粥樣硬化病變(例如，如Schiopu等人，2004；WO 2004/030607；美國專利第6,716,410號中之動物模型中所闡述)，並在治療數週後有效誘導主動脈中之預先存在之既定動脈粥樣硬化斑塊消退(例如，WO 2007/025781)。

C. 抗體製備

(i) 抗原製備

可使用視情況與其他分子偶聯之溶解性抗原或其片段作為用於製備抗體之免疫原。對於諸如受體等跨膜分子而言，可使用其片段(例如受體之細胞外結構域)作為免疫原。或者，可使用表現跨膜分子之細胞作為免疫原。該等細胞可源自天然來源(例如癌細胞系)，或可為已藉由重組技術轉化而表現跨膜分子之細胞。熟習此項技術者可瞭解其他抗原及其可用於製備抗體之形式。

(ii) 某些基於抗體之方法

較佳藉由多次皮下(sc)注射或腹膜腔內(ip)注射相關抗原及佐劑來在動物中產生多株抗體。有用的是，使用雙功能作用劑或衍生劑(例如，馬來醯亞胺基苯甲醯基磺基琥珀醯亞胺酯(通過半胱胺酸殘基偶聯)、N-羥基琥珀醯亞胺(通過離胺酸殘基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ ，其中R與 R^1 係不同烷基)使相關抗原與在經免疫物種體內具有免疫原性之蛋白質(例如，鑰孔血藍蛋白、血清白蛋白、牛甲狀腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制劑)偶聯。

對動物實施針對抗原、免疫原性偶聯物或衍生物之免疫，如下進行：將(例如)100 μg 或5 μg 蛋白質或偶聯物(分別用於兔子或小鼠)與3體積之弗氏完全佐劑(Freund's complete adjuvant)組合，並將該溶液經皮內注射至多個位點。一個月後，藉由多位點皮下注射用佔初始量1/5至1/10之存於弗氏完全佐劑中之肽或偶聯物對動物實施加強免疫。7天至14天後，抽取動物之血液並對血清進行抗體效價分析。對動物實施加強免疫直至效價達到穩定狀態。較佳地，使用偶聯至不同蛋白質及/或經由不同交聯試劑偶聯之相同抗原之偶聯物對動物實施加強免疫。偶聯物亦可在重組細胞培養物中作為蛋白質融合體來製備。同樣，諸如明礬等聚集劑適用於增強免疫反應。

可利用雜交瘤方法來製備本發明之單株抗體，該方法首先闡述於Kohler等人，*Nature*, 256:495 (1975)中，且另外闡述於(例如)Hongo等人，*Hybridoma*, 14 (3): 253-260

(1995)；Harlow等人，*Antibodies: A Laboratory Manual*，(冷泉港實驗室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)，第2版，1988)；Hammerling等人，*Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)；及Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006)(關於人類-人類雜交瘤)。額外方法包括彼等闡述於(例如)美國專利第7,189,826號中者，該專利係關於自雜交瘤細胞系製備單株人類天然IgM抗體。人類雜交瘤技術(三源雜交瘤(Trioma)技術)闡述於Vollmers及Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005)；及Vollmers及Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)中。

各種其他雜交瘤技術可參見(例如)美國專利第2006/258841號；美國專利第2006/183887號(完全人類抗體)；美國專利第2006/059575號；美國專利第2005/287149號；美國專利第2005/100546號；美國專利第2005/026229號；及美國專利第7,078,492號及第7,153,507號。利用雜交瘤方法製備單株抗體之實例性方案闡述如下。在一個實施例中，免疫小鼠或其他適宜宿主動物(例如倉鼠)以誘發可產生或能夠產生與免疫所用蛋白質特異性結合之抗體的淋巴細胞。藉由多次皮下(sc)注射或腹腔腔內(ip)注射本發明多肽或其片段及佐劑來在動物中產生抗體，該佐劑係例如單磷醯脂A(MPL)/海藻糖二棒杆黴菌酸酯(trehalose dicorynomycolate) (TDM)(Ribi Immunochem. Research公

司，Hamilton，MT)。可利用熟習此項技術者所熟知之方法來製備本發明多肽(例如，抗原)或其片段，例如重組方法，其中一些方法在本發明中進一步闡述。針對抗-抗原抗體對來自經免疫動物之血清進行分析，並視情況投予加強免疫。自產生抗-抗原抗體之動物分離淋巴細胞。或者，可在活體外對淋巴細胞進行免疫。

隨後使用適宜融合劑(例如聚乙二醇)使淋巴細胞與骨髓瘤細胞融合以形成雜交瘤細胞。參見，例如，Goding，*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*，第59-103頁(Academic Press, 1986)。可使用可有效融合、支持所選抗體產生細胞穩定大量產生抗體且對諸如HAT培養基等培養基敏感之骨髓瘤細胞。實例性骨髓瘤細胞包括(但不限於)鼠科動物骨髓瘤細胞系，例如源自MOPC-21及MPC-11小鼠腫瘤之細胞系(可購自沙克研究院細胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center)，San Diego，California USA)及SP-2或X63-Ag8-653細胞(可購自美國典型培養物保藏中心(American Type Culture Collection)，Rockville, Maryland USA)。亦有人闡述將人類骨髓瘤及小鼠-人類雜交骨髓瘤(heteromyeloma)細胞系用於製備人類單株抗體(Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984)；Brodeur等人，*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*，第51-63頁(Marcel Dekker公司，紐約，1987))。

將由此製備之雜交瘤細胞接種於適宜培養基中並使之於

其中生長，例如，含有一或多種可抑制未融合親代骨髓瘤細胞生長或存活之物質的培養基。例如，若親代骨髓瘤細胞缺乏次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(HGPRT或HPRT)，則用於雜交瘤之培養基通常會包括次黃嘌呤、胺基蝶呤及胸苷(HAT培養基)，該等物質可阻止HGPRT缺陷型細胞生長。較佳地，如(例如)Even等人，*Trends in Biotechnology*, 24(3), 105-108 (2006)中所述，使用無血清雜交瘤細胞培養方法來減少源自動物之血清(例如，胎牛血清)之使用。

Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005)闡述使用寡肽作為提高雜交瘤細胞培養之產率的方法。具體而言，標準培養基富含某些胺基酸(丙胺酸、絲胺酸、天冬醯胺、脯胺酸)或蛋白質水解產物組分(fraction)，且由三個至六個胺基酸殘基組成之合成寡肽可顯著阻抑細胞凋亡。該等肽以毫莫耳濃度或更高濃度存在。

可針對結合本發明抗體之單株抗體的產生對生長雜交瘤細胞之培養基進行分析。雜交瘤細胞所產生之單株抗體之結合特異性可藉由免疫沉澱或活體外結合分析(例如放射免疫分析(RIA)或酶聯免疫吸附分析(ELISA))進行測定。單株抗體之結合親和性可藉由例如Scatchard分析來測定。參見，例如，Munson等人，*Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)。

在識別可產生具有期望特異性、親和性及/或活性之抗

體的雜交瘤細胞後，可藉由有限稀釋程序對該等純系實施亞選殖並藉由標準方法使其生長。參見，例如，Goding，見上文。適用於此目的之培養基包括(例如)D-MEM或RPMI-1640培養基。另外，可使雜交瘤細胞作為動物體內之腹水腫瘤在活體內生長。可藉由習用免疫球蛋白純化程序以適當方式將亞純系分泌之單株抗體與培養基、腹水或血清分離，該等免疫球蛋白純化程序係例如蛋白質A-瓊脂糖凝膠、羥基磷灰石層析、凝膠電泳、透析或親和層析。一種自雜交瘤細胞分離蛋白質之程序闡述於美國專利第2005/176122號及美國專利第6,919,436號中。該方法包括在結合過程中使用最少量的鹽(例如易溶鹽)，且較佳地亦在溶析過程中使用少量有機溶劑。

(iii)某些庫篩選方法

可藉由使用組合庫篩選具有期望活性之抗體來製備本發明抗體。例如，熟習此項技術者習知各種用於產生噬菌體呈現庫及篩選該等庫中具有期望結合特徵之抗體的方法。該等方法概述於Hoogenboom等人，*Methods in Molecular Biology* 178:1-37(O'Brien等人編輯，Human Press，Totowa，NJ，2001)。例如，一種製備目標抗體之方法係通過使用噬菌體抗體庫，如Lee等人，*J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93中所述。

原則上，藉由篩選噬菌體庫來選擇合成抗體純系，該等噬菌體庫含有展示融合至噬菌體外殼蛋白之抗體可變區(Fv)之各個片段的噬菌體。藉由親和層析針對期望抗原對

該等噬菌體庫進行淘選。表現能夠結合期望抗原之Fv片段的純系被抗原吸附且由此與庫中之非結合純系分開。隨後自抗原溶析結合純系，並可藉由額外抗原吸附/溶析循環進一步富集。可藉由以下方法來獲得任一本發明抗體：設計適宜抗原篩選程序以選擇目標噬菌體純系，隨後使用來自目標噬菌體純系之Fv序列及闡述於Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第五版，NIH Publication 91-3242，Bethesda MD (1991)，第1-3卷中之適宜恆定區(Fc)序列來構建全長抗體純系。

在某些實施例中，抗體之抗原結合結構域由兩個約110個胺基酸之可變(V)區構成，一個來自輕鏈(VL)且另一個來自重鏈(VH)，二者均呈現三個超變環(HVR)或互補性決定區(CDR)。如Winter等人，*Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)中所述，可變結構域可作為單鏈Fv (scFv)片段(其中VH與VL通過短的柔性肽共價連接)或作為Fab片段(其中其各自融合至恆定結構域且以非共價方式相互作用)在功能上呈現於噬菌體上。本文所用之編碼scFv之噬菌體純系及編碼Fab之噬菌體純系統稱為「Fv噬菌體純系」或「Fv純系」。

如Winter等人，*Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)中所述，可藉由聚合酶鏈反應(PCR)各自選殖VH及VL基因譜(repertoires)並在噬菌體庫中隨機重組，隨後可搜索庫中之抗原結合純系。來自經免疫來源之庫在不需要構建雜交瘤之情況下提供對免疫原具有高親和性之抗體。或者，如

Griffiths 等人，*EMBO J*, 12: 725-734 (1993)所述，可選殖原始譜以提供針對寬廣範圍之非自體抗原以及自體抗原之人類抗體之單一來源。最後，亦可藉由自幹細胞選殖未重排之V-基因區段並使用含有隨機序列之PCR引物編碼高度可變之CDR3區並實現活體外重排以合成方式製備原始庫，如Hoogenboom及Winter，*J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)所述。

在某些實施例中，使用絲狀噬菌體藉由與次要外殼蛋白pIII融合來展示抗體片段。抗體片段可作為單鏈Fv片段(其中VH與VL結構域經由柔性多肽間隔區連接於相同多肽鏈上，例如，如Marks等人，*J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)所述)或作為Fab片段(其中一條鏈融合至pIII且另一條鏈分泌至細菌宿主細胞周質中，其中Fab-外殼蛋白結構裝配體藉由替換一些野生型外殼蛋白而展示於噬菌體表面上，例如，如Hoogenboom等人，*Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991)所述)展示。

通常，自收穫自人類或動物之免疫細胞獲得編碼抗體基因片段之核酸。若期望偏向於抗-抗原純系之庫，則用抗原對個體進行免疫以產生抗體反應，並回收脾細胞及/或循環B細胞或其他外周血淋巴細胞(PBL)以構建庫。在一個實施例中，偏向於抗-抗原純系之人類抗體基因片段庫係藉由以下來獲得：在攜帶功能人類免疫球蛋白基因陣列(且缺乏功能內源性抗體產生系統)之轉基因小鼠中產生抗-抗原抗體反應，由此抗原免疫獲得產生對抗抗原之人類抗

體的B細胞。下文闡述產生人類抗體之轉基因小鼠的形成。

抗-抗原反應性細胞群之額外富集可藉由使用適宜篩選程序分離表現抗原特異性膜結合抗體之B細胞來達成，例如，藉由使用抗原親和層析或將細胞吸附至標記螢光染料之抗原隨後流動激活細胞分選(FACS)來分離細胞。

或者，使用來自未經免疫供體之脾細胞及/或B細胞或其他PBL提供可能抗體譜之更佳代表，而且容許使用其中抗原不具有抗原性之任何動物(人類或非人類)物種構建抗體庫。對於納入活體外抗體基因構建體之庫，自個體收穫幹細胞以提供編碼未重排抗體基因區段之核酸。目標免疫細胞可自各種動物物種獲得，例如人類、小鼠、大鼠、兔形目(lagomorpha)、狼、犬科動物、貓科動物、豬科動物、牛、馬科動物及鳥類物種等。

自目標細胞回收編碼抗體可變基因區段(包括VH及VL區段)之核酸並進行擴增。在重排VH及VL基因庫之情形下，期望DNA可藉由以下來獲得：自淋巴細胞分離基因組DNA或mRNA，隨後使用匹配重排VH及VL基因之5'端及3'端之引物實施聚合酶鏈反應(PCR)，如Orlandi等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989)所述，由此製得用於表現之各種不同V基因譜。可自cDNA及基因組DNA擴增V基因，其中反向引物在編碼成熟V-結構域之外顯子的5'端且正向引物位於J-區段內，如Orlandi等人，(1989)及Ward等人，*Nature*, 341: 544-546 (1989)所述。然而，自

cDNA 擴增時，反向引物亦可位於如 Jones 等人，*Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991)所述之先導外顯子中，且正向引物位於如 Sastry 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989)所述之恆定區內。為使互補性最大化，可將簡併性納入引物中，如 Orlandi 等人，(1989)或 Sastry 等人，(1989)所述。在某些實施例中，藉由使用靶向各 V-基因家族之 PCR 引物來擴增存在於免疫細胞核酸試樣中之所有可得 VH 及 VL 排列以使庫多樣性最大化，例如，如 Marks 等人，*J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)之方法中所述或如 Orum 等人，*Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993)之方法中所述。在將經擴增 DNA 選殖至表現載體中時，可將稀有限制酶切位點引入 PCR 引物內作為一端之標籤(如 Orlandi 等人，(1989)所述)，或藉由使用加標籤之引物進一步 PCR 擴增(如 Clackson 等人，*Nature*, 352: 624-628 (1991)中所述)。

以合成方式重排之 V 基因譜可在活體外自 V 基因區段衍生得到。大多數人類 VH-基因區段已被選殖及測序(報導於 Tomlinson 等人，*J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)中)、及繪圖(報導於 Matsuda 等人，*Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993)中)；可使用該等經選殖區段(包括 H1 及 H2 環之所有重要構象)使用編碼各種不同序列及長度之 H3 環的 PCR 引物來產生各種不同 VH 基因譜，如 Hoogenboom 及 Winter，*J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)中所述。亦可製備所有序列多樣性均集中在單一長度之較長 H3 環中之 VH 譜，如 Barbas 等

人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992)中所述。人類 $V\kappa$ 及 $V\lambda$ 區段已被選殖及測序(報導於 Williams 及 Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)中)，且可用於製備合成的輕鏈譜。合成的 V 基因譜(基於一系列 VH 及 VL 摺疊、及 L3 及 H3 長度)將編碼具有相當大結構多樣性之抗體。在擴增編碼 DNA 之 V-基因後，可按照 Hoogenboom 及 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)之方法在活體外對種系 V-基因區段進行重排。

抗體片段譜可藉由 VH 與 VL 基因譜以數種方式組合在一起來構建。各譜可在不同載體中產生，該等載體在活體外(例如 Hogrefe 等人, *Gene*, 128: 119-126 (1993)中所述)或在活體內藉由組合感染重組，例如 Waterhouse 等人, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993)中所述之 loxP 系統。此活體內重組方法利用 Fab 片段之兩條鏈性質克服大腸桿菌轉化效率所帶來的庫大小限制。各別選殖原始 VH 及 VL 譜，一個選殖至噬菌粒中，另一個選殖至噬菌體載體中。隨後藉由含有噬菌粒之細菌進行噬菌體感染將兩庫組合，由此各細胞含有不同組合且庫大小僅受所存在細胞之數量限制(約 10^{12} 種純系)。兩種載體均含有活體內重組信號，由此 VH 與 VL 基因重組至單一複製子上且共包裝至噬菌體病毒粒子中。該等巨庫提供大量具有良好親和性(K_d^{-1} 約為 10^{-8} M)之不同抗體。

或者，該等譜可依序選殖至相同載體中(例如 Barbas 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991)中所

述)，或藉由PCR裝配在一起並隨後選殖(例如 Clackson 等人，*Nature*, 352: 624-628 (1991)中所述)。亦可利用PCR裝配使VH及VL DNAs與編碼柔性肽間隔區之DNA連接以形成單鏈Fv (scFv)譜。在另一技術中，利用「細胞內PCR裝配」以藉由PCR將VH與VL基因組合於淋巴細胞內，隨後選殖所連接基因之譜，如Embleton等人，*Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992)中所述。

原始庫(天然或合成)所產生之抗體可具有中等親和性(K_d^{-1} 為約 10^6 M^{-1} 至 10^7 M^{-1})，但親和性成熟亦可在活體外藉由構建二級庫並自此二級庫再選擇而模擬，如上Winter等人(1994)中所述。例如，在活體外可藉由使用易錯聚合酶(報導於Leung等人，*Technique*, 1: 11-15 (1989)中)於Hawkins等人，*J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992)之方法中或於Gram等人，*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 3576-3580 (1992)之方法中隨機引入突變。另外，親和性成熟可藉由例如使用PCR以攜帶跨所關注CDR之隨機序列的引物在所選各Fv純系中使一或多個CDRs隨機突變並篩選較高親和性之純系來實施。WO 9607754(1996年3月14日公開)闡述一種誘導免疫球蛋白輕鏈之互補決定區中發生誘變以產生輕鏈基因庫之方法。另一有效方法係將噬菌體呈現所選擇之VH或VL結構域與由未免疫供體所獲得天然存在的V結構域變體譜重組，及在數輪鏈再改組(chain reshuffling)中篩選較高親和性者，如Marks等人，*Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992)中所述。該技術能夠產生具有約 10^{-9} M 或更小

親和性之抗體及抗體片段。

庫篩選可藉由熟習此項技術者所習知之各種技術來達成。例如，可使用抗原來塗敷吸附板之各孔，使抗原表現於黏附至吸附板上之宿主細胞上或用於細胞分選，或偶聯至生物素以使用塗敷有抗生蛋白鏈菌素之珠粒進行俘獲，或用於淘選噬菌體呈現庫之任一其他方法中。

在適於使至少一部分噬菌體顆粒與吸附劑結合之條件下使噬菌體庫試樣與固定的抗原接觸。通常，選擇包括pH值、離子強度、溫度及諸如此類在內之條件以模擬生理學條件。洗滌結合至固相之噬菌體，並隨後藉由酸(例如，如Barbas等人，*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991)中所述)、或藉由鹼(例如，如Marks等人，*J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)中所述)、或藉由抗原競爭(例如，以類似於Clackson等人，*Nature*, 352: 624-628 (1991)之抗原競爭方法的程序)進行溶析。在一輪選擇中噬菌體可富集20-1,000倍。而且，可使所富集之噬菌體在細菌培養物中生長，並實施更多輪選擇。

選擇效率取決於許多因素，包括洗滌期間之解離動力學及單一噬菌體上之多個抗體片段是否可同時與抗原接合。可藉由使用短時間洗滌、多價噬菌體呈現及高塗敷密度之固相抗原來保留具有快速解離動力學(及弱結合親和性)之抗體。高密度不僅通過多價相互作用穩定噬菌體，且亦有利於重新結合已解離之噬菌體。可藉由使用長時間洗滌及單價噬菌體呈現(如Bass等人，*Proteins*, 8: 309-314 (1990)

及 WO 92/09690 中所述)及低抗原塗敷密度(如 Marks 等人, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992)中所述)來促進具有緩慢解離動力學(及良好結合親和性)之抗體的選擇。

可在對抗原具有不同親和性(甚至具有略微不同之親和性)之噬菌體抗體之間進行選擇。然而, 所選抗體之隨機突變(例如, 如在一些親和性成熟技術中所實施)可能產生許多突變體, 大多數結合至抗原, 且少數具有較高親和性。在有限抗原下, 極高親和性噬菌體可能會被競爭出局。為保留所有具有較高親和性之突變體, 可將噬菌體與過量生物素化抗原一起培育, 但生物素化抗原之莫耳濃度較靶標對抗原之莫耳親和常數為低。隨後可藉由塗敷有抗生蛋白鏈菌素之順磁性珠粒來俘獲高親和性結合噬菌體。該「平衡俘獲」容許按照抗體之結合親和性來選擇抗體, 同時靈敏性使得能夠自大量具有較低親和性之噬菌體分離親和性僅比其高兩倍的突變體純系。亦可操縱洗滌結合至固相之噬菌體時所用之條件以基於解離動力學而進行區別。

可基於活性來選擇抗-抗原純系。在某些實施例中, 本發明提供結合天然表現抗原之活細胞或結合自由浮動抗原或附著至其他細胞結構上之抗原的抗-抗原抗體。可藉由以下來選擇對應於該等抗-抗原抗體之 Fv 純系: (1)自如上所述之噬菌體庫分離抗-抗原純系, 並視情況藉由使所分離之噬菌體純系群體在適宜細菌宿主中生長來擴增該群體; (2)選擇抗原及第二蛋白質, 期望分別對其具有阻斷及

非阻斷活性；(3)將該等抗-抗原噬菌體純系吸附至固定的抗原上；(4)使用過量第二蛋白質來溶析任何不期望之純系，該等純系識別與第二蛋白質之結合決定子重疊或共享之抗原結合決定子；及(5)溶析在步驟(4)後仍然被吸附之純系。視情況，可藉由將本文所述之選擇程序重複一或多次進一步富集具有期望阻斷/非阻斷特性之純系。

容易地分離編碼本發明之衍生自雜交瘤之單株抗體或噬菌體呈現Fv純系的DNA，並利用習用程序進行測序(例如，藉由使用經設計以自雜交瘤或噬菌體DNA模板特異性地擴增目標重鏈及輕鏈編碼區之寡核苷酸引物)。分離後，可將DNA立即置於表現載體中，隨後將其轉染至原本不產生免疫球蛋白之宿主細胞(例如大腸桿菌(*E. coli*)細胞、猿猴COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞)中以及在重組宿主細胞中實現期望單株抗體之合成。有關編碼抗體之DNA在細菌中重組表現之綜述文章包括Skerra等人，*Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993)及Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151 (1992)。

可將編碼本發明之Fv純系的DNA與編碼重鏈及/或輕鏈恆定區之已知DNA序列(例如，合適DNA序列可自Kabat等人(見上文)獲得)組合，以形成編碼完全或部分長度之重鏈及/或輕鏈之純系。應瞭解，任一同種型之恆定區可用於此目的，包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恆定區，且該等恆定區可自任何人類或動物物種獲得。本文所用之「嵌合」及「雜合體」抗體之定義中包括衍生自一種動物(例

如人類)物種之可變結構域DNA且隨後融合至另一動物物種之恆定區DNA以形成「雜合體」全長重鏈及/或輕鏈之編碼序列的Fv純系。在某些實施例中，衍生自人類可變DNA之Fv純系融合至人類恆定區DNA以形成全部或部分長度之人類重鏈及/或輕鏈之編碼序列。

編碼本發明之衍生自雜交瘤之抗-抗原抗體的DNA亦可經修飾，例如，藉由用人類重鏈及輕鏈恆定結構域之編碼序列取代衍生自雜交瘤純系之同源鼠科動物序列(例如，如Morrison等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)中所述)。編碼衍生自雜交瘤或Fv純系之抗體或片段的DNA可藉由共價連接至免疫球蛋白編碼序列、非免疫球蛋白多肽之全部或部分編碼序列進一步經修飾。以此方式，製備具有本發明之衍生自Fv純系或雜交瘤純系之抗體的結合特異性的「嵌合」或「雜合體」抗體。

(iv)人類化抗體及人類抗體

用於人類化非人類抗體之各種方法已為熟習此項技術者所習知。例如，人類化抗體具有自非人類來源引入其中之一或多個胺基酸殘基。該等非人類胺基酸殘基通常稱為「輸入」殘基，其通常取自「輸入」可變結構域。人類化基本上可按照Winter及其同事之方法藉由用齧齒類動物之CDR序列取代人類抗體之對應序列來實施(Jones等人，*Nature*, 321:522-525 (1986)；Riechmann等人，*Nature*, 332:323-327 (1988)；Verhoeyen等人，*Science*, 239:1534-1536 (1988))。因此，此等「人類化」抗體係嵌合抗體(美

國專利第4,816,567號)，其中實質上少於一個完整人類可變結構域之部分已由來自非人類物種之對應序列所取代。實際上，人類化抗體通常為人類抗體，其中一些CDR殘基及可能一些FR殘基由齧齒類動物抗體中類似位點之殘基取代。

欲用於製備人類化抗體之人類可變結構域之選擇(輕鏈及重鏈二者)對於降低抗原性具有極其重要的意義。根據所謂「最佳擬合」方法，針對習知人類可變結構域序列之完整庫篩選齧齒類動物抗體可變結構域之序列。然後，將與齧齒類動物序列最接近之人類序列視為人類化抗體之人類框架區(FR)(Sims等人，*J. Immunol.* 151: 2296 (1993)；Chothia等人，*J. Mol. Biol.* 196: 901 (1987))。另一方法使用衍生自特定輕鏈或重鏈亞群之所有人類抗體共有序列的特定框架。同一框架可用於若干不同之人類化抗體(Carter等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992)；Presta等人，*J. Immunol.*, 151:2623 (1993))。

更為重要的是，經人類化之抗體需保留對抗原之高親和性及其他有利的生物特性。為達成此目標，根據該方法之一個實施例，藉由使用親代與人類化序列之三維模型分析親代序列及各種概念性人類化產物之方法來製備人類化抗體。三維免疫球蛋白模型通常可自市場購得且已為熟習此項技術者所熟知。可使用電腦程式，該等電腦程式可闡明並展示所選候選免疫球蛋白序列之可能的三維構象結構。通過觀察此等展示內容可分析此等殘基在候選免疫球蛋白

序列功能行使中之可能作用，即分析可影響候選免疫球蛋白與其抗原相結合之能力的殘基。以此方式，可自接受者及輸入性序列中選擇FR殘基並將其組合以達成期望抗體特徵，例如對靶抗原之增加的親和性。通常，超變區殘基直接且最為實質性地參與影響抗原結合。

可藉由將選自衍生自人類之噬菌體呈現庫的Fv純系可變結構域序列與如上所述之已知人類恆定結構域序列組合來構建本發明之人類抗體。或者，可藉由雜交瘤方法來製備本發明之人類單株抗體。亦有人闡述將人類骨髓瘤及小鼠-人類雜交骨髓瘤細胞系用於製備人類單株抗體，例如，Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984)；Brodeur等人，*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*，第51-63頁(Marcel Dekker公司，紐約，1987)；及Boerner等人，*J. Immunol.*, 147: 86 (1991)。

可產生轉基因動物(例如小鼠)，該等轉基因動物經免疫後能夠在不產生內源性免疫球蛋白之情況下產生完整人類抗體譜。例如，有人曾闡述嵌合及種系突變小鼠中抗體重鏈連接區(J_H)基因之純合缺失會導致內源性抗體產生之完全抑制。將人類種系免疫球蛋白基因陣列轉移至該等種系突變小鼠中可在受到抗原攻擊後引起人類抗體的產生。參見，例如，Jakobovits等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993)；Jakobovits等人，*Nature*, 362:255-258 (1993)；Bruggermann等人，*Year in Immuno.*, 7:33 (1993)；及Duchosal等人，*Nature* 355:258 (1992)。

亦可利用基因改組自非人類(例如齧齒類動物)抗體獲得人類抗體，其中人類抗體與起始非人類抗體具有類似之親和性及特異性。根據此方法(其亦被稱為「表位印跡」)，用人類V結構域基因譜替代藉由本文所述噬菌體呈現技術所獲得之非人類抗體片段的重鏈或輕鏈可變區，產生非人類鏈/人類鏈scFv或Fab嵌合體之群體。利用抗原進行選擇以分離非人類鏈/人類鏈嵌合scFv或Fab，其中該人類鏈恢復在移除初始噬菌體呈現純系中之對應非人類鏈後受破壞之抗原結合位點，即，表位決定(印跡)人類鏈配偶體之選擇。當重複該過程以替代剩餘非人類鏈時，獲得人類抗體(參見1993年4月1日公開之PCT WO 93/06213)。與藉由CDR移植之非人類抗體之傳統人類化不同，該技術提供不具有非人類來源之FR或CDR殘基的完全人類抗體。

(v) 抗體片段

可藉由傳統手段(例如酶促消化)或藉由重組技術來產生抗體片段。在某些情形下，使用抗體片段較使用全抗體具有優勢。片段之較小尺寸容許快速清除，且可更好地進入某些組織。對於某些抗體片段之綜述可參見Hudson等人(2003) *Nat. Med.* 9:129-134。

人們已經研發出多種用於製備抗體片段之技術。傳統上，該等片段係經由對完整抗體實施蛋白水解消化而獲得(參見，例如，Morimoto等人，*Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)；及Brennan等人，*Science*, 229:81 (1985))。然而，此等片段如今可直接藉由

重組宿主細胞來製備。Fab、Fv及ScFv抗體片段皆可表現於大腸桿菌中並自大腸桿菌分泌，由此能夠容易地製備大量該等片段。可自上文所論述之抗體噬菌體庫分離抗體片段。或者，可自大腸桿菌直接回收Fab'-SH片段，且以化學方式偶合以形成F(ab')₂片段(Carter等人，*Bio/Technology* 10:163-167 (1992))。根據另一方法，可直接自重組宿主細胞培養物中分離出F(ab')₂片段。包含補救受體結合表位殘基之具有延長之活體內半衰期的Fab及F(ab')₂片段闡述於美國專利第5,869,046號中。熟習此項技術者將明瞭用於產生抗體片段之其他技術。在某些實施例中，抗體係單鏈Fv片段(scFv)。參見WO 93/16185；美國專利第5,571,894號；及第5,587,458號。Fv及scFv係唯一的無恆定區之具有完整結合位點的物質；因此，其可適於在活體內使用期間降低非特異性結合。可構建scFv融合蛋白以在scFv之胺基或羧基末端獲得效應子蛋白之融合體。參見*Antibody Engineering*，Borrebaeck編輯，見上文。抗體片段亦可為「線性抗體」，例如，如美國專利第5,641,870號中所闡述。該等線性抗體可具有單特異性或雙特異性。

(vi)多特異性抗體

多特異性抗體具有針對至少兩種不同表位之結合特異性，其中該等表位通常來自不同抗原。儘管該等分子通常僅結合兩種不同表位(即雙特異性抗體，BsAb)，但在本文中使用时此表述亦涵蓋具有額外特異性之抗體，例如三特異性抗體。可製備呈全長抗體或抗體片段(例如F(ab')₂雙特

異性抗體)形式的雙特異性抗體。

製備雙特異性抗體之方法已為熟習此項技術者所習知。全長雙特異性抗體之傳統製備係基於兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之共表現，其中該兩條鏈具有不同特異性(Millstein等人，*Nature*, 305:537-539 (1983))。由於免疫球蛋白重鏈及輕鏈係隨機組合，因此該等雜交瘤(四源雜交瘤(quadroma))可產生10種不同抗體分子之可能混合物，其中僅一種具有正確的雙特異性結構。通常藉由親和層析步驟進行之正確分子的純化相當繁瑣，且產物產率很低。類似程序揭示於WO 93/08829及Traunecker等人，*EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991)中。

根據一不同方法，可使具有期望結合特異性之抗體可變結構域(抗體-抗原結合位點)與免疫球蛋白恆定結構域序列融合。融合體較佳具有免疫球蛋白重鏈恆定結構域，該結構域包含鉸鏈區、CH2區及CH3區中之至少一部分。通常使至少一個融合體中存在含有輕鏈結合所需位點之第一重鏈恆定區(CH1)。將編碼免疫球蛋白重鏈融合體及(若需要)免疫球蛋白輕鏈之DNA插入單獨表現載體中，並共轉染至適宜宿主有機體中。當用於構建之三種多肽鏈之不等比率可提供最優產率時，此可為調整實施例中三種多肽片段之相互比例提供較大靈活性。然而，當以等比率表現至少兩種多肽鏈可導致高產率時或當該等比率並無重要意義時，可將兩種或所有三種多肽鏈之編碼序列插入一個表現載體中。

在本方法之一個實施例中，雙特異性抗體係由一臂中具有第一結合特異性之雜合免疫球蛋白重鏈與另一臂中之雜合免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(提供第二結合特異性)構成。人們發現此不對稱結構有助於分離期望雙特異性化合物與不期望之免疫球蛋白鏈組合，此乃因僅在一半雙特異性分子中存在免疫球蛋白輕鏈使得易於分離。此方法揭示於WO 94/04690中。關於產生雙特異性抗體之更多細節可參見(例如)Suresh等人，*Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)。

根據WO 96/27011中所述之另一方法，可將抗體分子對之間之介面設計成可使自重組細胞培養物回收之異源二聚體之百分比最大化。一個介面包含抗體恆定結構域之C_H3結構域的至少一部分。在該方法中，用較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)替代來自第一抗體分子介面之一或多個小的胺基酸側鏈。用較小側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)替代較大胺基酸側鏈，藉此在第二抗體分子介面上形成與較大側鏈具有相同或類似尺寸之補償「腔」。此提供將異源二聚體產率提高至高於其他不期望之終產物(例如同源二聚體)的途徑。

雙特異性抗體包括交聯或「異源偶聯(heteroconjugate)」抗體。例如，呈異源偶聯形式之抗體之一可偶合至抗生物素蛋白，而另一個可偶合至生物素。曾提出此等抗體可(例如)使免疫系統細胞靶向不期望之細胞(美國專利第4,676,980號)，且可用於治療HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373及歐洲專利第03089號)。可使用任何簡便的交聯

方法來製備異源偶聯抗體。適宜交聯劑已為熟習此項技術者所熟知，且與許多交聯技術一道揭示於美國專利第4,676,980號中。

自抗體片段產生雙特異性抗體之技術亦已闡述於文獻中。例如，可使用化學鍵結來製備雙特異性抗體。Brennan等人，*Science*, 229: 81 (1985)闡述以蛋白水解方式裂解完整抗體以產生 $F(ab')_2$ 片段之程序。在二硫醇錯合劑亞砷酸鈉存在下，將該等片段還原以穩定鄰近的二硫醇並阻止形成分子間二硫化物。然後將所產生之 Fab' 片段轉化成硫代硝基苯甲酸鹽(TNB)衍生物。然後藉由巰乙胺還原將 Fab' -TNB衍生物之一重新轉化成 Fab' -硫醇並使之與等莫耳量的其他 Fab' -TNB衍生物混合以形成雙特異性抗體。可使用所產生之雙特異性抗體作為選擇性固定酶之試劑。

最新進展已使自大腸桿菌直接回收 Fab' -SH片段變得容易進行，該等片段可以化學方式偶合以形成雙特異性抗體。Shalaby等人，*J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)闡述完全人類化之雙特異性抗體 $F(ab')_2$ 分子之產生。每一 Fab' 片段皆可自大腸桿菌單獨分泌且對其實施活體外定向化學偶合以形成雙特異性抗體。

文獻中亦已闡述各種自重組細胞培養物直接製備並分離雙特異性抗體片段之技術。例如，可使用白胺酸拉鏈產生雙特異性抗體。Kostelny等人，*J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)。藉由基因融合將來自Fos及Jun蛋白質之白胺酸拉鏈肽連接至兩種不同抗體之 Fab' 部分上。使抗體同源

二聚體在鉸鏈區經還原以形成單體，且隨後重新氧化以形成抗體異源二聚體。此方法亦可用於產生抗體同源二聚體。Hollinger等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，90:6444-6448 (1993)闡述之「雙抗體」技術為製備雙特異性抗體片段提供了一種替代途徑。該等片段包含經連接子相連之重鏈可變結構域(V_H)與輕鏈可變結構域(V_L)，該連接子過短而無法使同一鏈上之兩個結構域間進行配對。因此，使一個片段的 V_H 及 V_L 結構域與另一片段的互補 V_L 及 V_H 結構域進行配對，由此形成兩個抗原結合位點。亦曾有人報導藉由使用單鏈Fv (sFv)二聚體來製備雙特異性抗體片段的另一策略。參見Gruber等人，*J. Immunol*，152:5368 (1994)。

本發明涵蓋二價以上之抗體。例如，可製備三特異性抗體。Tuft等人，*J. Immunol*，147: 60 (1991)。

(vii)單結構域抗體

在一些實施例中，本發明之抗體係單結構域抗體。單結構域抗體係單一多肽鏈，其包含抗體重鏈可變結構域之全部或一部分或抗體輕鏈可變結構域之全部或一部分。在某些實施例中，單結構域抗體係人類單結構域抗體(Domantis公司，Waltham, MA；參見，例如，美國專利第6,248,516 B1號)。在一個實施例中，單結構域抗體由抗體重鏈可變結構域之全部或一部分組成。

(viii)抗體變體

在一些實施例中，本發明涵蓋本文所述抗體之胺基酸序列修飾。例如，可能期望改良抗體之結合親和性及/或其

他生物特性。抗體之胺基酸序列變體可藉由向編碼該抗體之核苷酸序列中引入合適變化或藉由肽合成來製備。此等修飾包括(例如)抗體胺基酸序列中殘基之缺失及/或插入及/或取代。可實施缺失、插入及取代之任一組合以獲得最終構建體，前提條件為最終構建體具有期望特徵。可在製備序列時在標的抗體胺基酸序列中引入胺基酸改變。

(ix) 抗體衍生物

可對本發明抗體實施進一步修飾以含有熟習此項技術者習知且容易獲得之額外非蛋白質性部分。在某些實施例中，適於衍生化抗體之部分係水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯啉酮、聚-1,3-二氧戊環、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/馬來酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或隨機共聚物)、及葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯啉酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、聚環氧丙烷/環氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如，甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由於在水中穩定而在製造中具有優勢。聚合物可具有任何分子量，且可為具支鏈或非具支鏈。附接至抗體之聚合物的數量可變化，且若附接一種以上的聚合物，該一種以上的聚合物可為相同或不同的分子。通常，用於衍生化之聚合物的數量及/或類型可基於包括(但不限於)以下在內之考慮因素來決定：擬改良之抗體的特定特性或功能、抗體衍生物在界定條件下是否會用於療法等。

(x)載體、宿主細胞及重組方法

亦可利用重組方法來製備抗體。重組製備抗-抗原抗體時，分離編碼該抗體之核酸並將該核酸插入可複製載體中，以供進一步選殖(擴增DNA)或表現。編碼該抗體之DNA可使用習用程序容易地加以分離及測序(例如，藉由使用能夠特異性結合編碼該抗體重鏈及輕鏈之基因之寡核苷酸探針來實施)。可使用多種載體。載體組件通常包括(但不限於)一或多種以下組件：信號序列、複製起點、一或多個標記基因、增強子元件、啟動子及轉錄終止序列。

(a)信號序列組件

本發明抗體不僅可以重組方式直接製備，且亦可作為與異源多肽之融合多肽以重組方式來製備，該異源多肽較佳為信號序列或在成熟蛋白質或多肽之N末端具有特異性切割位點之其他多肽。所選異源信號序列較佳係由宿主細胞識別及加工(例如，藉由信號肽酶切割)者。對於不能識別及加工天然抗體信號序列之原核宿主細胞而言，可用選自(例如)鹼性磷酸酶、青黴素酶、lpp或熱穩定腸毒素II前導序列之群之原核信號序列取代該信號序列。對於酵母分泌，該天然信號序列可用(例如)酵母轉化酶前導序列、 α 因子前導序列(包括酵母屬(*Saccharomyces*)及克魯維酵母屬(*Kluyveromyces*) α 因子前導序列)、或酸性磷酸酯酶前導序列、白色念珠菌(*C. albicans*)葡萄糖澱粉酶前導序列、或WO 90/13646中闡述的信號序列取代。在哺乳動物細胞表現中，可利用哺乳動物信號序列以及病毒分泌前導序

列，例如單純疱疹 gD 信號。

(b)複製起點

表現及選殖載體二者均含有使載體能夠在一或多種所選宿主細胞內複製之核酸序列。通常，在選殖載體中，此序列係使載體能夠獨立於宿主染色體 DNA 進行複製者，且包括複製起點或自主複製序列。對於各種細菌、酵母及病毒而言，該等序列已眾所周知。來自質粒 pBR322 之複製起點適用於大多數革蘭氏陰性 (Gram-negative) 細菌，2 μ 質粒起點適用於酵母，且各種病毒起點 (SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV 或 BPV) 可用於哺乳動物細胞中之選殖載體。通常，哺乳動物表現載體不需要複製起點組件 (通常可使用 SV40 起點，此僅係由於其含有早期啟動子)。

(c)選擇基因組件

表現及選殖載體可含有選擇基因，其亦稱為可選標記。典型選擇基因編碼具有以下性質之蛋白質：(a) 賦予對抗生素或其他毒素 (例如，胺苄西林 (ampicillin)、新黴素、胺甲喋呤 (methotrexate) 或四環素) 之抗性；(b) 補足營養缺陷型不足；或 (c) 供給無法自複合培養基獲得之重要營養素，例如編碼桿菌 (*Bacilli*) 之 D-丙胺酸消旋酶之基因。

選擇方案之一個實例使用藥物來阻滯宿主細胞生長。彼等經異源基因成功轉化之細胞可產生賦予藥物抗性之蛋白，且因此可在選擇方案中存活。該顯性選擇之實例使用藥物新黴素、黴酚酸及潮黴素。

哺乳動物細胞之適宜可選標記之另一實例係能夠鑒定有

能力吸收編碼抗體之核酸(例如 DHFR、麩胺醯胺合成酶(GS)、胸苷激酶、金屬硫蛋白-I及金屬硫蛋白-II、較佳地靈長類動物金屬硫蛋白基因、腺苷脫胺酶、鳥胺酸脫羧酶等)的細胞者。

例如，藉由在含有胺甲喋呤(Mtx)(DHFR之競爭性拮抗劑)之培養基中培養轉化體來鑒定經DHFR基因轉化之細胞。在該等條件下，對DHFR基因與任一其他共轉化核酸實施擴增。可使用缺乏內源性DHFR活性之中國倉鼠卵巢(CHO)細胞系(例如，ATCC CRL-9096)。

或者，藉由在含有L-甲硫胺酸磺醯亞胺(Msx)(一種GS抑制劑)之培養基中培養轉化體來鑒定經GS基因轉化之細胞。在該等條件下，對GS基因與任一其他共轉化核酸實施擴增。GS選擇/擴增系統與上文所述DHFR選擇/擴增系統可組合使用。

或者，經編碼目標抗體、野生型DHFR基因及另一可選標記(例如胺基糖苷3'-磷酸轉移酶(APH))之DNA序列轉化或共轉化之宿主細胞(尤其含有內源性DHFR之野生型宿主細胞)可藉由在含有針對可選標記之選擇劑(例如胺基糖苷類抗生物素，例如卡那黴素(kanamycin)、新黴素或G418)之培養基中使細胞生長來進行選擇。參見美國專利第4,965,199號。

適用於酵母之選擇基因係存於酵母質粒YRp7中之*trp1*基因(Stinchcomb等人，*Nature*, 282:39 (1979))。*trp1*基因可為缺乏在色胺酸中生長之能力之酵母突變體菌株(例如，

ATCC第44076號或PEP4-1)提供選擇標記。Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)。則酵母宿主細胞基因組中 $trp1$ 損傷之存在可提供有效環境以檢測不存在色胺酸時由生長所導致的轉化。類似地，*Leu2*缺陷型酵母菌株(ATCC 20,622或38,626)係藉由具有*Leu2*基因之已知質粒來補足。

此外，得自1.6 μ m環狀質粒pKD1之載體可用於克魯維酵母屬酵母之轉化。或者，對於乳酸克魯維酵母(*K. lactis*)，已報導大規模產生重組體牛凝乳酶之表現系統。Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990)。亦已揭示藉由克魯維酵母屬之工業菌株分泌成熟重組體人類血清白蛋白之穩定多拷貝表現載體。Fleer等人，*Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)。

(d)啟動子組件

表現及選殖載體通常含有可由宿主有機體識別且與編碼抗體之核酸可操作地連接之啟動子。適合與原核宿主一起使用之啟動子包括 $phoA$ 啟動子、 β -內醯胺酶及乳糖啟動子系統、鹼性磷酸酶啟動子、色胺酸(trp)啟動子系統及雜合啟動子(例如tac啟動子)。然而，其他已知細菌啟動子亦適合。用於細菌系統之啟動子亦可含有與編碼抗體之DNA可操作地連接之Shine-Dalgarno (S.D.)序列。

對於真核生物而言，啟動子序列係已知的。事實上，所有真核基因皆具有AT-富集區，其位於轉錄起始位點上游約25到30個鹼基處。在許多基因之轉錄開始點上游70至80個鹼基處發現的另一序列係CNCAAT區，其中N可為任一

核苷酸。大多數真核基因之3'端處為AATAAA序列，其可能係向編碼序列之3'端添加多腺苷酸(poly A)尾之信號。所有該等序列皆適當地插入真核生物表現載體中。

與酵母宿主一起使用之適宜啟動子序列之實例包括3-磷酸甘油酸酯激酶或其他糖酵解酶(例如，烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脫氫酶、己糖激酶、丙酮酸脫羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸異構酶、3-磷酸甘油酸酯變位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖異構酶、磷酸葡萄糖異構酶及葡糖激酶)之啟動子。

其他酵母啟動子係具有藉由培養條件控制轉錄之額外優勢之可誘導啟動子，其為醇脫氫酶2、異構細胞色素C、酸性磷酸酯酶、與氮代謝相關之降解酶、金屬硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脫氫酶、及負責麥芽糖與半乳糖利用之酶之啟動子區。適用於酵母表現之載體及啟動子在EP 73,657中有進一步闡述。酵母增強子與酵母啟動子一起使用也較為有利。

在哺乳動物宿主細胞中自載體轉錄抗體可受(例如)以下啟動子控制：自病毒(例如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(例如腺病毒2)、牛乳頭瘤病毒、鳥類肉瘤病毒、巨細胞病毒、逆轉錄病毒、乙型肝炎病毒、猿猴病毒(Simian Virus) 40 (SV40))基因組獲得之啟動子、或自異源哺乳動物啟動子獲得之啟動子(例如，肌動蛋白啟動子或免疫球蛋白啟動子)、自熱激啟動子獲得之啟動子，條件係該等啟動子皆與宿主細胞系統相容。

SV40病毒之早期及晚期啟動子可方便地以亦含有SV40病毒複製起點之SV40限制性片段形式而獲得。人類巨細胞病毒之立即早期啟動子係方便地以HindIII E限制性片段形式來獲得。使用牛乳頭瘤病毒作為載體在哺乳動物宿主內表現DNA的系統揭示於美國專利第4,419,446號中。該系統的修改形式闡述於美國專利第4,601,978號中。亦參見Reyes等人, *Nature* 297:598-601 (1982), 其係關於在來自單純皰疹病毒之胸苷激酶啟動子的控制下在小鼠細胞中表現人類 β -干擾素cDNA。或者, 勞斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus)長末端重複序列可用作啟動子。

(e)增強子元件組件

高等真核生物對編碼本發明抗體之DNA的轉錄通常可藉由將增強子序列插入載體中來增強。當前已知許多來自哺乳動物基因(珠蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、 α -甲胎蛋白及胰島素)之增強子序列。然而, 通常可使用來自真核細胞病毒之增強子。實例包括位於複製起點遲側(late side)上之SV40增強子(bp 100-270)、巨細胞病毒早期啟動子增強子、位於複製起點遲側上之多瘤病毒增強子及腺病毒增強子。關於激活真核啟動子之增強元件亦可參見Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982)。增強子可在抗體編碼序列之5'或3'位置剪接至載體中, 但較佳係位於啟動子之5'位點。

(f)轉錄終止組件

用於真核宿主細胞(酵母、真菌、昆蟲、植物、動物、人類細胞或來自其他多細胞有機體之有核細胞)中之表現

載體亦可含有終止轉錄及穩定mRNA所需之序列。該等序列通常可自真核生物或病毒DNA或cDNA之5'及(偶而)3'非轉譯區獲得。該等區域含有在編碼抗體之mRNA的非轉譯部分中轉錄為多腺苷酸化片段之核苷酸區段。一種有用的轉錄終止組件係牛生長激素多腺苷酸化區。參見WO 94/11026及本文所揭示之表現載體。

(g) 宿主細胞之選擇及轉化

在本文中，適於選殖或表現載體中DNA之宿主細胞係上述原核細胞、酵母細胞或高等真核細胞。用於此目的之適宜原核生物包括諸如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性有機體等真細菌，例如腸桿菌科(Enterobacteriaceae)，例如埃希氏菌屬(*Escherichia*)(例如，大腸桿菌)、腸桿菌屬(*Enterobacter*)、歐文氏菌屬(*Erwinia*)、克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)、變形桿菌屬(*Proteus*)、沙門氏菌屬(*Salmonella*)(例如，鼠傷寒沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*))、沙雷菌屬(*Serratia*)(例如，黏質沙雷菌(*Serratia marcescans*))、及志賀氏菌屬(*Shigella*)、以及桿菌屬(*Bacilli*)(例如枯草桿菌(*B. subtilis*)及地衣芽孢桿菌(*B. licheniformis*))(例如，1989年4月12日公開之前東德專利第266,710號中所揭示之地衣芽孢桿菌41P))、假單胞菌屬(*Pseudomonas*)(例如銅綠假單胞菌(*P. aeruginosa*))、及鏈黴菌屬(*Streptomyces*)。一種較佳之大腸桿菌選殖宿主係大腸桿菌294(ATCC 31,446)，但其他菌株亦適合，例如大腸桿菌B、大腸桿菌X1776(ATCC 31,537)及大腸桿菌W3110

(ATCC 27,325)。該等實例係例示性的而非限制性的。

全長抗體、抗體融合蛋白及抗體片段可在細菌中產生，尤其在不需糖基化及Fc效應子功能時，例如在治療抗體偶聯至自身顯示破壞腫瘤細胞之效力的細胞毒性劑(例如，毒素)時。全長抗體在循環中具有較長之半衰期。在大腸桿菌中實施製備較為快速且更具成本效益。抗體片段及多肽在細菌中之表現可參見(例如)美國專利第5,648,237號(Carter等人)、美國專利第5,789,199號(Joly等人)、美國專利第5,840,523號(Simmons等人)，其闡述用於最佳化表現及分泌之轉譯起始區(TIR)及信號序列。亦參見Charlton, *Methods in Molecular Biology*，第248卷(B.K.C. Lo編輯，Humana Press，Totowa，NJ，2003)，第245-254頁，其闡述在大腸桿菌中表現抗體片段。表現後，可自大腸桿菌細胞糊狀物中在可溶性部分中分離出抗體，且可端視同種型通過(例如)蛋白質A或G管柱進行純化。最終純化可以類似於純化在(例如)CHO細胞中表現之抗體的方法來實施。

除原核生物外，諸如絲狀真菌或酵母等真核微生物亦為抗體編碼載體之適宜選殖或表現宿主。釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或常見的麵包酵母(baker's yeast)係最常用的低等真核宿主微生物。然而，多種其他屬、種及菌株通常亦可得到且可用於本發明中，例如裂殖酵母菌(*Schizosaccharomyces pombe*)；克魯維酵母屬(*Kluyveromyces*)宿主，例如乳酸克魯維酵母(*K. lactis*)、脆壁克魯維酵母(*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亞克魯

維酵母(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、威克海姆克魯維酵母(*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)、瓦爾特克魯維酵母(*K. waltii*) (ATCC 56,500)、果蠅克魯維酵母(*K. drosophilarum*) (ATCC 36,906)、耐熱克魯維酵母(*K. thermotolerans*)及馬科斯克魯維酵母(*K. marxianus*)；子囊菌酵母屬(*Yarrowia*) (EP 402,226)；巴斯德畢赤酵母菌(*Pichia pastoris*) (EP 183,070)；念珠菌屬(*Candida*)；裏氏木黴菌(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234)；粗糙鏈孢黴菌(*Neurospora crassa*)；許旺酵母屬(*Schwanniomyces*)，例如西方許旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)；及絲狀真菌，例如鏈孢黴屬(*Neurospora*)、青黴屬(*Penicillium*)、彎頸黴屬(*Tolypocladium*)及曲黴菌屬(*Aspergillus*)宿主(例如構巢麴黴(*A. nidulans*)及黑麴黴(*A. niger*))。論述酵母及絲狀真菌用於製備治療性蛋白質之用途的綜述可參見例如 Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004)。

可選擇糖基化路徑已經「人類化」導致產生具有部分或完全人類糖基化模式之抗體的某些真菌及酵母菌株。參見，例如，Li等人，*Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)(闡述巴斯德畢赤酵母菌中糖基化路徑之人類化)；及 Gerngross 等人，見上文。

表現糖基化抗體之適宜宿主細胞亦得自多細胞有機體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別出多種杆狀病毒株及變體及來自諸如下述宿主之對應許可性昆蟲宿主細胞：草地黏蟲

(*Spodoptera frugiperda*)(毛蟲)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)(蚊子)、白紋伊蚊(*Aedes albopictus*)(蚊子)、黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)(果蠅)、及家蠶(*Bombyx mori*)。多種轉染用病毒株可自公開途徑獲得，例如苜蓿銀紋夜蛾(*Autographa californica*) NPV之L-1變體及家蠶NPV之Bm-5菌株，且根據本發明該等病毒可用作本文中之病毒，具體而言用於草地黏蟲細胞之轉染。

亦可使用棉花、玉米、馬鈴薯、大豆、矮牽牛、番茄、浮萍(浮萍科(*Lemnaceae*))、紫花苜蓿(截形苜蓿(*M. truncatula*))及煙草之植物細胞培養物作為宿主。參見，例如，美國專利第5,959,177號、第6,040,498號、第6,420,548號、第7,125,978號及第6,417,429號(闡述用於在轉基因植物中製備抗體之PLANTIBODIES™技術)。

脊椎動物細胞可用作宿主，且在培養(組織培養)中增殖脊椎動物細胞已成為常規程序。可用哺乳動物宿主細胞系之實例係經SV40轉化之猴腎CV1細胞系(COS-7, ATCC CRL 1651)；人類胚腎細胞系(293細胞或經亞選殖以適於在懸浮液培養物中生長之293細胞，Graham等人，*J. Gen Virol.* 36:59 (1977))；幼倉鼠腎細胞(BHK, ATCC CCL 10)；小鼠支持細胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980))；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；人類子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34)；布法羅大鼠(buffalo rat)肝臟細胞(BRL 3A, ATCC

CRL 1442)；人類肺細胞(W138, ATCC CCL 75)；人類肝臟細胞(Hep G2, HB 8065)；小鼠乳房腫瘤(MMT 060562, ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather等人, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982))；MRC 5細胞；FS4細胞；及人類肝細胞瘤細胞系(Hep G2)。其他可用哺乳動物宿主細胞系包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括DHFR⁻CHO細胞(Urlaub等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))；及骨髓瘤細胞系，例如NS0及Sp2/0。關於適用於製備抗體之某些哺乳動物宿主細胞系的綜述可參見(例如)Yazaki及Wu, *Methods in Molecular Biology*, 第248卷(B.K.C. Lo編輯, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 第255-268頁。

用上述用於抗體製備之表現或選殖載體轉化宿主細胞，並在習用營養培養基中加以培養，視需要修改該等培養基以誘導啟動子、選擇轉化體或擴增編碼期望序列之基因。

(h)培養宿主細胞

可在多種培養基中培養用於產生本發明抗體之宿主細胞。市售培養基適用於培養宿主細胞，例如Ham's F10 (Sigma)、最小必需培養基((MEM), (Sigma))、RPMI-1640 (Sigma)、及杜貝克改良鷹氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ((DMEM), Sigma)。另外，可使用闡述於Ham等人, *Meth. Enz.* 58:44 (1979)；Barnes等人, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980)；美國專利第4,767,704號；第4,657,866號；第4,927,762號；第4,560,655號；或第5,122,469號；WO 90/03430；WO 87/00195；或重新公開

之美國專利第30,985號中之任一培養基作為宿主細胞之培養基。可根據需要向任一該等培養基中增補激素及/或其他生長因子(例如胰島素、鐵傳遞蛋白或表皮生長因子)、鹽(例如氯化鈉、鈣、鎂及磷酸鹽)、緩衝劑(例如HEPES)、核苷酸(例如腺苷及胸苷)、抗生素(例如慶大黴素(GENTAMYCIN)TM藥物)、微量元素(界定為通常以微莫耳範圍之最終濃度存在之無機化合物)、及葡萄糖或等效能量來源。亦可以熟習此項技術者所熟知之適當濃度引入任一其他所需補充物。培養條件(例如溫度、pH值及諸如此類)係先前用於所選表現用宿主細胞之培養條件，且對熟習此項技術者而言係顯而易見的。

(xi)抗體之純化

使用重組技術時，抗體可在細胞內、在周質間隙中產生，或直接分泌至培養基中。若抗體係在細胞內產生，作為第一步驟，藉由(例如)離心或超濾去除微粒碎屑(宿主細胞或經溶解片段)。Carter等人，*Bio/Technology* 10:163-167 (1992)闡述用於分離分泌到大腸桿菌周質間隙中之抗體的方法。簡言之，在乙酸鈉(pH 3.5)、EDTA和苯基甲基磺醯基氟化物(PMSF)存在下經約30分鐘使細胞糊狀物解凍。可藉由離心來去除細胞碎屑。倘若抗體係分泌至培養基中，則通常首先使用市售蛋白質濃縮過濾器(例如Amicon或Millipore Pellicon超濾單元)濃縮來自該等表現系統之上清液。可在任一前述步驟中引入蛋白酶抑制劑(例如PMSF)以抑制蛋白質水解，且可引入抗生素以防止外來

污染物生長。

自細胞製備之抗體組合物可使用(例如)羥基磷灰石層析、疏水作用層析、凝膠電泳、透析及親和層析來純化，其中親和層析係通常較佳之純化技術之一。蛋白質A作為親和配體之適合性取決於物種及存在於抗體中之任一免疫球蛋白Fc結構域之同種型。蛋白質A可用於純化基於人類 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重鏈之抗體(Lindmark等人，*J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983))。蛋白質G被推薦用於所有小鼠同種型及用於人類 $\gamma 3$ (Guss等人，*EMBO J.* 5:1567-1575 (1986))。親和配體所附著之基質最經常為瓊脂糖，但亦可使用其他基質。機械上穩定之基質(例如受控孔隙玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯)可達成較使用瓊脂糖更快之流速及更短之處理時間。倘若抗體包含 C_H3 結構域，則可使用Bakerbond ABX™樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)實施純化。端視欲回收之抗體亦可使用其他蛋白質純化技術，例如在離子交換管柱上分級分離、乙醇沉澱、反相HPLC、於二氧化矽上層析、於肝素瓊脂糖(SEPHAROSE)™上層析、於陰離子或陽離子交換樹脂(例如聚天冬胺酸管柱)上層析、層析聚焦、SDS-PAGE及硫酸銨沉澱。

通常，製備用於研究、測試及臨床之抗體的各種方法在業內已非常確實，與上述方法一致及/或被熟習此項技術者視為適合於所研究之特定抗體。

D. 選擇生物活性抗體

可對如上文所述製備之抗體實施一或多種「生物活性」

分析以選擇從治療觀點來看具有有益特性之抗體。可針對抗體與其所針對之抗原結合之能力來篩選抗體。例如，抗-oxLDL抗體，如下文實例中所示，該抗體之抗原結合特性可在檢測抗體結合MDA-ApoB100之能力的分析中予以評價。在某些實施例中，抗體之抗原結合特性可在檢測抗體結合ox肽IEIGLEGKGFEP TLEALFGK (SEQ ID NO: 5)之能力的分析中予以評價。亦可篩選在動物模型中抑制斑塊形成且預防動脈粥樣硬化病變發生之抗-oxLDL抗體(例如，Schiopu等人，2004；WO 2004/030607；US 6,716,410)。其他活性包括在治療數週後有效誘導主動脈中之預先存在之既定動脈粥樣硬化斑塊消退(例如，WO 2007/025781)。

在另一實施例中，抗體之親和性可藉由例如飽和結合；ELISA；及/或競爭分析(例如放射免疫分析(RIA))進行測定。

同樣，可對抗體實施其他生物活性分析，以(例如)評估其作為治療劑之效力。該等分析已為熟習此項技術者所習知，且取決於抗體之靶抗原及預期用途。

可實施常規交叉阻斷分析來篩選可與目標抗原上之特定表位結合之抗體(例如，阻斷實例抗-oxLDL抗體與oxLDL之結合之抗體)，例如，如 *Antibodies, A Laboratory Manual*，冷泉港實驗室，Harlow及David Lane編輯(1988)中所述。或者，可實施表位定位(例如，如Champe等人，*J. Biol. Chem.* 270:1388-1394 (1995)中所述)以確定抗體是否與目標表位結合。

E. 製品

在本發明之另一實施例中，提供一種製品，其包含容納本發明之水性醫藥調配物且視情況提供使用說明書的容器。適宜容器包括(例如)瓶子、小瓶及注射器。容器可由諸如玻璃或塑料等多種材料製成。實例性容器係3-20 cc的一次性玻璃小瓶。或者，對於多劑量調配物，容器可為3-100 cc的玻璃小瓶。該容器容納調配物，且位於容器上或與容器相連之標籤可指明用法說明。該製品可進一步包括就出售及使用者立場而言合乎需要之其他材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、注射用針、注射器及帶有使用說明之包裝插頁。

藉由參考以下實例可更全面地理解本發明。然而，不應將其理解為對本發明範圍進行限制。所引用之所有文獻及專利均以引用的方式併入本文中。

本說明書被視為足以使熟習此項技術者能夠實踐本發明。除本文所展示及闡述之修改形式外，熟習此項技術者可根據上述說明瞭解本發明之各種修改形式，該等修改形式皆涵蓋於隨附申請專利範圍之範圍內。本文所引用之所有出版物、專利及專利申請案出於所有目的皆以全文引用的方式併入本文中。

實例

應瞭解，本文所述實例及實施例僅為舉例說明之目的，且基於其之各種修改或變化應為熟習此項技術者所瞭解，且欲包括在本申請案之精神與範圍內及隨附申請專利範圍

之範圍內。

實例1：穩定的抗-oxLDL抗體液體調配物，pH值之研究

該等實例闡述以介於約10 mg/ml-200 mg/ml範圍內之蛋白質濃度包含抗-oxLDL抗體(具有圖2中所示之胺基酸序列)之穩定的液體調配物之研製及穩定性測試。抗體係自稱為n-CoDeR®之重組抗體片段庫獲得，該庫針對衍生自人類ApoB-100之氧化型肽(例如，WO 02/080954)。在由組胺酸、精胺酸、乙酸鹽、氯化鈉等組成之pH值為4.5至6.5的各種液體調配物中對抗-oxLDL抗體之穩定性(例如，聚集體調配物、電荷變體等)進行研究。藉由數種分析來檢測抗-oxLDL抗體之穩定性，包括UV(檢測濃度及混濁度)、用於尺寸變體分析之尺寸排除層析(SEC)、用於電荷變體分析之圖像毛細管等電聚焦(icIEF)及結合。在實施為期6個月的穩定性測試後，結果表明抗-oxLDL抗體在含有精胺酸之緩衝液中於pH 4.5與pH 6.5之間穩定。

藉由透析使用Slide-a-Lyzer透析盒將抗-oxLDL抗體調配於不同緩衝液中以達成表1中所列示之最終濃度。經0.22 μ m Sterifilp過濾器單元對各調配物進行無菌過濾，並在無菌條件下裝填至高壓小瓶中，塞上塞子並用鋁掀蓋式(flip-top)密封件進行密封。將試樣放置於-20°C、2-8°C、25°C、30°C、40°C下，且對照小瓶放置於-70°C下，並在所選溫度下實施長達6個月的穩定性研究。

表 1：pH 值調配條件

調配物	緩衝液[mg/ml]	pH值
A 20 mM 乙酸鈉, 150 mM 氯化鈉, 0.02% PS20	170.4	5.5
B 20 mM 組胺酸乙酸鹽, 150 mM 精胺酸乙酸鹽, 0.02% PS20	193.6	4.5
C 20 mM 組胺酸乙酸鹽, 150 mM 精胺酸乙酸鹽, 0.02% PS20	189.5	5.5
D 20 mM 組胺酸乙酸鹽, 150 mM 精胺酸乙酸鹽, 0.02% PS20	183.3	6.5
E 20 mM 組胺酸乙酸鹽、150 mM 精胺酸乙酸鹽、0.02% PS20	99.1	5.5

方法

pH 值：將 200 μ L 體積之各試樣放置在環境溫度下 1.5 ml Eppendorf 管中，並使用裝備有 Ross 半微量電極之 Thermo Orion pH 計測量其 pH 值。使用 Thermo Orion 緩衝液標準物 (pH 4.0、5.0 及 7.0) 校準 pH 計。

目測：在環境溫度下於螢光燈下利用白色及黑色背景目測分析試樣之顏色、外觀及透明度 (CAC)。

混濁度：使用 SpectraMax M2e 平板讀數器藉由 360 nm 及 450 nm 之吸光度來測量調配物試樣之混濁度。將 100 μ L 未經稀釋之試樣加載於 96 孔微量板上，並以水作為空白測量混濁度。為對不同蛋白質濃度之各調配物進行比較，將 360 nm 及 450 nm 下之吸光度除以蛋白質濃度以規範化僅由所存在蛋白質的量而引起之任何效應。

滲透壓：按照使用者手冊使用 50 mOsm/kg 及 850 mOsm/kg 校準溶液來校準滲透壓計。藉由在對調配物進行測試之前測試 Clinitrol 290 參考溶液來驗證校準。

蛋白質濃度-體積濃度：在用 Milli-Q 水將試樣稀釋至 0.5

mg/ml後一式兩份測量所有調配物之濃度。將稀釋試樣轉移至96孔板(BD bioscience)中，並使用SpectraMax平板讀數器(Molecular Devices M2^e)讀數吸收光譜。該等讀數係以去離子水作為空白，並取讀數的平均值。按照下式來計算蛋白質濃度：

$$\text{濃度(mg/mL)} = \frac{(A_{\text{max}} - A_{320}) \times \text{稀釋因子(mL/mL)}}{\epsilon \times \text{比色皿路徑長度(cm)}}$$

所測量的抗-oxLDL抗體之消光係數(ϵ)係 $1.62 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。

黏度：使用Physica MCR 300緊湊型模塊化流變計(Anton Paar)來測量黏度。將75 μL 試樣在環境溫度下加載於25 mm錐板流變計(1°角度；CP 25-1)中。在 1000 sec^{-1} 之恆定剪切速率下實施測量。

活性：藉由測量抗-oxLDL抗體在ELISA中結合ox-LDL之能力來測定抗體之生物活性。該ELISA結合分析測定抗-oxLDL抗體結合丙二醛(MDA)氧化型LDL肽之能力。

尺寸排除-高效液相層析(SEC)：利用尺寸排除層析來測定聚集體及片段的量。此分析使用TSK G3000 SWXLTM 7.8X300 mm管柱，並在25°C下於HP 1100TM HPLC系統上實施。將試樣用流動相稀釋至2 mg/ml，且注射體積為25 μL 。流動相為0.2 M K_2HPO_4 、0.25 M KCl (pH 6.2)，並以0.5 mL/min之穩定流速將蛋白質溶析30分鐘。在280 nm下檢測溶析液之吸光度。利用HP CHEMSTATIONMTM軟體實施積分。

圖像毛細管等電聚焦(icIEF)：利用icIEF來分析儲存於

40°C 下之穩定性試樣及參考試樣，以測定抗-oxLDL抗體穩定性試樣之電荷(酸性及鹼性)變體的量。此技術使用塗敷有碳氟化合物之毛細管在FAST IEF分析儀中使用Prince自動採樣器。

離子交換層析(IEX)：利用陽離子交換層析來測量電荷變體之變化。此分析在HP 1100TM HPLC系統中使用DIONEX PROPAC WCX-10TM管柱。使用含有50 mM HEPES (pH 7.5)之流動相A將試樣稀釋至2 mg/ml。隨後將25 µl稀釋試樣加載於管柱上，保持於環境溫度(40°C)下。使用含有50 mM HEPES、100 mM硫酸鈉(pH 7.5)之流動相B來溶析峰值組份。在280 nm下檢測溶析液。使用HP CHEMSTATION®軟體分析數據。

結果與討論

在此調配物pH值研究中，研究蛋白質濃度、離子強度及溶液pH值對抗-oxLDL抗體之穩定性的影響。利用SEC、IEC、icIEF及混濁度分析來檢測抗-oxLDL抗體在實時及加速儲存條件下之穩定性。在所選時間點實施蛋白質濃度、滲透壓、黏度、結合及CE-SDS分析。此研究測試不同濃度之抗-oxLDL抗體在基於精胺酸之調配物中在pH 4.5至pH 6.5之pH值範圍內之穩定性(例如，聚集體形成、電荷變體等)。使用L-精胺酸來調配高離子強度的緩衝液。測量滲透壓、pH值、蛋白質濃度及黏度，並顯示於下文中(表2)。

表2：所研究調配物之物理性質

調配物	[蛋白質] (mg/ml)	滲透壓(mOsm/kg)	黏度(cP)	pH值
A	170.4	326	7.8	5.5
B	193.6	495	6.9	4.5
C	189.5	389	10.7	5.5
D	183.3	344	10.9	6.5
E	99.1	358	2.5	5.5

所有調配物均經歷三個在-20℃或-70℃下冰凍並隨後於環境溫度下冷卻之循環。SEC證實，對於表1中所列示之調配物在-70℃及-20℃下冰凍並未顯著改變抗-oxLDL抗體之物理性質(參見表2)。

所有調配物在40℃下之結合活性：利用對oxLDL之ELISA結合分析來測量試樣之結合活性。分析顯示，在40℃下培育四週後所測試之所有調配物之結合活性已降低至對照試樣(T0時)之約20%(表3)。

表3：在40℃下儲存4週後調配物之分析

試樣，儲存溫度	4週
A，40℃	76.6±5.4%
B，40℃	71.1±6.1%
C，40℃	77.6±1.7%
D，40℃	86.1±3.9%
E，40℃	79.0±2.8%

pH值之影響：利用尺寸、電荷變體及混濁度分析來檢測抗-oxLDL抗體在各種溫度下經一定時間後之穩定性。利用SEC來測定所產生之聚集體、單體及片段的量，同時利

用IEC來測定穩定性研究期間所產生之酸性變體、中性變體(main variant)及鹼性變體(圖3)。所用IEC方法並非所測試之所有抗-oxLDL抗體調配物之穩定性指示分析，因此隨後利用藉由不同機制分離電荷之icIEF。在pH 4.5之溶液中，抗-oxLDL抗體形成更具鹼性之變體，而在pH 6.5時形成更具酸性之變體(圖3)。

該等結果輔之以SEC研究，顯示在40°C下在pH 6.5時抗-oxLDL抗體容易聚集且在pH 4.5時易呈片段形式(圖4)。SEC及IcIEF數據均表明，在40°C下與所測試之pH 4.5及pH 6.5試樣相比抗-oxLDL抗體在pH 5.5下更穩定。

在360 nm及450 nm波長下測量試樣之混濁度，並規範化成蛋白質濃度。所觀察到之規範化的試樣混濁度在30°C及40°C下隨時間流逝略微增大；然而，未觀察到沉澱。

賦形劑及離子強度之影響：研究不同賦形劑對抗-oxLDL抗體之穩定性的影響。所研究之一系列賦形劑包括氯化鈉、乙酸鈉、組胺酸乙酸鹽及精胺酸乙酸鹽。結果顯示含有氯化鈉之調配物相比於所有其他調配物聚集得更快。

抗-oxLDL抗體濃度之影響：如尺寸及電荷變體分析所顯示，蛋白質濃度對抗-oxLDL抗體之穩定性沒有強烈影響。端視濃度(介於99 mg/ml與189 mg/ml之間)而定，略微出現聚集，其中濃度越高聚集略微較多。利用SEC來測定所產生之聚集體、單體及片段的量，同時利用icIEF來測定穩定性研究期間所產生之酸性變體、中性變體及鹼性變

體(圖3)。

在各種緩衝條件下評價抗-oxLDL抗體之穩定性。自調配物篩選研究所獲得之數據顯示，抗-oxLDL抗體在介於pH 4.5與pH 6.5之間的組胺酸乙酸鹽與精胺酸乙酸鹽緩衝液中更穩定。

實例2：穩定的抗-oxLDL抗體液體調配物，賦形劑之研究

在各種液體(組胺酸乙酸鹽、組胺酸硫酸鹽、組胺酸琥珀酸鹽、組胺酸檸檬酸鹽及PBS)調配物(表A)中評價抗-oxLDL抗體之穩定性。將存於3cc玻璃小瓶中之1毫升各調配物在-70℃、-20℃、5℃、25℃、30℃及40℃下儲存長達6個月，並在1、2、4、6、8、12及24週評定穩定性。藉由數種分析來檢測抗-oxLDL抗體之穩定性，包括UV(檢測濃度及混濁度)、用於尺寸變體分析之尺寸排除層析(SEC)、用於電荷變體分析之圖像毛細管等電聚焦(icIEF)、用於測定尺寸分佈之CE-SDS及用於測定活性之結合分析。在實施為期6個月的穩定性測試後，結果表明抗-oxLDL抗體在20 mM組胺酸乙酸鹽、150 mM精胺酸乙酸鹽、0.02%聚山梨醇酯20 (pH 5.5)中穩定。

試樣製備：藉由透析使用Slide-a-Lyzer透析盒將抗-oxLDL抗體調配於不同緩衝液中，隨後使用Amicon Ultra-15離心裝置濃縮蛋白質以達到目標濃度。添加聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、甲硫胺酸及EDTA以達到表A中所列示之最終濃度。經0.22 μm Sterifilp過濾器單元對各調配物進行無菌過濾，並在無菌條件下裝填至高壓小瓶中，塞上塞

子並用鋁掀蓋式密封件進行密封。存於下文調配物中之所有試樣均以液體形式保存。將試樣放置於-20℃、2-8℃、25℃、30℃、40℃下，且對照小瓶放置於-70℃下，並在所選溫度下實施長達6個月的穩定性研究。

表 A：調配條件

調配物	緩衝液	pH值	蛋白質濃度 (mg/ml)
1	20 mM組胺酸乙酸鹽, 150 mM精胺酸乙酸鹽, 0.02% PS20	5.6	25.0
2	20 mM組胺酸乙酸鹽, 150 mM精胺酸乙酸鹽, 0.02% PS20	5.6	50.0
3	20 mM組胺酸乙酸鹽, 150 mM精胺酸乙酸鹽, 0.02% PS20	5.6	158.0
4	20 mM組胺酸硫酸鹽, 150 mM精胺酸硫酸鹽, 0.02% PS20	5.8	156.0
5	20 mM組胺酸琥珀酸鹽, 150 mM精胺酸琥珀酸鹽, 0.02% PS20	5.6	164.0
6	20 mM組胺酸檸檬酸鹽, 150 mM精胺酸檸檬酸鹽, 0.02% PS20	5.7	182.0
7	20 mM組胺酸乙酸鹽, 150 mM精胺酸乙酸鹽, 0.05% PS80	5.6	156.0
8	20 mM組胺酸乙酸鹽, 150 mM精胺酸乙酸鹽, 0.2% PS20	5.6	154.0
9	20 mM組胺酸乙酸鹽, 150 mM精胺酸乙酸鹽, 5 mg/ml 甲硫胺酸、0.02% PS20	5.6	136.0
10	PBS(137 mM NaCl、10 mM磷酸鹽、2.7 mM KCl) 0.02% PS20	7.4	152.0
11	20 mM組胺酸乙酸鹽, 150 mM精胺酸乙酸鹽, 0.02% PS20 1 mM EDTA	5.6	154.0

方法

pH 值：將 200 μ L 各試樣放置在環境溫度下 1.5 ml Eppendorf管中，並使用裝備有 Ross 半微量電極之 Thermo Orion pH計測量其 pH 值。使用 Thermo Orion 緩衝液標準物

(pH 4.0、5.0及7.0)校準pH計。

目測：在環境溫度下於螢光燈下利用白色及黑色背景目測分析試樣之顏色、外觀及透明度(CAC)。

混濁度：使用SpectraMax M2^e平板讀數器藉由360 nm及450 nm之吸光度來測量調配物試樣之混濁度。將100 µL未經稀釋試樣及水(用作空白)加載於96孔微量板上，並測量混濁度。為對不同蛋白質濃度之調配物進行比較，將360 nm及450 nm下之吸光度除以蛋白質濃度以規範化僅由所存在蛋白質的量而引起之任何效應。

滲透壓：按照使用者手冊使用50 mOsm/kg及850 mOsm/kg校準溶液來校準滲透壓計。藉由在對調配物試樣進行測試之前測試Clinitrol 290參考溶液來驗證校準。

蛋白質濃度-體積濃度：在用Milli-Q水將試樣稀釋至0.5 mg/ml後一式兩份測量所有調配物之濃度。將稀釋試樣轉移至96孔板(BD bioscience，目錄號為353261)中，並使用SpectraMax平板讀數器(Molecular Devices M2^e)讀數濃度。該等讀數係以去離子水作為空白，並取讀數的平均值。按照下式來計算蛋白質濃度：

$$\text{濃度(mg/mL)} = \frac{(A_{\text{max}} - A_{320}) \times \text{稀釋因子(mL/mL)}}{\epsilon \times \text{比色皿路徑長度(cm)}}$$

所測量的抗-oxLDL抗體之消光係數(ϵ)係 $1.62 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。

黏度：使用Physica MCR 300緊湊型模塊化流變計(Anton Paar)來測量黏度。將75 µL試樣在環境溫度下加載於25 mm錐板流變計(1°角度；CP 25-1)中。在 1000 sec^{-1} 之

恆定剪切速率下實施測量。

結合分析：將於40℃下儲存4週之穩定性試樣用 Milli-Q 水稀釋至 0.5 mg/ml，並利用 ELISA 測試與 oxLDL 之結合。未經歷熱降解過程之試樣用作分析對照。

CE-SDS UV(非還原)：利用 CE-SDS UV 非還原方法對於 40℃ 下儲存4週之穩定性試樣及參考試樣進行分析以評定抗-oxLDL 抗體穩定性試樣之尺寸分佈。

尺寸排除-高效液相層析(SEC)：利用尺寸排除層析來測定聚集體及片段的量。此分析使用 TSK G3000 SWXL™ 7.8X300 mm 管柱，並在 HP 1100™ HPLC 系統上實施。將試樣用流動相稀釋至 2 mg/ml，且注射體積為 25 µL。流動相為 0.2 M K₂HPO₄、0.25 M KCl (pH 6.2)，並以 0.5 mL/min 之穩定流速將蛋白質溶析30分鐘。在 280 nm 下檢測溶析液之吸光度。利用 HP CHEMSTATIONM™ 軟體實施積分。

圖像毛細管等電聚焦(icIEF)：利用 icIEF 來分析儲存於 40℃ 下之穩定性試樣及參考試樣，以測定抗-oxLDL 抗體穩定性試樣之電荷(酸性及鹼性)變體的量。此技術使用塗敷有碳氟化合物之毛細管在 FAST IEF 分析儀中使用 Prince 自動採樣器。

結果與討論

在此調配物賦形劑研究中，研究不同緩衝液抗衡離子、表面活性劑及抗氧化劑對抗-oxLDL 抗體之穩定性的影響。利用 SEC、icIEF 及混濁度分析來檢測整個研究期間抗-

oxLDL抗體之穩定性。在所選時間點對所選穩定性試樣實施蛋白質濃度、滲透壓、黏度、效能及CE-SDS分析。基於先前pH值研究之結果選擇20 mM之緩衝液濃度及約5.5之pH值。在更換緩衝液後測量所有液體調配物之pH值(表A)。測量滲透壓、pH值、蛋白質濃度及黏度，並顯示於下文中(表B)。目測分析之結果顯示所有試樣均顯澄清且呈淺黃色。

表B：所研究調配物之物理性質

調配物	蛋白質濃度(mg/ml)	滲透壓(mOsm/kg)	黏度	pH值
1	25.00	348	1.22	5.6
2	50.00	352	1.58	5.6
3	158.00	376	5.39	5.6
4	156.00	256	5.64	5.8
5	164.00	244	5.58	5.6
6	182.00	194	8.79	5.7
7	156.00	384	5.21	5.6
8	154.00	377	4.87	5.6
9	136.00	410	4.23	5.6
10	152.00	310	6.46	7.4
11	154.00	397	4.89	5.6

使儲存於-20℃及-70℃下之一組調配物在一週時間段內經歷三輪冰凍-解凍循環。將試樣分別冰凍在-20℃及-70℃下，隨後在環境溫度下解凍。藉由尺寸排除層析對經歷冰凍-解凍循環之試樣的物理性質進行評價。SEC分析表明冰凍-解凍未改變所測試試樣之聚集體或片段的百分比。

在360 nm及450 nm波長下測量試樣之混濁度，且顯示儲

存於5°C下之大多數調配物隨時間流逝混濁度無實質變化。調配物試樣之混濁度隨溫度升高(25°C、30°C及40°C)及時間流逝略微增大。

CE-SDS UV係用於估計蛋白質共價聚集體、片段及單體(例如抗體製劑中之游離輕鏈或重鏈)之表觀分子量的定量性分析。在非還原條件下對在40°C下儲存4週之穩定性試樣實施CE-SDS分析。結果顯示，所測試之所有試樣的主峰之百分比均在可接受之分析範圍內(圖5)。

利用ELISA結合分析來測量試樣之結合活性。該ELISA結合分析測定抗-oxLDL抗體結合丙二醛(MDA)氧化型LDL肽之能力。分析結果顯示，所測試之所有調配物在40°C下培育4週後均在可接受之分析範圍之 $\pm 25\%$ 內(圖6)。

抗-oxLDL抗體濃度之影響：對調配於20 mM組胺酸乙酸鹽、150 mM精胺酸乙酸鹽、0.02% PS20 (pH 5.5)中並在40°C下儲存長達4週之三種不同濃度(25 mg/ml (1)、50 mg/ml (2)及150 mg/ml (3))的調配物進行分析，以研究濃度對抗-oxLDL抗體之穩定性的影響。結果顯示，對於25 mg/ml及50 mg/ml之調配物而言，聚集體形成與時間及溫度無明顯相關性，而對於150 mg/ml之調配物試樣而言，聚集體形成隨時間及溫度依賴性增加。icIEF分析之結果顯示，對於所研究之所有三種濃度，酸性變體隨時間及溫度依賴性增加(圖7A及B)。

賦形劑之影響：研究不同賦形劑對抗-oxLDL抗體之穩定性的影響。所研究之一系列賦形劑包括磷酸鹽緩衝鹽水

(PBS)、組胺酸-鹽酸鹽及精胺酸之抗衡離子(乙酸鹽、硫酸鹽、琥珀酸鹽及檸檬酸鹽)。結果顯示，對於含有精胺酸之調配物而言，不管其抗衡離子為何，聚集體、片段、酸性變體及鹼性變體均無顯著變化。在PBS存在下，在所有所研究溫度下聚集、分裂及酸性變體隨時間流逝均顯著增加。

表面活性劑：表面活性劑可防止由攪動引起之聚集以及由吸附引起之蛋白質損失。藉由使用聚山梨醇酯20(0.02%及0.2%濃度)及聚山梨醇酯80(0.05%濃度)來減輕非離子型表面活性劑對抗-oxLDL抗體之穩定性的影響。結果顯示，0.02%之聚山梨醇酯20足以使蛋白質保持穩定。將聚山梨醇酯之濃度增大至0.2%或使用較高分子量之表面活性劑(聚山梨醇酯80)未對抗-oxLDL抗體之穩定性提供任何益處。(圖8)

抗氧化劑：分別使用甲硫胺酸(5 mg/ml)及EDTA (1 mM)作為調配物9及11之抗氧化劑。EDTA螯合金屬離子，且因此可防止金屬引起之氧化，而甲硫胺酸能夠清除氧化物質。SEC分析之結果顯示，EDTA及甲硫胺酸在2-8℃下僅略微改善抗-oxLDL抗體之穩定性(圖8)。

在各種緩衝條件下評價了抗-oxLDL抗體之穩定性。自調配物篩選研究所獲得之數據表明，抗-oxLDL抗體在150 mg/ml蛋白質濃度下在20 mM組胺酸乙酸鹽、150 mM精胺酸乙酸鹽、0.02%聚山梨醇酯20(約pH 5.5)中穩定。

【圖式簡單說明】

圖 1 展示編碼抗-oxLDL 抗體之可變重鏈及可變輕鏈的核酸序列。

圖 2 展示抗-oxLDL 抗體之可變重鏈及可變輕鏈及恆定區 H 及 L 之胺基酸序列。

圖 3 展示在實例 1 之 pH 值研究中藉由 icIEF 測量之抗-oxLDL 抗體的電荷變體隨 pH 值之變化。該圖顯示 T0 時(菱形)及於 40°C 下培育 4 週後(正方形)之數據。

圖 4 展示在 40°C 下抗-oxLDL 抗體之尺寸變體隨 pH 值之變化。該圖顯示 T0(菱形)、一週(正方形)、兩週(三角形)及四週(圓形)時之數據(pH 值研究)。

圖 5 展示 CE-SDS UV(非還原)數據，其顯示在 40°C 下培育 4 週後抗-oxLDL 抗體之主峰的百分比(賦形劑研究)。

圖 6 展示 ELISA 結合數據，其顯示在 40°C 下培育 4 週後之抗-oxLDL 抗體試樣。

圖 7A 及 B 展示：(A)在不同濃度下使用 SEC 測定之抗-oxLDL 抗體之聚集體的百分比，及(B)在不同濃度下使用 icIEF 測定之抗-oxLDL 抗體之酸性組份峰值的百分比。

圖 8 展示使用各種氧化劑時使用 SEC 測定之抗-oxLDL 抗體之聚集體的百分比。

序列表

<110> 美商建南德克公司

<120> 抗體調配物

<130> P4266R1

<140> 099106511

<141> 2010-03-05

<150> US 61/158,331

<151> 2009-03-06

<160> 7

<210> 1

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係合成的

<400> 1

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc 50

cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt aacgcctgga 100

tgagctgggt ccgccaggct ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaagt 150

attagtgttg gtggacatag gacatattat gcagattccg tgaagggccg 200

gtccaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat ctgcaaatga 250

acagcctgag agccgaggac actgccgtgt attactgtgc acggatacgg 300

gtgggtccgt ccggcggggc ctttgactac tggggccagg gtacactggt 350

201039854

caccgtgagc tca 363

<210> 2

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係合成的

<400> 2

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag 50

ggtcaccatc tcctgctctg gaagcaacac caacattggg aagaactatg 100

tatcttggtg taagcagctc ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat 150

gctaatagca atcggccctc aggggtccct gaccgattct ctggctccaa 200

gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg tccgaggatg 250

aggctgatta ttactgtgcg tcatgggatg ccagcctgaa tggttgggta 300

ttcggcggag gaaccaagct gacggtccta ggt 333

<210> 3

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係合成的

<400> 3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1

5

10

15

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

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

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Val Gly Gly His Arg Thr Tyr Tyr
50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Arg Val Gly Pro Ser Gly
95 100 105

Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
110 115 120

Ser

- <210> 4
- <211> 111
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 序列係合成的

<400> 4
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly
1 5 10 15
Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Thr Asn Ile Gly
20 25 30

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

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala
65 70 75

Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala
80 85 90

Ser Trp Asp Ala Ser Leu Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
95 100 105

Lys Leu Thr Val Leu Gly
110

<210> 5
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列係合成的

<400> 5
Ile Glu Ile Gly Leu Glu Gly Lys Gly Phe Glu Pro Thr Leu Glu
1 5 10 15

Ala Leu Phe Gly Lys
20

<210> 6
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係合成的

<400> 6

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

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

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

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

Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
				65					70					75

Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
				80					85					90

Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
				95					100					105

Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
				110					115					120

Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				125					130					135

Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
				140					145					150

His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
				155					160					165

201039854

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn	170	175	180
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	185	190	195
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	200	205	210
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	215	220	225
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu	230	235	240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe	245	250	255
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	260	265	270
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly	275	280	285
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	290	295	300
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu	305	310	315
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	320	325	330

<210> 7

<211> 105

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係合成的

<400> 7

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

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

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

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

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
65 70 75

Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His
80 85 90

Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
95 100 105

●

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：99106511

※申請日：99.3.5

※IPC 分類：~~C07K~~; A61K 47/42 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61K 39/395 (2006.01)

抗體調配物

ANTIBODY FORMULATION

二、中文發明摘要：

本發明闡述一種調配物，其包含治療有效量之抗體，視情況未經預先凍乾，使pH保持於約4.5至約6.5範圍內之緩衝液，及視情況表面活性劑；以及該調配物之用途。

三、英文發明摘要：

A formulation comprising a therapeutically effective amount of an antibody, optionally, not subjected to prior lyophilization, a buffer maintaining the pH in the range from about 4.5 to about 6.5, and an optional surfactant is described, along with uses for such a formulation.

七、申請專利範圍：

1. 一種調配物，其包含治療有效量之抗體於pH 4.5至6.5之組胺酸-精胺酸緩衝液中。
2. 如請求項1之調配物，其中該緩衝液係pH 5.0至6.0之組胺酸乙酸鹽-精胺酸乙酸鹽緩衝液，或其中該緩衝液係pH 5.0至6.0之組胺酸琥珀酸鹽-精胺酸琥珀酸鹽緩衝液。
3. 如請求項2之調配物，其中該緩衝液中組胺酸乙酸鹽或組胺酸琥珀酸鹽之濃度係自約5 mM至約100 mM。
4. 如請求項2之調配物，其中該組胺酸乙酸鹽或組胺酸琥珀酸鹽之濃度係約20 mM。
5. 如請求項2之調配物，其中該緩衝液中精胺酸乙酸鹽或精胺酸琥珀酸鹽之濃度係自約50 mM至約500 mM。
6. 如請求項2之調配物，其中該精胺酸乙酸鹽或精胺酸琥珀酸鹽之濃度係約150 mM。
7. 如請求項1之調配物，其進一步包含表面活性劑。
8. 如請求項7之調配物，其中該表面活性劑係聚山梨醇酯(polysorbate)。
9. 如請求項8之調配物，其中該聚山梨醇酯係聚山梨醇酯20。
10. 如請求項9之調配物，其中該表面活性劑之濃度係自0.0001%至約1.0%。
11. 如請求項10之調配物，其中該表面活性劑之濃度係自約0.01%至約0.1%。

12. 如請求項11之調配物，其中該表面活性劑之濃度係0.02%。
13. 如請求項1之調配物，其中該抗體之濃度係自約10 mg/ml至約250 mg/ml。
14. 如請求項1之調配物，其中該抗體之濃度係自約100 mg/ml至250 mg/ml。
15. 如請求項1之調配物，其中該抗體之濃度係自約150 mg/ml至約200 mg/ml。
16. 如請求項1之調配物，其中該抗體之濃度係自約25 mg/ml至約200 mg/ml。
17. 如請求項1之調配物，其中該抗體未經預先凍乾。
18. 如請求項1之調配物，其進一步包含甲硫胺酸。
19. 如請求項18之調配物，其中該甲硫胺酸之濃度係5 mg/ml。
20. 如請求項1之調配物，其進一步包含EDTA。
21. 如請求項20之調配物，其中該EDTA之濃度係1 mM EDTA。
22. 如請求項7之調配物，其中該緩衝液係pH 5.5之20 mM組胺酸乙酸鹽與150 mM精胺酸乙酸鹽，該表面活性劑係約0.01-0.1% v/v之量的聚山梨醇酯，其中該調配物在約2-8°C之溫度穩定至少12個月；或其中該緩衝液係pH 5.5之20 mM組胺酸琥珀酸鹽與150 mM精胺酸琥珀酸鹽，該表面活性劑係約0.01-0.1% v/v之量的聚山梨醇酯，其中該調配物在約2-8°C之溫度穩定至少12個月。

23. 如請求項1之調配物，其中該調配物係醫藥調配物。
24. 如請求項1之調配物，其中該調配物在約25°C穩定儲存至少12個月；或其中該調配物在約5°C穩定儲存至少12個月；或其中該調配物在約-20°C穩定儲存至少12個月。
25. 一種製品，其包含容納水性醫藥調配物之容器，該調配物包含治療有效量之抗體、pH約5.0至約6.0之組胺酸乙酸鹽-精胺酸乙酸鹽緩衝液及表面活性劑；或包含容納水性醫藥調配物之容器，該調配物包含治療有效量之抗體、pH約5.0至約6.0之組胺酸琥珀酸鹽-精胺酸琥珀酸鹽緩衝液及表面活性劑。
26. 一種穩定水性醫藥調配物中抗體之方法，其藉由將治療有效量之抗體、pH約5.0至約6.0之組胺酸乙酸鹽-精胺酸乙酸鹽緩衝液及表面活性劑組合，或藉由將治療有效量之抗體、pH約5.0至約6.0之組胺酸琥珀酸鹽-精胺酸琥珀酸鹽緩衝液及表面活性劑組合。
27. 一種醫藥調配物，其包含：(a)約10 mg/ml至約250 mg/ml之量的易於去醯胺或聚集之全長IgG1抗體；(b)組胺酸乙酸鹽-精胺酸乙酸鹽緩衝液，pH 5.0至6.0；及(c)約0.01%至約0.1%之量的聚山梨醇酯20。
28. 一種醫藥調配物，其包含：(a)約10 mg/ml至約250 mg/ml之量的易於去醯胺或聚集之全長IgG1抗體；(b)組胺酸琥珀酸鹽-精胺酸琥珀酸鹽緩衝液，pH 5.0至6.0；及(c)約0.01%至約0.1%之量的聚山梨醇酯20。

八、圖式：

2-D03-VH (SEQ ID NO: 1)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTAGTGTGGTGGACATAGGACATATTAT
 GCAGATTCGGTGAAGGGCCGGTCCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCACGGATACGG
 GTGGGTCCGTCCGGCGGGGCTTTGACTACTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGC
 TCA

2-D03-VL (SEQ ID NO: 2)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCAT
 CTCCTGCTCTGGAAGCAACACCAACATTGGGAAGAACTATGTATCTTGGTATCAGCAGC
 TCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGCTAATAGCAATCGGCCCTCAGGGGTC
 CCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCT
 CCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCGTCATGGGATGCCAGCCTGAATGGTT
 GGGTATTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

圖 1

2-D03-VH (SEQ ID NO: 3)

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVSSISVGGHRTYYA
 DSVKGRSTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIRVGPSGGAFDYWGQGLVTVSS

2-D03-VL (SEQ ID NO:4)

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGNTNIGKNYVSWYQQLPGTAPKLLIYANSNRPSGVPDRF
 SGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCASWDASLNGWVFGGGTKLTVLG

IgG1-CH (SEQ ID NO:6)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
 LVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSM
 HEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG1-CL (SEQ ID NO:7)

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN
 KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

圖 2

藉由icIEF測量之電荷變體隨pH值之變化。該圖顯示T0時(菱形)及於40°C下培育4週後(正方形)之數據(pH值研究)

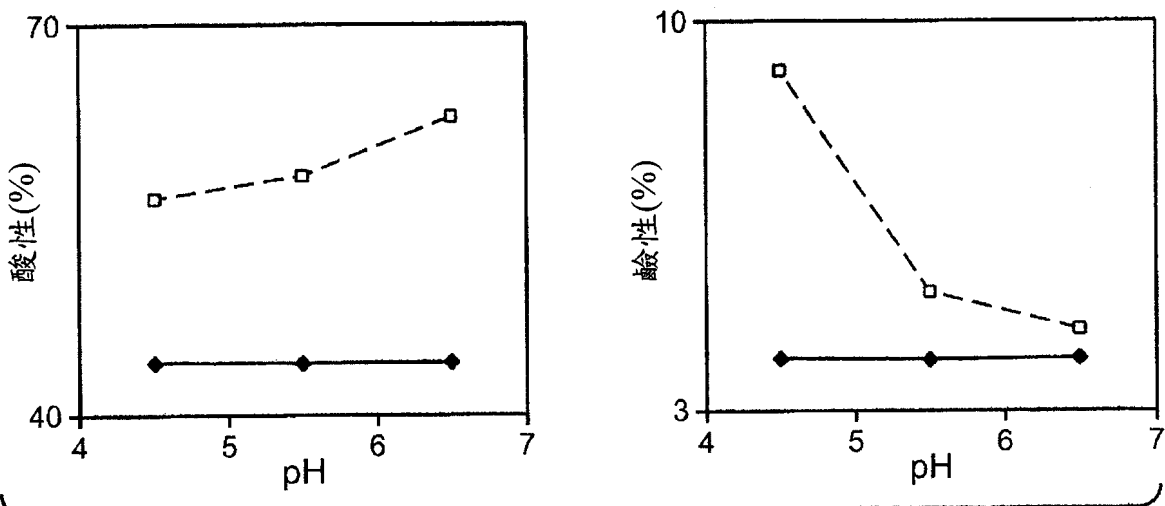


圖 3

在 40°C 下尺寸變體隨 pH 值之變化。該圖顯示 T0(菱形)、一週(正方形)、兩週(三角形)及四週(圓形)時之數據(pH 值研究)

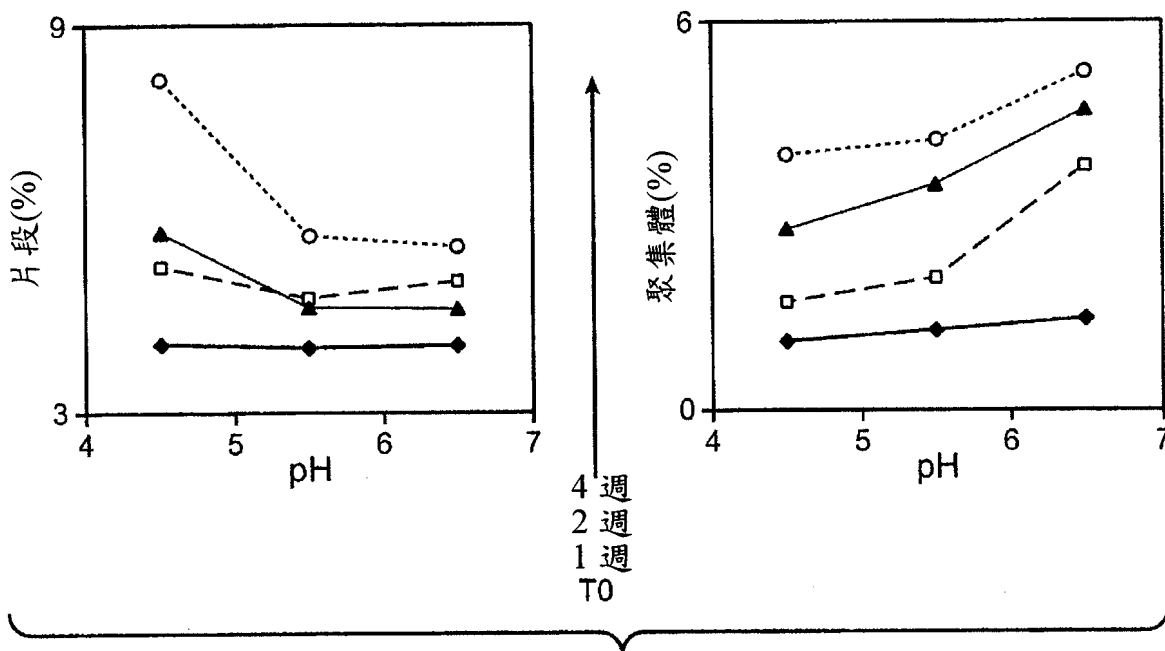


圖 4

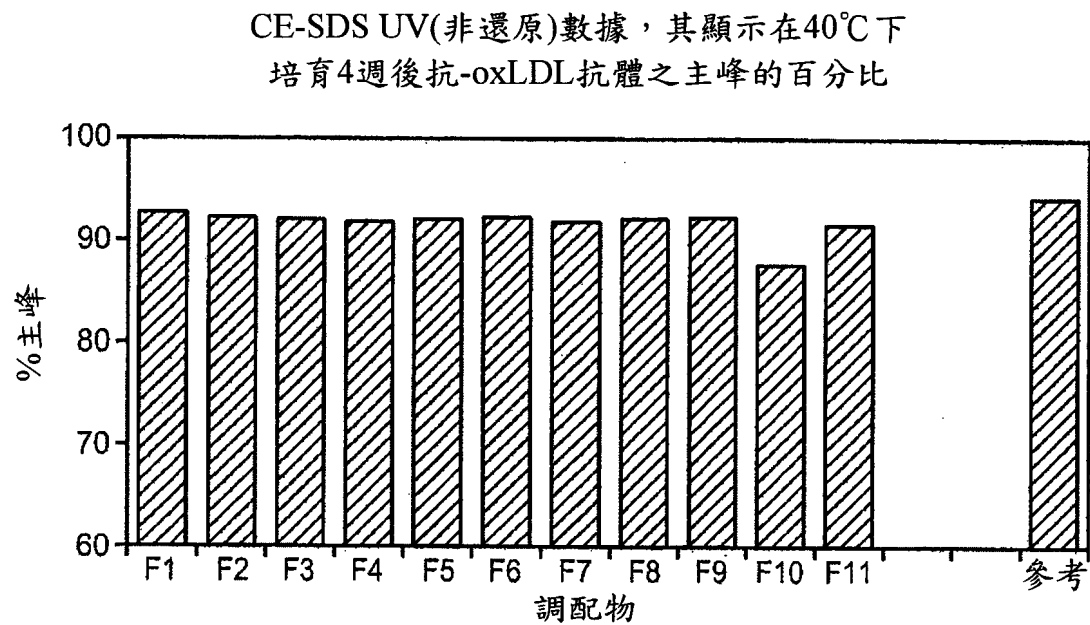


圖 5

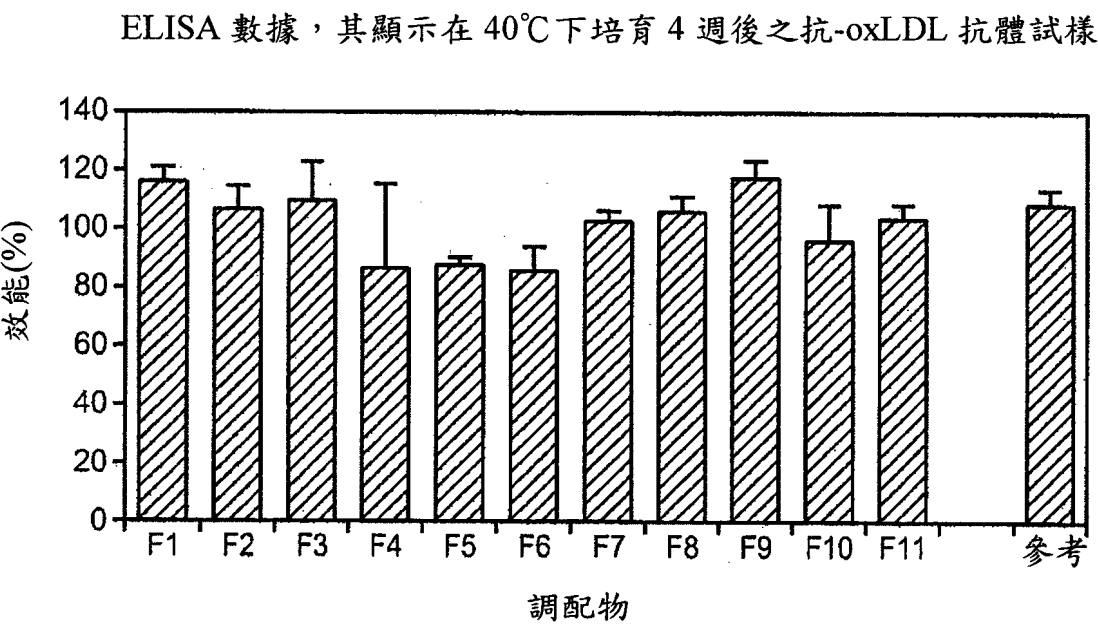
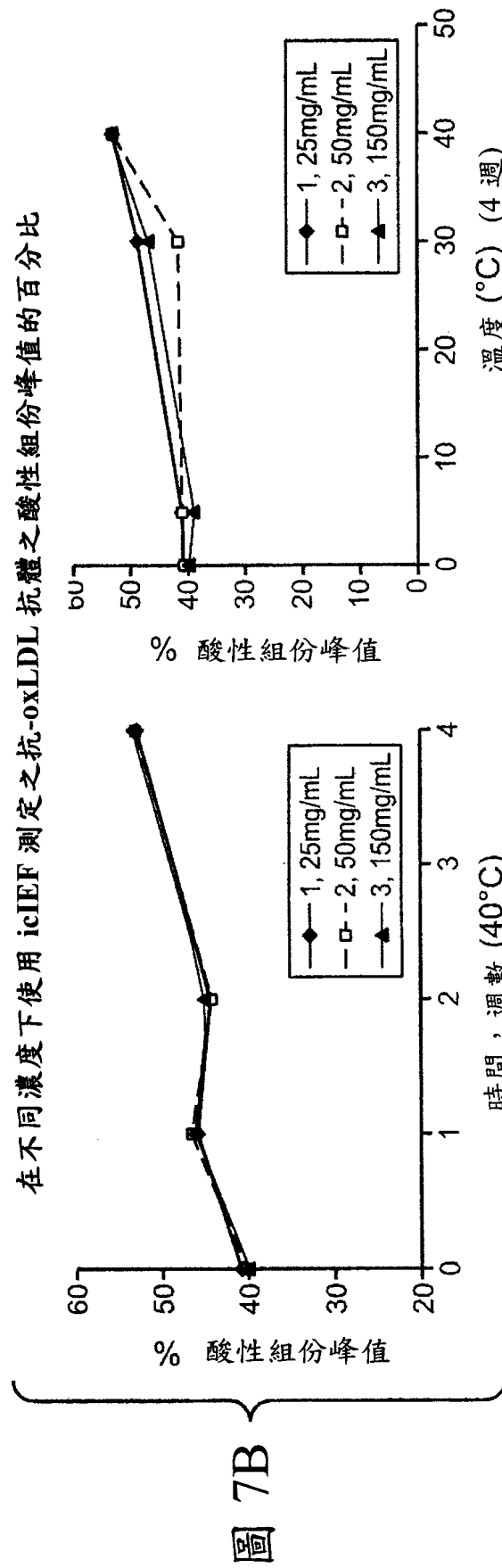
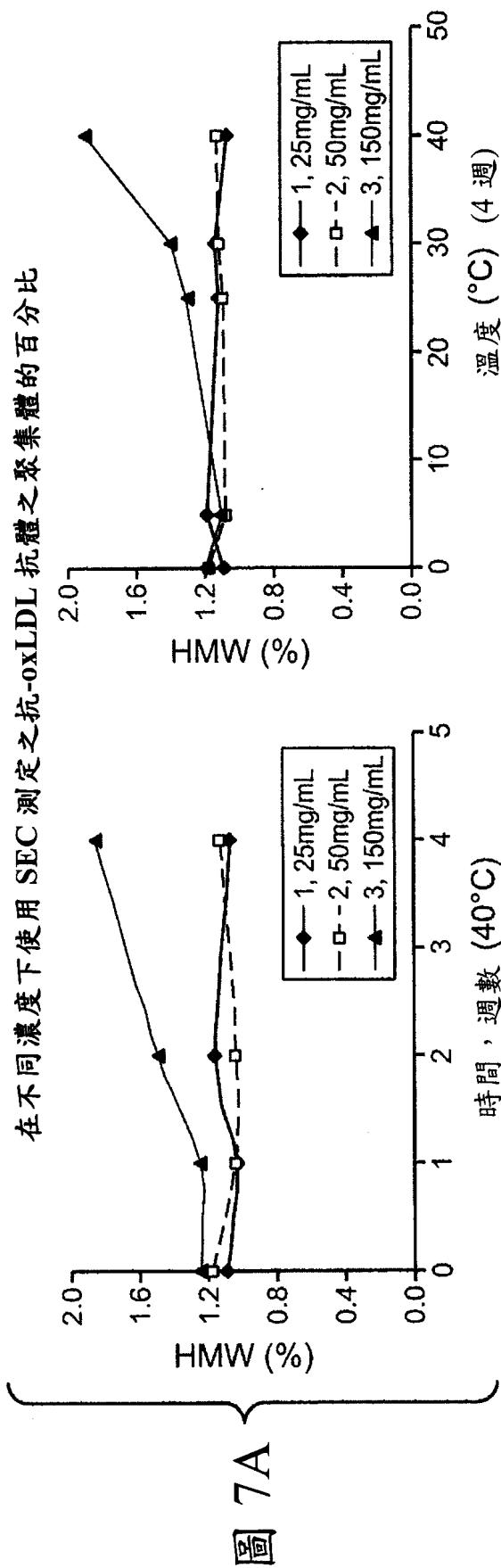


圖 6



使用各種氧化劑時使用SEC測定之
抗-oxLDL抗體之聚集體的百分比

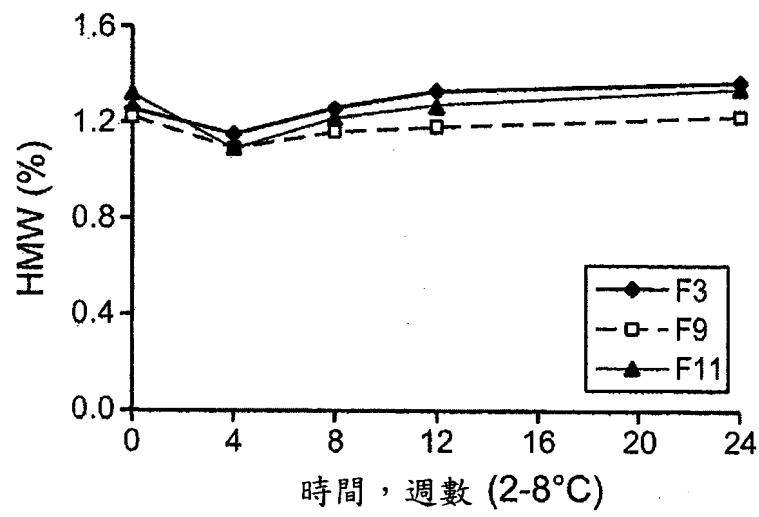


圖 8

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (3) 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)