



(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 201029662 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 08 月 16 日

(21)申請案號：098143432

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 17 日

(51)Int. Cl.：

A61K38/16 (2006.01)

C07K16/18 (2006.01)

C12N15/09 (2006.01)

A61P21/00 (2006.01)

(30)優先權：2008/12/19

美國

61/138,980

(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：亞士曼 克萊兒 ASHMAN, CLAIRE (GB)；畢登 安德魯 BEATON, ANDREW (GB)；艾理斯 喬納森 亨利 ELLIS, JONATHAN HENRY (GB)；漢 伯俊 HAN, BAJIN (US)；克比 伊恩 KIRBY, IAN (GB)；庫爾 佛德瑞 KULL, FREDERICK (US)；路易斯 艾倫 LEWIS, ALAN (GB)；李德雷 凱瑞 麥森 LINDLEY, KATHRYN MASON (US)；歐加 馬丁 安伯 ORECCHIA, MARTIN ANIBAL (IT)；沈揚 SHEN, YING (US)；威爾森 保羅 WILSON, PAUL (GB)；武田賢 XU, TIAN SHUN (US)；張紅 ZHANG, HONG (CN)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：23 項 圖式數：26 共 210 頁

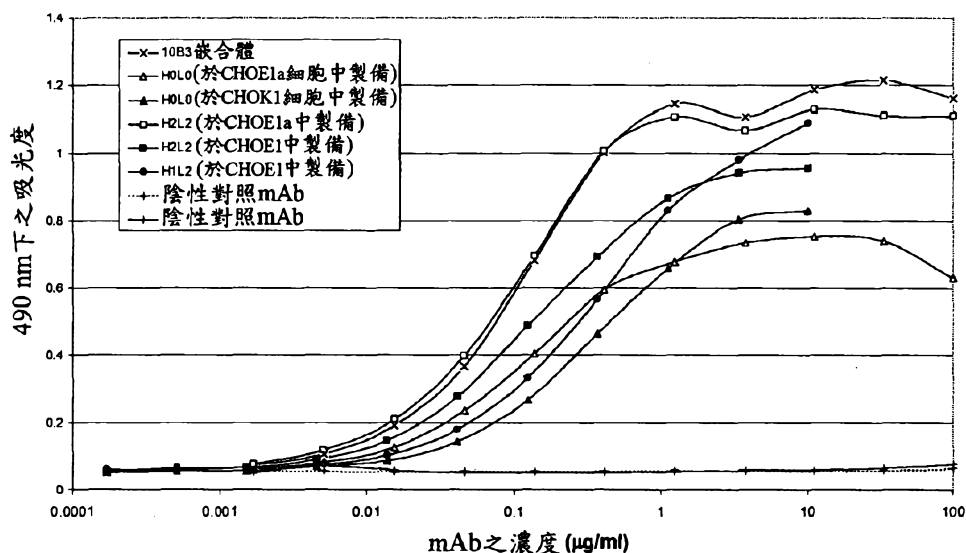
(54)名稱

新穎抗原結合蛋白

NOVEL ANTIGEN BINDING PROTEINS

(57)摘要

本發明係關於一種與肌肉抑制素結合之抗原結合蛋白(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。本發明亦係關於一種以該等抗原結合蛋白於治療或預防與降低之肌肉質量、肌力及肌肉功能中之任一者或其組合相關之疾病上的用途。





(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 201029662 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 08 月 16 日

(21)申請案號：098143432

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 17 日

(51)Int. Cl.：

A61K38/16 (2006.01)

C07K16/18 (2006.01)

C12N15/09 (2006.01)

A61P21/00 (2006.01)

(30)優先權：2008/12/19

美國

61/138,980

(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：亞士曼 克萊兒 ASHMAN, CLAIRE (GB)；畢登 安德魯 BEATON, ANDREW (GB)；艾里斯 喬納森 亨利 ELLIS, JONATHAN HENRY (GB)；漢 伯俊 HAN, BAJIN (US)；克比 伊恩 KIRBY, IAN (GB)；庫爾 佛德瑞 KULL, FREDERICK (US)；路易斯 艾倫 LEWIS, ALAN (GB)；李德雷 凱瑞 麥森 LINDLEY, KATHRYN MASON (US)；歐加 馬丁 安伯 ORECCHIA, MARTIN ANIBAL (IT)；沈揚 SHEN, YING (US)；威爾森 保羅 WILSON, PAUL (GB)；武田賢 XU, TIAN SHUN (US)；張紅 ZHANG, HONG (CN)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：23 項 圖式數：26 共 210 頁

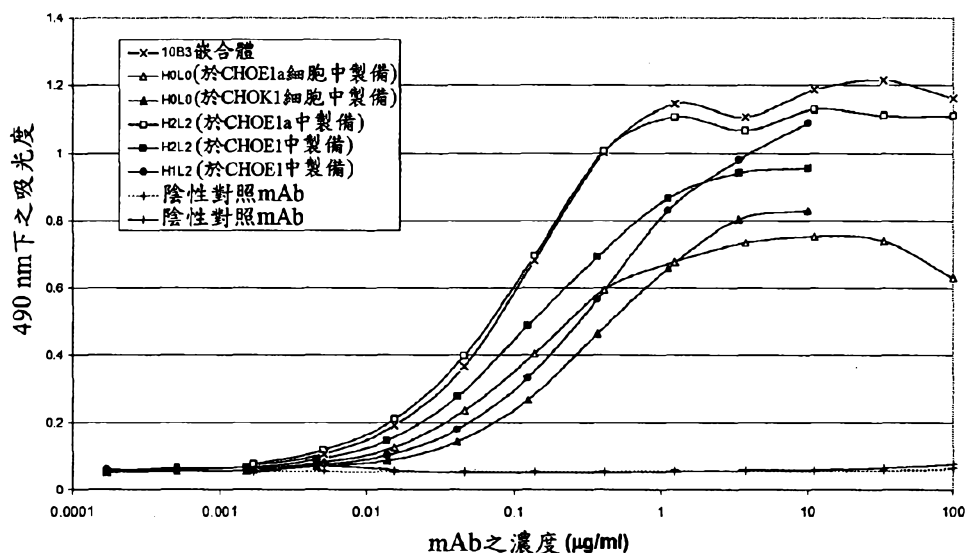
(54)名稱

新穎抗原結合蛋白

NOVEL ANTIGEN BINDING PROTEINS

(57)摘要

本發明係關於一種與肌肉抑制素結合之抗原結合蛋白(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。本發明亦係關於一種以該等抗原結合蛋白於治療或預防與降低之肌肉質量、肌力及肌肉功能中之任一者或其組合相關之疾病上的用途。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種與肌肉抑制素結合之抗原結合蛋白(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抗原結合蛋白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的用途。

【先前技術】

亦稱為生長分化因子(GDF-8)之肌肉抑制素為轉化生長因子- β (TGF- β)超家族之成員且為肌肉質量之負調控劑。肌肉抑制素在整個演化過程中高度保守，且人類、雞、小鼠及大鼠之序列在成熟C端域中100%一致。肌肉抑制素係以含有信號序列、前肽域及C端域之前驅蛋白形式合成。在與前肽域及/或其他抑制蛋白相關之潛伏複合物中，經分泌、循環形式之肌肉抑制素包括活性成熟C端域及包含成熟C端域之非活性形式。

存在與低肌肉質量、肌力及肌肉功能相關之許多不同疾病、病症及病狀。增加運動及較佳營養為治療該等疾病之當前療法的主要支持。不幸的是，就患者而言，由於持續性及順應性較差，故增強身體活動之益處很難實現。又，運動對於一些患者可能有困難、感疼痛或無法進行。此外，與運動相關之肌肉施力可能不足以對肌肉產生任何有益作用。若存在潛在的飲食缺乏且患者具有足夠食慾，則僅營養介入有效。由於此等限制，具有較廣泛可得之益處

的對與肌肉質量、肌力及肌肉功能中之任一者或其組合降低相關之疾病的治療為實質上未得到滿足之需要。

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)。又，Wagner等人(Ann Neurol. (2008) 63(5): 561-71)描述當使用一種所述抗肌肉抑制素抗體時，成人肌營養不良(貝克型肌營養不良(Becker muscular dystrophy)、面肩肱型肌營養不良(facioscapulohumeral dystrophy)及肢帶型肌營養不良(limb-girdle muscular dystrophy))之肌力或肌肉功能的探察終點並無改良。

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較有效療法。

【發明內容】

本發明提供一種與肌肉抑制素結合之抗原結合蛋白。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。

本發明提供一種與肌肉抑制素結合且包含SEQ ID NO: 3之CDRH3或變異型CDRH3之抗原結合蛋白。

本發明亦提供一種與肌肉抑制素結合且包含SEQ ID NO: 7之可變域序列之相應CDRH3或其變異型CDRH3的抗原結合蛋白。

本發明亦提供一種與肌肉抑制素結合且包含含有SEQ ID NO: 7之Kabat殘基95-101之結合單元H3或變異型H3的抗原

結合蛋白。

本發明亦提供一種與肌肉抑制素結合且包含以下之抗原結合蛋白：

- (i) 選自 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 25 之重鏈可變區；及/或選自 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 21 之輕鏈可變區；或具有 75% 或 75% 以上之序列一致性的變異型重鏈可變區或輕鏈可變區；或
- (ii) SEQ ID NO: 26 之重鏈；及/或選自 SEQ ID NO: 27 或 SEQ ID NO: 37 之輕鏈；或具有 75% 或 75% 以上之序列一致性的變異型重鏈或輕鏈。

本發明亦提供一種與肌肉抑制素結合且包含以下之抗原結合蛋白：

- (i) 選自 SEQ ID NO: 12、13 或 14 中之任一者的重鏈可變區；及/或選自 SEQ ID NO: 15、16、17、18 或 24 中之任一者的輕鏈可變區；或具有 75% 或 75% 以上之序列一致性的變異型重鏈可變區或輕鏈可變區；或
- (ii) 選自 SEQ ID NO: 28、29、30、98 或 99 中之任一者的重鏈；及/或選自 SEQ ID NO: 31、32、33、34 或 40 中之任一者的輕鏈；或具有 75% 或 75% 以上之序列一致性的變異型重鏈或輕鏈。

本發明亦提供一種編碼如本文所定義之抗原結合蛋白之核酸分子。本發明亦提供一種包含如本文所定義之核酸分子之表現載體。本發明亦提供一種包含如本文所定義之表現載體之重組宿主細胞。本發明亦提供一種產生如本文所

定義之抗原結合蛋白之方法，該方法包含培養如上所定義之宿主細胞及回收該抗原結合蛋白之步驟。本發明亦提供一種包含如本文所定義之其抗原結合蛋白及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。

本發明亦提供一種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，該方法包含投與治療有效量之如本文所定義之抗原結合蛋白之步驟。

本發明提供一種治療罹患以下疾病之個體的方法：肌肉減少症、惡病質、肌肉消瘦(muscle-wasting)、廢用性肌肉萎縮、HIV、AIDS、癌症、外科疾病、灼傷、肌骨或神經創傷或損傷、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、肌營養不良、運動神經元神經病、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、脂肪肝(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、類固醇誘發之肌肉消瘦、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抗原結合蛋白之步驟。

本發明提供一種增加個體之肌肉質量、增強個體之肌力及/或改良個體之肌肉功能的方法，該方法包含投與治療有效量之如本文所定義之抗原結合蛋白之步驟。

本發明提供一種如本文所述之抗原結合蛋白，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。

本發明提供一種如本文所述之抗原結合蛋白，其係用於治療以下疾病：肌肉減少症、惡病質、肌肉消瘦、廢用性肌肉萎縮、HIV、AIDS、癌症、外科疾病、灼傷、肌骨或神經創傷或損傷、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、肌營養不良、運動神經元神經病、肌肉萎縮性側索硬化(ALS)、帕金森氏病、骨質疏鬆症、骨關節炎、脂肪肝、肝硬化、艾迪森氏病、庫欣氏肌肉消瘦(Cushing's muscle wasting)、肌炎或脊柱側彎。

本發明提供一種如本文所述之抗原結合蛋白，其係用於增加個體之肌肉質量、增強個體之肌力及/或改良個體之症候群、急性呼吸窘迫症候群、類固醇誘發之肌肉功能的方法中。

本發明提供如本文所述之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：肌肉減少症、惡病質、肌肉消瘦、廢用性肌肉萎縮、HIV、AIDS、癌症、外科疾病、灼傷、肌骨或神經創傷或損傷、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、肌營養不良、運動神經元神經病、肌肉萎縮性側索硬化(ALS)、帕金森氏病、骨質疏鬆症、骨關節炎、脂肪肝、肝硬化、艾迪森氏病、庫欣氏肌肉消瘦、肌炎或脊柱側彎。

本發明提供如本文所述之抗原結合蛋白之用途，其係用於製造在增加個體之肌肉質量、增強個體之肌力及/或改良個體之症候群、急性呼吸窘迫症候群、類固醇誘發之肌肉功能之方法中使用的藥劑。

【實施方式】

本發明提供一種與例如均二聚成熟肌肉抑制素之肌肉抑制素結合之抗原結合蛋白。該抗原結合蛋白可結合並中和肌肉抑制素，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 均係指以下任一者：全長未經加工前驅形式之肌肉抑制素；由 C 端域轉譯後裂解產生且呈潛伏形式及非潛伏(活性)形式之成熟肌肉抑制素。術語肌肉抑制素亦係指保留一或多種與肌肉抑制素相關之生物活性的任何肌肉抑制素片段及變異體。

全長未經加工前驅形式之肌肉抑制素包含前肽及 C 端域，該 C 端域在有或無信號序列之情況下形成成熟蛋白。肌肉抑制素前肽加上 C 端域亦稱為聚合蛋白。肌肉抑制素

前驅體可以單體或均二聚體形式存在。

成熟肌肉抑制素為由肌肉抑制素前驅蛋白之C端(亦稱為C端域)裂解產生之蛋白質。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成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與SEQ ID NO: 104所示之均二聚成熟肌肉抑制素結合。

肌肉抑制素前肽為在信號序列裂解之後由肌肉抑制素前驅蛋白之N端域裂解產生之多肽。前肽亦稱為潛伏相關肽(LAP)。肌肉抑制素前肽能夠與成熟肌肉抑制素上之前肽結合域非共價結合。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之蛋白質複合物。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。替代一或兩種肌肉抑制素前肽或除此之外，肌肉抑制素潛伏複合物可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)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前驅形式、成熟形式、單體形式、二聚形式、潛伏形式及活性形式之肌肉抑制素

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。當抗原結合蛋白與前肽及/或卵泡抑素形成複合物時，該抗原結合蛋白可能結合或可能不結合肌肉抑制素。或者，當抗原結合蛋白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，該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，抗原結合蛋白與成熟二聚肌肉抑制素結合。

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」在本文中以最寬泛含義使用以指代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、微型雙功能抗體、Tandabs™等(關於替代性「抗體」形式之概述，參見Holliger及Hudson, Nature Biotechnology, 2005，第23卷，第9期，1126-1136)。

短語「單可變域」係指獨立於不同可變區或可變域而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(例如，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} 為源自包括駱駝、美洲駝、羊駝、單峰駱駝及原駝之物種的免疫球蛋白單可變域多肽，其產生天然不含輕鏈之重鏈抗體。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，且該等結構域被視為「域抗體」。如本文所用之 V_H 包括駱駝科動物 V_{HH} 域。

如本文所用之術語「域/結構域」係指具有與蛋白質之其餘部分無關之三級結構的摺疊蛋白質結構。一般而言，結構域對蛋白質之離散功能特性負責，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使蛋白質其餘部分及/或結構域之功能損失。「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，其包括完全抗體可變域及經修飾之可變域(例如其中一或多個環已經並非抗體可變域所特有之序列置換)，或已經截短或包含N端或C端延長之抗體可變域，以及至少保留全長域之結合活性及特異性的可變域摺疊片段。結構域可獨立於不同可變區或可變域而結合抗原或抗原決定基。

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來提供抗原結合片段。非抗體蛋白質骨架或結構域為已歷經蛋白質工程改造以與除其天然配位體以外之配位體獲得結合性的非抗體蛋白質骨架或結構域，例如作為骨架衍生物之結構域，該骨架係選自：CTLA-4 (Evibody)；脂質運載蛋白(lipocalin)；源自蛋白質A之分子，諸如蛋白質

A之Z域(Affibody, SpA)、A域(Avimer/Maxibody)；熱休克蛋白，諸如GroEl及GroES；運鐵蛋白(trans-body)；錨蛋白重複蛋白(DARPin)；肽適體；C型凝集素域(Tetranectin)；人類 γ -晶狀體球蛋白及人類泛素(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(adnectin)；其已歷經蛋白質工程改造以與除其天然配位體以外之配位體獲得結合性。

CTLA-4(細胞毒性T淋巴細胞相關抗原4)為主要在CD4+T細胞上表現之CD28家族受體。其胞外域具有可變域樣Ig摺疊。對應於抗體CDR之環可經異源序列取代以賦予不同結合特性。經工程改造而具有不同結合特異性之CTLA-4分子亦稱為Evibody。欲知詳情，參見Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001)。

脂質運載蛋白為輸送諸如類固醇、後膽色素、類視色素及脂質之疏水性小分子的細胞外蛋白質家族。脂質運載蛋白具有在典型結構之開放端具多個環的硬性 β -摺疊二級結構，其可經工程改造以與不同標靶抗原結合。抗運載蛋白(anticalin)之大小介於160-180個胺基酸之間，且係源自脂質運載蛋白。欲知詳情，參見Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000)；US7250297B1；及US20070224633。

affibody為源自金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)之蛋白質A的骨架，其可經工程改造以與抗原結合。該結構域由具有約58個胺基酸之三螺旋束組成。文庫已藉由使

表面殘基隨機化而產生。欲知詳情，參見 Protein Eng. Des. Sel. 17, 455-462 (2004)及 EP1641818A1。

Avimer為源自A域骨架家族之多域蛋白。具有約35個胺基酸之原生域採用規定二硫鍵鍵結之結構。A域家族所展現之天然變化之改組產生多樣性。欲知詳情，參見 Nature Biotechnology 23(12), 1556-1561 (2005)及 Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (2007年6月)。

運鐵蛋白為單體血清輸送糖蛋白。可藉由將肽序列(諸如一或多個CDR)插入容許性表面環中來對運鐵蛋白進行工程改造以結合不同標靶抗原。經工程改造之運鐵蛋白骨架之實例包括 Trans-body。欲知詳情，參見 J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999)。

經設計之錨蛋白重複蛋白(DARPin)係源自錨蛋白，一種介導整合膜蛋白與細胞骨架連接之蛋白質家族。單一錨蛋白重複序列為由兩個 α -螺旋及一個 β -轉角(β -turn)組成的33個殘基之基元。可藉由使各重複序列之第一 α -螺旋及 β -轉角中之殘基隨機化，或插入肽序列(諸如一或多個CDR)來對錨蛋白重複蛋白進行工程改造以結合不同標靶抗原。錨蛋白重複蛋白之結合界面可藉由增加模組之數目(一種親和力成熟方法)而增加。欲知詳情，參見 J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003)及 J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007)及 US20040132028A1。

纖維結合蛋白為可經工程改造以與抗原結合之骨架。Adnectin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結構組成。 β -夾層一端之三個環可經工程改造以使Adnectin能夠特異性識別相關治療標靶。欲知詳情，參見Protein Eng. Des. Sel. 18, 435-444 (2005)；US20080139791；WO2005056764；及US6818418B1。

肽適體為由恆定骨架蛋白組成之組合識別分子，該恆定骨架蛋白通常為含有在活性位點處插入之限制性可變肽環的硫氧還蛋白(TrxA)。欲知詳情，參見Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005)。

微體係源自含有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；微蛋白之實例包括KalataB1及芋螺毒素(conotoxin)及打結素(knottin)。微蛋白具有可經工程改造以包括至多25個胺基酸而不影響微蛋白之整體摺疊的環。欲知經工程改造之打結素域的詳情，參見WO2008098796。

其他結合域包括已用作對不同標靶抗原結合特性進行工程改造之骨架的蛋白質，包括人類 γ -晶狀體球蛋白及人類泛素(affilins)、人類蛋白酶抑制劑之孔尼茲型域、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(tetranectin))，其評述於Non-Antibody Scaffolds- 第7章，Handbook of Therapeutic Antibodies (2007, Stefan Dubel編)及Protein Science 15:14-27 (2006)中。本發明之結合域可源自任一此等替代性蛋白域及移植至結構域上之本發明CDR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與其他(例如無關)蛋白質結合或不與之顯著結合。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。本文所述之抗原結合蛋白可以至少為與密切相關分子(諸如GDF-11)結合之親和力的2倍、5倍、10倍、50倍、100倍或1000倍之親和力與肌肉抑制素結合。

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1 pM與500 pM之間；或介於500 pM與1 nM之間。抗原結合蛋白之結合親和力係由締合速率常數(k_a)及解離速率常數(k_d)($K_D=K_d/K_a$)測定。結合親和力可由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，結合親和力可由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上來量測。實例 5.1 中所述之 FORTEbio 方法可用於量測結合親和力。然而，由於本發明之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達成分級目的。

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。較慢 K_d 可使得抗原結合蛋白-配位體複合物較慢解離且配位體中和得到改良。

如本說明書通篇所用之術語「中和」意謂在活體外或活體內，與不存在抗原結合蛋白之情況下肌肉抑制素之活性相比，在如本文所述之抗原結合蛋白存在下肌肉抑制素之生物活性降低。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。中和可歸因於阻斷肌肉抑制素與其受體結合，且從而阻止肌肉抑制素活化其受體。

肌肉抑制素活性包括一或多種與活性肌肉抑制素相關之生長活性、調控活性及形態發生活性，例如調節肌肉質量、肌力及肌肉功能。與活性肌肉抑制素相關之其他活性可包括調節肌肉纖維數目、肌肉纖維大小、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；肌肉生長及肌肉功能所涉及之蛋白質合成或異化。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。中和抗原結合蛋白相對於在不存在該抗原結合蛋白之情況下肌肉抑制素之活性可將肌肉抑制素之活性中和至少20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在功能分析法(諸如以下所述之中和分析法)中， IC_{50} 為使生物反應降至其最大值之50%的濃度。

中和作用可使用熟習此項技術者已知或如本文所述之一或多種分析法來測定或量測。舉例而言，可在夾心ELISA中由BIAcore™、FMAT、FORTEbio™或類似活體外分析法(諸如表面電漿共振)來評估抗原結合蛋白與肌肉抑制素之結合性。

基於ELISA之受體結合分析法可用於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受體之結合性來測定抗原結合蛋白之中和活性(欲知詳情，參見實例2.5)。受體中和分析法為可用於基於效能區分 IC_{50} 低於1 nM之分子的敏感性方法。然而，該分析法本身對結合感受態生物素標記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，基於細胞之受體結合分析法可用於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由

其在PAI-1特異性啟動子控制下、在經編碼螢光素酶基因之構築體轉染之橫紋肌肉瘤細胞(A204)中抑制肌肉抑制素誘導之螢光素酶活性的能力來鑑別，亦稱為肌肉抑制素反應性報導基因分析法(欲知詳情，參見實例1.2)。

活體內中和作用可使用展示肌肉質量、肌力及肌肉功能中之任一者或其組合之變化的許多不同動物分析法來測定。舉例而言，體重、肌肉質量(諸如瘦肌肉質量)、肌肉收縮性(例如強直收縮力)、握力、動物自我懸吊之能力及游泳測試可單獨或以任何組合形式使用，以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。

熟習此項技術者顯而易見的是，術語「源自」不僅意欲定義在作為材料之物理起源之意義上的來源，而且定義在結構上與材料相同但並非起源於參考來源之材料。因此，「供體抗體中所見之殘基」未必需要自供體抗體純化得到。

分離意謂自其所存在之自然界環境中移出諸如抗原結合蛋白之分子。舉例而言，分子可經過純化而與自然界中通常與之一起存在之物質分開。舉例而言，就含有抗原結合蛋白之培養基而言，可將抗原結合蛋白純化為至少95%、96%、97%、98%或99%或99%以上。

「嵌合抗體」係指一種類型之工程改造抗體，其含有源自供體抗體且與源自受體抗體之輕鏈及重鏈恆定區相關聯

的天然存在之可變區(輕鏈及重鏈)。

「人類化抗體」係指一種類型之工程改造抗體，其具有一或多個源自非人類供體免疫球蛋白之CDR，該分子之其餘免疫球蛋白源性部分係源自一或多個人類免疫球蛋白。另外，可改變構架支持殘基以保存結合親和力(參見，例如Queen等人，Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989)；Hodgson等人，Bio/Technology, 9:421 (1991))。適合之人類受體抗體可為基於與供體抗體之核苷酸及胺基酸序列之同源性而選自例如KABAT®資料庫、Los Alamos資料庫及Swiss Protein資料庫之習知資料庫的人類受體抗體。特徵為與供體抗體之構架區之同源性(在胺基酸基礎上)的人類抗體可適於為插入供體CDR提供重鏈恆定區及/或重鏈可變構架區。可以類似方式選擇能夠供給輕鏈恆定區或可變構架區之適合受體抗體。應注意，受體抗體重鏈及輕鏈並不需要起源於相同受體抗體。先前技術描述產生該等人類化抗體之若干方式，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其可變區、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之具有供體抗體所特有之抗原特異性及中和活性的經表現且經改變之抗體。

術語「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受體抗體之重鏈及/或輕

鏈構架區及/或該受體抗體之重鏈及/或輕鏈恆定區的所有胺基酸序列(或胺基酸序列之任何部分)。人類抗體可為受體抗體。

術語「 V_H 」及「 V_L 」在本文中用於分別指代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。

在本說明書通篇，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編號規定來編號。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。欲知詳細資訊，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)。

熟習此項技術者顯而易見的是，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存在。CDR序列之替代性編號規定亦存在，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意謂其他殘基被視為CDR序列之一部分且將為熟習此項

技術者如此理解。因此，術語「相應CDR」在本文中用於指代使用任何編號規定之CDR序列，例如表1中所述之編號規定。

可為熟習此項技術者所用之其他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。

下表1表示一種使用各編號規定對各CDR或結合單元之定義。Kabat編號機制在表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與抗原特異性結合之位點。此抗原結合位點可為單域(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」係指與抗原結合蛋白之特定結合域接觸之抗原部分。抗原決定基可呈線性，其包含來自抗原之基本上呈線性的胺基酸序列。或者，抗原

決定基可具有構形或為不連續的。舉例而言，構形抗原決定基包含需要結構限制成份之胺基酸殘基。不連續抗原決定基包含由其他序列隔斷(亦即不處於抗原一級序列之連續序列中)之胺基酸殘基。在抗原三級結構及四級結構之情形下，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，且若需要，則屆時以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)，將為兩個序列之最佳比對所需引入之空隙數及各空隙長度考慮在內。可如下所述，使用數學演算法來實現兩個序列之間的序列比較及一致性百分比之測定。

兩個核苷酸序列之間的一致性百分比可使用GCG套裝軟體之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。兩個核苷酸序列或胺基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)中之E. Meyers及W. Miller之演算法(Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988))，使用PAM120權數餘量表、空隙長度罰分12及空隙罰分4來確定。另外，兩個胺基酸序列之間的一致性百分比可使用已併入GCG套裝軟體之GAP程式中的Needleman及Wunsch之演算

法(J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970))，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。

舉例而言，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；或與參考序列相比可包括至多某一整數量之核苷酸變更，諸如至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。該等變更係選自由至少一個核苷酸缺失、取代(包括轉換及易位)或插入，且其中該等變更可在參考核苷酸序列之5'端位或3'端位處或彼等端位之間的任何處發生，其個別地散布於參考序列之核苷酸中或以一或多個相連群組散布於參考序列中。核苷酸變更數係藉由將如本文所述之參考聚核苷酸序列(參見例如 SEQ ID NO: 41-55)之核苷酸總數乘以各別一致性百分比之數值百分比(除以100)且用如本文所述之參考聚核苷酸序列(參見例如 SEQ ID NO: 41-55)之該核苷酸總數減去彼乘積來確定，或：

$$n_n \leq x_n - (x_n \bullet y),$$

其中 n_n 為核苷酸變更數， 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)之核苷酸總數，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%)， $\bullet$ 為乘法運算子符號，且其中將 x_n 與 y 之任何非整數乘積四捨五入至最接近之整數，隨後用 x_n 減去該整數。

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或82-108)一致，亦即100%一致；或與參考序列相比可包括至多某一整數量之胺基酸變更，使得一致性%小於100%，諸如至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。該等變更係選自由至少一個胺基酸缺失、取代(包括保守性及非保守性取代)或插入組成之群，且其中該等變更可在參考多肽序列之胺基端位或羧基端位處或彼等端位之間的任何處發生，其個別地散布於參考序列之胺基酸中或以一或多個相連群組散布於參考序列中。既定一致性%之胺基酸變更數係藉由將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)所編碼之多肽序列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)且接著用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)之該胺基酸總數減去彼乘積來確定，或：

$$n_a \leq x_a - (x_a \bullet y),$$

其中 n_a 為胺基酸變更數， x_a 為如本文所述之參考多肽序列(參見例如SEQ ID NO: 7-40或82-108、98或99)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%)，•為乘法運算子符號，且其中將 x_a 與 y 之任何非整數乘積四捨五入至最接近之整數，隨後用 x_a 減去該整數。

可在序列全長或其任何片段上及在有或無插入或缺失的情況下確定一致性%。

術語「肽」、「多肽」及「蛋白質」各指代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。

在此項技術中充分認識到，某些胺基酸取代視為具有「保守性」。基於常見側鏈特性將胺基酸分組，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

本發明提供一種與肌肉抑制素結合且包含SEQ ID NO: 3之CDRH3或其變異型CDRH3(例如SEQ ID NO: 82-92或110中之任一者)之抗原結合蛋白。該抗原結合蛋白亦可中和肌肉抑制素活性。

本發明亦提供一種與肌肉抑制素結合且包含SEQ ID NO:

2之CDRH2或其變異型CDRH2(例如SEQ ID NO: 93-97中之任一者)之抗原結合蛋白。該抗原結合蛋白亦可中和肌肉抑制素活性。

抗原結合蛋白除上述CDRH3或CDRH2序列以外可進一步包含任何組合形式之一或多個CDR或所有CDR，該等CDR係選自：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中之任一者)。

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

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。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。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。

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

抗原結合蛋白可包含CDRH1(SEQ ID NO: 1)、CDRH2 (SEQ ID NO: 2)、CDRH3(SEQ ID NO: 3)、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CDRH3變異體SEQ ID NO: 82-92或110中之任一者；或CDRH2變異體SEQ ID NO: 93-97中之任一者)。

本發明亦提供一種與肌肉抑制素結合且包含SEQ ID NO: 7之可變域序列之相應CDRH3或其變異型CDRH3的抗原結合蛋白。該抗原結合蛋白亦可中和肌肉抑制素活性。抗原結合蛋白可為嵌合抗體或人類化抗體。

抗原結合蛋白可進一步包含一或多個或所有選自SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 8之可變域序列的相應CDR或其變異

型 CDR。

舉例而言，抗原結合蛋白可包含相應 CDRH3 及相應 CDRH1 或其變異體。抗原結合蛋白可包含相應 CDRH3 及相應 CDRH2 或其變異體。抗原結合蛋白可包含相應 CDRH1、相應 CDRH2 及相應 CDRH3 或其變異體。

抗原結合蛋白可包含相應 CDRL1 及相應 CDRL2 或其變異體。抗原結合蛋白可包含相應 CDRL2 及相應 CDRL3 或其變異體。抗原結合蛋白可包含相應 CDRL1、相應 CDRL2 及相應 CDRL3 或其變異體。

抗原結合蛋白可包含相應 CDRH3 及相應 CDRL3 或其變異體。抗原結合蛋白可包含相應 CDRH3、相應 CDRH2 及相應 CDRL3 或其變異體。抗原結合蛋白可包含相應 CDRH3、相應 CDRH2、相應 CDRL2 及相應 CDRL3 或其變異體。

抗原結合蛋白可包含相應 CDRH1、相應 CDRH2、相應 CDRH3、相應 CDRL1、相應 CDRL2 及相應 CDRL3 或其變異體。

相應 CDR 可參考 Kabat (1987)、Chothia (1989)、AbM 或接觸方法來定義。各方法之一種定義可見於表 1 中且可應用於參考重鏈可變域 SEQ ID NO: 7 及參考輕鏈可變域 SEQ ID NO: 8 以確定相應 CDR。

本發明亦提供一種與肌肉抑制素結合且包含含有 SEQ ID NO: 7 之 Kabat 殘基 95-101 之結合單元 H3 或變異型 H3 的抗原結合蛋白。該抗原結合蛋白亦可中和肌肉抑制素。

抗原結合蛋白可進一步包含一或多個或所有選自以下之

結合單元：包含SEQ ID NO: 7之Kabat殘基31-32之H1、包含SEQ ID NO: 7之Kabat殘基52-56之H2、包含SEQ ID NO: 8之Kabat殘基30-34之L1、包含SEQ ID NO: 8之Kabat殘基50-55之L2及包含SEQ ID NO: 8之Kabat殘基89-96之L3，或變異型結合單元。

舉例而言，抗原結合蛋白可包含結合單元H3及結合單元H1或其變異體。抗原結合蛋白可包含結合單元H3及結合單元H2或其變異體。抗原結合蛋白可包含結合單元H1、結合單元H2及結合單元H3，或其變異體。

抗原結合蛋白可包含結合單元L1及結合單元L2或其變異體。抗原結合蛋白可包含結合單元L2及結合單元L3或其變異體。抗原結合蛋白可包含結合單元L1、結合單元L2及結合單元L3，或其變異體。

抗原結合蛋白可包含結合單元H3及結合單元L3或其變異體。抗原結合蛋白可包含結合單元H3、結合單元H2及結合單元L3，或其變異體。抗原結合蛋白可包含結合單元H3、結合單元H2、結合單元L2及結合單元L3，或其變異體。

抗原結合蛋白可包含結合單元H1、結合單元H2、結合單元H3、結合單元L1、結合單元L2及結合單元L3，或其變異體。

CDR變異體或變異型結合單元包括由至少一個胺基酸修飾之胺基酸序列，其中該修飾可為化學修飾或胺基酸序列之部分變更(例如不多於10個胺基酸)，此修飾使變異體保

留未經修飾序列之生物特徵。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更可為一至數個胺基酸之缺失或取代，或一至數個胺基酸之添加或插入，或其組合(例如不多於10個胺基酸)。CDR變異體或結合單元變異體在胺基酸序列中可含有任何組合形式之1個、2個、3個、4個、5個或6個胺基酸取代、添加或缺失。CDR變異體或結合單元變異體在胺基酸序列中可含有任何組合形式之1個、2個或3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傾向於在結構上展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)來定義，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)來決定。Martin及Thornton (1996; J Mol Biol 263:800-815)已創造一種定義「關鍵殘基」典型模板之自動方法。使用群集分析來定義CDR組之典型類別，且接著藉由分析內埋式疏水物(buried hydrophobic)、與氫鍵結之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比較且使用一致性或相似性矩陣對各模板進行記分來將抗體序列之CDR歸類為典型類別。

Kabat編號之前的胺基酸為SEQ ID NO: 14或24之原始胺基酸序列且Kabat編號末尾之胺基酸序列為經取代之胺基

酸的CDR典型類別之實例包括：

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

CDRH2典型類別：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；

CDRH3典型類別：V102Y、V102H、V102I、V102S、V102D、V102G。

L1典型類別：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；

CDRL2典型類別：A51T、A51G、A51V；

CDRL3典型類別：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、每個相應CDR、每個結合單元、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可存在多個變異型CDR典型位置，且因此本發明之抗原結合蛋白中可存在任何取代組合。

CDR變異體或變異型結合單元之其他實例包括(使用Kabat編號機制，其中Kabat編號之前的胺基酸為SEQ ID NO: 14或24之原始胺基酸序列且Kabat編號末尾之胺基酸序列為經取代之胺基酸)：

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，與肌肉抑制素結合之本發明抗原結合蛋白可包含SEQ ID NO: 90之CDRH3。該抗原結合蛋白可進一步包含SEQ ID NO: 93-97中之任一者之CDRH2。詳言之，CDRH2可為SEQ ID NO: 95。抗原結合蛋白亦可包含SEQ ID NO: 109之CDRL3。抗原結合蛋白可進一步包含CDRH1(SEQ ID NO: 1)、CDRL1(SEQ ID NO: 4)及

CDRL2(SEQ ID NO: 5)中之任一者或其組合或全部。抗原結合蛋白亦可中和肌肉抑制素活性。

包含所述CDR、相應CDR、變異型CDR、結合單元或變異型結合單元之抗原結合蛋白可展示如EC₅₀所示，與肌肉抑制素結合之效能可在10B3或10B3嵌合體(重鏈：SEQ ID NO: 7或25，輕鏈：SEQ ID NO: 8)所示之效能的10倍以內或5倍以內。如EC₅₀所示，與肌肉抑制素結合之效能可由ELISA分析法得到。

抗原結合蛋白可能會或可能不會在重鏈之胺基酸Kabat位置54處用天冬胺酸(D)或麩醯胺酸(Q)取代天冬醯胺(N)。抗原結合蛋白變異體可能會或可能不會在輕鏈之胺基酸位置91處用絲胺酸(S)取代半胱胺酸(C)。舉例而言，抗原結合蛋白在輕鏈之位置91處具有絲胺酸(S)殘基且在重鏈之位置54處具有天冬醯胺(N)。

抗原結合蛋白可變重鏈可在位置28處具有絲胺酸(S)或蘇胺酸(T)胺基酸殘基；及/或在位置105處具有蘇胺酸(T)或麩醯胺酸(Q)胺基酸殘基。抗原結合蛋白可變輕鏈可在位置16處具有精胺酸(R)或甘胺酸(G)胺基酸殘基；及/或在位置71處具有酪胺酸(Y)或苯丙胺酸(F)胺基酸殘基；及/或在位置100處具有丙胺酸(A)或麩醯胺酸(Q)胺基酸殘基。舉例而言，抗原結合蛋白可在可變重鏈之位置28處包含絲胺酸(S)，在位置105處包含麩醯胺酸(Q)；及/或在可變輕鏈之位置16處包含甘胺酸(G)，在位置71處包含酪胺酸(Y)，及在位置100處包含麩醯胺酸(Q)。

如以上所討論，CDR之特定典型結構類別係由CDR長度與環填充來定義，由位於CDR與構架區中之關鍵位置處的殘基來決定。因此，除SEQ ID NO: 1-3中所列之CDR、SEQ ID NO: 82-97及SEQ ID NO: 109中所列之變異型CDR、相應CDR、結合單元或其變異體以外，本發明之抗原結合蛋白之典型構架殘基亦可包括(使用Kabat編號)：

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

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

本發明之抗原結合蛋白中可存在上述構架位置中之任一者、其任何組合或全部。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可存在多個變異型構架典型位置，且因此本發明之抗原結合蛋白中可存在任何組合。

舉例而言，重鏈可變構架可在位置2處包含V，在位置4

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

本文所述之一或多個CDR、相應CDR、變異型CDR或結合單元可在人類構架之情形下存在，例如以人類化可變域或嵌合可變域存在。

人類化重鏈可變域可在構架區與SEQ ID NO: 10之人類受體可變域序列具有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、99%或99%以上或100%之一致性的受體抗體構架內包含SEQ ID NO: 1-3中所列之CDR；SEQ ID NO: 82-97及110及SEQ ID NO: 109中所列之變異型CDR；相應CDR；結合單元；或其變異體。人類化輕鏈可變域可在構架區與SEQ ID NO: 11之人類受體可變域序列具有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、99%或99%以上或100%之一致性的受體抗體構架內包含SEQ ID NO: 4-6中

所列之CDR；SEQ ID NO: 82-97及110及SEQ ID NO: 109中所列之變異型CDR；相應CDR；結合單元；或其變異體。在SEQ ID NO: 10與SEQ ID NO: 11中，CDRH3之位置已由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，而非各CDR中胺基酸序列數目之量度。

本發明亦提供一種與肌肉抑制素結合且包含以下重鏈與輕鏈可變區組合中之任一者的抗原結合蛋白：10B3(SEQ ID NO: 7與SEQ ID NO: 8)、10B3C(SEQ ID NO: 25與SEQ ID NO: 8)或10B3C-C91S(SEQ ID NO: 25與SEQ ID NO: 21)。該抗原結合蛋白亦可中和肌肉抑制素。

本發明亦提供一種與肌肉抑制素結合且包含選自SEQ ID NO: 12、13、14、22及23中之任一者之重鏈可變區的抗原結合蛋白。該抗原結合蛋白可包含選自SEQ ID NO: 15、16、17、18或24中之任一者之輕鏈可變區。任一重鏈可變區均可與任一輕鏈可變區組合。抗原結合蛋白亦可中和肌肉抑制素。

抗原結合蛋白可包含以下重鏈與輕鏈可變區組合中之任一者：H0L0(SEQ ID NO: 12與SEQ ID NO: 15)、H0L1(SEQ ID NO: 12與SEQ ID NO: 16)、H0L2(SEQ ID NO: 12與SEQ ID NO: 17)、H0L3(SEQ ID NO: 12與SEQ ID NO: 18)、H1L0(SEQ ID NO: 13與SEQ ID NO: 15)、H1L1(SEQ ID NO: 13與SEQ ID NO: 16)、H1L2(SEQ ID NO: 13與SEQ ID NO: 17)、H1L3(SEQ ID NO: 13與SEQ ID NO: 18)、H2L0(SEQ ID NO: 14與SEQ ID NO: 15)、

H2L1(SEQ ID NO: 14與SEQ ID NO: 16)、H2L2(SEQ ID NO: 14與SEQ ID NO: 17)、H2L3(SEQ ID NO: 14與SEQ ID NO: 18)、H2L2-C91S(SEQ ID NO: 14與SEQ ID NO: 24)。

抗體重鏈可變區可與SEQ ID NO: 7、25、12、13、14、19、20、22或23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%之一致性。抗體輕鏈可變區可與SEQ ID NO: 8、15、16、17、18、21或24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%之一致性。

可在序列全長上確定SEQ ID NO: 7、25、12、13、14、19、20、22、23、8、15、16、17、18、21或24之變異體的一致性百分比。

抗體重鏈可變區可為SEQ ID NO: 7、25、12、13、14、19、20、22或23中之任一者之變異體，該變異體含有30個、25個、20個、15個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個或1個胺基酸取代、插入或缺失。抗體輕鏈可變區可為SEQ ID NO: 8、15、16、17、18、21或24中之任一者之變異體，該變異體含有30個、25個、20個、15個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個或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以至少75%一致或含有至多30個胺基酸取代之變異型序列存在

於變異型重鏈或輕鏈可變區中。

取代可在上述任一抗體重鏈可變區中包含以下任一者：Y96L、G99D、G99S、G100A_K、P100B_F、P100B_I、W100E_F、F100G_N、F100G_S、F100G_Y、V102N及V102S。除任一所述取代以外，抗體重鏈可變區亦可在上所述任一抗體重鏈可變區中包含以下任一取代：G55D、G55L、G55S、G55T或G55V。

抗體重鏈可變區可具有帶有取代F100G_Y之SEQ ID NO: 14之序列。除取代F100G_Y以外，亦可存在以下任一取代：G55D、G55L、G55S、G55T或G55V。詳言之，抗體重鏈可變區可具有帶有以下取代之SEQ ID NO: 14之序列：F100G_Y；或F100G_Y及G55S。抗體重鏈可變區可與SEQ ID NO: 24之序列之輕鏈可變區配對。

任一重鏈可變區可與適合之人類恆定區組合。任一輕鏈可變區可與適合之恆定區組合。

本發明亦提供一種與肌肉抑制素結合且包含以下重鏈與輕鏈組合中之任一者的抗原結合蛋白：10B3C(SEQ ID NO: 26與SEQ ID NO: 27)或10B3C-C91S(SEQ ID NO: 26與SEQ ID NO: 37)。該抗原結合蛋白亦可中和肌肉抑制素。

本發明亦提供一種與肌肉抑制素結合且包含選自SEQ ID NO: 28、29、30、35、36、38、39、98或99中之任一者之重鏈的抗原結合蛋白。該抗原結合蛋白可包含選自SEQ ID NO: 31、32、33、34或40中之任一者之輕鏈。任一重鏈可與任一輕鏈組合。抗原結合蛋白亦可中和肌肉抑制素。

抗原結合蛋白可包含以下重鏈與輕鏈組合中之任一者：

H0L0(SEQ ID NO: 28與SEQ ID NO: 31)、H0L1(SEQ ID NO: 28與SEQ ID NO: 32)、H0L2(SEQ ID NO: 28與SEQ ID NO: 33)、H0L3(SEQ ID NO: 28與SEQ ID NO: 34)、H1L0(SEQ ID NO: 29與SEQ ID NO: 31)、H1L1(SEQ ID NO: 29與SEQ ID NO: 32)、H1L2(SEQ ID NO: 29與SEQ ID NO: 33)、H1L3(SEQ ID NO: 29與SEQ ID NO: 34)、H2L0(SEQ ID NO: 30與SEQ ID NO: 31)、H2L1(SEQ ID NO: 30與SEQ ID NO: 32)、H2L2(SEQ ID NO: 30與SEQ ID NO: 33)、H2L3(SEQ ID NO: 30與SEQ ID NO: 34)、H2L2-C91S(SEQ ID NO: 30與SEQ ID NO: 40)、Fc失能之H2L2-C91S_F100G_Y(SEQ ID NO: 98與SEQ ID NO: 40)或Fc失能之H2L2-C91S_G55S-F100G_Y(SEQ ID NO: 99與SEQ ID NO: 40)。

抗體重鏈可與SEQ ID NO: 26、28、29、30、35、36、38、39、98或99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%之一致性。抗體輕鏈可與SEQ ID NO: 27、31、32、33、34、37或40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%之一致性。

可在序列長度上確定SEQ ID NO: 26、28、29、30、35、36、38、39、98、99、27、31、32、33、34、37或40

之變異體的一致性百分比。

抗體重鏈可為SEQ ID NO: 26、28、29、30、35、36、38、39、98或99中之任一者之變異體，該變異體含有30個、25個、20個、15個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個或1個胺基酸取代、插入或缺失。抗體輕鏈可為SEQ ID NO: 27、31、32、33、34、37或40中之任一者之變異體，該變異體含有30個、25個、20個、15個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個或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以至少75%一致或含有至多30個胺基酸取代之變異型序列存在於變異型重鏈或輕鏈中。

取代可在上述任一抗體重鏈中包含以下任一者：Y96L、G99D、G99S、G100A_K、P100B_F、P100B_I、W100E_F、F100G_S、F100G_N、F100G_Y、V102N及V102S。除任一所述取代以外，抗體重鏈亦可在上述任一抗體重鏈中包含以下任一取代：G55D、G55L、G55S、G55T或G55V。

抗體重鏈可具有帶有取代F100G_Y之SEQ ID NO:30之序列。除取代F100G_Y以外，亦可存在以下任一取代：G55D、G55L、G55S、G55T或G55V。詳言之，抗體重鏈可具有帶有以下取代之SEQ ID NO:30之序列：F100G_Y；或F100G_Y及G55S。抗體重鏈可與SEQ ID NO:40之序列之輕鏈配對。

如上所述之抗原結合蛋白，例如藉由化學修飾及/或一個或多個胺基酸殘基之插入、缺失或取代而具有序列部分變更之變異體，或與上述任一序列具有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展示如EC₅₀所示，與肌肉抑制素結合之效能可在10B3或10B3嵌合體(重鏈：SEQ ID NO: 7或25，輕鏈：SEQ ID NO: 8)所示之效能的10倍以內或5倍以內。如EC₅₀所示，與肌肉抑制素結合之效能可由ELISA分析法得到。

本發明之抗原結合蛋白可具有Fc失能。一種達成Fc失能之方式包含重鏈恆定區之位置235及237(EU索引編號)處丙胺酸殘基之取代。舉例而言，抗原結合蛋白可具有Fc失能且包含SEQ ID NO: 98(人類化重鏈：Fc失能之H2_F100G_Y)或SEQ ID NO: 99(人類化重鏈：Fc失能之H2_G55S-F100G_Y)之序列。或者，抗原結合蛋白質可具有Fc失能且在位置235及237處不含丙胺酸取代。

抗原結合蛋白可與肌肉抑制素結合且與包含SEQ ID NO: 7或25之重鏈可變區序列及SEQ ID NO: 8之輕鏈可變區序列的參考抗體競爭結合肌肉抑制素；其中該抗原結合蛋白不與肌肉抑制素之肽片段結合。肌肉抑制素之肽片段可由SEQ ID NO: 81(CCTPTKMSPINMLY)組成。肌肉抑制素之肽片段可為由肌肉抑制素序列之至多14個胺基酸組成之任何片段。肌肉抑制素之肽片段可呈線性。肌肉抑制素之肽片段可為肌肉抑制素序列(包括全長序列)之任何片段，其

中該肽片段呈線性。此可使用實例2.4中所述之方法，使用SRU BIND讀取器及捕捉於塗有抗生蛋白鏈菌素之生物感測器板上之生物素標記肽來評估。

或者，抗原結合蛋白可與肌肉抑制素結合且與包含SEQ ID NO: 7或25之重鏈可變區序列及SEQ ID NO: 8之輕鏈可變區序列的參考抗體競爭結合肌肉抑制素；其中該抗原結合蛋白不與由SEQ ID NO: 74組成之人工肽序列(人工肌肉抑制素線性肽37-SGSGCCTPTKMSPINMLY)結合。該人工肽序列可由表7中所述之任一序列組成。人工肽序列可呈線性。此可使用實例2.4中所述之方法，使用SRU BIND讀取器及捕捉於塗有抗生蛋白鏈菌素之生物感測器板上之生物素標記肽來評估。

參考抗體可包含以下重鏈與輕鏈組合：10B3C(SEQ ID NO: 26與SEQ ID NO: 27)。重鏈序列SEQ ID NO: 26包含可變域序列SEQ ID NO: 25；且輕鏈序列SEQ ID NO: 27包含可變域序列SEQ ID NO: 8。

抗原結合蛋白與參考抗體之間的競爭可由競爭ELISA來測定。針對中和肌肉抑制素之競爭可由以下任一者或其組合來測定：競爭結合肌肉抑制素，例如如ELISA、FMAT或BIAcore所測定；競爭抑制肌肉抑制素與ActRIIb受體結合；及在A204分析法中競爭抑制細胞信號傳導，從而抑制螢光素酶表現。競爭性抗原結合蛋白可與同一抗原決定基、重疊抗原決定基或與參考抗體所結合之抗原決定基極接近的抗原決定基結合。

抗原結合蛋白可能不與肌肉抑制素肽片段或人工肽序列顯著結合。抗原結合蛋白可能不會以1:1至1:10之抗原結合蛋白與肽之比率範圍分別結合肌肉抑制素肽片段或人工肽序列。

抗原結合蛋白與肌肉抑制素肽片段或人工肽序列之間的結合或結合缺乏可由ELISA或由SDS PAGE使用還原條件來測定。舉例而言，抗原結合蛋白與線性全長肌肉抑制素序列之結合或結合缺乏可由還原SDS PAGE來測定。

本文所述之抗原結合蛋白可能不與肌肉抑制素之肽片段結合。肌肉抑制素之肽片段可由SEQ ID NO: 81 (CCTPTKMSPINMLY)組成。肌肉抑制素之肽片段可為由肌肉抑制素序列之至多14個胺基酸組成之任何片段。肌肉抑制素之肽片段可呈線性。肌肉抑制素之肽片段可為肌肉抑制素序列(包括全長序列)之任何片段，其中該序列呈線性。此可使用實例2.4中所述之方法，使用SRU BIND讀取器及捕捉於塗有抗生蛋白鏈菌素之生物感測器板上之生物素標記肽來評估。

或者，本文所述之抗原結合蛋白可能不與由SEQ ID NO: 74組成之人工肽序列(人工肌肉抑制素線性肽37-SGSGCCTPTKMSPINMLY)結合。該人工肽序列可由表7中所述之任一序列組成。人工肽序列可呈線性。此可使用實例2.4中所述之方法，使用SRU BIND讀取器及捕捉於塗有抗生蛋白鏈菌素之生物感測器板上之生物素標記肽來評估。

抗原結合蛋白可能不與肌肉抑制素肽片段或人工肽序列顯著結合。抗原結合蛋白可能不會以1:1至1:10之比率範圍分別結合肌肉抑制素肽片段或人工肽序列。

抗原結合蛋白與肌肉抑制素肽片段或人工肽序列之間的結合或結合缺乏可由ELISA或由SDS PAGE使用還原條件來測定。舉例而言，抗原結合蛋白與線性全長肌肉抑制素序列之結合或結合缺乏可由還原(亦即變性)SDS PAGE來測定。舉例而言，可使用SRU BIND讀取器及捕捉於塗有抗生蛋白鏈菌素之生物感測器板上之生物素標記肽進行實例2.4中所述之方法。實例2.4中之數據表明10B3可結合構形序列，此可證實10B3有益於活體內結合及中和原生肌肉抑制素以供治療性處理用。

本文所述之抗原結合蛋白所結合的肌肉抑制素之抗原決定基可為構形抗原決定基或不連續抗原決定基。本文所述之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，例如抗原結合蛋白可能不與經還原或經變性之肌肉抑制素樣品結合。構形抗原決定基或不連續抗原決定基可與肌肉抑制素受體結合位點一致、相似或重疊。當肌肉抑制素呈其成熟形式且作為與另一肌肉抑制素分子之二聚體(均二聚體)之一部分時，抗原決定基可為易接近的。當肌肉抑制素呈其成熟形式且作為與所述其他肌肉抑制素結合分子之四聚體之一部分時，抗原決定基亦可為易接近的。抗原決定基可分布於兩個肌肉抑制素多肽上。此種類型之不連續抗原決定基可包含來自各肌肉抑制素分子之序列。

在二聚體三級及四級結構之情形下，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。構形抗原決定基及/或不連續抗原決定基可由例如 CLIPS™ (Pepscan Systems)之已知方法來鑑別。

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。肽掃描方法使用限制性肽。

在人類中或鼠類動物模型中，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。

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標記。可使用與肌肉抑制素結合之生物素分子以藉由使生物素-抗生蛋白鏈菌素於固體表面上偶合來將肌肉抑制素固定固體表面上。

抗原結合蛋白可源自大鼠、小鼠、靈長類動物(例如獼猴、舊世界猴或大猿)或人類。抗原結合蛋白可為人類化抗體或嵌合抗體。

抗原結合蛋白可包含恆定區，其可具有任何同型或子類。恆定區可具有 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效應部分之突變可用於改變FcRn與抗體之間相互作用之親和力以調節抗體轉換。可延長抗體之活體內半衰期。此舉將有益於患者群體，屆時由於維持活體內IC₅₀較長時段而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標靶，所以可整體或部分移除抗體之Fc效應功能。此移除可使安全概況增強。

包含恆定區之抗原結合蛋白可具有低ADCC及/或補體活化或效應功能。恆定域可包含IgG2或IgG4同型之天然失能恆定區，或突變IgG1恆定域。適合之修飾的實例描述於EP0307434中。一種達成Fc失能之方式包含重鏈恆定區之位置235及237(EU索引編號)處丙胺酸殘基之取代。

抗原結合蛋白可包含一或多個選自突變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。適合之修飾的實例描述於Shields等人，J. Biol. Chem (2001) 276:6591-6604；Lazar等人，PNAS (2006) 103:4005-4010；及US6737056、WO2004063351及WO2004029207中。

抗原結合蛋白可包含具有經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。產生具有經改變之糖基化概況之抗原結合蛋白的適合方法之實例描述於WO2003/011878、WO2006/014679及EP1229125中。

本發明亦提供一種編碼如本文所述之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)在獨立核酸分子上。

編碼重鏈之核酸分子可包含SEQ ID NO: 41，且編碼輕鏈之核酸分子可包含SEQ ID NO: 42或SEQ ID NO: 52。

編碼重鏈之核酸分子可包含SEQ ID NO: 43、44或45中之任一者。編碼輕鏈之核酸分子可包含SEQ ID NO: 46、47、48、49或55中之任一者。編碼抗原結合蛋白之核酸分子可包含以下重鏈與輕鏈組合中之任一者：H0L0(SEQ ID NO: 43與SEQ ID NO: 46)、H0L1(SEQ ID NO: 43與SEQ ID NO: 47)、H0L2(SEQ ID NO: 43與SEQ ID NO: 48)、H0L3(SEQ ID NO: 43與SEQ ID NO: 49)、H1L0(SEQ ID NO: 44與SEQ ID NO: 46)、H1L1(SEQ ID NO: 44與SEQ ID NO: 47)、H1L2(SEQ ID NO: 44與SEQ ID NO: 48)、H1L3(SEQ ID NO: 44與SEQ ID NO: 49)、H2L0(SEQ ID NO: 45與SEQ ID NO: 46)、H2L1(SEQ ID NO: 45與SEQ ID NO: 47)、H2L2(SEQ ID NO: 45與SEQ ID NO: 48)、H2L3(SEQ ID NO: 45與SEQ ID NO: 49)、H2L2-C91S(SEQ ID NO: 45與SEQ ID NO: 55)。

上述核酸分子亦可編碼具有以下任一取代之重鏈：

Y96L、G99D、G99S、G100A_K、P100B_F、P100B_I、W100E_F、F100G_N、F100G_Y、F100G_S、V102N及V102S。除任一所述取代以外，核酸分子亦可編碼包含以下任一取代之重鏈：G55D、G55L、G55S、G55T或G55V。

核酸分子可具有帶有編碼F100G_Y之取代的SEQ ID NO:45之序列。除取代F100G_Y以外，亦可存在以下任一取代：G55D、G55L、G55S、G55T或G55V。詳言之，核酸分子可具有帶有編碼以下之取代的SEQ ID NO: 45之序列：F100G_Y或F100G_Y及G55S。編碼重鏈之核酸分子可與編碼輕鏈之SEQ ID NO:55之序列的核酸分子配對。

本發明亦提供一種包含如本文所述之核酸分子的表現載體。亦提供一種包含如本文所述之表現載體的重組宿主細胞。

本文所述之抗原結合蛋白可於適合之宿主細胞中產生。產生如本文所述之抗原結合蛋白之方法可包含培養如本文所述之宿主細胞及回收該抗原結合蛋白之步驟。重組經轉型、轉染或轉導之宿主細胞可包含至少一個表現卡匣，藉以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，重組經轉型、轉染或轉導之宿主細胞可包含至少一個表現卡匣，藉以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。宿主細胞可培養於例如無血清培養基之培養基中。抗原結合蛋白可由宿主細胞分泌至培養基中。就該含有抗原結合蛋白之培養基而言，可將抗原結合蛋白純化為至少95%或95%以上(例如98%或98%以上)。

可提供一種包含抗原結合蛋白及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。可提供一種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，該套組可包含預定量之試劑與使用說明書。

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可進一步細分成子類，IgG1、IgG2、IgG3及IgG4；及IgA1及IgA2。物種變異體存在於至少具有IgG2a、IgG2b之小鼠及大鼠中。

可變區之較保守部分稱作構架區(FR)。完整重鏈及輕鏈

之可變域各包含由三個CDR連接之四個FR。各鏈中之CDR係由該等FR區極接近地保持在一起且與來自另一鏈之CDR一起促成抗體之抗原結合位點形成。

恆定區不直接涉及於抗體與抗原之結合中，但展現各種效應功能，諸如參與抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)、經由與Fc γ 受體結合之吞噬作用、經由新生Fc受體(FcRn)之半衰期/清除率及經由補體級聯之C1q組份之補體依賴性細胞毒性。

已報導人類IgG2恆定區基本上缺乏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。基本上缺乏此等效應功能之抗體可稱為『非溶解性』抗體。

人類抗體

可由熟習此項技術者所知之許多方法來產生人類抗體。可由融合瘤方法，使用人類骨髓瘤或小鼠-人類異源骨髓瘤細胞株來製得人類抗體，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(參見Winter (1994) Annu. Rev. Immunol 12: 433-455; Green (1999) J. Immunol. Methods 231: 11-23)。

若干轉殖基因小鼠品系當前可用，其中該等品系之小鼠

免疫球蛋白基因座已經人類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)。一旦進行抗原攻毒，該等小鼠即能夠產生可自其中選擇相關抗體之人類抗體譜。

噬菌體呈現技術可用於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係藉由用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而改良。此技術之變型，諸如「抗原決定基印記(epitope imprinting)」當前亦可用，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

通常使用重組DNA方法產生嵌合抗體。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來分離編碼抗體之DNA(例如cDNA)並對其進行定序。融合瘤細胞充當該DNA之典型來源。一旦分離DNA，即將該DNA置於表現載體中，隨後使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(諸如大腸桿菌細胞、COS細胞、CHO細胞或骨髓瘤細胞)中，從而合成抗體。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。

免疫原性之大幅降低可藉由僅將非人類(例如鼠類)抗體(「供體」抗體)之CDR移植至人類構架(「受體構架」)及恆定區上以產生人類化抗體來達成(參見Jones等人，(1986) Nature 321: 522-525；及Verhoeyen等人，(1988) Science 239: 1534-1536)。然而，CDR移植本身可能不會完全保留抗原結合特性，且常常發現若欲恢復顯著抗原結合親和力，則在人類化分子中需要保存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受體構架中以保存CDR構形。對抗體進行電腦模擬可用於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。對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所曝露殘基之精確型態不同，且大多數個別表面位置強烈偏向於少量不同殘基(參見Padlan等人，(1991) Mol. Immunol. 28: 489-498；及Pedersen等人，(1994) J. Mol. Biol. 235: 959-973)。因此，有可能藉由置換非人類Fv之構架區中所曝露之殘基(其不同於人類

抗體中通常所見之彼等殘基)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，所以表面殘基之置換可足以使小鼠可變區對人類免疫系統而言「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™程序(Kalobios)，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。製造該等抗原結合蛋白之方法在此項技術中為已知的。傳統上，重組產生雙特異性抗原結合蛋白係基於兩個免疫球蛋白H鏈-L鏈對之共同表現，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，故產生10種不同抗體結構之可能混合物，其中僅一者具有所要結合特異性。替代性方法涉及使具有所要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。將編碼此等融合體之DNA及L鏈(必要時)插入獨立表現載體中且接著共轉染至適合之宿主生物體中。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，雙特異性抗體係由在一臂中具有第一結合特異性之H鏈及在另一臂中提供第二結合特異性之H-L鏈對構成，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，該等片段係藉由完整抗體之蛋白水解消化，例如藉由木瓜蛋白酶消化而產生(參見例如WO 94/29348)，但可由經重組轉型之宿主細胞直接產生。對於產生ScFv，參見Bird等人，(1988) *Science* 242: 423-426。另外，可使用如下所述之多種工程改造技術來產生抗原結合片段。

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，其已與以下相關聯：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「杵入白(knob in hole)」突變(Zhu等人，(1997) *Protein Sci.*, 6: 781-788)。可由熟習此項技術者所熟知之方法產生ScFv片段，參見Whitlow等人，(1991) *Methods Companion Methods*

Enzymol, 2: 97-105 及 Huston 等人, (1993) Int. Rev. Immunol 10: 195-217。可在諸如大腸桿菌細胞之細菌細胞中或在真核細胞中產生 ScFv。ScFv之一缺點在於產物單價, 此阻礙歸因於多價結合之親和力增加; 及其較短半衰期。克服此等問題之嘗試包括藉由化學偶合(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端半胱氨酸殘基之 ScFv 的自發位點特異性二聚(參見 Kipriyanov 等人, (1995) Cell. Biophys 26: 187-204), 自含有另一C端半胱氨酸之 ScFv 而產生二價 (ScFv')₂。或者, 可藉由將肽連接子縮短至3至12個殘基以形成「微型雙功能抗體」來迫使 ScFv 形成多聚體, 參見 Holliger 等人, (1993) PNAS 90: 6444-6448。縮短連接子可進一步產生 ScFv 三聚體(「微型三功能抗體」, 參見 Kortt 等人, (1997) Protein Eng 10: 423-433)及四聚體(「微型四功能抗體」, 參見 Le Gall 等人, (1999) FEBS Lett, 453: 164-168)。構築二價 ScFv 分子亦可藉由與蛋白質二聚基元進行基因融合以形成「微型抗體(miniantibody)」(參見 Pack 等人, (1992) Biochemistry 31: 1579-1584)及「小體(minibody)」(參見 Hu 等人, (1996) Cancer Res. 56: 3055-3061)來達成。ScFv-Sc-Fv 串聯體((ScFv)₂)亦可藉由經第三肽連接子連接兩個 ScFv 單元來產生, 參見 Kurucz 等人, (1995) J. Immol. 154: 4576-4582。雙特異性微型雙功能抗體可經由兩種由來自一個抗體且經短連接子與另一抗體之 V_L 域連接之 V_H 域組成的單鏈融合產

物非共價締合來產生，參見Kipriyanov等人，(1998) *Int. J. Can* 77: 763-772。該等雙特異性微型雙功能抗體之穩定性可藉由引入如上所述之二硫橋或「杵入白」突變或藉由形成單鏈微型雙功能抗體(ScDb)而增強，其中兩個雜交ScFv片段係經由肽連接子連接，參見Kontermann等人，(1999) *J. Immunol. Methods* 226:179-188。可藉由例如使ScFv片段與IgG分子之CH3域或Fab片段經鉸鏈區融合而得到四價雙特異性分子，參見Coloma等人，(1997) *Nature Biotechnol.* 15: 159-163。或者，已藉由雙特異性單鏈微型雙功能抗體融合而產生四價雙特異性分子(參見Alt等人，(1999) *FEBS Lett* 454: 90-94)。較小四價雙特異性分子亦可藉由ScFv-ScFv串聯體與含有螺旋-環-螺旋基元之連接子(DiBi微型抗體，參見Muller等人，(1998) *FEBS Lett* 432: 45-49)二聚或在阻止分子內配對之定向中包含4個抗體可變域(V_H 及 V_L)之單鏈分子(串聯微型雙功能抗體，參見Kipriyanov等人，(1999) *J. Mol. Biol.* 293: 41-56)二聚來形成。雙特異性 $F(ab')_2$ 片段可藉由Fab'片段之化學偶合或藉由經白胺酸拉鏈異源二聚來產生(參見Shalaby等人，(1992) *J. Exp. Med.* 175: 217-225；及Kostelny等人，(1992), *J. Immunol.* 148: 1547-1553)。亦可利用經分離之 V_H 及 V_L 域(Domantis plc)，參見US 6,248,516；US 6,291,158；及US 6,172,197。

異源結合抗體

異源結合抗體係由使用任何適宜之交聯方法所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(FcγR)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。可視所要特性而對抗體之Fc區進行各種修飾。舉例而言，在Fc區中進行特異性突變以促使在其他情況下溶解之抗體變成非溶解性抗體詳述於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Fcγ受體包括FcγR (I)、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa及新生FcRn。Shields等人，(2001) J. Biol. Chem 276: 6591-6604展示一通用組之IgG1殘基涉及於結合所有FcγR中，而FcγRII及FcγRIII利用此通用組以外之相異位點。一組IgG1殘基當變為丙胺酸時降低與所有FcγR之結合性：Pro-238、Asp-265、Asp-270、Asn-297及Pro-239。所有皆處於IgG CH2域中且在連接CH1及CH2之鉸鏈附近叢集。FcγRI僅利用通用組之IgG1殘基以供結合，而FcγRII及FcγRIII與除通用組以外之相異殘基相互作用。一些殘基之變更僅降低與FcγRII(例如Arg-292)或FcγRIII(例如Glu-293)之結合性。一些變異體顯示與FcγRII或FcγRIII之結合性有所改良，但不影響與另一受體之結合性(例如Ser-267Ala改良與FcγRII之結合性，但與FcγRIII之結合性未受影響)。其他變異體展現與FcγRII或FcγRIII之結合性有所改良，而與另一受體之

結合性降低(例如 Ser-298Ala 改良與 Fc γ RIII 之結合性且降低與 Fc γ RII 之結合性)。對於 Fc γ RIIIa，最佳結合 IgG1 變異體在 Ser-298、Glu-333 及 Lys-334 處具有組合丙胺酸取代。咸信新生 FcRn 受體涉及於抗體清除率與跨越組織之胞轉作用(transcytosis)中(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。在此部分所述之任一位置處之取代能夠增加抗體之血清半衰期及/或改變抗體之效應特性。

其他修飾包括抗體之糖基化變異體。據知抗體恆定區中保守位置處之抗體糖基化對抗體功能、尤其效應功能(諸如上述效應功能)具有深度影響，參見例如 Boyd 等人，(1996) *Mol. Immunol.* 32: 1311-1318。涵蓋其中一或多個碳水化合物部分經添加、取代、缺失或修飾之抗體或其抗原結合片段之糖基化變異體。引入天冬醯胺-X-絲胺酸或天冬醯胺-X-蘇胺酸基元產生碳水化合物部分之酶促連接的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，經由使用 β -1,4-半乳糖基轉移酶及/或 α -2,3-唾液酸轉移酶進行再半乳糖基化及/或再唾液酸化過程來增加 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。與大多數醣蛋白相同，抗體通常以糖型(glycoform)之混合物形式產生。當在真核細胞、尤其哺乳動物細胞中

產生抗體時，此混合物尤其顯而易見。已開發多種方法來製造規定糖型，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)可包含規定數目(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)、聚丙二醇或聚氧化烯之非蛋白性聚合物偶合。蛋白質與PEG之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。已由完整抗體以及Fab'片段研究具有不同分子量及線型(線性或分枝)之聚乙二醇化的用途，參見Koumenis等人，(2000) Int. J. Pharmaceut. 198: 83-95。

產生方法

可於諸如山羊(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)之轉殖基因生物體中產生抗原結合蛋白。

抗原結合蛋白亦可藉由化學合成而產生。然而，通常使用熟習此項技術者所熟知之重組細胞培養技術來產生抗原

結合蛋白。將編碼抗原結合蛋白之聚核苷酸分離且插入可複製載體(諸如質體)中以供進一步選殖(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。將編碼抗原結合蛋白之聚核苷酸輕易地分離且使用習知程序(例如寡核苷酸探針)進行定序。可用載體包括質體、病毒、噬菌體、轉座子、微型染色體，其中通常使用質體。一般而言，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、強化子成份、啟動子及轉錄終止序列，上述者與抗原結合蛋白聚核苷酸可操作性地連接以有利於表現。可將編碼輕鏈及重鏈之聚核苷酸插入獨立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。

可採用密碼子最佳化，意欲使得經密碼子最佳化之基因轉染時宿主細胞所產生之總蛋白質含量相較於經野生型序列轉染時之含量較高。已公開若干方法(Nakamura等人，(1996) *Nucleic Acids Research* 24: 214-215；W098/34640；W097/11086)。由於遺傳密碼冗餘，本文所揭示之密碼子(尤其針對既定宿主細胞中之表現而最佳化之彼等密碼子)之替代性聚核苷酸亦可編碼本文所述之抗原結合蛋白。可改變本發明之抗原結合蛋白之密碼子使用以適應於宿主細胞之密碼子偏倚(codon bias)，從而增加轉錄物及/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表現所用之宿主細胞之適合相容性。

信號序列

抗原結合蛋白可以融合蛋白之形式產生，該融合蛋白具有在成熟蛋白之N端處具有特異性裂解位點之異源信號序列。信號序列應由宿主細胞識別並加工。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WO90/13646。在哺乳動物細胞系統中，病毒分泌前導序列(諸如單純疱疹gD信號)及原生免疫球蛋白信號序列可能適合。通常，信號序列在閱讀框架中與編碼抗原結合蛋白之DNA接合。可使用諸如SEQ ID NO: 9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 bacterium)，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之多種病毒起點適於大多數哺乳動物細胞。一般而言，哺乳動物表現載體並不需要複製起點組份，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得之營養物，或(c)兩者之組合。選擇機制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，其中轉型體係在甲胺喋呤存在下培養。可在漸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)。酵母中所用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與編碼抗原結合蛋白之DNA/聚核苷酸可操作性地連接。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乙醇去氫酶2、異細胞色素C、酸性磷酸酶、金屬硫蛋白及對氮代謝或麥芽糖/半乳糖利用負責之酶。

用於哺乳動物細胞系統中之表現的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

乳突狀瘤病毒、禽類肉瘤病毒、細胞巨大病毒(詳言之，即刻早期基因啟動子)、反轉錄病毒、B型肝炎病毒、肌動蛋白、勞斯肉瘤病毒(rous sarcoma virus, RSV)啟動子及早期或晚期猿猴病毒40。當然，啟動子之選擇係基於與表現所用之宿主細胞之適合相容性。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 區之DNA，以及新黴素及安比西林抗性選擇標記；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 $\gamma 1$ 恆定區之DNA、DHFR及安比西林抗性標記。

強化子成份

適當時，例如對於在高等真核細胞中表現，可使用與載體中之啟動子成份可操作性地連接之強化子成份。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成份。或者，可使用來自真核細胞病毒之強化子成份，諸如SV40強化子(bp100-270)、細胞巨大病毒早期啟動子強化子、多瘤病毒(polyoma)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位點之。或者，強化子可位於別處，例如在未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表現所用之宿主細胞之適合相容性。

聚腺苷酸化/終止

在真核系統中，聚腺苷酸化信號與編碼抗原結合蛋白之DNA/聚核苷酸可操作性地連接。該等信號通常置於開放

閱讀框架之3'處。在哺乳動物系統中，非限制性實例包括源自生長激素、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源自磷酸甘油酸激酶(PGK)及乙醇去氫酶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替代地採用較短且較明確之終止子序列。聚腺苷酸化/終止序列之選擇可基於與表現所用之宿主細胞之適合相容性。

用於增加產率之其他方法/成份

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

宿主細胞

適於選殖或表現編碼抗原結合蛋白之載體的宿主細胞為原核細胞、酵母細胞或高等真核細胞。適合之原核細胞包括真細菌，例如腸內菌科，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*)；以及桿菌屬(*Bacilli*)，諸如枯草桿菌(*B. subtilis*)及地衣桿菌(*B. licheniformis*)(參見DD 266 710)；假單胞菌屬(*Pseudomonas*)，諸如繡色假單胞菌(*P. aeruginosa*)；及鏈球菌屬(*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(*Kluyveromyce*)(例如 ATCC 16,045、12,424、24178、56,500)、耶氏酵母(*Yarrowia*)(EP 402 226)、甲醇酵母(*Pichia pastoris*)(EP 183 070，亦參見Peng等人，(2004) J. Biotechnol. 108: 185-192)、假絲酵母(*Candida*)、里氏木黴(*Trichoderma reesia*)(EP 244 234)、青黴素(Penicillin)、彎頸黴(*Tolypocladium*)，及麴菌(*Aspergillus*)宿主(諸如小巢狀麴菌(*A. nidulans*)及黑麴菌(*A. niger*))。

高等真核宿主細胞包括哺乳動物細胞，諸如 COS-1(ATCC 編號：CRL 1650)、COS-7(ATCC CRL 1651)；人胚腎細胞株 293；幼倉鼠腎細胞(BHK)(ATCC CRL 1632)；BHK570(ATCC 編號：CRL 10314)；293(ATCC 編號：CRL 1573)；中國倉鼠卵巢細胞 CHO(例如 CHO-K1，ATCC 編號：CCL 61)；DHFR-CHO細胞株，諸如 DG44(參見Urlaub等人，(1986) Somatic Cell Mol. Genet.12: 555-556)，尤其適於懸浮液培養之彼等 CHO細胞株；小鼠賽特利細胞(mouse sertoli cell)；猴腎細胞；非洲綠猴腎細胞(ATCC CRL-1587)；HELA細胞；犬腎細胞(ATCC CCL 34)；人肺細胞(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。

該等宿主細胞亦可經進一步工程改造或改適以改進抗原結合蛋白之品質、功能及/或產率。非限制性實例包括特异性修飾(例如糖基化)酶及蛋白質摺疊伴侶之表現。

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由熟習此項技術者已知之任何方法來培養。可於旋轉式燒瓶、轉瓶或中空纖維系統中培養宿主細胞，但對於大規模生產而言，尤其使用攪拌槽反應器用於懸浮液培養。該等攪拌槽可適於使用例如噴霧器、擋板或低剪切葉輪進行通氣。對於氣泡柱及氣升式反應器，可使用空氣或氧氣氣泡直接進行通氣。當在無血清培養基中培養宿主細胞時，用細胞保護劑(諸如普流尼克F-68(pluronic F-68))補充培養基以有助於防止細胞因通氣過程而受損害。視宿主細胞特徵而定，微載體可用作固著依賴性細胞株之生長基質，或細胞可適於懸浮液培養(此為典型的)。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，諸如分批饋料、重複分批處理(參見Drapeau等人，(1994) Cytotechnology 15: 103-109)、擴展式分批處理或灌注培養。儘管可於諸如胎牛血清(FCS)之含血清培養基中培養經重組轉型之哺乳動物宿主細胞，但該等宿主細胞係於例如以下者中培養：合成無血清培養基，諸如Keen等人，(1995) Cytotechnology 17: 153-163中所揭示，或市售培養基，諸如ProCHO-CDM或UltraCHO™ (Cambrex NJ, USA)，必要時該等培養基補充有諸如葡萄糖之能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彼等細胞適於在無血清條件下生長。一種改適方法為在含血清培養基中培養該等宿主細胞且反覆更換80%之培養基為無血清培養基以

使該等宿主細胞學會適應無血清條件(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純化以得到適於預期用途之純度。舉例而言, 使用抗原結合蛋白治療人類患者通常要求純度至少 95%, 純度更通常為 98% 或 99% 或 99% 以上(與粗培養基相比)。通常使用離心自培養基中移除細胞碎片(cell debris), 繼而使用例如微濾、超濾及/或深度過濾進行上清液澄清步驟。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)。繼各種澄清步驟之後, 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。亦可採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)。繼此等各種步驟之後, 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聚集形式之抗原結合蛋白。

細菌系統可用於表現抗原結合片段。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之方法提取不溶性蛋白質且將其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。

脫除醯胺基 (deamidation) 為移除醯胺官能基之化學反應。在生物化學中，該反應在蛋白質降解方面較重要，因為其破壞胺基酸天冬醯胺及麩醯胺酸之含醯胺側鏈。咸信脫除醯胺基反應為可限制蛋白質之有效壽命的因子之一，其亦為在製造治療性蛋白質期間所發生之最常見的轉譯後修飾之一。舉例而言，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已有報導，而其他重組蛋白質似乎未受影響。在誘導脫除醯胺基之應激條件下，本文所述之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，本文所述之抗原結合蛋白之生物活性及其有效壽命不太可能受脫除醯胺基影響。

醫藥組合物

術語疾病、病症及病狀可互換使用。可將如本文所述之抗原結合蛋白之經純化製劑併入醫藥組合物中以供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促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起反應之疾病。

醫藥製劑可包含抗原結合蛋白以及醫藥學上可接受之載劑。抗原結合蛋白可單獨或作為醫藥組合物之一部分投與。

通常，該等組合物包含獲知於可接受之醫藥規範且為醫

藥規範所提倡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，諸如生理食鹽水、林格氏溶液(Ringers solution)或右旋糖溶液，其視情況經適合之緩衝液緩衝至5至8範圍內之pH值。

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)來投與。該等組合物宜不含可見微粒物質。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。

製備該等醫藥組合物之方法為熟習此項技術者所熟知。醫藥組合物可包含1 mg至10 g之間的呈單位劑型之抗原結合蛋白，視情況連同使用說明書一起。醫藥組合物可經凍乾(冷凍乾燥)以供在投藥之前根據熟習此項技術者所熟知或顯而易見之方法進行復原。當抗體具有IgG1同型時，可將諸如檸檬酸鹽(例如檸檬酸鈉)或EDTA或組胺酸之銅螯合劑添加至醫藥組合物中以降低此同型之抗體的銅介導之降解程度，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；及置換小瓶頂空氧氣之惰性氣體，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，且可視諸如患者年齡、重量及健康狀況以及待治療疾病或病症之因素而定。該等因素在主治醫師之考慮範圍

內。選擇適當劑量之導則可見於例如 Smith 等人，(1977) *Antibodies in human diagnosis and therapy*, Raven Press, New York 中。

投與個體之抗原結合蛋白之劑量一般在每公斤個體體重 1 μ g 與 150 mg 之間、0.1 mg 與 100 mg 之間、0.5 mg 與 50 mg 之間、1 mg 與 25 mg 之間或 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投與，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獨立投與之子劑量，視情況以單位劑型投與。舉例而言，劑量可在投藥每天以多個子劑量之形式，每 14 天或 28 天 1 次皮下投與。

可藉由靜脈內輸注，通常經 15 分鐘至 24 小時，諸如 2 至 12 小時或 2 到 6 小時投與劑量。此可降低毒性副作用。

必要時可一或多次重複投與劑量，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。抗原結合蛋白可依維持療法投與，例如每週一次，歷時 6 個月或 6 個月以上。抗原結合蛋白可依間歇療法投與，例如歷時 3 至 6 個月，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投與後生物樣品中循環抗肌肉抑制素抗原結合蛋白之量來測定或調整。可利用測定或調整劑量之

其他方法，包括(但不限於)藥理學之生物標記(『生物指標』)、肌肉質量及/或功能之量度、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體內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部位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。

抗原結合蛋白可與一或多種用於治療本文所述疾病之其他治療活性劑組合使用，該等治療活性劑包括米氮平(Mirtazapine)(Remeron, Zispin: Organon)、乙酸甲地孕酮(Megestrol acetate)(Megace: BMS)、屈大麻酚(Dronabinol)(Marinol: Solvay Pharmaceutical Inc.)、氧雄龍(Oxandrolone)(Oxandrin: Savient)、睪固酮(testosterone)、重組生長激素(例如索瑪托平(Somatropin)(Serostim: Serono)、努托平(Nutropin)(Genentech)、優猛茁(Humatrope)(Lilly)、增若托平(Genotropin)(Pfizer)、諾德托平(Norditropin)(Novo)、思真(Saizen)(Merck Serono)及奧尼茁(Omnitrope)(Sandoz)、賽庚啶(Cyproheptadine)(Periactin: Merck)、鳥胺酸酮戊二酸(ornithine oxoglutarate)(Cetornan)、哌醋甲酯(Methylphenidate)(Ritalin: Novartis)及莫達非尼(Modafinil)(Provigil: Cephalon)、羅氏鮮(orlistat)(alli: GSK)、諾美婷(sibutramine)(Meridia, Reductil)、利莫納班(rimonabant)(Acomplia, Monaslim, Slimona)。該等組合可用於治療肌肉抑制素促成疾病或中和肌肉抑制素之活性將

有益之疾病。

當抗原結合蛋白與其他治療活性劑組合使用時，個別組份可以獨立或組合醫藥調配物形式，由任何適合途徑，一起或獨立、依序或同時投與。若獨立或依序投與，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之形式呈現以供使用。

當組合於同一調配物中時，應瞭解，組份必須穩定且彼此及與調配物之其他組份相容且可經調配以供投藥。當獨立調配時，組份可以任何適宜之調配物形式，例如以如此項技術中關於抗原結合蛋白所知之方式提供。

當與針對相同疾病具活性之第二治療劑組合時，各組份之劑量可不同於單獨使用抗原結合蛋白時的劑量。適當劑量將易於為熟習此項技術者所瞭解。

抗原結合蛋白及治療活性劑可起協同作用。換言之，以組合形式投與抗原結合蛋白及治療活性劑對本文所述之疾病、病症或病狀相較各單獨作用之總和可具有較大作用。

醫藥組合物可包含抗原結合蛋白以及其他藥劑，視情況連同使用說明書的分裝部分之套組。為方便起見，該套組可包含預定量之試劑與使用說明書。

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、閹牛、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消瘦、肌病或肌肉損失相關之疾病或病狀。

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

因此，本文所述之抗原結合蛋白可用於預防性處理。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發作。個體可能無症狀。個體可能具有疾病之遺傳素因。將預防有效量之抗原結合蛋白投與此類個體。預防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。

本文所述之抗原結合蛋白亦可用於治療方法中。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。

本文所述之抗原結合蛋白係以有效量用於治療性或預防性處理。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。

本文所述之抗原結合蛋白無需實現完全治癒或根除疾病之每一症狀或表現即構成可行的治療性處理。如相關領域中所瞭解，用作治療劑之藥物可降低既定疾病病況之嚴重度，但無需消除疾病之每一表現即視為適用之治療劑。類似地，預防性投與之治療無需完全有效地預防疾病發作即構成可行的預防劑。僅僅降低對疾病之影響(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)或降低個體之疾病發生(例如延緩疾病發作)或惡化之可能性即足矣。

病症、疾病或病狀包括肌肉減少症、惡病質、肌肉消瘦、廢用性肌肉萎縮、HIV、AIDS、癌症、外科疾病、灼傷、肌骨或神經創傷或損傷、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、肌營養不良、運動神經元神經病、肌肉萎縮性側索硬化(ALS)、帕金森氏病、骨質疏鬆症、骨關節炎、脂肪肝、肝硬化、艾迪森氏病、庫欣氏症候群、急性呼吸窘迫症候群、類固醇誘發之肌肉消瘦、肌炎及脊柱側彎。

年齡相關之肌肉消瘦(亦稱為肌病)或肌肉減少症為隨著年齡發生之肌肉質量及肌力的進行性損失。此病狀據信除肌肉分解增加以外亦為肌肉合成及修復減少之結果。在年齡相關之肌肉消瘦中，肌纖維束因個別纖維損失而縮減。

此外，由於該等個體之廢用性肌肉萎縮，肌纖維亦變小。治療可逆轉此肌肉萎縮。

年齡相關之肌肉消瘦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)低於年輕人之平均值兩個標準差以內。此病症可導致活動性減少、功能性失能及獨立性損失。

廢用性肌肉萎縮可與許多不同病狀、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)、肌肉或骨骼創傷或損傷。廢用性萎縮可由導致長期肌肉廢用之眾多原因或事件所致。肌肉萎縮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重量損失、肌肉質量損失、肌肉萎縮、疲勞、食慾較差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、自體免疫疾病及藥物或酒精成癮相關。此外，在例如已患有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。

慢性阻塞性肺病(COPD)患者可展示該疾病之輕度、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極虛弱，且其疾病一般視為不可逆的。因此，本文所述之抗原結合蛋白可用於治療肺氣腫患者，因為該患者之潛在肺功能較難得到改良。支氣管

炎患者一般較健壯，但其亦可能缺乏肌肉，且據信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，視情況與該患者之潛在肺功能的治療組合。用本文所述之抗原結合蛋白治療對改良肺氣腫或支氣管炎患者之呼吸中所涉及之肌肉功能可具有直接作用。

癌症患者常常展示可導致住院治療、感染、脫水、髖部骨折及最終死亡之肌肉消瘦。舉例而言，10%之肌肉質量損失可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良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，且改良患者之生活品質。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、胰腺癌、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/或可能正經歷雄激素去除療法(ADT)。患有癌症之個體可具有局部晚期癌症或轉移性癌症，例如早期轉移性癌症。

患有慢性腎衰竭(CRF)或末期腎病(ESRD)之患者可使用本文所述之抗原結合蛋白治療。舉例而言，可對患者進行透析前治療以延遲透析起始時間。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。使用本文所述之抗原結合蛋白可短期預防或治療肌肉消瘦，或經由長期使用抗原結合蛋白來

長期預防或治療肌肉消瘦。

肌肉、骨骼或神經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常常患有肌肉萎縮，且在許多患者中肌肉消瘦為髖部骨折之關鍵促因。髖部骨折之後，肌肉及肌力因廢用而損失，且髖部骨折患者之行走或功能常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消瘦且使該等患者易發生髖部骨折。與髖部骨折患者相關之治療緊急性不容小覷，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恢復而幫助髖部骨折患者康復。

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，以在手術之前塑造患者之肌肉。

肌營養不良係指一組引起進行性肌肉無力之基因遺傳性肌肉疾病。肌營養不良之特徵為進行性骨骼肌無力、肌肉蛋白缺乏以及肌細胞及組織死亡。肌營養不良之實例包括裘馨型肌營養不良(Duchenne)(DMD)、貝克型肌營養不良、肢帶型肌營養不良(LGMD)、先天性肌營養不良、面肩肱型肌營養不良(FSHD)、強直性肌營養不良、眼咽型肌營養不良、遠端型肌營養不良及埃-德型肌營養不良(Emery-Dreifuss)。舉例而言，本文所述之抗原結合蛋白可用於治療裘馨型肌營養不良、貝克型肌營養不良或肢帶型肌營養不良。此外，非局部萎縮之彌漫性肌肉萎縮可由本

文所述之抗原結合蛋白治療。詳言之，由於肌肉萎縮/功能障礙較集中及骨架/骨骼及心臟問題在疾病中之作用，強直性營養不良可由本文所述之抗原結合蛋白治療。

肥胖症為過量體脂肪已積累至可對健康產生負面影響之程度的病狀。身體質量指數($BMI = \text{重量} / \text{高度}^2$)為 30 kg/m^2 或 30 kg/m^2 以上通常即定為該病狀。此將肥胖症與超重區分開，BMI 介於 $25\text{-}29.9 \text{ kg/m}^2$ 之間即定為超重。肥胖症可與包括心血管疾病、2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飲食、身體運動及手術。肥胖症可由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，該治療會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、自主性損失、活動性減少所致之抑鬱症、食慾減退、營養不良及重量損失異常中之任一者或其任何組合。

疾病可與高含量之肌肉抑制素相關。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。

多個終點可用於展示肌肉質量、肌力及肌肉功能之變化。該等終點包括短期身體表現評估(Short Physical Performance Battery)、腿推舉(Leg Press)、定向生活品質調查、日常生活活動(ADL)、功能獨立量測(FIM)、功能測

試及量表(例如步行測試、爬樓梯、腳踏車測力計)、力量測試及量表(例如手握力試驗、手肌力測試量表)、生物阻抗分析、肌電圖、測力計、雙能量X射線吸收測定術、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、人體量測術、皮膚厚度量測、身體質量指數評估及重量監測。肌力可使用雙側肢體肌肉、頸部肌肉或腹部肌肉來評估。

短期身體表現評估(SPPB)為藉由量測站立平衡、步行速度及自椅子起立之能力來評估下肢功能之多組份量測，按0-4之級別定級。步行測試為下肢功能之評估，其對患者步行一段距離所花費之時間進行計時。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地評估患者之生活品質。雙能量X射線吸收測定術(DEXA)為估計骨骼肌質量之量測。

許多動物分析法亦可用於展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，且與人類之步行測試類似。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步行速度及轉輪。此等測試/模型可單獨使用或以任何組合使用。

高脂飲食(HFD)誘發之胰島素抗性可用作肥胖症之小鼠模型。

糖皮質激素通常用於治療一大系列之慢性發炎疾患，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氣喘。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。類似地，高皮質醇症對庫欣氏病(Cushing's disease)之肌肉萎縮起主要作用。地塞米松(dexamethasone, dex)誘發之肌肉萎縮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)。在糖皮質激素起主要作用之若干肌肉萎縮模型(諸如固定及灼傷損傷)中亦已報導肌肉抑制素之表現增加(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消瘦的小鼠模型可用於研究本發明之抗原結合蛋白。

人類廢用性肌肉萎縮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。廢用性肌肉萎縮會降低肌力且導致失能。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。因此，擠壓坐骨神經以誘發肌肉萎縮之小鼠模型可用於研究本發明之抗原結合蛋白。

一大部分癌症患者因脂肪組織之進行性萎縮及肌肉消瘦

而罹受重量損失。據估計約20%之癌症死亡係由肌肉損失引起。肌肉消瘦一般為許多疾病病狀中死亡率之良好預測因子。AIDS、饑餓及癌症之研究數據指示30%-40%以上之個體病前瘦體質量損失為致命的(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, 經由抑制肌肉消瘦所涉及之信號傳導路徑可能緩解肌肉萎縮為極具吸引力的。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。

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損失。腱切除術導致靜態張力即刻損失、肌節縮短以及肌肉質量及肌力產生能力隨後降低(Jamali等人, 2000 Muscle Nerve 23: 851-862)。因此, 誘發骨骼肌萎縮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/或預防性療法。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而維持。慢性療法可用於隨時間維持肌力或緩慢增進肌力。預防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下降。肌肉功能之改良並不總是為界定成功治療所必

需，因為對較不嚴重之肌肉消瘦的早期介入僅需要維持肌肉功能。

所述抗原結合蛋白亦可具有化妝用途以增加肌力、肌肉質量及肌肉功能。所述抗原結合蛋白亦可在太空飛行及訓練演習中用於太空人。

所述抗原結合蛋白對肌肉(諸如骨骼肌)可具有直接生物作用。或者，所述抗原結合蛋白對肌肉(諸如骨骼肌)可具有間接生物作用。

舉例而言，抗原結合蛋白可對肌肉組織結構、肌肉質量、肌肉纖維數目、肌肉纖維大小、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，可增加個體之瘦肉質量。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)。所述抗原結合蛋白可增加肌肉纖維數目及/或肌肉纖維大小。所述抗原結合蛋白可增強肌肉再生及/或減少肌肉纖維化。所述抗原結合蛋白可增加肌母細胞之增殖速率及/或活化肌原性分化。舉例而言，抗原結合蛋白可增加肌肉前驅細胞之增殖及/或分化。

所述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。所述抗原結合蛋白可調節肌肉抑制素含量。所述抗原結合蛋白可增加個體之體重。所述抗原結合蛋白可增加肌肉收縮性及/或改良肌肉功能。抗原結合蛋白可增加骨密度。

本文所述之抗原結合蛋白可調節肌肉生長、功能及收縮所涉及之蛋白質合成及/或異化。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、肌縮蛋白、肌漿蛋白之肌肉相關蛋白的蛋白質合成。舉例而言，可藉由使用本文所述之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的蛋白質異化。

所用診斷方法

本文所述之抗原結合蛋白可用於活體外或活體內偵測生物樣品中之肌肉抑制素以達成診斷目的。舉例而言，抗肌肉抑制素抗原結合蛋白可用於偵測經培養細胞中、組織中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)。可採用習知免疫分析法，包括ELISA、西方墨點法(Western blot)、免疫組織化學法或免疫沈澱。

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增加肌力、肌肉質量及肌肉功能之生物作用。

抗原結合蛋白可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提供。為方便起見，該套組可包含預定量之試劑與使用說明書。

基因療法

可將編碼本文所述之抗原結合蛋白之核酸分子投與有此需要之個體。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。核酸分子可包含於用於人類或動物細胞中之表現的載體中。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序列(SEQ ID NO: 101)。GB1標籤(SEQ ID NO: 102)描述於WO2006/127682中且據發現與使用Fc標籤之構築體相比能夠以較高量表現肌肉抑制素且能夠適當摺疊肌肉抑制素。小鼠聚合蛋白序列(SEQ ID NO: 103)用於產生成熟肌肉抑制素序列(SEQ ID NO: 104)，此係因為人類與小鼠成熟肌肉抑制素之序列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序列進行工程改造。

使用於含0.5 M NaCl之50 Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)中之Ni-NTA瓊脂糖(Qiagen)自CHO培養基中捕捉扣除信號序列之經表現HexaHisGB1Tev/(D76A)小鼠肌肉抑制素聚合蛋白。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/蛋白質比率由弗林蛋白酶(自身(in-house)表現，弗林蛋白酶之序列示於SEQ ID NO: 105中)裂解隔夜。弗林蛋白酶使前肽與成熟肌肉抑制素之間(「TPKRSRR」與「DFGLDCD」之間)的聚合蛋白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全部混合物置於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)且在40分鐘內以15%-60%之緩衝液B梯度(C8 RP-HPLC緩衝液A：0.1% TFA之H₂O溶液，緩衝液B：0.1% TFA於100%乙腈中之溶液)自混合物中分離成熟肌肉抑制素。將峰前部含有成熟肌肉抑制素之溶離份彙集且用於後續活體外分析法。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

肌肉抑制素反應性報導基因分析法(Thies等人，(2001) Growth Factors 18(4) 251-259)用於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(Invitrogen)、5%木炭貧化FCS(Hyclone)及1X麩丙胺酸二肽(Glutamax)(Invitrogen)之高葡萄糖DMEM中生長。接著以胰蛋白酶處理細胞以產生懸浮液且用在PAI-1啟動子之12xCAGA盒控制下含有螢光素酶基因之pLG3質體，使用Gemini轉染試劑(自身試劑，描述於專利WO2006/053782中)轉染。以每孔40,000個細胞

將細胞接種於96孔Fluoronunc板(VWR)，且使其沈降並生長隔夜。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(編號788-G8-010/CF)或自身肌肉抑制素(如上1.1所述)，兩者均具有SEQ ID NO: 104所示之序列)添加至各孔之培養基中且將細胞再培育6小時，隨後添加SteadyLite(Perkin Elmer LAS)，在室溫下培育20分鐘且在SpectraMax M5讀取器(Molecular Devices)中進行讀數。展示肌肉抑制素活化細胞信號傳導，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與自身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。自身經純化肌肉抑制素相較R&D Systems肌肉抑制素在分析法中展示較佳低的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McCoy's培養基(Invitrogen)及10%熱滅活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、5%木炭貧化血清(Hyclone)及2 mM麩丙胺酸二肽(Invitrogen)之高葡萄糖DMEM(分析培養基)中。藉由於懸浮液中將18.2 µg在PAI-1啟動子之12xCAGA盒控制下含有螢光素酶基因之pLG3質體與182 µl 1 mM Gemini轉染試劑(自身試劑，描述於專利WO2006/053782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(最終

體積 20 μ l) 存在下以恆定濃度將重組肌肉抑制素 (R&D Systems 肌肉抑制素 (編號 788-G8-010/CF) 或自身肌肉抑制素 (如上 1.1 所述)) 添加至 96 孔黑色 FluoroNUNC 分析板 (VWR) 中。將肌肉抑制素抗體混合物預培育 30 分鐘。用凡爾生：TrypLE 自燒瓶中分離經轉染細胞，且以 2.2×10^5 個細胞/毫升再懸浮於分析培養基中，且以 180 微升/孔分配至分析板中。將板再培育 6 小時，隨後添加 50 μ l SteadyLite 試劑 (Perkin Elmer LAS)，在室溫下培育 20 分鐘且在 SpectraMax M5 讀取器 (Molecular Devices) 中進行讀數。展示成熟二聚肌肉抑制素活化細胞信號傳導，從而引起螢光素酶表現之劑量反應曲線展示於圖 3B 中。自身肌肉抑制素物質以劑量依賴性方式且如不同天所獲得之數據所示在不同測試時刻以可再現方式活化 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

藉由用成熟肌肉抑制素 (如實例 1.1 所述而製備) 腹膜內注射各隻小鼠來使 SJL/J 小鼠 (Jackson Laboratories) 免疫。免疫之前，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 肌肉抑制素與 10 μ g 小隱孢子球菌結合) 及另外 7.5 μ g 可溶性肌肉抑制素使小鼠免疫。自小鼠中移除脾細胞且在 PEG1500 (Boehringer) 存在下使 B 淋巴細胞與源自 P3X63BCL2-13 細胞 (自身產生，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。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夾心分析模式，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，編號788-G8-010/CF)及自身經表現及經純化之肌肉抑制素(參見上述1.1)的結合性。

由限制稀釋法次選殖肌肉抑制素結合分析法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管柱來純化在無血清條件下於細胞工廠中生長之來自此等融合瘤之免疫球蛋白。接著由ELISA及BIAcore™針對肌肉抑制素結合性再篩選此等經純化之單株抗體。

與重組肌肉抑制素結合之有效抗體即定為單株抗體10B3。

2.2 對單株抗體10B3進行定序及選殖10B3嵌合體

自10B3融合瘤細胞中提取全部RNA且藉由使用對前導序列具特異性之引子及根據預定同型(IgG2a/κ)之抗體恆定區進行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區胺基酸序列示於SEQ ID NO: 7中。10B3 V_L區胺基酸序列示於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)	RYYYGTGPGADWYFDV (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 野生型恆定區中來構築嵌合抗體。使用信號序列 (如 SEQ ID NO: 9 所示) 構築此等構築體。

簡言之，由 PCR 擴增經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 位點經設計以框入 V_H 域且選殖至含有人類 $\gamma 1$ 野生型恆定區之載體 (Rld_Ef1) 中。Hind III 及 BsiW I 位點經設計以框入 V_L 域且選殖至含有人類 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 (使用標準分子生物技術) 以供 CHOK1 細胞上清液中之表現用。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 所示之重鏈胺基酸序列。10B3 嵌合抗體具有如 SEQ ID NO: 27 所示之輕鏈胺基酸序列。

2.3 與重組肌肉抑制素結合

在夾心ELISA中，10B3及10B3嵌合體(10B3C)結合肌肉抑制素(R&D Systems，編號788-G8-010/CF)。用肌肉抑制素以10奈克/孔塗布板，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°C下經連續稀釋培育抗體2小時，且再次洗滌板，隨後在37°C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)直至發生比色反應為止且藉由添加H₂SO₄中止反應。在490 nm之吸光度下對板進行讀數且測定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%信賴度(ng/ml)
10B3	69	46-102
10B3嵌合體	49	33-73

藉由BIAcore™ (表面電漿共振)分析來評估10B3小鼠親本體及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10B3小鼠親本體，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。

捕捉之後，使64 nM、16 nM、4 nM、1 nM、0.25 nM及0.0625 nM之重組肌肉抑制素通過表面，且緩衝注射液(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發生新的抗體捕捉

事件。使用 T100 機器分析軟體所固有之 1:1 模型與二價模型來分析數據(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 與肌肉抑制素之結合性的 T100 數據

動力學模型	10B3 嵌合體之 平衡常數(KD)	10B3 小鼠親本體之 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 之分析法以判定結合對純的成熟肌肉抑制素是否具特異性或與其他肌肉抑制素抗原是否仍可發生結合，該等其他肌肉抑制素抗原包括潛伏複合物及在 BMP-1 裂解之後自潛伏複合物釋放之成熟肌肉抑制素。

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。於 CHO 分泌系統中表現此序列，且由 Ni-NTA (GE Healthcare, NJ) 自 CHO 培養基中捕捉經表現之蛋白質。由 Tev 蛋白酶(自身表現，序列示於 SEQ ID NO: 107 中)使 HexaHisGB1 標籤裂解。Tev 蛋白酶使 SEQ ID NO: 106 之標籤與前肽之間(「ENLYFQ」與「ENSEQK」之間)發生裂解，得到 SEQ ID NO: 108 之序列。

在 6 M 鹽酸胍存在下將經裂解標籤及未經裂解之 hexaHisGB1Tev/人類肌肉抑制素聚合蛋白捕捉於 Ni-NTA 上，其中標籤裂解之人類肌肉抑制素聚合蛋白處於未結合

之徑流中。將該徑流施加於具有1×PBS緩衝液之Superdex 200管柱(GE Healthcare, NJ)上，且在管柱上分離聚集二聚體及單體形式。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1×PBS中隔夜，且加載至具有1×PBS緩衝液之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之峰處的溶離份。由LC/MS與SDS-PAGE確認潛伏複合物(數據未示)。

在4°C下將肌肉抑制素抗原以100奈克/孔塗布於具有PBS之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，隨後添加以洗滌緩衝液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，用硫酸中止，且在450 nm下對板進行讀數。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裂解之後自潛伏複合物釋放之肌肉抑制素。亦發現10B3不會與前肽二聚體結合(數據未示)。

2.4 粗定位肌肉抑制素上之10B3結合抗原決定基

基於肌肉抑制素胺基酸序列來合成由10個胺基酸重疊(以4個胺基酸補償)之生物素標記14元肽(14 mer peptide)以定位由10B3(Mimotopes, Australia供應)識別之結合抗原決定基之位置。

在SRU BIND讀取器(SRU Biosystems)上進行工作。洗滌抗生蛋白鏈菌素生物感測器板，進行基線讀取，且將生物素標記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，且進行新的基線讀取，接著添加抗體且監測結合。

由10個胺基酸重疊(以4個胺基酸補償)之經專門設計的14元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	Hydro	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-	SGSGGECEVFLQKYPHT (SEQ ID NO: 67)	-NH2	0.447	2211.21
25	生物素-	SGSGFVFLQKYPHTLVH (SEQ ID NO: 68)	-NH2	0.593	2279.36
27	生物素-	SGSGQKYPHTLVHQANP (SEQ ID NO: 69)	-NH2	0.279	2183.14
29	生物素-	SGSGHVLVHQANPRGSA (SEQ ID NO: 70)	-NH2	0.218	2037.94
31	生物素-	SGSGVHQANPRGSAGPCC (SEQ ID NO: 71)	-NH2	0.297	1909.85
33	生物素-	SGSGNPRGSAGPCCTPTK (SEQ ID NO: 72)	-NH2	0.238	1901.87
35	生物素-	SGSGSAGPCCTPTKMSP (SEQ ID NO: 73)	-NH2	0.468	1905.96
37	生物素-	SGSGCCTPTKMSPINMLY (SEQ ID NO: 74)	-NH2	0.582	2115.27
39	生物素-	SGSGTKMSPINMLYFNGK (SEQ ID NO: 75)	-NH2	0.39	2157.27
41	生物素-	SGSGPINMLYFNGKEQII (SEQ ID NO: 76)	-NH2	0.504	2193.28
43	生物素-	SGSGLYFNGKEQIIYGKI (SEQ ID NO: 77)	-NH2	0.434	2199.26
45	生物素-	SGSGGKEQIIYGKIPAMV (SEQ ID NO: 78)	-NH2	0.416	2060.17
47	生物素-	SGSGIYGKIPAMVVDR (SEQ ID NO: 79)	-NH2	0.558	2091.25
49	生物素-	SGSGGKIPAMVVDRCGCS (SEQ ID NO: 80)	-OH	0.396	1950.02

14元肽結合數據之分析顯示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肽組內之抗原決定基(數據未示)。

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(數據未示)。

2.5 中和肌肉抑制素ActRIIb受體結合性

在4°C下，將重組可溶性ActRIIb(R&D Systems，編號339-RBB)以1 µg/ml塗布於具有碳酸鹽緩衝液之ELISA板之

孔中隔夜。對板進行阻斷(參見上述2.3之阻斷溶液)且遵循標準ELISA方案進行洗滌。平行地，在37°C下，將2 nM生物素標記肌肉抑制素(自身，如1.1所述，生物素標記材料)與由10B3、10B3C及陰性對照(IgG1同型對照)組成之抗體連續稀釋液一起預培育2小時。接著在37°C下將生物素標記肌肉抑制素：抗體反應物添加至塗有ActRIIb之板中，歷時1小時。遵循標準洗滌程序，隨後添加1:1000稀釋之抗生蛋白鏈菌素-HRP結合物(Dako P0397)且在37°C下再培育1小時。再次洗滌板，且在OPD受質(Sigma)及酸停止溶液處理之後於490 nm之吸光度下進行分析。抑制肌肉抑制素活性之抑制曲線及IC₅₀值分別展示於圖5及表8中。

表8. 中和ActRIIb受體之IC₅₀

抗體	平均IC ₅₀ (ng/ml)	95%信賴度(ng/ml)
10B3	132	99-176
10B3嵌合體	138	97-196

受體中和分析法為可用於基於效能區分IC₅₀低於1 nM之分子的最敏感方法。然而，該分析法本身對結合感受態生物素標記肌肉抑制素之精確濃度敏感。因此，在不同情況下，已使用相同方法測定10B3之其他IC₅₀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分析法來評估活體外抗肌肉抑制素抗體對肌肉抑制素活性之作

用。對該分析法進行改進以在37℃下將濃度為2.8 nM(相當於細胞活化分析法中之ED₇₀)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。對螢光素酶進行讀數，由此產生圖6所示之抑制曲線。表9展示在3次重複分析及ANOVA分析之後針對抗體所測定之IC₅₀值。數據清楚顯示對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分析法之IC₅₀
(A204細胞)

抗體	平均IC ₅₀ (nM)	95%信賴度(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

為顯示親本10B3之功效，對8週齡雌性CB17 SCID小鼠進行為期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)。研究結束後，分別藉由對動物稱重及QMRI分析來測定動物之總體重(A)及總瘦肌質量(B)(圖7)。精選動物後(第35天)，自動物中解剖出個別肌肉(腓腸肌(A)、四頭肌(B)及伸趾長肌(EDL)(C))以供質量測定(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天研究之後體重及瘦肌質量有最顯著改良(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。

又，研究(未描述)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之強直收縮力量測中可顯示顯著改良。此外，該改良顯示與肌肉質量無關。因此，10B3展現改良現有肌肉質量之功能的能力。

3. 對10B3進行人類化

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。

鑑別適於10B3 V_H之人類受體構架(IGHV1_18及JH3人類J區段序列)：SEQ ID NO: 10。鑑別適於10B3 V_L之人類受體構架(IGKV1_16及JK2人類J區段序列)：SEQ ID NO: 11。在SEQ ID NO: 10中，存在受體構架之CDRH1及CDRH2，且CDRH3由XXXXXXXXXX表示。在SEQ ID NO: 11中，存在受體構架之CDRL1及CDRL2，且CDRL3由XXXXXXXXXX表示。(10個X殘基為CDR位置之佔位，而非各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受體構架中之直系同源殘基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)型式之設計方面具潛在重要性(位置係根據Kabat等人之編號規定)：

位置(Kabat編號)	小鼠10B3 V _H	人類 V _H
28	S	T
105	T	Q

位置(Kabat編號)	小鼠10B3 V _L	人類 V _L
16	R	G
71	Y	F
100	A	Q

三個具有不同回復突變之人類化V_H構築體經設計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至H2。使用CDR之Kabat定義，H0(SEQ ID NO: 12)由10B3 V_H CDR移植至指定受體序列中之CDR移植體組成。H1(SEQ ID NO: 13)與H0一致，但具有回復突變，其中位置105處之胺基酸為取代麩醯胺酸之蘇胺酸。H2(SEQ ID NO: 14)與H0一致，但具有回復突變，其中位置28處之胺基酸為取代蘇胺酸之絲胺酸。

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

四個具有不同回復突變之人類化V_L構築體經設計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，其中位置16處之胺基酸為替代甘胺酸之精胺酸。L2(SEQ ID NO: 17)與L0一致，但具有回復突變，其中位置71處之胺基酸為替代苯丙胺酸之酪胺酸。L3(SEQ ID NO: 18)與L0一致，但具有回復突變，其中位置100處之胺基酸為替代麩醯胺酸之丙胺酸。

3.2 對10B3進行人類化

藉由重新建構重疊寡核苷酸來製備人類化V_H及V_L構築體，該等寡核苷酸包括供選殖至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。引入Hind III及Spe I限制位點以框入含有信號序列(SEQ ID NO: 9)之V_H域以供選殖至含有Rld Ef1之人類IgG1野生型恆定區中。引入Hind III及BsiW I限制位點以框入含有信號序列(SEQ ID NO: 9)之V_L域以供選殖至含有Rln Ef1之人類κ恆定區中。此舉基本上如WO 2004/014953中所述。

4. 表現及表徵人類化抗體

4.1 製備抗體

在Rld_Ef1及Rln_Ef1哺乳動物表現載體中製備人類化V_H構築體(H0、H1及H2)及人類化V_L構築體(L0、L1、L2及L3)。將質體重鏈-輕鏈組合(H0L0、H0L1、H0L2、

H0L3、H1L0、H1L1、H1L2、H1L3、H2L0、H2L1、H2L2、H2L3)短暫地共轉染至CHOK1細胞中且小規模表現以得到12種不同人類化抗體。

一式兩份且在兩個獨立實驗中將各抗體之質體轉染至CHOK1細胞中。另外，表示10B3嵌合體，作為陽性對照。在肌肉抑制素結合ELISA中分析CHOK1細胞上清液中所產生之抗體的活性(參見4.2)。圖10A之圖表中說明僅一個實驗之ELISA數據。在此ELISA中所有12種人類化mAb皆顯示與重組肌肉抑制素結合。在兩個實驗中，含有H2或L2鏈之mAb傾向於對肌肉抑制素具有較佳結合活性，其類似於針對10B3嵌合體所觀測之結合活性。

圖10B由圖10A引出且展示含有H2及/或L2鏈之抗體及10B3嵌合體。

H0L0、H1L2及H2L2經選擇以供較大規模表現、純化及進一步分析。

藉由直接ELISA分析，經純化之H0L0、H1L2及H2L2結合重組肌肉抑制素。該方法係如4.2所述而進行且ELISA數據在圖11之圖表中說明。在CHOE1a與CHOK1細胞表現系統中均產生H2L2及H0L0。自CHOK1製劑獲得之低濃度抗體難以精確定量。自CHOE1a製劑獲得高濃度之經純化抗體。10B3嵌合抗體包括於ELISA中，作為陽性對照(此材料由CHOE1a製得)。H2L2對肌肉抑制素之結合活性與10B3嵌合體相當且優於針對H0L0所觀測之結合活性。

4.2 肌肉抑制素結合ELISA

大致根據此方案進行肌肉抑制素結合ELISA。在4℃下，用10奈克/孔重組肌肉抑制素塗布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。接著將抗體滴定至適合之濃度範圍(約100至0.001 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。使用抗小鼠IgG HRP結合抗體(Dako供應之P0260，根據製造商之說明書使用此試劑)偵測小鼠抗體(諸如10B3)之結合。使用抗人類κ輕鏈HRP結合抗體(Sigma Aldridge供應之A7164，根據製造商之說明書使用此試劑)偵測人類化抗體或嵌合抗體(諸如10B3嵌合體或H0L0)之結合。接著用洗滌緩衝液洗滌板3次且用OPD受質(來自Sigma，根據製造商之說明書使用)進行顯色且在490 nm下於板讀取器上進行讀數。

4.3 藉由BIAcore™分析與重組肌肉抑制素之結合

藉由BIAcore™分析，經純化之H0L0、H1L2及H2L2結合重組肌肉抑制素。將重組肌肉抑制素以三種不同密度(低、中及高密度，以分別得到約35、120及350 RU之R-max值)固定於BIAcore™晶片上。使256、64、16、4及1 nM之抗體通過。將0 nM抗體用於雙重參考且使數據與1:1模型擬合。

存在許多告誡適用於此分析法所產生之數據；肌肉抑制素固定於晶片表面上可能引起蛋白質構形改變，或可能使

抗體與蛋白質上之抗原決定基結合不明顯，且將產生異質表面(可能產生多個結合事件)。肌肉抑制素之低密度固定應顯示1:1結合(主要)，肌肉抑制素之中密度及高密度固定可能受二價(親和力)結合事件影響。在此分析法中，正確抗體濃度為精確值的測定所必需。

因此，使用BIAcore™所產生之數據一般用於對構築體進行分級，而非提供明確動力學。BIAcore™數據在表10至表12中說明。

表10：10B3嵌合體、H0L0、H1L2及H2L2與低密度肌肉抑制素表面結合之BIAcore™分析

構築體	締合速率， k_a ($M s^{-1}$)	解離速率， k_d (s^{-1})	結合親和力， KD (nM)
10B3嵌合體	5.987×10^5	9.668×10^{-4}	1.615
H0L0	8.012×10^5	6.615×10^{-3}	8.255
H1L2	2.205×10^5	3.324×10^{-3}	15.08
H2L2	3.206×10^5	2.682×10^{-3}	8.366
注意：分析之解離階段縮短至約250秒，以改良曲線擬合			

表11：10B3嵌合體、H0L0、H1L2及H2L2與中密度肌肉抑制素表面結合之BIAcore™分析

構築體	締合速率， k_a ($M s^{-1}$)	解離速率， k_d (s^{-1})	結合親和力， KD (nM)
10B3嵌合體	4.129×10^5	5.593×10^{-4}	1.355
H0L0	2.575×10^5	9.301×10^{-4}	3.612
H1L2	1.369×10^5	6.932×10^{-4}	5.064
H2L2	2.456×10^5	7.368×10^{-4}	3.000
注意：曲線擬合一般較差			

表 12：10B3 嵌合體、H0L0、H1L2 及 H2L2 與高密度肌肉抑制素表面結合之 BIAcore™ 分析

構築體	締合速率， k_a ($M s^{-1}$)	解離速率， k_d (s^{-1})	結合親和力， KD (nM)
10B3 嵌合體	2.478×10^5	2.185×10^{-4}	0.882
H0L0	1.463×10^5	3.375×10^{-4}	2.307
H1L2	9.224×10^4	2.232×10^{-4}	2.420
H2L2	1.473×10^5	2.160×10^{-4}	1.467
注意：曲線擬合一般較差			

此等數據指示結合親和力隨著 BIAcore™ 晶片上之肌肉抑制素表面密度增加而改良，此可能歸因於親和力結合。然而，等級次序大致保持相同，且與用於量測親和力之表面無關(結合親和力之等級次序=10B3 嵌合體>H2L2>H0L0>H1L2)。此等數據與肌肉抑制素 ELISA 數據廣泛一致。

4.4 在報導細胞生物分析法中中和重組肌肉抑制素

在以上(1.2)所述之肌肉抑制素反應性報導基因分析法中測試人類化抗體，以評估活體外功效。在 37°C 下，將濃度為 2.8 nM 之肌肉抑制素與不同濃度之抗體(0.1-20 nM)一起預培育，隨後添加至經轉染之 A204 細胞中，且隨後對螢光素酶進行讀數。所得數據展示於圖 12 中且經測定之 IC_{50} (ANOVA 分析)展示於表 13 中。

表 13. A204 活體外活性分析法中人類化抗體之 IC_{50}

抗體	平均 IC_{50} (nM)	95%信賴度(nM)
10B3	8.5	7.2-10.1
10B3 嵌合體	5.1	4.2-6.1
H0L0	10.2	7.9-13.1
H2L2	8.6	6.8-10.7

人類化抗體抑制A204細胞之肌肉抑制素誘導之活化，然而，與嵌合10B3相比，已觀測到活性有一些損失，此可能歸因於人類構架區之影響。然而，在分析法中，活性損失極小且確定處於2倍以內。

5. 人類化抗體之可展性分析(developability analysis)

10B3嵌合體與人類化抗體之重鏈及輕鏈中之潛在脫除醯胺基位點的電子雜交分析(in silico analysis)鑑別重鏈CDRH2中Kabat位置54處之天冬醯胺(N54)具有脫除醯胺基之高潛力。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位置91處具有半胱胺酸(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而產生修飾，從而引起產物之可能異質性及親和力之潛在變化。另外，此殘基可能能夠因與產生免疫球蛋白摺疊所必需之可變區中其他半胱胺酸的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。

另外，亦將重鏈CDRH2中進行之脫除醯胺基取代與輕鏈CDRL3中位置91處之取代組合。作為此等分析之一部分所產生之抗體在表14中說明。

表 14：產生以供可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:
10B3嵌合體N54D (HCLC-N54D)	19	8
10B3嵌合體N54Q (HCLC-N54Q)	20	8
10B3嵌合體N54D & C91S (HCLC-N54D-C91S)	19	21
10B3嵌合體N54Q & C91S (HCLC-N54Q-C91S)	20	21
10B3嵌合體C91S(HCLC-C91S)	25	21
H2L2 N54D (H2L2-N54D)	22	17
H2L2 N54Q (H2L2-N54Q)	23	17
H2L2 N54D & C91S (H2L2-N54D-C91S)	22	24
H2L2 N54Q & C91S (H2L2-N54Q-C91S)	23	24
H2L2 C91S (H2L2-C91S)	14	24

5.1 表現及表徵可展性變異體

藉由相關H2重鏈及L2輕鏈表現載體之定點突變誘發來製備表現此等抗體所必需之重鏈及輕鏈構築體。將質體重鏈-輕鏈組合(H2L2-N54D；H2L2-N54Q；H2L2-N54D-C91S；H2L2-N54Q-C91S；H2L2-C91S)短暫地共轉染至CHO細胞中且小規模表現以得到5種不同人類化抗體。另外，表現10B3嵌合體(HCLC)及H2L2，作為陽性對照。

一式兩份且在兩個獨立實驗中將各抗體之質體轉染至CHOK1細胞中。在肌肉抑制素結合ELISA中分析CHOK1細胞上清液中所產生之抗體的活性。如4.2所述進行ELISA方法且圖13之圖表中說明僅一個實驗之ELISA數據。在此ELISA中，含有N54Q及/或C91S取代之H2L2 mAb顯示與重組肌肉抑制素結合，且此結合分別與10B3嵌合體(HCLC)或H2L2大致相當。在此ELISA中，10B3嵌合體及含有單獨N54D取代(或與C91S取代組合)之H2L2 mAb不會與重組肌肉抑制素結合。

H2L2-N54Q、H2L2-C91S及H2L2-N54Q C91S經選擇以供較大規模表現(在CHOK1與CHOE1a表現系統中)、純化及進一步分析。在肌肉抑制素結合ELISA中分析此等抗體之活性。如第4.2節所述進行ELISA方法且圖14之圖表中說明僅一個實驗(來自總共三個實驗)之ELISA數據。H2L2 C91S對肌肉抑制素之結合活性似乎類似於10B3嵌合體、H0L0及H2L2。然而，H2L2 N54Q及H2L2 N54Q C91S對肌肉抑制素似乎具有較低結合活性。

亦由BIAcore，使用以上4.3所述之類似方法測試可展性構築體以測定肌肉抑制素結合親和力之任何變化(參見表15)。數據(對於低密度表面)顯示在H2L2人類化變異體中，預定脫除醯胺基位點(N54Q)之取代導致親和力損失至少2倍。

表15. 肌肉抑制素可展性變異體之肌肉抑制素結合動力學

構築體	ka	kd	KD (nM)
10B3嵌合體(HCLC)	3.323E+5	1.477E-3	4.44
H2L2	3.113E+5	3.735E-3	12.0
H0L0	1.922E+5	4.363E-3	22.7
H2L2-C91S	1.903E+5	3.153E-3	16.6
H2L2-N54Q	1.590E+5	4.447E-3	28.0
H2L2-N54Q-C91S	1.389E+5	4.623E-3	33.3

亦藉由FORTEbio™ (生物膜層干涉技術)分析來評估10B3小鼠親本體及H2L2-C91S可展性變異體對重組肌肉抑制素之親和力。藉由抗原捕捉進行FORTEbio™分析。根據製造商之說明書，藉由一級胺偶合將肌肉抑制素(自身，參見以上1.1)偶合至胺反應性生物感測器上。接著將濃度

為 20 nM 之抗體捕捉於此表面上。使用機器所固有之評估軟體分析數據且使用 1:1 擬合分析數據(參見表 16)。由於與感應器表面結合之肌肉抑制素分子數目有限及抗體濃度較低，故親和力作用降低，從而與 Biacore 分析相比能夠更精確地量測親和力。數據顯示親本抗體(10B3)具有 310 pM 之親和力，而可展性變異體 H2L2-C91S 具有 73 pM 之親和力。然而，由於抗體與肌肉抑制素之結合性質，故此等值主要用於達成分級目的，且親和力可能並不代表活體內親和力。

表 16. 10B3 親本體及 H2L2-C91S 可展性變異體對肌肉抑制素之親和力

抗體	莫耳濃度 [M]	k_d [1/s]	k_a [1/Ms]	K_D [M]	締合 R^2
10B3 親本體	2E-8	1.31E-4	4.24E5	3.10E-10	0.9981
H2L2-C91S	2E-8	2.99E-5	4.10E5	7.30E-11	0.99652

亦使用以上 1.2 所述之 A204 螢光素酶分析法可展性突變對活體外中和分析法之影響。抑制曲線之圖解表示展示於圖 15 中且相應 IC_{50} 值呈現於表 17 中。根據此分析法，人類化變異體之表觀中和效能相對於可展性變異體並無損失。

表 17. A204 活體外活性分析法中可展性抗體變異體之 IC_{50}

抗體	平均 IC_{50} (nM)	95%信賴度(nM)
10B3 嵌合體	8.45	5.36-13.31
H0L0	10.07	5.74-17.65
H2L2	10.14	5.87-17.49
H2L2-C91S	9.26	5.17-16.62
H2L2-N54Q	11.98	6.35-22.59
H2L2-N54Q-C91S	10.42	5.99-18.11

5.2 可展性變異體之脫除醯胺基潛力

藉由在37°C下與1%碳酸氫銨(pH 9.0)一起培育48小時使H0L0、H2L2、H2L2-C91S、H2L2-N54Q及H2L2-N54Q-C91S抗體歷經誘導脫除醯胺基之應激條件。處理之後，在肌肉抑制素結合ELISA中分析H0L0、H2L2、H2L2-C91S、H2L2-N54Q及H2L2-N54Q-C91S之功能活性(如4.2所述)。圖16至圖20中說明僅一個實驗(來自總共兩個實驗)之ELISA數據。此等數據清楚指示處理程序不會影響任一抗體與肌肉抑制素結合之能力。

6. CDRH3變異型人類化抗體

6.1 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)作為基礎分子來進行各殘基至替代性胺基酸殘基之CDRH3(SEQ ID NO: 3)的定點突變誘發。使用pTT載體(加拿大國家研究委員會(National Research Council Canada)，具有經修飾之多重選殖位點(MCS))產生包括H2及L2-C91S之基礎序列(分別為SEQ ID NO: 45及55)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6.2及6.3)。

6.2 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質體短暫地共轉染至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之基礎序列與變異型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。

6.3 對組織培養上清液進行初始掃描-ProteOn XPR36

在ProteOn XPR36(Biorad Laboratories)上對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。將來自表現相關特定變異體之短暫性轉染而得之組織培養上清液的CDRH3變異體直接捕捉於蛋白質A/G表面或抗人類IgG表面上(視經突變之殘基而定)。捕捉之後，將256 nM、32 nM、4 nM、0.5 nM及0.0625 nM之自身重組人類肌肉抑制素(參見以上1.1)用作分析物，且單獨緩衝注射液(亦即0 nM)用於對結合曲線進行雙重參考。在肌肉抑制素結合事件之後，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 MgCl₂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。接著將數據與ProteOn分析軟體所固有之1:1模型(具有質量輸送)擬合。使用HBS-EP(Biacore/GE-Healthcare BR-1006-69)進行操作且分析溫度為25℃。

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基礎分子具有改良之親和力的構築體。判斷篩選物具有經鑑別之11種CDRH3變異體，其相較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18中(使用Kabat編號)。所有變異體皆具有輕鏈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)，但此未作進一步分析。

表 18. CDRH3變異型人類化抗體序列

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)

提及經編碼之抗體(亦即H2L2-C91S_Y96L)意謂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)在適合之細胞株中共轉染及表現所產生之抗體。

6.4 表現一組經選擇之CDRH3變異體

在 HEK 293 6E 細胞中表現表 18 所述之 11 種 CDRH3 變異體之重鏈及輕鏈(如 6.2 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。

6.5 藉由 BIAcore™ 分析與重組肌肉抑制素之結合

為判斷是否成功選擇經 ProteOn XPR36 初始篩選之構築體，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(自身重組肌肉抑制素，參見以上 1.1)以三種不同密度(低、中及高密度)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，且緩衝注射液用於對結合相互作用進行雙重參考。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 (off-rate)。藉由使用 100 mM 磷酸進行再生，且在 25°C 下使用 HBS-EP 緩衝液進行分析。

據發現所測試之所有構築體相較基礎分子 (H2L2 C91S) 顯示較佳之解離速率(解離速率常數)，此係因為解離速率與 H2L2 C91S 相比較慢。在高密度表面上，除 10B3 嵌合體以外之前 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。

6.6 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(自身重組肌肉抑制素，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變異體通過所有三個表面，且緩衝注射液(亦即0 nM)用於雙重參考，使用100 mM磷酸進行再生。使數據與T100 Biacore機器所固有之二價模型擬合且在25°C下使用HBS-EP操作。

一般而言，在所有三種密度表面上，基礎H2L2-C91S相較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正的二價結合之最佳表面，此係因為親和力結合及再結合事件可能較為頻繁見且因此可「放大」親和力之小差異。一般而言，所有CDR變異體相較基礎H2L2-C91S似乎皆較佳，此主要因為解離速率優良(亦即較慢)，高密度表面上尤其如此。

由於此分析法所涉及之方法，故在標靶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，此數據適用於達成分級目的。使用來自此分析法之高密度表面之數據，基於總體親和力(平衡常數 K_D)但除嵌合體10B3以外，前5種構築體為F100G_Y、P100B_I、P100B_F、F100G_N及W100E_F。

然而，所有其他構築體之親和力皆在F100G_Y之2倍以內。

6.7 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°C下，用2.5 µg/ml針對肌肉抑制素之多株抗體(R&D Systems, AF788)塗布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1 µg/ml於阻斷緩衝液中之肌肉抑制素，隨後用洗滌緩衝液洗滌3次。接著將抗體滴定至適合之濃度範圍(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數。

該實驗在圖21中說明，將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變異型抗體皆與重組肌肉抑制素結合。H2L2-C91S_P100B_I、H2L2-C91S_V102N、H2L2-C91S_G100A_K、H2L2-C91S_P100B_F及H2L2-C91S_F100G_Y相較基礎H2L2-C91S及H0L0傾向於對肌肉

抑制素具有較佳結合活性。

6.8 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。

6.8.1 使用多株Ab作為捕捉方法

使用6.7所述之方案，將10B3(最終濃度為0.3 $\mu\text{g/ml}$)添加至各孔中且與滴定至適合濃度範圍(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數據獲得之分級展示於表19中。

6.8.2 使用生物素標記肌肉抑制素作為捕捉方法

使用6.7所述之方案，但最初在4°C下用5 $\mu\text{g/ml}$ 抗生蛋白鏈菌素塗布板隔夜。在1小時內添加0.3 $\mu\text{g/ml}$ 於阻斷緩衝液中之生物素標記肌肉抑制素，隨後用洗滌緩衝液洗滌3次。將10B3(最終濃度為0.2 $\mu\text{g/ml}$)添加至各孔中且與滴定至適合濃度範圍(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數據獲得之分級展示於表19中。

6.8.3 使用肌肉抑制素作為捕捉方法(直接捕捉)

使用6.7所述之方案，但最初在4°C下用0.2 $\mu\text{g/ml}$ 肌肉抑制素(自身重組肌肉抑制素，參見以上1.1)塗布板隔夜。將10B3(最終濃度為0.3 $\mu\text{g/ml}$)添加至各孔中且與滴定至適合濃度範圍(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數據獲得之分級展示於表19中。

所有CDRH3變異體皆能夠與10B3競爭。5種來自各不同競爭ELISA之最有效分子列於表19。

表19：5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		
生物素標記肌肉抑制素	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

基於本節(6.8)中之分析及6.6及6.7中之先前BIAcore數據，選擇變異體H2L2-C91S_P100B_F、H2L2-C91S_P100B_I、H2L2-C91S_F100G_Y、H2L2-C91S_V102N及H2L2-C91S_V102S以供進一步分析。

6.9 活體外抑制肌肉抑制素之生物活性

在肌肉抑制素反應性報導基因分析法中測試6.8之5種所選CDRH3變異體(參見以上1.2)以評估活體外功效。在37°C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°C下將細胞再培育6小時，隨後由發光來測定相對螢光素酶表現。所得IC₅₀展示於表20中。

表 20：A204 活體外活性分析法中人類化抗體之 IC₅₀

抗體	平均IC ₅₀ (nM)	95% CI之 下限(nM)	95% CI之 上限(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

數據顯示在此分析法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。

7. 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，所以分子保留其引發ADCC及CDC反應之Fc功能可能未必需要。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潛力。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，Fc失能之H2_F100G_Y)及輕鏈(SEQ ID NO: 40，L2-C91S)之全長DNA表現構築體。重鏈之詳情示於表21中。

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

在肌肉抑制素反應性報導基因分析法中分析Fc失能恆定區之影響(如上1.2所述)。所得IC₅₀數據展示於表22中。

表 22

抗體	平均IC ₅₀ (nM)	95% CI之 下限(nM)	95% CI之 上限(nM)
H2L2-C91S	4.083	1.319	12.640
Fc失能之H2L2-C91S_F100G_Y	1.239	0.524	2.932

此等數據顯示使如上所述「Fc失能之H2L2-C91S_F100G_Y」之Fc功能失能對抗體中和肌肉抑制素之效能無顯著影響。

8. CDRH2變異型人類化抗體

8.1 構築CDRH2變異型人類化抗體

如以上實例5所述，重鏈CDRH2中Kabat位置54處之天冬醯胺(N54)具有脫除醯胺基之潛力。為降低此潛在風險，使此胺基酸突變產生許多H2_F100G_Y之CDRH2變異體。此等變異體在CDRH2(SEQ ID NO: 2)中皆不同且藉由定點突變誘發，使用編碼H2_F100G_Y重鏈之pTT載體產生。使輕鏈(SEQ ID NO: 40，L2-C91S)與各重鏈一起表現。未使此等構築體之Fc區失能。

8.2 HEK293 6E細胞中CDRH2變異體之表現

如以上6.2所述，將分別編碼重鏈及輕鏈之pTT質體短暫地共轉染至HEK 293 6E細胞中。另外，表現H2L2-

C91S_F100G_Y，作為陽性對照。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的結合。CDRH2變異體之篩選指示所有變異體皆與重組肌肉抑制素結合。

使用所獲得之親和力數據及潛在脫除醯胺基風險之電子雜交分析，選擇一組5種CDRH2變異體(列於表23中)以供較大規模表現、純化及進一步分析。

表 23

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	NIYPYNLVSNNYNQRFKA(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	NIYPYNVVSNNYNQRFKA(SEQ ID NO: 97)

8.3 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(如實例4.2所述)。圖22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H2L2-C91S_F100G_Y對肌肉抑制素具有較佳或類似之結合活性。

8.4 CDRH2變異體BIAcore分析

亦由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之肌肉抑制素通過經捕捉之抗體表面；緩衝注射液(亦即0 nM)用於對結合數據進行雙重參考。使用100 mM磷酸使蛋白質A表面再生。將數據與T100 Biacore分析軟體所固有之二價模型及兩態模型擬合。然而，因為肌肉抑制素為二聚體，所以二價模型數據較為重要。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正的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。數據表明與H2L2-C91S_F100G_Y相比，CDRH2變異體不會太過顯著地影響親和力，由二價模型分析之最差構築體(H2L2 C91S_G55L F100G_Y)顯示總體親和力差6.8倍。

8.5 活體外抑制肌肉抑制素之生物活性

亦使用A204螢光素酶分析法分析CDRH2變異體對活體外中和分析法之作用(第1.2節所述)。抑制曲線之IC₅₀值示於表24中。

表24：A204活體外活性分析法中可展性抗體變異體之IC₅₀

抗體	平均IC ₅₀ (nM)	95% CI之下限 (nM)	95% CI之上限 (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

此分析法中之數據指示所有CDRH2變異型抗體皆以與H2L2-C91S_F100G_Y類似之效能抑制A204細胞之肌肉抑制素誘導之活化。

8.6 Fc失能之CDRH2變異體

H2L2 C91S_G55S F100G_Y(在A204分析法中具有最高表觀效能之可展性增強分子)為Fc失能的(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所例示。使用受體結合分析法(實例2.5)展示此新穎分子Fc失能之H2L2 C91S_G55S F100G_Y相對於H2L2 C91S_G55S F100G_Y具有稍加改良之效能(參見表25)。

表 25：ActRIIb受體結合分析法中可展性抗體變異體之IC₅₀值

mAb	平均IC ₅₀ (nM)	95% CI之 下限(nM)	95% CI之 上限(nM)
10B3	0.161	0.087	0.295
H2L2 C91S_G55S F100G_Y	0.786	0.326	1.898
Fc失能之H2L2 C91S_G55S F100G_Y	0.518	0.206	1.298

9. 10B3在糖皮質激素誘發之肌肉消瘦中之功效

在當前研究中，研究10B3處理是否可預防小鼠體內類固醇誘發之肌肉損失。用PBS、mIgG2a或10B3處理C57BL小鼠。將地塞米松用作誘發肌肉損失之類固醇。

地塞米松處理引起經對照抗體預處理之動物體重損失。藉由用10B3預處理而降低地塞米松誘發之重量損失。經對照抗體預處理之動物顯示伸趾長肌(EDL)、脛骨前肌(TA)

及腓腸肌之肌肉萎縮。相比之下，在經10B3預處理之動物中用地塞米松處理不會引起TA、EDL及腓腸肌萎縮。經對照抗體預處理之動物顯示體脂肪之積累增加。然而，在經10B3預處理之動物中用地塞米松處理之後體脂肪百分比並未增加。

實例9中之此等結果表明10B3或其人類化抗體可用於處理糖皮質激素誘發之肌肉消瘦。舉例而言，對經糖皮質激素治療之患者之肌肉消瘦的預防性處理可為有利的。

10. 10B3處理減輕坐骨神經擠壓模型之肌肉萎縮

此處使用神經損傷模型來評估10B3在預防小鼠之廢用性萎縮方面的功效。

用mIgG2a對照或10B3抗體處理C57BL小鼠。露出大腿中部之右側坐骨神經且保持完整(假組)或藉由使用止血鉗擠壓10秒而受損傷(神經擠壓組)。與假對照相比，坐骨神經擠壓損傷導致伸趾長肌(EDL)、脛骨前肌(TA)、腓腸肌及比目魚肌之質量下降。與IgG2a對照組相比，在假手術組中，10B3處理增加TA、EDL、腓腸肌及四頭肌之質量。與經IgG2a對照處理之動物相比，經10B3處理之動物保留較多肌肉。10B3處理亦增加經假手術與經神經擠壓之動物的總體重。

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

11. 10B3處理減輕帶有C-26腫瘤之小鼠的肌肉消瘦

在當前研究中，在帶有結腸-26腫瘤之小鼠中研究10B3

處理對體重變化、肌肉質量及肌肉功能之作用，此為癌症惡病質研究廣泛使用之臨床前模型。

將 39 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)腫瘤細胞以每隻小鼠 1×10^6 個細胞皮下植入 20 隻小鼠中。數小時後，動物開始接受抗體注射。第 0 天、第 3 天、第 7 天、第 14 天、第 21 天將劑量為 30 mg/kg 之小鼠 IgG2a 對照抗體或 10B3 腹膜內注射至小鼠中。在整個實驗中監測體重及脂肪質量。在第 25 天臨處死之前，藉由在對大腿中部坐骨神經電刺激之後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睪脂肪墊質量。

圖 23 展示第 0 天至第 25 天抗體處理對帶有 C-26 腫瘤之小鼠之體重的作用。腫瘤植入之後 21 天，帶有腫瘤之小鼠的體重開始明顯下降。用 10B3 處理有效減輕帶有腫瘤之小鼠的重量損失。經 10B3 處理之帶有腫瘤小鼠之平均體重比經 mIgG2a 對照抗體處理之帶有腫瘤小鼠高 8%。在 10B3 處理組與 mIgG2a 對照處理組之間腫瘤大小並無顯著差異(針對 IgG2a 之 2.2 g 相對於針對 10B3 之 1.9 g)。

圖 24 展示抗體處理對帶有 C-26 腫瘤之小鼠之總體脂肪(A)、附睪脂肪墊(B)及瘦肉質量(C)的作用。帶有腫瘤小鼠之總體脂肪顯著較少(圖 24A)。經 10B3 與 mIgG2a 對照處理之帶有腫瘤小鼠的附睪脂肪墊幾乎完全消失(圖 24B)，表明 10B3 不會保護帶有腫瘤之動物免受體脂肪損失。

如圖 24C 所示，在正常動物以及帶有腫瘤之小鼠中，10B3 處理使得瘦肉質量顯著 ($p < 0.01$) 增加。在移除腫瘤之後，經對照 IgG2a 處理之帶有腫瘤小鼠之瘦肉質量顯著較低。相比之下，經 10B3 處理之帶有腫瘤小鼠之瘦肉質量顯著 ($p < 0.01$) 高於經 IgG2a 處理之帶有腫瘤小鼠。實際上，在經 10B3 處理之帶有腫瘤小鼠與正常動物之間瘦肉質量並無顯著差異。

表 26 展示抗體處理對肌肉質量之作用。正如所料，帶有腫瘤小鼠之 TA、EDL、四頭肌、比目魚肌及腓腸肌並無顯著損失 (表 26)。10B3 處理增加正常動物之肌肉質量。最重要的是，10B3 處理減少帶有腫瘤小鼠之肌肉損失。在經 10B3 處理之帶有腫瘤小鼠中，TA、EDL、四頭肌、比目魚肌及腓腸肌之重量分別比經 IgG2a 對照處理之帶有腫瘤小鼠大 17.8%、11.3%、16.9%、13.4% 及 14.6%。

表 26：10B3 處理減少帶有腫瘤小鼠之肌肉損失。數據為平均肌肉質量 (mg) $\pm$ SEM。根據學生 T 檢驗，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 25 展示抗體處理對下肢肌力之作用，此係藉由在對大腿中部坐骨神經電刺激之後量測收縮力來評估。腫瘤植入

25天之後，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($p<0.05$)相比，在健康動物及帶有腫瘤小鼠中10B3處理分別使最大收縮力增加10.2%及17.5%。在經10B3處理之帶有腫瘤小鼠與健康對照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有腫瘤小鼠之肌肉功能。

此等數據指示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。

12. 10B3處理對小鼠腱切除模型之骨骼肌萎縮的作用

此處，測定肌肉抑制素抗體10B3對小鼠腱切除模型之肌肉質量的作用。

將幼年雄性C57BL小鼠隨機分成mIgG2a或10B3處理組(每組 $n=6$)，且第1天、第4天、第8天及第15天以30 mg/kg腹膜內給藥。給藥前的早晨(第0天)，所有小鼠接受以下手術方案：在左腿之遠端附著處分離脛骨前肌(TA)腱(腱切除術)，同時露出所有右側TA腱，但保持完整(假)。3週後(第21天)，對小鼠施以無痛致死術以評估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26)。有趣的是，與完整假狀況(+14%)相比，在腱切除術之情況下10B3之作用較為明顯(+21%)。

此等數據指示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。

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)

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSTGYFMHWVKQSHGNILDWIGNIY
 PYNGVSNYNQRFKAKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYYG
 TGPADWYFDVWGTGTTVTVSS

SEQ ID NO: 8 (小鼠單株10B3及10B3嵌合體V_L)

DIKMTQSPSSMYASLRERVITITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANR
 LVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQCDEFPLTFGAGTKLEL
 K

SEQ ID NO: 9 (人工信號序列)

MGWSCILFLVATATGVHS

SEQ ID NO: 10 (V_H之人類受體構架)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWI
 SAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARXXX
 XXXXXXXXWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO: 11 (V_L之人類受體構架)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSL
 QSGVPSKFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCXXXXXXXXXXXXFGQGTKLEI
 K

SEQ ID NO: 12 (人類化V_H: H0)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYFMHWVRQAPGQGLEWMG
NIYPYNGVSNYNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRY
YYGTGPADWYFDVWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 13 (人類化 V_H : H1)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYFMHWVRQAPGQGLEWMG
NIYPYNGVSNYNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRY
YYGTGPADWYFDVWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 14 (人類化 V_H : H2)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYFMHWVRQAPGQGLEWMG
NIYPYNGVSNYNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRY
YYGTGPADWYFDVWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 15 (人類化 V_L : L0)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANR
LVDGVPSKFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQCDEFPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 16 (人類化 V_L : L1)

DIQMTQSPSSLSASVRDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRL
VDGVPSKFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQCDEFPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 17 (人類化 V_L : L2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANR
LVDGVPSKFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCLQCDEFPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 18 (人類化 V_L : L3)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANR
LVDGVPSKFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQCDEFPLTFGAGTKLEIK

SEQ ID NO: 19 (10B3嵌合體 V_H : N54D)

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFMHWVKQSHGNILDWIGNIY
PYDGVSNYNQRFKAKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYYG
TGPADWYFDVWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 20 (10B3嵌合體 V_H : N54Q)

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFMHWVKQSHGNILDWIGNIY
PYQGVSNYNQRFKAKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYYG
TGPADWYFDVWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 21 (10B3嵌合體 V_L : C91S)

DIKMTQSPSSMYASLRERVITITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANR
LVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISLEYEDMGIYYCLQSDEFPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 22(人類化 V_H : H2 N54D)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTGYFMHWVRQAPGQGLEWMG
NIYPYDGVSNYNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRY
YYGTGPADWYFDVWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 23 (人類化V_H: H2 N54Q)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTGYFMHWVRQAPGQGLEWMG
NIYPYQGVSNYNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRY
YYGTGPADWYFDVWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 24 (人類化V_L: L2 C91S)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANR
LVDGVPSKFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQSDEFPLTFGQGKLEIK

SEQ ID NO: 25 (10B3嵌合體V_H)

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFMHWVKQSHGNILDWIGNIY
PYNGVSNYNQRFKAKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYYG
TGPADWYFDVWGVTGTLTVSS

SEQ ID NO: 26 (10B3嵌合體重鏈)

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFMHWVKQSHGNILDWIGNIY
PYNGVSNYNQRFKAKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYYG
TGPADWYFDVWGVTGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

SEQ ID NO: 27 (10B3嵌合體輕鏈)

DIKMTQSPSSMYASLRERVITITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANR
LVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQCEDEFPLTFGAGTKLEL
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

SEQ ID NO: 28 (人類化重鏈: H0)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYFMHWVRQAPGQGLEWMG
NIYPYNGVSNYNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRY
YYGTGPADWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

SEQ ID NO: 29 (人類化重鏈: H1)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYFMHWVRQAPGQGLEWMG
 NIYPYNGVSNYNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRY
 YYGTGPADWYFDVWGTGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY
 ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 30 (人類化重鏈：H2)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYFMHWVRQAPGQGLEWMG
 NIYPYNGVSNYNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRY
 YYGTGPADWYFDVWGGTGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY
 ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 31 (人類化輕鏈：L0)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANR
 LVDGVPSKFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQCDEFPLTFGQGTKLEIK
 RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 EC

SEQ ID NO: 32 (人類化輕鏈：L1)

DIQMTQSPSSLSASVRDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRL
 VDGVP SKFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQCDEFPLTFGQGTKLEIKR
 TVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
 C

SEQ ID NO: 33 (人類化輕鏈：L2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANR
 LVDGVPSKFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCLQCDEFPLTFGQGTKLEIK
 RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 EC

SEQ ID NO: 34 (人類化輕鏈：L3)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANR
 LVDGVPSKFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQCDEFPLTFGAGTKLEIK
 RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 EC

SEQ ID NO: 35 (10B3嵌合體N54D重鏈)

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSTGYFMHWVKQSHGNILDWIGNIY
 PYDGVSNYNQRFKAKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYYG
 TGPADWYFDVWGTGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 36 (10B3嵌合體N54Q重鏈)

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSTGYFMHWVKQSHGNILDWIGNIY
 PYQGVSNYNQRFKAKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYYG
 TGPADWYFDVWGTGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 37 (10B3嵌合體C91S輕鏈)

DIKMTQSPSSMYASLRERVITICKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANR
 LVDGVPSRFGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIIYYCLQSDEFPLTFGAGTKLELK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYF
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 38 (人類化重鏈：H2 N54D)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWMG
 NIYPYDGVSNYNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRY
 YYGTGPADWYFDVWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY
 ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 39 (人類化重鏈：H2 N54Q)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSTGYFMHWVRQAPGQGLEWMG
 NIYPYQGVSNYNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRY
 YYGTGPADWYFDVWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY
 ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 40 (人類化輕鏈：L2 C91S)

DIQMTQSPSSLASVGDRTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANR
LVDGVPSKFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQSDEFPLTFGQGTKLEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRG
EC

SEQ ID NO: 41 (10B3嵌合體重鏈，DNA序列)

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTC
CACTCCGAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGG
GGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTA
CTTCATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGCAATATCCTCGATTGGATTG
GAAATATTTATCCTTACAATGGTGTCTTAACATAACCAGAGATTCAAGG
CCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCTAGTACAGCCTACATGGAG
CTCCGCAGCCTTACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGACGC
TATTACTACGGTACCGGACCGGCTGATTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACT
GGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTT
CCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCGCGGCGGCACAGCCGCCCTGG
GCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTTGGAAC
AGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAG
CAGCGGCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCC
TGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACC
AAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCT
GCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCTGT
TCCCCCCTAAGCCTAAGGACACCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTG
ACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCTGAGGTGAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGG
GAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAAC
AAGGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCA
GCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGA
CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATACTACA
AGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGC
AAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGCT
GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTG
AGCCTGTCCCCTGGCAAGTGA

SEQ ID NO: 42 (10B3嵌合體輕鏈，DNA序列)

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTC
CACTCCGACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTA
CGAGAGAGAGTCACTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTA
TTTAAGCTGGTTCCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTAATCT
ATCGTGCAAACAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGT
GGATCTGGGCAAGATTATTCTCTACCATCAGCAGCCTGGAGTATGAAGA
TATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTGTGATGAATTTCCGCTCACGTTCCG

TGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGT
TCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTG
GTGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA
GGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAG
CAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCCTGAG
CAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACC
AGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGA

SEQ ID NO: 43 (人類化重鏈：H0，DNA序列)

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTG
CACAGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCG
GCGCCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGGC
TACTTCATGCACTGGGTGAGGCAGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGAT
GGGCAACATCTACCCCTACAACGGCGTCAGCAACTACAACCAGAGGTTCA
AGGCCAGGGTGACCATGACCACCGACACCTCTACCAGCACCGCCTACATG
GAACTGAGGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG
GAGGTACTATTACGGCACCGGACCCGCCGATTGGTACTTCGACGTGTGGG
GACAGGGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAG
CGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCGCGGCGGCACAGCCG
CCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCT
GGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTG
CAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAG
CAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCA
ACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCA
CACCTGCCCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTT
CCTGTTCCCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCG
AGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCC
CAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCG
TGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCC
AACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGG
CCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGC
TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCC
AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCT
ACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTAC
AGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA
GCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGC
CTGAGCCTGTCCCCTGGCAAGTGA

SEQ ID NO: 44 (人類化重鏈：H1，DNA序列)

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTG
CACAGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCG
GCGCCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGGC
TACTTCATGCACTGGGTGAGGCAGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGAT
GGGCAACATCTACCCCTACAACGGCGTCAGCAACTACAACCAGAGGTTCA
AGGCCAGGGTGACCATGACCACCGACACCTCTACCAGCACCGCCTACATG
GAACTGAGGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG
GAGGTACTATTACGGCACCGGACCCGCCGATTGGTACTTCGACGTGTGGG
GAACGGGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAG

CGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCG
CCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTT
GGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTG
CAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAG
CAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCA
ACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCA
CACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTT
CCTGTTCCCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCG
AGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCC
CAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCG
TGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCC
AACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGG
CCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGC
TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCC
AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC
ACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTAC
AGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA
GCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGC
CTGAGCCTGTCCCCTGGCAAGTGA

SEQ ID NO: 45 (人類化重鏈：H2，DNA序列)

ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTG
CACAGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCCG
GCGCCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGC
TACTTCATGCACTGGGTGAGGCAGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGAT
GGGCAACATCTACCCCTACAACGGCGTCAGCAACTACAACCAGAGGTTCA
AGGCCAGGGTGACCATGACCACCGACACCTCTACCAGCACCGCCTACATG
GAACTGAGGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG
GAGGTACTATTACGGCACCGGACCCGCCGATTGGTACTTCGACGTGTGGG
GACAGGGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAG
CGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCG
CCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTT
GGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTG
CAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAG
CAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCA
ACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCA
CACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTT
CCTGTTCCCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCG
AGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCC
CAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCG
TGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCC
AACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGG
CCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGC
TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCC
AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC
ACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTAC
AGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA
GCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGC
CTGAGCCTGTCCCCTGGCAAGTGA

SEQ ID NO: 46 (人類化輕鏈：L0，DNA序列)

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTG
CACAGCGACATTCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCTCTGAGCGCCAGCGT
GGGCGATAGGGTGACCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCT
ACCTGAGCTGGTTCCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCTCCCAAGAGCCTGATC
TACAGGGCCAACAGGCTCGTGGACGGCGTGCCTAGCAAGTTTAGCGGCAG
CGGAAGCGGCACAGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAG
GACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGTGCAGAGTTCCCCCTGACCTTC
GGCCAGGGCACCAAACCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGT
GTTTCATCTTCCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCG
TGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGG
AAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCG
AGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTG
AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCC
ACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC
TGA

SEQ ID NO: 47 (人類化輕鏈：L1，DNA序列)

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTG
CACAGCGACATTCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCTCTGAGCGCCAGCGT
GCGCGATAGGGTGACCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCT
ACCTGAGCTGGTTCCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCTCCCAAGAGCCTGATC
TACAGGGCCAACAGGCTCGTGGACGGCGTGCCTAGCAAGTTTAGCGGCAG
CGGAAGCGGCACAGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGG
ACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGTGCAGACGAGTTCCCCCTGACCTTCG
GCCAGGGCACCAAACCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTG
TTCATCTTCCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGT
GGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGG
AGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGA
GCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTG
AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCC
ACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC
TGA

SEQ ID NO: 48 (人類化輕鏈：L2，DNA序列)

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTG
CACAGCGACATTCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCTCTGAGCGCCAGCGT
GGGCGATAGGGTGACCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCT
ACCTGAGCTGGTTCCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCTCCCAAGAGCCTGATC
TACAGGGCCAACAGGCTCGTGGACGGCGTGCCTAGCAAGTTTAGCGGCAG
CGGAAGCGGCACAGACTACACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGG
ACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGTGCAGACGAGTTCCCCCTGACCTTCG
GCCAGGGCACCAAACCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTG
TTCATCTTCCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGT
GGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGG
AGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGA
GCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTG
AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCC
ACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC
TGA

SEQ ID NO: 49 (人類化輕鏈：L3，DNA序列)

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTG
CACAGCGACATTCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCTCTGAGCGCCAGCGT
GGGCGATAGGGTGACCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCT
ACCTGAGCTGGTTCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCTCCCAAGAGCCTGATC
TACAGGGCCAACAGGCTCGTGGACGGCGTGCCTAGCAAGTTTAGCGGCAG
CGGAAGCGGCACAGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGG
ACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGTGCAGACGAGTTCCCCCTGACCTTCG
GCGCGGGCACCAAACCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTG
TTCATCTTCCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGT
GGTGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGA
AGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGA
GCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTG
AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCC
ACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC
TGA

SEQ ID NO: 50 (10B3嵌合體N54D重鏈，DNA序列)

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTC
CACTCCGAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGG
GGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTA
CTTCATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGCAATATCCTCGATTGGATTG
GAAATATTTATCCTTACGATGGTGTCTTCTAACTACAACCAGAGATTCAAGG
CCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCTAGTACAGCCTACATGGAG
CTCCGCAGCCTTACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGACGC
TATTACTACGGTACCGGACCGGCTGATTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACT
GGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTT
CCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCGGCGGCACAGCCGCCCTGG
GCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTTGGAAAC
AGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAG
CAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCC
TGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACC
AAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCT
GCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCTCTGT
TCCCCCACAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTG
ACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGG
GAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAAC
AAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCA
GCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGA
CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACA
AGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGC
AAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACT
GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTG
AGCCTGTCCCCTGGCAAGTGA

SEQ ID NO: 51 (10B3嵌合體N54Q重鏈，DNA序列)

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTC
 CACTCCGAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGG
 GGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTA
 CTTTCATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGCAATATCCTCGATTGGATTG
 GAAATATTTATCCTTACCAAGGTGTTTCTAACTACAACCAGAGATTCAAGG
 CCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCTAGTACAGCCTACATGGAG
 CTCCGCAGCCTTACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGACGC
 TATTACTACGGTACCGGACCGGCTGATTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACT
 GGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTT
 CCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCGGCGGCACAGCCGCCCTGG
 GCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAAC
 AGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAG
 CAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCC
 TGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACC
 AAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCT
 GCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCTGT
 TCCCCCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTG
 ACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAA
 CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGG
 GAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT
 GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAAC
 AAGGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCA
 GCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGA
 CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGC
 GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACA
 AGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGC
 AAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACT
 GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCAGAAGAGCCTG
 AGCCTGTCCCCTGGCAAGTGA

SEQ ID NO: 52 (10B3嵌合體C91S輕鏈，DNA序列)

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTC
 CACTCCGACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTA
 CGAGAGAGAGTCACTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTA
 TTAAAGCTGGTTCCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTAATCT
 ATCGTGCAACAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGT
 GGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGTATGAAGA
 TATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTCTGATGAATTTCCGCTCACGTTCCG
 TGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGT
 TCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTG
 GTGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA
 GGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAG
 CAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAG
 CAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACC
 AGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGA

SEQ ID NO: 53 (人類化重鏈：H2 N54D，DNA序列)

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTG
 CACAGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCG
 GCGCCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGC
 TACTTCATGCACTGGGTGAGGCAGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGAT
 GGGCAACATCTACCCCTACGACGGCGTCAGCAACTACAACCAGAGGTTCA
 AGGCCAGGGTGACCATGACCACCGACACCTCTACCAGCACCGCCTACATG
 GAACTGAGGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG
 GAGGTACTATTACGGCACCGGACCCGCCGATTGGTACTTCGACGTGTGGG
 GACAGGGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAG
 CGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCG
 CCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTT
 GGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTG
 CAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAG
 CAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCA
 ACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCA
 CACCTGCCCCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTT
 CCTGTTCCCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCG
 AGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAG
 TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCC
 CAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCG
 TGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCC
 AACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGG
 CCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGC
 TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCC
 AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCT
 ACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTAC
 AGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA
 GCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGC
 CTGAGCCTGTCCCCTGGCAAGTGA

SEQ ID NO: 54 (人類化重鏈：H2 N54Q，DNA序列)

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTG
 CACAGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCG
 GCGCCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGC
 TACTTCATGCACTGGGTGAGGCAGGCTCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGAT
 GGGCAACATCTACCCCTACCAGGGCGTCAGCAACTACAACCAGAGGTTCA
 AGGCCAGGGTGACCATGACCACCGACACCTCTACCAGCACCGCCTACATG
 GAACTGAGGAGCCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG
 GAGGTACTATTACGGCACCGGACCCGCCGATTGGTACTTCGACGTGTGGG
 GACAGGGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAG
 CGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCG
 CCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTT
 GGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTG
 CAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAG
 CAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCA
 ACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCA
 CACCTGCCCCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTT
 CCTGTTCCCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCG
 AGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAG
 TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCC

CAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCG
 TGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCC
 AACAAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGG
 CCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGC
 TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCC
 AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC
 ACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTAC
 AGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA
 GCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGC
 CTGAGCCTGTCCCCTGGCAAGTGA

SEQ ID NO: 55 (人類化輕鏈：L2 C91S，DNA序列)

ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTG
 CACAGCGACATTCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCTCTGAGCGCCAGCGT
 GGGCGATAGGGTGACCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCT
 ACCTGAGCTGGTTCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCTCCCAAGAGCCTGATC
 TACAGGGCCAACAGGCTCGTGGACGGCGTGCCTAGCAAGTTTAGCGGCAG
 CGGAAGCGGCACAGACTACACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGG
 ACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGAGCGACGAGTTCCCCCTGACCTTCG
 GCCAGGGCACCAAACCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTG
 TTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGT
 GGTGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGA
 AGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGA
 GCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGA
 GCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCA
 CCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCT
 GA

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)

SGSGDCDEHSTESRCCRY

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)

SGSGFVFLQKYPHTHLVH

SEQ ID NO: 69 (人工肌肉抑制素線性肽27)

SGSGQKYPHTHLVHQANP

SEQ ID NO: 70 (人工肌肉抑制素線性肽29)

SGSGHHLVHQANPRGSA

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)

SGSGSAGPCCTPTKMSP

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)
SGSGIYGKIPAMVVDRRC

SEQ ID NO: 80 (人工肌肉抑制素線性肽49)
SGSGGKIPAMVVDRRCGCS

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)

NIYPYNLVSNNYNQRFKA

SEQ ID NO: 95 (CDRH2 變異體 G55S)

NIYPYNSVSNYNQRFKA

SEQ ID NO: 96 (CDRH2 變異體 G55T)

NIYPYNTVSNYNQRFKA

SEQ ID NO: 97 (CDRH2 變異體 G55V)

NIYPYNVVSNNYNQRFKA

SEQ ID NO: 98 (人類化重鏈：Fc 失能之 H2_F100G_Y)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYFMHWVRQAPGQGLEWMG
NIYPYNGVSNYNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRY
YYGTGPADWYYDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSIVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYFMHWVRQAPGQGLEWMG
NIYPYNSVSNYNQRFKARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRY
YYGTGPADWYYDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSIVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 100 (V_L-人類受體構架)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSL
QSGVPSKFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSTPXXXXXXXXXXFG
QGTELEIK

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

MAAGTAVGAWVLVLSLWGAVVGTHHHHHHDITYKLILNGKTLKGETTTEAV
DAATAEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATKTFTVTEGSENLYFQEGSEREEN
VEKEGLCNACAWRQNTYRSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDAIRQLPRAPPL
RELIDQYDVQRADSSDGSLEDDDYHATTETITMPTESDFLMQADGKPKCCFF
KFSSKIQYNKVVKAAQLWIYLRPVKTPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLK
LDMSPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAFTFPGPGE
DGLNPFLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWII
APKRYKANYCSGECEVFVLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINML
YFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS

SEQ ID NO: 102 (GB1標籤)

DTYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATK
TFTVTE

SEQ ID NO: 103 (小鼠肌肉抑制素聚合蛋白(D76A))

EGSEREENVEKEGLCNACAWRQNTYRSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDAIR
QLPRAPPLRELIDQYDVQRADSSDGSLEDDDYHATTETITMPTESDFLMQA
DGKPKCCFFKFSSKIQYNKVVKAAQLWIYLRPVKTPTTVFVQILRLIKPMKDG
TRYTGIRSLKLDMSPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHD
LAFTFPGPGEGLNPFLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDF
EAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEVFVLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTP
TKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS

SEQ ID NO: 104 (成熟肌肉抑制素)

DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEVFVL
QKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVD
RCGCS

SEQ ID NO: 105 (弗林蛋白酶序列)

MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADAQGQKVFTNTWAVRIPGGPAVANSVAR
KHGFLNLGQIFGDYYHFWHRGVTKRSLSPHRPRHSRLQREPQVQWLEQQVA
KRRTKRDVYQEPTDPKFPQQWYLSGVTQRDLNVKAAWAQGYTGHGIVVSIL
DDGIEKNHPDLAGNYDPGASFVNDQDPDPQPRYTQMNDNRHGTRCAGEV
AAVANNGVCGVGVAYNARIGGVRMLDGEVTDAREARSLGLNPNHIHYSAS
WGPEDDGKTVDGPALAEAAFRGVSQGRGGLGSIFVWASGNGGREHDSN
CDGYTNSIYTLSSSATQFGNVPWYSEACSSTLATTYSSGNQNEKQIVTTDLRQ
KCTESHTGTSASAPLAAGIALTLEANKNLTWRDMQHLVVQTSKPAHLNAND
WATNGVGRKVSHSYGYGLLDAGAMVALAQNWTTVAPQRKCIIDILTEPKDI
GKRLEVRKTVTACLGEPNHITRLEHAQARLTLSYNRRGDLAIHLVSPMGTRST
LLAARPHDYSADGFNDWAFMTTHSWDEDPSGEWVLEIENTSEANNYGTLTK
FTLVLYGTAPGLPVPPESSGCKTLTSSQACENLYFQG

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

MAAGTAVGAWVLVLSLWGAVVGTHHHHHHDTYKLILNGKTLKGETTTEAV
DAATAEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATKFTVTEGSENLYFQENSEQKE
NVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPP
LRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGPKKCCF
FKFSSKIQYNKVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLK
LDMNPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLA VTFPGPG
EDGLNPFLEVKVTDTPKRSRR

SEQ ID NO: 107 (Tev蛋白酶)

MHGHHHHHHGESLFGPRDYNPISSTICHLTNESDGHTTSLYGIGFGPFIITNK
HLFRRNNGTLLVQSLHGVFKVKNTTTLQQHLIDGRDMIIRMPKDFPFPQKL
KFREPQREERICLVTTNFQTKSMSSMVSDTSCTFPSSDGIFWKHWIQTKDGQC
GSPLVSTRDGFIVGIHSASNFTNTNNTNYFTSVPKNFMELLTNQEAQQWVSGWR
LNADSVLWGGHKVFMVKPEEPFQPVKEATQLMNE

SEQ ID NO: 108 (人類肌肉抑制素前肽)

ENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDVIR
QLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDDYHATTETIITMPTESDFLMQV
DGPKKCCFFKFSSKIQYNKVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDG
TRYTGIRSLKLDMNPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHD
LA VTFPGPGEDGLNPFLEVKVTDTPKRSRR

SEQ ID NO: 109 (CDRL3變異體C91S)

LQSDEFPLT

SEQ ID NO: 110 (CDRH3變異體F100G_S)

RYYYGTGPADWYSDV

【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，觀測MW為24793.98 Da，此指示具有九對二硫鍵之二聚分子，與具有九個半胱胺酸殘基之預測肌肉抑制素單體相對應；

圖2展示採用MOPS緩衝液之4-12% NuPAGE Bis-Tris凝膠。色帶1：經DTT還原之成熟肌肉抑制素。色帶2：未經DTT還原之成熟肌肉抑制素。色帶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及自身肌肉抑制素物質)以劑量依賴性方式誘導活化A204細胞中之細胞信號傳導，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，其顯示如不同天所獲得之數據所示在不同測試時刻，自身肌肉抑制素以劑量依賴性方式誘導活化A204細胞中之細胞信號傳導，從而引起螢光素酶表現；

圖 4 展示藉由 ELISA 分析，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 結合之抑制作用；

圖 6 展示 10B3 及 10B3 嵌合體抑制肌肉抑制素誘導活化細胞信號傳導，從而降低 A204 細胞中之螢光素酶表現；

圖 7 展示 10B3 對小鼠體重(A)及瘦肉質量(B)之活體內作用；

圖 8 展示 10B3 對小鼠腓腸肌(A)、四頭肌(B)及伸趾長肌(EDL)(C)之肌肉質量的活體內作用；

圖 9 展示 10B3 對 EDL 之肌肉收縮性的離體作用，其展示強直收縮力(A)及由肌肉質量校正之強直收縮力(B)；

圖 10A 展示藉由 ELISA 分析，人類化抗肌肉抑制素抗體變異體(CHOK1 上清液中)及 10B3C 與肌肉抑制素之結合。圖 10B 由圖 10A 引出且展示含有 H2 及 / 或 L2 鏈之抗體及 10B3 嵌合體；

圖 11 展示藉由 ELISA 分析，經純化之 H0L0、H1L2 及

H2L2人類化抗肌肉抑制素抗體變異體及10B3C與肌肉抑制素之結合；

圖 12 展示 10B3、10B3C，H0L0及H2L2抑制肌肉抑制素誘導活化細胞信號傳導，從而抑制A204細胞中之螢光素酶表現；

圖 13 展示藉由 ELISA 分析，經純化之 H2L2-N54D、H2L2-N54Q、H2L2-C91S、H2L2-N54D-C91S 及 H2L2-N54Q-C91S 人類化抗肌肉抑制素抗體變異體、H2L2 及 10B3C(HCLC)與肌肉抑制素之結合；

圖 14 展示藉由 ELISA 分析，經純化之 H2L2-N54Q、H2L2-C91S、H2L2-N54Q-C91S 人類化抗肌肉抑制素抗體變異體、H2L2、H0L0及10B3C(HCLC)與肌肉抑制素之結合；

圖 15 展示 H2L2-N54Q、H2L2-C91S、H2L2-N54Q-C91S 人類化抗肌肉抑制素抗體變異體、H0L0、H2L2及10B3C抑制肌肉抑制素誘導活化細胞信號傳導，從而抑制A204細胞中之螢光素酶表現；

圖 16 展示在經或未經可誘導抗體脫除醯胺基之碳酸氫銨處理抗體之後，H2L2人類化抗肌肉抑制素抗體與肌肉抑制素之結合；

圖 17 展示在經或未經可誘導抗體脫除醯胺基之碳酸氫銨處理抗體之後，H2L2-N54Q人類化抗肌肉抑制素抗體變異體與肌肉抑制素之結合；

圖 18 展示在經或未經可誘導抗體脫除醯胺基之碳酸氫銨

處理抗體之後，H2L2-C91S人類化抗肌肉抑制素抗體變異體與肌肉抑制素之結合；

圖 19 展示在經或未經可誘導抗體脫除醯胺基之碳酸氫銨處理抗體之後，H2L2-N54Q-C91S人類化抗肌肉抑制素抗體變異體與肌肉抑制素之結合；

圖 20 展示在經或未經可誘導抗體脫除醯胺基之碳酸氫銨處理抗體之後，H0L0人類化抗肌肉抑制素抗體與肌肉抑制素之結合；

圖 21 展示在肌肉抑制素捕捉 ELISA 中，11 種經親和純化之 CDRH3 變異體以及用作對照抗體之 H2L2-C91S、H0L0、HcLc(10B3 嵌合體)及陰性對照單株抗體之結合活性；

圖 22 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 23 展示第 0 天至第 25 天 10B3 及對照抗體處理對帶有 C-26 腫瘤之小鼠之體重的作用；

圖 24 展示 10B3 及對照抗體處理對帶有 C-26 腫瘤之小鼠之總體脂肪(A)、附睪脂肪墊(B)及瘦肉質量(C)的作用；

圖 25 展示 10B3 及對照抗體處理對下肢肌力之作用，此係藉由在對帶有 C-26 腫瘤之小鼠之大腿中部坐骨神經電刺激之後的收縮力來量測；及

圖 26 展示在假手術及腱切除手術中，10B3 及對照抗體處理對小鼠脛骨前肌(TA)肌肉之作用。

序列表

<110> 英商葛蘭素集團有限公司

<120> 新穎抗原結合蛋白

<130> PB63376

<140> 098143432

<141> 2009-12-17

<150> US61/138980

<151> 2008-12-19

<160> 110

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 1

Gly Tyr Phe Met His
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 2

Asn Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe Lys
1 5 10 15
Ala

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 3

Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 5

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 6

Leu Gln Cys Asp Glu Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 7
<211> 124
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 7
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Phe Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Asn Ile Leu Asp Trp Ile
35 40 45
Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60
Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp
100 105 110
Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 8
Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Arg
1 5 10 15
Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Cys Asp Glu Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Leu Lys
100 105

<210> 9
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工信號序列

<400> 9
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser

<210> 10
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH之人類受體構架

<221> VARIANT
<222> (99)...(108)

<223> Xaa為任何胺基酸

<400> 10

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20      25      30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35      40      45
Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50      55      60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly
100      105      110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL之人類受體構架

<221> VARIANT

<222> (89)...(98)

<223> Xaa為任何胺基酸

<400> 11

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20      25      30
Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35      40      45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Phe Ser Gly
50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85      90      95
Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100      105

```

<210> 12

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化VH : H0

<400> 12

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20      25      30
Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35      40      45
Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
50      55      60
Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Ala Arg Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp
100      105      110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115      120

```

<210> 13
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化VH : H1

```

<400> 13
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
           20           25           30
Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
           35           40           45
Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
           50           55           60
Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Arg Arg Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp
           100          105          110
Val Trp Gly Thr Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
           115          120

```

<210> 14
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化VH : H2

```

<400> 14
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
           20           25           30
Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
           35           40           45
Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
           50           55           60
Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Arg Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp
           100          105          110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
           115          120

```

<210> 15
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化VL : L0

```

<400> 15
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
           20           25           30
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
           35           40           45
Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

```

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Cys Asp Glu Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 16
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化VL : L1

<400> 16
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Arg
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Cys Asp Glu Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 17
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化VL : L2

<400> 17
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Cys Asp Glu Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 18
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化VL : L3

<400> 18
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Cys Asp Glu Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 19
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 10B3嵌合體VH : N54D

<400> 19
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Asn Ile Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Thr Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 20
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 10B3嵌合體VH : N54Q

<400> 20
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Asn Ile Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Gln Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Thr Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 21
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 10B3嵌合體VL : C91S

<400> 21
 Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Arg
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
 65 70 75 80
 Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Glu Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 22
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化VH : H2 N54D

<400> 22
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化VH : H2 N54Q

<400> 23
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Gln Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 24
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化VL : L2 C91S

<400> 24
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

```

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
      20      25      30
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
      35      40      45
Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
      50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Glu Phe Pro Leu
      85      90      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100      105

```

<210> 25
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 10B3嵌合体VH

```

<400> 25
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
      20      25      30
Phe Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Asn Ile Leu Asp Trp Ile
      35      40      45
Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
      50      55      60
Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp
      100      105      110
Val Trp Gly Thr Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115      120

```

<210> 26
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 10B3嵌合体重链

```

<400> 26
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
      20      25      30
Phe Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Asn Ile Leu Asp Trp Ile
      35      40      45
Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
      50      55      60
Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp
      100      105      110
Val Trp Gly Thr Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
      115      120      125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
      130      135      140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
      145      150      155      160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
      165      170      175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
      180      185      190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn

```

```

195      200      205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210      215      220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225      230      235
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245      250      255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp
260      265      270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275      280      285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290      295      300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305      310      315
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325      330      335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340      345      350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
355      360      365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370      375      380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385      390      395
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405      410      415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420      425      430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435      440      445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

```

<210> 27
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 10B3嵌合體輕鏈

```

<400> 27
Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Arg
1      5      10      15
Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
20      25      30
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35      40      45
Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50      55      60
Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65      70      75      80
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Cys Asp Glu Phe Pro Leu
85      90      95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100      105      110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115      120      125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130      135      140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145      150      155      160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165      170      175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180      185      190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195      200      205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

```

<210> 28

<211> 454
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化重鏈：H0

<400> 28
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 29
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化重鏈：H1

<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Thr Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 30

<211> 454

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化重鏈：H2

<400> 30

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 31
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化輕鏈：L0

<400> 31
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Cys Asp Glu Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 32
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化輕鏈：L1

<400> 32
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Arg
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Cys Asp Glu Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 33
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化輕鏈：L2

<400> 33
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Cys Asp Glu Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 34
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化輕鏈：L3

<400> 34
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Cys Asp Glu Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 35
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 10B3嵌合體N54D重鏈

<400> 35
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Phe Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Asn Ile Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Thr Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 36
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 10B3嵌合體N54Q重鏈

<400> 36
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Asn Ile Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Gln Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Thr Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 37
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 10B3嵌合体C91S轻链

<400> 37
 Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Arg
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
 65 70 75 80
 Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Glu Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 38
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化重鏈：H2 N54D

<400> 38
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 39
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化重鏈：H2 N54Q

<400> 39
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Gln Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 40
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化輕鏈：L2 C91S

<400> 40
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Glu Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 41
 <211> 1422
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 10B3嵌合體重鏈

<400> 41
 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacagggtg ccactccgag 60
 gticagctgc agcagctctgg acctgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagatatcc 120
 tgcaaggctt ctgggttactc attcactggc tacttcatgc actgggtgaa gcagagccat 180
 ggcaatatcc tcgattggat tggaaatait taitccttaca atgggtgttc taactacaac 240
 cagagattca aggcccaaggc cacattgact gtagacaagt cctctaglac agcctacatg 300
 gagctccgca gccctacatc tgaggactct gcagctctatt actgtgcaag acgctattac 360
 tacggtaccg gaccggctga ttgggtacttc gatgtctggg gcaactggag actagtacc 420
 gtgtccagcg ccagcaccac gggccccagc gtgttcccc tggccccag cagcaagagc 480
 accagcgcg gcacagccgc cctgggctgc ctgggtgaag actacttccc cgaaccgggtg 540
 accgtgtcct ggaacagcgg agccctgacc agcggcgctg acaccttccc cggcgtgctg 600
 cagagcagcg gccctgtacg cctgagcagc gtgggtgacc tggccagcag cagcctgggc 660
 acccagacct acatctgtaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 720
 gtggagccca agagctgtga caagaccac acctgcccc cctgccccgc ccccgagctg 780
 ctgggaggcc ccagcgtgtt cctgttcccc cccaagccta aggacacct gatgatcagc 840
 agaaccctcg aggtgacctg tgtgtgtgtg gatgtgagcc acgaggacct tgaggtgaag 900
 ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cacaatgcca agaccaagcc caggaggagg 960
 cagtacaaca gcacctaccg ggtgtgtgcc gtgctgaccg tgcctgacca ggattggctg 1020
 aacggcaagg agtacaagt taagggtgcc aacaaggccc tgcctgcccc tatcgagaaa 1080
 accatcagca aggcccaagg ccagcccaga gagccccagg tgtacacct gccccctagc 1140
 agagatgagc tgaccaagaa ccagggtgcc ctgacctgcc tgggtgaagg cttctacccc 1200
 agcgacatcg ccgtggagt ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc 1260
 cccctgtgct tggacagcga tggcagcttc ttctgttaca gcaagctgac cgtggacaag 1320
 agcagatggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcctccgtg tgcacgaggc cctgcacaat 1380
 cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc cctggcaagt ga 1422

<210> 42
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 10B3 嵌合體輕鏈

<400> 42
 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacagggtt ccactccgac 60
 atcaagatga cccagttctc atcttccatg tatgcatctc tacgagagag agtcactatc 120
 acttgcaagg cgagtcagga cattaatagc tatttaagct ggttccagca gaaaccaggg 180
 aaatcttcta agacccta atctcgtgca aacagattgg tagatggggg cccatcaagg 240
 ttacagtggca gtggatctgg gcaagattat tctctacca tcagcagcct ggagtatgaa 300
 gatatgggaa ttattatttg tctacagtgt gatgaatttc cgttcacgtt cgggtgctggg 360
 accaagctgg agctgaaacg tacgggtggc gccccagcg ttttcatctt cccccccagc 420
 gatgagcagc tgaagagcgg caccgcccagc gtgggtgtgtc tgcagaacaa ctctacccc 480
 cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aatgccctgc agagcggcaa cagccaggag 540
 agcgtgaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600
 agcaaggccg actacagaaa gcacaagggt tacgctgtg aggtgaccca ccagggcctg 660
 tccagccccg tgaccaagag ctcaaccgg ggcgagtgtc ga 702

<210> 43
 <211> 1422
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化重鏈：H0

<400> 43
 atgggctggg cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagccag 60
 gtgcagctgg tgcagagcgg cgcagagggt aagaagccc ggcagcagct gaaagtgagc 120
 tgcaaggcca ggcgtacac ctacaccggc tacttcatgc actgggtgag gcaggctccc 180
 ggccaggggc tggagtggat gggcaacatc taccctaca acggcgtcag caactacaac 240
 cagagggttca aggccagggt gacatgacc accgacacct ctaccagcac cgcctacatg 300
 gaactgagga gcctgaggag cgacgacacc gccgtgtact actgcgccag gaggtactat 360
 tacggcaccg gacccgccga ttggtacttc gacgtgtggg gacaggggac actagtacc 420
 gtgtccagcg ccagcaccaa gggccccagc gtgttcccc tggccccag cagcaagagc 480
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctgggtgaagg actacttccc cgaaccgggtg 540
 accgtgtcct ggaacagcgg agccctgacc agcggcgtgc acaccttccc cgcctgtctg 600
 cagagcagcg gccgtgtacg cctgagcagc gtgggtgacc tggccagcag cagcctgggc 660
 acccagacct acatctgtaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 720
 gtggagccca agagcigtga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccccagcig 780
 ctgggaggcc ccagcgtgtt cctgttcccc ccaagccta aggacacct gatgatcagc 840
 agaaccccc aggtgacctg ttgtgtgtgt gatgtgagcc acgaggaccc tgggtgag 900
 itcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cacaatgcc aagaccaagc caggaggagg 960
 cagtacaaca gcacctaccg ggtgtgttcc gtgtcagacc tgcctgacca ggtatggctg 1020
 aacggcaagg agtacaagtg taagggttcc aacaaggccc tgcctgcccc tatcgagaaa 1080
 accatcagca aggccagggt gacctgacc gagccccagg tgtacacct gccccctagc 1140
 agagatgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgcc tgggtgaagg ctctacccc 1200
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccc agaacaacta caagaccacc 1260
 cccccctgtc tggacagcga tggcagcttc ttctgttaca gcaagctgac cgtggacaa 1320
 agcagatggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcctcgtga tgcagaggc cctgcacaa 1380
 cactacacc agaagagcct gagcctgtcc cctggcaagt ga 1422

<210> 44
 <211> 1422
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化重鏈：H1

<400> 44
 atgggctggg cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagccag 60
 gtgcagctgg tgcagagcgg cgcagagggt aagaagccc ggcagcagct gaaagtgagc 120
 tgcaaggcca ggcgtacac ctacaccggc tacttcatgc actgggtgag gcaggctccc 180
 ggccaggggc tggagtggat gggcaacatc taccctaca acggcgtcag caactacaac 240
 cagagggttca aggccagggt gacatgacc accgacacct ctaccagcac cgcctacatg 300
 gaactgagga gcctgaggag cgacgacacc gccgtgtact actgcgccag gaggtactat 360
 tacggcaccg gacccgccga ttggtacttc gacgtgtggg gaacggggac actagtacc 420
 gtgtccagcg ccagcaccaa gggccccagc gtgttcccc tggccccag cagcaagagc 480
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctgggtgaagg actacttccc cgaaccgggtg 540
 accgtgtcct ggaacagcgg agccctgacc agcggcgtgc acaccttccc cgcctgtctg 600

```

cagagcagcg gccgtgacag cctgagcagc gtgggtgaccg tgcccagcag cagcctgggc 660
acccagacct acatctgtaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 720
gtggagccca agagctgtga caagaccac acctgcccc cctgcccctgc ccccgagctg 780
ctgggaggcc ccagcgtgtt cctgttcccc cccaagccta aggacacctt gatgatcagc 840
agaacccccg aggtgacctg tgtgggtggg gatgtgagcc acgaggaccc tgagggtgaag 900
ttcaacttgtt acgtggacgg cgtggagggt cacaatgcc aagaccaagcc caggaggagg 960
cagtacaaca gcacctaccg ggtgggtgtc gtgctgaccg tgcctgacca ggattggctg 1020
aacggcaagg agtacaagtg taagggtgtc aacaaggccc tgcctgcccc tatcgagaaa 1080
acctacagca aggccaaagg ccagcccaga gagccccagg tctacacctt gccccctagc 1140
agagatgagc tgaccaagaa ccagggtgtc ctgacctgcc tgggtgaagg cttctacccc 1200
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccc agaacaacta caagaccacc 1260
ccccctgtgc tggacagcga tggcagcttc ttccgtgtga gcaagctgac cgtggacaag 1320
agcagatggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcctccgtg tgcacgaggc cctgcacaa 1380
cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc cctggcaagt ga 1422

```

<210> 45

<211> 1422

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化重鏈：H2

<400> 45

```

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagccag 60
gtgcagctgg tgcagagcgg cgcagagggt aagaagcccg gcgccagcgt gaaagtgagc 120
tgcaaggcca gcggctactc cttaccgggc tacttcatgc actgggtgag gcaggctccc 180
ggccaggggcc tggagtggat gggcaacatc tacccttaca acggcgctcag caactacaac 240
cagagggtica aggccagggt gaccatgacc accgacacct ctaccagcac cgcctacatg 300
gaactgagga ccctgaggag gcacgacacc gccgtgtact actgcccagc gaggtactat 360
tacggcaccg gacccgccga ttggtacttc gacgtgtggg gacaggggac actagtacc 420
gtgtccagcg ccagacccaa gggccccagc gtgttcccc tggccccagc cagcaagagc 480
accagcgggc gcacagcccg cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgaaccgggtg 540
accgtgtcct ggaacagcgg agccctgacc agcggcgctg acaccttccc cgcctgtctg 600
cagagcagcg gcctglacag cctgagcagc gtgggtgacc tgcccagcag cagcctgggc 660
acccagacct acatctgtaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 720
gtggagccca agagctgtga caagaccac acctgcccc cctgcccctgc ccccgagctg 780
ctgggagggc ccagcgtgtt cctgttcccc cccaagccta aggacacctt gatgatcagc 840
agaacccccg aggtgacctg tgtgggtggg gatgtgagcc acgaggaccc tgagggtgaag 900
ttcaacttgtt acgtggacgg cgtggagggt cacaatgcc aagaccaagcc caggaggagg 960
cagtacaaca gcacctaccg ggtgggtgtc gtgctgaccg tgcctgacca ggattggctg 1020
aacggcaagg agtacaagtg taagggtgtc aacaaggccc tgcctgcccc tatcgagaaa 1080
acctacagca aggccaaagg ccagcccaga gagccccagg tctacacctt gccccctagc 1140
agagatgagc tgaccaagaa ccagggtgtc ctgacctgcc tgggtgaagg cttctacccc 1200
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccc agaacaacta caagaccacc 1260
ccccctgtgc tggacagcga tggcagcttc ttccgtgtga gcaagctgac cgtggacaag 1320
agcagatggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcctccgtg tgcacgaggc cctgcacaa 1380
cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc cctggcaagt ga 1422

```

<210> 46

<211> 702

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化輕鏈：L0

<400> 46

```

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagcgac 60
attcagatga cccagagccc cagctctctg agcggcagcg tggcgatag ggtgaccatc 120
acctgcaagg ccagccagga catcaacagc tacttgagct ggttccagca gaagcccggc 180
aaggctccca agagctgtat ctacagggcc aacaggctcg tggacggcgt gcctagcaag 240
tttagcgcca gcggaagcgg cacagacttc accctgacca tcagctccct gcagcccag 300
gacttcgcca cctactactg cctgcagtgc gacgagttcc cctgacctt cggccagggc 360
accnaacttg agatcaagcg tacgggtggc gcccccagcg tgttcatctt cccccccagc 420
gatgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgtc tgcctgaaca cttctacccc 480
cggggaggcca aggtgcagtg aagggtggac aatgccctgc agagcggcaa cagccaggag 540
agcgtgaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgacctg 600
agcaaggccc actacgagaa gcacaagggt tacgcctgtg aggtgaccca ccagggcctg 660
tccagccccg tgaccaagag cttcaaccgg ggcgagtgct ga 702

```

<210> 47

<211> 702

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化輕鏈：L1

<400> 47

```

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagcgac 60
attcagatga cccagagccc cagctctctg agcgccagcg tgcgcgatag ggtgaccatc 120
acctgcaagg ccagccaggga catcaacagc tacctgagct ggttccagca gaagcccggc 180
aaggctccca agagcctgat ctacagggcc aacaggctcg tggacggcgt gcctagcaag 240
tttagcggca gcggaagcgg cacagacttc accctgacca tcagctccct gcagcccag 300
gacttcgcca cctactactg cctgcagtgc gacgagticc ccctgacctt cggccagggc 360
accaaactgg agatcaagcg tacgggtggc gccccagcg tgttcatctt cccccccagc 420
gatgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgtc tgc tgaacaa ctctacccc 480
cgggaggcca aggtgcagt gaaggtggac aatgccctgc agagcggcaa cagccaggag 540
agcgtgaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600
agcaaggccg actacgagaa gcacaagggt tacgcctgtg aggtgaccca ccagggcctg 660
tccagccccg tgaccaagag ctccaaccgg ggcgagtgtc ga 702

```

<210> 48

<211> 702

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化輕鏈：L2

<400> 48

```

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagcgac 60
attcagatga cccagagccc cagctctctg agcgccagcg tggcgatag ggtgaccatc 120
acctgcaagg ccagccaggga catcaacagc tacctgagct ggttccagca gaagcccggc 180
aaggctccca agagcctgat ctacagggcc aacaggctcg tggacggcgt gcctagcaag 240
tttagcggca gcggaagcgg cacagacttc accctgacca tcagctccct gcagcccag 300
gacttcgcca cctactactg cctgcagtgc gacgagticc ccctgacctt cggccagggc 360
accaaactgg agatcaagcg tacgggtggc gccccagcg tgttcatctt cccccccagc 420
gatgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgtc tgc tgaacaa ctctacccc 480
cgggaggcca aggtgcagt gaaggtggac aatgccctgc agagcggcaa cagccaggag 540
agcgtgaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600
agcaaggccg actacgagaa gcacaagggt tacgcctgtg aggtgaccca ccagggcctg 660
tccagccccg tgaccaagag ctccaaccgg ggcgagtgtc ga 702

```

<210> 49

<211> 702

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化輕鏈：L3

<400> 49

```

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagcgac 60
attcagatga cccagagccc cagctctctg agcgccagcg tggcgatag ggtgaccatc 120
acctgcaagg ccagccaggga catcaacagc tacctgagct ggttccagca gaagcccggc 180
aaggctccca agagcctgat ctacagggcc aacaggctcg tggacggcgt gcctagcaag 240
tttagcggca gcggaagcgg cacagacttc accctgacca tcagctccct gcagcccag 300
gacttcgcca cctactactg cctgcagtgc gacgagticc ccctgacctt cggcgcgggc 360
accaaactgg agatcaagcg tacgggtggc gccccagcg tgttcatctt cccccccagc 420
gatgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgtc tgc tgaacaa ctctacccc 480
cgggaggcca aggtgcagt gaaggtggac aatgccctgc agagcggcaa cagccaggag 540
agcgtgaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600
agcaaggccg actacgagaa gcacaagggt tacgcctgtg aggtgaccca ccagggcctg 660
tccagccccg tgaccaagag ctccaaccgg ggcgagtgtc ga 702

```

<210> 50

<211> 1422

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 10B3嵌合體N54D重鏈

<400> 50

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacagggtt ccactccgag 60
gttcagctgc agcagctcgg acctgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagatatcc 120
tgcaaggctt ctggttactc attcactggc tacttcatgc actgggtgaa gcagagccat 180
ggcaatatcc tcgattggat tggaaatatt tatccttacg atggtgtttc taactacaac 240

```

```

cagagattica aggccaaaggc cacattgact gtagacaagt cctctagtag agcctacatg 300
gagctccgca gccttacatc tgaggactct gcagttcatt actgtgcaag acgctattac 360
tacggtaccg gaccggctga ttggtacttc gatgtctggg gcaactggac actagtacc 420
gtgtccagcg ccagcaccac gggccccagc gtgttcccc tggccccagc cagcaagagc 480
accagcgcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgaaccgggtg 540
accgtgtcct ggacacagcg agccctgacc agcggcgctg acaccttccc cgcctgtctg 600
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgaccg tgcccagcag cagcctgggc 660
acccagacct acatctgtaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 720
gtggagccca agagctgtga caagaccac acctgcccc cctgccccgc ccccgagctg 780
ctgggaggcc ccagcgtgtt cctgttcccc cccaagccta aggacacct gatgacagc 840
agaacccccg aggtgacctg tgtgtgtgtg gatgtgagcc acgaggacc tgaggagaag 900
ttcaacttgt acgtggacgg cgtggagggt cacaatgcca agaccaagcc caggaggagg 960
cagtacaaca gcacctaccg ggtgtgtgtc gtgtgaccg tgcgtgacca ggattggctg 1020
aacggcaagg agtaacaagt taagggtgtc aacaaggccc tgcctgcccc tatcgagaaa 1080
accatcagca aggccaaagg ccagcccaga gagcccagg tgtacacct gccccctagc 1140
agagatgagc tgaccaagaa ccagggtgtc ctgacctgcc tggatgaagg ctctacccc 1200
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagccc agaacaacta caagaccacc 1260
ccccctgtgc tggacagcga tggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1320
agcagatggc agcaggggca cgtgttcagc tgcctcgtag tgcacgaggc cctgcacaa 1380
cactacacc agaagagcct gagcctgtcc cctggcaagt ga 1422

```

<210> 51

<211> 1422

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 10B3嵌合體N54Q重鏈

<400> 51

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacagggtt ccactccgag 60
gttcagctgc agcagctctg accgaactg tgaagcctg gggcttcagt gaagatacc 120
tgcaaggctt ctggttactc attcactggc tacttcatgc actgggtgaa gcagagccat 180
ggcaatatcc tcgattggat tggaaatatt tatccttacc aagggtgttc taactacaac 240
cagagattca aggccaaagg cacattgact gtagacaagt cctctagtag agcctacatg 300
gagctccgca gccttacatc tgaggactct gcagttcatt actgtgcaag acgctattac 360
tacggtaccg gaccggctga ttggtacttc gatgtctggg gcaactggac actagtacc 420
gtgtccagcg ccagcaccac gggccccagc gtgttcccc tggccccagc cagcaagagc 480
accagcgcg ccagcagccg cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgaaccgggtg 540
accgtgtcct ggaacagcgg agccctgacc agcggcgctg acaccttccc cgcctgtctg 600
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgaccg tgcccagcag cagcctgggc 660
acccagacct acatctgtaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 720
gtggagccca agagctgtga caagaccac acctgcccc cctgccccgc ccccgagctg 780
ctgggaggcc ccagcgtgtt cctgttcccc cccaagccta aggacacct gatgacagc 840
agaacccccg aggtgacctg tgtgtgtgtg gatgtgagcc acgaggacc tgaggagaag 900
ttcaacttgt acgtggacgg cgtggagggt cacaatgcca agaccaagcc caggaggagg 960
cagtacaaca gcacctaccg ggtgtgtgtc gtgtgaccg tgcgtgacca ggattggctg 1020
aacggcaagg agtacaagt taagggtgtc aacaaggccc tgcctgcccc tatcgagaaa 1080
accatcagca aggccaaagg ccagcccaga gagcccagg tgtacacct gccccctagc 1140
agagatgagc tgaccaagaa ccagggtgtc ctgacctgcc tggatgaagg ctctacccc 1200
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagccc agaacaacta caagaccacc 1260
ccccctgtgc tggacagcga tggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1320
agcagatggc agcaggggca cgtgttcagc tgcctcgtag tgcacgaggc cctgcacaa 1380
cactacacc agaagagcct gagcctgtcc cctggcaagt ga 1422

```

<210> 52

<211> 702

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 10B3嵌合體C91S輕鏈

<400> 52

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacagggtt ccactccgac 60
atcaagatga cccagttctc attcttccatg tatgcatctc tacgagagag agtcactatc 120
acttgcaagg cgagtcagga cattaatagc tatttaagct gggtccagca gaaaccaggg 180
aaatctccta agaccctaal ctatcgtgca aacagattgg tagatgggtg cccatcaagg 240
ttcagtgcca gtggatcttg gcaagattat tctctacca tcagcagcct ggagiatgaa 300
gatatgggaa ttattatttg tctacagcti gatgaatttc cgtcacgtt cgggtgtggg 360
accaagctgg agctgaaagc tacggtggcc gccccagcg tgttcatcti cccccagc 420
gatgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgtc tgcgtgacaa ctctacccc 480
cgggaggcca aggtgcagtg gaagggtggc aatgccctgc agagcggcaa cagccaggag 540
agcgtgaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgacctg 600
agcaaggccg actacagaga gcacaagggtg tacgcctgtg aggtgaccca ccaggccctg 660

```

tccagccccg tgaccaagag cttcaaccgg ggcgagtgct ga

702

<210> 53
 <211> 1422
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化重鏈：H2 N54D

<400> 53
 atgggctggg cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagccag 60
 gtgcagctgg tgcagagcgg cgcagagggt aagaagcccc gcgccagcgt gaaagtgagc 120
 tgcaaggcca gcggctactc cttcaccggc tacttcatgc actgggtgag gcaggctccc 180
 ggccaggggc tggagtggat gggcaacatc tacccttacg acggcgctag caactacaac 240
 cagagggttca aggccagggt gaccatgacc accgacacct ctaccagcac cgcctacatg 300
 gaactgagga gcctgaggag cgacgacacc gccgtgtact actgcgccag gaggtactat 360
 tacggcaccg gacccgccga ttgggtacttc gacgtgtggg gacaggggac actagtgacc 420
 gtgtccagcg ccagcaccaa gggccccagc gtgttcccc tggccccag cagcaagagc 480
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctgggtgaagg actacttccc cgaaccgggtg 540
 accgtgtcct ggaacagcgg agccctgacc agcggcgctg acaccttccc cgcctgtctg 600
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtgggtgacc tggccagcag cagcctgggc 660
 acccagacct acatctgtaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 720
 gtggagccca agagctgtga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccccgagctg 780
 ctgggaggcc ccagcgtgtt cctgttcccc cccaagccta aggacacct gatgacagc 840
 agaacccccg aggtgacctg tgtgtgtgtg gatgtgagcc acgaggacct tgagggtgaag 900
 ttcaactggg acgtggacgg cgtggagggt cacaatgcca agaccaagcc caggggaggag 960
 cagtacaaca gcacctaccg ggtgtgtgtc gtgtgtgacc tgcctgacca ggattggctg 1020
 aacggcaagg agtacaagt taagggtgtc aacaaggccc tgcctgcccc tatcgagaaa 1080
 accatcagca aggccaaagg ccagcccaga gagccccagg tgtacacct gccccctagc 1140
 agagatgagc tgaccaagaa ccagggtgtc ctgacctgcc tgggtgaagg cttctacccc 1200
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc 1260
 cccctgtgc tggacagcga tggcagcttc ttctgttaca gcaagctgac cgtggacaag 1320
 agcagatggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcctccgtg tgcacgaggc cctgcacaa 1380
 cactacacc agaagagcct gagcctgtcc cctggcaagt ga 1422

<210> 54
 <211> 1422
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化重鏈：H2 N54Q

<400> 54
 atgggctggg cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagccag 60
 gtgcagctgg tgcagagcgg cgcagagggt aagaagcccc gcgccagcgt gaaagtgagc 120
 tgcaaggcca gcggctactc cttcaccggc tacttcatgc actgggtgag gcaggctccc 180
 ggccaggggc tggagtggat gggcaacatc tacccttacc agggcgctag caactacaac 240
 cagagggttca aggccagggt gaccatgacc accgacacct ctaccagcac cgcctacatg 300
 gaactgagga gcctgaggag cgacgacacc gccgtgtact actgcgccag gaggtactat 360
 tacggcaccg gacccgccga ttgggtacttc gacgtgtggg gacaggggac actagtgacc 420
 gtgtccagcg ccagcaccaa gggccccagc gtgttcccc tggccccag cagcaagagc 480
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctgggtgaagg actacttccc cgaaccgggtg 540
 accgtgtcct ggaacagcgg agccctgacc agcggcgctg acaccttccc cgcctgtctg 600
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtgggtgacc tggccagcag cagcctgggc 660
 acccagacct acatctgtaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 720
 gtggagccca agagctgtga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccccgagctg 780
 ctgggaggcc ccagcgtgtt cctgttcccc cccaagccta aggacacct gatgacagc 840
 agaacccccg aggtgacctg tgtgtgtgtg gatgtgagcc acgaggacct tgagggtgaag 900
 ttcaactggg acgtggacgg cgtggagggt cacaatgcca agaccaagcc caggggaggag 960
 cagtacaaca gcacctaccg ggtgtgtgtc gtgtgtgacc tgcctgacca ggattggctg 1020
 aacggcaagg agtacaagt taagggtgtc aacaaggccc tgcctgcccc tatcgagaaa 1080
 accatcagca aggccaaagg ccagcccaga gagccccagg tgtacacct gccccctagc 1140
 agagatgagc tgaccaagaa ccagggtgtc ctgacctgcc tgggtgaagg cttctacccc 1200
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc 1260
 cccctgtgc tggacagcga tggcagcttc ttctgttaca gcaagctgac cgtggacaag 1320
 agcagatggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcctccgtg tgcacgaggc cctgcacaa 1380
 cactacacc agaagagcct gagcctgtcc cctggcaagt ga 1422

<210> 55
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
<223> 人類化輕鏈：L2 C91S

<400> 55
atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagcgac 60
attcagatga ccagagccc cagctctctg agcgccagcg tggcgatag ggtgaccatc 120
acctgcaagg ccagccagga catcaacagc tacctgagct ggctccagca gaagcccggc 180
aaggctccca agagcctgat ctacagggcc aacaggctcg tggacggcgt gcctagcaag 240
tttagcggca gcggaagcgg cacagactac accctgacca tcagctccct gcagcccag 300
gacttcgcca cctactactg cctgcagagc gacgagttcc cctgacctt cggccagggc 360
accaaactgg agatcaagcg tacggtggcc gccccagcg tgttcattt cccccccagc 420
gatgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgtc tgcitgaaca ctctaccctc 480
cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aatgccctgc agagcggcaa cagccaggag 540
agcgtgaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600
agcaaggccg actacgagaa gcacaagggt tacgcctgtg aggtgaccca ccagggcctg 660
tccagccccg tgaccaagag cttaaccgg ggcgagtgtc ga 702

<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工肌肉抑制素線性肽1

<400> 56
Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Gly Ser
1 5 10 15
Gly

<210> 57
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工肌肉抑制素線性肽3

<400> 57
Ser Gly Ser Gly Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys
1 5 10 15
Arg Tyr

<210> 58
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工肌肉抑制素線性肽5

<400> 58
Ser Gly Ser Gly His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu
1 5 10 15
Thr Val

<210> 59
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工肌肉抑制素線性肽7

<400> 59
Ser Gly Ser Gly Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe
1 5 10 15
Glu Ala

<210> 60
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽9

<400> 60
 Ser Gly Ser Gly Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly
 1 5 10 15
 Trp Asp

<210> 61
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽11

<400> 61
 Ser Gly Ser Gly Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile
 1 5 10 15
 Ile Ala

<210> 62
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽13

<400> 62
 Ser Gly Ser Gly Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys
 1 5 10 15
 Arg Tyr

<210> 63
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽15

<400> 63
 Ser Gly Ser Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn Tyr

<210> 64
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽17

<400> 64
 Ser Gly Ser Gly Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser
 1 5 10 15
 Gly Glu

<210> 65
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽19

<400> 65
 Ser Gly Ser Gly Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu
 1 5 10 15
 Phe Val

<210> 66
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽21

<400> 66
 Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu
 1 5 10 15
 Gln Lys

<210> 67
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽23

<400> 67
 Ser Gly Ser Gly Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro
 1 5 10 15
 His Thr

<210> 68
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽25

<400> 68
 Ser Gly Ser Gly Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu
 1 5 10 15
 Val His

<210> 69
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽27

<400> 69
 Ser Gly Ser Gly Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala
 1 5 10 15
 Asn Pro

<210> 70
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽29

<400> 70
 Ser Gly Ser Gly His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly
 1 5 10 15
 Ser Ala

<210> 71
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽31

<400> 71
 Ser Gly Ser Gly Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro
 1 5 10 15
 Cys Cys

<210> 72
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽33

<400> 72
 Ser Gly Ser Gly Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Lys

<210> 73
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽35

<400> 73
 Ser Gly Ser Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser
 1 5 10 15
 Pro Ile

<210> 74
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽37

<400> 74
 Ser Gly Ser Gly Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met
 1 5 10 15
 Leu Tyr

<210> 75
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽39

<400> 75
 Ser Gly Ser Gly Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn
 1 5 10 15
 Gly Lys

<210> 76
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽41

<400> 76
 Ser Gly Ser Gly Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln
 1 5 10 15
 Ile Ile

<210> 77
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽43

<400> 77
 Ser Gly Ser Gly Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly
 1 5 10 15
 Lys Ile

<210> 78
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽45

<400> 78
 Ser Gly Ser Gly Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 Met Val

<210> 79
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽47

<400> 79
 Ser Gly Ser Gly Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val Val Asp
 1 5 10 15
 Arg Cys

<210> 80
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工肌肉抑制素線性肽49

<400> 80
 Ser Gly Ser Gly Gly Lys Ile Pro Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly
 1 5 10 15
 Cys Ser

<210> 81
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 81
 Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr
 1 5 10

<210> 82
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDRH3變異體Y96L

<400> 82
 Arg Leu Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10 15

<210> 83
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDRH3變異體G99D

<400> 83
 Arg Tyr Tyr Tyr Asp Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10 15

<210> 84
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDRH3變異體G99S

<400> 84
 Arg Tyr Tyr Tyr Ser Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10 15

<210> 85
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDRH3變異體G100A_K

<400> 85

Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Lys Pro Ala Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 86
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH3變異體P100B_F

<400> 86
Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Phe Ala Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 87
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH3變異體P100B_I

<400> 87
Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Ile Ala Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 88
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH3變異體W100E_F

<400> 88
Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Phe Tyr Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 89
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH3變異體F100G_N

<400> 89
Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Asn Asp Val
1 5 10 15

<210> 90
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH3變異體F100G_Y

<400> 90
Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Tyr Asp Val
1 5 10 15

<210> 91
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> CDRH3變異體V102N

<400> 91

Arg	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Gly	Pro	Ala	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Asn
1				5					10					15

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRH3變異體V102S

<400> 92

Arg	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Gly	Pro	Ala	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Ser
1				5					10					15

<210> 93

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRH2變異體G55D

<400> 93

Asn	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Asp	Val	Ser	Asn	Tyr	Asn	Gln	Arg	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ala

<210> 94

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRH2變異體G55L

<400> 94

Asn	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Leu	Val	Ser	Asn	Tyr	Asn	Gln	Arg	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ala

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRH2變異體G55S

<400> 95

Asn	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Ser	Val	Ser	Asn	Tyr	Asn	Gln	Arg	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ala

<210> 96

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRH2變異體G55T

<400> 96

Asn	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Thr	Val	Ser	Asn	Tyr	Asn	Gln	Arg	Phe	Lys
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1
Ala

5

10

15

<210> 97
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDRH2變異體G55V

<400> 97
 Asn Ile Tyr Pro Tyr Asn Val Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe Lys
 1 5 10 15
 Ala

<210> 98
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化重鏈：Fc失能之H2_F100G_Y

<400> 98
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Tyr Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 99
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人類化重鏈：Fc失能之H2_G55S-F100G_Y

<400> 99
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Pro Tyr Asn Ser Val Ser Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Tyr Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 100
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VL之人類受體構架

<221> VARIANT
 <222> (96)...(105)
 <223> Xaa為任何胺基酸

<400> 100
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 Glu Ile Lys
 115

<210> 101
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HexaHisGB1Tev/ (D76A) 小鼠肌肉抑制素聚合蛋白

<400> 101
 Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Trp Gly Ala Val Val Gly Thr His His His His His His Asp Thr Tyr
 20 25 30
 Lys Leu Ile Leu Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Glu
 35 40 45
 Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn
 50 55 60
 Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Phe Thr Val Thr Glu Gly Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Glu Gly Ser
 85 90 95
 Glu Arg Glu Glu Asn Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Ala
 100 105 110
 Trp Arg Gln Asn Thr Arg Tyr Ser Arg Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln
 115 120 125
 Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp
 130 135 140
 Ala Ile Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile
 145 150 155 160
 Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Ala Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu
 165 170 175
 Asp Asp Asp Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr
 180 185 190
 Glu Ser Asp Phe Leu Met Gln Ala Asp Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe
 195 200 205
 Phe Lys Phe Ser Ser Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val Val Lys Ala Gln

```

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

```

<210> 102
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GB1標籤

```

<400> 102
Asp Thr Tyr Lys Leu Ile Leu Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr
1      5      10      15
Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln
      20      25      30
Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala
      35      40      45
Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu
      50      55

```

<210> 103
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 鼠肌肉抑制素聚合蛋白 (D76A)

```

<400> 103
Glu Gly Ser Glu Arg Glu Glu Asn Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn
1      5      10      15
Ala Cys Ala Trp Arg Gln Asn Thr Arg Tyr Ser Arg Ile Glu Ala Ile
      20      25      30
Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile
      35      40      45
Ser Lys Asp Ala Ile Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala Pro Pro Leu Arg
      50      55      60
Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Ala Asp Ser Ser Asp Gly
      65      70      75      80
Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr
      85      90      95
Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu Met Gln Ala Asp Gly Lys Pro Lys
      100      105      110
Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val Val
      115      120      125

```

```

Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu Arg Pro Val Lys Thr Pro Thr Thr
130      135      140
Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr
145      150      155
Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu Lys Leu Asp Met Ser Pro Gly Thr
165      170      175
Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu
180      185      190
Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu
195      200      205
Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly
210      215      220
Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser
225      230      235
Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg
245      250      255
Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp
260      265      270
Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu
275      280      285
Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His
290      295      300
Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys
305      310      315
Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile
325      330      335
Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
340      345      350

```

<210> 104
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 104
Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys
1      5      10
Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile
20      25      30
Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu
35      40      45
Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala
50      55      60
Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser
65      70      75
Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly
85      90      95
Lys Ile Pro Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
100      105

```

<210> 105
 <211> 603
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 弗林蛋白酶表现構築體

```

<400> 105
Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr
1      5      10
Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn
20      25      30
Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val
35      40      45
Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr
50      55      60
Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His
65      70      75
Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu
85      90      95
Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu
100      105      110

```

Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr
 115 120 125
 Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly
 130 135 140
 His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His
 145 150 155 160
 Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn
 165 170 175
 Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn
 180 185 190
 Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn
 195 200 205
 Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val
 210 215 220
 Arg Met Leu Asp Gly Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu
 225 230 235 240
 Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro
 245 250 255
 Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu
 260 265 270
 Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Gly Leu Gly Ser Ile
 275 280 285
 Phe Val Trp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn
 290 295 300
 Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala
 305 310 315 320
 Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr
 325 330 335
 Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val
 340 345 350
 Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser
 355 360 365
 Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala
 370 375 380
 Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr
 385 390 395 400
 Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val
 405 410 415
 Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly
 420 425 430
 Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg
 435 440 445
 Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg
 450 455 460
 Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His
 465 470 475 480
 Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn
 485 490 495
 Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg
 500 505 510
 Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe
 515 520 525
 Asn Asp Trp Ala Phe Met Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser
 530 535 540
 Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr
 545 550 555 560
 Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu
 565 570 575
 Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser Gly Cys Lys Thr Leu Thr Ser
 580 585 590
 Ser Gln Ala Cys Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
 595 600

<210> 106

<211> 335

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HexaHisGB1Tev/人類肌肉抑制素前肽

<400> 106

Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu
 1 5 10 15

```

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

```

<210> 107
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Tev蛋白酶表現構築體

```

<400> 107
Met His Gly His His His His His His Gly Glu Ser Leu Phe Lys Gly
  1      5      10      15
Pro Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Ser Thr Ile Cys His Leu Thr Asn
      20      25      30
Glu Ser Asp Gly His Thr Thr Ser Leu Tyr Gly Ile Gly Phe Gly Pro
      35      40      45
Phe Ile Ile Thr Asn Lys His Leu Phe Arg Arg Asn Asn Gly Thr Leu
      50      55      60
Leu Val Gln Ser Leu His Gly Val Phe Lys Val Lys Asn Thr Thr Thr
      65      70      75      80
Leu Gln Gln His Leu Ile Asp Gly Arg Asp Met Ile Ile Ile Arg Met
      85      90      95
Pro Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln Lys Leu Lys Phe Arg Glu Pro
      100      105      110
Gln Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val Thr Thr Asn Phe Gln Thr Lys
      115      120      125
Ser Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr Ser Cys Thr Phe Pro Ser Ser
      130      135      140
Asp Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile Gln Thr Lys Asp Gly Gln Cys
      145      150      155      160
Gly Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp Gly Phe Ile Val Gly Ile His
      165      170      175
Ser Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn Asn Tyr Phe Thr Ser Val Pro
      180      185      190

```

Lys Asn Phe Met Glu Leu, Leu Thr Asn Gln Glu Ala Gln Gln Trp Val
 195 200 205
 Ser Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser Val Leu Trp Gly Gly His Lys
 210 215 220
 Val Phe Met Val Lys Pro Glu Glu Pro Phe Gln Pro Val Lys Glu Ala
 225 230 235 240
 Thr Gln Leu Met Asn Glu
 245

<210> 108
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 108
 Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn
 1 5 10 15
 Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr Lys Ser Ser Arg Ile Glu Ala Ile
 20 25 30
 Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile
 35 40 45
 Ser Lys Asp Val Ile Arg Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg
 50 55 60
 Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Asp Ser Ser Asp Gly
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr
 85 90 95
 Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu Met Gln Val Asp Gly Lys Pro Lys
 100 105 110
 Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val Val
 115 120 125
 Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr Thr
 130 135 140
 Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr
 145 150 155 160
 Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr
 165 170 175
 Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu
 180 185 190
 Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu
 195 200 205
 Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly
 210 215 220
 Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser
 225 230 235 240
 Arg Arg

<210> 109
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDRL3變異體C91S

<400> 109
 Leu Gln Ser Asp Glu Phe Pro Leu Thr
 1 5

<210> 110
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDRH3變異體Y100G_S

<400> 110
 Arg Tyr Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Ala Asp Trp Tyr Ser Asp Val
 1 5 10 15

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： 98143432

※ 申請日： 98.12.17

※IPC 分類：~~C07K~~ A61K^{38/16} (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

C07K^{16/18} (2006.01)

新穎抗原結合蛋白

C12N^{15/09} (2006.01)

NOVEL ANTIGEN BINDING PROTEINS

A61P^{21/00} (2006.01)

二、中文發明摘要：

本發明係關於一種與肌肉抑制素結合之抗原結合蛋白(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。本發明亦係關於一種以該等抗原結合蛋白於治療或預防與降低之肌肉質量、肌力及肌肉功能中之任一者或其組合相關之疾病上的用途。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to 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 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. 一種抗原結合蛋白，其與肌肉抑制素結合且包含SEQ ID NO: 3之CDRH3或變異型CDRH3。
2. 如請求項1之抗原結合蛋白，其中該變異型CDRH3包含
(i) SEQ ID NO: 82-92或110中之任一者；或(ii)以下任一取代：V102Y、V102H、V102I、V102D或V102G。
3. 如請求項1或2之抗原結合蛋白，其進一步包含一或多個或所有選自以下之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)；或變異型CDRH1、CDRH2、CDRL1、CDRL2或CDRL3。
4. 如請求項2之抗原結合蛋白，其中該變異型CDRH2包含
(i) SEQ ID NO: 93-97中之任一者；或(ii)以下任一取代：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。
5. 如請求項1、2及4中任一項之抗原結合蛋白，其中CDRH3為SEQ ID NO: 90；且/或CDRH2為SEQ ID NO: 95；且/或CDRL3為SEQ ID NO: 109。
6. 一種抗原結合蛋白，其與肌肉抑制素結合且包含SEQ ID

NO: 7之可變域序列之相應CDRH3或其變異型CDRH3。

7. 如請求項6之抗原結合蛋白，其進一步包含一或多個或所有選自以下之相應CDR：SEQ ID NO: 7之可變域序列之CDRH1或CDRH2；或SEQ ID NO: 8之可變域序列之CDRL1、CDRL2、CDRL3；或其變異型CDRH1、CDRH2、CDRL1、CDRL2或CDRL3。
8. 一種抗原結合蛋白，其與肌肉抑制素結合且包含含有SEQ ID NO: 7之Kabat殘基95-101之結合單元H3或變異型H3。
9. 如請求項8之抗原結合蛋白，其進一步包含一或多個或所有選自以下之結合單元：包含SEQ ID NO: 7之Kabat殘基31-32之H1、包含SEQ ID NO: 7之Kabat殘基52-56之H2、包含SEQ ID NO: 8之Kabat殘基30-34之L1、包含SEQ ID NO: 8之Kabat殘基50-55之L2及包含SEQ ID NO: 8之Kabat殘基89-96之L3；或變異型H1、H2、L1、L2或L3。
10. 如請求項1、2、4及6至9中任一項之抗原結合蛋白，其進一步包含選自以下之胺基酸殘基中之任一者或其組合：
 - (a) 可變重鏈之位置28處之S或T；
 - (b) 可變重鏈之位置105處之T或Q；
 - (c) 可變重鏈之位置2處之V、I或G；位置4處之L或V；位置20處之L、I、M或V；位置22處之C；位置24處之T、A、V、G或S；位置26處之G；位置29處之I、F、L

或S；位置36處之W；位置47處之W或Y；位置48處之I、M、V或L；位置69處之I、L、F、M或V；位置78處之A、L、V、Y或F；位置80處之L或M；位置90處之Y或F；位置92處之C；及/或位置94處之R、K、G、S、H或N；

(d) 可變輕鏈之位置16處之R或G；

(e) 可變輕鏈之位置71處之Y或F；

(f) 可變輕鏈之位置100處之A或Q；及/或

(g) 可變輕鏈之位置2處之I、L或V；位置3處之V、Q、L或E；位置4處之M或L；位置23處之C；位置35處之W；位置36處之Y、L或F；位置46處之S、L、R或V；位置49處之Y、H、F或K；位置88處之C；及/或位置98處之F。

11. 如請求項1、2、4及6至9中任一項之抗原結合蛋白，其進一步包含與SEQ ID NO: 10所示之構架區具有75%或75%以上之序列一致性的重鏈可變區受體抗體構架；或與SEQ ID NO: 11所示之構架區具有75%或75%以上之序列一致性的輕鏈可變域受體抗體構架。

12. 一種抗原結合蛋白，其與肌肉抑制素結合且包含：

(i) 選自SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 25之重鏈可變區；及/或選自SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 21之輕鏈可變區；或具有75%或75%以上之序列一致性的變異型重鏈可變區或輕鏈可變區；或

(ii) SEQ ID NO: 26之重鏈；及/或選自SEQ ID NO: 27

或 SEQ ID NO: 37 之輕鏈；或具有 75% 或 75% 以上之序列一致性的變異型重鏈或輕鏈。

13. 一種抗原結合蛋白，其與肌肉抑制素結合且包含：

(i) 選自 SEQ ID NO: 12、13 或 14 中之任一者的重鏈可變區；及/或選自 SEQ ID NO: 15、16、17、18 或 24 中之任一者的輕鏈可變區；或具有 75% 或 75% 以上之序列一致性的變異型重鏈可變區或輕鏈可變區；或

(ii) 選自 SEQ ID NO: 28、29、30、98 或 99 中之任一者的重鏈；及/或選自 SEQ ID NO: 31、32、33、34 或 40 中之任一者的輕鏈；或具有 75% 或 75% 以上之序列一致性的變異型重鏈或輕鏈。

14. 如請求項 12 或 13 之抗原結合蛋白，其中存在以下取代：

(i) 重鏈可變區或重鏈中之 Y96L、G99D、G99S、G100A_K、P100B_F、P100B_I、W100E_F、F100G_N、F100G_S、F100G_Y、V102N 或 V102S；及/或

(ii) 重鏈可變區或重鏈中之 G55D、G55L、G55S、G55T 或 G55V；及/或

(iii) 輕鏈可變區或輕鏈中之 C91S。

15. 如請求項 1、2、4、6 至 9、12 及 13 中任一項之抗原結合蛋白，其為 Fc 失能。

16. 一種核酸分子，其編碼如請求項 1 至 15 中任一項之抗原結合蛋白。

17. 一種表現載體，其包含如請求項 16 之核酸分子。

18. 一種重組宿主細胞，其包含如請求項 17 之表現載體。

19. 一種產生如請求項1至15中任一項之抗原結合蛋白之方法，該方法包含培養如請求項18之宿主細胞及回收該抗原結合蛋白之步驟。
20. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至15中任一項之抗原結合蛋白及醫藥學上可接受之載劑。
21. 一種如請求項1至15中任一項之抗原結合蛋白或如請求項20之組合物之用途，其係用於製造用以治療罹患降低之肌肉質量、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。
22. 一種如請求項1至15中任一項之抗原結合蛋白或如請求項20之組合物之用途，其係用於製造用以治療罹患以下疾病之個體的藥劑：肌肉減少症、惡病質、肌肉消瘦(muscle-wasting)、廢用性肌肉萎縮、HIV、AIDS、癌症、外科疾病、灼傷、肌骨或神經創傷或損傷、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、肌營養不良、運動神經元神經病、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、脂肪肝(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、類固醇誘發之肌肉消瘦、肌炎或脊柱側彎。

23. 一種如請求項1至15中任一項之抗原結合蛋白或如請求項20之組合物之用途，其係用於製造用以增加個體之肌肉質量、增加個體之肌力及/或改良個體之肌肉功能的藥劑。

八、圖式：

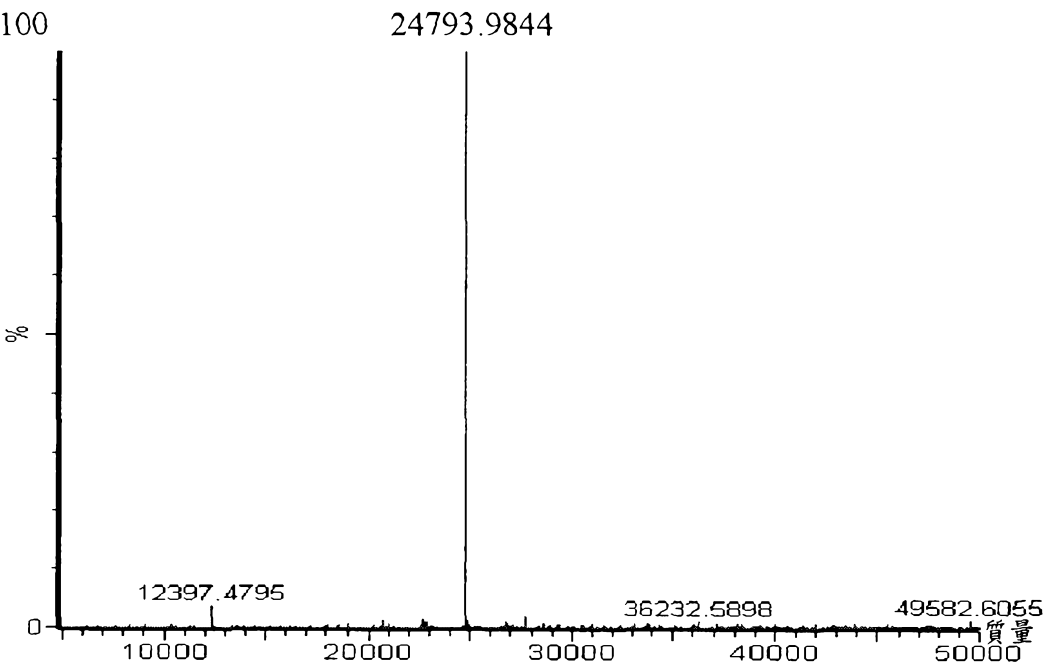


圖1

+- DTT

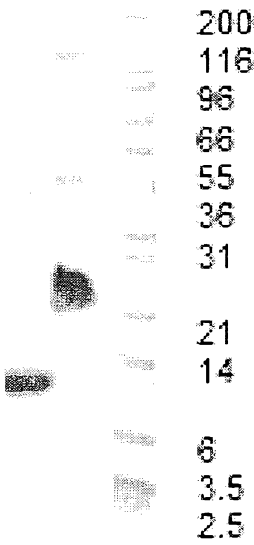


圖2

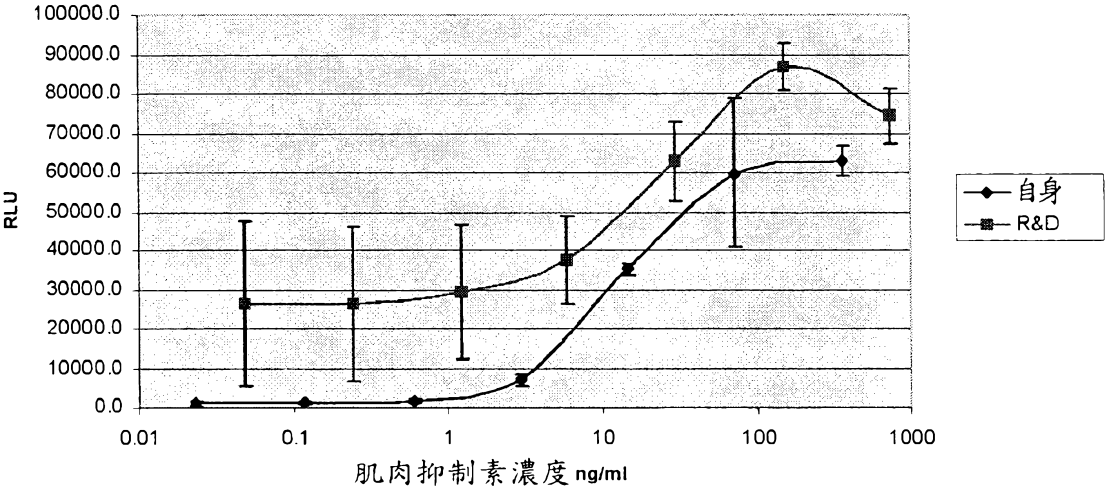


圖 3A

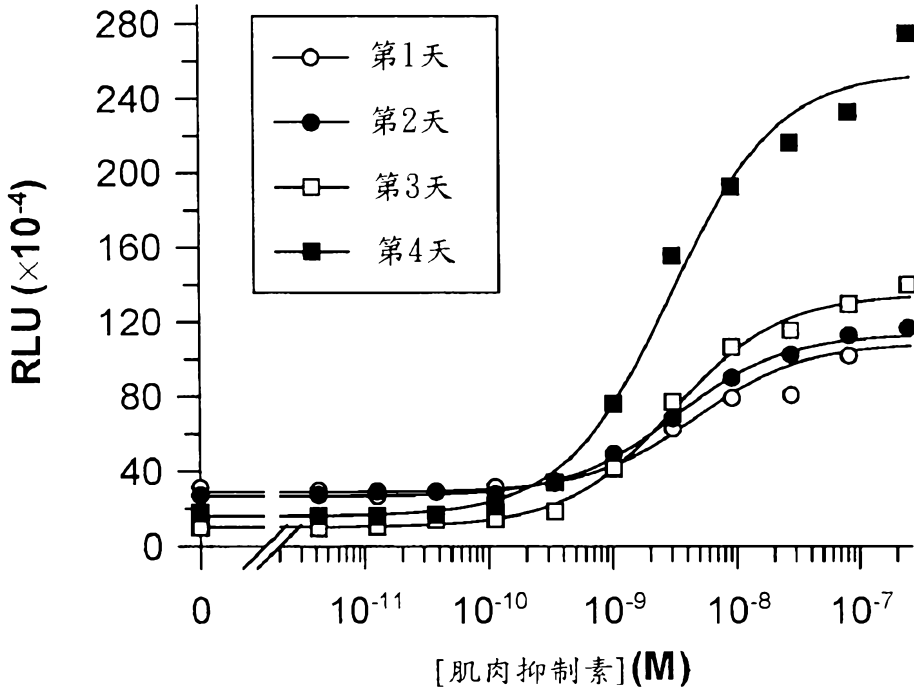


圖 3B

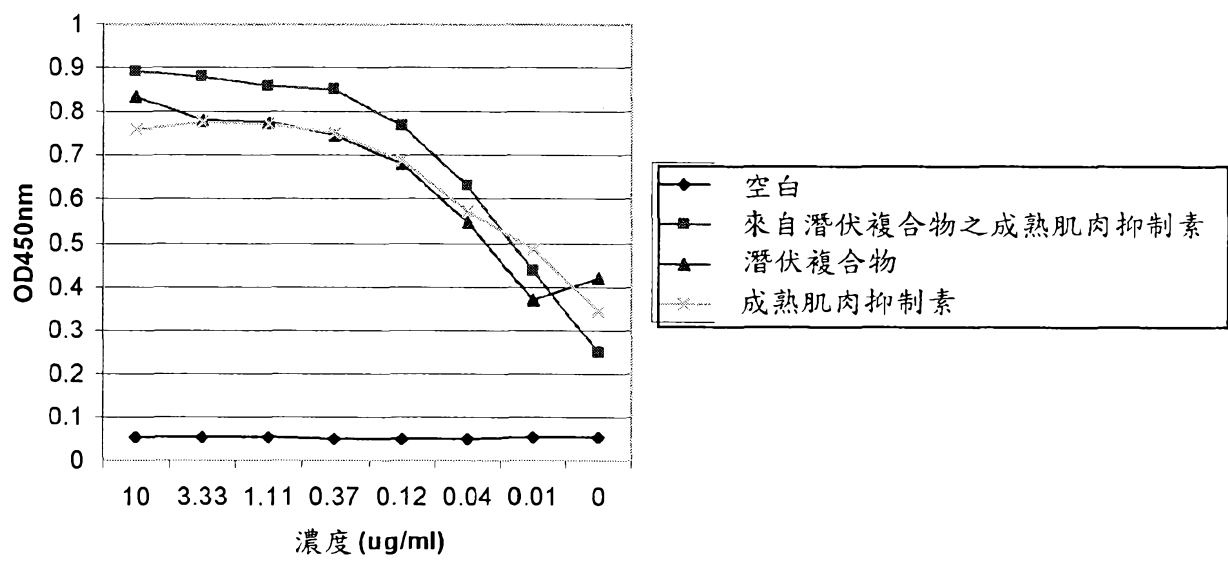


圖4

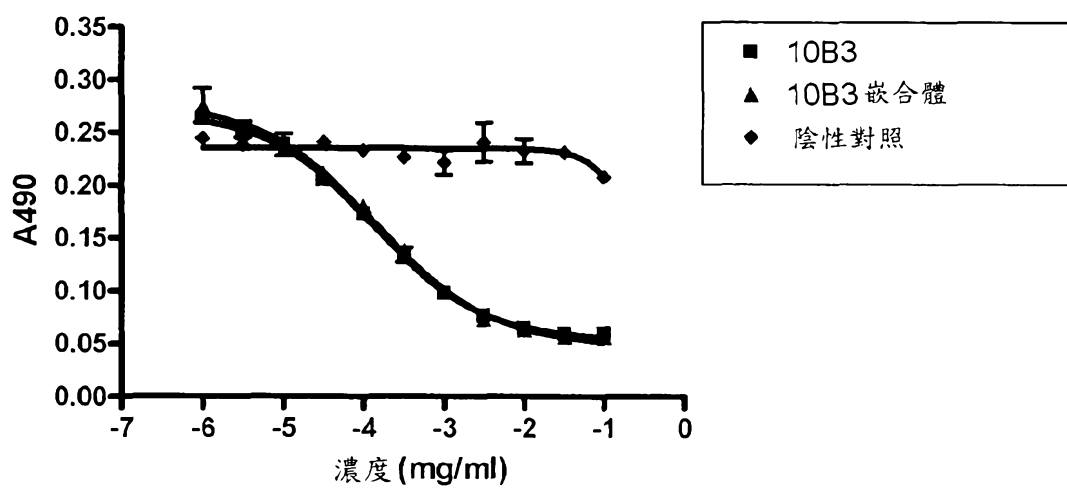


圖5

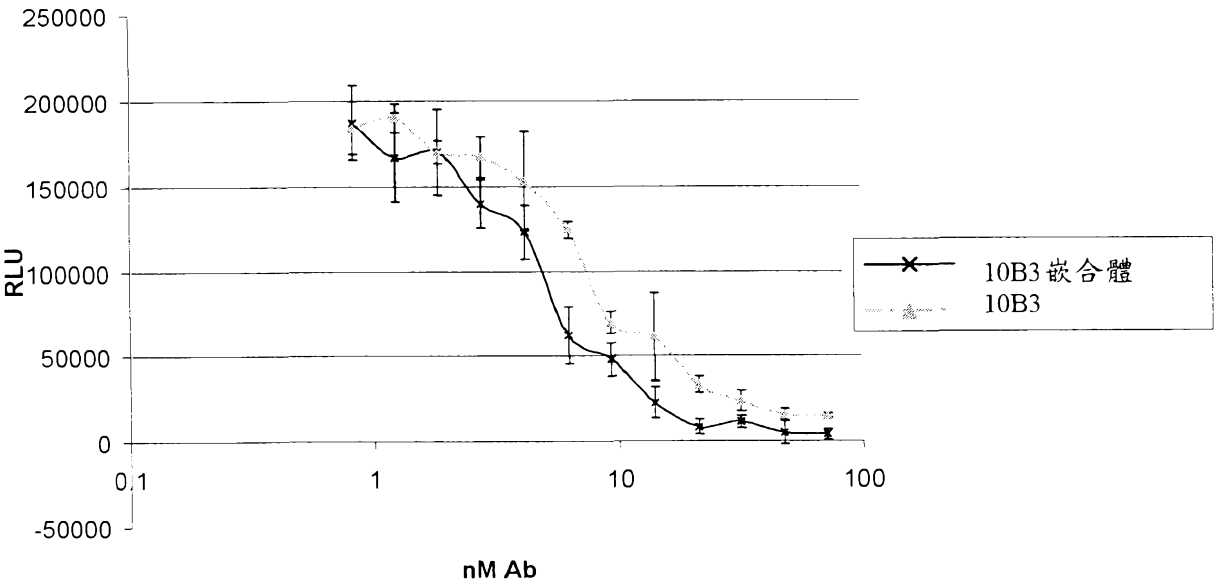
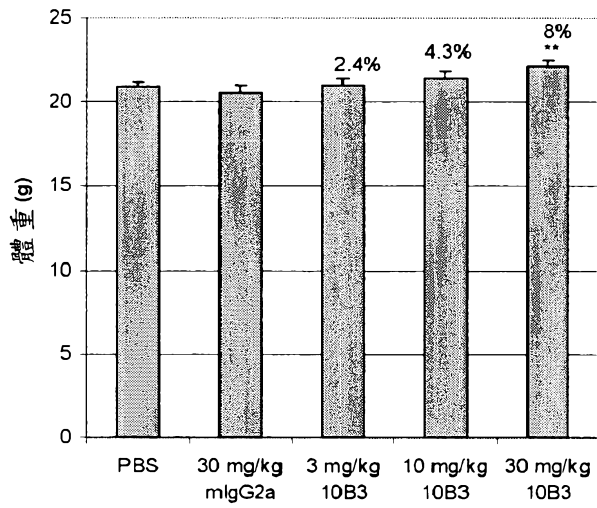
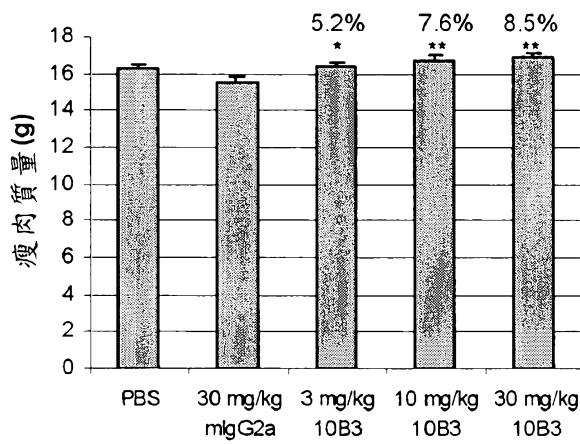


圖6



A



B

圖 7

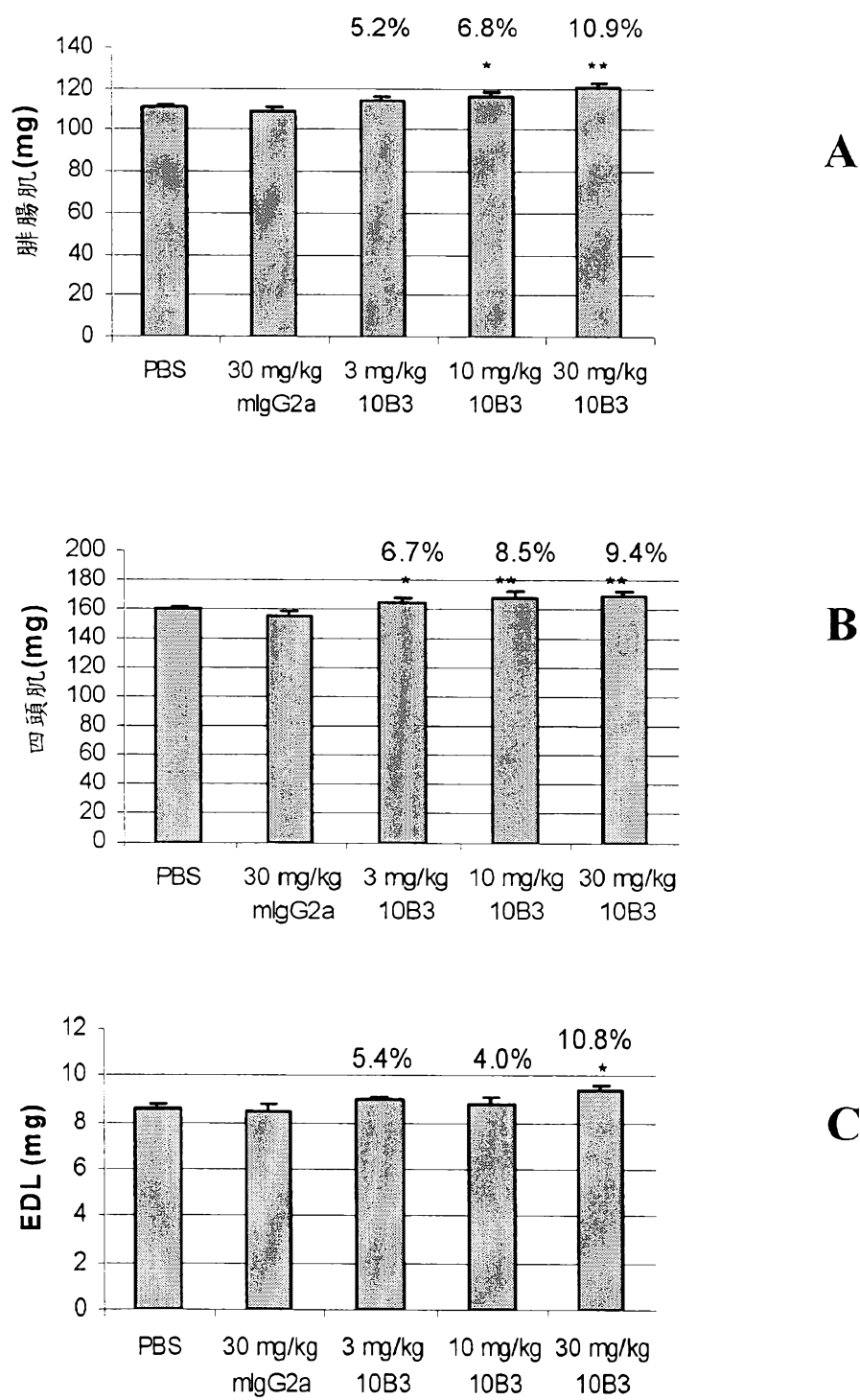
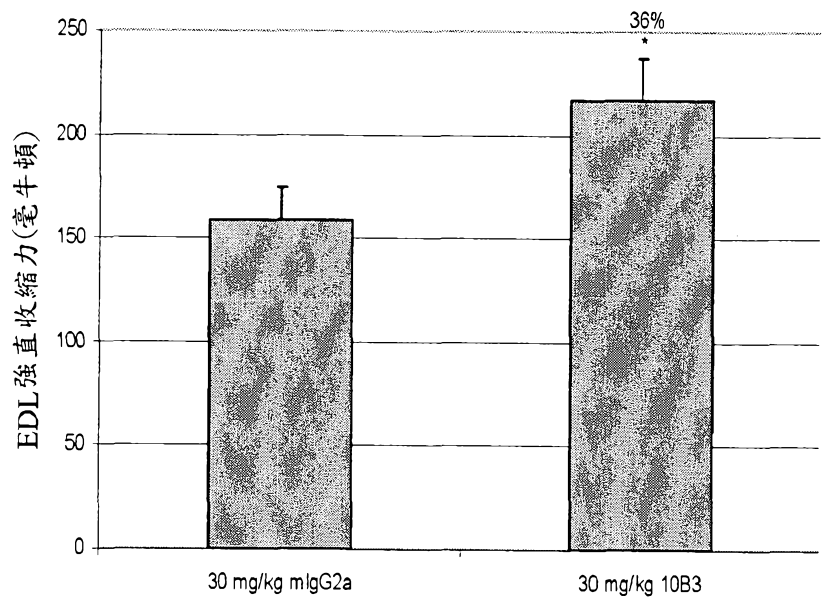
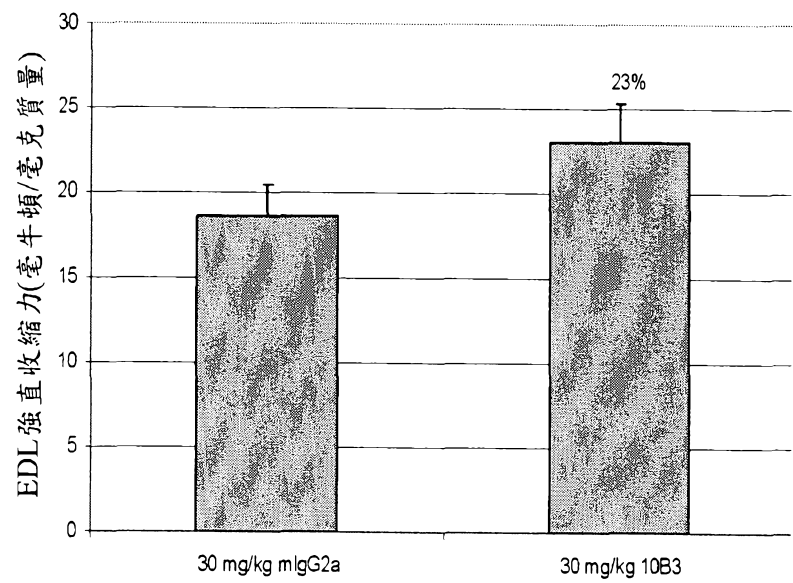


圖8



A



B

圖 9

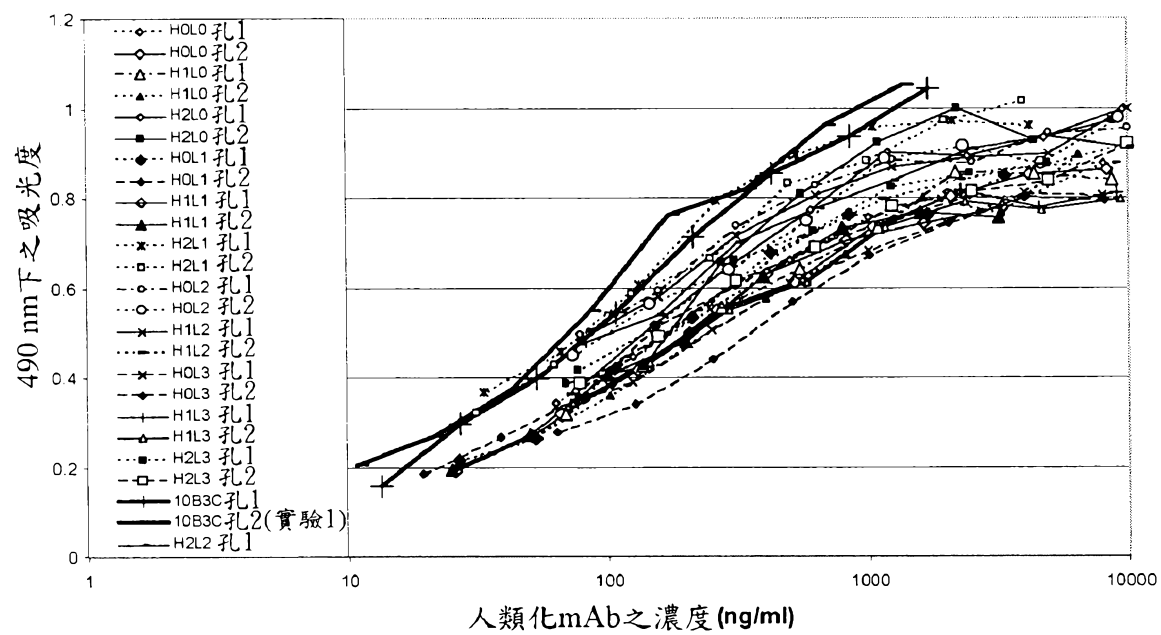


圖10A

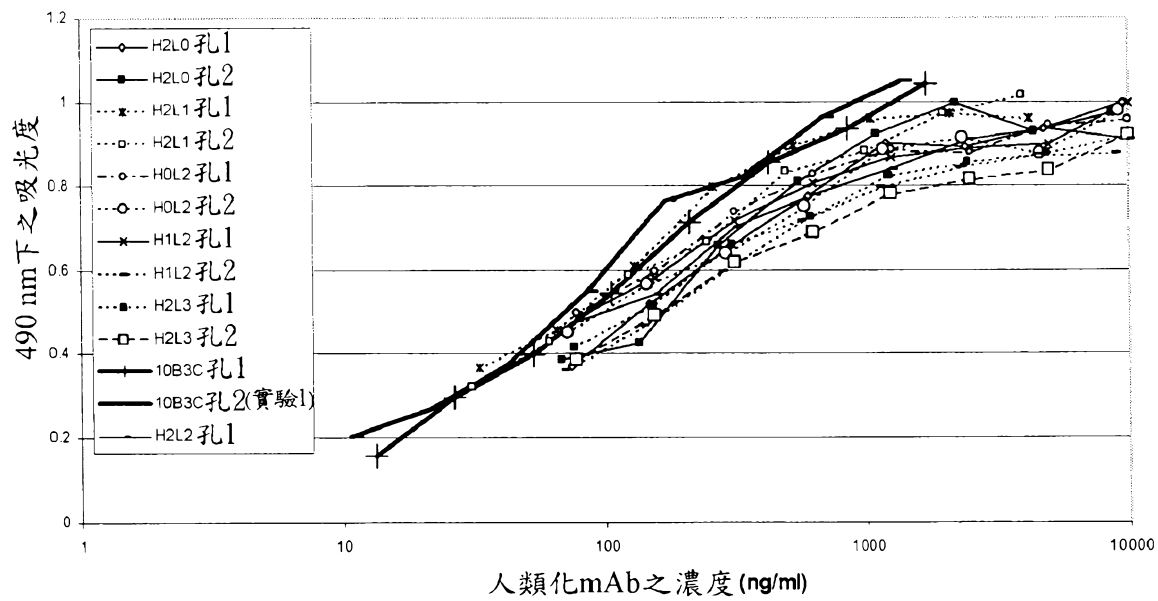


圖10B

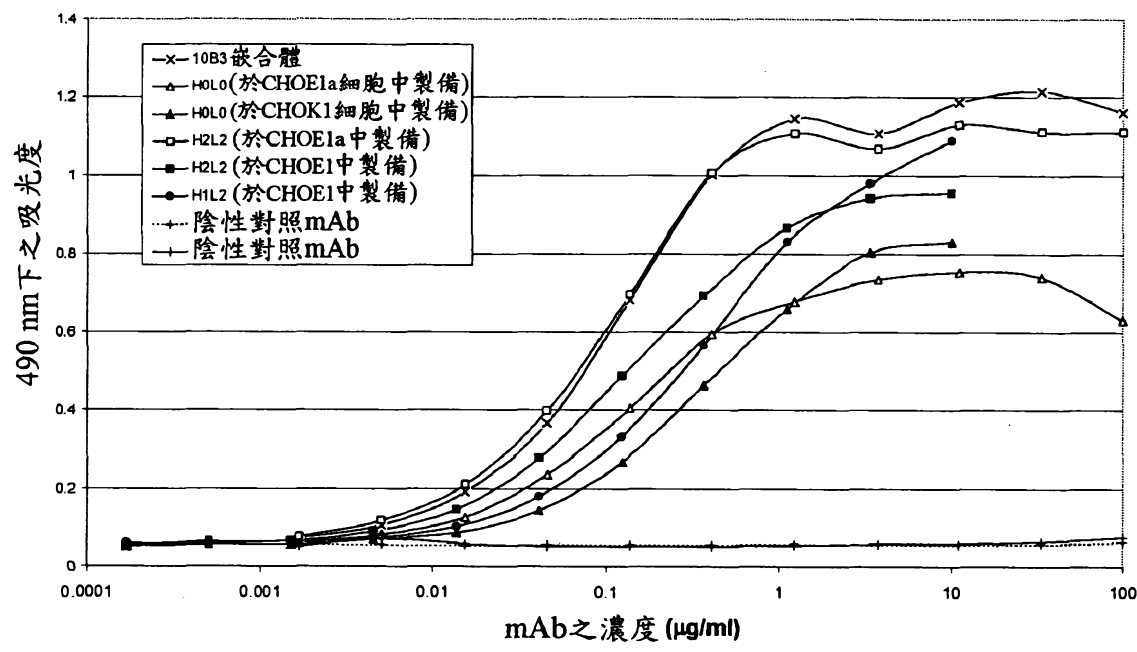


圖11

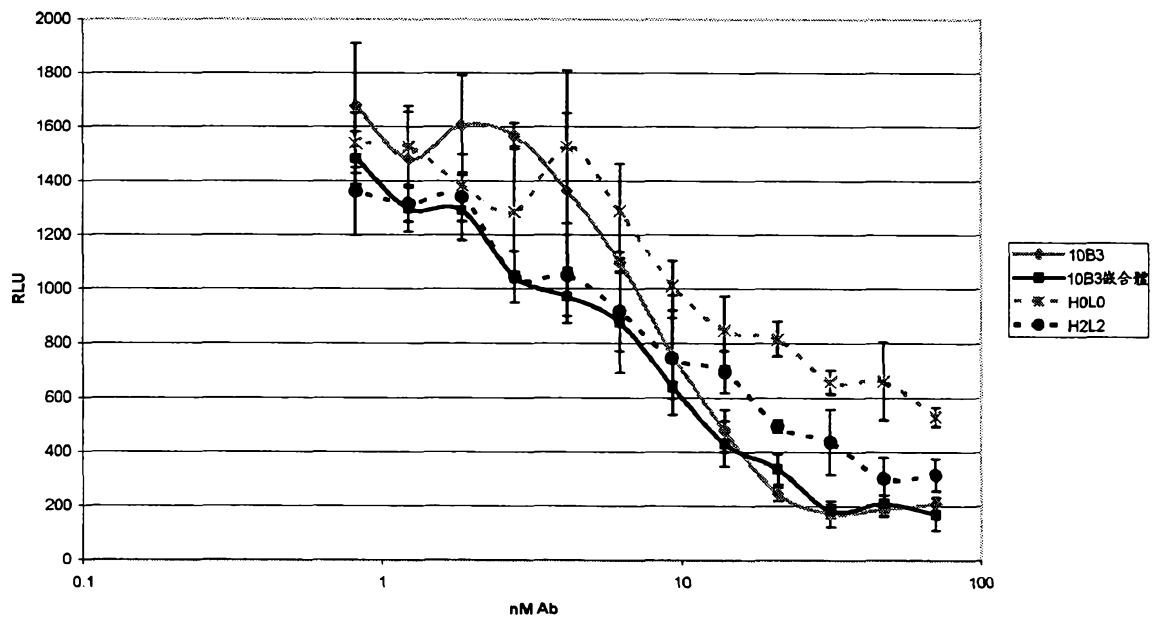


圖12

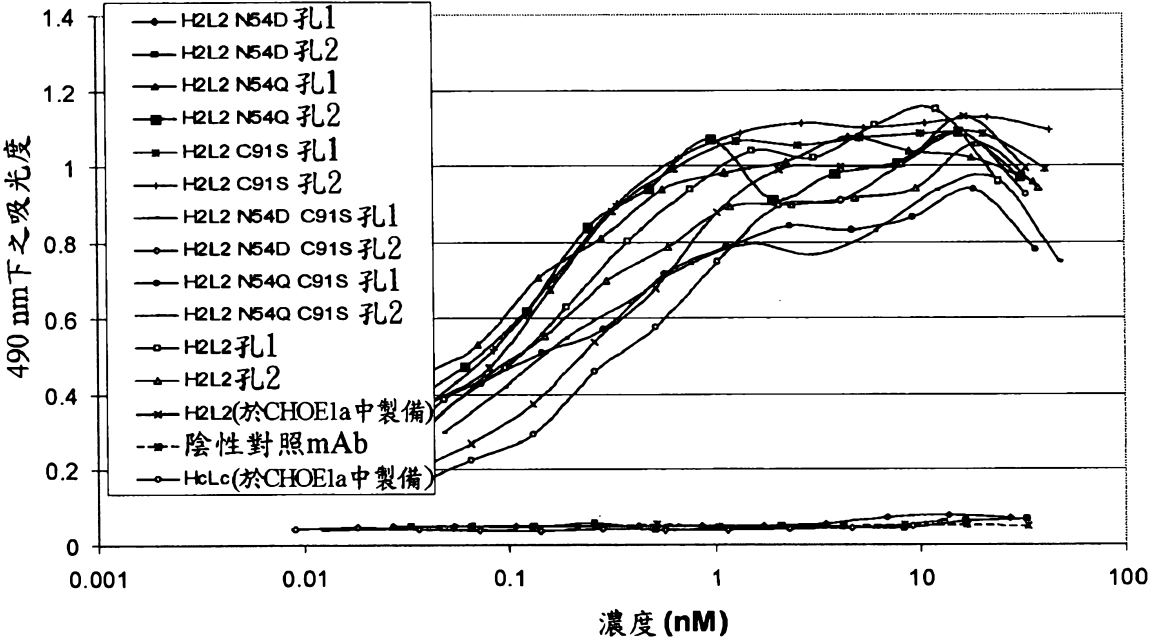


圖13

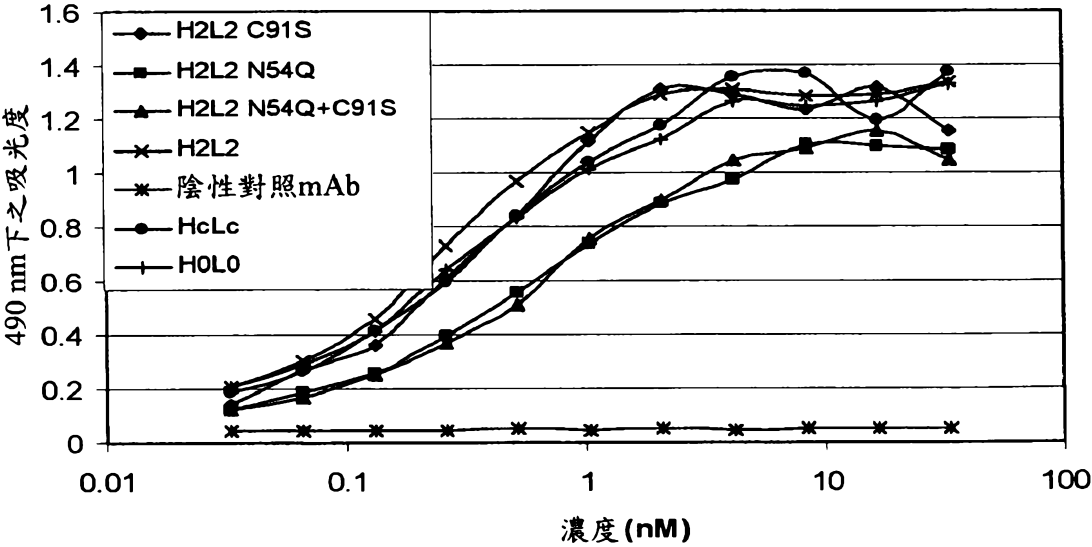


圖14

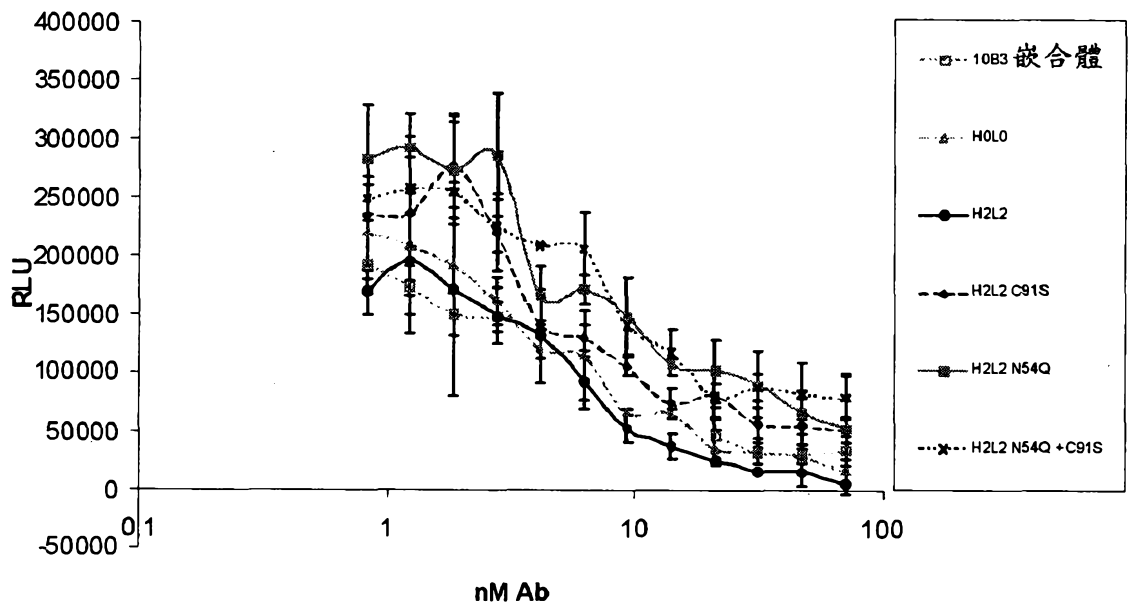


圖 15

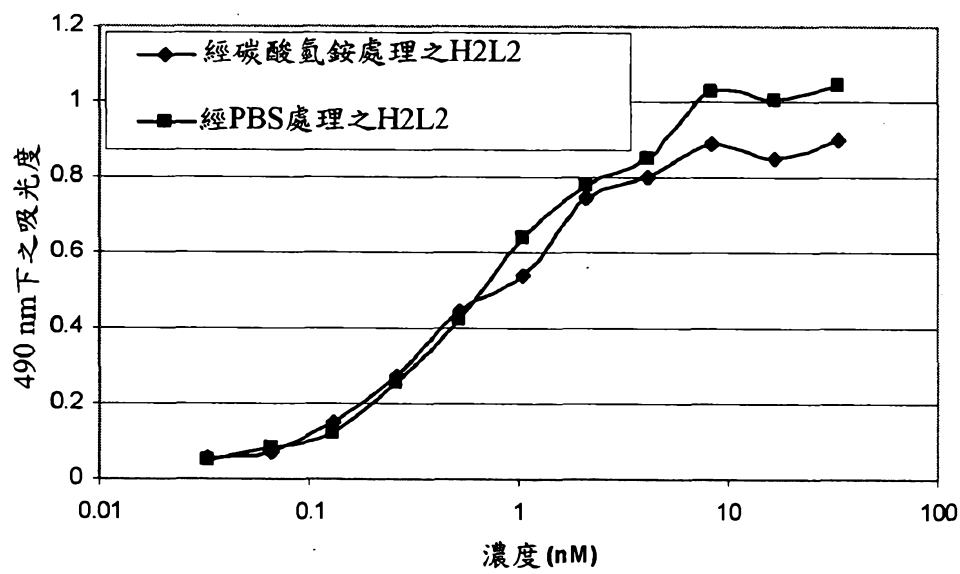


圖 16

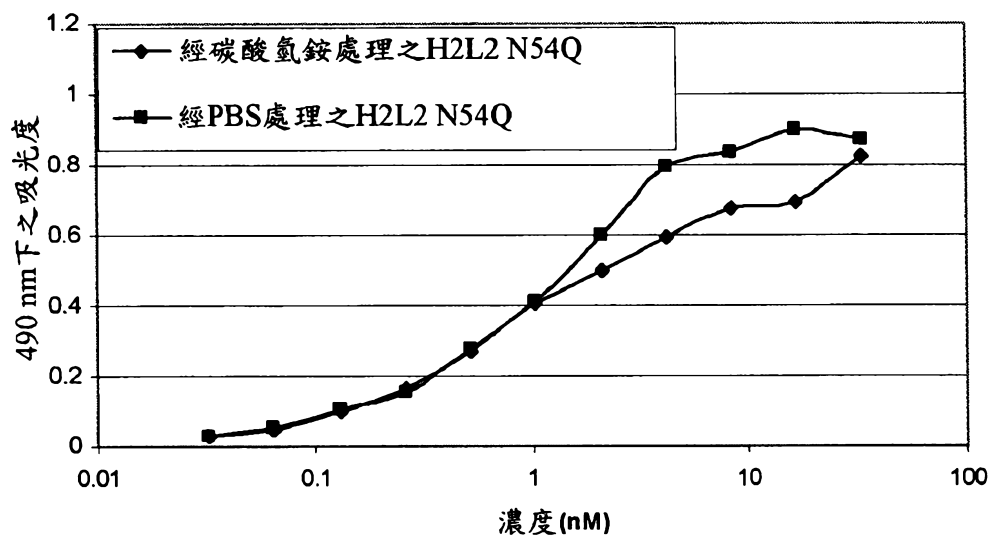


圖17

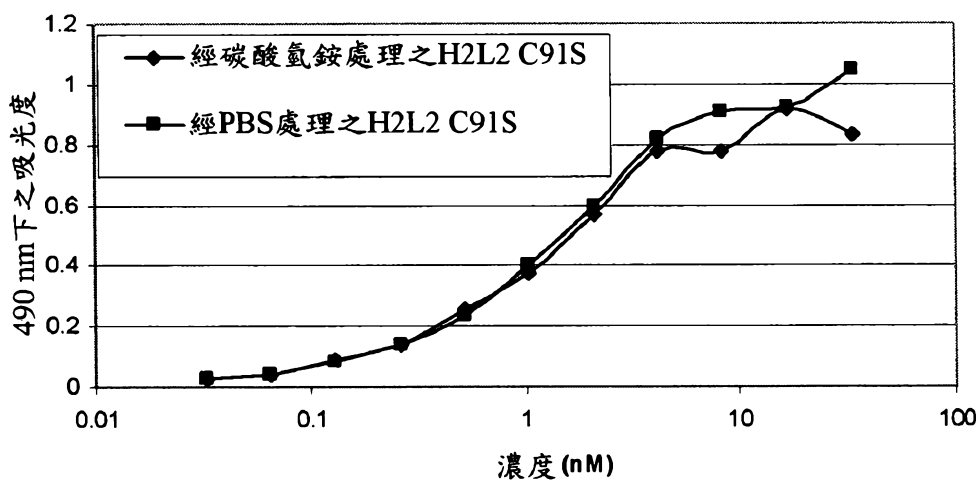


圖18

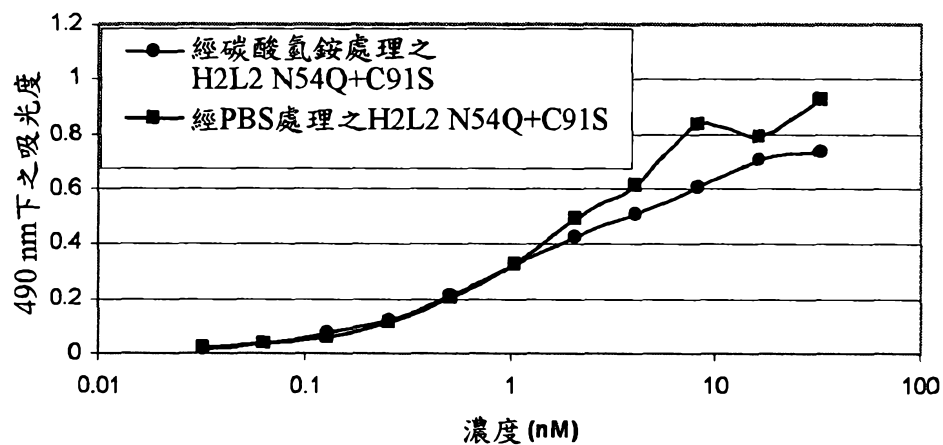


圖 19

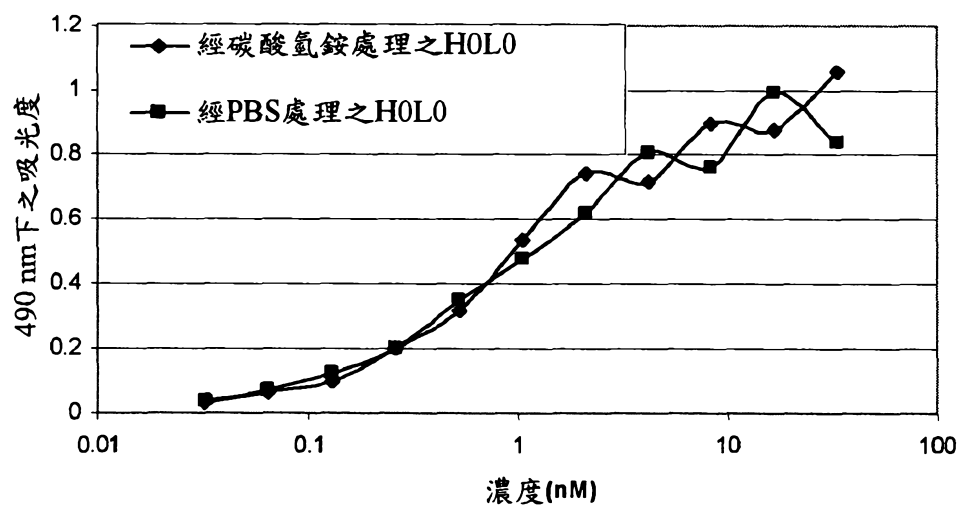


圖 20

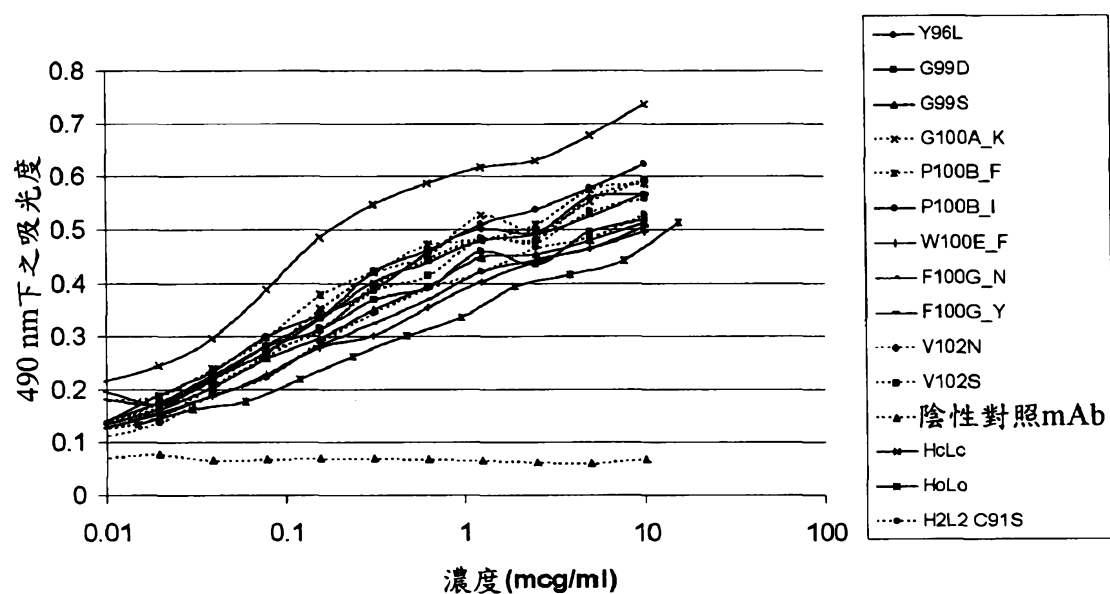


圖21

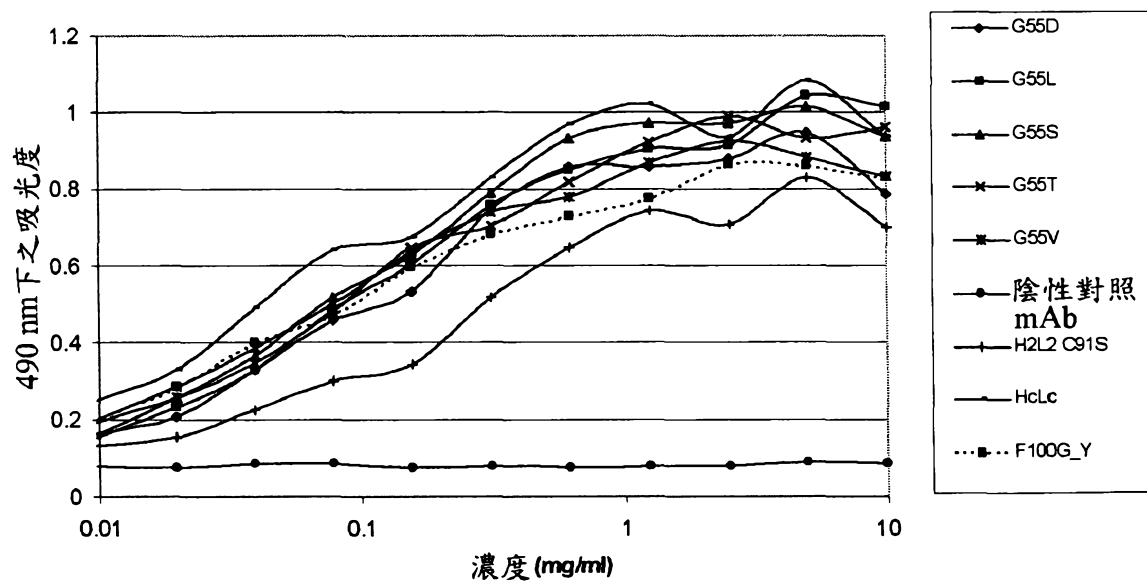


圖22

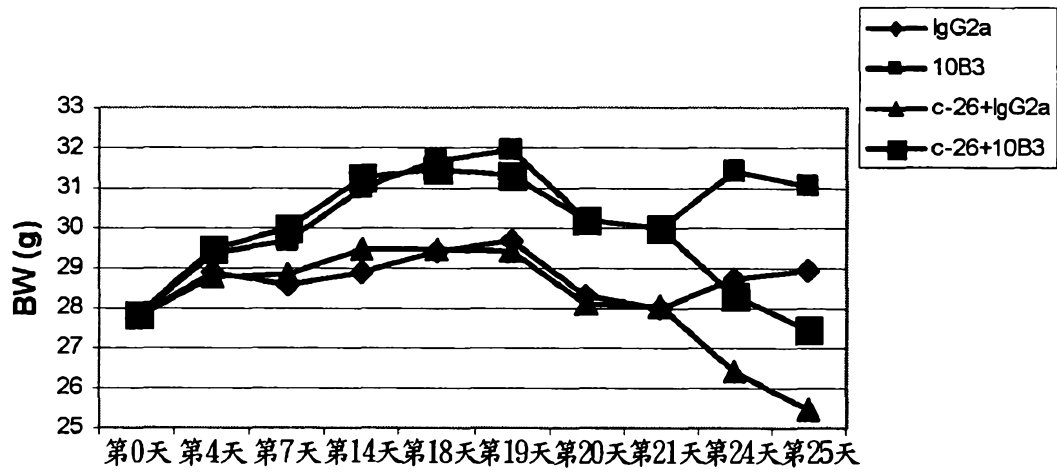


圖23

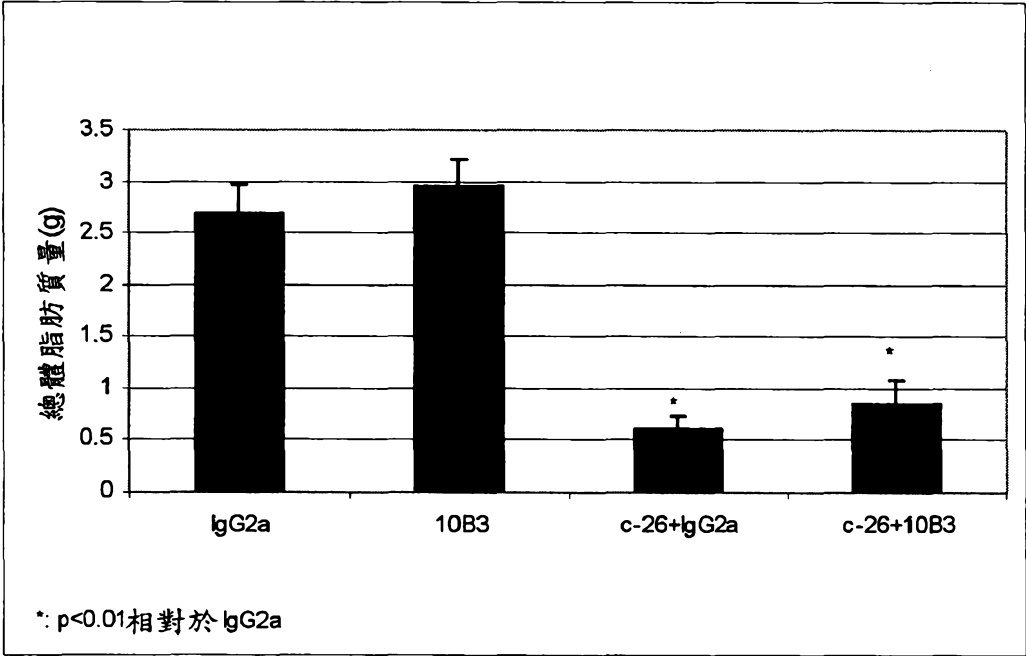


圖24A

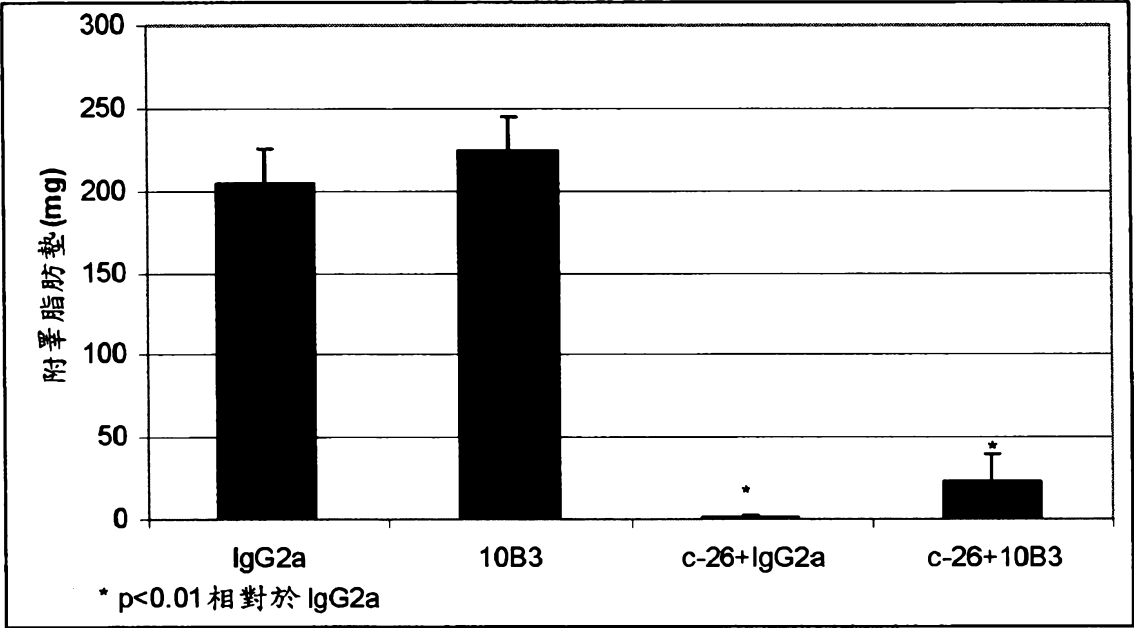


圖 24B

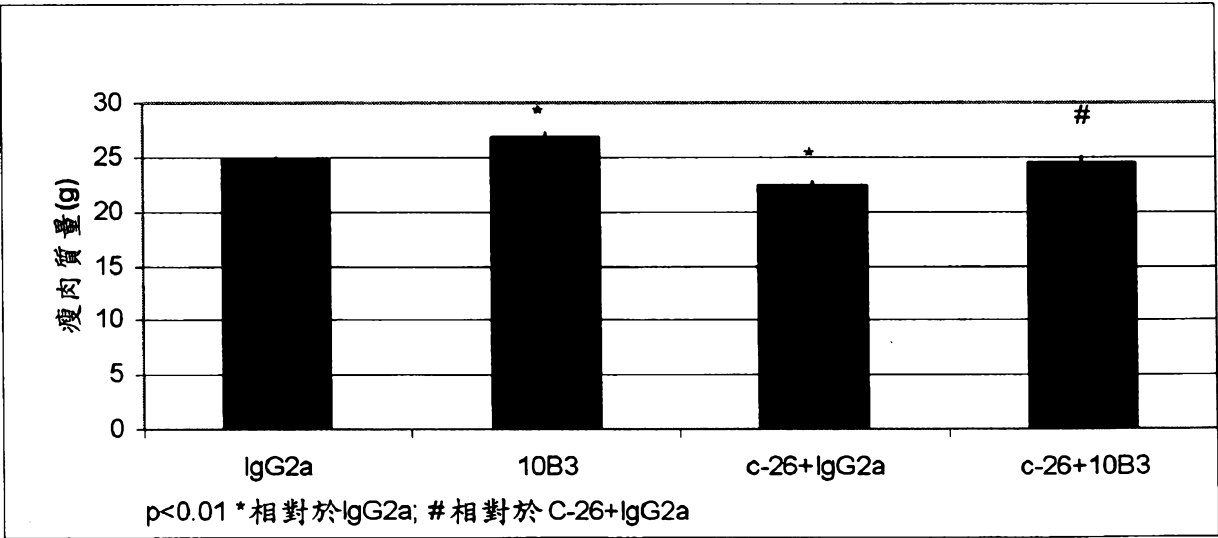


圖 24C

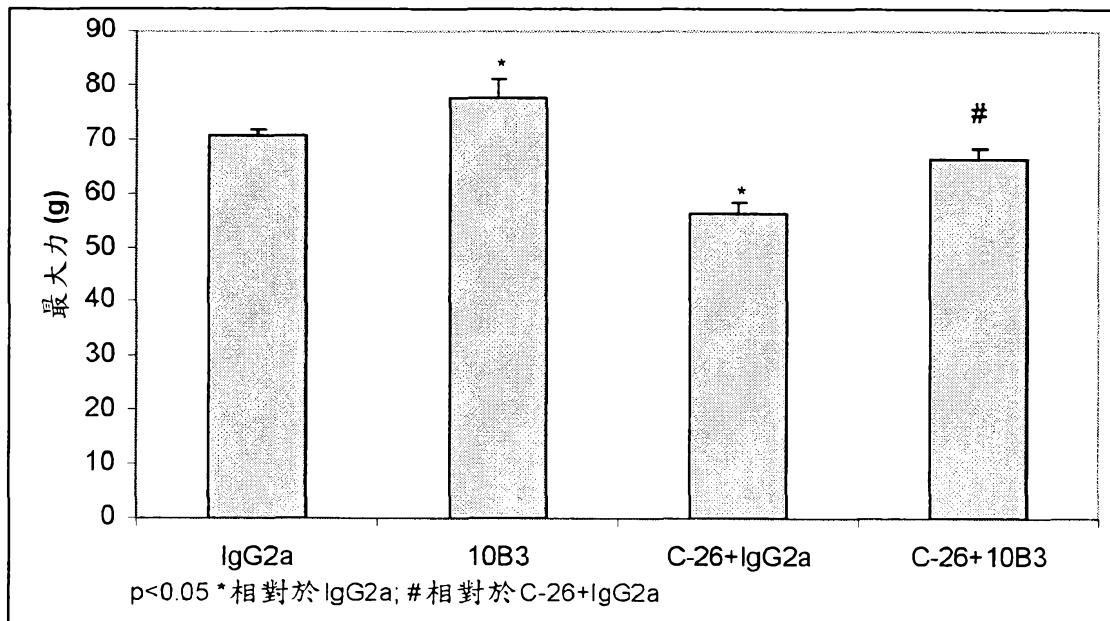


圖25

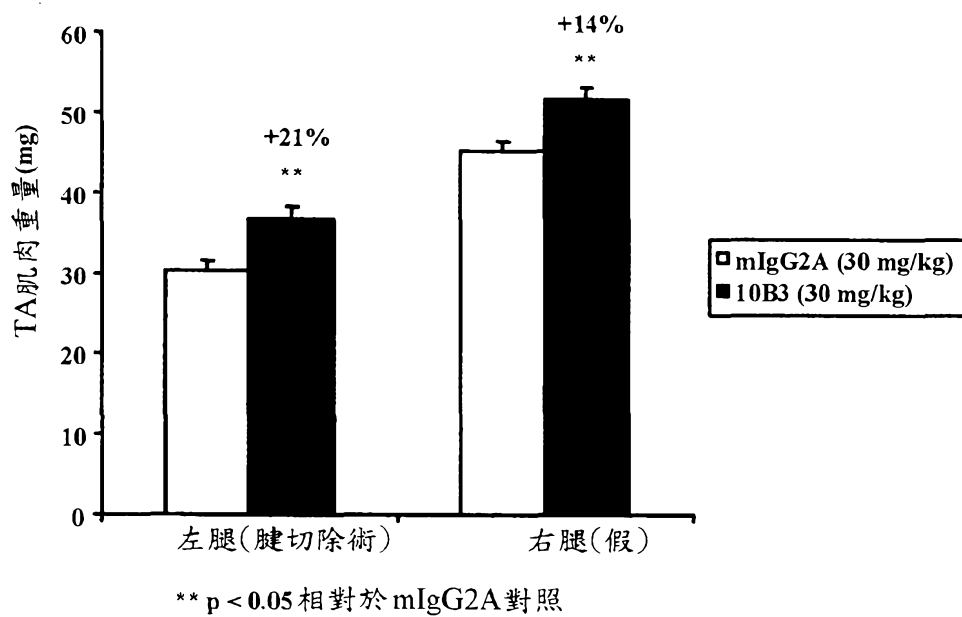


圖26

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(11)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)