



(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 201210612 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：100119304

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 06 月 01 日

(51)Int. Cl. : A61K39/00 (2006.01)

C07K16/22 (2006.01)

A61P21/00 (2006.01)

(30)優先權：2010/06/03 美國

61/350,968

(71)申請人：葛蘭素集團有限公司 (英國) GLAXO GROUP LIMITED (GB)

英國

(72)發明人：艾許曼 克萊兒 ASHMAN, CLAIRE (GB)；艾許曼 史蒂芬 ASHMAN, STEPHEN (GB)；漢伯林 保羅 安德魯 HAMBLIN, PAUL ANDREW (GB)；路易斯 艾倫 彼德 LEWIS, ALAN PETER (GB)；歐加 馬丁 安伯 ORECCHIA, MARTIN ANIBAL (IT)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：26 項 圖式數：29 共 217 頁

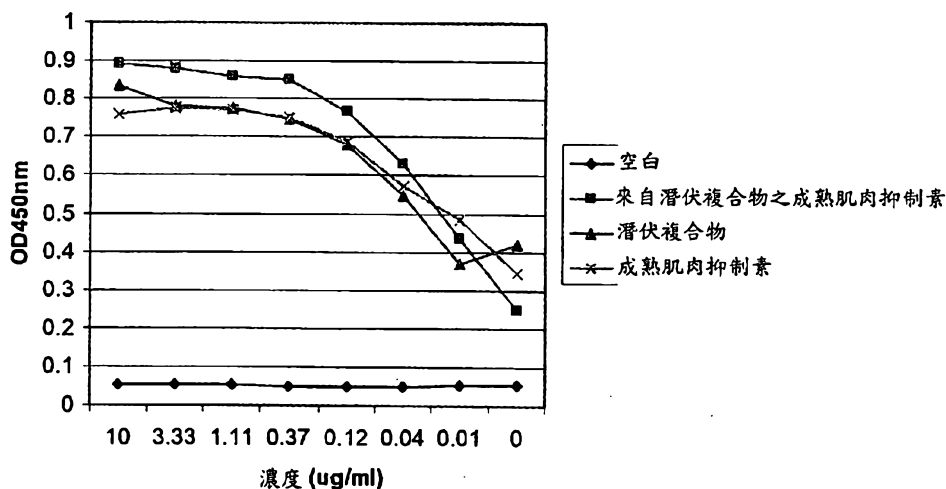
(54)名稱

人類化抗原結合蛋白

HUMANISED ANTIGEN BINDING PROTEINS

(57)摘要

本發明係關於結合肌肉抑制素(myostatin)人類化抗原結合蛋白(如抗體)編碼該等抗原結合蛋白之聚核苷酸、包含該等抗原結合蛋白之醫藥組合物及製造方法。本發明亦關於該等人類化抗原結合蛋白之用途，其係用於治療或預防與肌肉質量、肌力及肌肉功能降低之任一者或組合相關之疾病。





(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 201210612 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：100119304

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 06 月 01 日

(51)Int. Cl.：

A61K39/00 (2006.01)

C07K16/22 (2006.01)

A61P21/00 (2006.01)

(30)優先權：2010/06/03

美國

61/350,968

(71)申請人：葛蘭素集團有限公司 (英國) GLAXO GROUP LIMITED (GB)

英國

(72)發明人：艾許曼 克萊兒 ASHMAN, CLAIRE (GB)；艾許曼 史蒂芬 ASHMAN, STEPHEN (GB)；漢伯林 保羅 安德魯 HAMBLIN, PAUL ANDREW (GB)；路易斯 艾倫 彼德 LEWIS, ALAN PETER (GB)；歐加 馬丁 安伯 ORECCHIA, MARTIN ANIBAL (IT)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：26 項 圖式數：29 共 217 頁

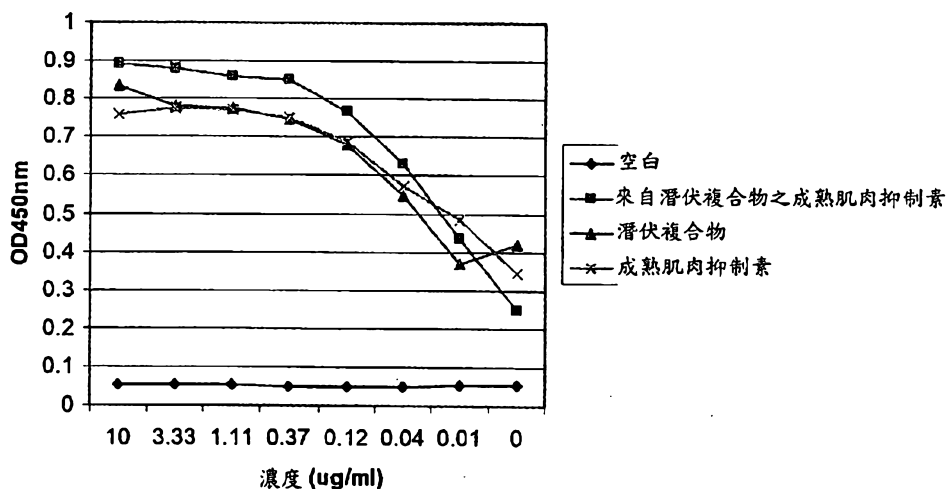
(54)名稱

人類化抗原結合蛋白

HUMANISED ANTIGEN BINDING PROTEINS

(57)摘要

本發明係關於結合肌肉抑制素(myostatin)人類化抗原結合蛋白(如抗體)編碼該等抗原結合蛋白之聚核苷酸、包含該等抗原結合蛋白之醫藥組合物及製造方法。本發明亦關於該等人類化抗原結合蛋白之用途，其係用於治療或預防與肌肉質量、肌力及肌肉功能降低之任一者或組合相關之疾病。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於結合肌肉抑制素之人類化抗原結合蛋白(諸如抗體)、編碼該等抗原結合蛋白之聚核苷酸、包含該等抗原結合蛋白之醫藥組合物及製造方法。本發明亦係關於該等人類化抗原結合蛋白之用途，其係用於治療或預防與低肌肉質量、肌力及肌肉功能中之任一者或其組合相關之疾病。

【先前技術】

肌肉抑制素亦稱為生長分化因子(Growth and Differentiation Factor ; GDF-8)，其為轉型生長因子- β (Transforming Growth Factor-beta ; TGF- β)超家族之成員且為肌肉質量之負性調節因子。肌肉抑制素在進化中高度保守，且人類、雞、小鼠及大鼠之序列在成熟C端域中100%一致。肌肉抑制素合成為含有信號序列、前肽域及C端域之前驅蛋白質。肌肉抑制素之分泌、循環形式包括活性成熟C端域及包含處於與前肽域及/或其他抑制蛋白質相關之潛伏複合物中之成熟C端域的非活性形式。

存在多種與低肌肉質量、肌力及肌肉功能相關之不同疾病、病症及病狀。增加運動及良好營養為治療該等疾病之當前療法的主要方式。不幸的是，對於部分患者，增加身體活動由於難以堅持及適應而很少實現其益處。同時，運動對於一些患者可能有困難、痛苦或無法進行。此外，與運動相關之肌肉運用可能不足以對肌肉產生任何有益影

響。營養介入僅在存在根本飲食缺乏且患者具有足夠食慾的情況下有效。由於此等限制，因此雖然治療與肌肉質量、肌力及肌肉功能中之任一者或其組合降低相關之疾病可獲得更廣泛益處，但該需要實質上未得到滿足。

已描述針對肌肉抑制素之抗體(WO 2008/030706、WO 2007/047112、WO 2007/044411、WO 2006/116269、WO 2005/094446、WO 2004/037861、WO 03/027248及WO 94/21681)。同時，Wagner等人(Ann Neurol. (2008) 63(5): 561-71)描述當使用一種所描述抗肌肉抑制素抗體時，在成人肌肉萎縮症(muscular dystrophies)(貝克爾肌肉萎縮症(Becker muscular dystrophy)、顏面肩胛肱骨型萎縮症(facioscapulohumeral dystrophy)及肢帶型肌肉萎縮症(limb-girdle muscular dystrophy))中肌力及功能之探測端點未獲得改良。

因此，仍需要治療或預防與肌肉質量、肌力及肌肉功能中之任一者或其組合降低相關之疾病的更有效療法。

【發明內容】

本發明提供特異性結合肌肉抑制素之人類化抗原結合蛋白。該抗原結合蛋白可用於治療或預防與低肌肉質量、肌力及肌肉功能中之任一者或其組合相關之疾病。

本發明提供人類化抗原結合蛋白，其特異性結合肌肉抑制素且在溶液相親和力檢定中具有強於150 pM之親和力。本發明亦提供特異性結合肌肉抑制素之人類化抗原結合蛋白，其中該抗原結合蛋白具有至少100小時之pK。

本發明提供特異性結合肌肉抑制素之人類化抗原結合蛋白，且其中該抗原結合蛋白包含重鏈可變區且其中該重鏈可變區包含SEQ ID NO: 90之CDRH3(F100G_Y變異體)；或該CDRH3之變異體；其中該抗原結合蛋白進一步包含Kabat 28位之絲胺酸殘基；及以下殘基中之至少一者或其組合或所有以下殘基：Kabat 66位之離胺酸殘基；Kabat 67位之丙胺酸殘基；Kabat 71位之纈胺酸殘基；及Kabat 73位之離胺酸殘基。

本發明提供特異性結合肌肉抑制素之人類化抗原結合蛋白，且其中該抗原結合蛋白包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含以下CDR序列中之一者、兩者或三者：

- (a) SEQ ID NO: 4之CDRL1或該CDRL1之變異體；
- (b) SEQ ID NO: 5之CDRL2或該CDRL2之變異體；及
- (c) SEQ ID NO: 109之CDRL3(C91S變異體)或該CDRL3之變異體；其中該抗原結合蛋白進一步包含Kabat 71位之酪胺酸殘基；及以下殘基中之至少一者或兩者：Kabat 46位之蘇胺酸殘基；及Kabat 69位之麩醯胺酸殘基。

本發明提供特異性結合肌肉抑制素之人類化抗原結合蛋白，其包含：

- (a) 重鏈可變區，其包含SEQ ID NO: 90之CDRH3(F100G_Y變異體)；或該CDRH3之變異體；其中該抗原結合蛋白進一步包含Kabat 28位之絲胺酸殘基；及以下殘基中之至少一者或其組合或所有以下殘基：Kabat 66位之離胺酸殘基；Kabat 67位之丙胺酸殘基；Kabat 71位之纈胺

酸殘基；及Kabat 73位之離胺酸殘基；及
視情況包含以下序列中之一或兩者：SEQ ID NO: 2之
CDRH2或該CDRH2之變異體；及CDRH1 (SEQ ID NO: 1)
或該CDRH1之變異體；及

(b) 輕鏈可變區，其包含以下CDR序列中之一者、兩者或
三者：SEQ ID NO: 4之CDRL1或該CDRL1之變異體；SEQ
ID NO: 5之CDRL2或該CDRL2之變異體；及SEQ ID NO:
109之CDRL3(C91S變異體)或該CDRL3之變異體；

其中該抗原結合蛋白進一步包含Kabat 71位之酪胺酸殘
基；及以下殘基中之至少一者或兩者：Kabat 46位之蘇胺
酸殘基；及Kabat 69位之麩醯胺酸殘基。

本發明亦提供人類化抗原結合蛋白，其特異性結合肌肉
抑制素且包含：

選自SEQ ID NO: 112、113、114、115、119、120或121之
重鏈可變區；及/或選自SEQ ID NO: 116、117或118之輕
鏈可變區；或與該序列具有75%或75%以上序列一致性之
變異型重鏈或輕鏈可變區；

其中CDRH3為SEQ ID NO: 90；CDRH2為SEQ ID NO: 2或
95；CDRH1為SEQ ID NO: 1；CDRL1為SEQ ID NO: 4；
CDRL2為SEQ ID NO: 5；且CDRL3為SEQ ID NO: 109；且
其中重鏈可變區進一步包含Kabat 28位之絲胺酸殘基；及
以下殘基中之至少一者或其組合或所有以下殘基：Kabat
66位之離胺酸殘基；Kabat 67位之丙胺酸殘基；Kabat 71
位之纈胺酸殘基；及Kabat 73位之離胺酸殘基；且

其中輕鏈可變區進一步包含Kabat 71位之酪胺酸殘基；及
以下殘基中之至少一者或兩者：Kabat 46位之蘇胺酸殘
基；及Kabat 69位之麩醯胺酸殘基。

本發明亦提供人類化抗原結合蛋白，其特異性結合肌肉
抑制素且包含：

- (a) SEQ ID NO: 112之重鏈可變區及SEQ ID NO: 116之輕
鏈可變區；
- (b) SEQ ID NO: 112之重鏈可變區及SEQ ID NO: 117之輕
鏈可變區；
- (c) SEQ ID NO: 112之重鏈可變區及SEQ ID NO: 118之輕
鏈可變區；
- (d) SEQ ID NO: 113之重鏈可變區及SEQ ID NO: 116之輕
鏈可變區；
- (e) SEQ ID NO: 113之重鏈可變區及SEQ ID NO: 117之輕
鏈可變區；
- (f) SEQ ID NO: 113之重鏈可變區及SEQ ID NO: 118之輕
鏈可變區；
- (g) SEQ ID NO: 114之重鏈可變區及SEQ ID NO: 116之輕
鏈可變區；
- (h) SEQ ID NO: 114之重鏈可變區及SEQ ID NO: 117之輕
鏈可變區；
- (i) SEQ ID NO: 114之重鏈可變區及SEQ ID NO: 118之輕
鏈可變區；
- (j) SEQ ID NO: 115之重鏈可變區及SEQ ID NO: 116之輕

鏈可變區；

(k) SEQ ID NO: 115之重鏈可變區及SEQ ID NO: 117之輕鏈可變區；

(l) SEQ ID NO: 115之重鏈可變區及SEQ ID NO: 118之輕鏈可變區；

(m) SEQ ID NO: 119之重鏈可變區及SEQ ID NO: 116之輕鏈可變區；

(n) SEQ ID NO: 119之重鏈可變區及SEQ ID NO: 117之輕鏈可變區；

(o) SEQ ID NO: 119之重鏈可變區及SEQ ID NO: 118之輕鏈可變區；

(p) SEQ ID NO: 120之重鏈可變區及SEQ ID NO: 116之輕鏈可變區；

(q) SEQ ID NO: 120之重鏈可變區及SEQ ID NO: 117之輕鏈可變區；

(r) SEQ ID NO: 120之重鏈可變區及SEQ ID NO: 118之輕鏈可變區；

(s) SEQ ID NO: 121之重鏈可變區及SEQ ID NO: 116之輕鏈可變區；

(t) SEQ ID NO: 121之重鏈可變區及SEQ ID NO: 117之輕鏈可變區；或

(u) SEQ ID NO: 121之重鏈可變區及SEQ ID NO: 118之輕鏈可變區。

本發明亦提供人類化抗原結合蛋白，其特異性結合肌肉

抑制素且包含：選自 SEQ ID NO: 123、125、127 或 138-144 之重鏈序列；及/或選自 SEQ ID NO: 145、146、147 之輕鏈序列；或與該序列具有 75% 或 75% 以上序列一致性之變異型重鏈或輕鏈序列，

其中 CDRH3 為 SEQ ID NO: 90；CDRH2 為 SEQ ID NO: 2 或 95；CDRH1 為 SEQ ID NO: 1；CDRL1 為 SEQ ID NO: 4；CDRL2 為 SEQ ID NO: 5；且 CDRL3 為 SEQ ID NO: 109；且其中重鏈進一步包含 Kabat 28 位之絲胺酸殘基；及以下殘基中之至少一者或其組合或所有以下殘基：Kabat 66 位之離胺酸殘基；Kabat 67 位之丙胺酸殘基；Kabat 71 位之纈胺酸殘基；及 Kabat 73 位之離胺酸殘基；且其中輕鏈進一步包含 Kabat 71 位之酪胺酸殘基；及以下殘基中之至少一者或兩者：Kabat 46 位之蘇胺酸殘基；及 Kabat 69 位之麩醯胺酸殘基。

本發明亦提供編碼特異性結合肌肉抑制素之人類化抗原結合蛋白之核酸分子，其包含：

SEQ ID NO: 122、124、126、128-131、135-137 之重鏈 DNA 序列；及/或選自 SEQ ID NO: 132、133 或 134 之輕鏈 DNA 序列；或

變異型重鏈或輕鏈 DNA 序列，其編碼 SEQ ID NO: 123、125、127 或 138-144 之重鏈序列；及/或 SEQ ID NO: 145、146 或 147 之輕鏈序列。

本發明亦提供編碼如本文所定義之人類化抗原結合蛋白之核酸分子。本發明亦提供包含如本文所定義之核酸分子

之表現載體。本發明亦提供包含如本文所定義之表現載體之重組宿主細胞。本發明亦提供產生如本文所定義之人類化抗原結合蛋白之方法，該方法包含培養如上文所定義之宿主細胞及回收抗原結合蛋白之步驟。本發明亦提供醫藥組合物，其包含如本文所定義之人類化抗原結合蛋白及醫藥學上可接受之載劑。

本發明亦提供治療罹患降低肌肉質量、肌力及/或肌肉功能之疾病之個體的方法，該方法包含投與如本文所定義之人類化抗原結合蛋白之步驟。

本發明提供治療罹患以下疾病之個體的方法：少肌症、惡病質、肌肉萎縮(muscle-wasting)、不用性肌肉萎縮症、HIV、AIDS、癌症、外科疾病、灼傷、肌肉骨骼或神經之創傷或損傷、肥胖症、糖尿病(包括II型糖尿病)、關節炎、慢性腎衰竭(CRF)、末期腎病(ESRD)、充血性心臟衰竭(CHF)、慢性阻塞性肺病(COPD)、選擇性關節修復(elective joint repair)、多發性硬化症(MS)、中風、肌肉萎縮症、運動神經元神經病變、肌肉萎縮性側索硬化(ALS)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、骨質疏鬆症、骨關節炎、脂肪酸肝病(fatty acid liver disease)、肝硬化、艾迪森氏病(Addison's disease)、庫欣氏症候群(Cushing's syndrome)、急性呼吸窘迫症候群、類固醇誘發之肌肉萎縮、肌炎或脊柱側彎，該方法包含投與治療有效量之如本文所述之人類化抗原結合蛋白之步驟。

本發明提供在患者中增加肌肉質量、增強肌力及/或改

善肌肉功能的方法，該方法包含投與如本文所述之人類化抗原結合蛋白之步驟。

本發明提供如本文所述之人類化抗原結合蛋白，其係用於治療罹患降低肌肉質量、肌力及肌肉功能中之任一者或其組合之疾病的個體。

本發明提供如本文所述之人類化抗原結合蛋白，其係用於治療少肌症、惡病質、肌肉萎縮、不用性肌肉萎縮症、HIV、AIDS、癌症、外科疾病、灼傷、肌肉骨骼或神經之創傷或損傷、肥胖症、糖尿病(包括II型糖尿病)、關節炎、慢性腎衰竭(CRF)、末期腎病(ESRD)、充血性心臟衰竭(CHF)、慢性阻塞性肺病(COPD)、選擇性關節修復、多發性硬化症(MS)、中風、肌肉萎縮症、運動神經元神經病變、肌肉萎縮性側索硬化(ALS)、帕金森氏病、骨質疏鬆症、骨關節炎、脂肪酸肝病、肝硬化、艾迪森氏病、庫欣氏肌肉萎縮(Cushing's muscle wasting)、肌炎或脊柱側彎。

本發明提供如本文所述之人類化抗原結合蛋白，其係用於在個體中增加肌肉質量、增強肌力及/或改善症候群、急性呼吸窘迫症候群、類固醇誘發之肌肉功能之方法中。

本發明提供如本文所述之人類化抗原結合蛋白之用途，其係用於製造用以治療罹患降低肌肉質量、肌力及肌肉功能中之任一者或其組合之疾病之個體的藥劑。

本發明提供如本文所述之人類化抗原結合蛋白之用途，其係用於製造用以治療以下疾病之藥劑：少肌症、惡病

質、肌肉萎縮、不用性肌肉萎縮症、HIV、AIDS、癌症、外科疾病、灼傷、肌肉骨骼或神經之創傷或損傷、肥胖症、糖尿病(包括II型糖尿病)、關節炎、慢性腎衰竭(CRF)、末期腎病(ESRD)、充血性心臟衰竭(CHF)、慢性阻塞性肺病(COPD)、選擇性關節修復、多發性硬化症(MS)、中風、肌肉萎縮症、運動神經元神經病變、肌肉萎縮性側索硬化(ALS)、帕金森氏病、骨質疏鬆症、骨關節炎、脂肪酸肝病、肝硬化、艾迪森氏病、庫欣氏肌肉萎縮、肌炎或脊柱側彎。

本發明提供如本文所述之人類化抗原結合蛋白之用途，其係用於製造用於在個體中增加肌肉質量、增強肌力及/或改善肌肉功能之方法中的藥劑。

【實施方式】

本發明提供特異性結合肌肉抑制素(例如均二聚成熟肌肉抑制素)之抗原結合蛋白。該抗原結合蛋白可結合及中和肌肉抑制素，例如人類肌肉抑制素。抗原結合蛋白可為抗體，例如單株抗體。

肌肉抑制素與GDF-8均指以下任一者：肌肉抑制素之全長未經加工前驅體形式；由C端域轉譯後裂解產生之成熟肌肉抑制素，其呈潛伏及非潛伏(活性)形式。術語肌肉抑制素亦指保留一或多種與肌肉抑制素相關之生物活性的肌肉抑制素之任何片段及變異體。

肌肉抑制素之全長未經加工前驅體形式包含前肽及C端域，該C端域在有或無信號序列下形成成熟蛋白質。肌肉

抑制素前肽加上C端域亦稱為聚合蛋白質。肌肉抑制素前驅體可以單體或均二聚體形式存在。

成熟肌肉抑制素為自肌肉抑制素前驅蛋白之C端(亦稱為C端域)裂解之蛋白質。成熟肌肉抑制素可以單體、均二聚體形式存在，或存在於肌肉抑制素潛伏複合物中。視條件而定，成熟肌肉抑制素可在此等不同形式之組合之間建立平衡。人類、雞、小鼠及大鼠肌肉抑制素之成熟C端域序列100%一致(參見例如SEQ ID NO: 104)。在一實施例中，本發明之抗原結合蛋白結合SEQ ID NO: 104中所示之均二聚成熟肌肉抑制素。

肌肉抑制素前肽為在信號序列裂解後自肌肉抑制素前驅蛋白質之N端域裂解之多肽。前肽亦稱為潛伏相關肽(LAP)。肌肉抑制素前肽能夠非共價結合於成熟肌肉抑制素上之前肽結合域。人類前肽肌肉抑制素序列之一實例提供於SEQ ID NO: 108中。

肌肉抑制素潛伏複合物為成熟肌肉抑制素與肌肉抑制素前肽或其他肌肉抑制素結合蛋白之間所形成的蛋白質複合物。舉例而言，兩個肌肉抑制素前肽分子可與兩個成熟肌肉抑制素分子締合形成非活性四聚潛伏複合物。肌肉抑制素潛伏複合物可包括其他肌肉抑制素結合蛋白替代一或兩個肌肉抑制素前肽或除一或兩個肌肉抑制素前肽之外亦包括其他肌肉抑制素結合蛋白。其他肌肉抑制素結合蛋白之實例包括卵泡抑素(follistatin)、卵泡抑素相關基因(FLRG)以及生長分化因子相關血清蛋白1(GASP-1)。

肌肉抑制素抗原結合蛋白可結合肌肉抑制素之前驅體形式、成熟形式、單體形式、二聚形式、潛伏形式及活性形式中之任一者或其任何組合。抗原結合蛋白可結合呈單體形式及/或二聚形式之成熟肌肉抑制素。當肌肉抑制素與前肽及/或卵泡抑素形成複合物時，抗原結合蛋白可能結合或可能不結合肌肉抑制素。或者，當肌肉抑制素與卵泡抑素相關基因(FLRG)及/或生長分化因子相關血清蛋白1(GASP-1)形成複合物時，抗原結合蛋白可能結合或可能不結合肌肉抑制素。舉例而言，抗原結合蛋白結合成熟二聚肌肉抑制素。

如本文所用之術語「抗原結合蛋白」係指能夠與肌肉抑制素結合之抗體、抗體片段及其他蛋白質構築體(諸如結構域)。

術語「抗體」在本文中以最廣泛意義使用以指具有免疫球蛋白樣結構域之分子，且包括單株抗體、重組抗體、多株抗體、嵌合抗體、人類化抗體、雙特異性抗體及異源結合抗體；單可變域、域抗體、抗原結合片段、免疫有效片段、單鏈Fv、雙功能抗體、Tandabs™等(關於替代性「抗體」格式之概述，參見 Holliger 及 Hudson, *Nature Biotechnology*, 2005, 第23卷, 第9期, 1126-1136)。

片語「單可變域」係指獨立於不同可變區或可變域特異性結合抗原或抗原決定基之抗原結合蛋白可變域(例如 V_H 、 V_{HH} 、 V_L)。

「域抗體」或「dAb」可視為與能夠結合抗原之「單可

變域」相同。單可變域可為人類抗體可變域，但亦包括來自其他物種之單抗體可變域，諸如齧齒動物(如例如 WO 00/29004 中所揭示)、護士鯊(nurse shark)及駱駝科動物(*Camelid*) V_{HH} dAb。駱駝科動物 V_{HH} 為自包括駱駝(camel)、美洲駝(llama)、羊駝(alpaca)、單峰駝(dromedary)及原駝(guanaco)之物種得到之免疫球蛋白單可變域多肽，該等物種產生天然缺乏輕鏈之重鏈抗體。可根據此項技術中可用之標準技術對該等 V_{HH} 域進行人類化，且將該等結構域視為「域抗體」。如本文中所用之 V_H 包括駱駝科動物 V_{HH} 域。

如本文中所用之術語「域/結構域」係指具有獨立於蛋白質其餘部分之三級結構的摺疊蛋白質結構。通常，結構域負責蛋白質之離散功能性質，且在許多情況下可將其添加、移除或轉移至其他蛋白質而不損失蛋白質其餘部分及/或結構域之功能。「單可變域」為包含抗體可變域所特有之序列的摺疊多肽域。因此，其包括完整抗體可變域及經修飾可變域(例如其中一或多個環已由不為抗體可變域所特有的序列置換)，或已截短或包含N端或C端延伸之抗體可變域，以及至少保留全長結構域之結合活性及特異性的可變域之摺疊片段。結構域可獨立於不同可變區或可變域結合抗原或抗原決定基。

抗原結合片段可藉助於在非抗體蛋白質骨架(諸如結構域)上排列一或多個CDR來提供。非抗體蛋白質骨架或結構域為已進行蛋白質工程改造以便能夠與除其天然配位體

以外之配位體結合者，例如作為選自以下之骨架之衍生物的結構域：CTLA-4(Evibody)；脂質運載蛋白(lipocalin)；蛋白質A來源之分子，諸如蛋白質A之Z域(親和抗體(Affibody)，SpA)、A域(高親和性多聚體(Avimer)/最大抗體(Maxibody))；熱休克蛋白，諸如GroEl及GroES；運鐵蛋白(transferrin)(轉運體(trans-body))；錨蛋白重複蛋白(ankyrin repeat protein)(DARPin)；肽適體；C型凝集素域(C-type lectin domain)(四連接素(Tetranectin))；人類 γ -晶狀體球蛋白(γ -crystallin)及人類泛素(ubiquitin)(阿夫林(affilins))；PDZ域；人類蛋白酶抑制劑之蠍毒素孔尼茲型域(scorpion toxinkunitz type domain)；及纖維結合蛋白(fibronectin)(黏附蛋白(adnectin))；其已進行蛋白質工程改造以便能夠與除其天然配位體以外之配位體結合。

CTLA-4(細胞毒性T淋巴細胞相關抗原4)為主要表現於CD4+T細胞上之CD28家族受體。其細胞外域具有可變域樣Ig摺疊。與抗體之CDR對應之環可經異源序列取代以賦予不同結合性質。經工程改造以具有不同結合特異性之CTLA-4分子亦稱為Evibody。更多詳情請參見Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001)。

脂質運載蛋白為轉運諸如類固醇、後膽色素(bilins)、類視黃素(retinoids)及脂質之小疏水性分子的細胞外蛋白質家族。其具有剛性 β 片二級結構，該二級結構在典型結構之開放末端具有多個環，該典型結構可經工程改造以結合不同目標抗原。抗運載蛋白(anticalins)之尺寸介於160-180

個胺基酸之間，且來源於脂質運載蛋白。更多詳情請參見 Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000)、US 7250297B1 及 US 20070224633。

親和抗體為自金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 之蛋白質 A 獲得之骨架，其可經工程改造以結合抗原。該結構域由具有約 58 個胺基酸之三螺旋束組成。已藉由表面殘基之隨機化產生文庫。更多詳情請參見 Protein Eng. Des. Sel. 17, 455-462 (2004) 及 EP1641818A1。

高親和性多聚體為自 A 域骨架家族獲得之多結構域蛋白質。具有約 35 個胺基酸之天然結構域採用明確二硫鍵鍵結之結構。藉由對 A 域家族所展現之天然變化進行改組產生多樣性。更多詳情請參見 Nature Biotechnology 23(12), 1556 -1561 (2005) 及 Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (2007 年 6 月)。

轉鐵蛋白為單體血清轉運醣蛋白。可藉由將肽序列(諸如一或多個 CDR) 插入容許表面環中來對運鐵蛋白進行工程改造以結合不同目標抗原。經工程改造之轉鐵蛋白骨架之實例包括轉運體 (Trans-body)。更多詳情請參見 J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999)。

所設計之錨蛋白重複蛋白 (DARPin) 來源於錨蛋白，錨蛋白為介導整合膜蛋白質連接至細胞骨架的蛋白質家族。單一錨蛋白重複為由 2 個 α 螺旋及 1 個 β 轉角組成之具有 33 個殘基之基元。其可藉由以下進行工程改造以結合不同目標抗原：隨機化各重複之第一 α 螺旋及 β 轉角中之殘基；或插入

肽序列(諸如一或多個CDR)。其結合界面可藉由增加模組數而增加(一種親和力成熟方法)。更多詳情請參見J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003) 及J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007)及US 20040132028A1。

纖維結合蛋白為可經工程改造以結合抗原之骨架。黏附蛋白(Adnectins)由III型人類纖維結合蛋白(FN3)之15個重複單元的第10結構域之天然胺基酸序列之主鏈組成。位於 β 夾層之一端的三個環可經工程改造以使黏附蛋白能夠特异性識別相關治療目標。更多詳情請參見Protein Eng. Des. Sel. 18, 435-444 (2005)、US 20080139791、WO 2005056764及US 6818418B1。

肽適體為由恆定骨架蛋白質組成之組合識別分子，該恆定骨架蛋白質通常為含有在活性位點處插入之受限可變肽環的硫氧還蛋白(thioredoxin; TrxA)。更多詳情請參見Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005)。

微體(microbody)來源於含有3-4個半胱胺酸橋且長度為25-50個胺基酸的天然存在之微蛋白(microprotein)；微蛋白之實例包括KalataB1及芋螺毒素(conotoxin)及打結素(knottins)。微蛋白具有可經工程改造以包括多達25個胺基酸而不影響微蛋白之整體摺疊的環。經工程改造之打結素域的更多詳情請參見WO 2008098796。

其他結合域包括已用作工程改造不同目標抗原結合性質之骨架的蛋白質，包括人類 γ -晶狀體球蛋白及人類泛素(阿夫林)、人類蛋白酶抑制劑之孔尼茲(kunitz)型結構域、

Ras- 結合蛋白 AF-6 之 PDZ 域、蠍毒素(卡律蠍毒素(charybdotoxin))、C型凝集素域(四連接素)，評述於治療性抗體手冊(Handbook of Therapeutic Antibodies)(2007，Stefan Dubel編)之第7章-非抗體骨架(Non-Antibody Scaffolds)及 Protein Science 15:14-27 (2006)中。本發明之結合域可來源於任何該等替代性蛋白質域及本發明 CDR 移植至結構域上之任何組合。

抗原結合片段或免疫有效片段可包含部分重鏈或輕鏈可變序列。片段長度為至少 5 個、6 個、8 個或 10 個胺基酸。或者，片段長度為至少 15 個、至少 20 個、至少 50 個、至少 75 個或至少 100 個胺基酸。

如本說明書通篇關於抗原結合蛋白所用之術語「特異性結合」意謂抗原結合蛋白與肌肉抑制素結合而不或不顯著結合其他(例如無關)蛋白質。然而，該術語並不排除抗原結合蛋白亦可與密切相關分子(例如生長分化因子-11)交叉反應之事實。本文所述之抗原結合蛋白可以其與密切相關分子(諸如 GDF-11)結合之親和力的至少 2、5、10、25、50、100 或 1000 倍大之親和力結合肌肉抑制素。

抗原結合蛋白-肌肉抑制素相互作用之結合親和力或平衡解離常數(K_D)可為 100 nM 或 100 nM 以下、10 nM 或 10 nM 以下、2 nM 或 2 nM 以下或 1 nM 或 1 nM 以下。或者， K_D 可介於 5 nM 與 10 nM 之間；或介於 1 nM 與 2 nM 之間。 K_D 可介於 500 pM 與 1 nM 之間或介於 1 pM 與 500 pM 之間或介於 1 pM 與 200 pM 之間或介於 1 pM 與 100 pM 之間。抗原結合蛋

白之結合親和力藉由締合速率常數(k_a)及解離速率常數(k_d)進行測定($K_D=K_d/K_a$)。結合親和力可利用BIAcore™，例如藉由用經由一級胺偶合而偶合至CM5晶片上之肌肉抑制素進行抗原捕捉及於此表面上進行抗體捕捉來量測。實例2.3中所述之BIAcore™方法可用於量測結合親和力。或者，結合親和力可利用FORTEbio，例如藉由用經由一級胺偶合而偶合至CM5針上之肌肉抑制素進行抗原捕捉及於此表面上進行抗體捕捉來量測。然而，由於本發明抗原結合蛋白與肌肉抑制素之結合性質，故結合親和力可用於分級目的。在一實施例中，可根據溶液相親和力檢定量測親和力(諸如在實例17中)。

k_d 可為 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 以下， $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下，或 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下。 k_d 可介於 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 與 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 之間；或介於 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 與 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 之間。緩慢 k_d 可使抗原結合蛋白-配位體複合物緩慢解離且使配位體之中和得到改良。

如本說明書所用之術語「中和」意謂在活體外或活體內，與不存在抗原結合蛋白時肌肉抑制素之活性相比，肌肉抑制素之生物活性在如本文所述之抗原結合蛋白存在下降低。中和可歸因於以下一或多者：阻斷肌肉抑制素與其受體之結合、阻止肌肉抑制素活化其受體、下調肌肉抑制素或其受體、或影響效應功能性。中和可歸因於阻斷肌肉抑制素與其受體之結合且從而阻止肌肉抑制素活化其受體。

肌肉抑制素活性包括與活性肌肉抑制素相關之生長活性、調節活性及形態發生活性中之一或多者，例如調節肌肉質量、肌力及肌肉功能。其他與活性肌肉抑制素相關之活性可包括調節肌肉纖維數目、肌肉纖維尺寸、肌肉再生、肌肉纖維化、肌母細胞增殖速率、肌原性分化；衛星細胞之活化、衛星細胞之增殖、衛星細胞之自我更新；肌肉生長及功能中所涉及之蛋白質的合成或分解代謝。肌肉可為骨骼肌。

生物活性之降低或抑制可為部分或完全的。與不存在抗原結合蛋白時之肌肉抑制素活性相比，中和抗原結合蛋白可中和肌肉抑制素之活性達至少20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在功能檢定(諸如以下所述之中和檢定)中， IC_{50} 為使生物反應降至其最大值之50%的濃度。

可使用熟習此項技術者已知或如本文所述之一或多種檢定來測定或量測中和作用。舉例而言，可在夾心ELISA中、藉由BIAcore™、FMAT、FORTEbio™或類似活體外檢定(諸如表面電漿子共振)評估抗原結合蛋白與肌肉抑制素之結合。

可使用基於ELISA之受體結合檢定藉由量測在抗原結合蛋白存在下肌肉抑制素與固定於板上之可溶性ActRIIb受體之結合來測定抗原結合蛋白之中和活性(更多詳情請參見實例2.5)。受體中和檢定為可用於基於效能區分 IC_{50} 低

於1 nM之分子的靈敏方法。然而，該檢定本身對勝任結合之生物素化肌肉抑制素之精確濃度敏感。因此，可獲得0.1 nM至5 nM範圍內之 IC_{50} 值，例如0.1 nM至3 nM，或0.1 nM至2 nM，或0.1 nM至1 nM。

或者，可使用基於細胞之受體結合檢定藉由量測對受體結合、下游信號傳導及基因活化之抑制作用來測定抗原結合蛋白之中和活性。舉例而言，中和抗原結合蛋白可根據在用編碼受PAI-1特異性啟動子控制之螢光素酶基因之構築體轉染的橫紋肌肉瘤細胞(A204)中抑制肌肉抑制素誘導之螢光素酶活性的能力進行鑑別，亦稱為肌肉抑制素反應性報導基因檢定(更多詳情請參見實例1.2)。

活體內中和作用可在顯示肌肉質量、肌力及肌肉功能中之任一者或其組合之變化的動物中使用多種不同檢定進行測定。舉例而言，可單獨或組合使用體重、肌肉質量(諸如瘦肌肉質量)、肌肉收縮性(例如強直力)、握力、動物使自身懸吊之能力及游泳測試來評估肌肉抑制素抗原結合蛋白之中和活性。舉例而言，可測定以下肌肉之肌肉質量：腓腸肌、四頭肌、三頭肌、伸趾長肌(EDL)、脛骨前肌(TA)及比目魚肌。

熟習此項技術者將顯而易知，術語「來源」不僅意欲定義在作為材料之實體起源之意義上的來源，而且亦定義結構上與該材料相同但並非起源於參考來源之材料。因此，「供體抗體中發現之殘基」未必需要自供體抗體純化得到。

分離意謂諸如抗原結合蛋白之分子係自在自然界中可發現其之環境中移除。舉例而言，分子可經純化與自然界中通常與之一起存在之物質分離。舉例而言，對於含有抗原結合蛋白之培養基，可將抗原結合蛋白純化為至少95%純、96%純、97%純、98%純或99%純或99%純以上。

「嵌合抗體」係指一種類型之經工程改造之抗體，其含有來源於供體抗體的天然存在之可變區(輕鏈及重鏈)以及來源於接受體抗體的輕鏈及重鏈恆定區。

「人類化抗體」係指一種類型之經工程改造之抗體，其具有一或多個來源於非人類供體免疫球蛋白之CDR，該分子之其餘免疫球蛋白衍生部分來源於一或多個人類免疫球蛋白。此外，可改變構架支撐殘基以保留結合親和力(參見例如 Queen 等人 Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989)，Hodgson 等人 . Bio/Technology, 9:421 (1991))。適當人類接受體抗體可為根據與供體抗體之核苷酸及胺基酸序列之同源性自例如 KABAT® 資料庫、Los Alamos 資料庫及 Swiss Protein 資料庫之習知資料庫選擇的人類接受體抗體。根據與供體抗體構架區之同源性(以胺基酸為基礎)表徵的人類抗體可適於提供用於插入供體 CDR 之重鏈恆定區及/或重鏈可變構架區。可以類似方式選擇能夠提供輕鏈恆定區或可變構架區之合適接受體抗體。應注意，接受體抗體重鏈及輕鏈無需來源於相同接受體抗體。先前技術描述若干種產生該等人類化抗體之方式，參見例如 EP-A-0239400 及 EP-A-054951。

術語「供體抗體」係指向第一免疫球蛋白搭配物貢獻該供體抗體之可變區、一或多個CDR或其他功能片段或其類似物之胺基酸序列的抗體。因此，供體提供經改變之免疫球蛋白編碼區及由此產生的具有供體抗體所特有之抗原特异性及中和活性的所表現之經改變抗體。

術語「接受體抗體」係指與供體抗體異源之抗體，其向第一免疫球蛋白搭配物貢獻編碼該接受體抗體之重鏈及/或輕鏈構架區及/或其重鏈及/或輕鏈恆定區的胺基酸序列之全部(或任何部分)。人類抗體可為接受體抗體。

術語「V_H」及「V_L」在本文中用於分別指抗原結合蛋白之重鏈可變區及輕鏈可變區。

「CDR」定義為抗原結合蛋白之互補決定區胺基酸序列。此等CDR為免疫球蛋白重鏈及輕鏈之高變區。在免疫球蛋白之可變部分中存在三個重鏈CDR及三個輕鏈CDR(或CDR區)。因此，如本文所用之「CDR」係指所有三個重鏈CDR、所有三個輕鏈CDR、所有重鏈及輕鏈CDR或至少兩個CDR。

在本說明書中，除非另外說明，否則可變域序列及全長抗體序列中之胺基酸殘基係根據Kabat編號規定進行編號。類似地，實例中所用之術語「CDR」、「CDRL1」、「CDRL2」、「CDRL3」、「CDRH1」、「CDRH2」、「CDRH3」遵循Kabat編號規定。關於其他資訊，請參見Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第4版，U.S. Department of Health and Human

Services, National Institutes of Health (1987)。舉例而言，圖20及21分別展示序列H0 (SEQ ID NO: 12)及L0 (SEQ ID NO: 15)之可變重鏈及輕鏈之Kabat編號。

熟習此項技術者將顯而易知，存在用於可變域序列及全長抗體序列中之胺基酸殘基的替代性編號規定。亦存在用於CDR序列之替代性編號規定，例如Chothia等人(1989) Nature 342: 877-883中所述之編號規定。抗體之結構及蛋白質摺疊可意謂其他殘基視為CDR序列之部分且熟習此項技術者將如此理解。因此，術語「相應CDR」在本文中用於指使用任何編號規定之CDR序列，例如表1中所述之編號規定。

熟習此項技術者可用之其他CDR序列編號規定包括「AbM」(University of Bath)及「接觸」(University College London)方法。可確定使用Kabat、Chothia、AbM及接觸方法中之至少兩者的最小重疊區以提供「最小結合單元」。最小結合單元可為CDR之子部分。

以下表1表示一種使用各編號規定對各CDR或結合單元進行之定義。Kabat編號方案在表1中用於對可變域胺基酸序列進行編號。應注意，一些CDR定義可視所使用之個別出版物而變。

表 1

	Kabat CDR	Chothia CDR	AbM CDR	接觸CDR	最小結合單元
H1	31-35/35A/35B	26-32/33/34	26-35/35A/35B	30-35/35A/35B	31-32
H2	50-65	52-56	50-58	47-58	52-56
H3	95-102	95-102	95-102	93-101	95-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36	30-34
L2	50-56	50-56	50-56	46-55	50-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96	89-96

如本文所用之術語「抗原結合位點」係指抗原結合蛋白上能夠特異性結合抗原之位點。其可為單一域(例如抗原決定基結合域)或單鏈Fv(ScFv)域，或其可為如標準抗體上可見之成對V_H/V_L域。

如本文所用之術語「抗原決定基」係指抗原中與抗原結合蛋白之特定結合域接觸之部分。抗原決定基可為線性抗原決定基，包含來自抗原之基本上呈線性的胺基酸序列。或者，抗原決定基可為構形或不連續抗原決定基。舉例而言，構形抗原決定基包含需要結構約束元件之胺基酸殘基。不連續抗原決定基包含由其他序列隔開(亦即在抗原一級序列中不處於連續序列中)之胺基酸殘基。在抗原三級結構及四級結構之情形中，不連續抗原決定基之殘基彼此足夠接近以由抗原結合蛋白結合。

對於核苷酸序列及胺基酸序列，術語「一致」或「序列一致性」指示兩個核酸序列或兩個胺基酸序列之間的一致性程度，且必要時屆時藉由適當插入或缺失而進行最佳比對及比較。

兩個序列之間的一致性百分比為在考慮兩個序列進行最佳比對所需引入之空隙數及各空隙長度下，該等序列所共有之相同位置數的函數(亦即一致性% = 相同位置數 / 總位置數 × 100)。如下所述，可使用數學演算法來完成兩個序列之間的序列比較及確定一致性百分比。

可使用GCG套裝軟體中之GAP程式，使用NWSgapdna.CMP矩陣及空隙權數40、50、60、70或80及長度權數1、2、3、4、5或6來確定兩個核苷酸序列之間的一致性百分比。亦可使用已併入ALIGN程式(2.0版本)中之E. Meyers及W. Miller之演算法(Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988))，使用PAM120權數殘基表、空隙長度處罰12及空隙處罰4來確定兩個核苷酸序列或胺基酸序列之間的一致性百分比。此外，可使用已併入GCG套裝軟體中之GAP程式中的Needleman及Wunsch(J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970))演算法，使用Blossum 62矩陣或PAM250矩陣及空隙權數16、14、12、10、8、6或4及長度權數1、2、3、4、5或6來確定兩個胺基酸序列之間的一致性百分比。

在一種方法中，聚核苷酸序列可與如本文所述之參考聚核苷酸序列(參見例如SEQ ID NO: 41-55)一致，亦即100%一致，或其與參考序列相比可包括多達某一整數之核苷酸變化，諸如至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。該等變化選自至少一個核苷酸缺失、取代(包括轉換及顛換)或插入，且其中該等變化可在參考核苷酸序列之5'端或3'端位置或該等末端位置之

間的任何地方發生，個別地散佈於參考序列之核苷酸之間或以一或多個毗連群組散佈於參考序列中。核苷酸變化之數目藉由以如本文所述之參考聚核苷酸序列(參見例如 SEQ ID NO: 41-55)中核苷酸之總數乘以各別一致性百分比之數值百分比(除以100)且自如本文所述參考聚核苷酸序列(參見例如 SEQ ID NO: 41-55)中之該核苷酸總數減去該乘積來確定，或者：

$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y)$$
，其中 n_n 為核苷酸變化數， x_n 為如本文所述之參考聚核苷酸序列(參見例如 SEQ ID NO: 41-55)中核苷酸之總數，且 y 為 0.50(對於 50%)、0.60(對於 60%)、0.70(對於 70%)、0.75(對於 75%)、0.80(對於 80%)、0.85(對於 85%)、0.90(對於 90%)、0.95(對於 95%)、0.98(對於 98%)、0.99(對於 99%) 或 1.00(對於 100%)， $\cdot$ 為乘法算子符號，且其中 x_n 及 y 之任何非整數乘積在自 x_n 減去之前向下捨入至最接近整數。

類似地，多肽序列可與如本文所述之多肽參考序列(參見例如 SEQ ID NO: 7-40、98 或 99)一致，亦即 100% 一致，或其與參考序列相比可包括多達某一整數之胺基酸變化使得一致性百分比小於 100%，諸如至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 一致。該等變化係選自由至少一個胺基酸缺失、取代(包括保守及非保守取代)或插入組成之群，且其中該等變化可在參考多肽序列之胺基或羧基端位置或該等末端位置之間的任何地方發生，個別地散佈於參考序列中之胺基酸之間或以一或多

個毗連群組散佈於參考序列中。指定一致性百分比下之胺基酸變化數藉由以由如本文所述之多肽參考序列(參見例如 SEQ ID NO: 7-40、98或99)編碼之多肽序列中的胺基酸總數乘以各別一致性百分比之數值百分比(除以100)且接著自如本文所述之多肽參考序列(參見例如 SEQ ID NO: 7-40或82-108、98或99)中之該胺基酸總數減去該乘積來確定，或者：

$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y)$ ，其中 n_a 為胺基酸變化數， x_a 為如本文所述之參考多肽序列(參見例如 SEQ ID NO: 7-40、98或99)中之胺基酸總數，且 y 為 0.50(對於 50%)、0.60(對於 60%)、0.70(對於 70%)、0.75(對於 75%)、0.80(對於 80%)、0.85(對於 85%)、0.90(對於 90%)、0.95(對於 95%)、0.98(對於 98%)、0.99(對於 99%)或 1.00(對於 100%)， $\cdot$ 為乘法運算子符號，且其中 x_a 及 y 之任何非整數乘積在自 x_a 減去之前向下捨入至最接近整數。

一致性百分比可在序列全長或其任何片段上及在有或無插入或缺失下確定。

術語「肽」、「多肽」及「蛋白質」各指包含兩個或兩個以上胺基酸殘基之分子。肽可為單體肽或聚合肽。

在此項技術中公認，某些胺基酸取代視為「保守性」。基於常見側鏈性質將胺基酸分組，且維持抗原結合蛋白之所有或實質上所有結合親和力的組內之取代視為保守性取代，參見下表 2：

表 2

側鏈	成員
疏水性	met、ala、val、leu、ile
中性親水性	cys、ser、thr
酸性	asp、glu
鹼性	asn、gln、his、lys、arg
影響鏈定向之殘基	gly、pro
芳族	trp、tyr、phe

本發明提供特異性結合肌肉抑制素之人類化抗原結合蛋白質。本發明亦提供特異性結合肌肉抑制素且具有至少100小時之pK的人類化抗原結合蛋白。

本發明提供人類化抗原結合蛋白重鏈序列，其結合肌肉抑制素且包含SEQ ID NO: 90之CDRH3；或其變異型CDRH3(例如SEQ ID NO: 3、82-89、91或92中之任一者)，其中該抗原結合蛋白進一步包含Kabat 28位之絲胺酸殘基；及以下殘基中之至少一者或其組合或所有以下殘基：Kabat 66位之離胺酸殘基、Kabat 67位之丙胺酸殘基、Kabat 71位之纈胺酸殘基及Kabat 73位之離胺酸殘基。抗原結合蛋白亦可中和肌肉抑制素活性。

舉例而言，本發明提供人類化抗原結合蛋白重鏈序列，其結合肌肉抑制素且包含SEQ ID NO: 90之CDRH3；或該CDRH3之變異體，其中該抗原結合蛋白進一步包含：

(a) Kabat 28位之絲胺酸殘基、Kabat 48位之異白胺酸殘基、Kabat 67位之丙胺酸殘基及Kabat 69位之白胺酸殘基；

(b) Kabat 28位之絲胺酸殘基、Kabat 71位之纈胺酸殘基及Kabat 73位之離胺酸殘基；

(c) Kabat 28位之絲胺酸殘基、Kabat 48位之異白胺酸殘基、Kabat 67位之丙胺酸殘基、Kabat 69位之白胺酸殘基、Kabat 71位之纈胺酸殘基及Kabat 73位之離胺酸殘基；或

(d) Kabat 20位之異白胺酸殘基、Kabat 28位之絲胺酸殘基、Kabat 48位之異白胺酸殘基、Kabat 66位之離胺酸殘基、Kabat 67位之丙胺酸殘基、Kabat 69位之白胺酸殘基、Kabat 71位之纈胺酸殘基及Kabat 73位之離胺酸殘基。

上述人類化抗原結合蛋白重鏈序列可進一步包含SEQ ID NO: 2之CDRH2；或該CDRH2之變異體。上述人類化抗原結合蛋白重鏈序列可進一步包含CDRH1 (SEQ ID NO: 1)或該CDRH1之變異體。

本發明提供人類化抗原結合蛋白輕鏈序列，其特異性結合肌肉抑制素且包含以下CDR序列中之一者、兩者或三者：

(a) SEQ ID NO: 4之CDRL1或該CDRL1之變異體；

(b) SEQ ID NO: 5之CDRL2或該CDRL2之變異體；及

(c) SEQ ID NO: 109之CDRL3或該CDRL3之變異體；

其中該抗原結合蛋白進一步包含Kabat 71位之酪胺酸殘基，及以下殘基中之至少一者或兩者：Kabat 46位之蘇胺酸殘基及Kabat 69位之麩醯胺酸殘基。

舉例而言，本發明提供人類化抗原結合蛋白輕鏈序列，其特異性結合肌肉抑制素且包含 SEQ ID NO: 109 之 CDRL3；或該 CDRL3 之變異體，其中該抗原結合蛋白進一步包含：

- (a) Kabat 69 位之麩醯胺酸殘基及 Kabat 71 位之酪胺酸殘基；
- (b) Kabat 46 位之蘇胺酸殘基及 Kabat 71 位之酪胺酸殘基；或
- (c) Kabat 46 位之蘇胺酸殘基、Kabat 69 位之麩醯胺酸殘基及 Kabat 71 位之酪胺酸殘基。

上述人類化抗原結合蛋白輕鏈序列可進一步包含 SEQ ID NO: 5 之 CDRL2；或該 CDRL2 之變異體。上述人類化抗原結合蛋白輕鏈序列可進一步包含 CDRL1 (SEQ ID NO: 4) 或該 CDRL1 之變異體。

本發明提供特異性結合肌肉抑制素之人類化抗原結合蛋白，其包含：

- (a) 重鏈序列，其包含 SEQ ID NO: 90 之 CDRH3，或該 CDRH3 之變異體，其中該抗原結合蛋白進一步包含 Kabat 28 位之絲胺酸殘基，及以下殘基中之至少一者或其組合或所有以下殘基：Kabat 66 位之離胺酸殘基，Kabat 67 位之丙胺酸殘基，Kabat 71 位之纈胺酸殘基及 Kabat 73 位之離胺酸殘基；及

視情況包含以下序列中之一或兩者：SEQ ID NO: 2 之 CDRH2 或該 CDRH2 之變異體；及 CDRH1 (SEQ ID NO: 1)

或該CDRH1之變異體；及

(b) 輕鏈序列，其包含以下CDR序列中之一者、兩者或三者：SEQ ID NO: 4之CDRL1或該CDRL1之變異體；SEQ ID NO: 5之CDRL2或該CDRL2之變異體；及SEQ ID NO: 109之CDRL3或該CDRL3之變異體；

其中該抗原結合蛋白進一步包含Kabat 71位之酪胺酸殘基，及以下殘基中之至少一者或兩者：Kabat 46位之蘇胺酸殘基及Kabat 69位之麩醯胺酸殘基。

上述人類化抗原結合蛋白除CDRH3序列以外可進一步包含選自以下之一或多個CDR之任何組合或所有CDR：CDRH1 (SEQ ID NO: 1)、CDRH2 (SEQ ID NO: 2)、CDRL1 (SEQ ID NO: 4)、CDRL2 (SEQ ID NO: 5)及CDRL3 (SEQ ID NO: 6或109)；或其變異體(例如CDRH2變異體SEQ ID NO: 93-97、110中之任一者)。

舉例而言，上述人類化抗原結合蛋白可包含CDRH3 (SEQ ID NO: 90)及CDRH1 (SEQ ID NO: 1)或其變異體(例如CDRH3變異體3、82-89、91、92中之任一者)。人類化抗原結合蛋白可包含CDRH3 (SEQ ID NO: 90)及CDRH2 (SEQ ID NO: 2)或其變異體(例如CDRH3變異體SEQ ID NO: 3、82-89、91、92中之任一者；或CDRH2變異體SEQ ID NO: 93-97、110中之任一者)。人類化抗原結合蛋白可包含CDRH1 (SEQ ID NO: 1)及CDRH2 (SEQ ID NO: 2)及CDRH3 (SEQ ID NO: 90)或其變異體(例如CDRH3變異體SEQ ID NO: 3、82-89、91、92中之任一者；或CDRH2變

異體 SEQ ID NO: 93-97、110中之任一者)。

人類化抗原結合蛋白可包含CDRL1 (SEQ ID NO: 4)及CDRL2 (SEQ ID NO: 5)或其變異體。人類化抗原結合蛋白可包含CDRL2 (SEQ ID NO: 5)及CDRL3 (SEQ ID NO: 6或109)或其變異體。人類化抗原結合蛋白可包含CDRL1 (SEQ ID NO: 4)、CDRL2 (SEQ ID NO: 5)及CDRL3 (SEQ ID NO: 6或109)或其變異體。

人類化抗原結合蛋白可包含CDRH3 (SEQ ID NO: 90)及CDRL3 (SEQ ID NO: 6或109)或其變異體(例如CDRH3變異體 SEQ ID NO: 3、82-89、91、92中之任一者)。人類化抗原結合蛋白可包含CDRH3 (SEQ ID NO: 90)、CDRH2 (SEQ ID NO: 2)及CDRL3 (SEQ ID NO: 6或109)或其變異體(例如CDRH3變異體 SEQ ID NO: 3、82-89、92、92中之任一者；或CDRH2變異體 SEQ ID NO: 93-97、110中之任一者)。人類化抗原結合蛋白可包含CDRH3 (SEQ ID NO: 90)、CDRH2 (SEQ ID NO: 2)、CDRL2 (SEQ ID NO: 5)及CDRL3 (SEQ ID NO: 6或109)或其變異體(例如CDRH3變異體 SEQ ID NO: 3、82-89、91、92中之任一者；或CDRH2變異體 SEQ ID NO: 93-97、110中之任一者)。

人類化抗原結合蛋白可包含CDRH1 (SEQ ID NO: 1)、CDRH2 (SEQ ID NO: 2或95)、CDRH3 (SEQ ID NO: 90)、CDRL1 (SEQ ID NO: 4)、CDRL2 (SEQ ID NO: 5)及CDRL3 (SEQ ID NO: 6或109)。舉例而言，人類化抗原結合蛋白可包含CDRH1 (SEQ ID NO: 1)、CDRH2 (SEQ ID NO: 95)、

CDRH3 (SEQ ID NO: 90)、CDRL1 (SEQ ID NO: 4)、CDRL2 (SEQ ID NO: 5)及CDRL3 (SEQ ID NO: 109)。

CDR變異體包括經至少一個胺基酸修飾之胺基酸序列，其中該修飾可為胺基酸序列之化學或部分變化(例如不超過10個胺基酸)，該修飾允許變異體保留未經修飾序列之生物學性質。舉例而言，變異體為與肌肉抑制素結合之功能變異體。CDR胺基酸序列之部分變化可為一至若干個胺基酸之缺失或取代，或一至若干個胺基酸之添加或插入，或其組合(例如不超過10個胺基酸)。CDR變異體可在胺基酸序列中含有1、2、3、4、5或6個胺基酸取代、添加或缺失之任何組合。CDR變異體可在胺基酸序列中含有1、2或3個胺基酸取代、插入或缺失之任何組合。CDR變異體可在胺基酸序列中含有1個胺基酸取代、插入或缺失。胺基酸殘基之取代可為保守性取代，例如用一個疏水性胺基酸取代一替代性疏水性胺基酸。舉例而言，白胺酸可經纈胺酸或異白胺酸取代。

CDR L1、L2、L3、H1及H2傾向於在結構上呈現有限數目之主鏈構形之一。CDR之特定典型結構類別係由CDR長度與環填充(loop packing)定義，由位於CDR與構架區中之關鍵位置處的殘基(結構決定殘基或SDR)決定。Martin及Thornton(1996; J Mol Biol 263:800-815)已產生了一種定義「關鍵殘基」典型模板之自動方法。使用叢集分析來定義CDR組之典型類別，且接著藉由分析內埋式疏水物(buried hydrophobics)、氫鍵結殘基及保守性甘胺酸及脯胺酸來鑑

別典型模板。可藉由將序列與關鍵殘基模板進行比較且使用一致性或相似性矩陣對各模板進行評分來將抗體序列之CDR歸類於典型類別。

典型 CDR 之實例 (其中 Kabat 編號前之胺基酸為 SEQ ID NO: 14 或 24 之原始胺基酸序列且 Kabat 編號後端之胺基酸序列為所取代之胺基酸) 包括：

典型 CDRH1：Y32I、Y32H、Y32F、Y32T、Y32N、Y32C、Y32E、Y32D、F33Y、F33A、F33W、F33G、F33T、F33L、F33V、M34I、M34V、M34W、H35E、H35N、H35Q、H35S、H35Y、H35T；

典型 CDRH2：N50R、N50E、N50W、N50Y、N50G、N50Q、N50V、N50L、N50K、N50A、I51L、I51V、I51T、I51S、I51N、Y52D、Y52L、Y52N、Y52S、Y53A、Y53G、Y53S、Y53K、Y53T、Y53N、N54S、N54T、N54K、N54D、N54G、V56Y、V56R、V56E、V56D、V56G、V56S、V56A、N58K、N58T、N58S、N58D、N58R、N58G、N58F、N58Y；

典型 CDRH3：V102Y、V102H、V102I、V102S、V102D、V102G；

典型 CDRL1：D28N、D28S、D28E、D28T、I29V、N30D、N30L、N30Y、N30V、N30I、N30S、N30F、N30H、N30G、N30T、S31N、S31T、S31K、S31G、Y32F、Y32N、Y32A、Y32H、Y32S、Y32R、L33M、L33V、L33I、L33F、S34A、S34G、S34N、S34H、

S34V、S34F；

典型CDRL2：A51T、A51G、A51V；

典型CDRL3：L89Q、L89S、L89G、L89F、Q90N、Q90H、S91N、S91F、S91G、S91R、S91D、S91H、S91T、S91Y、S91V、D92N、D92Y、D92W、D92T、D92S、D92R、D92Q、D92H、D92A、E93N、E93G、E93H、E93T、E93S、E93R、E93A、F94D、F94Y、F94T、F94V、F94L、F94H、F94N、F94I、F94W、F94P、F94S、L96P、L96Y、L96R、L96I、L96W、L96F。

每個CDR、每個重鏈或輕鏈可變區、每個重鏈或輕鏈及每個抗原結合蛋白中可存在多個變異型CDR典型位置，且因此本發明之人類化抗原結合蛋白中可存在取代之任何組合，其限制條件為維持CDR之典型結構。

CDR變異體之其他實例包括(使用Kabat編號方案，其中Kabat編號前之胺基酸為SEQ ID NO: 14或24之原始胺基酸序列且Kabat編號後端之胺基酸序列為所取代之胺基酸)：

H2：G55D、G55L、G55S、G55T、G55V；

H3：Y96L、G99D、G99S、G100A_K、P100B_F、P100B_I、W100E_F、F100G_N、F100G_S、F100G_Y、V102N、V102S；

L3：C91S。

舉例而言，結合肌肉抑制素之本發明人類化抗原結合蛋白可包含SEQ ID NO: 90之CDRH3。人類化抗原結合蛋白

可進一步包含SEQ ID NO: 2、93-97中任一者之CDRH2。詳言之，CDRH2可為SEQ ID NO: 95。人類化抗原結合蛋白亦可包含SEQ ID NO: 109之CDRL3。人類化抗原結合蛋白可進一步包含以下序列中之任一者或其組合或所有以下序列：CDRH1 (SEQ ID NO: 1)、CDRL1 (SEQ ID NO: 4)及CDRL2 (SEQ ID NO: 5)。人類化抗原結合蛋白亦可中和肌肉抑制素活性。

包含CDR之人類化抗原結合蛋白可顯示10B3或10B3嵌合體(重鏈：SEQ ID NO: 7或25，輕鏈：SEQ ID NO: 8)所顯示效能之10倍以內或5倍以內之結合肌肉抑制素之效能(如由EC₅₀所顯示)。如EC₅₀所顯示，結合肌肉抑制素之效能可利用ELISA檢定測得。

如上文所討論，CDR之特定典型結構類別係由CDR長度與環填充定義，由位於CDR與構架區中之關鍵位置處的殘基決定。因此，除如上所述之SEQ ID NO: 1-6、SEQ ID NO: 82-97、SEQ ID NO: 109及110中列舉之CDR外，本發明抗原結合蛋白之典型構架殘基亦可包括(使用Kabat編號)：

重鏈：2位之V、I或G；4位之L或V；20位之L、I、M或V；22位之C；24位之T、A、V、G或S；26位之G；29位之I、F、L或S；36位之W；47位之W或Y；48位之I、M、V或L；69位之I、L、F、M或V；78位之A、L、V、Y或F；80位之L或M；90位之Y或F；92位之C；及/或94位之R、K、G、S、H或N；及/或

輕鏈：2位之I、L或V；3位之V、Q、L或E；4位之M或L；23位之C；35位之W；36位之Y、L或F；46位之S、L、R或V；49位之Y、H、F或K；71位之Y或F；88位之C；及/或98位之F。

本發明之人類化抗原結合蛋白中可存在上述構架位置中之任一者、其任何組合或所有上述構架位置。每個重鏈或輕鏈可變區、每個重鏈或輕鏈及每個抗原結合蛋白中可存在多個變異型構架典型位置，且因此本發明之人類化抗原結合蛋白中可存在任何組合，其限制條件為維持構架之典型結構。

舉例而言，重鏈可變構架可包含2位之V、4位之L、20位之V、22位之C、24位之A、26位之G、29位之F、36位之W、47位之W、48位之M、69位之M、78位之A、80位之M、90位之Y、92位之C及94位之R。舉例而言，輕鏈可變構架可包含2位之I、3位之Q、4位之M、23位之C、35位之W、36位之F、46位之S、49位之Y、71位之Y、88位之C及98位之F。

人類化重鏈可變域可在與SEQ ID NO: 10中之人類接受體可變域序列在構架區中具有75%或75%以上、80%或80%以上、85%或85%以上、90%或90%以上、95%或95%以上、98%或98%以上、99%或99%以上或100%一致性之接受體抗體構架內包含如上文所述SEQ ID NO: 1-3；SEQ ID NO: 82-97及110中所列之CDR。人類化輕鏈可變域可在與SEQ ID NO: 11中之人類接受體可變域序列在構架區中

具有 75% 或 75% 以上、80% 或 80% 以上、85% 或 85% 以上、90% 或 90% 以上、95% 或 95% 以上、98% 或 98% 以上、99% 或 99% 以上或 100% 一致性之接受體抗體構架內包含如上文所述 SEQ ID NO: 4-6；及 SEQ ID NO: 109 中所列之 CDR。在 SEQ ID NO: 10 及 SEQ ID NO: 11 中，CDRH3/CDRL3 之位置由 X 表示。SEQ ID NO: 10 及 SEQ ID NO: 11 中之 10 個 X 殘基為 CDR 位置之佔位符且不為各 CDR 中胺基酸序列數目之量度。

本發明亦提供人類化抗原結合蛋白，其結合肌肉抑制素且包含選自 SEQ ID NO: 112、113、114、115、119、120 或 121 中任一者之重鏈可變區。抗原結合蛋白可包含選自 SEQ ID NO: 116、117 或 118 中任一者之輕鏈可變區。任何重鏈可變區可與任何輕鏈可變區組合。抗原結合蛋白亦可中和肌肉抑制素。

人類化抗原結合蛋白可包含以下重鏈及輕鏈可變區組合中之任一者：H3L4 (SEQ ID NO: 112 及 SEQ ID NO: 116)、H3L5 (SEQ ID NO: 112 及 SEQ ID NO: 117)、H3L6 (SEQ ID NO: 112 及 SEQ ID NO: 118)、H4L4 (SEQ ID NO: 113 及 SEQ ID NO: 116)、H4L5 (SEQ ID NO: 113 及 SEQ ID NO: 117)、H4L6 (SEQ ID NO: 113 及 SEQ ID NO: 118)、H5L4 (SEQ ID NO: 114 及 SEQ ID NO: 116)、H5L5 (SEQ ID NO: 114 及 SEQ ID NO: 117)、H5L6 (SEQ ID NO: 114 及 SEQ ID NO: 118)、H6L4 (SEQ ID NO: 115 及 SEQ ID NO: 116)、H6L5 (SEQ ID NO: 115 及 SEQ ID NO: 117)、H6L6 (SEQ

ID NO: 115及SEQ ID NO: 118)、H7L4 (SEQ ID NO: 119及SEQ ID NO: 116)、H7L5 (SEQ ID NO: 119及SEQ ID NO: 117)、H7L6 (SEQ ID NO: 119及SEQ ID NO: 118)、H8L4 (SEQ ID NO: 120及SEQ ID NO: 116)、H8L5 (SEQ ID NO: 120及SEQ ID NO: 117)、H8L6 (SEQ ID NO: 120及SEQ ID NO: 118)、H9L4 (SEQ ID NO: 121及SEQ ID NO: 116)、H9L5 (SEQ ID NO: 121及SEQ ID NO: 117)或H9L6 (SEQ ID NO: 121及SEQ ID NO: 118)。

抗體重鏈可變區可與SEQ ID NO: 112、113、114、115、119、120或121中之任一者(其中存在如本文所定義之CDRH1、CDRH2及CDRH3或變異體)具有75%或75%以上、80%或80%以上、85%或85%以上、90%或90%以上、95%或95%以上、98%或98%以上、99%或99%以上或100%一致性；且其中重鏈可變區進一步包含Kabat 28位之絲胺酸殘基；及以下殘基中之至少一者或其組合或所有以下殘基：Kabat 66位之離胺酸殘基、Kabat 67位之丙胺酸殘基、Kabat 71位之纈胺酸殘基及Kabat 73位之離胺酸殘基。舉例而言，CDRH3為SEQ ID NO: 90；CDRH2為SEQ ID NO: 2或95；CDRH1為SEQ ID NO: 1。

舉例而言，重鏈可變區可進一步包含：

(a) Kabat 28位之絲胺酸殘基、Kabat 48位之異白胺酸殘基、Kabat 67位之丙胺酸殘基及Kabat 69位之白胺酸殘基；

(b) Kabat 28位之絲胺酸殘基、Kabat 71位之纈胺酸殘基

及 Kabat 73 位之離胺酸殘基；

(c) Kabat 28 位之絲胺酸殘基、Kabat 48 位之異白胺酸殘基、Kabat 67 位之丙胺酸殘基、Kabat 69 位之白胺酸殘基、Kabat 71 位之纈胺酸殘基及 Kabat 73 位之離胺酸殘基；或

(d) Kabat 20 位之異白胺酸殘基、Kabat 28 位之絲胺酸殘基、Kabat 48 位之異白胺酸殘基、Kabat 66 位之離胺酸殘基、Kabat 67 位之丙胺酸殘基、Kabat 69 位之白胺酸殘基、Kabat 71 位之纈胺酸殘基及 Kabat 73 位之離胺酸殘基。

抗體輕鏈可變區可與 SEQ ID NO: 116、117 或 118 中之任一者(其中存在如本文所定義之 CDRL1、CDRL2 及 CDRL3)具有 75% 或 75% 以上、80% 或 80% 以上、85% 或 85% 以上、90% 或 90% 以上、95% 或 95% 以上、98% 或 98% 以上、99% 或 99% 以上或 100% 一致性；且其中輕鏈可變區進一步包含 Kabat 71 位之酪胺酸殘基；及以下殘基中之至少一者或兩者：Kabat 46 位之蘇胺酸殘基及 Kabat 69 位之麩醯胺酸殘基。舉例而言，CDRL1 為 SEQ ID NO: 4；CDRL2 為 SEQ ID NO: 5；且 CDRL3 為 SEQ ID NO: 109。

舉例而言，輕鏈可變區可進一步包含：

(a) Kabat 69 位之麩醯胺酸殘基及 Kabat 71 位之酪胺酸殘基；

(b) Kabat 46 位之蘇胺酸殘基及 Kabat 71 位之酪胺酸殘基；或

(c) Kabat 46位之蘇胺酸殘基、Kabat 69位之麩醯胺酸殘基及Kabat 71位之酪胺酸殘基。

任何重鏈可變區可與任何輕鏈可變區組合。

可在序列全長上確定SEQ ID NO: 112-121之序列之一致性百分比。

抗體重鏈可變區可為SEQ ID NO: 112、113、114、115、119、120或121中任一者之變異體，其含有30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸取代、插入或缺失。抗體輕鏈可變區可為SEQ ID NO: 116、117或118中任一者之變異體，其含有30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸取代、插入或缺失。

舉例而言，上述典型CDR及典型構架殘基取代亦可存在於作為至少75%一致或含有至多30個胺基酸取代之變異型序列的變異型重鏈或輕鏈中。

任何重鏈可變區可與適合人類恆定區組合。任何輕鏈可變區可與適合恆定區組合。

本發明亦提供人類化抗原結合蛋白，其結合肌肉抑制素且包含選自SEQ ID NO: 123、125、127或138-144中任一者之重鏈。人類化抗原結合蛋白可包含選自SEQ ID NO: 145、146或147中任一者之輕鏈。任何重鏈可與任何輕鏈組合。抗原結合蛋白亦可中和肌肉抑制素。

人類化抗原結合蛋白可包含以下重鏈及輕鏈組合中之任一者：H3L4 (SEQ ID NO: 138及SEQ ID NO: 145)、H3L5

(SEQ ID NO: 138及SEQ ID NO: 146)、H3L6 (SEQ ID NO: 138及SEQ ID NO: 147)、H4L4 (SEQ ID NO: 139及SEQ ID NO: 145)、H4L5 (SEQ ID NO: 139及SEQ ID NO: 146)、H4L6 (SEQ ID NO: 139及SEQ ID NO: 147)、H5L4 (SEQ ID NO: 140及SEQ ID NO: 145)、H5L5 (SEQ ID NO: 140及SEQ ID NO: 146)、H5L6 (SEQ ID NO: 140及SEQ ID NO: 147)、H6L4 (SEQ ID NO: 141及SEQ ID NO: 145)、H6L5 (SEQ ID NO: 141及SEQ ID NO: 146)、H6L6 (SEQ ID NO: 141及SEQ ID NO: 147)、H7L4 (SEQ ID NO: 142及SEQ ID NO: 145)、H7L5 (SEQ ID NO: 142及SEQ ID NO: 146)、H7L6 (SEQ ID NO: 142及SEQ ID NO: 147)、H8L4 (SEQ ID NO: 143及SEQ ID NO: 145)、H8L5 (SEQ ID NO: 143及SEQ ID NO: 146)、H8L6 (SEQ ID NO: 143及SEQ ID NO: 147)、H9L4 (SEQ ID NO: 144及SEQ ID NO: 145)、H9L5 (SEQ ID NO: 144及SEQ ID NO: 146)、H9L6 (SEQ ID NO: 144及SEQ ID NO: 147)、H7失能L4 (SEQ ID NO: 123及SEQ ID NO: 145)、H7失能L5 (SEQ ID NO: 123及SEQ ID NO: 146)、H7失能L6 (SEQ ID NO: 123及SEQ ID NO: 147)、H8失能L4 (SEQ ID NO: 125及SEQ ID NO: 145)、H8失能L5 (SEQ ID NO: 125及SEQ ID NO: 146)、H8失能L6 (SEQ ID NO: 125及SEQ ID NO: 147)、H9失能L4 (SEQ ID NO: 127及SEQ ID NO: 145)、H9失能L5 (SEQ ID NO: 127及SEQ ID NO: 146)或H9失能L6 (SEQ ID NO: 127及SEQ ID NO: 147)。

抗體重鏈可與如本文所定義存在CDRH1、CDRH2及CDRH3或變異體之SEQ ID NO: 中之任一者具有75%或75%以上、80%或80%以上、85%或85%以上、90%或90%以上、95%或95%以上、98%或98%以上、99%或99%以上或100%一致性；且其中重鏈進一步包含Kabat 28位之絲胺酸殘基；及以下殘基中之至少一者或其組合或所有以下殘基：Kabat 66位之離胺酸殘基、Kabat 67位之丙胺酸殘基、Kabat 71位之纈胺酸殘基及Kabat 73位之離胺酸殘基。舉例而言，CDRH3為SEQ ID NO: 90；CDRH2為SEQ ID NO: 2或95；CDRH1為SEQ ID NO: 1。

舉例而言，重鏈可進一步包含：

(a) Kabat 28位之絲胺酸殘基、Kabat 48位之異白胺酸殘基、Kabat 67位之丙胺酸殘基及Kabat 69位之白胺酸殘基；

(b) Kabat 28位之絲胺酸殘基、Kabat 71位之纈胺酸殘基及Kabat 73位之離胺酸殘基；

(c) Kabat 28位之絲胺酸殘基、Kabat 48位之異白胺酸殘基、Kabat 67位之丙胺酸殘基、Kabat 69位之白胺酸殘基、Kabat 71位之纈胺酸殘基及Kabat 73位之離胺酸殘基；或

(d) Kabat 20位之異白胺酸殘基、Kabat 28位之絲胺酸殘基、Kabat 48位之異白胺酸殘基、Kabat 66位之離胺酸殘基、Kabat 67位之丙胺酸殘基、Kabat 69位之白胺酸殘基、Kabat 71位之纈胺酸殘基及Kabat 73位之離胺酸殘基

基。

抗體輕鏈可與如本文所定義存在 CDRL1、CDRL2 及 CDRL3 或變異體之 SEQ ID NO: 中之任一者具有 75% 或 75% 以上、80% 或 80% 以上、85% 或 85% 以上、90% 或 90% 以上、95% 或 95% 以上、98% 或 98% 以上、99% 或 99% 以上或 100% 一致性；且其中輕鏈進一步包含 Kabat 71 位之酪胺酸殘基；及以下殘基中之至少一者或兩者：Kabat 46 位之蘇胺酸殘基及 Kabat 69 位之麩醯胺酸殘基。舉例而言，CDRL1 為 SEQ ID NO: 4；CDRL2 為 SEQ ID NO: 5；且 CDRL3 為 SEQ ID NO: 109。

舉例而言，輕鏈可進一步包含：

(a) Kabat 69 位之麩醯胺酸殘基及 Kabat 71 位之酪胺酸殘基；

(b) Kabat 46 位之蘇胺酸殘基及 Kabat 71 位之酪胺酸殘基；或

(c) Kabat 46 位之蘇胺酸殘基、Kabat 69 位之麩醯胺酸殘基及 Kabat 71 位之酪胺酸殘基。

可在序列全長上確定 SEQ ID NO: 之序列之一致性百分比。

抗體重鏈可為 SEQ ID NO: 中任一者之變異體，其含有 30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 個胺基酸取代、插入或缺失。抗體輕鏈可為 SEQ ID NO: 中任一者之變異體，其含有 30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 個胺基酸取代、插入或缺失。

舉例而言，上述典型CDR及典型構架殘基取代亦可存在於作為至少75%一致或含有至多30個胺基酸取代之變異型序列的變異型重鏈或輕鏈中。

如上文所述之抗原結合蛋白，例如藉由化學修飾及/或插入、缺失或取代一或多個胺基酸殘基而具有序列部分變化之變異體，或與任何上述序列具有75%或75%以上、80%或80%以上、85%或85%以上、90%或90%以上、95%或95%以上、98%或98%以上或99%或99%以上之一致性的變異體可如EC₅₀所示，顯示在10B3或10B3嵌合體(重鏈：SEQ ID NO: 7或25，輕鏈：SEQ ID NO: 8)所示效能的10倍以內或5倍以內的與肌肉抑制素結合之效能。如EC₅₀所示，與肌肉抑制素結合之效能可利用ELISA檢定測得。

本發明之抗原結合蛋白可經Fc失能。一種達成Fc失能之方式包含取代重鏈恆定區之235位及237位(EU索引編號)處之丙胺酸殘基。舉例而言，抗原結合蛋白可經Fc失能且包含SEQ ID NO: 123(人類化重鏈：H7_G55S-F100G_Y Fc失能)；或SEQ ID NO: 125(人類化重鏈：H8_G55S-F100G_Y Fc失能)；或SEQ ID NO: 127(人類化重鏈：H9_G55S-F100G_Y Fc失能)之序列。或者，抗原結合蛋白可經Fc賦能且不包含235位及237位之丙胺酸取代。

本文所述之人類化抗原結合蛋白所結合之肌肉抑制素之抗原決定基可為構形或不連續抗原決定基。本文所述之人類化抗原結合蛋白可能不與肌肉抑制素上之線性抗原決定基結合，例如該抗原結合蛋白可能不與還原或變性之肌肉

抑制素樣品結合。該構形或不連續抗原決定基可能與肌肉抑制素受體結合位點相同、類似或重疊。當肌肉抑制素呈成熟形式且為與另一肌肉抑制素分子之二聚體(均二聚體)之一部分時，抗原決定基可為可接近的。當肌肉抑制素呈成熟形式且為與所述其他肌肉抑制素結合分子之四聚體之一部分時，抗原決定基亦可為可接近的。抗原決定基可分佈於兩個肌肉抑制素多肽上。此類型之不連續抗原決定基可包含各肌肉抑制素分子之序列。在二聚體之三級及四級結構中，該等序列可彼此足夠接近以形成抗原決定基且由抗原結合蛋白結合。構形及/或不連續抗原決定基可由例如 CLIPS™(Pepscan Systems)之已知方法鑑別。

使用肽掃描(Pepscan)，骨架上之化學鍵聯免疫原性肽(Chemically Linked Immunogenic Peptides on Scaffolds，CLIPS)技術對10B3C之肌肉抑制素結合位點的後續分析表明肌肉抑制素之「PRGSAGPCCTPTKMS」胺基酸序列可能為嵌合抗體之結合位點。肽掃描方法使用限制性肽。

在人類中或鼠類動物模型中，人類化抗原結合蛋白之活體內半衰期可為至少6小時、至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少7天或至少9天。

人類化抗原結合蛋白所結合之肌肉抑制素多肽可為重組多肽。肌肉抑制素可於溶液中或可附著於固體表面。舉例而言，肌肉抑制素可附著於珠粒，諸如磁性珠粒。肌肉抑制素可經生物素化。可使用與肌肉抑制素結合之生物素分子藉由與固體表面上之生物素-抗生蛋白鏈菌素偶合來使

肌肉抑制素固定於固體表面上。

人類化抗原結合蛋白可來源於大鼠、小鼠、靈長類動物(例如食蟹獼猴(cynomolgus monkey)、舊世界猴(Old World monkey)或大猿(Great Ape))或人類。抗原結合蛋白可為人類化抗體或嵌合抗體。

人類化抗原結合蛋白可包含恆定區，其可具有任何同型(isotype)或子類。恆定區可為IgG同型，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其變異體。抗原結合蛋白恆定區可為IgG1。

抗體之Fc效應部分之突變改變可用於改變FcRn與抗體之間相互作用的親和力以調節抗體週轉(turnover)。可延長抗體之活體內半衰期。此有益於患者群體，因為藉由維持活體內IC₅₀較長時段可達成最大劑量及最大給藥頻率。因為肌肉抑制素為可溶性目標，所以可整體或部分移除抗體之Fc效應功能。此移除可使安全性概況增加。

包含恆定區之人類化抗原結合蛋白可具有降低之ADCC及/或補體活化或效應功能性。恆定域可包含IgG2或IgG4同型之天然失能恆定區或突變型IgG1恆定域。適合修飾之實例描述於EP0307434中。一種達成Fc失能之方式包含取代重鏈恆定區之235位及237位(EU索引編號)處之丙胺酸殘基。

人類化抗原結合蛋白可包含一或多個選自突變型恆定域之修飾以使抗體具有增強之效應功能/ADCC及/或補體活化。適合修飾之實例描述於Shields等人J. Biol. Chem

(2001) 276:6591-6604, Lazar等人PNAS (2006) 103:4005-4010及US 6737056、WO 2004063351及WO 2004029207中。

人類化抗原結合蛋白可包含具有改變之糖基化概況的恆定域以使該抗原結合蛋白具有增強之效應功能/ADCC及/或補體活化。產生具有改變之糖基化概況之抗原結合蛋白的合適方法之實例描述於WO 2003/011878、WO 2006/014679及EP1229125中。

本發明亦提供編碼如本文所述之人類化抗原結合蛋白之核酸分子。該核酸分子可包含編碼以下之序列：(i)一或多個CDRH、重鏈可變序列或全長重鏈序列；及(ii)一或多個CDRL、輕鏈可變序列或全長輕鏈序列，其中(i)及(ii)在同一核酸分子上。或者，編碼本文所述之人類化抗原結合蛋白之核酸分子可包含編碼以下之序列：(a)一或多個CDRH、重鏈可變序列或全長重鏈序列；或(b)一或多個CDRL、輕鏈可變序列或全長輕鏈序列，其中(a)及(b)在各別核酸分子上。

編碼重鏈之核酸分子可包含SEQ ID NO: 122、124、126、128-131、135-137中之任一者。編碼輕鏈之核酸分子可包含SEQ ID NO: 132、133或134中之任一者。

或者，編碼重鏈之核酸分子可包含變異型重鏈DNA序列，其編碼SEQ ID NO: 123、125、127或138-144之重鏈胺基酸序列。編碼輕鏈之核酸分子可包含變異型輕鏈DNA序列，其編碼SEQ ID NO: 145、146或147之輕鏈胺基酸序

列。

編碼抗原結合蛋白之核酸分子可包含以下重鏈及輕鏈組合中之任一者：H3L4 (SEQ ID NO: 128及SEQ ID NO: 132)、H3L5 (SEQ ID NO: 128及SEQ ID NO: 133)、H3L6 (SEQ ID NO: 128及SEQ ID NO: 134)、H4L4 (SEQ ID NO: 129及SEQ ID NO: 132)、H4L5 (SEQ ID NO: 129及SEQ ID NO: 133)、H4L6 (SEQ ID NO: 129及SEQ ID NO: 134)、H5L4 (SEQ ID NO: 130及SEQ ID NO: 132)、H5L5 (SEQ ID NO: 130及SEQ ID NO: 133)、H5L6 (SEQ ID NO: 130及SEQ ID NO: 134)、H6L4 (SEQ ID NO: 131及SEQ ID NO: 132)、H6L5 (SEQ ID NO: 131及SEQ ID NO: 133)、H6L6 (SEQ ID NO: 131及SEQ ID NO: 134)、H7L4 (SEQ ID NO: 135及SEQ ID NO: 132)、H7L5 (SEQ ID NO: 135及SEQ ID NO: 133)、H7L6 (SEQ ID NO: 135及SEQ ID NO: 134)、H8L4 (SEQ ID NO: 136及SEQ ID NO: 132)、H8L5 (SEQ ID NO: 136及SEQ ID NO: 133)、H8L6 (SEQ ID NO: 136及SEQ ID NO: 134)、H9L4 (SEQ ID NO: 137及SEQ ID NO: 132)、H9L5 (SEQ ID NO: 137及SEQ ID NO: 133)、H9L6 (SEQ ID NO: 137及SEQ ID NO: 134)、H7失能L4 (SEQ ID NO: 122及SEQ ID NO: 132)、H7失能L5 (SEQ ID NO: 122及SEQ ID NO: 133)、H7失能L6 (SEQ ID NO: 122及SEQ ID NO: 134)、H8失能L4 (SEQ ID NO: 124及SEQ ID NO: 132)、H8失能L5 (SEQ ID NO: 124及SEQ ID NO: 133)、H8失能L6 (SEQ ID NO: 124及SEQ ID NO: 134)、H9失能L4

(SEQ ID NO: 126及SEQ ID NO: 132)、H9失能L5 (SEQ ID NO: 126及SEQ ID NO: 133)或H9失能L6 (SEQ ID NO: 126及SEQ ID NO: 134)。

本發明亦提供包含如本文所述之核酸分子的表現載體。亦提供包含如本文所述之表現載體的重組宿主細胞。

本文所述之人類化抗原結合蛋白可在合適宿主細胞中產生。產生如本文所述之抗原結合蛋白的方法可包含培養如本文所述之宿主細胞及回收抗原結合蛋白之步驟。經轉型、轉染或轉導之重組宿主細胞可包含至少一個表現卡匣，其中該表現卡匣包含編碼本文所述之抗原結合蛋白之重鏈的聚核苷酸且進一步包含編碼本文所述之抗原結合蛋白之輕鏈的聚核苷酸。或者，經轉型、轉染或轉導之重組宿主細胞可包含至少一個表現卡匣，其中第一表現卡匣包含編碼本文所述之抗原結合蛋白之重鏈的聚核苷酸，且該宿主細胞進一步包含含有編碼本文所述之抗原結合蛋白之輕鏈之聚核苷酸的第二卡匣。經穩定轉型之宿主細胞可包含含有一或多個編碼本文所述之抗原結合蛋白之重鏈及/或輕鏈之表現卡匣的載體。舉例而言，該等宿主細胞可包含編碼輕鏈之第一載體及編碼重鏈之第二載體。

宿主細胞可為真核細胞，例如哺乳動物細胞。該等細胞株之實例包括CHO或NS0。宿主細胞可為非人類宿主細胞。宿主細胞可為非胚胎宿主細胞。宿主細胞可培養於培養基中，例如無血清培養基。人類化抗原結合蛋白可由宿主細胞分泌至培養基中。對於含有抗原結合蛋白之該培養

基，可將人類化抗原結合蛋白純化為至少95%純或95%純以上(例如98%純或98%純以上)。

可提供包含人類化抗原結合蛋白及醫藥學上可接受之載劑之醫藥組合物。可提供包含醫藥組合物以及使用說明書的分裝部分之套組(kit-of-parts)。為方便起見，套組可包含預定量之試劑及使用說明書。

抗體結構

完整抗體

基於恆定區之胺基酸序列，來自大多數脊椎動物物種之抗體之輕鏈可歸類為兩種稱作 κ 及 λ 之類型之一。視該等抗體之重鏈之恆定區的胺基酸序列而定，人類抗體可歸類為五種不同類別，IgA、IgD、IgE、IgG及IgM。IgG及IgA可進一步細分為子類，IgG1、IgG2、IgG3及IgG4；及IgA1及IgA2。小鼠及大鼠中存在物種變異體，至少具有IgG2a、IgG2b。

可變區之更保守部分稱為構架區(FR)。完整重鏈及輕鏈之可變域各自包含由三個CDR連接之四個FR。各鏈中之CDR由FR區極接近地保持在一起且與來自另一鏈之CDR一起幫助形成抗體之抗原結合位點。

恆定區不直接參與抗體與抗原之結合，而是展現各種效應功能，諸如參與抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)、經由與Fc γ 受體結合參與吞噬作用、經由新生兒Fc受體(FcRn)參與半衰期/清除率及經由補體級聯之C1q組分參與補體依賴性細胞毒性。

已報導人類IgG2恆定區基本上缺乏藉由經典路徑活化補體或介導抗體依賴性細胞毒性之能力。已報導IgG4恆定區缺乏藉由經典路徑活化補體之能力且僅微弱地介導抗體依賴性細胞毒性。基本上缺乏該等效應功能之抗體可稱為『非溶解性』抗體。

人類抗體

人類抗體可藉由熟習此項技術者已知的許多方法產生。可使用人類骨髓瘤或小鼠-人類異源骨髓瘤細胞株藉由融合瘤方法製備人類抗體，參見Kozbor (1984) J. Immunol 133, 3001 及 Brodeur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987)。替代性方法包括使用噬菌體文庫或轉殖基因小鼠，兩者均利用人類可變區譜系(參見Winter (1994) Annu. Rev. Immunol 12: 433-455 ; Green (1999) J. Immunol. Methods 231: 11-23)。

現可獲得轉殖基因小鼠之若干品系，其中其小鼠免疫球蛋白基因座已經人免疫球蛋白基因區段置換(參見Tomizuka (2000) PNAS 97: 722-727 ; Fishwild (1996) Nature Biotechnol. 14: 845-851 ; Mendez (1997) Nature Genetics, 15: 146-156)。抗原攻毒時，該等小鼠能夠產生可自其中選擇相關抗體之人類抗體譜系。

可使用噬菌體呈現技術產生人類抗原結合蛋白(及其片段)，參見McCafferty (1990) Nature 348: 552-553及Griffiths等人(1994) EMBO 13: 3245-3260。

親和力成熟技術(Marks Bio/technol (1992) 10: 779-783)可用於改良結合親和力，其中初級人類抗體之親和力藉由天然存在之變異體依序置換H鏈及L鏈可變區且基於改良之結合親和力進行選擇進行改良。該技術之變體現亦可獲得，諸如「抗原決定基印記」，參見例如WO 93/06213；Waterhouse (1993) Nucl. Acids Res. 21: 2265-2266。

嵌合抗體及人類化抗體

嵌合抗體通常使用重組DNA方法產生。使用習知程序，例如藉由使用能夠與編碼抗體之H鏈及L鏈之基因特異性結合的寡核苷酸探針，分離編碼抗體之DNA(例如cDNA)且對其進行定序。融合瘤細胞用作該DNA之典型來源。分離後，將該DNA置於表現載體中，隨後將該等表現載體轉染至不會以其他方式產生免疫球蛋白之宿主細胞(諸如大腸桿菌(*E. coli*)、COS細胞、CHO細胞或骨髓瘤細胞)中以合成抗體。DNA可藉由用人類L鏈及H鏈之編碼序列取代相應非人類(例如鼠類)H及L恆定區來修飾，參見例如Morrison (1984) PNAS 81: 6851。

可藉由僅將非人類(例如鼠類)抗體(「供體」抗體)之CDR移植於人類構架(「接受體構架」)及恆定區上以產生人類化抗體來達成免疫原性之大幅降低(參見Jones等人(1986) Nature 321: 522-525；及 Verhoeyen等人(1988) Science 239: 1534-1536)。然而，CDR移植本身可能不能完全保留抗原結合性質且經常發現若將恢復顯著抗原結合親和力，則需要在人類化分子中保留供體抗體之一些構架

殘基(有時稱為「回復突變」)(參見Queen等人(1989) PNAS 86: 10,029-10,033; Co等人(1991) Nature 351: 501-502)。在此情況下，自資料庫中選擇與非人類供體抗體顯示最大序列同源性之人類可變區以提供人類構架(FR)。可自人類共同抗體或個別人類抗體選擇人類FR。必要時，可將來自供體抗體之關鍵殘基取代至人類接受體構架中以保持CDR構形。可使用抗體之電腦模型化來幫助鑑別該等結構上重要之殘基，參見WO 99/48523。

或者，可由「面飾(veneering)」方法達成人類化。獨特人類及鼠類免疫球蛋白重鏈及輕鏈可變區之統計分析揭示人類抗體與鼠類抗體中暴露殘基之精確型態不同且大部分個別表面位置極傾向於少數不同殘基(參見Padlan等人(1991) Mol. Immunol. 28: 489-498；及Pedersen等人(1994) J. Mol. Biol. 235: 959-973)。因此，可藉由置換非人類Fv之構架區中與人類抗體中通常所發現不同之暴露殘基來降低非人類Fv之免疫原性。因為蛋白質抗原性可能與表面可接近性有關，所以置換表面殘基可足以使得小鼠可變區為人類免疫系統「不可見」(亦參見Mark等人(1994), Handbook of Experimental Pharmacology 第113卷: The pharmacology of Monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, 105-134)。此人類化程序稱為「面飾」，因為僅改變抗體表面而支撐殘基保持原狀。其他替代性方法包括WO04/006955中所述之方法及Humaneering™(Kalobios)之程序，該程序利用細菌表現系統且產生序列接近於人類生

殖系之抗體 (Alfenito-M Advancing Protein Therapeutics, 2007年1月, San Diego, California)。

雙特異性抗原結合蛋白

雙特異性抗原結合蛋白為對至少兩個不同抗原決定基具有結合特異性之抗原結合蛋白。製備該等抗原結合蛋白之方法在此項技術中已知。傳統上，雙特異性抗原結合蛋白之重組產生係基於兩個免疫球蛋白H鏈-L鏈對之共表現，其中兩個H鏈具有不同結合特異性，參見Millstein等人(1983) *Nature* 305: 537-539；WO 93/08829；及Traunecker等人(1991) *EMBO* 10: 3655-3659。由於H鏈及L鏈之隨機分配，可能產生10種不同抗體結構之混合物，其中僅1種具有所需結合特異性。替代性方法涉及使具有所需結合特異性之可變域與包含至少一部分鉸鏈區、CH2區及CH3區之重鏈恆定區融合。含有輕鏈結合所必需之位點的CH1區可存在於至少一種融合體中。將編碼該等融合體之DNA及L鏈(若需要)插入各別表現載體中且接著共轉染至合適宿主生物體中。然而，有可能將兩個或全部三個鏈之編碼序列插入一個表現載體中。在一種方法中，雙特異性抗體由H鏈(在一臂中具有第一結合特異性)及H鏈-L鏈對(在另一臂中提供第二結合特異性)構成，參見WO 94/04690。亦參見Suresh等人(1986) *Methods in Enzymology* 121: 210。

抗原結合片段

缺乏恆定區之片段缺乏藉由經典路徑活化補體或介導抗體依賴性細胞毒性之能力。傳統上，該等片段係藉由例如

利用木瓜蛋白酶消化對完整抗體進行蛋白水解消化而產生(參見例如 WO 94/29348)，但亦可由經重組轉型之宿主細胞直接產生。關於產生 ScFv，參見 Bird 等人(1988) *Science* 242: 423-426。此外，可使用如下文所述之多種工程改造技術產生抗原結合片段。

與 Fab 片段相比，Fv 片段之兩個鏈似乎具有較低相互作用能。為穩定 V_H 域與 V_L 域之締合，使其與肽 (Bird 等人(1988) *Science* 242: 423-426；Huston 等人(1988) *PNAS* 85(16): 5879-5883)、二硫橋 (Glockshuber 等人(1990) *Biochemistry* 29: 1362-1367) 及「孔中丘型(knob in hole)」突變 (Zhu 等人(1997) *Protein Sci.*, 6: 781-788) 連接。ScFv 片段可藉由熟習此項技術者熟知之方法產生，參見 Whitlow 等人(1991) *Methods Companion Methods Enzymol*, 2: 97-105 及 Huston 等人(1993) *Int. Rev. Immunol* 10: 195-217。ScFv 可在細菌細胞(諸如大腸桿菌)或真核細胞中產生。ScFv 之一缺點在於該產物為單價(此阻礙藉由多價結合使親合力增加)及其短暫半衰期。克服該等問題之嘗試包括藉由化學偶合自含有額外 C 端半胱胺酸之 ScFv (Adams 等人(1993) *Can. Res* 53: 4026-4034；及 McCartney 等人(1995) *Protein Eng.* 8: 301-314) 或藉由含有不成對 C 端半胱胺酸殘基之 ScFv 之自發位點特異性二聚作用(參見 Kipriyanov 等人(1995) *Cell. Biophys* 26: 187-204) 產生二價 (ScFv')₂。或者，可藉由縮短肽連接子至 3 至 12 個殘基來迫使 ScFv 形成多聚體以形成「雙功能抗體」，參見 Holliger

等人(1993) PNAS 90: 6444-6448。進一步縮短連接子可產生 ScFv 三聚體(「三功能抗體」, 參見 Kortt 等人(1997) Protein Eng 10: 423-433)及四聚體(「四功能抗體」, 參見 Le Gall 等人(1999) FEBS Lett, 453: 164-168)。亦可藉由與蛋白質二聚基元遺傳融合來構築二價 ScFv 以形成「微小抗體(miniantibody)」(參見 Pack 等人(1992) Biochemistry 31: 1579-1584)及「微型抗體(minibody)」(參見 Hu 等人(1996) Cancer Res. 56: 3055-3061)。亦可藉由利用第三肽連接子連接兩個 ScFv 單元來產生 ScFv-Sc-Fv 串聯((ScFv)₂), 參見 Kurucz 等人(1995) J. Immunol. 154: 4576-4582。可經由兩個單鏈融合產物(由來自一抗體之 V_H 域經由短連接子連接至另一抗體之 V_L 域組成)之非共價締合來產生雙特異性雙功能抗體, 參見 Kipriyanov 等人(1998) Int. J. Can 77: 763-772。可藉由引入如上文所述之二硫橋或「孔中丘型」突變或藉由形成單鏈雙功能抗體(ScDb)(其中兩個雜交 ScFv 片段經由肽連接子連接)來增強該等雙特異性雙功能抗體之穩定性, 參見 Kontermann 等人(1999) J. Immunol. Methods 226:179-188。四價雙特異性分子可藉由例如經由絞鏈區使 ScFv 片段融合至 IgG 分子之 CH3 域或 Fab 片段來獲得, 參見 Coloma 等人(1997) Nature Biotechnol. 15: 159-163。或者, 藉由雙特異性單鏈雙功能抗體之融合產生四價雙特異性分子(參見 Alt 等人(1999) FEBS Lett 454: 90-94)。亦可藉由具有含有螺旋-環-螺旋基元之連接子之 ScFv-ScFv 串聯(DiBi 微小抗體, 參見 Muller 等人(1998))

FEBS Lett 432: 45-49)或在一個方向上包含四個抗體可變域(V_H 及 V_L)從而防止分子內配對之單鏈分子(串聯雙功能抗體，參見Kipriyanov等人(1999) J. Mol. Biol. 293: 41-56)之二聚作用形成較小四價雙特異性分子。可藉由Fab'片段之化學偶合或藉由經由白胺酸拉鏈之異二聚作用產生雙特異性 $F(ab')_2$ 片段(參見Shalaby等人(1992) J. Exp. Med. 175: 217-225；及Kostelny等人(1992), J. Immunol. 148: 1547-1553)。亦可獲得經分離之 V_H 域及 V_L 域(Domantis plc)，參見US 6,248,516；US 6,291,158；及US 6,172,197。

異結合抗體

異結合抗體由使用任何便利交聯方法形成之兩個共價連接之抗體構成。參見例如US 4,676,980。

其他修飾

本發明之抗原結合蛋白可包含其他修飾以增強或改變其效應功能。咸信抗體Fc區與各種Fc受體($Fc\gamma R$)之間的相互作用介導該抗體之效應功能，該等效應功能包括抗體依賴性細胞毒性(ADCC)、補體固定、吞噬作用及抗體之半衰期/清除率。可視所需性質對抗體之Fc區進行各種修飾。舉例而言，在Fc區中進行特定突變從而使本身具溶解性之抗體不具溶解性詳細描述於EP 0629 240及EP 0307 434中，或可將救助受體結合抗原決定基併入抗體中以增加血清半衰期，參見US 5,739,277。人類 $Fc\gamma$ 受體包括 $Fc\gamma R$ (I)、 $Fc\gamma RIIa$ 、 $Fc\gamma RIIb$ 、 $Fc\gamma RIIIa$ 及新生兒FcRn。Shields等人(2001) J. Biol. Chem 276: 6591-6604證明一組共用

IgG1殘基參與結合所有FcγR，而FcγRII及FcγRIII利用除該組共用殘基以外的不同位點。一組IgG1殘基在變為丙胺酸降低與所有FcγR之結合：Pro-238、Asp-265、Asp-270、Asn-297及Pro-239。該等殘基全部位於IgG CH2域中且在聯接CH1與CH2之鉸鏈附近形成叢集。儘管FcγRI僅利用該組共用IgG1殘基進行結合，但FcγRII及FcγRIII與除該組共用殘基以外的不同殘基相互作用。改變一些殘基僅降低與FcγRII(例如Arg-292)或FcγRIII(例如Glu-293)之結合。一些變異體展示與FcγRII或FcγRIII之結合改良但不影響與其他受體之結合(例如Ser-267Ala改良與FcγRII之結合但與FcγRIII之結合不受影響)。其他變異體展現與FcγRII或FcγRIII之結合改良且降低與其他受體之結合(例如Ser-298Ala改良與FcγRIII之結合且降低與FcγRII之結合)。對於FcγRIIIa，最佳結合IgG1變異體具有Ser-298、Glu-333及Lys-334之組合丙胺酸取代。咸信新生兒FcRn受體參與抗體清除及跨組織之轉胞吞作用(參見Junghans (1997) *Immunol. Res* 16: 29-57；及Ghetie等人(2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18: 739-766)。經確定與人類FcRn直接發生相互作用之人類IgG1殘基包括Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434及His435。在此部分所述之任何位置進行取代能夠增加抗體之血清半衰期及/或改變抗體之效應性質。

其他修飾包括抗體之糖基化變異體。已知抗體在其恆定區中保守位置處之糖基化對抗體功能具有深遠影響，尤其

效應功能，諸如上文所述之效應功能，參見例如Boyd等人(1996) *Mol. Immunol.* 32: 1311-1318。涵蓋抗體或其抗原結合片段之糖基化變異體，其中添加、取代、缺失或修飾一或多個碳水化合物部分。引入天冬醯胺-X-絲胺酸或天冬醯胺-X-蘇胺酸基元產生酶促連接碳水化合物部分之潛在位點且因此可用於操縱抗體糖基化。在Raju等人(2001) *Biochemistry* 40: 8868-8876中，使用 β -1,4-半乳糖基轉移酶及/或 α ,2,3唾液酸基轉移酶經由再半乳糖苷化及/或再唾液酸化過程增加TNFR-IgG免疫黏附素之末端唾液酸化。咸信增加末端唾液酸化會增加免疫球蛋白之半衰期。與大多數糖蛋白相同，抗體通常產生為糖型(glycoform)之混合物。當在真核細胞、尤其哺乳動物細胞中產生抗體時，此混合物尤其明顯。已發展多種方法來製造確定糖型，參見Zhang等人(2004) *Science* 303: 371; Sears等人(2001) *Science* 291: 2344; Wacker等人(2002) *Science* 298: 1790; Davis等人(2002) *Chem. Rev.* 102: 579; Hang等人(2001) *Acc. Chem. Res* 34: 727。如本文所述之抗體(例如IgG同型(例如IgG1)之抗體)可包含確定數目(例如7個或7個以下，例如5個或5個以下，諸如2個或1個)之糖型。

抗體可與諸如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚環氧烷之非蛋白質性聚合物偶合。蛋白質與PEG結合為增加蛋白質半衰期以及降低蛋白質之抗原性及免疫原性的既定技術。已利用完整抗體以及Fab'片段研究不同分子量及類型(線性或分支)之聚乙二醇化之使用，參見Koumenis等人(2000)

Int. J. Pharmaceut. 198: 83-95。

產生方法

抗原結合蛋白可在轉殖基因生物體中產生，諸如山羊(參見 Pollock 等人(1999) J. Immunol. Methods 231: 147-157)、雞(參見 Morrow (2000) Genet. Eng. News 20: 1-55)、小鼠(參見 Pollock 等人)，或植物(參見 Doran (2000) Curr. Opinion Biotechnol. 11: 199-204; Ma (1998) Nat. Med. 4: 601-606; Baez 等人(2000) BioPharm 13: 50-54; Stoger 等人(2000) Plant Mol. Biol. 42: 583-590)。

亦可藉由化學合成產生抗原結合蛋白。然而，通常使用熟習此項技術者熟知的重組細胞培養技術產生抗原結合蛋白。分離編碼抗原結合蛋白之聚核苷酸且插入可複製載體(諸如質體)中以用於進一步選殖(擴增)或表現。一種表現系統為麩胺酸合成酶系統(諸如 Lonza Biologics 所出售)，尤其在宿主細胞為 CHO 或 NS0 之情況下。編碼抗原結合蛋白之聚核苷酸容易使用習知程序(例如寡核苷酸探針)分離及定序。可使用之載體包括質體、病毒、噬菌體、轉座子、微型染色體，其中通常使用質體。通常，該等載體進一步包括信號序列、複製起點、一或多個標記基因、強化子元件、啟動子及轉錄終止序列可操作地連接於抗原結合蛋白聚核苷酸以促進表現。可將編碼輕鏈及重鏈之聚核苷酸插入各別載體中且同時或依序引入(例如藉由轉型、轉染、電穿孔或轉導)同一宿主細胞中，或必要時在該引入之前可將重鏈與輕鏈插入同一載體中。

可使用密碼子最佳化，意圖使得用經密碼子最佳化之基因轉染時宿主細胞所產生之蛋白質的總含量相較於用野生型序列轉染時之含量較高。已公開若干種方法(Nakamura 等人 (1996) *Nucleic Acids Research* 24: 214-215 ; W098/34640 ; W097/11086)。由於遺傳密碼之冗餘，本文所揭示聚核苷酸(尤其經密碼子最佳化以供在特定宿主細胞中表現之聚核苷酸)之替代性聚核苷酸亦可編碼本文所述之抗原結合蛋白。可修改本發明抗原結合蛋白之密碼子使用以適應宿主細胞之密碼子偏好，諸如以增加轉錄物及/或產物產率(例如 Hoekema 等人 *Mol Cell Biol* 1987 7(8): 2914-24)。密碼子之選擇可基於與用於表現之宿主細胞之合適相容性。

信號序列

抗原結合蛋白可產生為具有異源信號序列之融合蛋白，該融合蛋白在成熟蛋白之N端具有特定裂解位點。信號序列應由宿主細胞識別及加工。對於原核宿主細胞，信號序列可為例如鹼性磷酸酶、青黴素酶(penicillinase)或熱穩定性腸毒素II前導序列。對於酵母分泌，信號序列可為例如酵母轉化酶前導序列、 α 因子前導序列或酸性磷酸酶前導序列，參見例如 W090/13646。在哺乳動物細胞系統中，諸如單純疱疹gD信號之病毒分泌性前導序列及原生免疫球蛋白信號序列可為合適的。通常，信號序列在閱讀框架中連接於編碼抗原結合蛋白之DNA。可使用諸如 SEQ ID NO: 9 中所示之信號序列。

複製起點

複製起點在此項技術中已為熟知，其中 pBR322 適於大多數革蘭氏陰性細菌 (gram-negative bacteria)，2 μ 質體適於大多數酵母，且諸如 SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV 或 BPV 之各種病毒起點適於大多數哺乳動物細胞。通常，哺乳動物表現載體無需複製起點組分，但可使用 SV40，因為其含有早期啟動子。

選擇標記

典型選擇基因編碼如下蛋白質，其 (a) 賦予對抗生素或其他毒素 (例如安比西林 (ampicillin)、新黴素 (neomycin)、甲胺喋呤 (methotrexate) 或四環素 (tetracycline)) 之抗性，或 (b) 補充自養不足 (auxiotrophic deficiency) 或供應複合培養基中不可獲得之營養物，或 (c) 兩者之組合。選擇方案可涉及遏止宿主細胞生長。已經編碼抗原結合蛋白之基因成功轉型之細胞由於例如共同傳遞之選擇標記所賦予之耐藥性而存活。一實例為 DHFR 選擇標記，其中轉型體在甲胺喋呤存在下培養。可在遞增量之甲胺喋呤存在下培養細胞以擴增相關外源基因之複本數。對於 DHFR 選擇，CHO 細胞為尤其適用之細胞株。另一實例為麩胺酸合成酶表現系統 (Lonza Biologics)。用於酵母之選擇基因之一實例為 trp1 基因，參見 Stinchcomb 等人 (1979) Nature 282: 38。

啟動子

適於表現抗原結合蛋白之啟動子可操作地連接於編碼抗原結合蛋白之 DNA/聚核苷酸。用於原核宿主之啟動子包

括 *phoA* 啟動子、 β -內醯胺酶及乳糖啟動子系統、鹼性磷酸酶、色胺酸及雜交啟動子(諸如 *Tac*)。適於酵母細胞中之表現的啟動子包括 3-磷酸甘油酸激酶或其他醣解酶，例如烯醇酶、甘油醛 3 磷酸去氫酶、己糖激酶、丙酮酸去羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖 6 磷酸異構酶、3-磷酸甘油酸變位酶及葡萄糖激酶。誘導性酵母啟動子包括醇去氫酶 2、異細胞色素 C、酸性磷酸酶、金屬硫蛋白及負責氮代謝或麥芽糖/半乳糖利用之酶。

用於哺乳動物細胞系統中之表現之啟動子包括病毒啟動子，諸如多瘤病毒、禽痘病毒及腺病毒(例如腺病毒 2)、牛乳頭狀瘤病毒、禽肉瘤病毒、細胞巨大病毒(尤其直接早期基因啟動子)、反轉錄病毒、B 型肝炎病毒、肌動蛋白、勞氏肉瘤病毒(*rous sarcoma virus*; RSV)啟動子及早期或晚期猿病毒 40。當然，啟動子之選擇係基於與用於表現之宿主細胞之合適相容性。第一質體可包含 RSV 及/或 SV40 及/或 CMV 啟動子、編碼輕鏈可變區(V_L)、 κC 區以及新黴素及安比西林抗性選擇標記之 DNA，且第二質體包含 RSV 或 SV40 啟動子、編碼重鏈可變區(V_H)之 DNA、編碼 $\gamma 1$ 恆定區、DHFR 及安比西林抗性標記之 DNA。

強化子元件

適當時，例如對於在高等真核細胞中表現，可使用可操作地連接於載體中之啟動子元件之強化子元件。哺乳動物強化子序列包括來自血球蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、胎蛋白及胰島素之強化子元件。或者，可使用來自真核細胞

病毒之強化子元件，諸如SV40強化子(位於bp100-270)、細胞巨大病毒早期啟動子強化子、多瘤病毒強化子、桿狀病毒強化子或鼠類IgG2a基因座(參見WO04/009823)。強化子可位於載體上啟動子上游之位點。或者，強化子可位於別處，例如在非轉譯區內或聚腺苷酸化信號下游。強化子之選擇及定位可基於與用於表現之宿主細胞之合適相容性。

聚腺苷酸化/終止

在真核系統中，聚腺苷酸化信號可操作地連接於編碼抗原結合蛋白之DNA/聚核苷酸。該等信號通常置於開放閱讀框架之3'端。在哺乳動物系統中，非限制性實例包括來源於生長激素、延伸因子-1 α 及病毒(例如SV40)基因或反轉錄病毒長末端重複序列之信號。在酵母系統中，聚腺苷酸化/終止信號之非限制性實例包括來源於磷酸甘油酸激酶(PGK)及醇去氫酶1(ADH)基因之信號。在原核系統中，通常不需要聚腺苷酸化信號且通常改為採用較短且更明確之終止子序列。聚腺苷酸化/終止序列之選擇可基於與用於表現之宿主細胞之合適相容性。

用於增加產率之其他方法/元件

除上述元件以外，可用於增加產率之其他特徵包括染色質重塑元件、內含子及宿主細胞特異性密碼子修飾。

宿主細胞

用於選殖或表現編碼抗原結合蛋白之載體之合適宿主細胞為原核細胞、酵母細胞或高級真核細胞。合適原核細胞

包括真細菌(eubacteria)，例如腸桿菌科(enterobacteriaceae)，諸如大腸桿菌屬(*Escherichia*)，例如大腸桿菌(例如 ATCC 31,446；31,537；27,325)；腸內桿菌屬(*Enterobacter*)；伊文氏桿菌屬(*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*)；沙雷氏菌屬(*Serratia*)，例如黏質沙雷氏菌(*Serratia marcescans*)；及志賀桿菌屬(*Shigella*)；以及芽胞桿菌屬(*Bacilli*)，諸如枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*)及地衣芽孢桿菌(*B. licheniformis*)(參見 DD 266 710)；假單胞菌屬(*Pseudomonas*)，諸如綠膿桿菌(*P. aeruginosa*)；及鏈黴菌(*Streptomyces*)。在酵母宿主細胞中，亦涵蓋釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、克魯維酵母(*Kluyveromyces*)(例如 ATCC 16,045；12,424；24178；56,500)、耶氏酵母(*Yarrowia*)(EP402，226)、甲醇酵母(*Pichia pastoris*)(EP 183 070，亦參見 Peng 等人(2004) *J. Biotechnol.* 108: 185-192)、念珠菌屬(*Candida*)、里氏木黴(*Trichoderma reesia*)(EP 244 234)、青黴素(Penicillin)、彎頸黴屬(*Tolypocladium*)及麴菌(*Aspergillus*)宿主，諸如構巢麴黴(*A. nidulans*)及黑麴黴(*A. niger*)。

高級真核宿主細胞包括哺乳動物細胞，諸如 COS-1(ATCC 第 CRL 1650 號)、COS-7(ATCC CRL 1651)、人類胚腎細胞株 293、幼倉鼠腎細胞(BHK)(ATCC CRL.1632)、BHK570(ATCC 第 CRL 10314 號)、293(ATCC 第 CRL 1573

號)、中國倉鼠卵巢細胞 CHO(例如 CHO-K1、ATCC 第 CCL 61 號、DHFR-CHO 細胞株, 諸如 DG44(參見 Urlaub 等人 (1986) Somatic Cell Mol. Genet.12: 555-556), 尤其適於懸浮培養之 CHO 細胞株)、小鼠足細胞、猴腎細胞、非洲綠猴腎細胞(ATCC CRL-1587)、海拉細胞(HELA cell)、犬腎細胞(ATCC CCL 34)、人類肺細胞(ATCC CCL 75)、Hep G2 及骨髓瘤或淋巴瘤細胞, 例如 NS0(參見 US 5,807,715)、Sp2/0、Y0。

該等宿主細胞亦可進一步工程改造或改適以改良抗原結合蛋白之品質、功能及/或產率。非限制性實例包括表現特定修飾(例如糖基化)酶及蛋白質摺疊伴隨蛋白。

細胞培養方法

經編碼抗原結合蛋白之載體轉型之宿主細胞可藉由熟習此項技術者已知的任何方法培養。宿主細胞可在旋轉燒瓶、滾瓶或中空纖維系統中培養, 但對於大規模生產, 特別使用攪拌槽反應器以便懸浮培養。攪拌槽可適於使用例如噴嘴、導流板或低剪切力葉輪進行通氣。對於氣泡塔及氣升反應器(airlift reactor), 可使用空氣或氧氣泡直接通氣。當在無血清培養基中培養宿主細胞時, 培養基補充有細胞保護劑(諸如普朗尼克 F-68(pluronic F-68))以幫助防止由通氣過程引起之細胞損壞。視宿主細胞特徵而定, 可使用微載體作為固著依賴性細胞株之生長基質或細胞可適合懸浮培養(其為典型的)。宿主細胞(尤其無脊椎動物宿主細胞)之培養可利用多種操作模式, 諸如分批補料、重複分

批處理(參見Drapeau等人(1994) Cytotechnology 15: 103-109)、擴展分批處理或灌注培養。儘管可在含有血清之培養基(諸如胎牛血清(FCS))中培養重組轉型之哺乳動物宿主細胞,但該等宿主細胞亦可在例如合成無血清培養基中培養,諸如Keen等人(1995) Cytotechnology 17: 153-163中所揭示之培養基或市售培養基,諸如ProCHO-CDM或UltraCHO™(Cambrex NJ, USA),必要時補充有諸如葡萄糖之能量源及諸如重組胰島素之合成生長因子。宿主細胞之無血清培養可能需要使該等細胞適於在無血清條件下生長。一種適應方法為在含有血清之培養基中培養該等宿主細胞且重複地將培養基之80%換為無血清培養基以使宿主細胞學習適應無血清條件,(參見例如Scharfenberg等人(1995), Animal Cell Technology: Developments towards the 21st century (Beuvery等人編, 619-623, Kluwer Academic publishers))。

可回收分泌至培養基中之抗原結合蛋白且使用多種技術進行純化以得到適於預定用途之純化程度。舉例而言,使用抗原結合蛋白治療人類患者通常要求純度為至少95%,更通常純度為98%或99%或99%以上(與粗培養基相比)。通常使用離心分離自培養基移除細胞碎片(cell debris),接著使用例如微濾、超濾及/或深度過濾進行上清液之澄清步驟。可利用多種其他技術,諸如透析及凝膠電泳及層析技術,諸如羧基磷灰石(HA)、親和層析(視情況涉及親和力標籤標記系統,諸如聚組胺酸)及/或疏水性相互作用層析

(HIC，參見US 5,429,746)。在各種澄清步驟後，可使用蛋白質A或G親和層析來捕捉抗體。其他層析步驟可遵循諸如離子交換及/或HA層析、陰離子或陽離子交換、尺寸排阻層析及硫酸銨沈澱。亦可使用各種病毒移除步驟(例如使用例如DV-20過濾器進行奈米過濾)。在該等各種步驟後，得到包含至少75 mg/ml或75 mg/ml以上、或100 mg/ml或100 mg/ml以上之抗原結合蛋白的經純化(例如單株)製劑。該等製劑實質上不含抗原結合蛋白之聚集形式。

可使用細菌系統來表現抗原結合片段。該等片段可位於細胞內之周質中或分泌至細胞外。可根據熟習此項技術者已知的方法萃取不溶性蛋白質且進行再摺疊以形成活性蛋白質，參見Sanchez等人(1999) *J. Biotechnol.* 72: 13-20；及Cupit等人(1999) *Lett Appl Microbiol* 29: 273-277。

脫醯胺作用為移除醯胺官能基之化學反應。在生物化學中，該反應在蛋白質之降解中較重要，因為其破壞胺基酸天冬醯胺及麩醯胺酸之含醯胺側鏈。威信脫醯胺反應為可限制蛋白質之有效壽命的因素之一，其亦為在製造治療性蛋白質期間所發生之最常見轉譯後修飾之一。舉例而言，已報導重組人類DNase及重組可溶性CD4之活體外或活體內生物活性降低或損失，而其他重組蛋白質似乎未受影響。在誘導脫醯胺作用之應力條件下，本文所述抗原結合蛋白與肌肉抑制素結合之能力似乎未受影響。因此，本文所述抗原結合蛋白之生物活性及其有效壽命不太可能受脫醯胺作用影響。

醫藥組合物

術語疾病、病症及病狀可互換使用。如本文所述之人類化抗原結合蛋白之經純化製劑可併入醫藥組合物中以用於治療本文所述之人類疾病。醫藥組合物可用於治療肌肉抑制素造成疾病或中和肌肉抑制素之活性將有益之疾病。包含治療有效量之本文所述人類化抗原結合蛋白之醫藥組合物可用於治療對中和肌肉抑制素有反應之疾病。

醫藥製劑可包含人類化抗原結合蛋白與醫藥學上可接受之載劑的組合。人類化抗原結合蛋白可單獨投與或作為醫藥組合物之部分投與。

通常該等組合物包含根據可接受之醫藥實踐已知且需要之醫藥學上可接受之載劑，參見例如 Remingtons Pharmaceutical Sciences, 第16版 (1980) Mack Publishing Co。該等載劑之實例包括經滅菌載劑，諸如鹽水、林格氏溶液(Ringers solution)或右旋糖溶液，視情況經適當緩衝劑緩衝至pH 5至8。

醫藥組合物可藉由注射或連續輸注(例如靜脈內、腹膜內、皮內、皮下、肌肉內或門脈內)投與。該等組合物宜不含可見顆粒物質。醫藥組合物可包含1 mg至10 g之間的抗原結合蛋白，例如5 mg與1 g之間的抗原結合蛋白。或者，組合物可包含5 mg與500 mg之間，例如5 mg與50 mg之間的抗原結合蛋白。

熟習此項技術者已熟知製備該等醫藥組合物之方法。醫藥組合物可在單位劑型中包含1 mg至10 g之間的抗原結合

蛋白，視情況連同使用說明書。醫藥組合物可凍乾(冷凍乾燥)以供在投與前根據熟習此項技術者熟知或顯而易知方法復原。當抗體具有IgG1同型時，可添加銅之螯合劑(諸如檸檬酸鹽(例如檸檬酸鈉)或EDTA或組胺酸)至醫藥組合物中以降低銅介導之該同型抗體降解之程度，參見EP0612251。醫藥組合物亦可包含增溶劑，諸如精胺酸鹼；清潔劑/抗聚集劑，諸如聚山梨醇酯80；及置換小瓶頂空氣氣之惰性氣體，諸如氮氣。

投與抗原結合蛋白之有效劑量及治療方案一般憑經驗確定，且可取決於諸如患者之年齡、體重及健康狀況以及所治療疾病或病症之因素。該等因素在主治醫師之考慮範圍內。選擇適當劑量之準則可見於例如Smith等人，(1977) *Antibodies in human diagnosis and therapy*, Raven Press, New York中。因此，可以治療有效量投與本發明之抗原結合蛋白。

投與個體之抗原結合蛋白之劑量通常介於每公斤個體體重1 μg 至150 mg之間，介於每公斤個體體重0.1 mg與100 mg之間，介於每公斤個體體重0.5 mg與50 mg之間，介於每公斤個體體重1 mg與25 mg之間或介於每公斤個體體重1 mg與10 mg之間。舉例而言，劑量可為10 mg/kg、30 mg/kg或60 mg/kg。抗原結合蛋白可非經腸(例如皮下、靜脈內或肌肉內)投與。

必要時，治療性組合物之有效日劑量可以2個、3個、4個、5個、6個或6個以上依適當時間間隔分開投與之次劑

量視情況以單位劑型投與。舉例而言，劑量可在每個投藥日時以多個次劑量之形式，每14天或28天1次皮下投與。

可藉由靜脈內輸注投與劑量，通常歷經15分鐘至24小時之時期，諸如2至12小時或2至6小時。此可降低毒性副作用。

必要時劑量之投與可重複一或多次，例如每天三次、每天一次、每兩天一次、每週一次、兩週一次、一個月一次、每三個月一次、每六個月一次或每十二個月一次。抗原結合蛋白可藉由維持療法投與，例如每週一次，歷時6個月或6個月以上之時期。抗原結合蛋白可藉由間歇療法投與，例如歷時3至6個月之時期，且接著停止給藥3至6個月，隨後再次投與抗原結合蛋白歷時3至6個月等，如此循環。

劑量可藉由使用靶向抗肌肉抑制素抗原結合蛋白之抗個體基因型抗體量測生物樣品中投藥後循環抗肌肉抑制素抗原結合蛋白之量來確定或調整。可利用確定或調整劑量之其他方法，包括(但不限於)藥理學之生物學標記(「生物標記」)、肌肉質量及/或功能之指標、安全性、耐受性及治療反應。抗原結合蛋白可以有效下調個體之肌肉抑制素活性之量及持續時間投與。

可以使療法靶向特定位點之方式向個體投與抗原結合蛋白。舉例而言，可將抗原結合蛋白局部注射至肌肉(例如骨骼肌)中。

人類化抗原結合蛋白可與用於治療本文所述疾病之一或

多種其他治療活性劑組合使用，例如米氮平(Mirtazapine) (瑞美隆(Remeron)、茲斯平(Zispin)：Organon)、乙酸甲地孕酮(Megestrol acetate)(梅格施(Megace)：BMS)、屈大麻酚(Dronabinol)(麻林酚(Marinol)：Solvay Pharmaceutical Inc.)、氧甲氫龍(Oxandrolone)(奧沙得林(Oxandrin)：Savient)、睪固酮(testosterone)、重組生長激素(例如促生長激素(Somatropin)(雪蘭思定(Serostim)：Serono)、路歐平(Nutropin)(Genentech)、優猛茁(Humatrope)(Lilly)、鍵豪寧(Genotropin)(Pfizer)、健高靈(Norditropin)(Novo)、思真(Saizen)(Merck Serono)及歐尼派(Omnitrope)(Sandoz))、賽庚啉(Cyproheptadine)(安清敏(Periactin)：Merck)、鳥胺酸酮戊二酸(ornithine oxoglutarate)(塞特蘭(Cetornan))、哌甲酯(Methylphenidate)(利他林(Ritalin)：Novartis)及莫達非尼(Modafinil)(莫待芬寧(Provigil)：Cephalon)、羅氏鮮(orlistat)(艾麗(alli)：GSK)、諾美婷(sibutramine)(美瑞達(Meridia)、雷度替爾(Reductil))、利莫那班(rimonabant)(阿克立亞(Acomplia)、苗絲麗(Monaslim)、斯立苗那(Slimona))。該等組合可用於治療肌肉抑制素造成疾病或中和肌肉抑制素之活性將有益之疾病。

當人類化抗原結合蛋白與其他治療活性劑組合使用時，個別組分可以各別或組合醫藥調配物藉由任何適當途徑，一起或分開、依序或同時投與。若分開或依序投與，則抗原結合蛋白及治療活性劑可以任何次序投與。

以上所提及之組合可以包含如上文所定義之組合，視情

況連同醫藥學上可接受之載劑或賦形劑之單一醫藥調配物形式提供以供使用。

當組合於同一調配物中時，應瞭解，組分必須穩定且彼此及與調配物之其他組分相容且可經調配以供投藥。當分開調配時，其可提供於任何便利調配物中，例如以諸如此項技術中已知用於抗原結合蛋白之方式。

當與具有針對相同疾病之活性之第二治療劑組合時，各組分之劑量可與單獨使用抗原結合蛋白時的劑量不同。熟習此項技術者可容易地瞭解合適劑量。人類化抗原結合蛋白及治療活性劑可協同作用。換言之，組合投與抗原結合蛋白及治療活性劑對本文所述之疾病、病症或病狀的作用可大於各藥劑單獨作用之總和。

醫藥組合物可包含人類化抗原結合蛋白連同其他藥劑之分裝部分之套組，視情況連同使用說明書。為方便起見，套組可包含預定量之試劑及使用說明書。

術語「個體」及「患者」在本文中可互換使用。個體通常為人類。個體亦可為哺乳動物，諸如小鼠、大鼠或靈長類動物(例如狢猿或猴)。個體可為非人類動物。抗原結合蛋白亦可具有獸醫學用途。待治療之個體可為農畜，例如母牛或公牛、綿羊、豬、閩牛、山羊或馬；或可為家畜，諸如犬或貓。動物可為任何年齡之動物或成熟成年動物。當個體為實驗動物(諸如小鼠、大鼠或靈長類動物)時，可對動物進行處理以誘發與肌肉萎縮、肌病或肌肉損失相關之疾病或病狀。

處理可為治療性、防治性或預防性處理。個體可為有此需要者。需要處理者除將來可能發展疾病者以外亦可包括已罹患特定醫學疾病之個體。

因此，本文所述之人類化抗原結合蛋白可用於防治性或預防性處理。在此情況下，將本文所述之抗原結合蛋白投與個體以預防或延緩疾病之一或多種態樣或症狀之發作。個體可能無症狀。個體可能具有疾病之遺傳素因。將防治有效量之抗原結合蛋白投與此種個體。防治有效量為預防或延緩本文所述疾病之一或多種態樣或症狀發作之量。

本文所述之人類化抗原結合蛋白亦可用於治療方法。術語「治療」涵蓋緩和、減輕或預防疾病之至少一種態樣或症狀。舉例而言，本文所述之抗原結合蛋白可用於改善或減輕本文所述疾病之一或多種態樣或症狀。

本文所述之人類化抗原結合蛋白以有效量使用以用於治療性、防治性或預防性處理。本文所述抗原結合蛋白之治療有效量為有效改善或減輕疾病之一或多種態樣或症狀之量。本文所述之抗原結合蛋白亦可用於治療、預防或治癒本文所述之疾病。

本文所述之人類化抗原結合蛋白對個體健康可具有一般有益之作用，例如其可增加個體之預期壽命。

本文所述之人類化抗原結合蛋白無需實現完全治癒或根除疾病之各種症狀或表現即構成可行的治療性處理。如相關領域中所公認，用作治療劑之藥物可降低指定疾病病況之嚴重度，但無需消除疾病之各種表現即視為適用治療

劑。類似地，防治性投與之處理無需完全有效地預防疾病發作即構成可行的防治劑。僅僅降低疾病之影響(例如降低其症狀之數目或嚴重度，或增加另一治療之有效性，或產生另一有益作用)或降低個體發生疾病(例如延緩疾病發作)或疾病惡化之可能性即足矣。

病症、疾病或病狀包括少肌症、惡病質、肌肉萎縮、不用性肌肉萎縮症、HIV、AIDS、癌症、外科疾病、灼傷、肌肉骨骼或神經之創傷或損傷、肥胖症、糖尿病(包括II型糖尿病)、關節炎、慢性腎衰竭(CRF)、末期腎病(ESRD)、充血性心臟衰竭(CHF)、慢性阻塞性肺病(COPD)、選擇性關節修復、多發性硬化症(MS)、中風、肌肉萎縮症、運動神經元神經病變、肌肉萎縮性側索硬化(ALS)、帕金森氏病、骨質疏鬆症、骨關節炎、脂肪酸肝病、肝硬化、艾迪森氏病、庫欣氏症候群、急性呼吸窘迫症候群、類固醇誘發之肌肉萎縮、肌炎及脊柱側彎。

年齡相關之肌肉萎縮(亦稱為肌病)或少肌症為隨著年齡發生之肌肉質量及肌力的進行性降低。認為此病狀為肌肉合成及修復減少加上肌肉分解增加之結果。在年齡相關之肌肉萎縮中，肌纖維束因個別纖維損失而縮減。此外，由於該等個體之不用性肌肉萎縮症，肌纖維亦變小。治療可逆轉此肌肉萎縮症。因此，本文所述之抗原結合蛋白可用於治療少肌症。

年齡相關之肌肉萎縮始於中年且在整個生命之剩餘時間加速發展。該病狀之最常用定義為附肢骨骼質量/身高²

(kg/m²)低於年輕成人之平均值兩個標準差。此病症可導致活動性減少、功能性失能及獨立性降低。

不用性肌肉萎縮症可與許多不同病狀、疾病或病症相關，例如固定、術後外科疾病、透析、重症護理(例如灼傷、ICU)、肌肉或骨骼之創傷或損傷。不用性萎縮症可由導致肌肉長期不使用之眾多原因或事件所致。肌肉萎縮症涉及肌纖維之尺寸及/或數目及/或功能降低。

惡病質為在並未主動試圖減輕重量之個體中與體重減輕、肌肉質量降低、肌肉萎縮症、疲勞、衰弱及食慾減退中之任一者或其組合相關之病狀。惡病質可與各種其他病症(包括本文所提及之任一疾病)相關。舉例而言，惡病質可與癌症、感染(例如HIV或AIDS感染)、腎衰竭、自體免疫性及藥物或酒精成癮相關。此外，在例如已經歷心肌梗塞之患者或患有充血性心臟衰竭之患者中，可使用本文所述之抗原結合蛋白治療心臟惡病質。因此，可利用本文所述之抗原結合蛋白治療癌症惡病質患者。

慢性阻塞性肺病(COPD)患者可顯示該疾病之輕度、中度或重度症狀。COPD包括患有肺氣腫及支氣管炎之患者。肺氣腫患者一般極瘦或虛弱，且其疾病一般視為不可逆轉。因此，本文所述之抗原結合蛋白可用於治療肺氣腫患者，因為較難以改善患者之基本肺功能。支氣管炎患者一般較健壯，但其亦可能缺乏肌肉，且認為其疾病具有一定程度的可逆性。因此，本文所述之抗原結合蛋白可用於治療支氣管炎患者，視情況與治療患者之基本肺功能組

合。用本文所述之抗原結合蛋白治療對改善肺氣腫或支氣管炎患者之呼吸中所涉及之肌肉的功能可具有直接作用。

癌症患者常常顯示可能導致住院治療、感染、脫水、髖部骨折及最終死亡之肌肉萎縮。舉例而言，肌肉質量損失10%可能與癌症患者之顯著較差之預後相關。用本文所述之抗原結合蛋白治療可改善癌症患者之表現狀況，例如使得化學療法全面或化學療法的使用更具侵入性，且改善患者之生活品質。因此，本文所述之抗原結合蛋白可用於治療癌症惡病質。

癌症包括例如前列腺癌、胰臟癌、肺癌、頭頸癌、結腸直腸癌及淋巴瘤。舉例而言，在前列腺癌中，個體可具有轉移性前列腺癌及/或可正經歷雄激素去除療法(ADT)。患有癌症之個體可能具有局部晚期癌症或轉移性癌症，例如早期轉移性癌症。因此，可利用本發明之抗原結合蛋白治療前列腺癌後經歷ADT之患者。

可用本文所述之抗原結合蛋白治療患有慢性腎衰竭(CRF)或末期腎病(ESRD)之患者。舉例而言，可對患者進行透析前治療以延遲透析開始時間。或者，可用本文所述之抗原結合蛋白治療已透析1年或1年以上、2年或2年以上或3年或3年以上之患者。本文所述之抗原結合蛋白可用於短期預防或治療肌肉萎縮，或經由長期使用抗原結合蛋白來進行長期預防或治療。

肌肉、骨骼或神經之創傷或損傷之實例包括髖部骨折及急性膝損傷。髖部骨折患者在骨折之前通常患有肌肉萎縮

症，且在許多患者中肌肉萎縮為髖部骨折之關鍵促因。髖部骨折後，肌肉及肌力因不使用而損失，且髖部骨折患者之行走或功能通常不會恢復至骨折前水準。此外，許多髖部骨折患者亦罹患諸如COPD、ESRD及癌症之病狀，該等病狀可能促成顯著肌肉萎縮且使該等患者易發生髖部骨折。因此，可用本文所述之抗原結合蛋白治療具有髖部骨折風險之患者。髖部骨折患者有相當之治療緊急性，因為此等患者必須即刻動手術。因此，用本文所述之抗原結合蛋白進行術後治療可藉由減少肌肉質量及肌力損失及/或改良肌肉質量及肌力之恢復而幫助髖部骨折患者康復。可利用本發明之抗原結合蛋白治療具有髖部骨折風險之個體或患有髖部骨折之個體。

本文所述之抗原結合蛋白可有助於治療選擇性手術(elective surgery)患者以在手術之前建造患者之肌肉。

肌肉萎縮症(dystrophy)係指一群引起進行性肌肉衰弱之基因遺傳性肌肉疾病。肌肉萎縮症之特徵為進行性骨骼肌衰弱、肌肉蛋白質缺乏以及肌細胞及組織死亡。肌肉萎縮症之實例包括杜興氏(Duchenne)肌肉萎縮症(DMD)、貝克爾肌肉萎縮症、肢帶型肌肉萎縮症(LGMD)、先天性肌肉萎縮症、顏面肩胛肱骨型肌肉萎縮症(FSHD)、肌緊張性肌肉萎縮症(myotonic)、眼咽型肌肉萎縮症、遠端型肌肉萎縮症及埃-德氏(Emery-Dreifuss)肌肉萎縮症。舉例而言，本文所述之抗原結合蛋白可用於治療杜興氏肌肉萎縮症、貝克爾肌肉萎縮症或肢帶型肌肉萎縮症。同樣，非局部萎

縮症之彌漫性肌肉萎縮症可用本文所述之抗原結合蛋白治療。肌緊張性萎縮症特別可用本文所述之抗原結合蛋白治療，因為該疾病較局竈性肌肉萎縮/功能障礙及骨骼/骨及心臟問題之角色。

肥胖症為過量體脂肪已積累至可對健康產生負面影響程度的病狀。其通常定義為身體質量指數($BMI = \text{體重} / \text{身高}^2$)為 30 kg/m^2 或 30 kg/m^2 以上。此將肥胖症與超重區分，超重定義為BMI介於 $25\text{-}29.9 \text{ kg/m}^2$ 之間。肥胖症可與包括心血管疾病、II型糖尿病、阻塞性睡眠呼吸暫停、癌症及骨關節炎之各種疾病相關。因此，已發現肥胖症會縮短預期壽命。肥胖症之典型治療包括節食、身體運動及手術。肥胖症可利用本文所述之抗原結合蛋白治療，該等抗原結合蛋白增加肌肉質量且從而可增加基礎代謝率。舉例而言，該治療可改良血清化學及胰島素敏感性。

肌肉質量、肌力及肌肉功能降低之典型態樣或症狀包括全身無力、疲勞、身體活動減少、易摔傷、功能性失能、自主性降低、活動性減少所致之抑鬱症、食慾減退、營養不良及體重異常減輕中之任一者或其任何組合。

疾病可能與高肌肉抑制素含量相關。本文所述之抗原結合蛋白可用於調節肌肉抑制素之含量及/或肌肉抑制素之活性。

多個端點可用於顯示肌肉質量、肌力及肌肉功能之變化。該等端點包括短期生理表現評估量表(Short Physical Performance Battery)、腿推舉(Leg Press)、直接生活品質

調查(directed quality of life survey)、每日生活活動性(activities of daily living ; ADLs)、功能獨立性指標(FIM)、功能測試及量表(例如行走測試、樓梯攀爬、蹬車運動)、力量測試及量表(例如握力測試、手肌力測試量表)、生物阻抗分析、肌電圖、測力計、雙能X光吸收分析、電腦斷層攝影測試、磁共振成像、肌肉活組織檢查、肌肉組織學、血液/生物化學測試、人體測量、皮膚厚度量測、身體質量指數評估及體重監測。肌力可使用雙側肢體肌肉、頸部肌肉或腹部肌肉來評估。

短期生理表現評估量表(SPPB)為根據站立平衡、行走速度及自椅子起立之能力的指標評估之下肢功能的多組分指標(以0-4標度分級)。行走測試為下肢功能之評估，其量測患者行走某一距離所需之時間。腿推舉使用重量及力評估來量測腿力。在此項技術中使用多個量表及系統來定性評估患者之生活品質。雙能X光吸收分析(DEXA)為估計骨骼肌質量之指標。

許多動物檢定亦可用於顯示肌肉質量及肌力及肌肉功能之變化。舉例而言，握力測試量測動物反向拉動握力計之力量。斜面測試量測動物自我懸吊之能力。游泳測試經由代表性活動(例如游泳)來量測功能性能力，且與人類之行走測試類似。下肢發力測試(Hindlimb Exertion Force Test, HEFT)量測施加尾部刺激後所發揮之最大力。動物之其他身體表現測試包括行走速度及轉輪。該等測試/模型可單獨使用或以任何組合使用。

可使用高脂肪飲食(HFD)誘發之胰島素抗性小鼠模型作為肥胖症模型。

糖皮質激素通常用於治療一大系列之慢性發炎性疾病，諸如全身性紅斑狼瘡症、肉狀瘤病、類風濕性關節炎及支氣管哮喘。然而，投與高劑量之糖皮質激素會導致人類及動物之肌肉萎縮症。類似地，皮質醇增多症在庫欣氏病(Cushing's disease)之肌肉萎縮症中起主要作用。地塞米松(dex)誘發之肌肉萎縮症與肌肉之肌肉抑制素mRNA及蛋白質表現之劑量依賴性顯著誘導相關(Ma K等人, 2003 Am J Physiol Endocrinol Metab 285:E363-E371)。亦已在若干種肌肉萎縮症模型(諸如固定及灼傷損傷)中報導肌肉抑制素表現增加，其中糖皮質激素起重要作用(Lalani R等人, 2000 J Endocrinol 167:417-428; Kawada S等人, 2001 J Muscle Res Cell Motil 22:627-633; 及Lang CH等人, 2001 FASEB J 15:NIL323-NIL338)。因此，糖皮質激素誘發之肌肉萎縮的小鼠模型可用於研究本發明之抗原結合蛋白。

人類不用性肌肉萎縮症通常與諸如關節之慢性骨關節炎或用於治療骨折之石膏固定的矯形外科病症相關聯地發生，且在出於其他醫學或手術原因而長期臥床休息之情況下發生。不用性肌肉萎縮症會導致肌力降低及失能。身體復原仍然為唯一治療選擇，且此通常需要較長時間且並不總是會使肌肉恢復至正常尺寸或力量。因此，擠壓坐骨神經以誘發肌肉萎縮症之小鼠模型可用於研究本發明之抗原結合蛋白。

大部分癌症患者因脂肪組織之進行性萎縮及肌肉萎縮而導致體重減輕。據估計約20%之癌症死亡係由肌肉損失引起。肌肉萎縮一般為許多疾病病狀中死亡率之良好預測因子。來自AIDS、饑餓及癌症研究之資料表明損失超過個體疾病前瘦體質量之30%-40%為致命的(DeWye WD., *Clinics in Oncology*. Calman KC及fearon KCH編. London: Saunders, 1986, 第5卷, 第2期, 第251-261頁; Kotter DP等人, 1990 J Parent Enteral Nutr 14:454-358; 及Wigmore SJ等人, 1997 Br J Cancer 75:106-109)。因此, 可能經由抑制肌肉萎縮所涉及之信號傳導路徑來緩解肌肉萎縮症極具吸引力。因此, 帶有C-26腫瘤之小鼠模型可用於研究本發明之抗原結合蛋白。

在臨床中, 腱切除術係指因肌腱單元之先天及/或後天變形而對腱進行手術橫切, 但在創傷或退化性肌肉骨骼疾病中亦可能發生腱連續性之喪失。腱切除術引起靜止張力直接喪失、肌節縮短以及肌肉質量及力產生能力之後續降低(Jamali等人2000 Muscle Nerve 23: 851-862)。因此, 誘發骨骼肌萎縮症之小鼠腱切除術模型可用於研究本發明之抗原結合蛋白。

所述抗原結合蛋白可用於急性、慢性及/或防治性療法。急性療法可快速增進力量且使患者之功能性能力恢復至適當程度, 隨後可藉由運動或慢性療法來維持。慢性療法可用於隨時間維持肌力或緩慢增進肌力。防治性療法可用於預防所述患者群體中通常隨時間發生之肌肉質量及肌

力的下降。肌肉功能之改良並不總是為定義成功治療所必需，因為對較不嚴重之肌肉萎縮的早期介入僅需要肌肉功能之維持。

所述人類化抗原結合蛋白亦可具有用於增強肌力、質量及功能之化妝用途。所述人類化抗原結合蛋白亦可用於宇航員之航天及訓練練習。

所述人類化抗原結合蛋白可對肌肉(諸如骨骼肌)具有直接生物作用。或者，所述人類化抗原結合蛋白可對肌肉(諸如骨骼肌)具有間接生物作用。

舉例而言，人類化抗原結合蛋白可對肌肉組織結構、肌肉質量、肌肉纖維數目、肌肉纖維尺寸、肌肉再生及肌肉纖維化中之一或多者具有作用。舉例而言，可增加肌肉質量。詳言之，可增加個體之瘦質量(lean mass)。可增加以下肌肉中之任一者或其組合之質量：四頭肌、三頭肌、比目魚肌、脛骨前肌(TA)及伸趾長肌(EDL)。所述人類化抗原結合蛋白可增加肌肉纖維數目及/或肌肉纖維尺寸。所述人類化抗原結合蛋白可增強肌肉再生及/或降低肌肉纖維化。所述人類化抗原結合蛋白可增加肌母細胞之增殖速率及/或活化肌性分化。舉例而言，人類化抗原結合蛋白可增加肌肉前驅細胞之增殖及/或分化。

所述人類化抗原結合蛋白對衛星細胞可具有以下作用之一或其組合：活化、增加增殖及促進自我更新。所述人類化抗原結合蛋白可調節肌肉抑制素含量。所述人類化抗原結合蛋白可增加個體體重。所述人類化抗原結合蛋白可增

加肌肉收縮性及/或改善肌肉功能。人類化抗原結合蛋白可增加骨密度。

本文所述之人類化抗原結合蛋白可調節肌肉生長、功能及收縮性所涉及之蛋白質之合成及/或分解代謝。舉例而言，可藉由使用本文所述之抗原結合蛋白來上調諸如肌凝蛋白(myosin)、肌縮蛋白(dystrophin)、肌漿蛋白(myogenin)之肌肉相關蛋白質的蛋白質合成。舉例而言，可藉由使用本文所述之人類化抗原結合蛋白來下調諸如肌凝蛋白、肌縮蛋白、肌漿蛋白之肌肉相關蛋白質的蛋白質分解代謝。

所用診斷方法

本文所述之人類化抗原結合蛋白可出於診斷目的用於活體外或活體內偵測生物樣品中之肌肉抑制素。舉例而言，抗肌肉抑制素抗原結合蛋白可用於偵測培養細胞、組織或血清中之肌肉抑制素。可首先自人體或動物體中移出組織(例如活組織檢查)。可採用習知免疫檢定，包括ELISA、西方墨點法(Western blot)、免疫組織化學或免疫沈澱。

藉由使肌肉抑制素之存在或含量與疾病相關聯，熟習此項技術者可診斷相關疾病。此外，在個體中偵測到肌肉抑制素之含量增加可指示將會對本文所述之抗原結合蛋白治療起反應之患者群體。在經本文所述之抗原結合蛋白治療之個體中偵測到肌肉抑制素之含量降低可指示肌力、肌肉質量及肌肉功能增強之生物作用。

抗原結合蛋白可提供於包含一或多種抗原結合蛋白、可偵測標記及套組使用說明書之診斷套組中。為方便起見，

該套組可包含預定量之試劑及使用說明書。

可向有需要之個體投與編碼本文所述之人類化抗原結合蛋白之核酸分子。核酸分子可於適當骨架或結構域、可變域或全長抗體中表現CDR。核酸分子可包含於允許在人類或動物細胞中表現的載體中。核酸分子或載體可經調配以供與醫藥學上可接受之賦形劑及/或一或多種如上文所討論之治療活性劑一起投與。

實例

1. 產生重組蛋白質

1.1 純化成熟二聚肌肉抑制素

在CHO分泌系統中表現HexaHisGB1Tev/(D76A)小鼠肌肉抑制素聚合蛋白質序列(SEQ ID NO: 101)。GB1標籤(SEQ ID NO: 102)描述於WO 2006/127682中且發現其與使用Fc標籤之構築體相比允許肌肉抑制素以較高含量表現且允許肌肉抑制素適當摺疊。使用小鼠聚合蛋白質序列(SEQ ID NO: 103)產生成熟肌肉抑制素序列(SEQ ID NO: 104)，因為人類成熟肌肉抑制素序列與小鼠成熟肌肉抑制素序列100%一致。為降低肌肉抑制素之任何可能降解，在區域「DVQRADSSD」中用D76A突變對小鼠聚合蛋白質序列進行工程改造。

於含0.5 M NaCl之50 Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)中使用Ni-NTA瓊脂糖(Qiagen)自CHO培養基中捕捉扣除信號序列之所表現HexaHisGB1Tev/(D76A)小鼠肌肉抑制素聚合蛋白質。將Ni溶離液之緩衝液交換為弗林蛋白酶(Furin)裂解緩

衝液(50 mM HEPES, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM CaCl₂), 隨後在室溫下以1:25(V/V)之弗林蛋白酶/蛋白質比率利用弗林蛋白酶(內部(in-house)表現, 弗林蛋白酶之序列示於SEQ ID NO: 105中)裂解隔夜。弗林蛋白酶使聚合蛋白質在前肽與成熟肌肉抑制素之間(「TPKRSRR」與「DFGLDCD」之間)裂解, 產生前肽及成熟肌肉抑制素。

將弗林蛋白酶裂解反應之混合物整體置於6 M Gdn-HCl中以使聚集體解離。在60°C下使用C8 RP-HPLC(Vydac 208TP, Grace, Deerfield, IL, USA)利用40分鐘內15%-60%之緩衝液B梯度(C8 RP-HPLC緩衝液A: 含0.1% TFA之H₂O, 緩衝液B: 含0.1% TFA之100%乙腈)自混合物分離成熟肌肉抑制素。彙集峰前部含有成熟肌肉抑制素之溶離份且用於後續活體外檢定。圖1展示成熟肌肉抑制素之LC/MS分析且圖2展示具有經還原及未經還原肌肉抑制素樣品之NuPAGE凝膠。

1.2 重組肌肉抑制素之活體外生物活性

使用肌肉抑制素反應性報導基因檢定(Thies等人, (2001) Growth Factors 18(4) 251-259)評估橫紋肌肉瘤細胞(A204)中肌肉抑制素之活體外活性。使A204細胞(LGC Promochem HTB-82)於不含酚紅之高葡萄糖DMEM(Invitrogen)、5%木炭貧化FCS(Hyclone)及1X Glutamax(Invitrogen)中生長。接著以胰蛋白酶處理細胞以產生懸浮液且用含有受PAI-1啟動子之12x CAGA盒控制的螢光素酶基因之pLG3質體,

使用 Gemini 轉染試劑(內部試劑，描述於專利 WO 2006/053782 中)轉染。細胞以 40,000 個細胞/孔接種於 96 孔 Fluoronunc 板(VWR)中且靜置並生長隔夜。第二天，藉由連續稀釋將重組成熟肌肉抑制素(R&D Systems 肌肉抑制素(788-G8-010/CF)或內部肌肉抑制素(如上文 1.1 所述)，兩者均具有 SEQ ID NO: 104 中所示之序列)添加至各孔之培養基中且再培育細胞 6 小時，隨後添加 SteadyLite(Perkin Elmer LAS)，在室溫下培育 20 分鐘且用 SpectraMax M5 讀取器(Molecular Devices)進行讀取。顯示細胞信號傳導被肌肉抑制素活化，從而引起螢光素酶表現之劑量反應曲線展示於圖 3A 中。清楚可見，R&D Systems 與內部成熟二聚肌肉抑制素物質均以劑量依賴性方式活化 A204 細胞，從而產生螢光素酶信號。內部經純化肌肉抑制素相較於 R&D Systems 肌肉抑制素在檢定中顯示較佳的較低本底及改良之動態範圍。

在替代性方法中，使 A204 細胞(LGC Promochem HTB-82)於 McCoys 培養基(Invitrogen)及 10% 熱不活化 FBS(Invitrogen)中生長。接著用凡爾生(versene)(Invitrogen)與 TrypLE(Invitrogen)之 1:1 混合物分離細胞且使其再懸浮於不含酚紅之高葡萄糖 DMEM、5% 木炭貧化血清(Hyclone)及 2 mM glutamax(Invitrogen)(檢定培養基)中。藉由於懸浮液中將 18.2 μ l pLG3 質體(含有受 PAI-1 啟動子之 12x CAGA 盒控制的螢光素酶基因)與 182 μ l 1 mM Gemini 轉染試劑(內部試劑，描述於專利 WO 2006/053782 中)混合來轉

染 14×10^6 個細胞。將細胞轉移至 T175 培養瓶中且培育隔夜。第二天，藉由連續稀釋或在測試抗體之連續稀釋液存在下以恆定濃度(最終體積 20 μ l)將重組肌肉抑制素(R&D Systems肌肉抑制素(788-G8-010/CF)或內部肌肉抑制素(如上 1.1 所述))添加至 96 孔黑色 FluoroNUNC 檢定板(VWR)中。預培育肌肉抑制素抗體混合物 30 分鐘。用凡爾生:TrypLE 自燒瓶分離經轉染細胞，且以 2.2×10^5 個細胞/毫升再懸浮於檢定培養基中，且以 180 微升/孔分配至檢定板中。再培育板 6 小時，隨後添加 50 μ l SteadyLite 試劑(Perkin Elmer LAS)，在室溫下培育 20 分鐘且用 SpectraMax M5 讀取器(Molecular Devices)進行讀取。顯示細胞信號傳導被成熟二聚肌肉抑制素活化，從而引起螢光素酶表現之劑量反應曲線展示於圖 3B 中。內部肌肉抑制素物質以劑量依賴性方式且如不同日期所獲得之資料所示在不同測試時刻可再現地活化 A204 細胞，從而產生螢光素酶信號。

2. 產生單株抗體及表徵小鼠單株抗體 10B3

2.1 單株抗體

藉由各自腹膜內注射成熟肌肉抑制素(如實例 1 中所述製備)免疫 SJL/J 小鼠(Jackson Laboratories)。免疫前，使肌肉抑制素與小隱孢子球菌(*C. parvum*)結合，且用結合物(2.5 μ g 肌肉抑制素結合於 10 μ g 小隱孢子球菌)及另外 7.5 μ g 可溶性肌肉抑制素免疫小鼠。自小鼠移除脾細胞且在 PEG1500(Boehringer)存在下使 B 淋巴細胞與來源於 P3X63BCL2-13 細胞(內部產生，參見 Kilpatrick 等人，1997

Hybridoma 16(4) 第381-389頁)之小鼠骨髓瘤細胞融合以產生融合瘤。藉由限制稀釋法選殖個別融合瘤細胞株(使用E Harlow及D Lane中所述之方法)。以顯微鏡鑑別含有單一群落之孔且測試上清液之活性。

最初，以FMAT夾心檢定格式，針對對重組肌肉抑制素之結合活性來篩選融合瘤上清液。使用BIAcore™方法對此等陽性物質進行二次篩選以偵測與重組肌肉抑制素(R&D Systems, 788-G8-010/CF)及內部表現之經純化肌肉抑制素(參見上述1.1)的結合性。

藉由限制稀釋法次選殖肌肉抑制素結合檢定所鑑別之陽性物質以產生穩定單株細胞株。使用經固定之蛋白質A管柱自在無血清條件下於細胞工廠中生長之此等融合瘤純化免疫球蛋白。接著藉由ELISA及BIAcore™針對肌肉抑制素結合性再篩選此等經純化單株抗體。

單株抗體10B3鑑別為與重組肌肉抑制素結合之有效抗體。

2.2 單株抗體10B3之定序及10B3嵌合體之選殖

自10B3融合瘤細胞萃取總RNA且使用前導序列特異性引子及與預定同型(IgG2a/κ)一致之抗體恆定區藉由反轉錄來產生重鏈及輕鏈可變域之cDNA。接著將可變重鏈及輕鏈域之cDNA選殖至質體中以供定序。10B3 V_H區胺基酸序列展示於SEQ ID NO: 7中。10B3 V_L區胺基酸序列展示於SEQ ID NO: 8中。10B3之Kabat CDR序列展示於表3及表4中。

表 3：重鏈 CDR 序列

抗體	CDR H1	CDR H2	CDR H3
10B3	GYFMH (SEQ ID NO: 1)	NIYPYNGVSNYNQRFKA (SEQ ID NO: 2)	RYYYGTGPADWYFDV (SEQ ID NO: 3)

表 4：輕鏈 CDR 序列

抗體	CDR L1	CDR L2	CDR L3
10B3	KASQDINSYLS (SEQ ID NO: 4)	RANRLVD (SEQ ID NO: 5)	LQCDEFPLT (SEQ ID NO: 6)

藉由自 10B3 鼠類單株抗體 (V_H : SEQ ID NO: 7; V_L : SEQ ID NO: 8) 獲取可變區且將此等可變區移植至人類 IgG1/k 野生型恆定區來構築嵌合抗體。在此等構築體之構築中使用信號序列 (如 SEQ ID NO: 9 中所示)。

簡言之，藉由 PCR 擴增所選殖之鼠類可變區以引入選殖至哺乳動物表現載體 (Rld_Ef1 及 Rln_Ef1) 中所需之限制位點。Hind III 及 Spe I 位點設計成框住 V_H 域且允許選殖至含有人類 $\gamma 1$ 野生型恆定區之載體 (Rld_Ef1) 中。Hind III 及 BsiW I 位點設計成框住 V_L 域且允許選殖至含有人類 κ 恆定區之載體 (Rln_Ef1) 中。鑑別具有正確 V_H (SEQ ID NO: 25) 及 V_L (SEQ ID NO: 8) 序列之純系且製備質體 (使用標準分子生物學技術) 以便在 CHOK1 細胞上清液中表現。使用經固定之蛋白質 A 管柱自細胞上清液純化抗體且藉由在 280 nm 下讀取吸光度來定量。

所得嵌合抗體稱為 10B3 嵌合體 (10B3C 或 HCLC)。10B3 嵌合抗體具有如 SEQ ID NO: 26 中所述之重鏈胺基酸序

列。10B3嵌合抗體具有如SEQ ID NO: 27中所述之輕鏈胺基酸序列。

2.3 與重組肌肉抑制素之結合

在夾心ELISA中，10B3及10B3嵌合體(10B3C)結合肌肉抑制素(R&D Systems，788-G8-010/CF)。用肌肉抑制素以10奈克/孔塗佈板且用阻斷溶液(PBS、0.1% TWEEN及1% BSA)阻斷。洗滌(PBS、0.1% TWEEN)之後，在37℃下經連續稀釋培育抗體2小時且再次洗滌板，隨後在37℃下與抗小鼠HRP或抗人類HRP(分別為Dako，P0161及Sigma，A-8400)一起培育1小時。再次洗滌板且添加OPD受質(Sigma，P9187)直至發生比色反應，且藉由添加H₂SO₄終止反應。在490 nm之吸光度下對板進行讀取且測定EC₅₀(參見表5)。

表5. 親本10B3及嵌合10B3抗體之EC₅₀

抗體	平均EC ₅₀ (ng/ml)	95%信賴等級(ng/ml)
10B3	69	46-102
10B3嵌合體	49	33-73

藉由BIAcore™(表面電漿子共振)分析來評估小鼠親本10B3及10B3C對重組肌肉抑制素之親和力。藉由使用捕捉表面進行分析：對於小鼠親本10B3，藉由一級胺偶合使抗小鼠IgG與C1晶片偶合；且對於10B3嵌合體，藉由一級胺偶合在C1晶片上產生蛋白質A表面。

捕捉後，使64 nM、16 nM、4 nM、1 nM、0.25 nM及0.0625 nM之重組肌肉抑制素流經表面，且注射緩衝液(亦

即 0 nM)用於雙重參考。在各次分析物注射之間存在再生步驟，其後在下次注射肌肉抑制素之前進行新的抗體捕捉事件。使用 T100 機器分析軟體所固有之 1:1 模型及二價模型來分析資料(參見表 6)。兩個捕捉表面均可使用 100 mM 磷酸再生，該工作係使用 HBS-EP 作為操作緩衝液且使用 25°C 作為分析溫度來進行。

表 6. 親本 10B3 及嵌合 10B3 與肌肉抑制素結合的 T100 資料

動力學模型	10B3 嵌合體之平衡常數(KD)	小鼠親本 10B3 之平衡常數(KD)
所有曲線 1:1 模型	88 pM	1 nM
所有曲線 二價模型	3.6 nM	5.9 nM

為進一步分析 10B3 之結合能力，進行基於 ELISA 之檢定以判定結合是否對純的成熟肌肉抑制素具有特異性或是否仍可與其他肌肉抑制素抗原(包括潛伏複合物及在肌肉抑制素前肽之 Arg 75 與 Asp 76 之間發生 BMP-1 裂解後自潛伏複合物釋放之成熟肌肉抑制素)發生結合(Wolfman 等人 (2003) PNAS 100: 第 15842-15846 頁)。

使用 HexaHisGB1Tev/人類肌肉抑制素前肽序列(SEQ ID NO: 106)進行人類肌肉抑制素前肽之純化。此序列表現於 CHO 分泌系統中，且藉由 Ni-NTA(GE Healthcare, NJ)自 CHO 培養基捕捉所表現之蛋白質。藉由 Tev 蛋白酶(內部表現，序列展示於 SEQ ID NO: 107 中)裂解 HexaHisGB1 標籤。Tev 蛋白酶在標籤與 SEQ ID NO: 106 之前肽之間(「ENLYFQ」與「ENSEQK」之間)裂解以產生 SEQ ID NO: 108 之序列。

在 6 M 鹽酸胍存在下將經裂解標籤及未裂解之 hexaHisGB1Tev/人類肌肉抑制素聚合蛋白質捕捉於 Ni-NTA 上，其中標籤經裂解之人類肌肉抑制素聚合蛋白質處於未結合流過物中。將該流過物於 1xPBS 緩衝液中施加於 Superdex 200 管柱 (GE Healthcare, NJ) 上，且在管柱上分離聚集之二聚體及單體形式。人類肌肉抑制素前肽 (SEQ ID NO: 108) 二聚體形式用於形成潛伏複合物。

藉由在室溫下於 6 M 鹽酸胍中將經純化之人類肌肉抑制素前肽 (SEQ ID NO: 108) 與成熟肌肉抑制素 (SEQ ID NO: 104) 以 3:1 (w/w) 之比率混合 2 小時來製備肌肉抑制素潛伏複合物，隨後在 4°C 下透析至 1xPBS 中隔夜，且於 1xPBS 緩衝液中加載至 Superdex 200 (GE Healthcare, NJ) 上。彙集含有肌肉抑制素前肽與成熟肌肉抑制素兩者之峰中的溶離份。藉由 LC/MS 與 SDS-PAGE 確認潛伏複合物 (資料未圖示)。對於 BMP-1 消化，150 μ l 人類肌肉抑制素潛伏複合物 (1.5 mg/ml) 與 225 μ l BMP-1 (0.217 mg/ml)、75 μ l 25 mM HEPES (pH 7.5) 及 150 μ l 以下物質一起培育：20 mM CaCl_2 、4 μ M ZnCl_2 及 0.04% Brij 35。在 30°C 下培育反應物隔夜。使用 CHO 分泌系統內部表現 BMP-1 蛋白質 (序列展示於 SEQ ID NO: 111 中)。

在 4°C 下將肌肉抑制素抗原於 PBS 中以 100 奈克/孔塗佈於 EIA/RIA 板 (Costar) 之孔上隔夜，隨後在室溫下阻斷 (PBS、3% BSA) 30 分鐘。洗滌 (PBS、1% BSA 及 0.1% Tween20) 板，隨後添加 10B3 於洗滌緩衝液中之連續稀釋液且在室溫

下培育2小時。再次洗滌板，隨後添加於洗滌緩衝液中以1:10,000稀釋之結合過氧化酶之Affinipure F(ab')₂片段驢抗小鼠IgG(Jackson Laboratories，目錄號715-036-151)且在室溫下培育1小時。最終洗滌步驟之後，添加TMB受質且發生色度變化，用硫酸終止，且在450 nm下對板進行讀取。圖4展示10B3能夠結合成熟二聚肌肉抑制素、潛伏複合物(四聚體)及在BMP-1裂解後自潛伏複合物釋放之肌肉抑制素。亦發現10B3不與前肽二聚體結合(資料未圖示)。

2.4 肌肉抑制素上10B3結合抗原決定基之粗定位

基於肌肉抑制素胺基酸序列來合成重疊10個胺基酸(偏移4個胺基酸)之生物素化14聚體肽(14 mer peptide)以定位由10B3(由Mimotopes, Australia供應)識別之結合抗原決定基之位置。

利用SRU BIND讀取器(SRU Biosystems)進行工作。洗滌抗生蛋白鏈菌素生物感測器板，取基線讀數，且將生物素化肽捕捉於塗有抗生蛋白鏈菌素之生物感測器板上。再次洗滌板，且取新的基線讀數，接著添加抗體且監測結合。

重疊10個胺基酸(偏移4個胺基酸)之14聚體定製設計人工肽序列之詳情提供於表7中。

表7：肌肉抑制素人工肽

肽編號	N端	序列	C端	氫	MWt
1	H-	DFGLDCDEHSTESRGSG (SEQ ID NO: 56)	-NH ₂	-0.045	2164.84
3	生物素-	SGSGDCDEHSTESRCCRY (SEQ ID NO: 57)	-NH ₂	0.118	2217.09

5	生物素-	SGSGHSTESRCCRYPLTV (SEQ ID NO: 58)	-NH ₂	0.346	2165.17
7	生物素-	SGSGSRCCRYPLTVDFEA (SEQ ID NO: 59)	-NH ₂	0.394	2173.18
9	生物素-	SGSGRYPLTVDFEAFGWD (SEQ ID NO: 60)	-NH ₂	0.456	2229.16
11	生物素-	SGSGTVDFEAFGWDWIIA (SEQ ID NO: 61)	-NH ₂	0.646	2183.13
13	生物素-	SGSGEAFGWDWIIAPKRY (SEQ ID NO: 62)	-NH ₂	0.505	2265.28
15	生物素-	SGSGWDWIIAPKRYKANY (SEQ ID NO: 63)	-NH ₂	0.416	2337.39
17	生物素-	SGSGIAPKRYKANYCSGE (SEQ ID NO: 64)	-NH ₂	0.183	2113.11
19	生物素-	SGSGRYKANYCSGECEFV (SEQ ID NO: 65)	-NH ₂	0.286	2182.15
21	生物素-	SGSGNYCSGECEFVFLQK (SEQ ID NO: 66)	-NH ₂	0.436	2180.17
23	生物素-	SGSGGECEFVFLQKYPHT (SEQ ID NO: 67)	-NH ₂	0.447	2211.21
25	生物素-	SGSGFVFLQKYPHTHLVH (SEQ ID NO: 68)	-NH ₂	0.593	2279.36
27	生物素-	SGSGQKYPHTHLVHQANP (SEQ ID NO: 69)	-NH ₂	0.279	2183.14
29	生物素-	SGSGHHLVHQANPRGSA (SEQ ID NO: 70)	-NH ₂	0.218	2037.94
31	生物素-	SGSGVHQANPRGSAGPCC (SEQ ID NO: 71)	-NH ₂	0.297	1909.85
33	生物素-	SGSGNPRGSAGPCCTPTK (SEQ ID NO: 72)	-NH ₂	0.238	1901.87
35	生物素-	SGSGSAGPCCTPTKMSP (SEQ ID NO: 73)	-NH ₂	0.468	1905.96
37	生物素-	SGSGCCTPTKMSPINMLY (SEQ ID NO: 74)	-NH ₂	0.582	2115.27
39	生物素-	SGSGTKMSPINMLYFNGK (SEQ ID NO: 75)	-NH ₂	0.39	2157.27
41	生物素-	SGSGPINMLYFNGKEQII (SEQ ID NO: 76)	-NH ₂	0.504	2193.28

43	生物素-	SGSGLYFNGKEQIIYGKI (SEQ ID NO: 77)	-NH ₂	0.434	2199.26
45	生物素-	SGSGGKEQIIYGKIPAMV (SEQ ID NO: 78)	-NH ₂	0.416	2060.17
47	生物素-	SGSGIIYGKIPAMVVDRG (SEQ ID NO: 79)	-NH ₂	0.558	2091.25
49	生物素-	SGSGGKIPAMVVDRGCGS (SEQ ID NO: 80)	-OH	0.396	1950.02

14聚體肽結合資料之分析表明10B3不能結合肌肉抑制素內之任何線性抗原決定基。然而，對照抗肌肉抑制素抗體顯示結合該組肽內之抗原決定基(資料未圖示)。

使用肽掃描，骨架上之化學鍵聯免疫原性肽(CLIPS)技術對10B3C之肌肉抑制素結合位點進行後續分析，表明肌肉抑制素之「PRGSAGPCCTPTKMS」胺基酸序列可為嵌合抗體之結合位點(資料未圖示)。

2.5 中和肌肉抑制素ActRIIb受體結合性

在4°C下將1 µg/ml重組可溶性ActRIIb(R&D Systems 339-RBB)於碳酸酯緩衝液中塗佈於ELISA板之孔中隔夜。阻斷板(參見以上2.3中之阻斷溶液)且根據標準ELISA方案進行洗滌。同時，2 nM生物素化肌肉抑制素(內部，如1.1中所描述，生物素化物質)與由10B3、10B3C及陰性對照(IgG1同型對照)組成之抗體系列稀釋液一起在37°C下預培育2小時。接著在37°C下經1小時向ActRIIb塗佈之板中添加生物素化肌肉抑制素:抗體反應物。進行標準洗滌程序，接著添加以1:1000稀釋之抗生蛋白鏈菌素-HRP結合物(Dako P0397)且再在37°C下培育1小時。再次洗滌板，且在OPD受質(Sigma)及酸終止溶液處理後於490 nm之吸光度下

進行檢定。抑制肌肉抑制素活性之抑制曲線及 IC_{50} 值分別展示於圖5及表8中。

表8. ActRIIb受體中和之 IC_{50}

抗體	平均 IC_{50} (ng/ml)	95%信賴等級(ng/ml)
10B3	132	99-176
10B3嵌合體	138	97-196

受體中和檢定為可用於基於效能區分 IC_{50} 低於1 nM之分子的最靈敏方法。然而，該檢定本身對勝任結合之生物素化肌肉抑制素之精確濃度敏感。因此，在不同情況下，已使用相同方法測得10B3之其他 IC_{50} 值，例如0.13 nM、0.108 nM、0.109 nM或0.384 nM(注意，在表8中，132 ng/ml=0.88 nM)。

2.6 活體外抑制肌肉抑制素之生物活性

使用以上1.2所述之肌肉抑制素反應性報導基因檢定來評估抗肌肉抑制素抗體對肌肉抑制素活性之活體外作用。對該檢定進行改進以在37°C下將濃度為2.8 nM(等效於細胞活化檢定中之 ED_{70})之肌肉抑制素與不同濃度之10B3或10B3C抗體(0.1-20 nM)一起預培育，隨後添加至經轉染之A204細胞中。對螢光素酶進行讀取，由此產生圖6中所示之抑制曲線。表9展示在3次重複檢定及ANOVA分析後測得之抗體之 IC_{50} 值。資料清楚顯示對A204肌細胞株之肌肉抑制素活化的劑量依賴性抑制，而對照抗體顯示對肌肉抑制素活性無抑制作用。

表9. 活體外肌肉抑制素反應性報導基因檢定之 IC_{50} (A204細胞)

抗體	平均 IC_{50} (nM)	95%信賴等級(nM)
10B3	10.0	6.5-15.5
10B3嵌合體	6.2	3.9-9.9

2.7 10B3之活體內功效

為證明親本10B3之功效，在8週齡雌性CB17 SCID小鼠中進行為期5週之35天研究。第1天、第4天、第8天、第15天、第22天及第29天藉由腹膜內注射3、10或30 mg/kg 10B3對處理組(每組10隻動物)進行給藥，而對照組接受PBS或同型對照抗體(IgG2a)。研究結束時，分別藉由對動物稱重及QMRI分析來測定動物之總體重(A)及總瘦肌肉質量(B)(圖7)。淘汰完動物時(第35天)，自動物解剖出個別肌肉(腓腸肌(A)、四頭肌(B)及伸趾長肌(EDL)(C))用於進行質量測定(圖8)。為測定對肌肉功能之作用，對EDL肌肉進行離體收縮性測試(圖9)，其中測定肌肉之強直收縮力(圖9A)及每毫克肌肉質量之強直收縮力(圖9B)。

在30 mg/kg劑量下在處理組中觀測到對10B3之明顯劑量依賴性反應，表明35天研究後體重及瘦肌肉質量有最顯著改良(分別為8%及8.5%)。肌肉質量之分析顯示腓腸肌、四頭肌及EDL具有相同趨勢，皆展示質量之劑量依賴性增加，此外30 mg/kg給藥組展示最大顯著性。

此外，研究(未描述)亦已顯示在較早時間點(諸如35天)不能觀察到握力有顯著改良。然而，離體收縮性測試顯示

在EDL之強直收縮力指標方面可顯示顯著改良。此外，顯示改良與肌肉質量無關。因此，10B3展現改良現有肌肉質量之功能的能力。

3. 10B3之人類化

3.1 序列分析

在10B3可變區之序列與其他鼠類及人類免疫球蛋白序列之間進行比較。使用FASTA及BLAST程式及藉由目視檢查來進行此比較。

鑑別10B3 V_H 之合適人類接受體構架(IGHV1_18及JH3人類J區段序列)：SEQ ID NO: 10。鑑別10B3 V_L 之合適人類接受體構架(IGKV1_16及JK2人類J區段序列)：SEQ ID NO: 11。在SEQ ID NO: 10中，存在接受體構架之CDRH1及CDRH2且CDRH3由XXXXXXXXXX表示。在SEQ ID NO: 11中，存在接受體構架之CDRL1及CDRL2且CDRL3由XXXXXXXXXX表示。(10個X殘基為CDR位置之佔位符且不為各CDR中胺基酸序列數目之量度)。

在CDR移植中，通常需要一或多個來自所包括供體抗體之構架殘基替代其在接受體構架中之直系同源物以獲得令人滿意的結合。10B3中之以下鼠類構架殘基經鑑別在抗體之CDR移植(人類化)型式之設計方面可能重要(位置係根據Kabat等人之編號規定)：

位置 (Kabat)	小鼠 10B3 V _H	人類 V _H
20	I	V
28	S	T
48	I	M
66	K	R
67	A	V
69	L	M
71	V	T
73	K	T
105	T	Q

位置 (Kabat)	小鼠 10B3 V _L	人類 V _L
16	R	G
46	T	S
69	Q	T
71	Y	F
100	A	Q

設計三個具有不同回復突變之人類化 V_H 構築體以獲得具有令人滿意之活性之人類化抗體。將此等構築體編號為 H0 至 H2。使用 CDR 之 Kabat 定義，H0 (SEQ ID NO: 12) 由 10B3 V_H CDR 移植至指定接受體序列中之 CDR 移植體組成。H1 (SEQ ID NO: 13) 與 H0 一致，但具有回復突變，其中 105 位之胺基酸為蘇胺酸而非麩醯胺酸。H2 (SEQ ID NO: 14) 與 H0 一致，但具有回復突變，其中 28 位之胺基酸為絲胺酸而非蘇胺酸。

應注意，對於所有人類化 V_H 區(及相應重鏈)，已對構架

4(WGQGTMVTVSS)之序列進行修飾，藉以用甲硫胺酸胺基酸殘基(Kabat 108位)取代白胺酸胺基酸殘基。此藉由在編碼人類化V_H區之DNA序列中包括SpeI選殖位點而產生。

設計四個具有不同回復突變之人類化V_L構築體以獲得具有令人滿意之活性的人類化抗體。將此等構築體編號為L0至L3。使用CDR之Kabat定義，L0 (SEQ ID NO: 15)由10B3 V_L CDR移植至指定接受體序列中之CDR移植體組成。L1 (SEQ ID NO: 16)與L0一致，但具有回復突變，其中16位之胺基酸為精胺酸而非甘胺酸。L2 (SEQ ID NO: 17)與L0一致，但具有回復突變，其中71位之胺基酸為酪胺酸而非苯丙胺酸。L3 (SEQ ID NO: 18)與L0一致，但具有回復突變，其中100位之胺基酸為丙胺酸而非麩醯胺酸。

設計5個具有不同回復突變之其他人類化V_H構築體以獲得具有令人滿意之活性的人類化抗體。將此等構築體編號為H0及H3至H6。使用CDR之Kabat定義，H0 (SEQ ID NO: 12)由10B3 V_H CDR移植至指定接受體序列中之CDR移植體組成。H3 (SEQ ID NO: 112)與H0一致，但具有以下回復突變：28位之胺基酸為絲胺酸而非蘇胺酸，48位之胺基酸為異白胺酸而非甲硫胺酸，67位之胺基酸為丙胺酸而非纈胺酸且69位之胺基酸為白胺酸而非甲硫胺酸。H4 (SEQ ID NO: 113)與H0一致，但具有以下回復突變：28位之胺基酸為絲胺酸而非蘇胺酸，71位之胺基酸為纈胺酸而非蘇胺酸且73位之胺基酸為離胺酸而非蘇胺酸。H5 (SEQ ID NO: 114)組合H3及H4回復突變。H6 (SEQ ID NO: 115)與H5一

致，但具有以下回復突變：20位之胺基酸為異白胺酸而非纈胺酸且66位之胺基酸為離胺酸而非精胺酸。此外，H3至H6 V_H構築體在CDRH3中存在單一點突變，其中位置100G(Kabat編號)處之胺基酸為酪胺酸而非苯丙胺酸。

應注意，對於所有人類化V_H區(及相應重鏈)，已對構築4(WGQGTMVTVSS)之序列進行修飾，藉以用甲硫胺酸胺基酸殘基(Kabat 108位)取代白胺酸胺基酸殘基。此藉由在編碼人類化V_H區之DNA序列中包括SpeI選殖位點而產生。

設計三個具有不同回復突變之其他人類化V_L構築體以獲得具有令人滿意之活性的人類化抗體。將此等構築體編號為L0及L4至L6。使用CDR之Kabat定義，L0 (SEQ ID NO: 15)由10B3 V_L CDR移植至指定接受體序列中之CDR移植體組成。L4 (SEQ ID NO: 116)與L0一致，但具有回復突變，其中69位之胺基酸為麩醯胺酸而非蘇胺酸且71位之胺基酸為酪胺酸而非苯丙胺酸。L5 (SEQ ID NO: 117)與L0一致，但具有回復突變，其中71位之胺基酸為酪胺酸而非苯丙胺酸且46位之胺基酸為蘇胺酸而非絲胺酸。L6 (SEQ ID NO: 118)組合L4及L5回復突變。此外L4至L6在CDRL3中存在單一點突變，其中91位之胺基酸為絲胺酸而非半胱胺酸。

10B3之輕鏈在CDRL3中之Kabat 91位具有半胱胺酸(C)殘基。在抗體加工發展期間，未配對半胱胺酸可具有化學反應性從而產生修飾，由此可能使產物具有異質性且可能使親和力發生變化。此外，此殘基可能能夠因與可變區中產生免疫球蛋白摺疊所必需之其他半胱胺酸發生錯誤配對而

促使錯誤摺疊或聚集。因此，具有C91之人類化抗體取代為絲胺酸(S)。

3.2 10B3之人類化

H0-H2及L0至L3：藉由從頭合成包括用於選殖至Rld Ef1及Rln Ef1哺乳動物表現載體中之限制位點以及信號序列的重疊寡核苷酸來製備人類化V_H及V_L構築體。引入Hind III及Spe I限制位點以框住含有信號序列(SEQ ID NO: 9)之V_H域以供選殖至含有人類IgG1野生型恆定區之Rld Ef1中。引入Hind III及BsiW I限制位點以框住含有信號序列(SEQ ID NO: 9)之V_L域以供選殖至含有人類κ恆定區之Rln Ef1中。此舉基本上如WO 2004/014953中所述。

H3-H6及L4-L6：藉由包括用於選殖至pTT表現載體(National Research Council Canada，具有經修飾之多選殖位點(MCS))之限制位點以及信號序列中的重疊寡核苷酸之定點突變誘發及從頭合成來製備人類化V_H及V_L構築體。引入Hind III及Spe I限制位點以框住含有信號順序(SEQ ID NO: 9)之V_H域以供選殖至含有人類IgG1野生型恆定區之pTT中。引入Hind III及BsiW I限制位點以框住含有信號順序(SEQ ID NO: 9)之V_L域以供選殖至含有人類κ恆定區之pTT中。

4. 人類化抗體之可發展性分析(developability analysis)

10B3嵌合體與人類化抗體之重鏈及輕鏈中之潛在脫醯胺位點的電腦分析(in silico analysis)鑑別出重鏈CDRH2中Kabat 54位之天冬醯胺(N54)具有高度脫醯胺可能性。為進

一步表徵此殘基，產生10B3嵌合抗體及人類化H2L2抗體，其中用N54取代天冬胺酸(D)或麩醯胺酸(Q)胺基酸殘基。

10B3嵌合體及人類化抗體之輕鏈在CDRL3中之Kabat 91位具有半胱胺酸(C)殘基。在抗體加工發展期間，未配對半胱胺酸可具有化學反應性從而產生修飾，由此可能引起產物具有異質性及親和力可能發生變化。此外，此殘基可能能夠因與可變區中產生免疫球蛋白摺疊所必需之其他半胱胺酸發生錯誤配對而促使錯誤摺疊或聚集。為進一步表徵此殘基，產生10B3嵌合抗體及人類化H2L2抗體，其中用C91取代絲胺酸(S)胺基酸殘基。

此外，亦將重鏈CDRH2中進行之脫醯胺取代與輕鏈CDRL3中91位之取代組合。作為此等分析之一部分所產生之抗體在表10中說明。

表10：所產生之用於可發展性分析之人類化抗體變異體

抗體分子名稱	重鏈可變區： SEQ ID NO:	輕鏈可變區： SEQ ID NO:	重鏈：胺基酸 SEQ ID NO: (DNA SEQ ID NO:)	輕鏈：胺基酸 SEQ ID NO: (DNA SEQ ID NO:)
10B3嵌合體N54D(HCLC-N54D)	19	8	35(50)	27(42)
10B3嵌合體N54Q(HCLC-N54Q)	20	8	36(51)	27(42)
10B3嵌合體N54D及C91S(HCLC-N54D-C91S)	19	21	35(50)	37(52)
10B3嵌合體N54Q及C91S(HCLC-N54Q-C91S)	20	21	36(51)	37(52)
10B3嵌合體C91S(HCLC-C91S)	25	21	26(41)	37(52)

H2L2 N54D(H2L2-N54D)	22	17	38(53)	33(48)
H2L2 N54Q(H2L2-N54Q)	23	17	39(54)	33(48)
H2L2 N54D及C91S(H2L2-N54D-C91S)	22	24	38(53)	40(55)
H2L2 N54Q及C91S(H2L2-N54Q-C91S)	23	24	39(54)	40(55)
H2L2 C91S(H2L2-C91S)	14	24	30(45)	40(55)

5. CDRH3變異型人類化抗體

5.1 構築CDRH3變異型人類化抗體

使用抗體H2L2-C91S(可變序列分別為：SEQ ID NO: 14及24；全長序列分別為：SEQ ID NO: 30及40)作為基礎分子進行CDRH3 (SEQ ID NO: 3)中各殘基之定點突變誘發以突變為替代性胺基酸殘基。使用pTT載體(National Research Council Canada，具有經修飾之多選殖位點(MCS))產生包括H2及L2-C91S(分別為SEQ ID NO: 45及55)之基礎序列之人類恆定區的全長DNA表現構築體。

產生約300個CDRH3變異體且在後續分析中測試約200個變異體(參見5.2及5.3)。

5.2 HEK 293 6E細胞中之CDRH3變異體表現

將分別編碼約200個CDRH3變異體之重鏈及輕鏈的pTT質體短暫共轉染至HEK 293 6E細胞中且小規模表現以產生抗體。如上所述，重鏈具有H2之基礎序列及變異型CDRH3序列，且輕鏈具有L2-C91S之基礎序列。直接評估來自組織培養上清液之抗體。

5.3 對組織培養上清液進行初始掃描-ProteOn XPR36

用ProteOn XPR36(Biorad Laboratories)對CDRH3篩選物

進行初始動力學分析。對於殘基 R95至 P100_B，使用蛋白質 A/G 捕捉表面 (Pierce 21186) 進行分析，且對於殘基 A100_C至 V102，使用抗人類 IgG 表面 (Biacore/GE Healthcare BR-1008-39)。使用一級胺偶合將捕捉分子固定於 GLM 晶片 (Biorad Laboratories 176-5012) 上來類似地製備兩種捕捉表面。CDRH3 變異體直接自由表現相關特定變異體之短暫轉染獲得之組織培養上清液捕捉於蛋白質 A/G 表面或抗人類 IgG 表面上 (視所突變之殘基而定)。捕捉後，使用 256 nM、32 nM、4 nM、0.5 nM 及 0.0625 nM 之內部重組人類肌肉抑制素 (參見以上 1.1) 作為分析物，且使用單獨緩衝液注射 (亦即 0 nM) 作為結合曲線之雙重參考。在肌肉抑制素結合事件後，使捕捉表面再生：對於蛋白質 A/G 捕捉表面，使用 100 mM 磷酸使捕捉表面再生；且對於抗人類 IgG 表面，使用 3 M MgCl_2 使捕捉表面再生；該再生移除先前所捕捉之抗體以準備用於捕捉及結合分析之另一循環。接著擬合資料與 ProteOn 分析軟體所固有之 1:1 模型 (具有質量輸送)。使用 HBS-EP (Biacore/GE-Healthcare BR-1006-69) 進行操作且分析溫度為 25°C。

結果因相互作用之性質而難以解釋，此係因為 1:1 模型不太可能充分描述相互作用，然而，藉由判斷感測器圖譜有可能選擇相較於基礎分子具有改良之親和力的構築體。判斷篩選物具有所鑑別之 11 種 CDRH3 變異體，其相較於基礎分子似乎具有較佳動力學概況。11 種 CDRH3 變異體之重鏈描述於下表 11 中 (使用 Kabat 編號)。所有變異體均具有輕

鏈 L2-C91S(可變序列：SEQ ID NO: 24；全長序列：SEQ ID NO: 40，全長DNA序列SEQ ID NO: 55)。經鑑別相較於基礎分子具有較佳動力學概況之另一CDRH3變異體為F100G_S(SEQ ID NO: 110)，但未對其作進一步分析。

表 11. CDRH3變異體序列

名稱	CDRH3之序列
H2L2-C91S	RYYYGTGPADWYFDV(SEQ ID NO: 3)
H2L2-C91S_Y96L	RLYYGTGPADWYFDV(SEQ ID NO: 82)
H2L2-C91S_G99D	RYYYDTGPADWYFDV(SEQ ID NO: 83)
H2L2-C91S_G99S	RYYYSTGPADWYFDV(SEQ ID NO: 84)
H2L2-C91S_G100A_K	RYYYGTKPADWYFDV(SEQ ID NO: 85)
H2L2-C91S_P100B_F	RYYYGTGFADWYFDV(SEQ ID NO: 86)
H2L2-C91S_P100B_I	RYYYGTGIADWYFDV(SEQ ID NO: 87)
H2L2-C91S_W100E_F	RYYYGTGPADFYFDV(SEQ ID NO: 88)
H2L2-C91S_F100G_N	RYYYGTGPADWYNDV(SEQ ID NO: 89)
H2L2-C91S_F100G_Y	RYYYGTGPADWYYDV(SEQ ID NO: 90)
H2L2-C91S_V102N	RYYYGTGPADWYFDN(SEQ ID NO: 91)
H2L2-C91S_V102S	RYYYGTGPADWYFDS(SEQ ID NO: 92)

利用編號提及抗體(亦即H2L2-C91S_Y96L)意謂在合適細胞株中共轉染及表現編碼輕鏈及重鏈之第一質體及第二質體(例如含有pTT5_H2_Y96L序列之質體及含有pTT5_L2-C91S序列之質體)所產生的抗體。

5.4 表現一組所選CDRH3變異體

在HEK 293 6E細胞中表現表11中所述之11種CDRH3變異體之重鏈及輕鏈(如5.2所述)，使用經固定之蛋白質A管

柱 (GE Healthcare) 進行親和純化且藉由在 280 nm 下讀取吸光度來定量。

5.5 藉由 BIAcore™ 分析與重組肌肉抑制素之結合

為判斷利用 ProteOn XPR36 自初始篩選物選擇構築體是否成功，對經純化之重組抗體進行解離速率分級實驗。藉由一級胺偶合將肌肉抑制素 (內部重組肌肉抑制素，參見以上 1.1) 以三種不同密度 (低、中及高) 共價固定於 CM5 晶片 (Biacore/GE Healthcare BR-1000-14) 上，產生對於所用抗體濃度分別得到約 60 個共振單位 (RU)、250 RU 及 1000 RU 之最大結合信號的表面。使用單一濃度 (256 nM) 之抗體及緩衝液注射作為結合相互作用之雙重參考。針對所有抗體對各種密度之肌肉抑制素表面的相互作用，使用 Biacore 3000 機器所固有之軟體計算初始解離速率 (解離速率)。藉由使用 100 mM 磷酸進行再生，且在 25°C 下使用 HBS-EP 緩衝液進行檢定。

發現所測試之所有構築體相較於基礎分子 (H2L2 C91S) 均顯示較佳之解離速率 (解離速率常數)，其中解離速率與 H2L2 C91S 相比較慢。在高密度表面上，除 10B3 嵌合體以外的前 5 種構築體為 H2L2-C91S_P100B_I、H2L2-C91S_W100E_F、H2L2-C91S_F100G_Y、H2L2-C91S_G99S 及 H2L2-C91S_P100B_F。

5.6 藉由 BIAcore™ 對與重組肌肉抑制素之結合進行完全動力學分析

將低、中及高密度之肌肉抑制素 (內部重組肌肉抑制

素，參見以上1.1)固定於Series S CM5晶片(Biacore/GE Healthcare BR-1006-68)上，產生分別得到約15 RU、37 RU及500 RU之最大結合信號的表面。使256 nM、64 nM、16 nM、4 nM、1 nM之CDRH3變異體流經所有三個表面，且使用緩衝液注射(亦即0 nM)作為雙重參考，使用100 mM磷酸進行再生。擬合資料與T100 Biacore機器所固有之二價模型且在25°C下使用HBS-EP進行操作。

通常，在所有三種密度表面上，基礎H2L2-C91S相較於CDR變異體擬合較差，以致難以獲得精確基線值。在三種表面中，最高密度表面在基礎抗體與CDR變異體之間得到最佳分離，但此外基礎H2L2-C91S分子之擬合較差。然而，預期此表面可能在構築體之間得到最大分離，且該表面最有可能提供用於真實二價結合之最佳表面，此係因為親合力結合及再結合事件可能較為頻繁且因此可「放大」親和力之小差異。通常，所有CDR變異體相較於基礎H2L2-C91S似乎皆較佳，此主要因為解離速率優良(亦即較慢)，在高密度表面上尤其如此。

由於此檢定中所涉及之方法，故在目標抗原與生物感測器晶片表面之共價偶合中，所得實際親和力可能不會反映活體內可觀察到的親和力。然而，此資料適用於達成分級目的。使用此檢定之高密度表面之資料，基於總體親和力(平衡常數KD)但排除嵌合體10B3以外的前5位構築體為F100G_Y、P100B_I、P100B_F、F100G_N及W100E_F。然而，所有其他構築體親和力均在F100G_Y之兩倍以內。

5.7 肌肉抑制素捕捉ELISA

在肌肉抑制素捕捉ELISA中亦分析11種經親和純化之CDRH3變異體的結合活性。

在4℃下，用2.5 µg/ml針對肌肉抑制素之多株抗體(R&D Systems, AF788)塗佈96孔ELISA板隔夜。接著用洗滌緩衝液(PBS、0.1% Tween-20)洗滌此板3次且在室溫下用阻斷溶液(PBS、0.1% Tween-20 + 1%牛血清白蛋白[BSA])阻斷1小時。接著，在1小時內添加含1 µg/ml肌肉抑制素之阻斷緩衝液，隨後用洗滌緩衝液洗滌3次。接著，將抗體滴定至合適濃度範圍(約10至0.01 µg/ml)，添加至板中且在室溫下培育1小時。接著用洗滌緩衝液洗滌板3次。使用抗人類κ輕鏈HRP結合抗體(Sigma A7164，根據製造商之說明書使用)偵測人類化抗體或嵌合抗體(諸如10B3嵌合體(HcLc)或H0L0)之結合。接著用洗滌緩衝液洗滌板3次，且用OPD受質(根據製造商之說明書)進行顯色且在490 nm下於板讀取器上進行讀取。

實驗說明於圖10中，其中H2L2-C91S、H0L0、HcLc(10B3嵌合體)及陰性對照單株抗體用作對照抗體。在此ELISA中，所有11種CDRH3變異型抗體均與重組肌肉抑制素結合。與基礎H2L2-C91S及H0L0相比，H2L2-C91S_P100B_I、H2L2-C91S_V102N、H2L2-C91S_G100A_K、H2L2-C91S_P100B_F及H2L2-C91S_F100G_Y傾向於對肌肉抑制素具有較佳結合活性。

5.8 肌肉抑制素競爭ELISA

在三種不同肌肉抑制素競爭ELISA中進一步研究CDRH3變異體。分析經純化之抗體與10B3鼠類mAb競爭的能力。

5.8.1 使用多株Ab作為捕捉方法

使用5.7中所述之方案，但向各孔中添加10B3(最終濃度為0.3 $\mu\text{g/ml}$)並與滴定至合適濃度範圍(約10至0.01 $\mu\text{g/ml}$)之抗體混合。使用抗小鼠HRP結合抗體(DAKO P0260，根據製造商之說明書使用)偵測10B3抗體之結合。自ELISA資料獲得之分級展示於表12中。

5.8.2 使用生物素化肌肉抑制素作為捕捉方法

使用5.7中所述之方案，但起初在4°C下用5 $\mu\text{g/ml}$ 抗生蛋白鏈菌素塗佈板隔夜。經1小時添加含0.3 $\mu\text{g/ml}$ 生物素化肌肉抑制素之阻斷緩衝液，接著用洗滌緩衝液洗滌3次。添加10B3(最終濃度為0.2 $\mu\text{g/ml}$)至各孔中且與滴定至合適濃度範圍(約10至0.01 $\mu\text{g/ml}$)之抗體混合。使用抗小鼠HRP結合抗體(DAKO P0260，根據製造商之說明書使用)偵測10B3抗體之結合。自ELISA資料獲得之分級展示於表12中。

5.8.3 使用肌肉抑制素作為捕捉方法(直接捕捉)

使用5.7中所述之方案，但起初在4°C下用0.2 $\mu\text{g/ml}$ 肌肉抑制素(內部重組肌肉抑制素，參見以上1.1)塗佈板隔夜。添加10B3(最終濃度為0.3 $\mu\text{g/ml}$)至各孔中且與滴定至合適濃度範圍(約10至0.01 $\mu\text{g/ml}$)之抗體混合。使用抗小鼠HRP結合抗體(DAKO P0260，根據製造商之說明書使用)偵測10B3抗體之結合。自ELISA資料獲得之分級展示於表12

中。

所有CDRH3變異體均能夠與10B3競爭。5種來自各不同競爭ELISA之最有效分子列於表12中。

表12：5種最有效CDRH3變異型分子之等級次序首位(1)至末位(5)

肌肉抑制素競爭ELISA		
生物素化肌肉抑制素	多株Ab	直接捕捉
H2L2-C91S_V102S	H2L2-C91S_P100B_F	H2L2-C91S_P100B_F
H2L2-C91S_F100G_Y	H2L2-C91S_V102N	H2L2-C91S_F100G_Y
H2L2-C91S_P100B_I	H2L2-C91S_V102S	H2L2-C91S_V102N
H2L2-C91S_V102N	H2L2-C91S_F100G_Y	H2L2-C91S_V102S
H2L2-C91S_Y96L	H2L2-C91S_G99D	H2L2-C91S_P100B_I

基於該部分之分析及先前部分5.6及5.7中之BIAcore資料，選擇變異體H2L2-C91S_P100B_F、H2L2-C91S_P100B_I、H2L2-C91S_F100G_Y、H2L2-C91S_V102N及H2L2-C91S_V102S用於進一步分析。

5.9 肌肉抑制素生物活性之活體外抑制

在肌肉抑制素反應性報導基因檢定(參見以上1.2)中測試5.8之5種所選CDRH3變異體以評估活體外功效。在37℃下，將濃度為5 nM之肌肉抑制素與不同濃度之抗體一起預培育，隨後添加至經轉染之A204細胞中。在37℃下再培育細胞6小時，隨後根據發光來測定相對螢光素表現。所得IC₅₀展示於表13中。

表 13：A204活體外活性檢定中人類化抗體之IC₅₀

抗體	平均IC ₅₀ (nM)	下部95% CI (nM)	上部95% CI (nM)
10B3嵌合體	3.534	1.941	6.435
H2L2-C91S	5.137	2.350	11.230
H2L2-C91S_P100B_F	4.235	2.295	7.818
H2L2-C91S_P100B_I	4.525	1.837	11.140
H2L2-C91S_F100G_Y	3.639	1.908	6.940
H2L2-C91S_V102N	5.514	3.023	10.060
H2L2-C91S_V102S	4.221	2.234	7.975

資料顯示，在此檢定中所測試之所有抗體以與10B3嵌合體類似之效能中和肌肉抑制素，其中H2L2-C91S_F100G_Y具有最高效能，儘管並不顯著。

6. 構築及表現Fc失能之恆定區變異體

因為抗肌肉抑制素之活體內作用模式為簡單結合及中和肌肉抑制素，所以分子可能未必需要保留其引發ADCC及CDC反應之Fc功能。此外，使Fc功能失能可能有助於降低輸注相關之免疫反應的可能性。使Fc功能失能之突變涉及以下取代(使用EU編號系統)：Leu 235 Ala；及Gly 237 Ala。

使用標準分子生物學技術，將編碼CDRH3變異體H2_F100G_Y之可變重鏈區之序列的基因自現有構築體轉移至含有hIgG1 Fc失能恆定區之表現載體中。使用pTT載體產生編碼重鏈(SEQ ID NO: 98 H2_F100G_Y_Fc失能)及輕鏈(SEQ ID NO: 40 L2-C91S)之全長DNA表現構築體。重

鏈之詳情展示於表14中。

表 14. CDRH3變異體Fc失能之序列

名稱	全長蛋白質序列ID
H2L2-C91S_F100G_Y Fc失能	98

在肌肉抑制素反應性報導基因檢定(如上1.2所述)中分析經Fc失能之恆定區之影響。所得IC₅₀資料展示於表15中。

表 15. 活體外活性檢定中A204中CDRH3變異體Fc失能抗體之IC₅₀

抗體	平均IC ₅₀ (nM)	下部95%CI (nM)	上部95%CI (nM)
H2L2-C91S	4.083	1.319	12.640
H2L2-C91S_F100G_Y Fc失能	1.239	0.524	2.932

該等資料顯示如上所述使「H2L2-C91S_F100G_Y Fc失能」之Fc功能失能對抗體中和肌肉抑制素之效能無顯著影響。

7. CDRH2變異型人類化抗體

7.1 構築CDRH2變異型人類化抗體

如以上實例4所述，重鏈CDRH2中Kabat 54位之天冬醯胺(N54)可能脫醯胺。為降低此潛在風險，使序列之G55突變以產生H2_F100G_Y之多個CDRH2變異體。所有該等變異體均在CDRH2 (SEQ ID NO: 2)中有所不同且使用編碼H2_F100G_Y重鏈之pTT載體藉由定點突變誘發產生。輕鏈(SEQ ID NO: 40 L2-C91S)與各重鏈一起表現。未使該等構築體之Fc區失能。

7.2 HEK293 6E細胞中之CDRH2變異體表現

如以上5.2所述，將分別編碼重鏈及輕鏈之pTT質體短暫共轉染至HEK 293 6E細胞中。此外，表現H2L2-C91S_F100G_Y作為陽性對照。藉由BIAcore分析HEK293細胞上清液中所產生之抗體與重組肌肉抑制素之結合。CDRH2變異體之篩選指示所有變異體均與重組肌肉抑制素結合。

使用所獲得之親和力資料及潛在脫醯胺作用風險之電腦分析，選擇一組5種CDRH2變異體(列於表16中)進行較大規模表現、純化及進一步分析。

表 16. CDRH2變異體序列

名稱	CDRH2之序列
H2L2 C91S	NIYPYNGVSNYNQRFKA(SEQ ID NO: 2)
H2L2 C91S_G55D F100G_Y	NIYPYNDVSNYNQRFKA(SEQ ID NO: 93)
H2L2 C91S_G55L F100G_Y	NIYPYNLVSYNYNQRFKA(SEQ ID NO: 94)
H2L2 C91S_G55S F100G_Y	NIYPYNSVSNYNQRFKA(SEQ ID NO: 95)
H2L2 C91S_G55T F100G_Y	NIYPYNTVSNYNQRFKA(SEQ ID NO: 96)
H2L2 C91S_G55V F100G_Y	NIYPYNVVSYNYNQRFKA(SEQ ID NO: 97)

7.3 表徵CDRH2變異體

在肌肉抑制素結合ELISA中分析所有5種抗體之結合活性。在4℃下，用10奈克/孔重組肌肉抑制素塗佈96孔ELISA板隔夜。接著用洗滌緩衝液(PBS、0.1% Tween-20)洗滌此板3次。在室溫下用阻斷溶液(PBS、0.1% Tween-20+1%牛血清白蛋白[BSA]))對孔進行阻斷1小時，隨後用洗滌緩衝液洗滌3次。接著，將抗體滴定至合適濃度範圍

(約 10 至 0.01 $\mu\text{g/ml}$)，添加至板中且在室溫下培育 1 小時。接著在洗滌緩衝液中洗滌板 3 次。使用抗人類 κ 輕鏈 HRP 結合抗體 (Sigma Aldridge 供應之 A7164，根據製造商之說明使用此試劑) 偵測人類化抗體或嵌合抗體 (諸如 10B3 嵌合體或 H0L0) 之結合。接著在洗滌緩衝液中洗滌板 3 次且用 OPD 受質 (來自 Sigma，根據製造商之說明使用) 進行顯色且在 490 nm 下用板讀取器進行讀取。

圖 11 展示 H2L2-C91S_F100G_Y、H2L2 C91S、HcLc (10B3C) 及陰性對照 mAb 以及所有 5 種 CDRH2 變異型抗體之結果。CDRH2 變異體相較於 H2L2-C91S_F100G_Y 具有較佳或類似之肌肉抑制素結合活性。

7.4 CDRH2 變異體 BIAcore 分析

亦藉由 BIAcore 測試 CDRH2 變異體以測定肌肉抑制素結合親和力之任何變化。將蛋白質 A 固定於 C1 Biacore 生物感測器晶片上，以低密度捕捉經純化之抗體，使得肌肉抑制素之最大結合產生小於 30 個共振單位。僅使濃度為 256 nM 之肌肉抑制素流經捕捉之抗體表面；使用緩衝液注射 (亦即 0 nM) 作為結合資料之雙重參考。使用 100 mM 磷酸使蛋白質 A 表面再生。擬合資料與 T100 Biacore 分析軟體所固有之二價模型及兩態模型。然而，因為肌肉抑制素為二聚體，所以二價模型資料較為重要。使用 HBS-EP 且在 25°C 之溫度下進行操作。

所用模型可能不會反映真實活體內結合且模型本身可能不會精確反映相互作用，因此計算值僅用於分級。資料表

明與 H2L2-C91S_F100G_Y 相比，CDRH2 變異體不會太過顯著地影響親和力，根據二價模型，最差構築體 (H2L2 C91S_G55L F100G_Y) 顯示總體親和力低 6.8 倍。

7.5 肌肉抑制素生物活性之活體外抑制

亦使用 A204 螢光素檢定 (部分 1.2 中所描述) 分析 CDRH2 變異體對活體外中和檢定之作用。抑制曲線之 IC_{50} 值提供於表 17 中。

表 17. A204 活體外活性檢定中抗體變異體之 IC_{50}

抗體	平均 IC_{50} (nM)	下部 95%CI (nM)	上部 95%CI (nM)
10B3 嵌合體	3.570	1.473	8.654
H2L2-C91S_F100G_Y	11.070	3.686	33.230
H2L2 C91S_G55D F100G_Y	5.530	1.649	18.540
H2L2 C91S_G55L F100G_Y	5.581	1.601	19.460
H2L2 C91S_G55S F100G_Y	4.425	1.730	11.310
H2L2 C91S_G55T F100G_Y	6.892	2.452	19.370
H2L2 C91S_G55V F100G_Y	3.840	1.044	14.130

資料表明在此檢定中所有 CDRH2 變異型抗體均以與 H2L2-C91S_F100G_Y 類似之效能抑制肌肉抑制素誘導之 A204 細胞活化。

7.6 Fc 失能型 CDRH2 變異體

在 A204 檢定中具有最高表觀效能之可發展性增強分子 H2L2 C91S_G55S F100G_Y 進行 Fc 失能 (藉由進行以下取代，使用 EU 編號系統：Leu 235 Ala；及 Gly 237 Ala)，如 SEQ ID NO: 99 中所例示。使用受體結合檢定 (實例 2.5) 證明此新穎分子 H2L2 C91S_G55S F100G_Y-Fc 失能相較

H2L2 C91S_G55S F100G_Y具有輕微改良之效能(參見表18)。

表 18. ActRIIb受體結合檢定中抗體變異體之IC₅₀值

mAb	平均IC ₅₀ (nM)	下部95%CI (nM)	上部95%CI (nM)
10B3	0.161	0.087	0.295
H2L2 C91S_G55S F100G_Y	0.786	0.326	1.898
H2L2 C91S_G55S F100G_Y-Fc失能	0.518	0.206	1.298

8. 10B3處理減輕帶有C-26腫瘤之小鼠之肌肉萎縮

在本研究中，在帶有結腸-26腫瘤之小鼠(此為癌症惡病質研究廣泛使用之臨床前模型)中研究10B3處理對體重變化、肌肉質量及肌肉功能之影響。

將38隻8週齡雄性CD2F1小鼠隨機分成4組：mIgG2a(n=9)、10B3(n=9)、mIgG2a+C-26(n=10)及10B3+C-26(n=10)。將結腸-26(C-26)腫瘤細胞以 1×10^6 個細胞/小鼠皮下植入20隻小鼠中。若干小時後，動物開始接受抗體注射。在第0天、第3天、第7天、第14天、第21天向小鼠腹膜內注射30 mg/kg劑量之小鼠IgG2a對照抗體或10B3。在整個實驗期間監測體重及脂肪質量。在第25天臨處死前，藉由在對大腿中部坐骨神經電刺激時量測收縮力來評估下肢肌力。實驗結束時測定腫瘤重量及個別肌肉質量及附睾脂肪墊質量。

圖12展示第0天至第25天帶有C-26腫瘤之小鼠中抗體處理對體重之影響。在腫瘤植入後第21天帶腫瘤小鼠之體重開始顯著降低。用10B3處理有效緩解帶腫瘤小鼠的體重減輕。經10B3處理之帶腫瘤小鼠之平均體重比經mIgGa2a對

照抗體處理之帶腫瘤小鼠高8%。在10B3處理組與mIgG2a對照處理組之間腫瘤尺寸並無顯著差異(IgG2a為2.2 g對比10B3為1.9 g)。

圖13展示抗體處理對帶有C-26腫瘤之小鼠之總體脂肪(A)、附睾脂肪墊(B)及瘦質量(C)的影響。帶腫瘤小鼠之總體脂肪顯著較少(圖13A)。經10B3及mIgG2a對照處理之帶腫瘤小鼠的附睾脂肪墊幾乎完全消失(圖13B)，表明10B3並不保護帶腫瘤動物免於體脂肪減少。

如圖13C所示，10B3處理在正常動物以及帶腫瘤小鼠中引起瘦質量顯著($p<0.01$)增加。在移除腫瘤之後，經對照IgG2a處理之帶腫瘤小鼠之瘦質量顯著較低。相比之下，經10B3處理之帶腫瘤小鼠之瘦質量顯著($p<0.01$)高於經IgG2a處理之帶腫瘤小鼠。實情為，經10B3處理之帶腫瘤小鼠與正常動物之間瘦質量並無顯著差異。

表19展示抗體處理對肌肉質量之影響。如所預期，帶腫瘤小鼠之TA、EDL、四頭肌、比目魚肌及腓腸肌顯著損失(表19)。10B3處理增加正常動物之肌肉質量。最重要的是，10B3處理減少帶腫瘤小鼠之肌肉損失。在經10B3處理之帶腫瘤小鼠中，TA、EDL、四頭肌、比目魚肌及腓腸肌之重量分別比經IgG2a對照處理之帶腫瘤小鼠高17.8%、11.3%、16.9%、13.4%及14.6%。

表 19：10B3處理減少帶腫瘤小鼠之肌肉損失。資料為平均肌肉質量(mg) $\pm$ SEM。根據史都登氏T檢驗(Student T tests)，帶有上標*及#之平均值分別指示與IgG2a組及C-26+IgG2a組顯著($p<0.05$)不同。

組	四頭肌	腓腸肌	TA	EDL	比目魚肌
IgG2a	216 $\pm$ 2.1	159 $\pm$ 2.2	51 $\pm$ 0.5	11.1 $\pm$ 0.5	8.0 $\pm$ 0.4
10B3	244 $\pm$ 4.7 *	173 $\pm$ 4.8	58 $\pm$ 1.2 *	12.6 $\pm$ 0.6 *	8.5 $\pm$ 0.2
C-26 + IgG2a	174 $\pm$ 3.7 *	123 $\pm$ 4.5 *	40 $\pm$ 1.6 *	8.9 $\pm$ 0.3 *	6.9 $\pm$ 0.3 *
C-26 + 10B3	204 $\pm$ 8.6 #	140 $\pm$ 5.8 #	47 $\pm$ 1.8 #	9.9 $\pm$ 0.6	7.9 $\pm$ 0.5

圖 14 展示抗體處理對下肢肌力之影響，此係藉由在對大腿中部坐骨神經電刺激時量測收縮力來評估。腫瘤植入 25 天後，在對照抗體組中下肢肌肉收縮力顯著($p<0.001$)降低 20%。與對照組相比，在健康動物及帶腫瘤小鼠中 10B3 處理分別使最大收縮力增加 10.2% 及 17.5% ($p<0.05$)。在經 10B3 處理之帶腫瘤小鼠與健康對照組之間最大力量測值並無顯著差異。因此，10B3 處理改良健康小鼠與帶腫瘤小鼠之肌肉功能。

該等資料指示 10B3 或其人類化抗體處理可減少與癌症惡病質相關之肌肉損失及功能下降。

9. 在小鼠腓切除模型中 10B3 處理對骨骼肌萎縮症的作用

此處，測定小鼠腓切除模型中肌肉抑制素抗體 10B3 對肌肉質量之影響。

將幼年雄性 C57BL 小鼠隨機分為 mIgG2a 或 10B3 處理組 ($n=6$ 隻/組) 且在第 1 天、第 4 天、第 8 天及第 15 天以 30 mg/kg 腹膜內給藥。在給藥前的早晨(第 0 天)，所有小鼠接受以下

外科手術方案：使左腿中之脛骨前肌(TA)腱在其末端插入處分離(腱切除術)，同時暴露所有右TA腱但保持完整(假)。3週後(第21天)，對小鼠實施安樂死以評估TA肌肉質量之變化。

在對小鼠進行假手術與腱切除手術之後，3週10B3處理顯著增加TA肌肉質量(圖15)。有趣的是，與完整假狀況(+14%)相比，在腱切除術存在下10B3之作用較為明顯(+21%)。

該等資料指示10B3或其人類化抗體處理可減少與創傷/損傷相關之肌肉損失及功能下降。

10. 10B3在糖皮質激素誘發之肌肉萎縮中之功效

糖皮質激素通常用於治療許多慢性發炎性疾病，諸如全身性紅斑狼瘡症、肉狀瘤病、類風濕性關節炎及支氣管哮喘。然而，投與高劑量之糖皮質激素會導致人類及動物之肌肉萎縮症。類似地，皮質醇增多症對庫欣氏病(Cushing's disease)之肌肉萎縮症中起主要作用。地塞米松(dex)誘發之肌肉萎縮症與肌肉之肌肉抑制素mRNA及蛋白質表現之顯著劑量依賴性誘導相關(Ma K等人，2003 Am J Physiol Endocrinol Metab 285:E363-E371)。亦已在若干種肌肉萎縮症模型(諸如固定及灼傷損傷)中報導肌肉抑制素表現增加，其中糖皮質激素起主要作用(Lalani R等人，2000 J Endocrinol 167:417-428；Kawada S等人，2001 J Muscle Res Cell Motil 22:627-633；及Lang CH等人，2001 FASEB J 15:NIL323-NIL338)。

在本研究中，研究10B3處理是否可預防小鼠中類固醇誘發之肌肉損失。

50隻10週齡C57BL小鼠分為3個組且在第0天、第3天、第7天、第14天、第21天及第28天腹膜內給與PBS(n=10)、30 mg/kg mIgG2a(n=20)或30 mg/kg 10B3(n=20)。接著在第28天將各抗體處理組進一步分為兩個子組：mIgG2a+媒劑(n=10)、10B3+媒劑(n=10)、mIgG2a+地塞米松(n=10)、10B3+地塞米松(n=10)。在第29天至第42天，每天一次向小鼠皮下注射含0.1% DMSO之PBS作為媒劑(PBS+媒劑、mIgG2a+媒劑、10B3+媒劑)或以1毫克/公斤/天皮下注射地塞米松(mIgG2a+地塞米松、10B3+地塞米松)。在此期間，在第35天小鼠再一次接受PBS、mIgG2a或10B3腹膜內注射。在42天實驗結束時，藉由QNMR掃描量測總體脂肪及瘦質量。對小鼠實施安樂死且解剖個別骨骼肌並進行稱重。

圖16展示第0天至第42天之處理時程期間之體重變化。在第29天開始地塞米松處理。歷時13天之地塞米松處理在經對照抗體預先處理之動物中引起體重減輕。用10B3預先處理減弱地塞米松誘發之體重減輕。

表20展示用10B3或對照抗體預先處理對地塞米松誘發之肌肉損失之影響。經對照抗體預先處理之動物在注射地塞米松13天後展示在伸趾長肌(EDL)、脛骨前肌(TA)及腓腸肌中發生明顯肌肉萎縮症($P < 0.05$)。地塞米松處理後，對照抗體處理組中之四頭肌質量降低7%。然而，其在統計

上並不顯著。有趣的是，地塞米松處理不引起比目魚肌之顯著肌肉損失。相比之下，在經10B3預先處理之動物中，地塞米松處理未在TA、EDL、四頭肌及腓腸肌引起明顯萎縮症(10B3+媒劑相對於10B3+地塞米松， $p>0.05$ ，因此不顯著)。

表 20 10B3處理對地塞米松誘發之肌肉損失之影響。資料為平均值 $\pm$ SEM。具有不同上標之平均值指示顯著不同($p<0.05$)

組	TA	EDL	四頭肌	腓腸肌	比目魚肌
PBS+媒劑	37 $\pm$ 0.79 ^c	8.5 $\pm$ 0.25 ^{ab}	176 $\pm$ 2.8 ^{bc}	119 $\pm$ 2.6 ^b	8.1 $\pm$ 0.29
mIgG2a+媒劑	38 $\pm$ 0.37 ^{bc}	8.8 $\pm$ 0.37 ^a	176 $\pm$ 1.8 ^{bc}	121 $\pm$ 2.0 ^b	7.6 $\pm$ 0.29
mIgG2a+地塞米松	34 $\pm$ 0.83 ^d	7.7 $\pm$ 0.16 ^b	164 $\pm$ 2.8 ^c	109 $\pm$ 2.3 ^c	7.5 $\pm$ 0.24
10B3+媒劑	42 $\pm$ 0.64 ^a	9.3 $\pm$ 0.16 ^a	194 $\pm$ 4.5 ^a	131 $\pm$ 2.3 ^a	8.1 $\pm$ 0.35
10B3+地塞米松	41 $\pm$ 0.32 ^{ab}	8.7 $\pm$ 0.32 ^{ab}	187 $\pm$ 3.2 ^{ab}	124 $\pm$ 1.9 ^{ab}	8.4 $\pm$ 0.35

圖 17 展示用 10B3 或對照抗體進行預先處理對地塞米松誘發之體脂肪積累之影響。經對照抗體預先處理之動物展示體脂肪積累顯著增加($P<0.05$)。然而，在經 10B3 預先處理之動物中，地塞米松處理後體脂肪百分比未顯著增加(10B3+媒劑相對於10B3+地塞米松， $p>0.05$ ，因此不顯著(NS))。

該等結果表明 10B3 或其人類化抗體可用於治療糖皮質激素誘發之肌肉萎縮。舉例而言，在經受糖皮質激素療法之患者中防治性處理肌肉萎縮可為有利的。

11. 10B3處理減輕坐骨神經擠壓模型之肌肉萎縮症

人類不用性肌肉萎縮症通常與諸如關節之慢性骨關節炎

或用於治療骨折之石膏固定的矯形外科病症相關聯地發生，以及在出於其他醫學或手術原因而長期臥床休息之情況下發生。不用性肌肉萎縮症引起肌力降低且導致失能。身體復原仍然為唯一治療選擇，且此通常需要較長時間且並不總是會使肌肉恢復至正常尺寸或力量。

此處使用神經損傷模型來評估10B3在預防小鼠之不用性萎縮症方面的功效。

39隻8週齡雄性C57BL小鼠隨機分為4個組：mIgG2a+假手術(n=9)、10B3+假手術(n=10)、mIgG2a+坐骨神經擠壓(n=10)及10B3+坐骨神經擠壓(n=10)。在第0天、第3天、第7天、第14天、第21天及第28天向小鼠腹膜內給與30 mg/kg mIgG2a對照或10B3抗體。抗體處理3週後，用異氟烷(isoflurane)使小鼠麻醉且使右腿之大腿中部坐骨神經暴露並保持完整(假手術組)或藉由使用止血劑鉗擠壓10秒來損傷(神經擠壓組)。手術1週後(第28天)，小鼠接受最後一次抗體注射。神經擠壓手術後第10天對小鼠實施安樂死且評估後肢之肌肉質量。

圖18展示經對照抗體處理之組中坐骨神經擠壓對肌肉質量之影響(mIgG2a+假手術，及mIgG2a+坐骨神經(SN)擠壓)。與假手術對照相比，坐骨神經擠壓損傷分別引起伸趾長肌(EDL)、脛骨前肌(TA)、腓腸肌及比目魚肌之質量顯著($p<0.01$)降低達22%、37%、41%及29%。坐骨神經損傷不影響四頭肌質量(資料未圖示)。

圖19A展示假手術操作腿中10B3及對照抗體處理對骨骼

肌質量之影響。在假手術組中，與IgG2a對照組相比，10B3處理分別使TA、EDL、腓腸肌及四頭肌之質量顯著增加7%、10%、12%及13%。然而，10B3處理不引起比目魚肌之明顯質量變化。

圖19B展示坐骨神經擠壓腿中10B3及對照抗體處理對骨骼肌質量之影響。經10B3處理之動物與經IgG2a對照處理之動物相比保留顯著更多肌肉。經10B3處理之神經損傷動物之TA、EDL、腓腸肌及比目魚肌顯示質量高於(分別為11%、16%、9%及10%)IgG2a對照組之質量。10B3處理亦增加假手術操作及神經擠壓動物之總體重(資料未圖示)。

此等結果顯示10B3或其人類化抗體可具有預防及/或治療人類不用性肌肉萎縮症之潛力。

實例12：H2L2變異體之活體內功效

使用3、10及30 mg/kg之劑量在7至8週齡雄性SCID小鼠中比較具有完整功能WT Fc域或Fc失能突變之H2L2抗肌肉抑制素變異體對肌肉生長之影響。鼠類親本分子10B3用作陽性對照且亦以3、10及30 mg/kg給與且無關鼠類IgG2a同型對照以30 mg/kg給與。每劑量組有10隻動物。在第0天、第3天、第7天、第14天及第21天藉由腹膜內注射投與分子。在研究之第28天，處死動物且解剖並測定以下肌肉之重量：脛骨前肌(TA)、四頭肌、伸趾長肌(EDL)及腓腸肌(圖29)。

應注意，與對照動物相比，10B3陽性對照組顯示肌肉質量增加大於10%，而兩種H2L2變異體對所量測之肌肉組織

顯示顯著較少之影響，但觀測到劑量依賴性增加肌肉質量之趨勢，在一些肌群中觀測到一些統計上顯著之效果。

13. 表現及表徵人類化抗體

製備抗體

在pTT哺乳動物表現載體中製備人類化V_H構築體(H3、H4、H5及H6)及人類化V_L構築體(L4、L5及L6)。作為該等分析之部分產生之抗體說明於表21中。使用293費克汀(293fectin)(Invitrogen, 12347019)將編碼圖20中之抗體之重鏈及輕鏈表現質體共轉染至HEK 293 6E細胞中。24小時後，添加胰化蛋白(tryptone)進料至各細胞培養物中且48至72小時後收集細胞。使用蛋白質A管柱純化抗體，隨後在結合檢定中進行測試。

人類化抗體之重鏈及輕鏈兩者中潛在脫醯胺位點之電腦分析鑑別出重鏈CDRH2中Kabat 54位(N54)處之天冬醯胺具有高脫醯胺可能性。為減少此潛在風險，藉由定點突變誘發將Kabat 55位(G55)處之胺基酸取代為絲胺酸。

產生3種人類化V_H構築體。該等構築體編號為H7 (SEQ ID NO: 119)、H8 (SEQ ID NO: 120)及H9 (SEQ ID NO: 121)。H7、H8及H9分別與H4、H5及H6一致，但具有點突變，其中55位之胺基酸為絲胺酸而非甘胺酸。

表 21：所產生之用於可發展性分析之人類化抗體

10B3 V_H人類化

構築體	所存在之突變(Kabat編號)	可變區 (蛋白質) SEQ ID NO.	可變區 (DNA) SEQ ID NO.	全長序列 (蛋白質) SEQ ID NO.
H0	無	12	43	28
H1	Q105T	13	44	29
H2	T28S	14	45	30
H3	T28S、M48I、V67A、M69L、 F100G_Y	112	128	138
H4	T28S、T71V、T73K、F100G_Y	113	129	139
H5	T28S、M48I、V67A、M69L、 T71V、T73K、F100G_Y	114	130	140
H6	T28S、M48I、V67A、M69L、 T71V、T73K、V20I、R66K、 F100G_Y	115	131	141
H7	T28S、T71V、T73K、 F100G_Y、G55S	119	135	142
H8	T28S、M48I、V67A、M69L、 T71V、T73K、F100G_Y、G55S	120	136	143
H9	T28S、M48I、V67A、M69L、 T71V、T73K、V20I、R66K、 F100G_Y、G55S	121	137	144

10B3 V_L人類化

構築體	所存在之突變 (Kabat編號)	可變區 (蛋白質) SEQ ID NO.	可變區(DNA) SEQ ID NO.	全長序列 (蛋白質) SEQ ID NO.
L0	無	15	46	31
L1	G16R	16	47	32
L2	F71Y	17	48	33
L2 + C91S	F71Y、C91S	24	55	40
L3	Q100A	18	49	34
L4	F71Y、T69Q、C91S	116	132	145
L5	F71Y、S46T、C91S	117	133	146
L6	F71Y、T69Q、S46T、 C91S	118	134	147

14. 肌肉抑制素中和檢定

14.1 重組可溶性ActRIIb

在 4°C 下將 1 µg/ml 重組可溶性 ActRIIb(R&D Systems 339-RBB)於碳酸酯緩衝液中塗佈於 ELISA 板之孔中隔夜。用含有 0.1% tween 20 及 0.1% BSA 之 PBS 對板進行阻斷且根據標準 ELISA 方案洗滌。同時，2 nM 生物素化肌肉抑制素(內部試劑，如上所述)與表 21 及 22 抗體之系列稀釋液一起在 37°C 下預培育 30 分鐘。接著在 37°C 下經 1 小時向 ActRIIb 塗佈之板中添加生物素化肌肉抑制素:抗體反應物(50 微升/孔)。進行標準洗滌程序，接著以每孔添加 50 微升以 1:200 稀釋之抗生蛋白鏈菌素-HRP 結合物(R&D Systems, #890803)，接著再在 37°C 下培育 1 小時。再次洗滌板且在受質(R&D Systems, #DY999)及酸終止溶液處理後在 490 nm 吸光度下進行檢定。結果展示為至少 3 次重複檢定之平均 IC₅₀ 值且信賴區間展示於下表 23 中。

表 23：人類化抗體之 ActRIIb 肌肉抑制素中和

抗體	平均IC ₅₀ (nM)	下部95% CI(nM)	上部95% CI(nM)
10B3	0.172	0.132	0.225
H2L2-C91S_F100G_Y	1.246	0.916	1.696
H3L4	1.307	0.476	3.587
H3L5	1.076	0.505	2.291
H3L6	3.037	0.937	9.842
H4L4	0.395	0.290	0.539
H4L5	0.336	0.213	0.530
H4L6	0.273	0.196	0.381

H5L4	0.211	0.211	0.245
H5L5	0.149	0.118	0.189
H5L6	0.166	0.143	0.192
H6L4	0.225	0.184	0.274
H6L5	0.211	0.240	0.428
H6L6	0.320	0.240	0.428
H7L4	0.038	0.020	0.073
H7L5	0.028	0.013	0.059
H7L6	0.031	0.020	0.047
H8L4	0.079	0.068	0.093
H8L5	0.101	0.068	0.152
H8L6	0.101	0.068	0.152
H9L4	0.141	0.110	0.179
H9L5	0.140	0.101	0.193
H9L6	0.129	0.094	0.176

該等資料顯示對肌肉抑制素與ActRIIb-Fc蛋白質之結合之中和的 IC_{50} 範圍。效能主要利用重鏈進行測定，其中H7、H8及H9得到最低 IC_{50} 值。

14.2 報導細胞生物檢定

使用肌肉抑制素反應性報導基因檢定(Thies等人, (2001) Growth Factors 18(4) 251-259)評估橫紋肌肉瘤細胞(A204)中肌肉抑制素之活體外活性。A204細胞(LGC Promochem HTB-82)在含有10%胎牛血清(Gibco)之RPMI 1640培養基(Hyclone)中生長。細胞用胰蛋白酶處理以產生懸浮液且使用FuGene 6(Roche)用含有受PAI-1啟動子之12x CAGA盒控制的螢光素酶基因之pLG3質體轉染。24小時後，收集細胞，洗滌，以 2×10^7 個細胞/毫升再懸浮於20% DMSO、

80%胎牛血清中，等分且在-80℃下冷凍。

使A204細胞之冷凍小瓶解凍且懸浮於50 ml溫暖培養基(具有HEPES及L-麩醯胺酸之高葡萄糖DMEM [Invitrogen, 12430-047]，含有1%胎牛血清 [Invitrogen, 16000-044])中。使細胞集結且以 1.3×10^6 個細胞/毫升再懸浮於含有30 nM肌肉抑制素之10 ml培養基中。添加細胞至96孔板(Greiner, 655083)中，每孔50微升。在含有1%胎牛血清及2 nM肌肉抑制素之DMEM/高葡萄糖培養基中連續稀釋表21及22中所述之抗體且轉移100 μ l測試樣品至檢定板中。在37℃下培育檢定板5小時。接著添加100 μ l SteadyGlo試劑(Promega)至各孔中。培育板10分鐘，隨後使用Viewlux板讀取器(Perkin Elmer)進行螢光量測。結果展示於表24中。

表24：肌肉抑制素反應性報導基因中和檢定

抗體	IC ₅₀ (M)
10B3	1.0e-8
H2L2-C91S_F100G_Y	2.3e-8
H4L4	7.9E-09
H4L5	6.5E-09
H4L6	6.9E-09
H5L5	6.1E-09
H6L5	6.0E-09
H7L5	6.3E-09
H8L5	5.0E-09
H9L5	4.0E-09

該等資料表明，以上測試之所有抗肌肉抑制素人類化抗體根據其在報導基因轉染之A204細胞中刺激螢光素酶反應

之能力均能夠中和肌肉抑制素。

15. 結合特異性

進行ELISA以判定H8L5是否可結合任何其他生長因子及尤其TGF β 家族中已知與所提出之抗原決定基序列共有一定程度之同源性的其他成員。藉由用各種生長因子以0.5 $\mu\text{g/ml}$ 塗佈ELISA板且在標準ELISA條件下在H8L5中進行滴定，斷定在所測試之其他因子中H8L5僅可與GDF-11結合，其中得到50%結合所需之濃度為肌肉抑制素的1/3倍(圖22)。SPR資料表明H8L5結合於活化素B，但親和力較弱(比其對肌肉抑制素之親和力低超過12倍)。

16. 在報導基因檢定中活化素b之中和

A204細胞用含有受PAI-1啟動子之12x CAGA盒控制的螢光素酶基因之pLG3質體轉染且培育隔夜。

製備含有不同濃度之H8L5及40 nM活化素B(20倍其最終檢定濃度)之溶液且預培育30分鐘。接著將20 μl 該等測試溶液置於檢定板中且添加180 μl 每毫升含 2.22×10^5 個經轉染細胞之檢定培養基。在37 $^{\circ}\text{C}$ 下培育細胞6小時。接著添加50 μl SteadyLite(Perkin Elmer)試劑。在室溫下在振動下(450 rpm)培育板20分鐘且用Tecan Ultra板讀取器以螢光模式讀取。顯示H8L5為活化素B之極弱抑制劑，其中 $\text{IC}_{50} > 1.5 \mu\text{M}$ (圖23)。

17. 藉由KINEXA方法測定結合親和力

使用Kinexa(Sapidyne Instruments)溶液相親和力測定一定範圍之抗肌肉抑制素分子之總體親和力。藉由吸附(聚

甲基丙烯酸甲酯珠粒-PMMA)或胺偶合(NHS活化之瓊脂糖凝膠珠粒)製備肌肉抑制素珠粒。所研究抗肌肉抑制素分子之範圍需要產生經不同濃度之肌肉抑制素塗佈之珠粒。對於檢定之溶液相部分，固定濃度之抗體與廣泛範圍濃度之肌肉抑制素一起培育且藉由在室溫下培育至少2小時使其達到平衡，隨後進行分析。接著使用肌肉抑制素珠粒藉助於游離抗體與肌肉抑制素珠粒基質之結合，接著使用經螢光染料標記之適當二次抗體(視所測試之構築體而定為抗人類或抗小鼠抗體)偵測來測定溶液相樣品中所存在游離抗體之量。使用機器固有之Kinexa Pro分析軟體擬合結合曲線。接著彙編使用不同起始濃度之抗體進行多次測定獲得之結果且使用n曲線分析軟體進行分析以得到更精確的親和力測定。

表 25 使用 Kinexa 測定與肌肉抑制素之結合的溶液相親和力

分子	K _D (pM)	上部95% CI	下部95% CI
10B3.C5	205	251	166
10B3嵌合體	548	722	402
H2L2-C91S_F100G_Y	3680	6160	2130
H8L5	50	79	28

18. 構築及表現Fc失能型恆定區變異體

因為抗肌肉抑制素之活體內作用模式為簡單結合及中和肌肉抑制素，所以分子可能未必需要保留其引發ADCC及CDC反應之Fc功能。此外，使Fc功能失能可能有助於降低輸注相關之免疫反應的可能性。使Fc功能失能之突變涉及以下取代(使用EU編號系統)：Leu 235 Ala；及Gly 237

Ala。

使用標準分子生物學技術，將編碼人類化V_H構築體H7、H8及H9之可變重鏈區之序列的基因自現有構築體轉移至含有hIgG1 Fc失能型恆定區之表現載體。作為該等分析之部分所產生之抗體說明於表26中。

表26. Fc失能型構築體之序列

抗體	全長DNA序列SEQ ID NO:	全長蛋白質序列SEQ ID NO:
H7 Fc失能	122	123
H8 Fc失能	124	125
H9 Fc失能	126	127

任何失能重鏈可與任何輕鏈配對。

19. 抗體與Fc受體及C1q之結合

使用ProteOn XPR36進行FcγR及C1q之結合分析。藉由一級胺偶合使測試抗體(H8L5及Fc失能型H8L5)固定於GLC生物感測器晶片上。FcγR以2048 nM、512 nM、128 nM、32 nM及8 nM使用，而C1q以512 nM、128 nM、32 nM、8 nM及2 nM使用。使用緩衝液注射(亦即0 nM)作為結合感測器圖譜之雙重參考。由於相互作用之性質(亦即快速結合/快速解離)，因此無需再生且使用20分鐘解離時間及後續緩衝液注射使結合感測器圖譜返回至基線。擬合資料與ProteOn分析軟體所固有之平衡模型，對各受體組及C1q結合使用全局R-max(亦即FcγR2a His及Arg多形現象在一起分析且FcγR3a Phe及Val多形現象在一起分析，而單獨分析C1q)。表27中提供之該等資料表明與無失能突變之相同

抗體相比，所述Fc失能突變有效削弱失能型抗體與Fc受體及C1q之結合。

20. CH50 EIA檢定中Fc功能之表徵

為研究抗體對C1q之親和力的此變化對抗體固定補體之能力的影響，使用CH50 Eq EIA套組。該等實驗表明H8L5在暴露於人類血清時能夠以濃度依賴性方式產生末端互補複合物(TCC)。當結合於重組肌肉抑制素時顯然能夠產生更多TCC且亦比Fc失能型等效物多(在存在或不存在肌肉抑制素下；圖24)。圖24A展示利用15%人類血清獲得之結果且圖24B展示利用25%人類血清獲得之結果。由此可斷定，若需要補體介導之免疫複合物清除機制，則H8L5應優於其Fc失能型等效物。

21：H8L5變異體之活體內功效

在第0天、第3天、第7天、第14天及第21天向體重為約24 g之11週齡雄性C.B-17 SCID小鼠腹膜內給與(給藥量為20 ml/kg)以下抗體：30 mg/kg hIgG1對照抗體；30 mg/kg 10B3；3、10、30及60 mg/kg 10B3H8L5或10B3H8L5 Fc失能。經4週每週2次向一些小鼠腹膜內給與30 mg/kg hIgG1，或1、3、10及30 mg/kg AMG745。使用WO 2007/067616 A2中公開之序列製備AMG745。第28天，解剖個別骨骼肌(TA、腓腸肌、四頭肌及EDL)且記錄其重量。圖28(A-D)展示處理對所研究肌肉之質量的影響。用10B3進行處理引起TA、四頭肌、EDL之質量顯著增加($p < 0.05$)及腓腸肌之不顯著增加($p > 0.05$)。用任一人類化抗

體(H8L5或H8L5-失能)進行處理對個別肌肉質量產生影響，其中一些劑量組中出現顯著增加。AMG745處理在除最低劑量1 mg/kg以外之所有劑量下均引起四頭肌、腓腸肌之質量顯著增加。

參見圖28。

22. 使用磁共振成像測定在肌肉反應之縱向研究中10B3之作用

此研究由3組動物組成，2個10B3處理組(3及30 mg/kg)及1個同型匹配對照組(30 mg/kg)。在初始3週時期內對動物進行5次給藥，且在第0天(第一次給藥)進行腓肌體積之MRI測定且在隨後12週內每週測定一次。與同型對照組相比，在給藥期期間觀測到經30 mg/kg 10B3處理之動物之腓肌體積及體重顯著增加；30 mg/kg劑量組及3 mg/kg劑量組與對照組之間的腓肌體積差異百分比分別為約15%及<5%(圖25)。然而，重要的是，整個歷時9週之洗淨期內大劑量組與對照組之間肌肉體積保持顯著差異($P<0.05$)，而停止給藥後4週時兩個組之體重之間不存在統計差異。亦在第3週(最後一次給藥)及第4週在3 mg/kg 10B3組中觀測到與對照組相比腓肌體積顯著增加(儘管隨後不存在)。應注意，整個研究過程中經低劑量10B3處理之動物與對照動物之間不存在體重之顯著差異。

23 SCID小鼠中H8L5之劑量反應研究

在8週齡SCID小鼠中評估一定劑量範圍之H8L5之效能以定義劑量反應。在第0天、第3天、第7天、第14天及第21

天藉由腹膜內注射向動物給與30 mg/kg 10B3或0.1、0.3、1.0、3.0或10.0 mg/kg H8L5。在第28天處死動物。切除肌肉及其他組織且進行稱重。在低劑量(0.1及0.3 mg/kg)下，H8L5顯著增加附睾脂肪墊質量($p < 0.05$)(圖 26A)。當劑量超過1 mg/kg時，H8L5引起個別骨骼肌質量之顯著增加(圖 26B)。與經1-10 mg/kg劑量之H8L5處理之對照組相比，藉由後肢坐骨神經之電刺激原位測得之峰強直力增加19%-24%($p < 0.05$)(圖 26C)。

此研究表明在此模型中H8L5為有效同化劑。基於所稱重之所有肌肉之質量顯著增加及血清中游離肌肉抑制素之中和，最低有效劑量為1 mg/kg。重要的是，藉由活體內收縮性量測，肌肉質量增加引起最大力產生之顯著增加，在1 mg/kg劑量下觀測到與對照動物相比得到顯著改良。

24. SCID小鼠中腹膜內給藥時H8L5之PK

在雌性C.B-17 SCID小鼠中在單次腹膜內(IP)注射0.1、1及10 mg/kg後測定H8L5之藥物動力學特性。根據以下收集時程在每一收集時間點時根據交替稀疏取樣設計自3隻動物收集血清樣品：2、6、12、24、48、72、192、336、504及672小時。使用Gyrola平台(生物素化肌肉抑制素捕捉試劑及Dylight Alexa標記之山羊抗人類IgG偵測抗體)針對H8L5對樣品進行分析。使用WinNonLin，4.1企業版藉由非隔室藥物動力學分析進行PK分析。

腹膜內投與SCID小鼠0.1、1.0及10 mg/kg之目標劑量後自血清濃度-時間資料獲得之H8L5之藥物動力學參數的概

述提供於表 29 中。

表 29. 腹膜內給與 0.1、1.0 及 10 mg/kg 之目標劑量後，
SCID 小鼠中 H8L5 之 PK 參數的概述

劑量(毫克/公斤)	AUC _{0-t} (小時×微克/毫升)	C _{max} (微克/毫升)	T _{max} (小時)	T _½ (小時)	CL _F (毫升/小時/公斤)	V _{z_F} (毫升/公斤)
0.1	87.6	0.727	6	184	0.787	209
1	2040	8.42	6	202	0.444	130
10	20500	95.4	6	292	0.384	162

序列

SEQ ID NO: 1 (CDRH1)

GYFMH

SEQ ID NO: 2 (CDRH2)

NIYPYNGVSNYNQRFKA

SEQ ID NO: 3 (CDRH3)

RYYYGTGPADWYFDV

SEQ ID NO: 4 (CDRL1)

KASQDINSYLS

SEQ ID NO: 5 (CDRL2)

RANRLVD

SEQ ID NO: 6 (CDRL3)

LQCDEFPLT

SEQ ID NO: 7 (小鼠單株 10B3 V_H)

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFMHWWKQSHGNILDWIGNIYPYNGVSNYN
QRFKAKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYYGTGPADWYFDVWGTTTVTV
SS

SEQ ID NO: 8 (小鼠單株 10B3 及 10B3 嵌合體 V_L)

DIKMTQSPSSMYASLRERVITITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRF
SGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQCDEFPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 9 (人工信號序列)

MGWSCILFLVATATGVHS

SEQ ID NO: 10 (V_H 之人類接受體框架)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNY
AQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARXXXXXXXXXXWGQGTMTVSS

SEQ ID NO: 11 (V_L 之人類接受體框架)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSKF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCXXXXXXXXXXFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 12 (人類化 V_H : H0)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYFMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPYNGVSN
YNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYGTGPADWYFDVWGQGT
LTVSS

SEQ ID NO: 13 (人類化 V_H : H1)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYFMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPYNGVSN
YNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYGTGPADWYFDVWGQGT
LTVSS

SEQ ID NO: 14 (人類化 V_H : H2)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYFMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPYNGVSN
YNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYGTGPADWYFDVWGQGT
LTVSS

SEQ ID NO: 15 (人類化 V_L : L0)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPSKF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQCDEFPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 16 (人類化 V_L : L1)

DIQMTQSPSSLSASVRDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPSKF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQCDEFPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 17 (人類化 V_L : L2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPSKF
SGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCLQCDEFPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 18 (人類化 V_L : L3)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPSKF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQCDEFPLTFGAGTKLEIK

SEQ ID NO: 19 (10B3嵌合體 V_H : N54D)

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFMHWWKQSHGNILDWIGNIYPYDGVSNN
QRFKAKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYYGTGPADWYFDWWGTGTLVTV
SS

SEQ ID NO: 20 (10B3嵌合體 V_H : N54Q)

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFMHWWKQSHGNILDWIGNIYPYQGVSNN
QRFKAKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYYGTGPADWYFDWWGTGTLVTV
SS

SEQ ID NO: 21 (10B3嵌合體 V_L : C91S)

DIKMTQSPSSMYASLRERVITITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRF
SGSGSGQDYSLTISLLEYEDMGIYYCLQSDEFPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 22 (人類化 V_H : H2 : N54D)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYFMHWRQAPGQGLEWMGNIYPYDGVSNN
YNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYFDWWGQGTL
VTVSS

SEQ ID NO: 23 (人類化 V_H : H2 : N54Q)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYFMHWRQAPGQGLEWMGNIYPYQGVSNN
YNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYFDWWGQGTL
VTVSS

SEQ ID NO: 24 (人類化 V_L : L2 : C91S)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPSKF
SGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCLQSDEFPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 25 (10B3嵌合體 V_H)

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFMHWWKQSHGNILDWIGNIYPYNGVSNN
QRFKAKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYYGTGPADWYFDWWGTGTLVTV
SS

SEQ ID NO: 26 (10B3嵌合體重鏈)

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFMHWWKQSHGNILDWIGNIYPYNGVSNN
QRFKAKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYYGTGPADWYFDWWGTGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGPP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST

YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 27 (10B3嵌合體輕鏈)

DIKMTQSPSSMYASLRERVITITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRF
SGSGSGQDYSLTISSELEYEDMGIYYCLQCDEFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 28 (人類化重鏈：H0)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYFMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPYNGVSN
YNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYFDVWGQGT
LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 29 (人類化重鏈：H1)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYFMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPYNGVSN
YNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYFDVWGQGT
LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 30 (人類化重鏈：H2)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYFMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPYNGVSN
YNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYFDVWGQGT
LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 31 (人類化輕鏈：L0)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPSKF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQCDEFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 32 (人類化輕鏈：L1)

DIQMTQSPSSLSASVRDRVITITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPSKF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQCDEFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 33 (人類化輕鏈：L2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPSKF
SGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCLQCDEFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 34 (人類化輕鏈：L3)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPSKF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQCDEFPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 35 (10B3嵌合體N54D重鏈)

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSTGYFMHWVKQSHGNILDWIGNIYPYDGVSNYN
QRFKAKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYYGTGPADWYFDVWGTGTLTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHTFPVAVLQS
SGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 36 (10B3嵌合體N54Q重鏈)

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSTGYFMHWVKQSHGNILDWIGNIYPYQGVSNYN
QRFKAKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYYGTGPADWYFDVWGTGTLTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHTFPVAVLQS
SGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 37 (10B3嵌合體C91S輕鏈)

DIKMTQSPSSMYASLRERVITICKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRF
SGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQSDEFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 38 (人類化重鏈：H2 N54D)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPYDGVSN
YNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYFDVWGQGL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 39 (人類化重鏈：H2 N54Q)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPYQGVSN
YNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYFDVWGQGL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 40 (人類化輕鏈：L2 C91S)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITICKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPSKF
SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQSDEFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 41 (10B3嵌合體重鏈，DNA序列)

ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCGA
GGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATAT
CCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACTTCATGCACTGGGTGAAGCAGAGC
CATGGCAATATCCTCGATTGGATTGGAAATATTTATCCTTACAATGGTGTTCCTAACTACA
ACCAGAGATTCAAGGCCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCTAGTACAGCCTAC
ATGGAGCTCCGCAGCCTTACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGACGCTAT
TACTACGGTACCGGACCGGCTGATTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACTGGGACACTAGT
GACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAG

CAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCC
 GAACCGGTGACCGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
 CCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCCA
 GCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACAC
 CAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCC
 TGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCCCAAGCCTA
 AGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAG
 CCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAT
 GCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGC
 TGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAAC
 AAGGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAG
 AGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTC
 CCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
 AACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCA
 GCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGT
 GTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCAGAAAGAGCCTGA
 GCCTGTCCCCTGGCAAGTGA

SEQ ID NO: 42 (10B3嵌合體輕鏈，DNA序列)

ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCGA
 CATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTACGAGAGAGAGTCACTAT
 CACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAAGCTGGTTCAGCAGAAACCAG
 GGAAATCTCCTAAGACCCTAATCTATCGTGCAAACAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAA
 GGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTACCATCAGCAGCCTGGAGTAT
 GAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTGTGATGAATTTCCGCTCACGTTCCGGTGCT
 GGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCC
 CCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTT
 CTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAA
 CAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC
 ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGA
 CCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGA

SEQ ID NO: 43 (人類化重鏈：H0，DNA序列)

ATGGGCTGGTCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGCACAGCC
 AGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAAG
 TGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCAACGGCTACTTCATGCACTGGGTGAGGCA
 GGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAACATCTACCCCTACAACGGCGTCAGC
 AACTACAACCAGAGGTTCAAGGCCAGGGTGAACATGACCACCGACACCTCTACCAGCAC
 CGCCTACATG
 GAACTGAGGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGGTACT
 ATTACGGCACCGGACCCGCCGATTGGTACTTCGACGTGTGGGGACAGGGGACACTAGT

GACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAG
CAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCC
GAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
CCGCCGTGCTG

CAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTG
GGCACCAGACCTACATCTGTAACTGAACCAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA
GAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCC
GAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCCTAAGCCTAAGGACACCCTGA
TGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCC
TGAGGTGAAG

TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTG
GCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATC
GAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC
CCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGG
CTTCTACCCC

AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAACAACTACAAGACCA
CCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGA
CAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTG
CACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAGTGA

SEQ ID NO: 44 (人類化重鏈：H1，DNA序列)

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGCACAGCC
AGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAAG
TGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGGCTACTTCATGCACTGGGTGAGGCA
GGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAACATCTACCCCTACAACGGCGTCAGC
AACTACAACCAGAGGTTCAAGGCCAGGGTGACCATGACCACCGACACCTCTACCAGCAC
CGCCTACATG

GAAGTGAAGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGGTACT
ATTACGGCACCGGACCCGCCGATTGGTACTTCGACGTGTGGGGAACGGGGACACTAGT
GACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAG
CAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCC
GAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
CCGCCGTGCTG

CAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTG
GGCACCAGACCTACATCTGTAACTGAACCAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA
GAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCC
GAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCCTAAGCCTAAGGACACCCTGA
TGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCC
TGAGGTGAAG

TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTG
GCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATC
GAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC
CCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGG
CTTCTACCCC
AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCA
CCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGA
CAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTACAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTG
CACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAGTGA

SEQ ID NO: 45 (人類化重鏈：H2，DNA序列)

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGGCTGCACAGCC
AGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAAG
TGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACTCCTTACCGGCTACTTCATGCACTGGGTGAGGCA
GGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAACATCTACCCCTACAACGGCGTCAGC
AACTACAACCAGAGGTTCAAGGCCAGGGTGACCATGACCACCGACACCTCTACCAGCAC
CGCCTACATG
GAACTGAGGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGGTACT
ATTACGGCACCGGACCCGCCGATTGGTACTTCGACGTGTGGGGACAGGGGACACTAGT
GACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCTGGCCCCCAGCAG
CAAGAGCACCGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCC
GAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
CCGCCGTGCTG
CAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTG
GGCACCCAGACCTACATCTGTAACTGAACCAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA
GAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCC
GAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCCTAAGCCTAAGGACACCCTGA
TGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCC
TGAGGTGAAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTG
GCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATC
GAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC
CCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGG
CTTCTACCCC
AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCA
CCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGA
CAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTACAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTG
CACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAGTGA

SEQ ID NO: 46 (人類化輕鏈：L0，DNA序列)

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGACACAGCG
ACATTCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCTCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGGGTGAC
CATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGCTGGTTCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCTCCCAAGAGCCTGATCTACAGGGCCAACAGGCTCGTGGACGGCGTGCC
TAGCAAGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGGCACAGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGC
AGCCCGAG

GACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGTGCGACGAGTTCCCCCTGACCTTCGGCCAGG
GCACCAAAGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCC
CAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTC
TACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACA
GCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCAC
CCTGACCCTG

AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCC
TGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGA

SEQ ID NO: 47 (人類化輕鏈：L1，DNA序列)

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGACACAGCG
ACATTCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCTCTGAGCGCCAGCGTGCGCGATAGGGTGAC
CATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGCTGGTTCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCTCCCAAGAGCCTGATCTACAGGGCCAACAGGCTCGTGGACGGCGTGCC
TAGCAAGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGGCACAGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGC
AGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGTGCGACGAGTTCCCCCTGACCTTC
GGCCAGGGCACCAAAGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCT
TCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAA
CAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGC
GGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGA
GCAGCACCTGACCCTG

AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCC
TGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGA

SEQ ID NO: 48 (人類化輕鏈：L2，DNA序列)

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGACACAGCG
ACATTCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCTCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGGGTGAC
CATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGCTGGTTCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCTCCCAAGAGCCTGATCTACAGGGCCAACAGGCTCGTGGACGGCGTGCC
TAGCAAGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGGCACAGACTACACCCTGACCATCAGCTCCCTG
CAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGTGCGACGAGTTCCCCCTGACCTT
CGGCCAGGGCACCAAAGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATC
TCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGA
ACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAG
CGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTG
AGCAGCACCTGACCCTG

AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCC
TGTCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGA

SEQ ID NO: 49 (人類化輕鏈：L3，DNA序列)

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGCACAGCG
ACATTCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCTCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGGGTGAC
CATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGCTGGTTCCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCTCCCAAGAGCCTGATCTACAGGGCCAACAGGCTCGTGACGGCGTGCC
TAGCAAGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGGCACAGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGC
AGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGTGCGACGAGTTCCCCCTGACCTTC
GGCGCGGGCACCAAACTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCAGCGTGTTTCATCT
TCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAA
CAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGC
GGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGA
GCAGCACCCCTGACCCTG
AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCC
TGTCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGA

SEQ ID NO: 50 (10B3嵌合體N54D重鏈，DNA序列)

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCGA
GGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATAT
CCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACTTCATGCACTGGGTGAAGCAGAGC
CATGGCAATATCCTCGATTGGATTGGAATATTTATCCTTACGATGGTGTTCCTAACTACA
ACCAGAGATTCAAGGCCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCTAGTACAGCCTAC
ATGGAGCTCCGCAGCCTTACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGACGCTAT
TACTACGGTACCGGACCGGCTGATTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACTGGGACACTAGT
GACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAG
CAAGAGCACCGCGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCC
GAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
CCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCA
GCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACAC
CAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCC
TGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCTCTGTTCCCCCCCCAAGCCTA
AGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAG
CCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAT
GCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGC
TGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAAC
AAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAG
AGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTC
CCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCA

GCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGT
GTTCAAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGA
GCCTGTCCCCTGGCAAGTGA

SEQ ID NO: 51 (10B3嵌合體N54Q重鏈，DNA序列)

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCGA
GGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATAT
CCTGCAAGGCTTCTGGTACTCATTCACTGGCTACTTCATGCACTGGGTGAAGCAGAGC
CATGGCAATATCCTCGATTGGATTGGAAATATTTATCCTTACCAAGGTGTTTCTAACTACA
ACCAGAGATTCAAGGCCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCTAGTACAGCCTAC
ATGGAGCTCCGCAGCCTTACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGACGCTAT
TACTACGGTACCGGACCGGCTGATTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACTGGGACACTAGT
GACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAG
CAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCC
GAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
CCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCA
GCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACAC
CAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCC
TGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCCTGTTCCCCCCCAAGCCTA
AGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAG
CCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAT
GCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGC
TGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAAC
AAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAG
AGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTC
CCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCA
GCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGT
GTTCAAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGA
GCCTGTCCCCTGGCAAGTGA

SEQ ID NO: 52 (10B3嵌合體C91S輕鏈，DNA序列)

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCGA
CATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTACGAGAGAGAGTCACTAT
CACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAAGCTGGTTCCAGCAGAAACCAG
GGAAATCTCCTAAGACCCTAATCTATCGTGCAAACAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAA
GGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTACCATCAGCAGCCTGGAGTAT
GAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTCTGATGAATTTCCGCTCACGTTCCGGTGCT
GGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCC
CCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTT
CTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAA
CAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC

ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGA
CCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGA

SEQ ID NO: 53 (人類化重鏈：H2 N54D，DNA序列)

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGACAGCC
AGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAAG
TGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTACTTCATGCACTGGGTGAGGCA
GGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAACATCTACCCCTACGACGGCGTCAGC
AACTACAACCAGAGGTTCAAGGCCAGGGTGACCATGACCACCGACACCTCTACCAGCAC
CGCCTACATG

GAAGTGAAGGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGGTACT
ATTACGGCACCGGACCCGCCGATTGGTACTTCGACGTGTGGGGACAGGGGACACTAGT
GACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAG
CAAGAGCACCGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCC
GAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCC
CCGCCGTGCTG

CAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTG
GGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA
GAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCC
GAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCCTAAGCCTAAGGACACCCTGA
TGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCC
TGAGGTGAAG

TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTG
GCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATC
GAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC
CCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGG
CTTCTACCCC

AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAAGACCA
CCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGA
CAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTGAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTG
CACAATCACTACCCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAGTGA

SEQ ID NO: 54 (人類化重鏈：H2 N54Q，DNA序列)

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGACAGCC
AGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAAG
TGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTACTTCATGCACTGGGTGAGGCA
GGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAACATCTACCCCTACCAGGGCGTCAGC
AACTACAACCAGAGGTTCAAGGCCAGGGTGACCATGACCACCGACACCTCTACCAGCAC
CGCCTACATG

GAAGTGAAGGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGGTACT
ATTACGGCACCGGACCCGCCGATTGGTACTTCGACGTGTGGGGACAGGGGACACTAGT

GACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAG
CAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCC
GAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
CCGCCGTGCTG

CAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTG
GGCAGCCAGACCTACATCTGTAACTGAACCAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA
GAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCC
GAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCCTAAGCCTAAGGACACCCTGA
TGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCC
TGAGGTGAAG

TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTG
GCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATC
GAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC
CCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGG
CTTCTACCCC

AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCA
CCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGA
CAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTG
CACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAGTGA

SEQ ID NO: 55 (人類化輕鏈：L2 C91S，DNA序列)

ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGACACAGCG
ACATTCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCTCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGGGTGAC
CATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGCTGGTTCCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCTCCCAAGAGCCTGATCTACAGGGCCAACAGGCTCGTGGACGGCGTGCC
TAGCAAGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGGCACAGACTACACCCTGACCATCAGCTCCCTG
CAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGAGCGACGAGTTCCCCCTGACCTT
CGGCCAGGGCACCAAACCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATC
TTCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGA
ACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAG
CGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTG
AGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTG
AGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTG
CTGA

SEQ ID NO: 56 (人工肌肉抑制素線性肽1)

DFGLDCDEHSTESRSG

SEQ ID NO: 57 (人工肌肉抑制素線性肽3)

SGSGDCDEHSTESRCRY

SEQ ID NO: 58 (人工肌肉抑制素線性肽5)

SGSGHSTESRCCRYPLTV

SEQ ID NO: 59 (人工肌肉抑制素線性肽7)

SGSGSRCCRYPLTVDFEA

SEQ ID NO: 60 (人工肌肉抑制素線性肽9)

SGSGRYPLTVDFEAFGWD

SEQ ID NO: 61 (人工肌肉抑制素線性肽11)

SGSGTVDFEAFGWDWIIA

SEQ ID NO: 62 (人工肌肉抑制素線性肽13)

SGSGEAFGWDWIIAPKRY

SEQ ID NO: 63 (人工肌肉抑制素線性肽15)

SGSGWDWIIAPKRYKANY

SEQ ID NO: 64 (人工肌肉抑制素線性肽17)

SGSGIAPKRYKANYCSGE

SEQ ID NO: 65 (人工肌肉抑制素線性肽19)

SGSGRYKANYCSGECEFV

SEQ ID NO: 66 (人工肌肉抑制素線性肽21)

SGSGNYCSGECEFVFLQK

SEQ ID NO: 67 (人工肌肉抑制素線性肽23)

SGSGGECEFVFLQKYPHT

SEQ ID NO: 68 (人工肌肉抑制素線性肽25)

SGSGFVFLQKYPHTLVH

SEQ ID NO: 69 (人工肌肉抑制素線性肽27)

SGSGQKYPHTLVHQANP

SEQ ID NO: 70 (人工肌肉抑制素線性肽29)

SGSGHThLVHQANPRGSA

SEQ ID NO: 71 (人工肌肉抑制素線性肽31)

SGSGVHQANPRGSAGPCC

SEQ ID NO: 72 (人工肌肉抑制素線性肽33)

SGSGNPRGSAGPCCTPTK

SEQ ID NO: 73 (人工肌肉抑制素線性肽35)

SGSGSAGPCCTPTKMSPi

SEQ ID NO: 74 (人工肌肉抑制素線性肽37)

SGSGCCTPTKMSPINMLY

SEQ ID NO: 75 (人工肌肉抑制素線性肽39)

SGSGTKMSPINMLYFNGK

SEQ ID NO: 76 (人工肌肉抑制素線性肽41)

SGSGPINMLYFNGKEQII

SEQ ID NO: 77 (人工肌肉抑制素線性肽43)

SGSGLYFNGKEQIIYGKI

SEQ ID NO: 78 (人工肌肉抑制素線性肽45)

SGSGGKEQIIYGKIPAMV

SEQ ID NO: 79 (人工肌肉抑制素線性肽47)

SGSGIIYGKIPAMVVDRc

SEQ ID NO: 80 (人工肌肉抑制素線性肽49)

SGSGGKIPAMVVDRCGCS

SEQ ID NO: 81 (人工肌肉抑制素線性肽)

CCTPTKMSPINMLY

SEQ ID NO: 82 (CDRH3 變異體 Y96L)

RLYYGTGPADWYFDV

SEQ ID NO: 83 (CDRH3 變異體 G99D)

RYYYDTGPADWYFDV

SEQ ID NO: 84 (CDRH3 變異體 G99S)

RYYYSTGPADWYFDV

SEQ ID NO: 85 (CDRH3 變異體 G100A_K)

RYYYGTPADWYFDV

SEQ ID NO: 86 (CDRH3 變異體 P100B_F)

RYYYGTGFADWYFDV

SEQ ID NO: 87 (CDRH3 變異體 P100B_I)

RYYYGTGIADWYFDV

SEQ ID NO: 88 (CDRH3 變異體 W100E_F)

RYYYGTGPADFYFDV

SEQ ID NO: 89 (CDRH3 變異體 F100G_N)

RYYYGTGPADWYNDV

SEQ ID NO: 90 (CDRH3 變異體 F100G_Y)

RYYYGTGPADWYYDV

SEQ ID NO: 91 (CDRH3 變異體 V102N)

RYYYGTGPADWYFDN

SEQ ID NO: 92 (CDRH3 變異體 V102S)

RYYYGTGPADWYFDS

SEQ ID NO: 93 (CDRH2 變異體 G55D)

NIYPYNDVSNYNQRFKA

SEQ ID NO: 94 (CDRH2變異體 G55L)

NIYPYNLVSNNYQRFKA

SEQ ID NO: 95 (CDRH2變異體 G55S)

NIYPYNSVSNYQRFKA

SEQ ID NO: 96 (CDRH2變異體 G55T)

NIYPYNTVSNYQRFKA

SEQ ID NO: 97 (CDRH2變異體 G55V)

NIYPYNVSNYQRFKA

SEQ ID NO: 98 (人類化重鏈：H2_F100G_Y Fc失能)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPYNGVSN
YNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYYDWWGQGT
LVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELAG
APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
T KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 99 (人類化重鏈：H2_G55S-F100G_Y Fc失能)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPYNSVSN
YNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYYDWWGQGT
LVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELAG
APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
T KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 100 (V_L之人類接受體框架)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSKF
SGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYNSYPXXXXXXXXXXFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 101 (HexaHisGB1Tev/(D76A)小鼠肌肉抑制素
聚合蛋白質)

MAAGTAVGAWVLVLSLWGAVVGTHHHHHHDYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQ
YANDNGVDGEWTYDDATKTFTVTEGSENLYFQEGSEREENVEKEGLCNACAWRQNTRY
RIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDAIRQLLPRAPPLRELIDQYDVQRADSSDGSLEDDDYHATTE
TIITMPTESDFLMQADGKPKCCFFKFSSKIQYNKVKAQLWIYLRPVKTPTTVFVQILRLIKPM
KDGTRYTGIRSLKLDMSPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHD LAVTFPG
PGEDGLNPFLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRY
KANYCSGECEFVFLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPA
MVVDRCGCS

SEQ ID NO: 102 (GB1 標 籤)

DTYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATKTFTVTE

SEQ ID NO: 103 (小鼠肌肉抑制素聚合蛋白質(D76A))

EGSEREENVEKEGLCNACAWRQNTRYRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDAIRQLLPRAPPLR
ELIDQYDVQRADSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQADGKPKCCFFKFSSKIQYNKV
VKAQLWIYLRPVKTPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMSPGTGIWQSIDVKTVLQ
WLKQPESNLGIEIKALDENGHD LAVTFPGPGEDGLNPFLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHS
TESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQKYPHTHLVHQANPRGSAG
PCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS

SEQ ID NO: 104 (成熟肌肉抑制素)

DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQKYPHTHLV
HQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS

SEQ ID NO: 105 (弗林蛋白酶表現構築體)

MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADAQGQKVFTNTWAVRIPGGPAVANSVARKHGFLNLGQIF
GDYYHFWHRGVTKRSLSPHRPRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRTKRVDYQEPTDPKFPQ
QWYLSGVTQRDLNVKAAWAQGYTGHGIVVSILDDGIEKNHPDLAGNYDPGASFDVNDQDP
DPQPRYTQMNDNRHGTRCAGEVA AVANNGVCGVG VAYNARIGGVRMLDGEVTD AVEARS
LGLNPNHIHIYSASWGPEDDGKTVDGPARLAEAAFFRGVSQGRGGLGSIFVWASNGGRE
HDSCNCDGYTNSIYTLSSSATQFGNVPWYSEACSSTLATTYSSGNQNEKQIVTTDLRQKCT
ESHTGTSASAPLAAGIIALTLEANKNL TWRDMQHLVVQTSKPAHLNANDWATNGVGRKVSH
SYGYGLLDAGAMVALAQNWTTVAPQRKCIIDILTEPKDIGKRLEVRKTVTACLGEPNHITRLE
HAQARLTLSYNRRGDLAIHLVSPMGTRSTLLAARPHDYSADGFNDWAFMTTHSWDEDPG
EWWLEIENTSEANNYGTLT KFTLVLYGTAP EGLPVPP ESSGCKLTSSQACENLYFQG

SEQ ID NO: 106 (HexaHisGB1Tev/人類肌肉抑制素前肽)

MAAGTAVGAWVLVLSLWGAVVGTHHHHHHDYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQ
YANDNGVDGEWTYDDATKTFTVTEGSENLYFQENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSR
IEAIKIQILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETII
TMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKFSSKIQYNKVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKD

GTRYTGIRSLKLDMPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHD LAVTFPGPG
EDGLNPFLEVKVTDTPKRSRR

SEQ ID NO: 107 (Tev蛋白酶表現構築體)

MHGHHHHHHGESSLFKGRDYNPISSTICHLTNESDGHSTSLYGIGFGPFIITNKHLFRRNNGT
LLVQSLHGVFKVKNNTTLQQHLIDGRDMIIRMPKDFPPFPQKLKFREPQREERICLVTTNFQT
KSMSSMVSDTSCTFPSSDGIFWKHWIQTGDGQC
GSPLVSTRDGFIVGIHSASNFTNTNNYFTSVPKNFMELLTNQEAQQWVSGWRLNADSVLWG
GHKVF MVKPEEPFQPVKEATQLMNE

SEQ ID NO: 108 (人類肌肉抑制素前肽)

ENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLR
ELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKFSSKIQYNKV
VKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMPGTGIWQSIDVKTVLQ
WLKQPESNLGIEIKALDENGHD LAVTFPGPGEDGLNPFLEVKVTDTPKRSRR

SEQ ID NO: 109 (CDRL3變異體C91S)

LQSDEFPLT

SEQ ID NO: 110 (CDRH2變異體F100G_S)

RYYYGTGPADWYSDV

SEQ ID NO: 111 (BMP-1表現構築體)

MPGVARLPLLLGLLLLPRPGRPLDLADYTYDLAEEDDSEPLNYKDPCKAAAF LGDIALDEEDL
RAFQVQQAVDLRRHTARKSSIKA AVPGNTSTPSCQSTNGQPQRGACGRWRGRSRSRRAA
TSRPERWVPDGVIPFVIGGNFTGSQRAVFRQAMRHWKHTCVTFLERTDEDSYIVFTYRPC
GCCSYVGRRGGGPQAISIGKNCDKFGI VHELGHVVGFWHEHTRPDRDRHVSIVRENIQPG
QEYNFLKMEPQEVESLGETYDFDSIMHYARNTFSRGIFLDTIVPKYEVNGVKPPIGQRTRLSK
GDIAQARKLYKCPACGETLQDSTGNFSSPEYPNGYSAHMHCVWRISVTPGEKILNFTSLDL
RSRLCWYDYVEVRDGFWRKAPLRGRFCGSKLPEPIVSTDSRLWVEFRSSSNWVGKFFAV
YEAICGGDVKKDYGHIQSPNYPDDYRPSKVCIWRIQVSEGFHVGLTFQSFEIERHDS CAYDY
LEVRDGHSESSTLIGRYCGYEKPDDIKSTSSRLWLK FVSDGSINKAGFAVNFFKEVDECSR
NRGGCEQRCLNTLGSYKCSCDPGYELAPDKRRCEAACGGFLT KLNGSITSPGWPKEYPPN
KNCIWQLVAPTQYRISLQFDFETEGNDVCKYDFVEVRSGLTADSKLHGKFCGSEKPEVITS
QYNNMRVEFKSDNTVSKKGFKAHFFSEKRPALQPPRGRPHQLKFRVQKRN RTPQENLYFQ
GWSHPQFEKGTDTYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEW TYDDATK
TFTVTE

SEQ ID NO: 112 (人類化V_H: H3)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWIGNIYPYNGVSNY
NQRFKARATLTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYYDVWGQGTLV
TVSS

SEQ ID NO: 113 (人類化 V_H : H4)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPYNGVSN
YNQRFKARVTMTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYYDWWGQGT
LTVSS

SEQ ID NO: 114 (人類化 V_H : H5)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWIGNIYPYNGVSNY
NQRFKARATLTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYYDWWGQGT
LTVSS

SEQ ID NO: 115 (人類化 V_H : H6)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWIGNIYPYNGVSNY
NQRFKAKATLTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYYDWWGQGT
LTVSS

SEQ ID NO: 116 (人類化 V_L : L4)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPSKF
SGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLQSDEFPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 117 (人類化 V_L : L5)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLVDGVPSKF
SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQSDEFPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 118 (人類化 V_L : L6)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLVDGVPSKF
SGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLQSDEFPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 119 (人類化 V_H : H7)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPYNSVSN
YNQRFKARVTMTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYYDWWGQGT
LTVSS

SEQ ID NO: 120 (人類化 V_H : H8)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWIGNIYPYNSVSNY
NQRFKARATLTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYYDWWGQGT
LTVSS

SEQ ID NO: 121 (人類化 V_H : H9)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWIGNIYPYNSVSNY
NQRFKAKATLTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYYDWWGQGT
LTVSS

SEQ ID NO: 122 (人類化HC：H7 Fc失能，DNA序列)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAA
GTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTACTTCATGCACTGGGTGAGGC
AGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAACATCTACCCCTACAACAGCGTCAG
CAACTACAACCAGAGGTTCAAGGCCAGGGTGACCATGACCGTGGACAAGTCTACCAGCA
CCGCCTACATGGAAGTGAAGGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGC
CAGGAGGTACTATTACGGCACCGGACCCGCGGATTGGTACTATGACGTGTGGGGACAG
GGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGG
CCCCCAGCAGCAAGAGCACCGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGG
ACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGT
GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTG
ACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGC
CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACAC
CTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGGCCGGAGCCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCC
CCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGG
TGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTG
GTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTA
AGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGG
CCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAG
AACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGA
CAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAG
CAGGGCAACGTGTTCACTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCA
GAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 123 (人類化HC：H7 Fc失能)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPYNSVSN
YNQRFKARVTMTVDKSTSTAYMELRSLRSDDAVYYCARRYYYGTGPADWYYDWWGQGL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELAG
APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHENHNTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 124 (人類化HC：H8 Fc失能，DNA序列)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAA
GTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTACTTCATGCACTGGGTGAGGC
AGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACATCTACCCCTACAACAGCGTCAG
CAACTACAACCAGAGGTTCAAGGCCAGGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCTACCAGC

ACCGCCTACATGGAAGTGAAGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCG
 CCAGGAGGTACTATTACGGCACCGGACCCGCCGATTGGTACTATGACGTGTGGGGACA
 GGGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTG
 GCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAG
 GACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCG
 TGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGT
 GACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAG
 CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACA
 CCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGGCCGGAGCCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCC
 CCCCAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTG
 GTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
 AGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGT
 GGTGTCCGTGCTGACCGTGTCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGT
 AAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGG
 GCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAA
 GAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTG
 GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGG
 ACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCA
 GCAGGGCAACGTGTTGAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACC
 CAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 125 (人類化HC：H8 Fc失能)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWIGNIYPYNSVSNY
 NQRFKARATLTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYYDVWGQGLV
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELAGA
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHENLHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 126 (人類化HC：H9 Fc失能，DNA序列)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAA
 ATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACTCCTTACCGGCTACTTCATGCACTGGGTGAGGCA
 GGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACATCTACCCCTACAACAGCGTCAGC
 AACTACAACCAGAGGTTCAAGGCCAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCTACCAGCAC
 CGCCTACATGGAAGTGAAGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC
 AGGAGGTACTATTACGGCACCGGACCCGCCGATTGGTACTATGACGTGTGGGGACAGG
 GGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGC
 CCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGA
 CTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTG
 CACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGA

CCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCC
 CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACC
 TGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGGCCGGAGCCCCAGCGTGTTCCCTGTTCCCCC
 CCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGT
 GGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAG
 GTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGG
 TGTCCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTA
 GGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC
 CAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGA
 ACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA
 GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGAC
 AGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGC
 AGGGCAACGTGTTCACTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAG
 AAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 127 (人類化HC：H9 Fc失能)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTGYFMHWVRQAPGQGLEWIGNIYPYNSVSNY
 NQRFKAKATLTVDKSTSTAYMELRSLRSDDAVYYCARRYYYGTGPADWYYDWWGQGLTV
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELAGA
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 128 (人類化HC：H3，DNA序列)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGCCAGCGTGAAA
 GTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACTCCTTACCGGCTACTTCATGCACTGGGTGAGGC
 AGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACATCTACCCCTACAACGGCGTCAG
 CAACTACAACCAGAGGTTCAAGGCCAGGGCCACCCTGACCACCGACACCTCTACCAGCA
 CCGCCTACATGGAAGTGAAGGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGC
 CAGGAGGTACTATTACGGCACCGGACCCGCCGATTGGTACTATGACGTGTGGGGACAG
 GGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGG
 CCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGG
 ACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGT
 GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTG
 ACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGC
 CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACAC
 CTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCCTGTTCCCC
 CCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGG
 TGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTG

GTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTA
 AGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGG
 CCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAG
 AACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGA
 CAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAG
 CAGGGCAACGTGTTTCACTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCA
 GAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 129 (人類化HC：H4，DNA序列)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAA
 GTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTACTTCATGCACTGGGTGAGGC
 AGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAACATCTACCCCTACAACGGCGTCAG
 CAACTACAACCAGAGGTTCAAGGCCAGGGTGACCATGACCGTGGACAAGTCTACCAGCA
 CCGCCTACATGGAAGTGAAGGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGC
 CAGGAGGTACTATTACGGCACCCGACCCGCCGATTGGTACTATGACGTGTGGGGACAG
 GGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGG
 CCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGG
 ACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGT
 GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGT
 ACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACTGAACCACAAGC
 CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACAC
 CTGCCCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCTCTGTTCCCC
 CCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGG
 TGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTG
 GTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTA
 AGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGG
 CCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAG
 AACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGA
 CAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAG
 CAGGGCAACGTGTTTCACTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCA
 GAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 130 (人類化HC：H5，DNA序列)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAA
 GTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTACTTCATGCACTGGGTGAGGC
 AGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACATCTACCCCTACAACGGCGTCAG
 CAACTACAACCAGAGGTTCAAGGCCAGGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCTACCAGC
 ACCGCCTACATGGAAGTGAAGGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCG

CCAGGAGGTACTATTACGGCACCGGACCCGCCGATTGGTACTATGACGTGTGGGGACA
GGGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTG
GCCCCCAGCAGCAAGAGCACCGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAG
GACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCG
TGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGT
GACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAG
CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACA
CCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCC
CCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTG
GTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
AGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGT
GGTGTCCGTGCTGACCGTGTCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGT
AAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGG
GCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAA
GAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGG
ACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCA
GCAGGGCAACGTGTTCACTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACC
CAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 131(人類化HC：H6，DNA序列)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAA
ATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTACTTCATGCACTGGGTGAGGCA
GGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACATCTACCCCTACAACGGCGTCAGC
AACTACAACCAGAGGTTCAAGGCCAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCTACCAGCAC
CGCCTACATGGAAGTGAAGGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC
AGGAGGTACTATTACGGCACCGGACCCGCCGATTGGTACTATGACGTGTGGGGACAGG
GGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTGCTGGC
CCCCAGCAGCAAGAGCACCGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGA
CTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTG
CACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACC
TGCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCC
CCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGT
GGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGG
TGTCCGTGCTGACCGTGTCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTA
GGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC
CAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGA
ACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA

GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGAC
AGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGC
AGGGCAACGTGTTCACTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAG
AAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 132 (人類化LC：L4，DNA序列)

GACATTCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCTCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGGGTGA
CCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGCTGGTTCAGCAGAAG
CCCGGCAAGGCTCCCAAGAGCCTGATCTACAGGGCCAACAGGCTCGTGGACGGCGTGC
CTAGCAAGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGGCCAGGACTACACCCTGACCATCAGCTCCCT
GCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGAGCGACGAGTTCCCCCTGACC
TTCGGCCAGGGCACCAAACTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCA
TCTTCCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCT
GAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAG
AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGC
CTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCT
GTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGA
GTGC

SEQ ID NO: 133(人類化LC：L5，DNA序列)

GACATTCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCTCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGGGTGA
CCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGCTGGTTCAGCAGAAG
CCCGGCAAGGCTCCCAAGACCCTGATCTACAGGGCCAACAGGCTCGTGGACGGCGTGC
CTAGCAAGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGGCACAGACTACACCCTGACCATCAGCTCCCT
GCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGAGCGACGAGTTCCCCCTGACC
TTCGGCCAGGGCACCAAACTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCA
TCTTCCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCT
GAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAG
AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGC
CTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCT
GTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGA
GTGC

SEQ ID NO: 134 (人類化LC：L6，DNA序列)

GACATTCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCTCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGGGTGA
CCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTACCTGAGCTGGTTCAGCAGAAG
CCCGGCAAGGCTCCCAAGACCCTGATCTACAGGGCCAACAGGCTCGTGGACGGCGTGC
CTAGCAAGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGGCCAGGACTACACCCTGACCATCAGCTCCCT
GCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGAGCGACGAGTTCCCCCTGACC
TTCGGCCAGGGCACCAAACTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCA
TCTTCCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCT
GAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAG

AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGC
CTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCT
GTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGA
GTGC

SEQ ID NO: 135 (人類化HC：H7，DNA序列)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCCGGCGCCAGCGTGAAA
GTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTACTTCATGCACTGGGTGAGGC
AGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAACATCTACCCCTACAACAGCGTCAG
CAACTACAACCAGAGGTTCAAGGCCAGGGTGACCATGACCGTGGACAAGTCTACCAGCA
CCGCCTACATGGAAGTGAAGGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGC
CAGGAGGTACTATTACGGCACCGGACCCGCCGATTGGTACTATGACGTGTGGGGACAG
GGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGG
CCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGG
ACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGT
GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTG
ACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACTGAACCAAGC
CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACAC
CTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCTGTTCCTG
CCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGG
TGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTG
GTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTA
AGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGG
CCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAG
AACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGA
CAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAG
CAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCA
GAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 136 (人類化HC：H8，DNA序列)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCCGGCGCCAGCGTGAAA
GTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTACTTCATGCACTGGGTGAGGC
AGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACATCTACCCCTACAACAGCGTCAG
CAACTACAACCAGAGGTTCAAGGCCAGGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCTACCAGC
ACCGCCTACATGGAAGTGAAGGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCG
CCAGGAGGTACTATTACGGCACCGGACCCGCCGATTGGTACTATGACGTGTGGGGACA
GGGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTG
GCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAG
GACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCG
TGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGT

GACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAG
CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACA
CCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCTGTTCCTCC
CCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTG
GTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
AGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGT
GGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGT
AAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGG
GCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAA
GAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGG
ACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCA
GCAGGGCAACGTGTTGAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACC
CAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 137 (人類化HC：H9，DNA序列)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAA
ATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACTCCTTACCGGCTACTTCATGCACTGGGTGAGGCA
GGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACATCTACCCCTACAACAGCGTCAGC
AACTACAACCAGAGGTTCAAGGCCAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCTACCAGCAC
CGCCTACATGGAAGTGAAGGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC
AGGAGGTACTATTACGGCACCGGACCCGCCGATTGGTACTATGACGTGTGGGGACAGG
GGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGC
CCCCAGCAGCAAGAGCACCGCGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGA
CTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTG
CACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACC
TGCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCTGTTCCTCC
CCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGT
GGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGG
TGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAA
GGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC
CAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGA
ACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGAC
AGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGC
AGGGCAACGTGTTGAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAG
AAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 138 (人類化重鏈：H3)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWIGNIYPYNGVSNY
 NQRFKARATLTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYYDWWGQGLTV
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 139 (人類化重鏈：H4)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPYNGVSN
 YNQRFKARVTMTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYYDWWGQGLT
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 140 (人類化重鏈：H5)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWIGNIYPYNGVSNY
 NQRFKARATLTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYYDWWGQGLTV
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 141 (人類化重鏈：H6)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWIGNIYPYNGVSNY
 NQRFKAKATLTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYYDWWGQGLTV
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 142 (人類化重鏈：H7)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWMGNIYPYNSVSN
 YNQRFKARVTMTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYYDVWGQGT
 LVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 143 (人類化重鏈：H8)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWIGNIYPYNSVSNY
 NQRFKARATLTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYYDVWGQGT
 LVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 144 (人類化重鏈：H9)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWIGNIYPYNSVSNY
 NQRFKAKATLTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRYYYGTGPADWYYDVWGQGT
 LVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 145 (人類化輕鏈：L4)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPSKF
 SGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLQSDEFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
 KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADY
 EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 146 (人類化輕鏈：L5)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLVDGVPSKF
 SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQSDEFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
 SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 147 (人類化輕鏈：L6)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLVDGVPSKF
SGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLQSDEFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【圖式簡單說明】

圖1展示經純化成熟肌肉抑制素之LC/MS分析：預測分子量(MW)為12406.25 Da，實測MW為24793.98 Da，此指示具有9對二硫鍵之二聚分子，與具有9個半胱氨酸殘基之預測肌肉抑制素單體相匹配。

圖2展示使用MOPS緩衝液之4-12% NuPAGE Bis-Tris凝膠。泳道1：經DTT還原之成熟肌肉抑制素。泳道2：未經DTT還原之成熟肌肉抑制素。泳道3：標記12蛋白質標準物。

圖3A展示劑量反應曲線，其顯示肌肉抑制素(R&D Systems及內部肌肉抑制素物質)在A204細胞中以劑量依賴性方式誘導細胞信號傳導之活化，從而在6小時後引起螢光素酶表現。圖3B展示劑量反應曲線，其顯示如在不同日期所獲得之資料所表示，在不同測試時刻，內部肌肉抑制素在A204細胞中以劑量依賴性方式誘導細胞信號傳導之活化，從而引起螢光素酶表現。

圖4展示藉由ELISA所測定的10B3與成熟肌肉抑制素、潛伏複合物及自潛伏複合物釋放之成熟肌肉抑制素的結合。

圖5展示10B3及10B3嵌合體對肌肉抑制素與ActRIIb之結合的抑制。

圖6展示10B3及10B3嵌合體抑制肌肉抑制素誘導的細胞

信號傳導之活化，從而降低A204細胞中之螢光素酶表現。

圖 7 展示小鼠中 10B3 對體重(A)及瘦質量(B)之活體內影響。

圖 8 展示在小鼠之腓腸肌(A)、四頭肌(B)及伸趾長肌(EDL)(C)中 10B3 對肌肉質量之活體內影響。

圖 9 展示在 EDL 中 10B3 對肌肉收縮性之離體影響，展示強直力(A)及根據肌肉質量校正之強直力(B)。

圖 10 展示在肌肉抑制素捕捉 ELISA 中，11 種經親和純化之 CDRH3 變異體；以及 H2L2-C91S、H0L0、HcLc(10B3 嵌合體)及陰性對照單株抗體之結合活性。

圖 11 展示在肌肉抑制素結合 ELISA 中，5 種經親和純化之 CDRH2 變異體；以及用作對照抗體之 H2L2-C91S_F100G_Y、H2L2-C91S、HcLc(10B3 嵌合體)及陰性對照單株抗體之結合活性。

圖 12 展示第 0 天至第 25 天 10B3 及對照抗體處理對具有 C-26 腫瘤之小鼠之體重的影響。

圖 13 展示 10B3 及對照抗體處理對具有 C-26 腫瘤之小鼠之總體脂肪(A)、附睾脂肪墊(B)及瘦質量(C)的影響。

圖 14 展示 10B3 及對照抗體處理對下肢肌力之影響，其由在對具有 C-26 腫瘤之小鼠之大腿中部的坐骨神經進行電刺激時的收縮力量測。

圖 15 展示在假手術及腱切除術手術中，10B3 及對照抗體處理對小鼠脛骨前肌(TA)之影響。

圖 16 展示第 0 天至第 42 天類固醇誘導之處理程序期間的

體重變化。第29天開始對經10B3或對照抗體預先處理之小鼠進行地塞米松(Dexamethasone)處理。

圖17展示在小鼠中10B3或對照抗體預先處理對地塞米松誘導之體脂肪積累之影響。

圖18展示在經對照抗體處理之組中之小鼠中坐骨神經擠壓對肌肉質量之影響(mIgG2a+假手術；及mIgG2a+坐骨神經(SN)擠壓)。

圖19展示在假手術腿(A)及坐骨神經擠壓腿(B)中10B3及對照抗體處理對骨骼肌質量之影響。

圖20展示可變重鏈H0 (SEQ ID NO: 12)之Kabat編號。

圖21展示可變輕鏈L0 (SEQ ID NO: 15)之Kabat編號。

圖22展示H8L5與一組生長因子之結合以確定與肌肉抑制素結合之特異性之圖示。

圖23使用報導基因檢定比較A204細胞之肌肉抑制素與活化素B(ActivinB)刺激之中和。

圖24展示利用15%人類血清(A)及25%人類血清(B)獲得之CH50 Eq EIA結果。

圖25藉由MRI測得的相對於基線之總下肢體積變化百分比。第1組以30 mg/kg IgG2a同型對照處理，第2組以3 mg/kg 10B3處理且第3組以30 mg/kg 10B3處理(根據先前描述之時程藉由腹膜內注射投與)。箭頭指示劑量投與。符號表示以下比較之統計顯著性($P < 0.05$)：第1組對比第3組，第1組對比第2組，及第2組對比第3組。

圖26顯示(A)處理對附睾脂肪墊質量之影響。誤差條表

示SEM。(*)指示與對照之顯著差異($P < 0.05$)。(B)不同劑量之hIgG1對照、10B3.C5及H8L5對腓腸肌質量之影響，在研究終止時稱重，及(C)所測試之組的平均峰值力產生之圖示。

圖 27 以 0.1、1.0 及 10 mg/kg 之目標劑量腹膜內投與後 H8L5 在 SCID 小鼠中之血清當量濃度。

圖 28 圖 A-D 分別表示 10B3、H8L5、H8L5 失能及 AMG745 與 IgG1 對照之顯著 ($P < 0.05$) 差異。

圖 29 在研究 (A) 脛骨前肌 (B) 四頭肌 (C) 伸趾長肌及 (D) 腓腸肌肌肉質量之第 0、3、7、14 及 21 天藉由腹膜內注射投與 SCID 小鼠之不同劑量之 BPC1036 及 BPC1049 在第 28 天處死時的作用。

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：100119304

A61K 39/00(2006.01)

※ 申請日：100.6.1

※IPC 分類：C07K: 16/22 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

人類化抗原結合蛋白

HUMANISED ANTIGEN BINDING PROTEINS

二、中文發明摘要：

本發明係關於結合肌肉抑制素(myostatin)人類化抗原結合蛋白(如抗體)編碼該等抗原結合蛋白之聚核苷酸、包含該等抗原結合蛋白之醫藥組合物及製造方法。本發明亦關於該等人類化抗原結合蛋白之用途，其係用於治療或預防與肌肉質量、肌力及肌肉功能降低之任一者或組合相關之疾病。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to humanised antigen binding proteins, such as antibodies, which bind to myostatin, polynucleotides encoding such antigen binding proteins, pharmaceutical compositions comprising said antigen binding proteins and methods of manufacture. The present invention also concerns the use of such humanised antigen binding proteins in the treatment or prophylaxis of diseases associated with any one or a combination of decreased muscle mass, muscle strength and muscle function.

七、申請專利範圍：

1. 一種人類化抗原結合蛋白，其特異性結合肌肉抑制素 (Myostatin) 且在溶液相親和力檢定中具有強於 150 pM 之親和力，且其中該抗原結合蛋白具有至少 100 小時之 pK。
2. 如請求項 1 之人類化抗原結合蛋白，其中該抗原結合蛋白包含重鏈可變區，其中該重鏈可變區包含 SEQ ID NO: 90 之 CDRH3；或該 CDRH3 之變異體；其中該抗原結合蛋白進一步包含絲胺酸殘基在 Kabat 28 位；及以下殘基之至少一者，或組合，或全部：Kabat 66 位之離胺酸殘基；Kabat 67 位之丙胺酸殘基；Kabat 71 位之纈胺酸殘基；及 Kabat 73 位之離胺酸殘基。
3. 如請求項 2 之人類化抗原結合蛋白，其進一步包含 SEQ ID NO: 2 之 CDRH2；或該 CDRH2 之變異體。
4. 如請求項 2 或 3 之人類化抗原結合蛋白，其進一步包含 CDRH1 (SEQ ID NO: 1) 或該 CDRH1 之變異體。
5. 如請求項 1 之人類化抗原結合蛋白，其中該抗原結合蛋白包含輕鏈可變區，其中該輕鏈可變區包含以下 CDR 序列之一者、兩者或三者：
 - (a) SEQ ID NO: 4 之 CDRL1 或該 CDRL1 之變異體；
 - (b) SEQ ID NO: 5 之 CDRL2 或該 CDRL2 之變異體；及
 - (c) SEQ ID NO: 109 之 CDRL3 或該 CDRL3 之變異體；其中該抗原結合蛋白進一步包含 Kabat 71 位之酪胺酸殘基；及以下殘基之至少一者或兩者：Kabat 46 位之蘇

胺酸殘基；及Kabat 69位之麩醯胺酸殘基。

6. 如請求項1之人類化抗原結合蛋白，其中該抗原結合蛋白包含：

(a) 重鏈序列，其包含SEQ ID NO: 90之CDRH3；或該CDRH3之變異體；其中該抗原結合蛋白進一步包含Kabat 28位之絲胺酸殘基；及以下殘基之至少一者或組合或全部：Kabat 66位之離胺酸殘基；Kabat 67位之丙胺酸殘基；Kabat 71位之纈胺酸殘基；及Kabat 73位之離胺酸殘基；及

視情況以下序列之一或兩者：SEQ ID NO: 2之CDRH2或該CDRH2之變異體；及SEQ ID NO: 1之CDRH1或該CDRH1之變異體；及

(b) 輕鏈序列，其包含以下CDR序列之一者、兩者或三者：SEQ ID NO: 4之CDRL1或該CDRL1之變異體；SEQ ID NO: 5之CDRL2或該CDRL2之變異體；及SEQ ID NO: 109之CDRL3或該CDRL3之變異體；

其中該抗原結合蛋白進一步包含Kabat 71位之酪胺酸殘基；及以下殘基之至少一者或兩者：Kabat 46位之蘇胺酸殘基；及Kabat 69位之麩醯胺酸殘基。

7. 如請求項2、3及6中任一項之人類化抗原結合蛋白，其中該變異型CDRH3 (i)為SEQ ID NO: 3、82-89、91或92之任一者；或(ii)含有任一以下Kabat取代：V102Y、V102H、V102I、V102D或V102G。

8. 如請求項3之人類化抗原結合蛋白，其中該變異型CDR

H2 (i)為SEQ ID NO: 93-97或110之任一者；或(ii)含有任一以下Kabat取代：N50R、N50E、N50W、N50Y、N50G、N50Q、N50V、N50L、N50K、N50A、I51L、I51V、I51T、I51S、I51N、Y52D、Y52L、Y52N、Y52S、Y53A、Y53G、Y53S、Y53K、Y53T、Y53N、N54S、N54T、N54K、N54D、N54G、V56Y、V56R、V56E、V56D、V56G、V56S、V56A、N58K、N58T、N58S、N58D、N58R、N58G、N58F或N58Y。

9. 如請求項5或6之人類化抗原結合蛋白，其中該變異型CDRL3 (i)為SEQ ID NO: 6；或(ii)含有任一以下Kabat取代：L89Q、L89S、L89G、L89F、Q90N、Q90H、S91N、S91F、S91G、S91R、S91D、S91H、S91T、S91Y、S91V、D92N、D92Y、D92W、D92T、D92S、D92R、D92Q、D92H、D92A、E93N、E93G、E93H、E93T、E93S、E93R、E93A、F94D、F94Y、F94T、F94V、F94L、F94H、F94N、F94I、F94W、F94P、F94S、L96P、L96Y、L96R、L96I、L96W或L96F。

10. 如請求項6之人類化抗原結合蛋白，其中CDRH3為SEQ ID NO: 90；CDRH2為SEQ ID NO: 2或95；CDRH1為SEQ ID NO: 1；CDRL1為SEQ ID NO: 4；CDRL2為SEQ ID NO: 5；及CDRL3為SEQ ID NO: 109。

11. 如請求項6或10之抗原結合蛋白，其進一步包含選自以下之Kabat胺基酸殘基之任一者或組合：

(a)以下任一者或組合：重鏈之2位之V、I或G；4位之

L或V；20位之L、I、M或V；22位之C；24位之T、A、V、G或S；26位之G；29位之I、F、L或S；36位之W；47位之W或Y；48位之I、M、V或L；69位之I、L、F、M或V；78位之A、L、V、Y或F；80位之L或M；90位之Y或F；92位之C；及94位之R、K、G、S、H或N；及/或

(b)以下任一者或組合：輕鏈之2位之I、L或V；3位之V、Q、L或E；4位之M或L；23位之C；35位之W；36位之Y、L或F；46位之S、L、R或V；49位之Y、H、F或K；88位之C；及98位之F。

12. 如請求項1之人類化抗原結合蛋白，其中該抗原結合蛋白包含：

選自SEQ ID NO: 112、113、114、115、119、120或121之重鏈可變區；及/或選自SEQ ID NO: 116、117或118之輕鏈可變區；或與該序列具有75%或75%以上序列一致性之變異型重鏈或輕鏈可變區；

其中CDRH3為SEQ ID NO: 90；CDRH2為SEQ ID NO: 2或95；CDRH1為SEQ ID NO: 1；CDRL1為SEQ ID NO: 4；CDRL2為SEQ ID NO: 5；及CDRL3為SEQ ID NO: 109；及

其中該重鏈可變區進一步包含Kabat 28位之絲胺酸殘基；及以下殘基之至少一者或組合或全部：Kabat 66位之離胺酸殘基；Kabat 67位之丙胺酸殘基；Kabat 71位之纈胺酸殘基；及Kabat 73位之離胺酸殘基；及

其中該輕鏈可變區進一步包含Kabat 71位之酪胺酸殘

基；及以下殘基之至少一者或兩者：Kabat 46位之蘇胺酸殘基；及Kabat 69位之麩醯胺酸殘基。

13. 如請求項1之人類化抗原結合蛋白，其中該抗原結合蛋白包含：

(a) SEQ ID NO: 112之重鏈可變區及SEQ ID NO: 116之輕鏈可變區；

(b) SEQ ID NO: 112之重鏈可變區及SEQ ID NO: 117之輕鏈可變區；

(c) SEQ ID NO: 112之重鏈可變區及SEQ ID NO: 118之輕鏈可變區；

(d) SEQ ID NO: 113之重鏈可變區及SEQ ID NO: 116之輕鏈可變區；

(e) SEQ ID NO: 113之重鏈可變區及SEQ ID NO: 117之輕鏈可變區；

(f) SEQ ID NO: 113之重鏈可變區及SEQ ID NO: 118之輕鏈可變區；

(g) SEQ ID NO: 114之重鏈可變區及SEQ ID NO: 116之輕鏈可變區；

(h) SEQ ID NO: 114之重鏈可變區及SEQ ID NO: 117之輕鏈可變區；

(i) SEQ ID NO: 114之重鏈可變區及SEQ ID NO: 118之輕鏈可變區；

(j) SEQ ID NO: 115之重鏈可變區及SEQ ID NO: 116之輕鏈可變區；

- (k) SEQ ID NO: 115之重鏈可變區及SEQ ID NO: 117之輕鏈可變區；
- (l) SEQ ID NO: 115之重鏈可變區及SEQ ID NO: 118之輕鏈可變區；
- (m) SEQ ID NO: 119之重鏈可變區及SEQ ID NO: 116之輕鏈可變區；
- (n) SEQ ID NO: 119之重鏈可變區及SEQ ID NO: 117之輕鏈可變區；
- (o) SEQ ID NO: 119之重鏈可變區及SEQ ID NO: 118之輕鏈可變區；
- (p) SEQ ID NO: 120之重鏈可變區及SEQ ID NO: 116之輕鏈可變區；
- (q) SEQ ID NO: 120之重鏈可變區及SEQ ID NO: 117之輕鏈可變區；
- (r) SEQ ID NO: 120之重鏈可變區及SEQ ID NO: 118之輕鏈可變區；
- (s) SEQ ID NO: 121之重鏈可變區及SEQ ID NO: 116之輕鏈可變區；
- (t) SEQ ID NO: 121之重鏈可變區及SEQ ID NO: 117之輕鏈可變區；或
- (u) SEQ ID NO: 121之重鏈可變區及SEQ ID NO: 118之輕鏈可變區。

14. 如請求項13之人類化抗原結合蛋白，其中該等可變重鏈及輕鏈區與適合人類恆定區組合。

15. 如請求項1之人類化抗原結合蛋白，其中該抗原結合蛋白包含：選自SEQ ID NO: 123、125、127或138-144之重鏈序列；及/或選自SEQ ID NO: 145、146、147之輕鏈序列；或與該序列具有75%或75%以上序列一致性之變異型重鏈或輕鏈序列，

其中CDRH3為SEQ ID NO: 90；CDRH2為SEQ ID NO: 2或95；CDRH1為SEQ ID NO: 1；CDRL1為SEQ ID NO: 4；CDRL2為SEQ ID NO: 5；及CDRL3為SEQ ID NO: 109；及

其中該重鏈進一步包含Kabat 28位之絲胺酸殘基；及以下殘基之至少一者或組合或全部：Kabat 66位之離胺酸殘基；Kabat 67位之丙胺酸殘基；Kabat 71位之纈胺酸殘基；及Kabat 73位之離胺酸殘基；及

其中該輕鏈進一步包含Kabat 71位之酪胺酸殘基；及以下殘基之至少一者或兩者：Kabat 46位之蘇胺酸殘基；及Kabat 69位之麩醯胺酸殘基。

16. 如請求項14或15之人類化抗原結合蛋白，其中該重鏈為Fc失能。
17. 一種核酸分子，其編碼如請求項1至16中任一項之人類化抗原結合蛋白。
18. 一種編碼特異性結合肌肉抑制素之人類化抗原結合蛋白之核酸分子，其包含：

SEQ ID NO: 122、124、126、128-131、135-137之重鏈DNA序列；及/或選自SEQ ID NO: 132、133或134之輕

鏈DNA序列；或

變異型重鏈或輕鏈DNA序列，其編碼SEQ ID NO: 123、125、127或138-144之重鏈序列；及/或SEQ ID NO: 145、146或147之輕鏈序列。

19. 一種編碼特異性結合肌肉抑制素之人類化抗原結合蛋白之核酸分子，其包含：SEQ ID NO: 122、124或126之重鏈DNA序列及/或選自SEQ ID NO: 132、133或134之輕鏈DNA序列或編碼SEQ ID NO: 145、146或147之輕鏈序列的變異型輕鏈DNA序列。
20. 一種表現載體，其包含如請求項17至19中任一項之核酸分子。
21. 一種重組宿主細胞，其包含如請求項20之表現載體。
22. 一種產生如請求項1至16中任一項之抗原結合蛋白的方法，該方法包含培養如請求項21之宿主細胞及回收該抗原結合蛋白之步驟。
23. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至16中任一項之抗原結合蛋白及醫藥學上可接受之載劑。
24. 一種如請求項1至16中任一項之抗原結合蛋白或如請求項23之組合物之用途，其係用於製造用以治療罹患肌肉質量、肌力及肌肉功能降低之任一者或組合之疾病之個體的藥劑。
25. 一種如請求項1至16中任一項之抗原結合蛋白或如請求項23之組合物之用途，其係用於製造用以治療罹患以下個體的藥劑：少肌症、惡病質、肌肉萎縮(muscle-

wasting)、不用性肌肉萎縮症、HIV、AIDS、癌症、外科手術、灼傷、肌肉骨骼或神經之創傷或損傷、肥胖症、糖尿病(包括II型糖尿病)、關節炎、慢性腎衰竭(CRF)、末期腎病(ESRD)、充血性心臟衰竭(CHF)、慢性阻塞性肺病(COPD)、選擇性關節修復(elective joint repair)、多發性硬化症(MS)、中風、肌肉萎縮症(muscular dystrophy)、運動神經元神經病變、肌肉萎縮性側索硬化(ALS)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、骨質疏鬆症、骨關節炎、脂肪酸肝病(fatty acid liver disease)、肝硬化、艾迪森氏病(Addison's disease)、庫欣氏症候群(Cushing's syndrome)、急性呼吸窘迫症候群、類固醇誘發之肌肉萎縮、肌炎或脊柱側彎。

26. 一種如請求項1至16中任一項之抗原結合蛋白或如請求項23之組合物之用途，其係用於製造用以增加肌肉質量、增強肌力及/或改善肌肉功能之藥劑。

八、圖式：

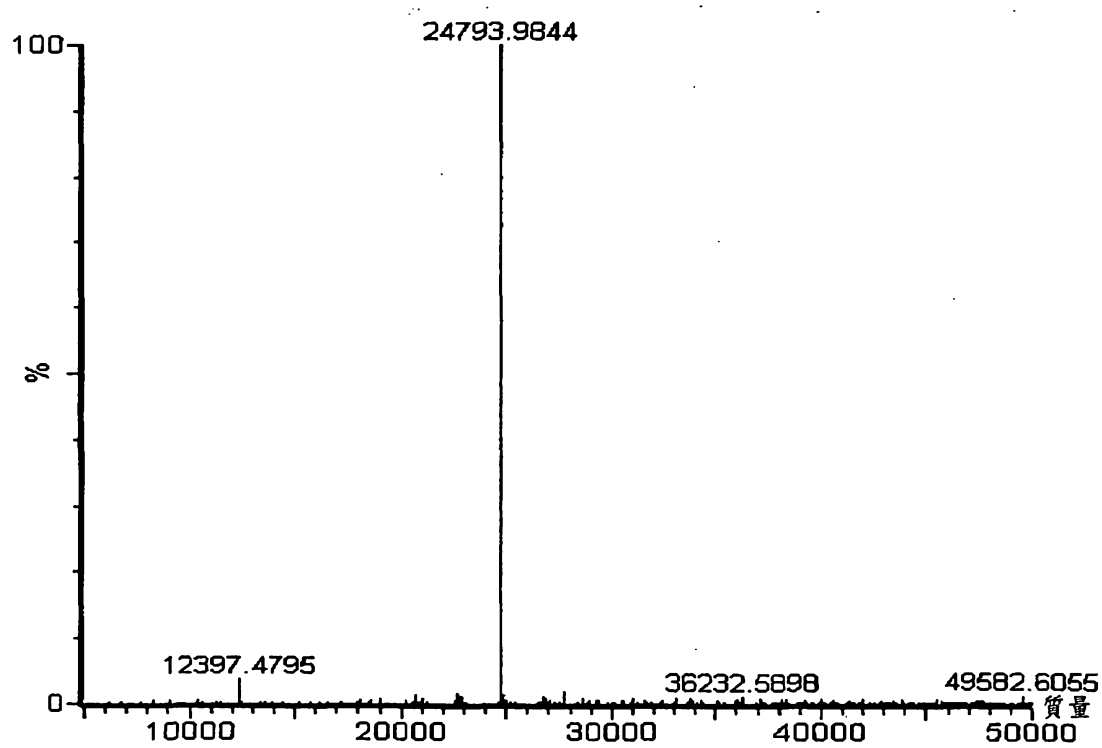


圖 1

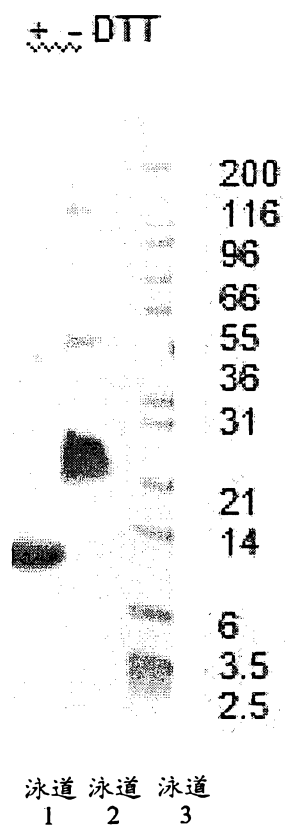


圖2

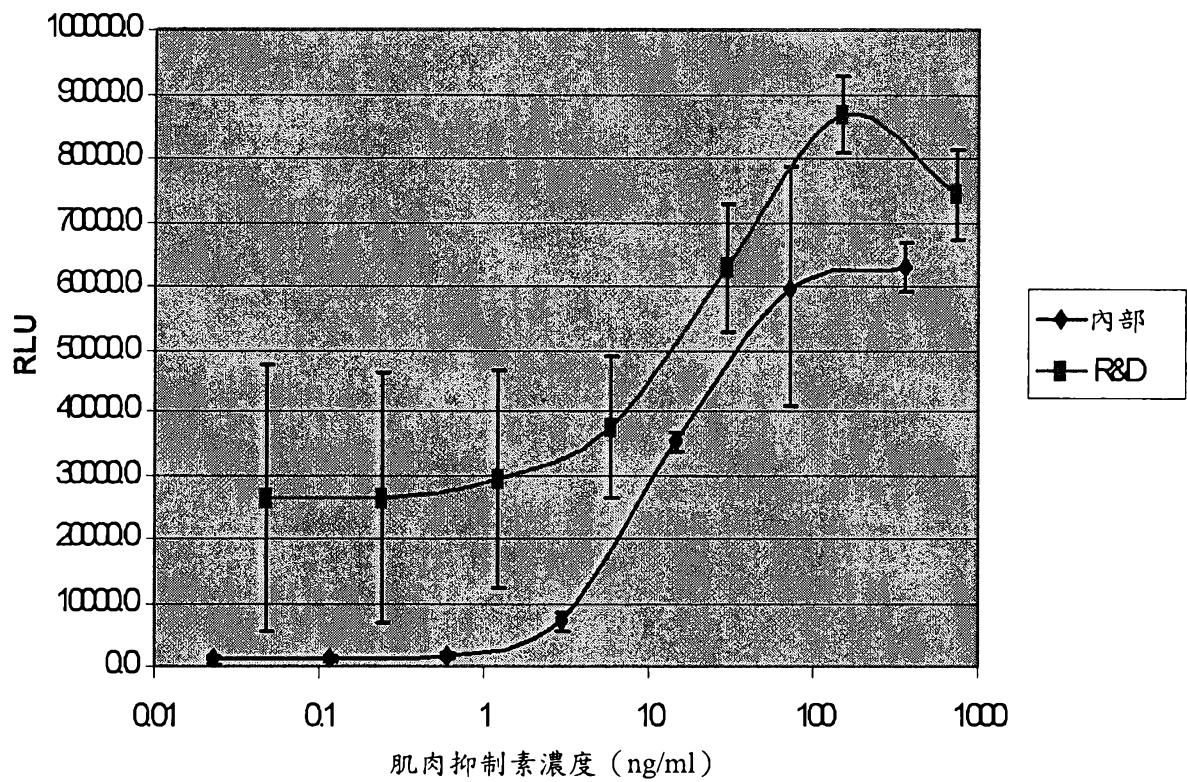


圖3A

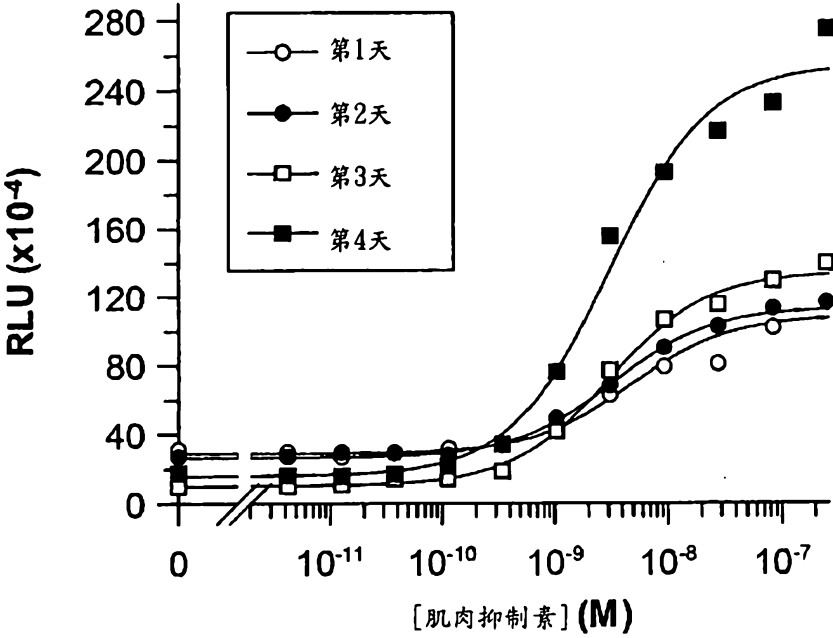


圖 3B

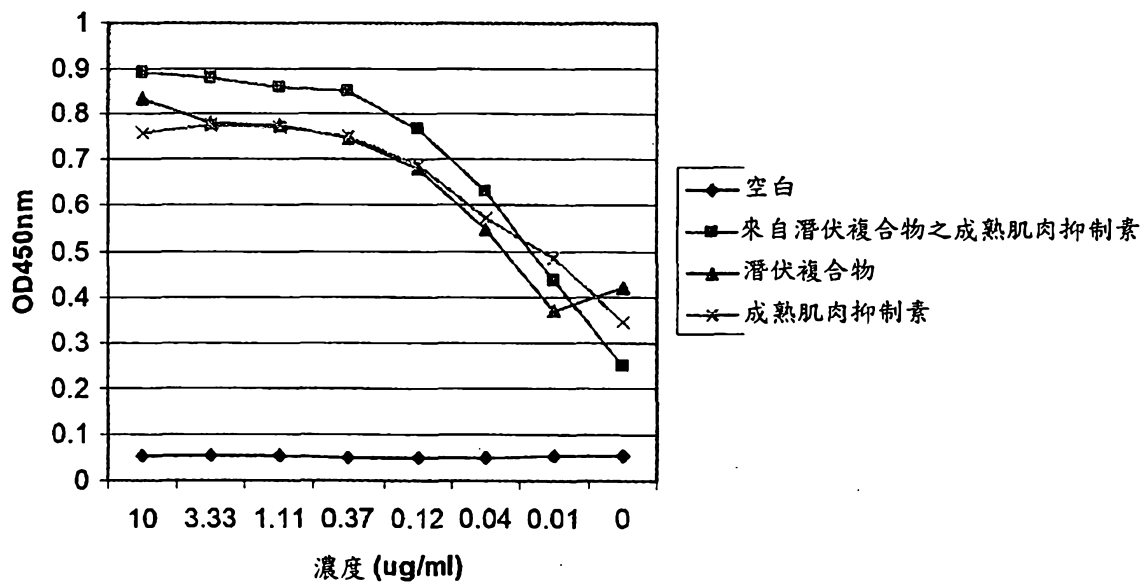


圖4

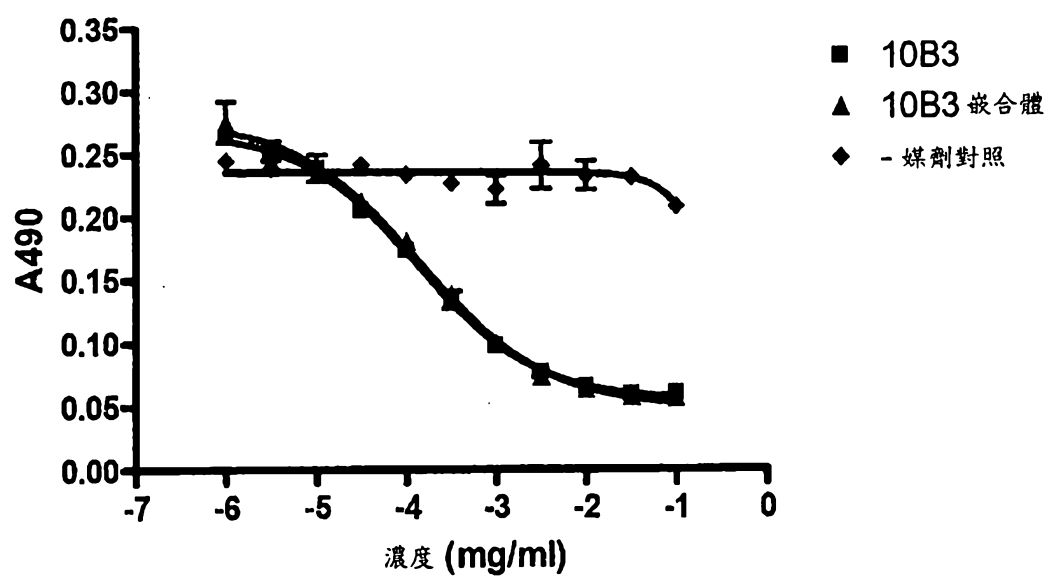


圖5

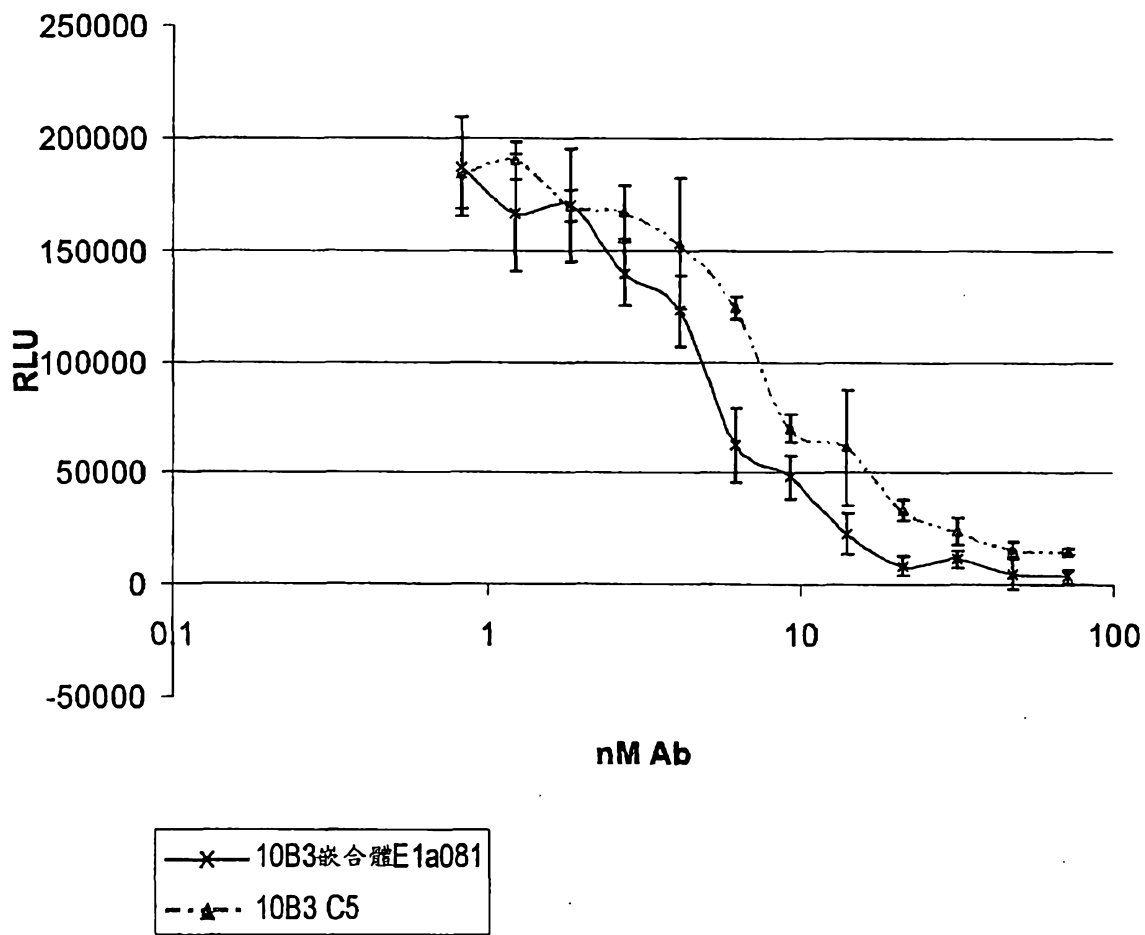


圖6

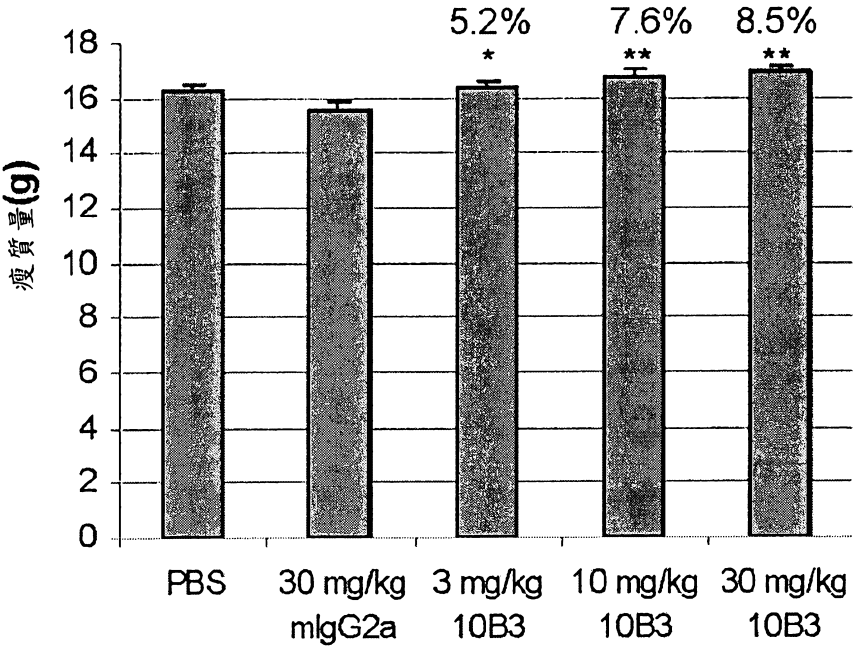
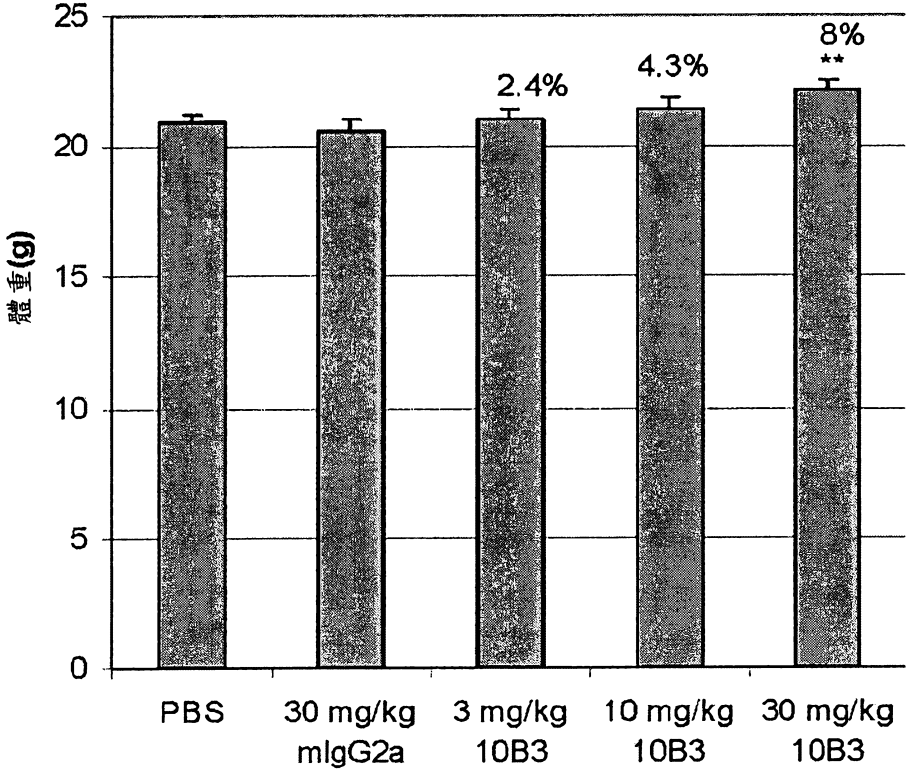
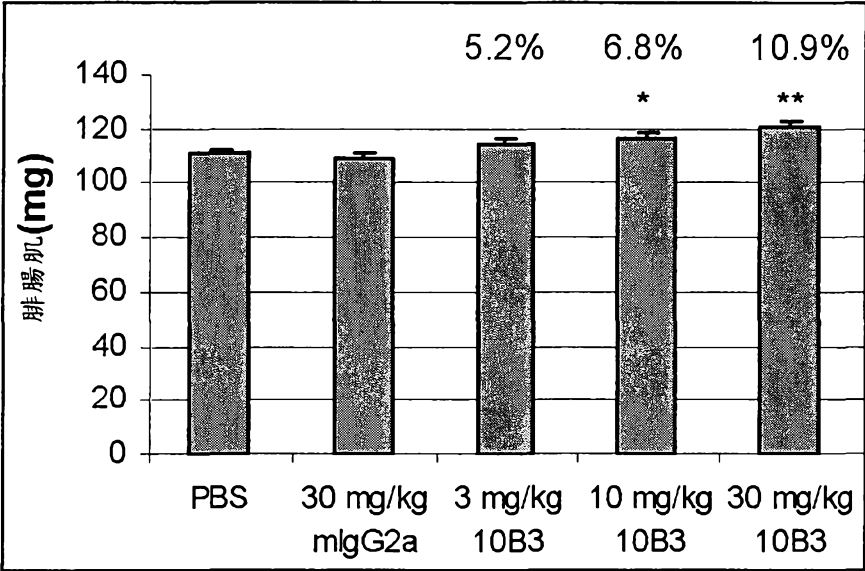
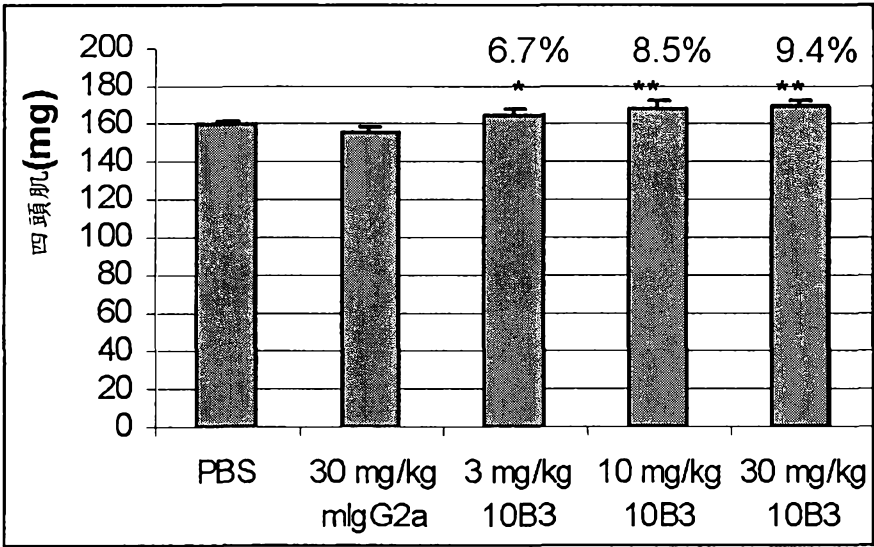


圖 7

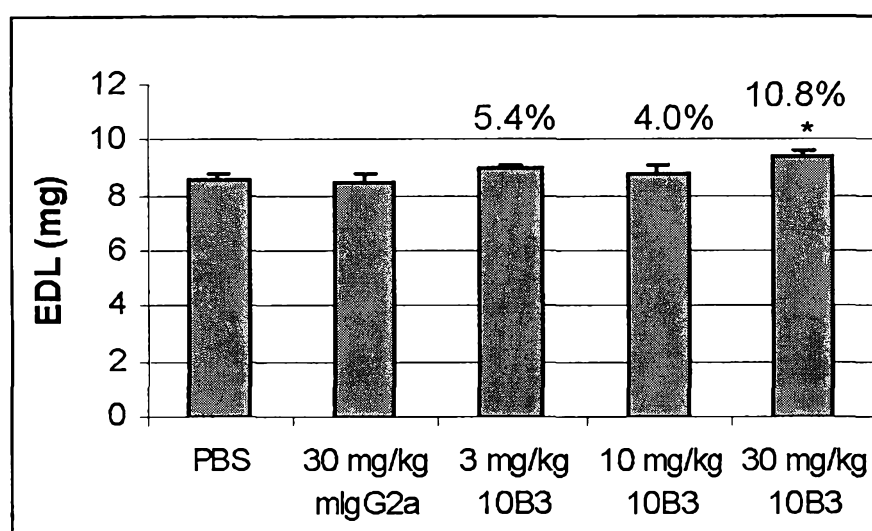


A



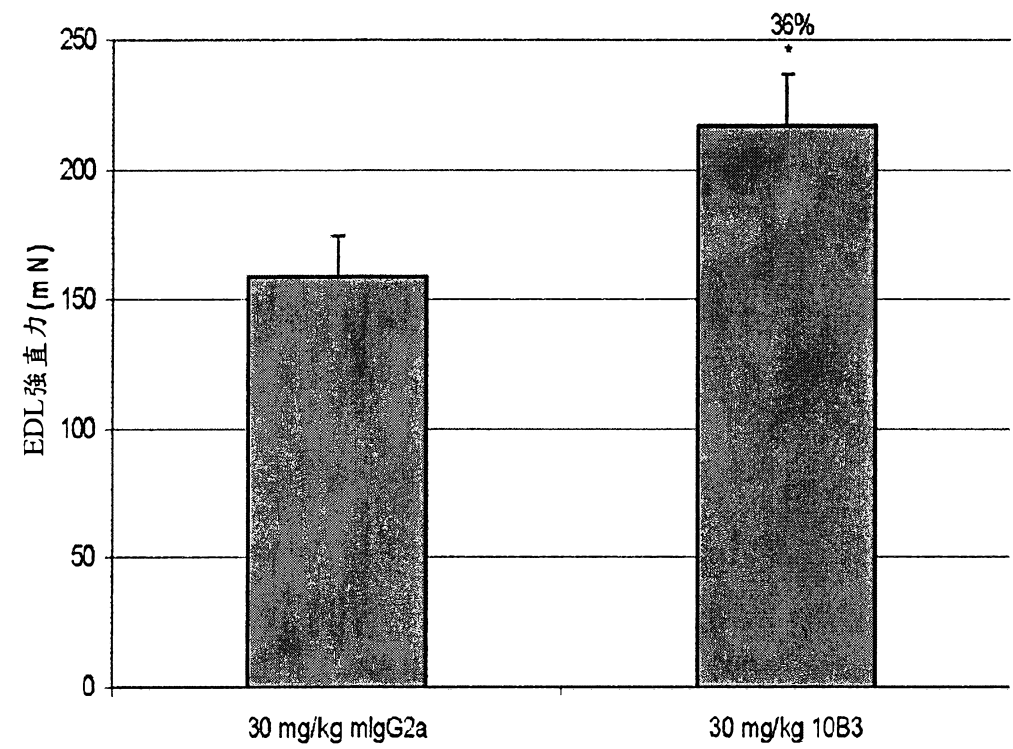
B

圖8

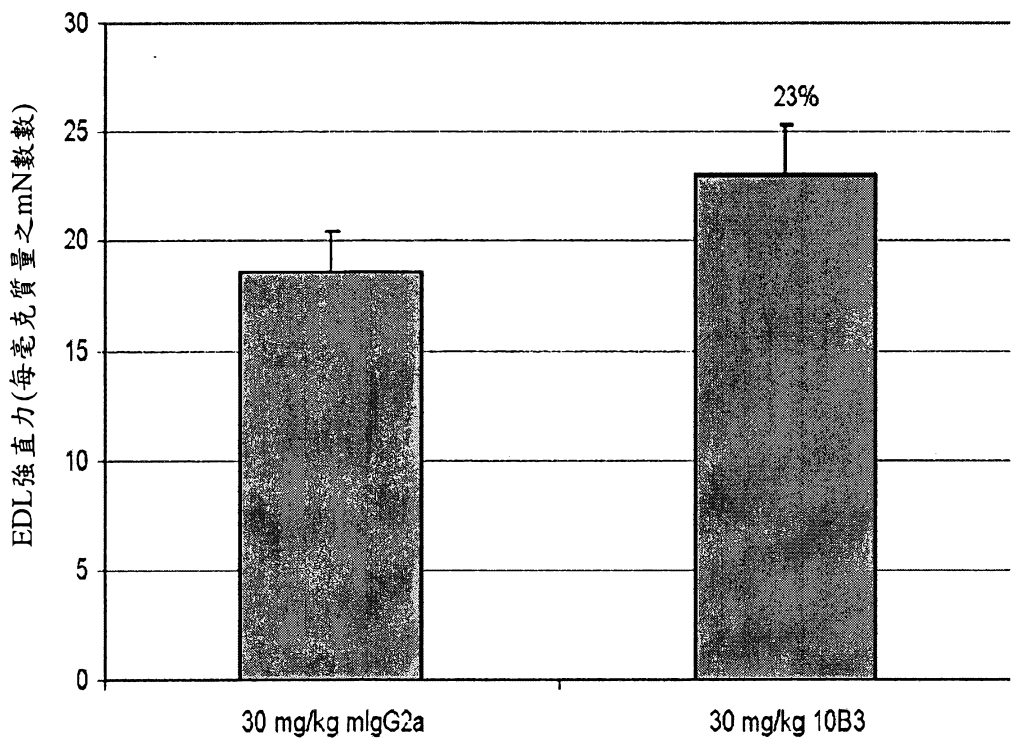


C

圖8(續)



A



B

圖9

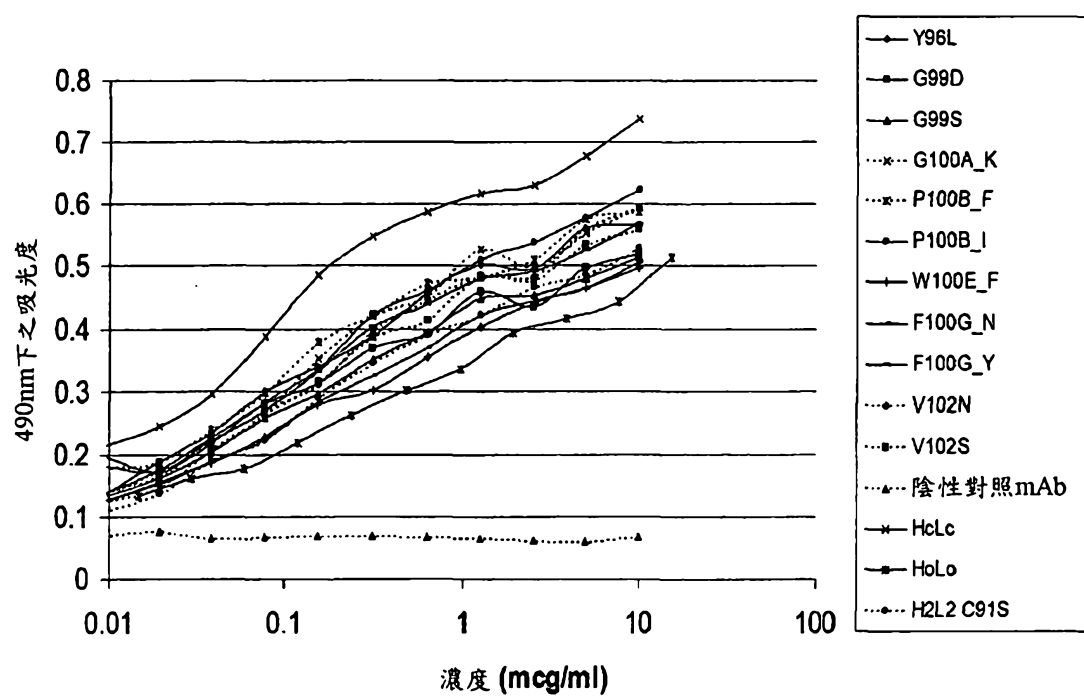


圖10

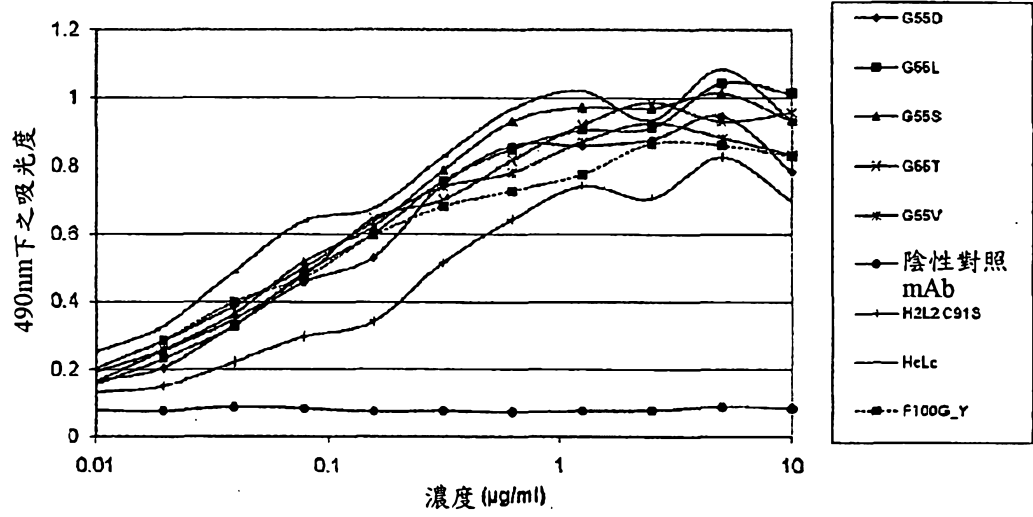


圖11

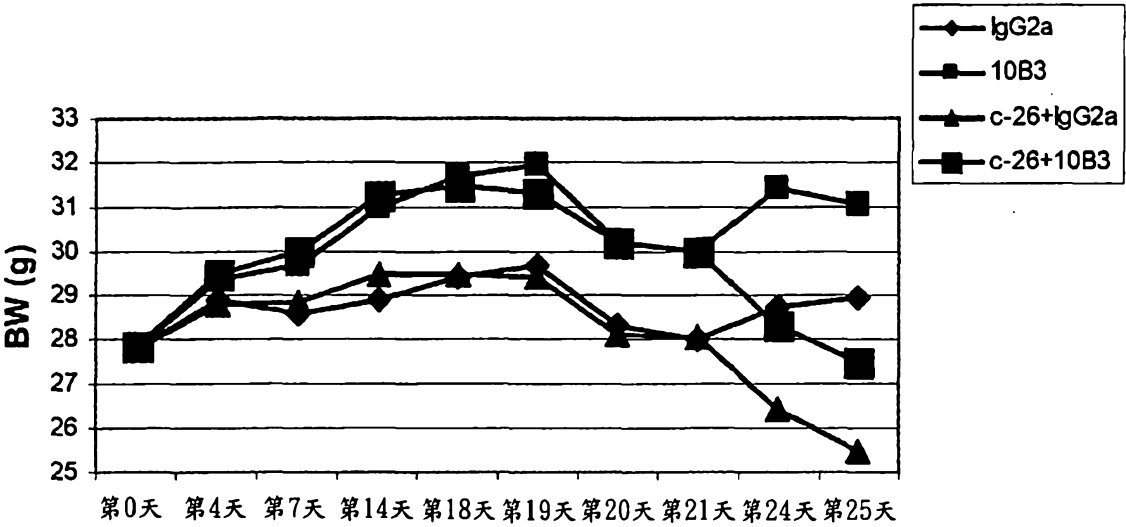


圖12

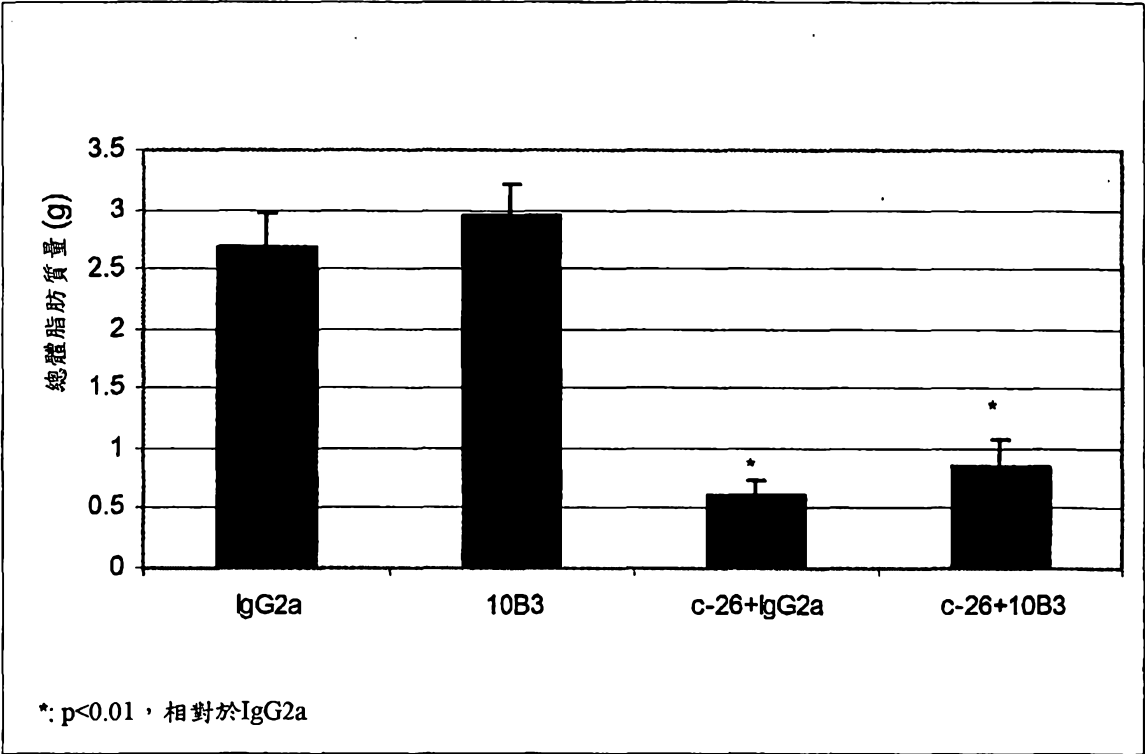


圖 13A

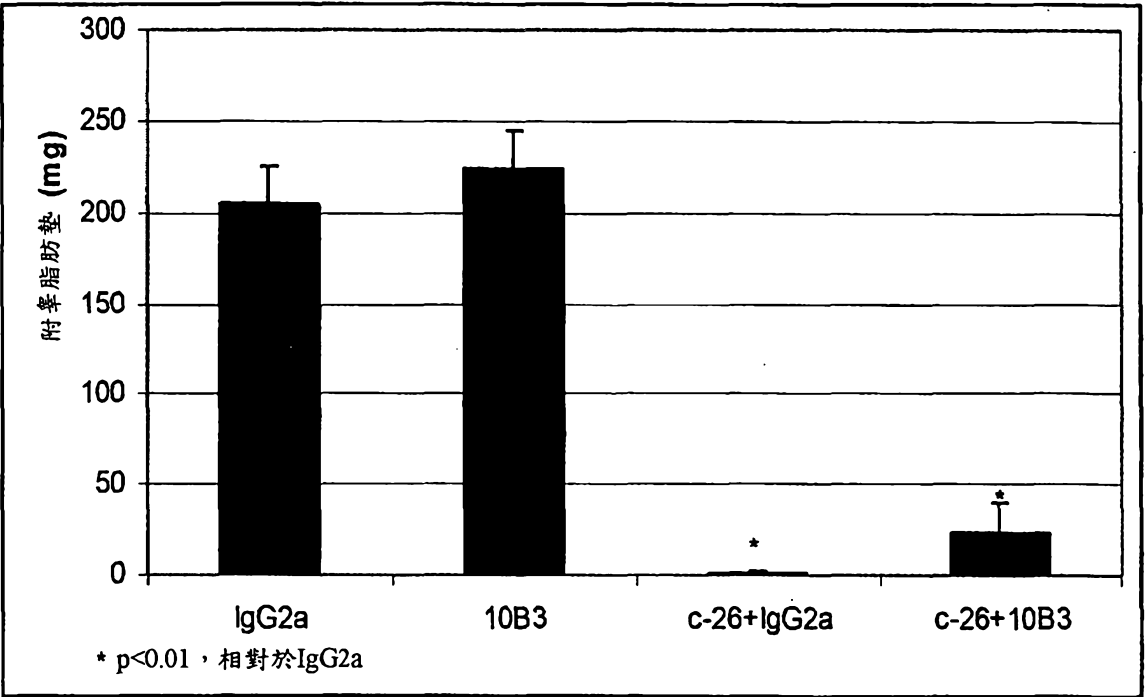


圖 13B

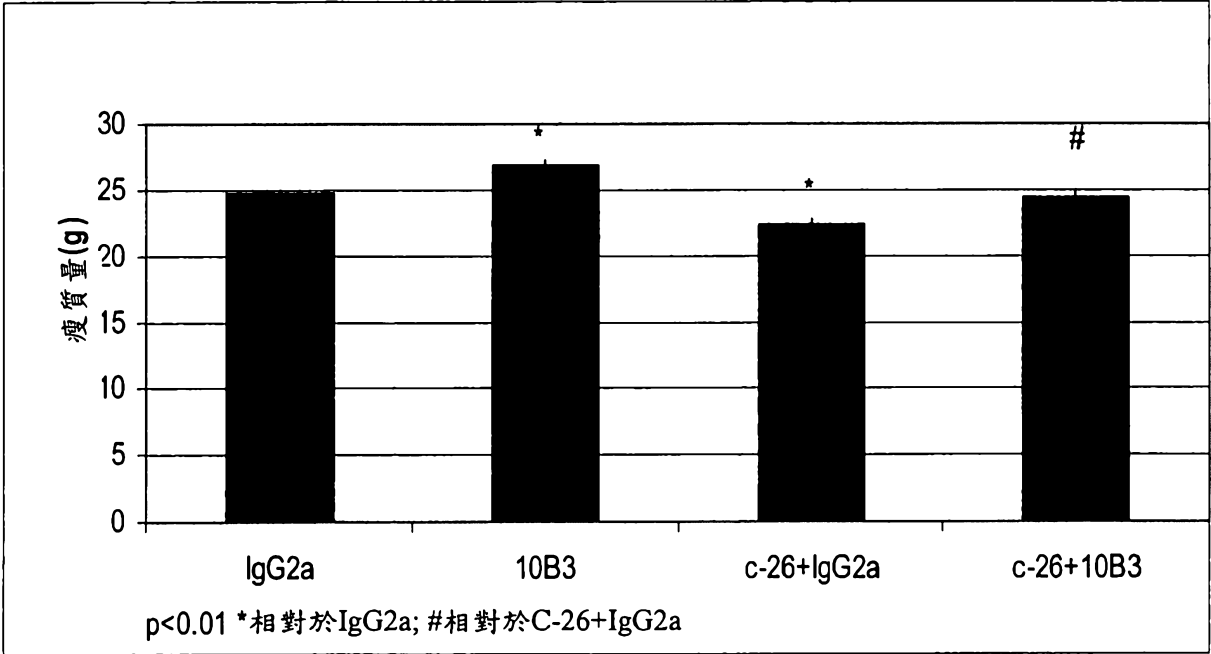


圖13C

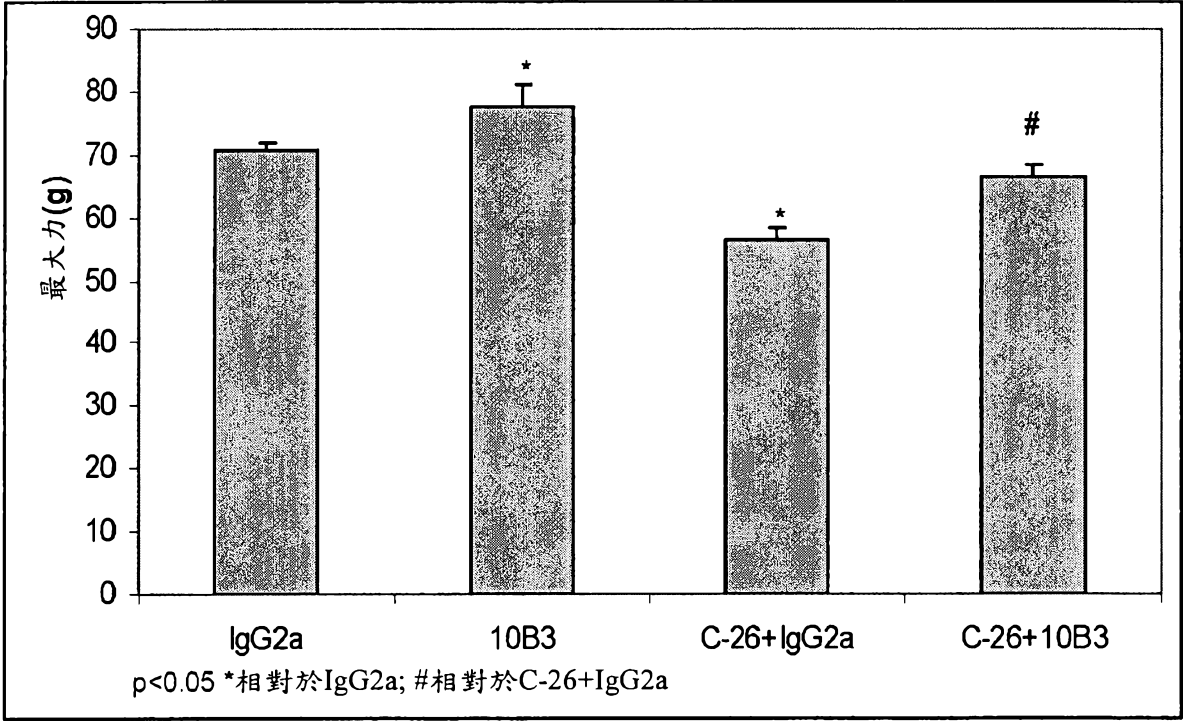


圖14

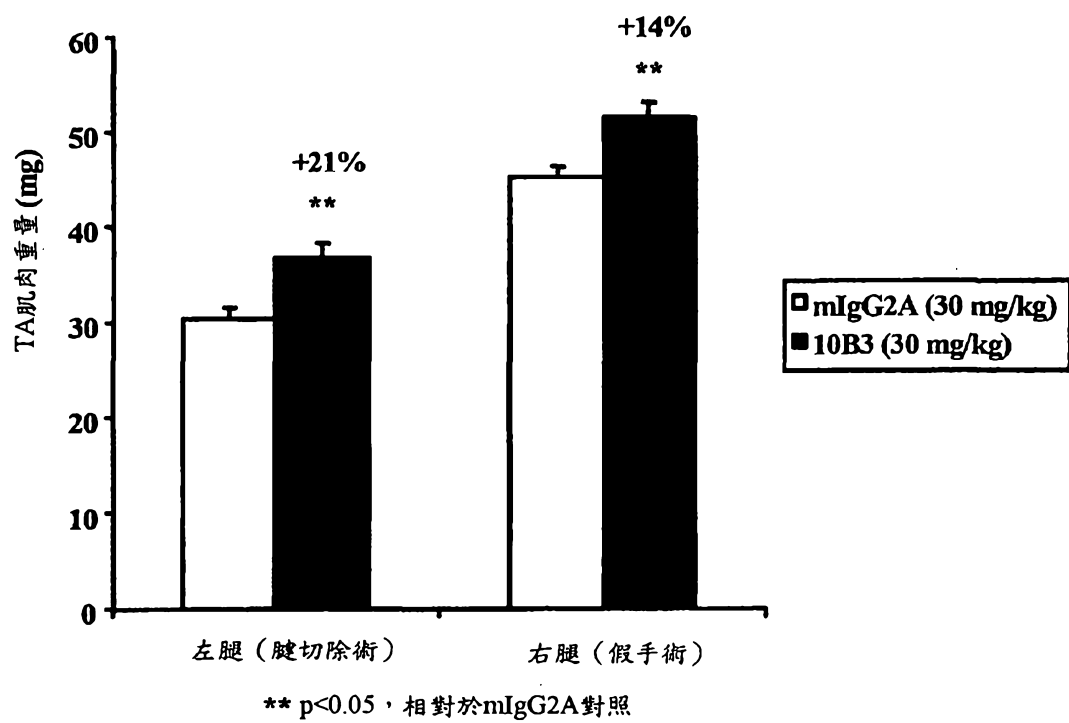


圖15

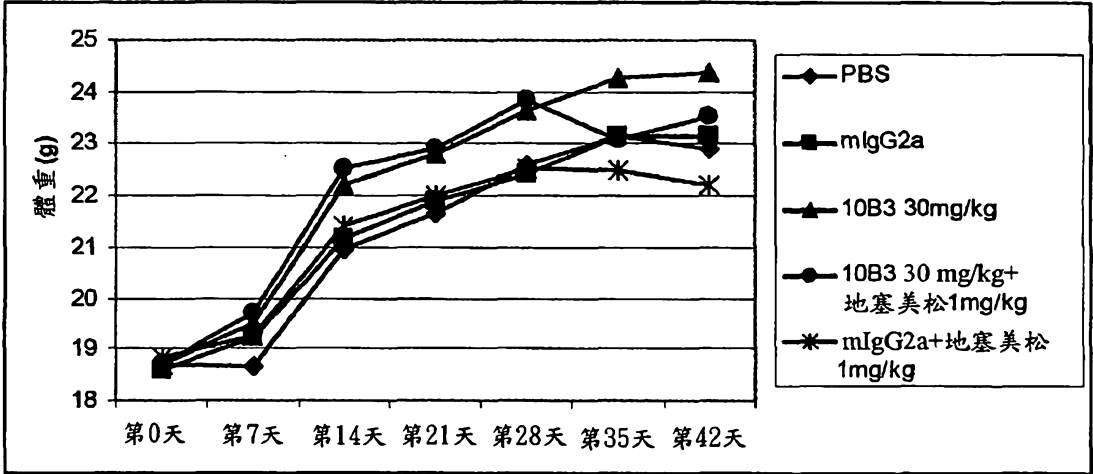


圖16

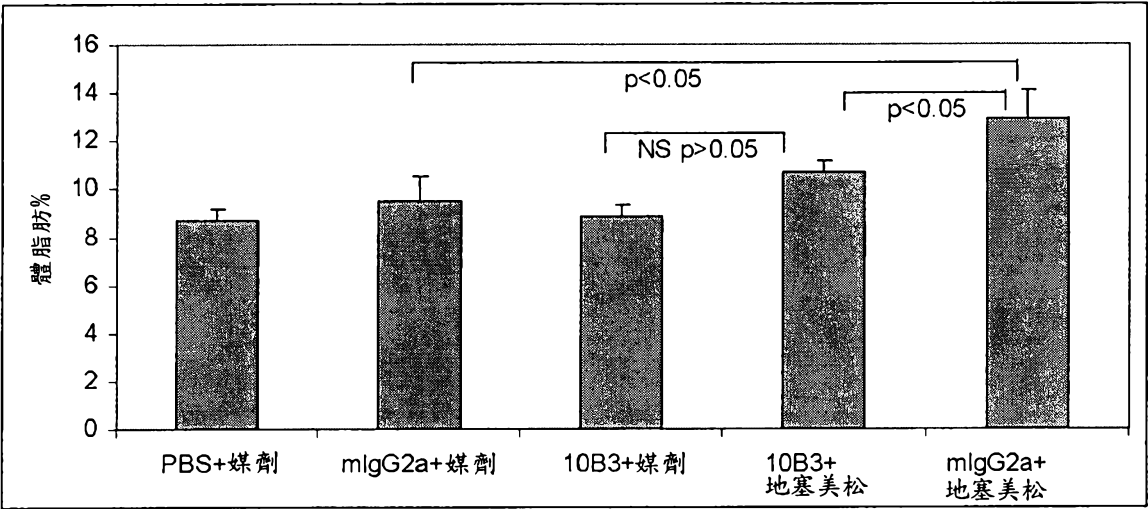


圖17

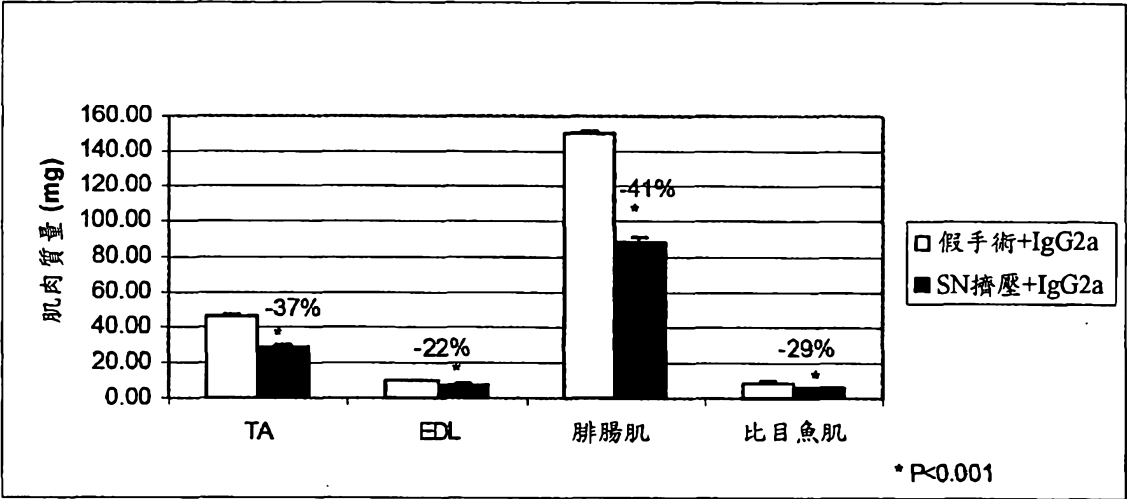


圖18

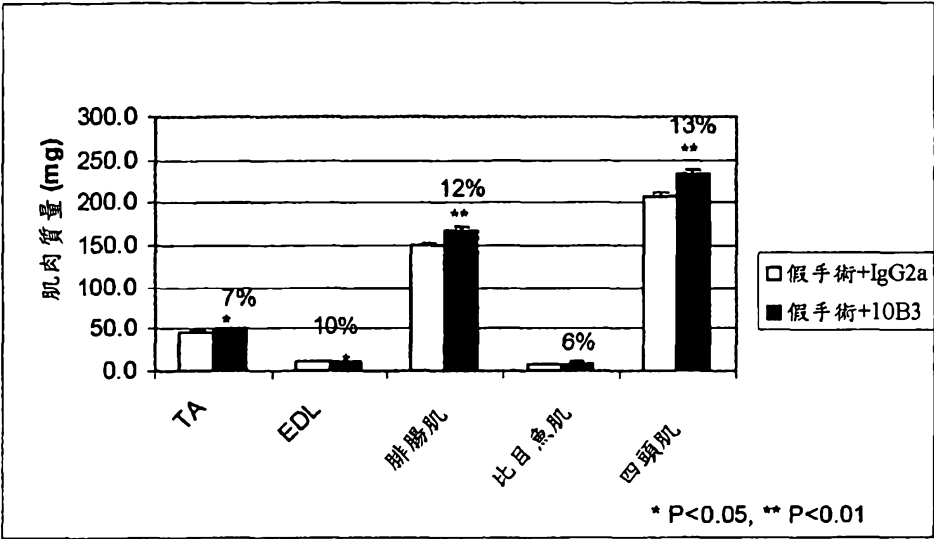


圖19A

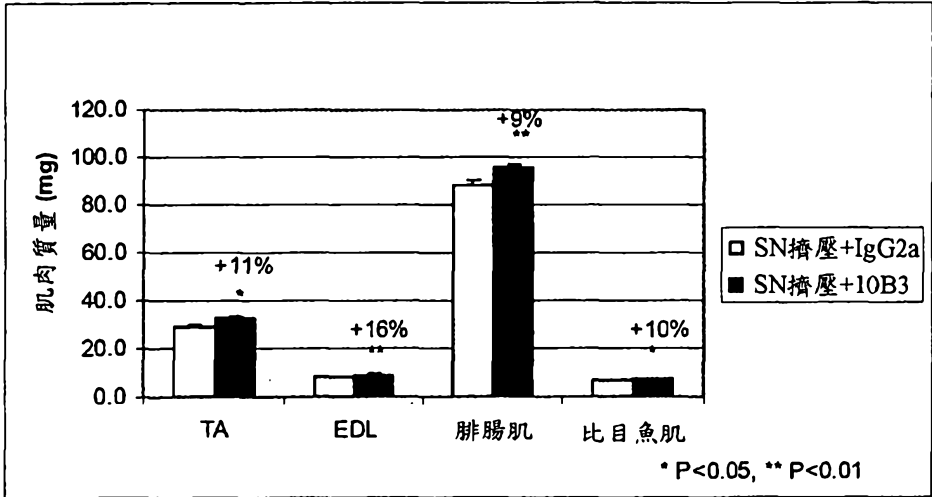


圖19B

IgV區Kabat編號-H0鏈=重鏈

框架1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G

16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T

CDR1; 典型類型 = H1_1

31	32	33	34	35
G	Y	F	M	H

框架2

36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G

CDR2; 典型類型 = H2_2

50	51	52	52A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
N	I	Y	P	Y	N	G	V	S	N	Y	N	Q	R	F	K	A

框架3

66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
R	V	T	M	T	T	D	T	S	T	S	T	A	Y	M

81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
E	L	R	S	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C

93	94
A	R

CDR3; 典型類型 = 未識別

95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	100F	100G	101	102
R	Y	Y	Y	G	T	G	P	A	D	W	Y	F	D	V

框架4

103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S

圖20

IgV區Kabat編號L0鏈=輕鏈 (次型=κ)

框架1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V

16	17	18	19	20	21	22	23
G	D	R	V	T	I	T	C

CDR1; 典型類型= L1_2

24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
K	A	S	Q	D	I	N	S	Y	L	S

框架2

35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
W	F	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	S	L	I	Y

CDR2; 典型類型= L2_1

50	51	52	53	54	55	56
R	A	N	R	L	V	D

框架3

57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
G	V	P	S	K	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F

72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86
T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y

87	88
Y	C

CDR3; 典型類型= L3_1

89	90	91	92	93	94	95	96	97
L	Q	C	D	E	F	P	L	T

框架4

98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K

圖21

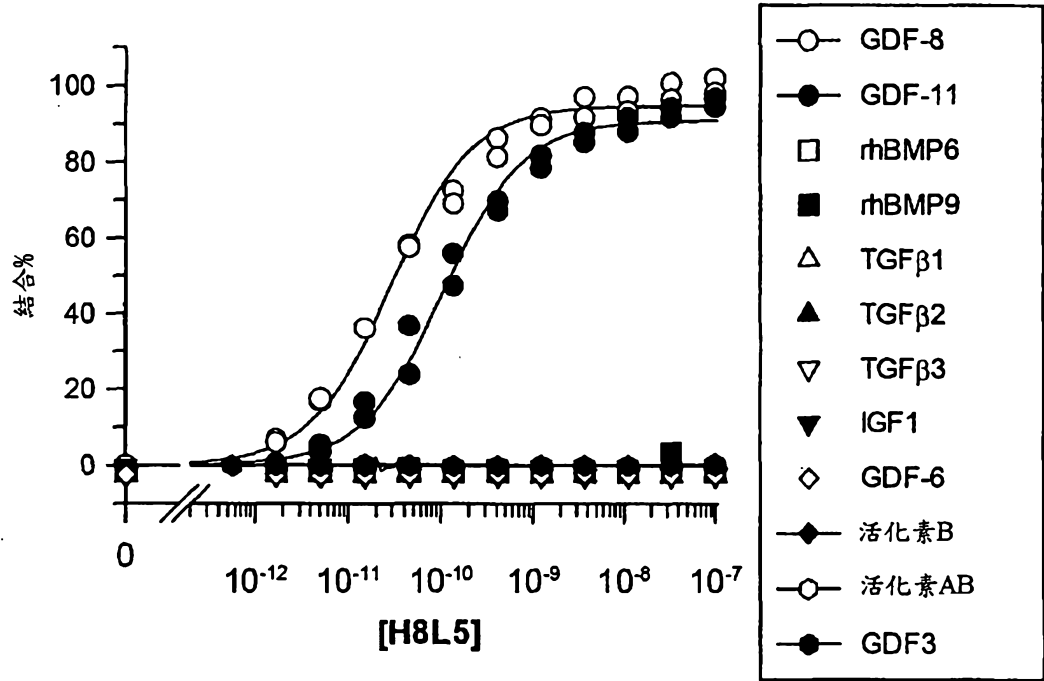


圖22

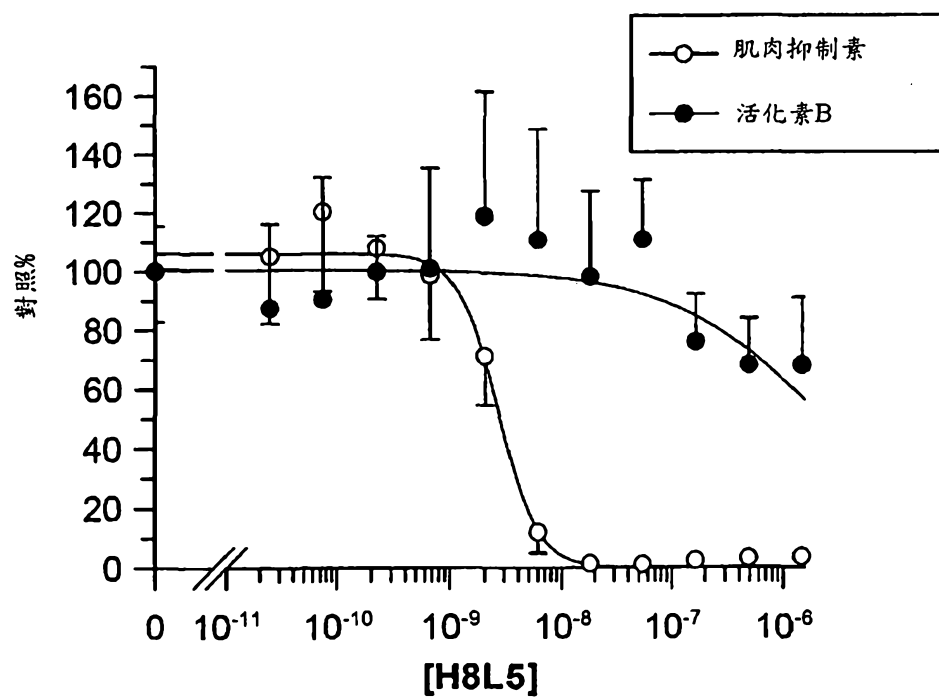


圖 23

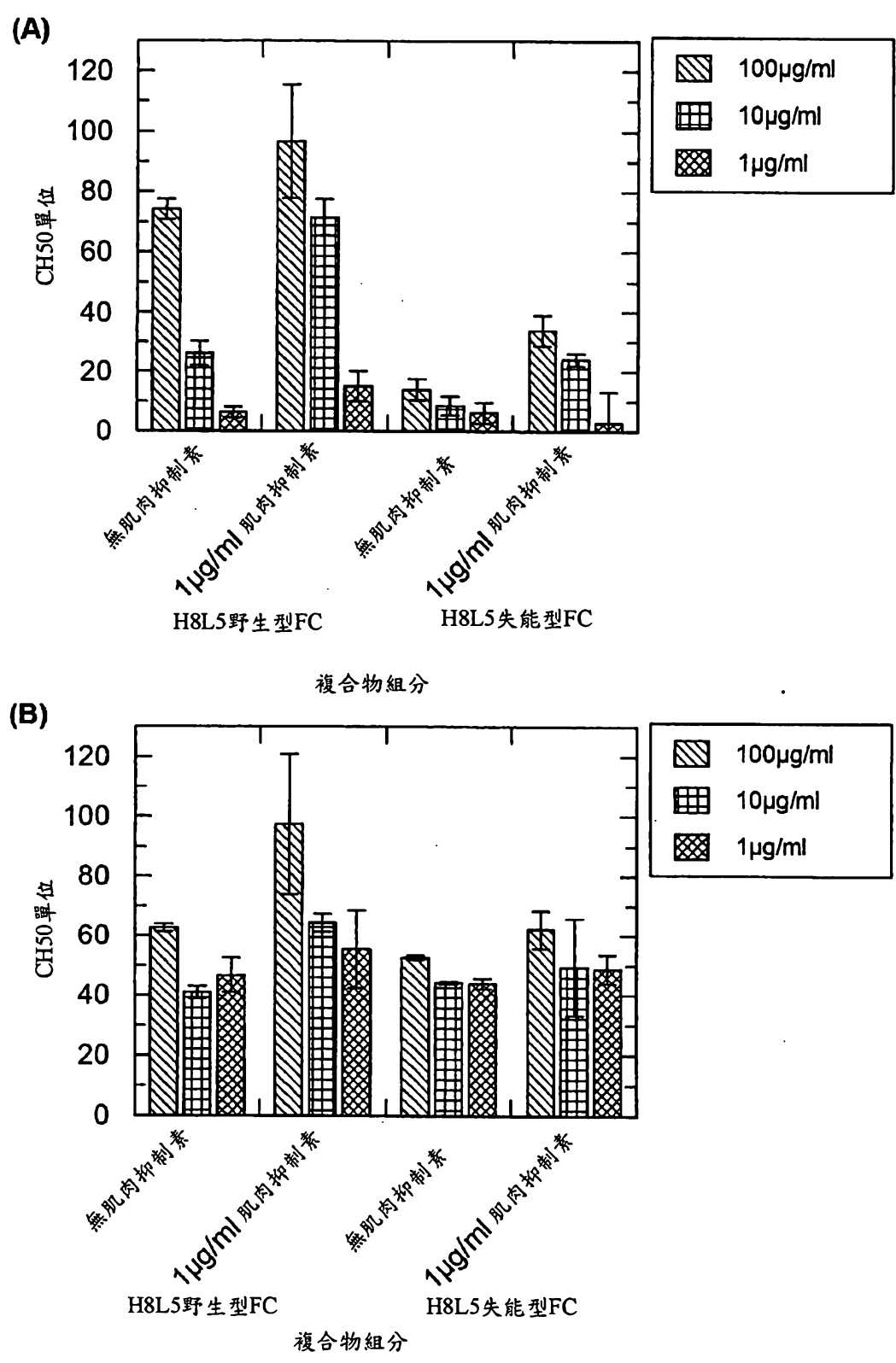


圖24

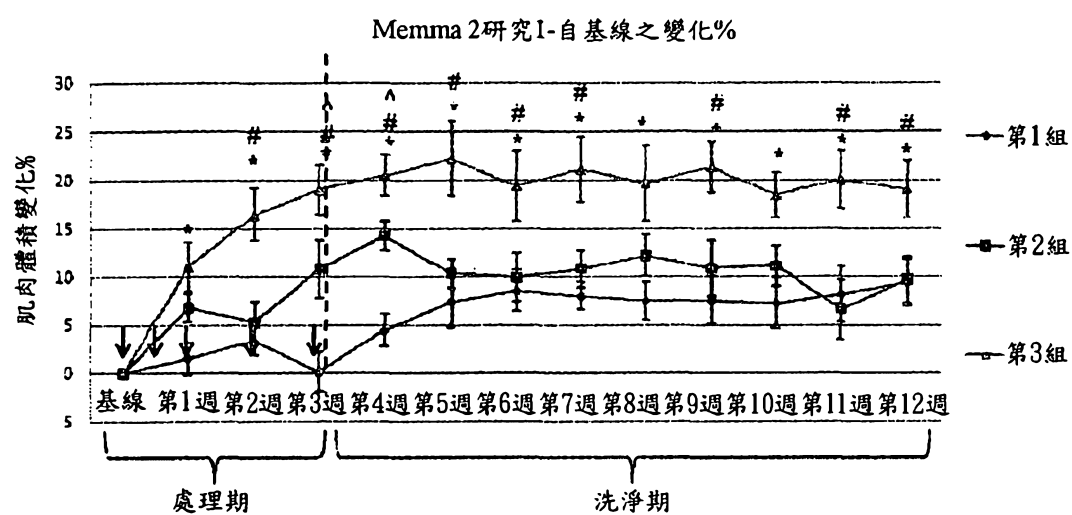


圖25

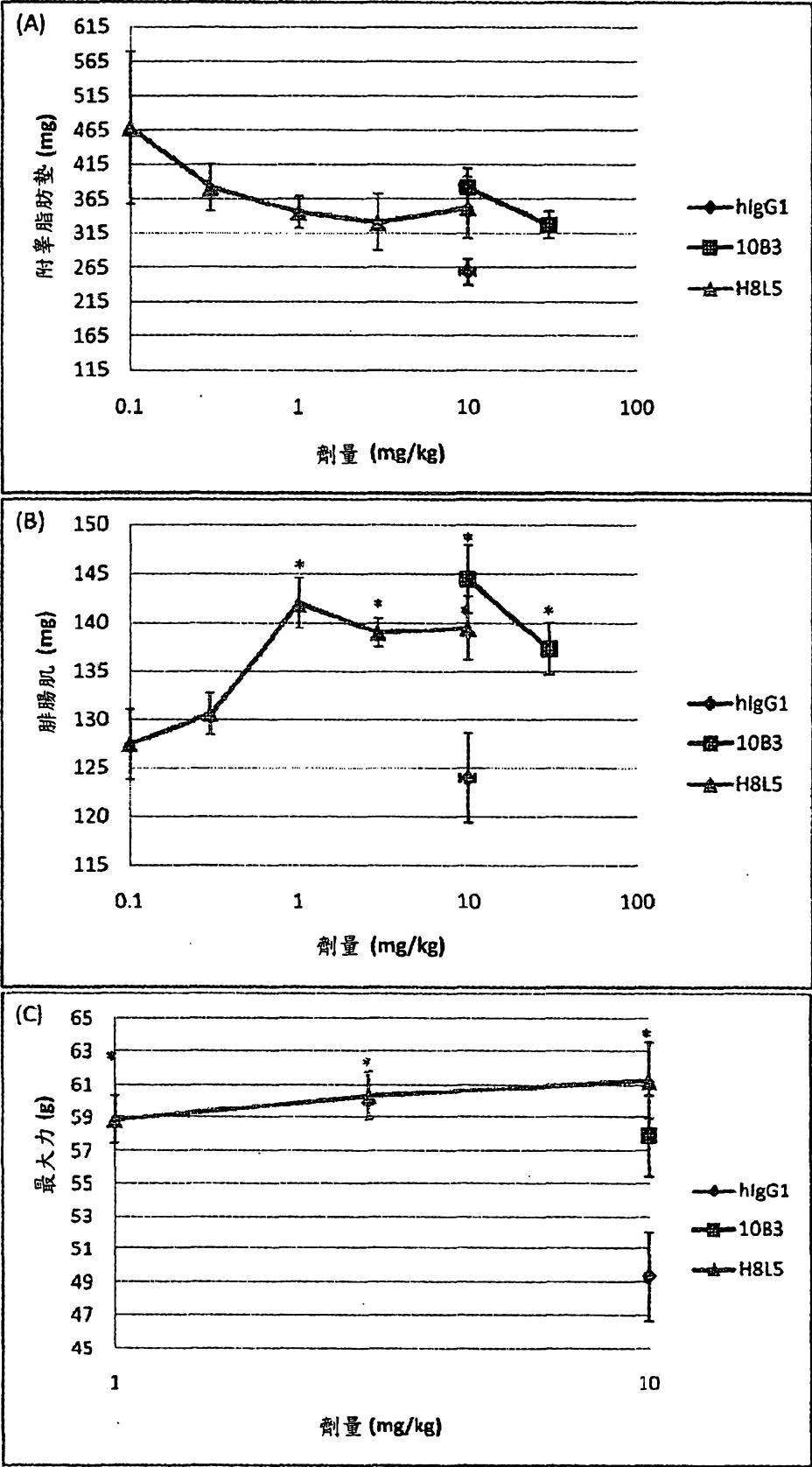


圖26

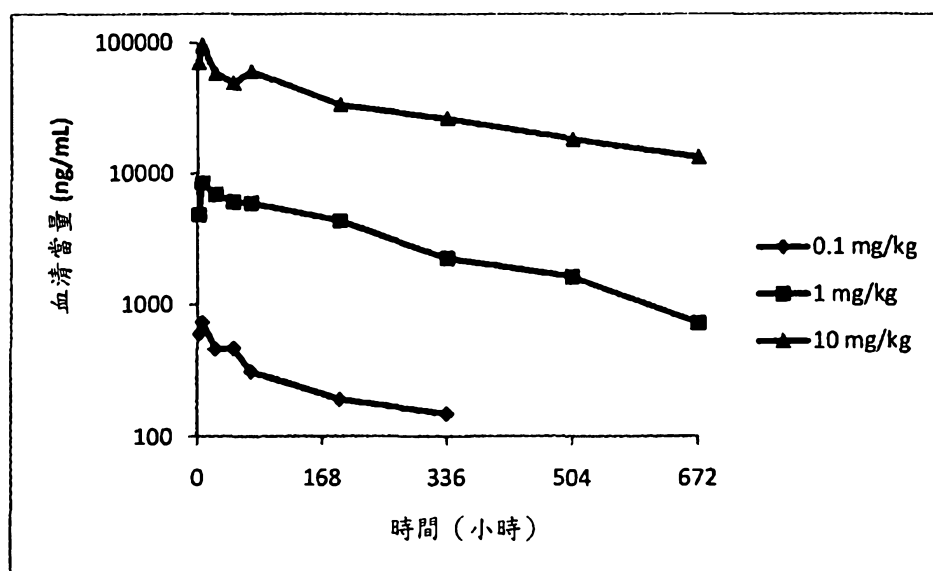


圖27

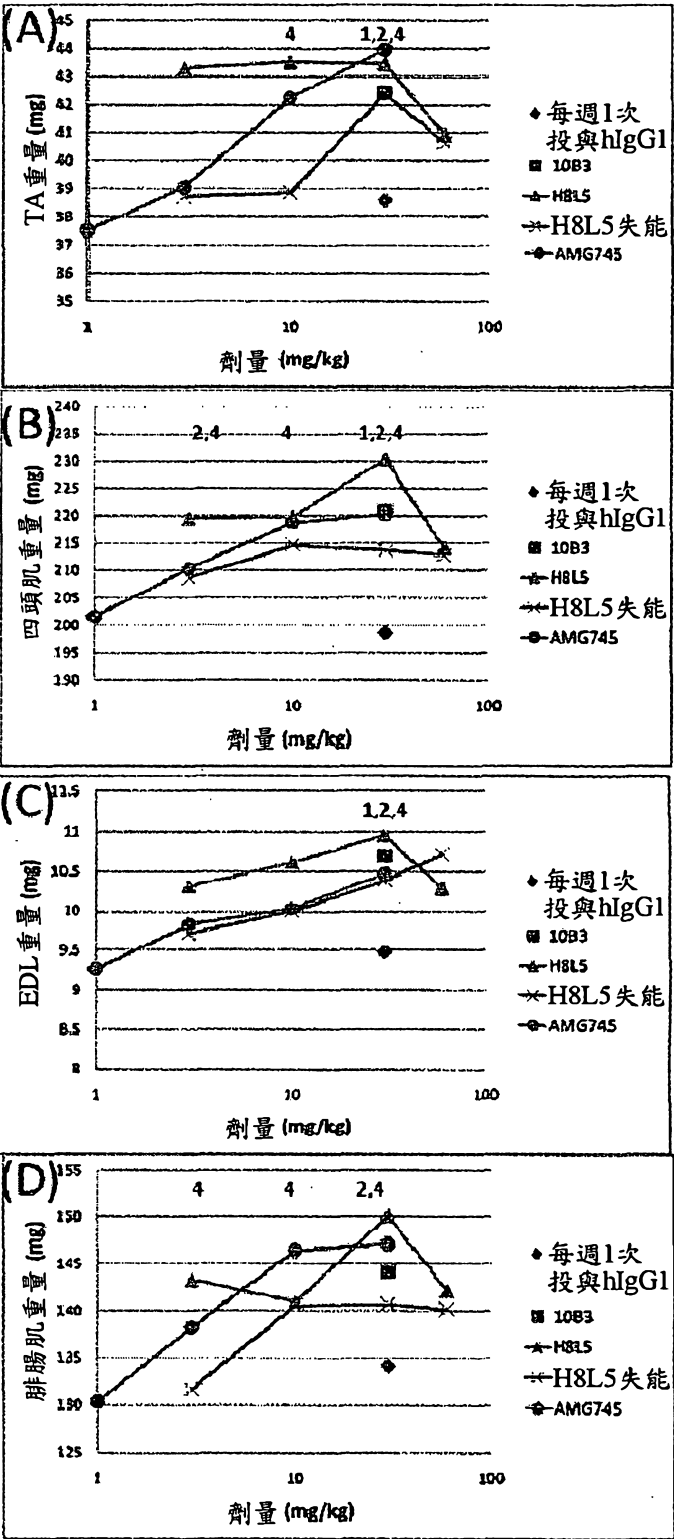


圖28

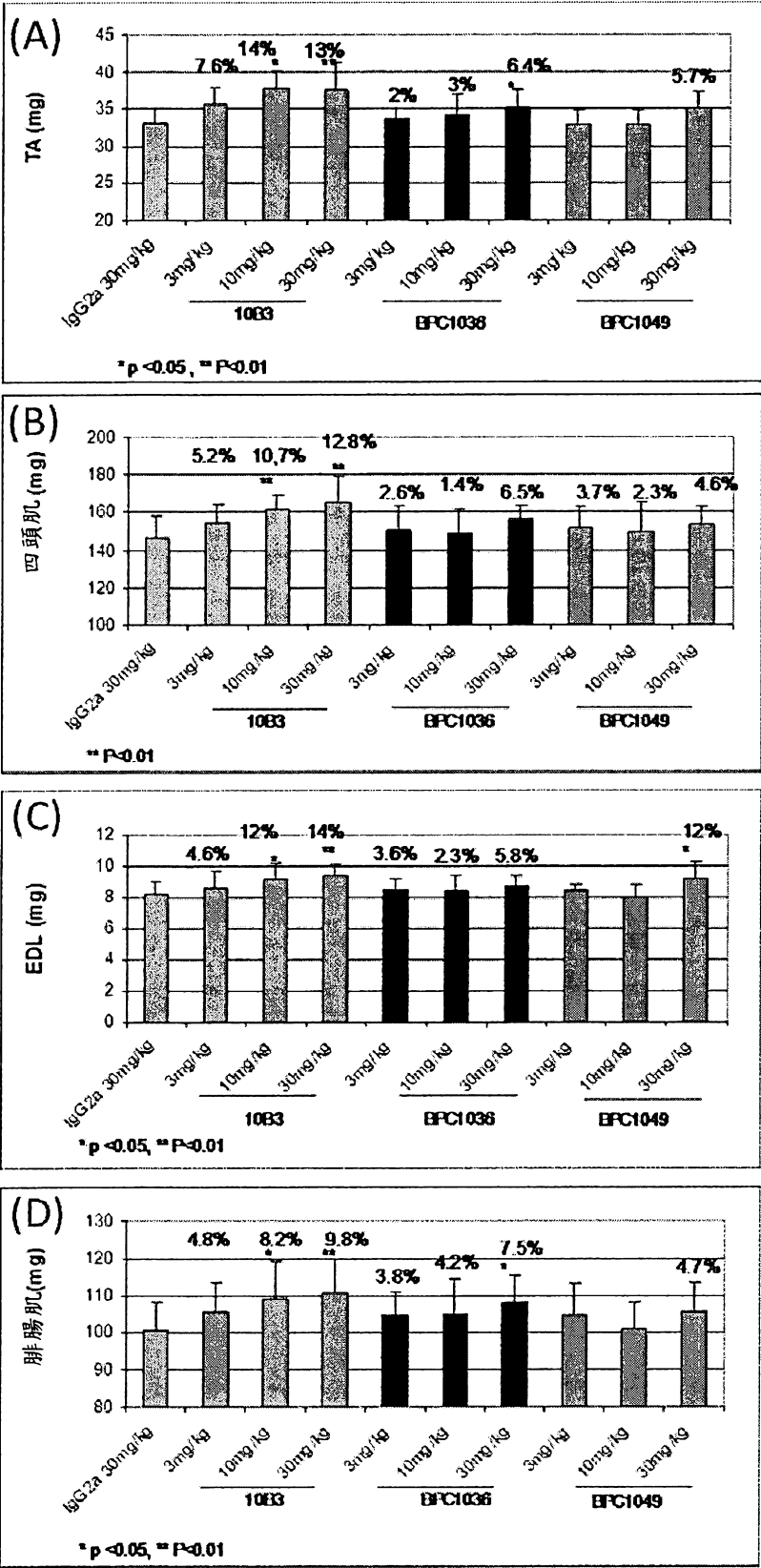


圖29

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (4) 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)