



(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 202011029 A

(43) 公開日：中華民國 109 (2020) 年 03 月 16 日

---

(21) 申請案號：108112039 (22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 04 月 03 日

(51) Int. Cl. : *G01N33/74 (2006.01)* *C07K16/26 (2006.01)*  
*A61K39/00 (2006.01)*

(30) 優先權：2018/04/04 美國 62/652,701

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

(72) 發明人：劉 約翰 學 寧 LOWE, JOHN HOK NIN (US) ; 園田 純一郎 SONODA,  
 JUNICHIRO (US)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：89 項 圖式數：41 共 270 頁

---

(54) 名稱

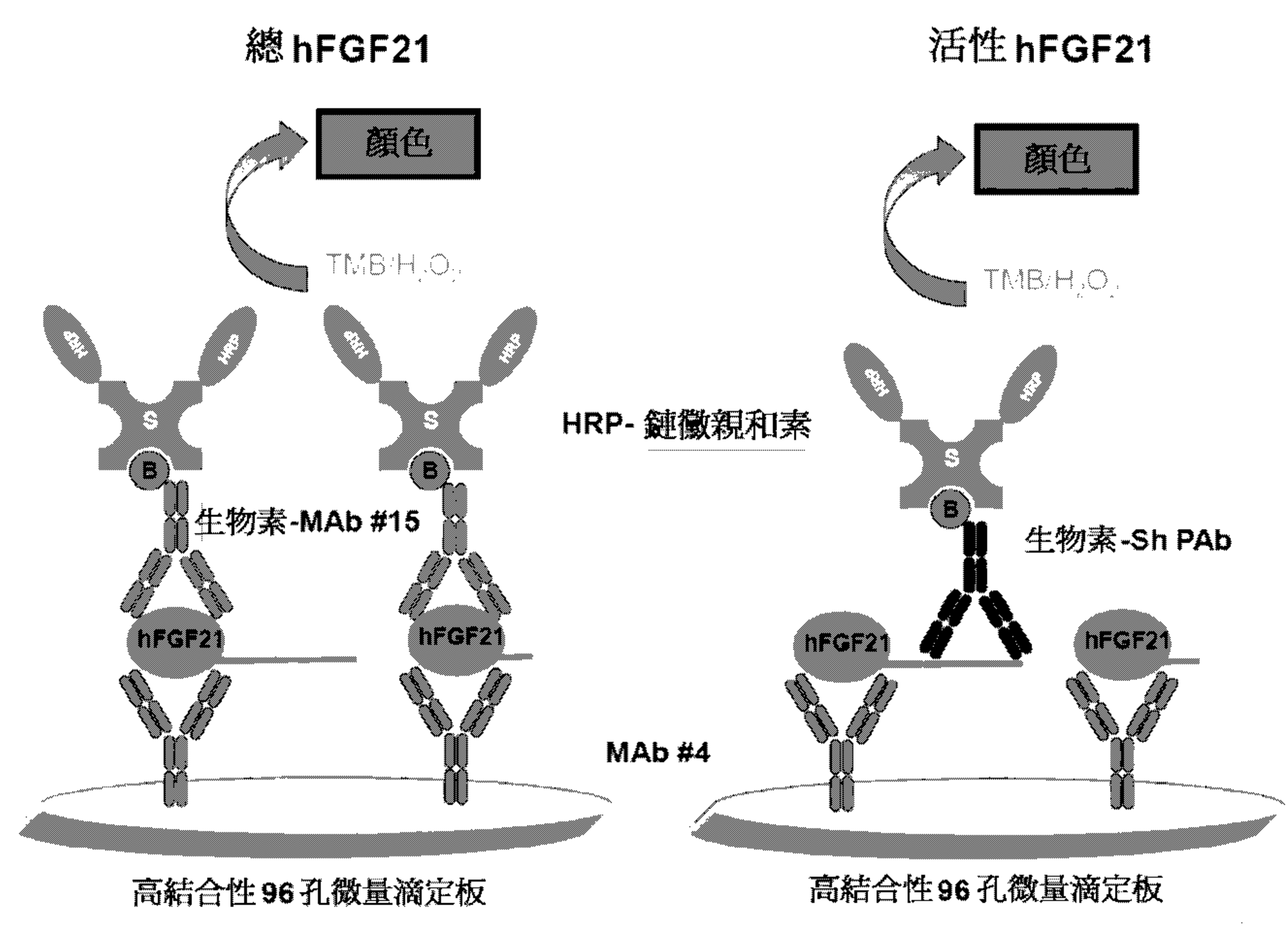
偵測及定量 FGF21 之方法

(57) 摘要

本發明揭示之主題提供結合 FGF21 之抗體及其使用方法。特定而言，本發明提供用於偵測及定量樣品中之活性及總 FGF21 含量之免疫分析方法以及用於進行此類方法之套組。

The presently disclosed subject matter provides antibodies that bind FGF21 and methods of using the same. In particular, the present disclosure provides immunoassay methods for detecting and quantifying active and total FGF21 levels in a sample and kits for performing such methods.

指定代表圖：



【圖 5】



202011029

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】偵測及定量 FGF21 之方法

【英文發明名稱】METHODS FOR DETECTING AND QUANTIFYING FGF21

【中文】

本發明揭示之主題提供結合 FGF21 之抗體及其使用方法。特定而言，本發明提供用於偵測及定量樣品中之活性及總 FGF21 含量之免疫分析方法以及用於進行此類方法之套組。

【英文】

The presently disclosed subject matter provides antibodies that bind FGF21 and methods of using the same. In particular, the present disclosure provides immunoassay methods for detecting and quantifying active and total FGF21 levels in a sample and kits for performing such methods.

【指定代表圖】圖 5

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】偵測及定量 FGF21 之方法

【英文發明名稱】METHODS FOR DETECTING AND QUANTIFYING FGF21

【技術領域】

【0001】 本發明係關於結合於 FGF21 之抗體以及使用該等抗體之免疫分析方法及套組。

【先前技術】

【0002】 纖維母細胞生長因子 21 (FGF21)為 FGF 超家族之內分泌成員且在葡萄糖及脂類代謝之調控中起作用。FGF21 需要 FGF-受體(FGFR)同種型及膜結合共受體 Klotho- $\beta$  (KLB)來進行信號傳導(Ogawa 等人 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104(18):7432-37 (2007)；US 2010/0184665)。FGF21 為一種有效疾病調節蛋白，其對葡萄糖穩態及胰島素敏感性具有有益影響，且已在動物疾病模型中顯示逆轉肥胖症及 2 型糖尿病(Kharitonov 等人 J. Clin. Invest. 115(6): 1627-35 (2005))。已顯示投與重組 FGF21 會減少肝臟脂質，改良胰島素敏感性，且使瘦素信號傳導缺陷型(ob/ob 或 db/db)小鼠或高脂肪膳食(HFD)飼喂之小鼠中之血糖控制正常化(Dunshee 等人 J. Biol. Chem. 291(11):5986-96 (2016)；US 2015/0218276)。在每天用重組 FGF21 處理之肥胖及糖尿病恆河猴中亦已觀測到血糖減少及各種心血管危險因子提高。

【0003】 FGF21 可在 N 端與 C 端發生蛋白水解裂解，且已顯示此類裂解影響 FGF21 之活性。在 N 端，人類 FGF21 中具有序列 His-Pro-Ile-Pro (HPIP (SEQ ID NO: 76))之頭四個胺基酸可由二肽基肽酶裂解(Dunshee 等人(2016))。

在 C 端，內肽酶纖維母細胞活化蛋白(FAP)裂解人類 FGF21 中具有胺基酸序列 Ser-Gln-Gly-Arg-Ser-Pro-Ser-Tyr-Ala-Ser (SQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 77))之最末端 10 個胺基酸(Dunshee 等人(2016))。缺乏四個 N 端胺基酸之 FGF21 為完全活性的；而缺乏最後十個 C 端胺基酸之 FGF21 不能結合共受體 KLB 且為非活性的(Yie 等人 FEBS Letters 583:19-24 (2009))。

**【0004】** 已提出循環 FGF21 為代謝病症(諸如糖尿病)之生物標記物，因為在肥胖個體中、患有非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)之個體中及患有 2 型糖尿病之個體中觀測到 FGF21 之血清含量增加(Zhang 等人 Diabetes 57(5):1246-1253 (2008)；Li 等人 Diabetes Res. Clin. Pract. 93(1):10-16 (2011))。鑒於 FGF21 在代謝病症之治療及發展中之顯著作用，此項技術中仍需要用於測定個體中 FGF21 蛋白之量的分析。

#### **【發明內容】**

**【0005】** 本發明提供結合纖維母細胞生長因子 21 (FGF21)之抗體及此類抗體在用於偵測及定量樣品中之 FGF21 蛋白(例如總體及/或活性 FGF21 蛋白)之免疫分析方法中的用途。

**【0006】** 在某些實施例中，本發明提供用於測定樣品中之總 FGF21 蛋白之量的免疫分析。舉例而言，但不限制，用於測定樣品中之總 FGF21 蛋白之量的方法可包括使結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的捕獲抗體與樣品接觸，以產生樣品-捕獲抗體組合物質，(b)使樣品-捕獲抗體組合物質與結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的偵測抗體接觸，(c)偵測結合於樣品-捕獲抗體組合物質之偵測抗體及(d)基於所結合之偵測抗體

的水準計算存在於樣品中之總 FGF21 蛋白的量。在某些實施例中，捕獲抗體及偵測抗體結合於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之不同抗原決定基。

**【0007】** 在某些實施例中，本發明提供用於測定樣品中之活性 FGF21 蛋白之量的免疫分析。舉例而言，但不限制，用於測定樣品中之活性 FGF21 蛋白之量的方法可包括(a)使結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的捕獲抗體與樣品接觸，以產生樣品-捕獲抗體組合物質，(b)使樣品-捕獲抗體組合物質與結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 內之抗原決定基的偵測抗體接觸，(c)偵測結合於樣品-捕獲抗體組合物質之偵測抗體及(d)基於所結合之偵測抗體的水準計算存在於樣品中之活性 FGF21 蛋白的量。

**【0008】** 在某些實施例中，本發明提供用於測定樣品中活性 FGF21 蛋白與總 FGF21 蛋白之比率的免疫分析。舉例而言，但不限制，該方法可包括(i)使結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的第一捕獲抗體與樣品接觸，以產生第一樣品-捕獲抗體組合物質，(ii)使第一樣品-捕獲抗體組合物質與結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的第一偵測抗體接觸，(iii)偵測結合於樣品-捕獲抗體組合物質之第一偵測抗體及(iv)基於所結合之第一偵測抗體的水準計算存在於樣品中之總 FGF21 蛋白的量。在某些實施例中，該方法可進一步包括(i)使結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的第二捕獲抗體與樣品接觸，以產生第二樣品-捕獲抗體組合物質，(ii)使第二樣品-捕獲抗體組合物質與結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 內之抗原決定基的第二偵測抗體接觸，(iii)偵測結合於樣品-捕獲抗體組合物質之第二偵測抗體及(iv)基於所結合之第二偵測抗體的水準計算存在於樣品中之活性

FGF21 蛋白的量。在某些實施例中，該方法可包括將所計算之總 FGF21 蛋白的量與所計算之活性 FGF21 蛋白的量相比較，以確定樣品中活性 FGF21 蛋白與總 FGF21 蛋白之比率。在某些實施例中，第一捕獲抗體與第二捕獲抗體為相同抗體。在某些實施例中，第一捕獲抗體及第一偵測抗體結合於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之不同抗原決定基。

**【0009】** 在某些實施例中，免疫分析方法為酶聯免疫吸附分析(ELISA)。在某些實施例中，免疫分析方法以約 2 pg/ml 至約 20 pg/ml 之孔內靈敏度偵測樣品中之總體或活性 FGF21 蛋白的量。

**【0010】** 在某些實施例中，免疫分析方法為單分子偵測分析，例如使用 Quanterix Simoa HD-1 Analyzer™之單分子偵測分析。在某些實施例中，免疫分析方法以約 0.2 pg/ml 至約 0.5 pg/ml 之孔內靈敏度偵測樣品中之總體或活性 FGF21 蛋白的量。

**【0011】** 本發明進一步提供用於進行免疫分析方法以便偵測及定量 FGF21 蛋白之套組。在某些實施例中，本發明提供用於測定樣品中之總 FGF21 蛋白之量的套組。舉例而言，但不限制，用於定量總 FGF21 蛋白之量的套組包括(a)捕獲抗體，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基，(b)偵測抗體，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基及(c)偵測劑。在某些實施例中，捕獲抗體及偵測抗體結合於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之不同抗原決定基。

**【0012】** 在某些實施例中，本發明提供用於測定樣品中之活性 FGF21 蛋白之量的套組。舉例而言，但不限制，用於定量活性 FGF21 蛋白之量的套組包括

(a)捕獲抗體，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基，(b)偵測抗體，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 內之抗原決定基及(c)偵測劑。

**【0013】** 在某些實施例中，本發明提供用於測定樣品中之活性 FGF21 蛋白之量的套組。舉例而言，但不限制，用於測定樣品中活性 FGF21 蛋白與總 FGF21 蛋白之比率的套組可包括(a)第一捕獲抗體，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基，(b)第一偵測抗體，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基，(c)第二捕獲抗體，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基，(d)第二偵測抗體，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 內之抗原決定基及(e)一或多種偵測劑。在某些實施例中，第一捕獲抗體與第二捕獲抗體為相同抗體。在某些實施例中，第一捕獲抗體及第一偵測抗體結合於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之不同抗原決定基。

**【0014】** 在某些實施例中，用於偵測偵測抗體、第一偵測抗體及/或第二偵測抗體之偵測劑可選自由以下組成之群：鏈黴親和素- $\beta$ -D-半乳哌喃糖接合物、鏈黴親和素-辣根過氧化酶接合物及其組合。在某些實施例中，鏈黴親和素- $\beta$ -D-半乳哌喃糖接合物具有約 100 pM 至約 400 pM 之濃度。

**【0015】** 在某些實施例中，本發明之套組可進一步包括試鹵靈(resorufin)  $\beta$ -D-半乳哌喃糖苷、四甲基聯苯胺、過氧化氫或其組合。舉例而言，但不限制，本發明之套組可包括鏈黴親和素- $\beta$ -D-半乳哌喃糖接合物作為偵測劑且可進一步

包括試鹵靈  $\beta$ -D-半乳哌喃糖苷。在某些實施例中，本發明之套組可包括鏈黴親和素-辣根過氧化酶接合物作為偵測劑且可進一步包括四甲基聯苯胺及過氧化氫。

**【0016】** 在某些實施例中，本文所揭示之套組以約 2 pg/ml 至約 20 pg/ml 之孔內靈敏度偵測樣品中之總體或活性 FGF21 蛋白的量。在某些實施例中，本文所揭示之套組以約 0.2 pg/ml 至約 0.5 pg/ml 之孔內靈敏度偵測樣品中之總體或活性 FGF21 蛋白的量。

**【0017】** 在某些實施例中，捕獲抗體、第一捕獲抗體或第二捕獲抗體固定至順磁性珠粒。在某些實施例中，捕獲抗體、第一捕獲抗體及/或第二捕獲抗體以約  $10^{-10}$  M 至  $10^{-13}$  M 之  $K_d$  結合於 FGF21。在某些實施例中，偵測抗體、第一偵測抗體及第二偵測抗體接合至生物素。在某些實施例中，偵測抗體及/或第一偵測抗體以約  $10^{-10}$  M 至  $10^{-13}$  M 之  $K_d$  結合於 FGF21。在某些實施例中，用於測定總 FGF21 蛋白之量的偵測抗體及/或第一偵測抗體具有約 0.1  $\mu$ g/ml 至約 1  $\mu$ g/ml 之濃度。在某些實施例中，用於測定活性 FGF21 蛋白之量的偵測抗體及/或第二偵測抗體具有約 1  $\mu$ g/ml 至約 3  $\mu$ g/ml 之濃度。

**【0018】** 在某些實施例中，捕獲抗體、第一捕獲抗體及/或第二捕獲抗體包括以下各項或競爭性結合於包括以下各項之抗體：(a)重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 26 及 27 (例如 26)組成之群的胺基酸序列及其保守取代，(b)重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 30 及 31 (例如 30)組成之群的胺基酸序列及其保守取代，(c)重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 34 及 35 (例如 34)組成之群的胺基酸序列及其保守取代，(d)輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 38 及 39 (例如 38)組成之群的胺

基酸序列及其保守取代，(e)輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 42 及 43 (例如 42)組成之群的胺基酸序列及其保守取代及(f)輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 46 及 47 (例如 46)組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0019】** 在某些實施例中，捕獲抗體、第一捕獲抗體及/或第二捕獲抗體包括以下各項或競爭性結合於包括以下各項之抗體：(a)重鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 54、55、74 及 75 (例如 54)組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及(b)輕鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 50、51、70 及 71 (例如 50)組成之群的胺基酸序列及其保守取代。在某些實施例中，捕獲抗體、第一捕獲抗體及/或第二捕獲抗體包括以下各項或競爭性結合於包括以下各項之抗體：(a)重鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 22、23、66 及 67 (例如 22)組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及(b)輕鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 18、19、62 及 63 (例如 18)組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0020】** 在某些實施例中，偵測抗體及/或第一偵測抗體包括以下各項或競爭性結合於包括以下各項之抗體：(a)重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 28 及 29 (例如 29)組成之群的胺基酸序列及其保守取代，(b)重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 32 及 33 (例如 33)組成之群的胺基酸序列及其保守取代，(c)重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 36 及 37 (例如 37)組成之群的胺基酸序列及其保守取代，(d)輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 40 及 41 (例如 41)組成之群的胺基酸序列及其保守取代，(e)輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 44 及 45

(例如 45)組成之群的胺基酸序列及其保守取代及(f)輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 48 及 49 (例如 49)組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0021】** 在某些實施例中，偵測抗體及/或第一偵測抗體包括以下各項或競爭性結合於包括以下各項之抗體：(a)重鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 56、57、72 及 73 (例如 57)組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及(b)輕鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 52、53、68 及 69 (例如 53)組成之群的胺基酸序列及其保守取代。在某些實施例中，偵測抗體及/或第一偵測抗體包括以下各項或競爭性結合於包括以下各項之抗體：(a)重鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 24、25、64 及 65 (例如 25)組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及(b)輕鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 20、21、60 及 61 (例如 21)組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0022】** 在某些實施例中，所揭示之免疫分析方法中所用之抗體可為單株抗體、嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體。在某些實施例中，所揭示之免疫分析方法中所用之抗體可為抗體片段，例如 Fv、Fab、Fab'、scFv、雙功能抗體或 F(ab')<sub>2</sub> 片段。

**【0023】** 在某些實施例中，所分析之樣品為自個體獲得之血液樣品。在某些實施例中，樣品為自個體獲得之血漿樣品。

**【0024】** 本發明進一步提供經分離之抗 FGF21 抗體。在某些實施例中，經分離之抗 FGF21 抗體或其抗原結合部分包含：(a)重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 26-29 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；(b)重鏈可變區

CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 30-33 組成之群的胺基酸序列及其保守取代； (c)重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 34-37 組成之群的胺基酸序列及其保守取代； (d)輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 38-41 組成之群的胺基酸序列及其保守取代； (e)輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 42-45 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及(f)輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 46-49 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0025】** 在某些實施例中，經分離之抗 FGF21 抗體或其抗原結合部分包含：(a)重鏈可變域(VH)序列，其包含選自由 SEQ ID NO: 54-57 及 72-75 組成之群的胺基酸序列；及(b)輕鏈可變域(VH)序列，其包含選自由 SEQ ID NO: 50-53 及 68-71 組成之群的胺基酸序列。在某些實施例中，經分離之抗 FGF21 抗體或其抗原結合部分包含：(a)重鏈序列，其包含選自由 SEQ ID NO: 22-25 及 64-67 組成之群的胺基酸序列；及(b)輕鏈序列，其包含選自由 SEQ ID NO: 18-21 及 60-63 組成之群的胺基酸序列。

#### **【圖式簡單說明】**

**【0026】** 圖 1. 描繪表現抗 FGF21 抗體之 80 份雜交瘤上清液的 ELISA 篩選結果。

**【0027】** 圖 2：描繪使用 mAb4 或 mAb9 捕獲抗體及 mAb11 偵測抗體藉由夾心 ELISA 進行之完整與裂解之 FGF21 偵測的劑量反應。

**【0028】** 圖 3：描繪抗 FGF21 抗體 mAb4、mAb9、mAb11 及 mAb15 之 BIACORE®表面電漿子共振分析。

【0029】 圖 4：描繪顯示抗 FGF21 抗體結合於 FGF21 (FGF19 用作陰性對照) 之示意圖。

【0030】 圖 5：描繪用於偵測總 FGF21 及活性 FGF21 之比色 ELISA 法之非限制性實施例的示意圖。

【0031】 圖 6：描繪用於進行總體及活性 FGF21 ELISA 分析之方案的非限制性實施例。

【0032】 圖 7：描繪使用 mAb4 或 mAb11 捕獲抗體及各種偵測抗體之 ELISA 分析的結果。

【0033】 圖 8：描繪使用示例性總體及活性 FGF21 ELISA 分析偵測野生型及裂解之人類 FGF21 之靈敏度的比較。

【0034】 圖 9：描繪使用示例性總 FGF21 ELISA 分析偵測人類 FGF21。

【0035】 圖 10：描繪表明示例性抗 FGF21 抗體不與小鼠 FGF21 交叉反應之 ELISA 分析。

【0036】 圖 11：描繪示例性總體及活性 FGF21 ELISA 分析中捕獲抗體 mAb4 及 mAb9 之靈敏度的比較。

【0037】 圖 12：描繪塗佈緩衝液及濃度對使用 mAb4 作為捕獲抗體且使用 mAb15 作為偵測抗體之示例性總 FGF21 ELISA 分析之靈敏度的影響。

【0038】 圖 13：描繪塗佈緩衝液及濃度對使用 mAb4 作為捕獲抗體且使用綿羊 C 端 pAb 作為偵測抗體之示例性活性 FGF21 ELISA 分析之靈敏度的影響。

【0039】 圖 14：描繪生物素接合型偵測抗體及 HRP 濃度對使用 mAb4 作為捕獲抗體且使用 mAb15 作為偵測抗體之示例性總 FGF21 ELISA 分析之靈敏度的影響。

【0040】 圖 15：描繪用於使用 Quanterix Simoa HD-1 Analyzer™ (「Quanterix Simoa」)偵測總 FGF21 及活性 FGF21 之單分子偵測方法的非限制性實施例之示意圖。

【0041】 圖 16：描繪使用 Quanterix Simoa 之示例性總 FGF21 及活性 FGF21 分析之兩步分析方案的非限制性實施例。

【0042】 圖 17：描繪使用 Quanterix Simoa 藉由示例性總 FGF21 及活性 FGF21 分析進行之完整與裂解之 FGF21 偵測的劑量反應。

【0043】 圖 18：描繪使用 Quanterix Simoa 進行示例性總體及活性 FGF21 分析之方案的非限制性實施例。

【0044】 圖 19：描繪使用 Quanterix Simoa 之示例性總體及活性 FGF21 分析中的標準曲線。

【0045】 圖 20：描繪使用 Quanterix Simoa 之示例性總體及活性 FGF21 分析中的標準曲線效能。

【0046】 圖 21：描繪在使用 Quanterix Simoa 之示例性總體及活性 FGF21 分析中在存在 BA010 及 IL-12 緩衝液之情況下偵測總體及活性 FGF21 的靈敏度之比較。

【0047】 圖 22：描繪高珠粒(HB)及低珠粒(LB)濃度對使用 Quanterix Simoa 之示例性總體及活性 FGF21 分析之靈敏度的影響。

【0048】 圖 23：描繪在使用 Quanterix Simoa 之示例性總體及活性 FGF21 分析中使用三種捕獲順磁性珠粒批次偵測總體及活性 FGF21 之靈敏度的比較。

【0049】 圖 24：描繪在使用 Quanterix Simoa 之示例性總 FGF21 分析中使用各種偵測抗體偵測總體及活性 FGF21 之靈敏度的比較。

【0050】 圖 25：描繪使用 Quanterix Simoa 之使用 mAb4 作為捕獲抗體且使用 mAb15 作為偵測抗體之示例性總 FGF21 分析中的鉤狀效應之分析。

【0051】 圖 26：描繪使用示例性總體及活性 FGF21 ELISA 分析偵測來自健康供體之血漿及血清樣品中之總 FGF21 及活性 FGF21。

【0052】 圖 27：描繪使用示例性總體及活性 FGF21 ELISA 分析偵測來自高血壓供體及不使用藥物之供體的經 MS-SAFE 處理之血漿樣品或血漿樣品中之總 FGF21 及活性 FGF21。

【0053】 圖 28A：描繪利用使用 Quanterix Simoa 之示例性總體及活性 FGF21 分析偵測來自健康患者及 2 型糖尿病患者之血漿樣品中之總 FGF21 及活性 FGF21 (第 1 天)。

【0054】 圖 28B：描繪利用使用 Quanterix Simoa 之示例性總體及活性 FGF21 分析偵測來自健康患者及 2 型糖尿病患者之血漿樣品中之總 FGF21 及活性 FGF21 (第 2 天)。

【0055】 圖 29：描繪用於使用 Quanterix Simoa 偵測來自健康患者及 2 型糖尿病患者之血漿樣品中之總 FGF21 及活性 FGF21 的示例性總體及活性 FGF21 分析之再現性。

【0056】 圖 30：描繪用於使用 Quanterix Simoa 偵測來自 2 型糖尿病患者之血漿樣品中之總 FGF21 及活性 FGF21 的示例性總體及活性 FGF21 分析之稀釋線性。

【0057】 圖 31：描繪用於使用 Quanterix Simoa 偵測來自 2 型糖尿病患者之血漿樣品中之總 FGF21 及活性 FGF21 的示例性總體及活性 FGF21 分析中之定量下限(LLOQ)之確定。

【0058】 圖 32：描繪用於使用 Quanterix Simoa 偵測來自 2 型糖尿病患者之血漿樣品中之總 FGF21 及活性 FGF21 的示例性總體及活性 FGF21 分析之特異性。

【0059】 圖 33：描繪利用使用 Quanterix Simoa 之示例性總體及活性 FGF21 分析偵測使用 P800 或 K<sub>2</sub>-EDTA 製備之血漿樣品中之總 FGF21 及活性 FGF21。

【0060】 圖 34：描繪在使用 Quanterix Simoa 之示例性總體及活性 FGF21 分析中在來自 GC29819 研究之 P800 及 K<sub>2</sub>-EDTA 血漿樣品中偵測之總 FGF21 及活性 FGF21 的分析。

【0061】 圖 35：描繪利用使用 Quanterix Simoa 之示例性總 FGF21 分析定量之在 P800 及 K<sub>2</sub>-EDTA 血漿樣品(GC29819 臨床研究)中偵測之總 FGF21 及活性 FGF21 的量之間的相關性。

【0062】 圖 36：描繪利用使用 Quanterix Simoa 之示例性活性 FGF21 分析定量之在 P800 及 K<sub>2</sub>-EDTA 血漿樣品(GC29819 研究)中偵測之總 FGF21 及活性 FGF21 的量之間的相關性。

【0063】 圖 37：描繪利用使用 Quanterix Simoa 之示例性總體及活性 FGF21 分析評估來自 GC29819 研究之 P800 血漿樣品之穩定性。

【0064】 圖 38：描繪含有 10  $\mu\text{g/ml}$  之小鼠或綿羊 IgG 之分析稀釋劑對使用 Quanterix Simoa 的總體及活性分析之影響。

【0065】 圖 39：描繪含有 10  $\mu\text{g/ml}$  之小鼠及綿羊 IgG 之分析稀釋劑對使用 Quanterix Simoa 的總體及活性分析之影響。

【0066】 圖 40：描繪含有 10  $\mu\text{g/ml}$  之小鼠或綿羊 IgG 之分析稀釋劑對使用 Quanterix Simoa 的總體及活性分析之標準曲線之影響。

【0067】 圖 41A：描繪示例性抗 FGF21 抗體之輕鏈可變區之序列。按出現順序分別以 SEQ ID NO: 50、51、52、53、71、70、69 及 68 之形式揭示輕鏈可變區序列。按出現順序分別以 SEQ ID NO: 38、39、40、41、38、39、40 及 41 之形式揭示 CDR-L1 序列；按出現順序分別以 SEQ ID NO: 42、43、44、45、42、43、44 及 45 之形式揭示 CDR-L2 序列；且按出現順序分別以 SEQ ID NO: 46、47、48、49、46、47、48 及 49 之形式揭示 CDR-L3 序列。

【0068】 圖 41B：描繪示例性抗 FGF21 抗體之重鏈可變區之序列。按出現順序分別以 SEQ ID NO: 54、55、56、57、75、74、73 及 72 之形式揭示重鏈可變區序列。按出現順序分別以 SEQ ID NO: 26、27、28、29、26、27、28 及 29 之形式揭示 CDR-H1 序列；按出現順序分別以 SEQ ID NO: 30、31、32、33、30、31、32 及 33 之形式揭示 CDR-H2 序列；且按出現順序分別以 SEQ ID NO: 34、35、36、37、34、35、36 及 37 之形式揭示 CDR-H3 序列。

### 【實施方式】

## 相關申請案之交叉參考

**【0069】** 本申請案主張 2018 年 4 月 4 日申請之美國臨時申請案第 62/652,701 號之權益，該臨時申請案之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

### 序列表

**【0070】** 本申請案含有序列表，其已以 ASCII 格式經由 EFS 網提交且以全文引用之方式併入本文中。該 ASCII 拷貝創建於 2019 年 4 月 2 日，名稱為 00B206\_0809\_SL.txt 且大小為 105,595 位元組。

**【0071】** 為清楚起見，但不限制，將當前所揭示之主題的詳細描述分成以下小節：

- I. 定義；
- II. 免疫分析；
- III. 抗體；
- IV. 套組；及
- V. 示例性實施例。

### I. 定義

**【0072】** 除非另外定義，否則本文中所用之所有技術及科學術語具有熟習本發明所屬技術者通常所理解之含義。以下參考文獻為熟習此項技術者提供本發明中所用之許多術語之一般定義：Singleton 等人, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (第 2 版 1994)；The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker 編, 1988)；The Glossary of Genetics, 第 5 版, R. Rieger 等人 (編), Springer Verlag (1991)；及 Hale 及 Marham, The Harper Collins Dictionary of

Biology (1991)。除非另外指定，否則如本文所用，以下術語具有以下歸屬於它們之含義。

**【0073】** 如本文所用，術語「約」或「大約」可意謂在如由一般熟習此項技術者所確定之特定值的可接受誤差範圍內，其將部分取決於如何量測或測定該值，例如量測系統之限制。舉例而言，「約」可意謂給定值根據實踐在 1 個或大於 1 個標準偏差以內。在本申請案及申請專利範圍中描述特定值之情況下，除非另外說明，否則術語「約」可意謂特定值之可接受誤差範圍，諸如由術語「約」修飾之值 $\pm 10\%$ 。

**【0074】** 如本文中可互換使用之術語「多肽」及「蛋白質」係指任何長度之胺基酸聚合物。聚合物可為直鏈或分枝鏈的，其可包含經修飾之胺基酸，且其可由非胺基酸間斷開。該等術語亦涵蓋已天然地或藉由干預(例如二硫鍵形成、糖基化、脂化、乙醯化、磷酸化或任何其他操縱或修飾(諸如與標記組分接合))加以修飾之胺基酸聚合物。該定義內亦包括例如含有一或多種胺基酸類似物(包括例如非天然胺基酸等)以及此項技術中已知之其他修飾之多肽。如本文所用之術語「多肽」及「蛋白質」特定而言涵蓋抗體。

**【0075】** 除非另外指出，否則如本文所用，術語「纖維母細胞生長因子 21」或「FGF21」係指來自任何脊椎動物來源，包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)之任何天然 FGF21。該術語涵蓋「全長」未加工之 FGF21 以及由細胞中之加工產生之任何形式的 FGF21。除非另外指出，否則該術語亦涵蓋天然存在之 FGF21 變異體，例如剪接變異體或對偶變異體。以下顯示全長人類 FGF21 胺基酸之非限制性實例：

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESELL  
 QLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNV  
 YQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDV  
 GSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 1)。

**【0076】** 如本文所用，術語「總 FGF21」包括未加工形式之 FGF21 以及由細胞加工產生之所有形式的 FGF21，例如 N 端裂解之 FGF21 及 C 端裂解之 FGF21。缺乏十個 C 端胺基酸之人類 FGF21 胺基酸之非限制性實例為：

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESELL  
 QLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNV  
 YQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDV  
 GSSDPLSMVGP (SEQ ID NO: 58)。缺乏 4 個 N 端胺基酸之人類 FGF21 胺基酸之非限制性實例為：

DSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESELLQLK  
 ALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQS  
 EAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSS  
 DPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 59)。舉例而言，但不限制，術語「總 FGF21」包括具有 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 58 或 SEQ ID NO: 59 中所闡述之胺基酸序列的 FGF21 蛋白。

**【0077】** 如本文所用，術語「活性 FGF21」係指保留 C 端片段之 FGF21 蛋白。在某些實施例中，該術語包括經加工形式之 FGF21，諸如其中 FGF21 之 N 端片段(例如 SEQ ID NO: 1 之胺基酸殘基 1-4)已裂解之彼等形式。舉例而言，

但不限制，術語「活性 FGF21」包括具有 SEQ ID NO: 1 中所闡述之胺基酸序列或 SEQ ID NO: 59 中所闡述之胺基酸序列的 FGF21 蛋白。

**【0078】** 術語「抗體」在本文中以廣義使用且涵蓋各種抗體結構，包括但不限於單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及抗體片段，只要其展現所需抗原結合活性即可。

**【0079】** 「抗體片段」係指不是完整抗體之分子，其包含完整抗體中結合與完整抗體結合之抗原的部分。抗體片段之實例包括但不限於 Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>；雙功能抗體；線性抗體；單鏈抗體分子(例如 scFv)；及由抗體片段形成之多特異性抗體。

**【0080】** 「結合相關抗原(例如 FGF21 蛋白)」之抗體為以足夠親和力結合抗原以使得抗體適合作為分析試劑(例如作為捕獲抗體或作為偵測抗體)之抗體。典型地，此類抗體不會顯著地與其他多肽交叉反應。關於多肽結合於目標分子，術語「特異性結合特定多肽或特定多肽靶標上之抗原決定基」或「特異性結合於特定多肽或特定多肽靶標上之抗原決定基」或「對特定多肽或特定多肽靶標上之抗原決定基具特異性」意謂結合可量測地不同於非特異性相互作用。特異性結合可例如藉由測定與對照分子之結合相比目標分子之結合來量測，該對照分子通常為具有類似結構且不具有結合活性之分子。

**【0081】** 術語「抗 FGF21 抗體」係指能夠以足夠親和力結合 FGF21 使得抗體適合作為靶向 FGF21 之藥劑(例如作為本文所描述之分析中的藥劑)的抗體。在某些實施例中，如例如藉由放射免疫分析(RIA)所量測，抗 FGF21 抗體結合於不相關、非 FGF21 蛋白之程度不到該抗體結合於 FGF21 之約 10%。在某些

實施例中，結合於 FGF21 之抗體具有 $\leq 1 \text{ M}$ 、 $\leq 100 \text{ mM}$ 、 $\leq 10 \text{ mM}$ 、 $\leq 1 \text{ mM}$ 、 $\leq 100 \text{ }\mu\text{M}$ 、 $\leq 10 \text{ }\mu\text{M}$ 、 $\leq 1\text{ }\mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$  或 $\leq 0.001 \text{ nM}$  之解離常數( $K_d$ )。在某些實施例中，本文所揭示之結合於 FGF21 之抗體的  $K_d$  可為  $10^{-3} \text{ M}$  或更小或  $10^{-8} \text{ M}$  或更小，例如  $10^{-8} \text{ M}$  至  $10^{-13} \text{ M}$ ，例如  $10^{-9} \text{ M}$  至  $10^{-13} \text{ M}$ 。在某些實施例中，本文所揭示之結合於 FGF21 之抗體的  $K_d$  可為  $10^{-10} \text{ M}$  至  $10^{-13} \text{ M}$ 。在某些實施例中，抗 FGF21 抗體結合於 FGF21 之在來自不同物種之 FGF21 間保守的抗原決定基。

**【0082】** 用於本文目的之「受體人類構架」為包含如下文所定義之衍生自人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之輕鏈可變域(VL)構架或重鏈可變域(VH)構架之胺基酸序列的構架。「衍生自」人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之受體人類構架可包含其相同胺基酸序列，或其可含有胺基酸序列變化。在某些實施例中，胺基酸之數目變化為 10 或更少、9 或更少、8 或更少、7 或更少、6 或更少、5 或更少、4 或更少、3 或更少或 2 或更少。在某些實施例中，VL 受體人類構架之序列與 VL 人類免疫球蛋白構架序列或人類共同構架序列相同。

**【0083】** 「親和力」係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合配偶體(例如抗原)之間的非共價相互作用之總和強度。除非另有指示，否則如本文所用，「結合親和力」係指固有結合親和力，其反映結合對成員(例如抗體及抗原)之間的 1:1 相互作用。分子 X 對其配偶體 Y 之親和力通常可由解離常數( $K_d$ )表示。親和力可藉由此項技術中已知之常用方法來量測，包括本文所描述之彼等方法。用於量測結合親和力之特定說明性及示例性實施例描述於下文中。

【0084】 「親和力成熟」之抗體係指與不具有改變之親本抗體相比在一或多個高變區(CDR)中具有一或多處改變的抗體，此類改變引起抗體對抗原親和力之改良。

【0085】 「抗體與參考抗體競爭結合」係指抗體在競爭分析中將參考抗體與其抗原之結合阻斷 50%或更多，且相反地，參考抗體在競爭分析中將抗體與其抗原之結合阻斷 50%或更多。示例性競爭分析描述於「Antibodies」, Harlow 及 Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY)中。

【0086】 如本文所用，「捕獲抗體」係指特異性結合樣品中之目標分子(例如一種形式之 FGF21)的抗體。在某些條件下，捕獲抗體與目標分子形成複合物使得抗體-靶標分子複合物可與樣品之其餘部分分離。在某些實施例中，此類分離可包括洗掉樣品中不結合捕獲抗體之物質或材料。在某些實施例中，捕獲抗體可附接至固體支撐物表面，諸如但不限於板或珠粒，例如順磁性珠粒。

【0087】 如本文所用，「偵測抗體」係指特異性結合樣品中或樣品-捕獲抗體組合物中之目標分子的抗體。在某些條件下，偵測抗體與目標分子或與目標分子-捕獲抗體複合物形成複合物。偵測抗體能夠直接通過可經擴增之標記或間接地例如通過使用經標記且結合偵測抗體之另一抗體來偵測。對於直接標記，偵測抗體典型地接合至可藉由一些手段偵測之例如包括但不限於生物素或鈎之部分。

【0088】 術語「嵌合」抗體係指重鏈及/或輕鏈之一部分衍生自特定來源或物種，而重鏈及/或輕鏈之其餘部分衍生自不同來源或物種的抗體。

【0089】 抗體之「類別」係指其重鏈所具有之恆定域或恆定區的類型。存在五種主要類別之抗體：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且此等類別中之若干可進一步劃分成諸多個子類(同型)，例如 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>及IgA<sub>2</sub>。對應於不同類別之免疫球蛋白的重鏈恆定域分別稱為 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 及 $\mu$ 。

【0090】 如本文所用之術語「細胞毒性劑」係指抑制或阻止細胞功能及/或引起細胞死亡或破壞之物質。細胞毒性劑包括但不限於放射性同位素(例如 At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、P<sup>32</sup>、Pb<sup>212</sup>及Lu之放射性同位素)；化學治療劑或藥物(例如胺甲喋呤、亞德里亞黴素(adriamycin)、長春花生物鹼(長春新鹼、長春花鹼、依託泊苷(etoposide))、阿黴素(doxorubicin)、美法侖(melphalan)、絲裂黴素 C、氮芥苯丁酸、道諾黴素(daunorubicin)或其他插入劑)；生長抑制劑；酶及其片段，諸如溶核酶；抗生素；毒素，諸如細菌、真菌、植物或動物來源之小分子毒素或酶促活性毒素，包括其片段及/或其變異體；及下文揭示之各種抗腫瘤或抗癌劑。

【0091】 「效應功能」係指可歸因於抗體之 Fc 區的彼等生物活性，其隨抗體同型而變化。抗體效應功能之實例包括：C1q 結合及補體依賴性細胞毒性(CDC)；Fc 受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；噬菌作用；細胞表面受體(例如 B 細胞受體)之下調；及 B 細胞活化。

【0092】 術語「Fc 區」在本文中用於定義免疫球蛋白重鏈之 C 端區，其含有恆定區之至少一部分。該術語包括天然序列 Fc 區及變異體 Fc 區。在某些實施例中，人類 IgG 重鏈 Fc 區自 Cys226 或自 Pro230 延伸至重鏈之羧基端。然而，Fc 區之 C 端離胺酸(Lys447)可能存在或可能不存在。除非本文中另外指明，否

則 Fc 區或恆定區中之胺基酸殘基的編號係如 Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所描述, 根據 EU 編號系統(亦稱為 EU 索引)來進行。

**【0093】** 「構架」或「FR」係指除高變區(CDR)殘基外之可變域殘基。可變域之 FR 通常由四個 FR 域組成: FR1、FR2、FR3 及 FR4。因此, CDR 及 FR 序列通常按以下順序出現在 VH (或 VL)中: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

**【0094】** 術語「全長抗體」、「完整抗體」及「全抗體」在本文中可互換地用於指具有實質上類似於天然抗體結構之結構或具有含有如本文所定義之 Fc 區的重鏈之抗體。

**【0095】** 「人類抗體」為具有如下胺基酸序列之抗體, 該胺基酸序列對應於由人類或人類細胞產生或衍生自非人類來源之抗體的胺基酸序列, 該非人類來源利用人類抗體譜或其他人類抗體編碼序列。此人類抗體定義特定地排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

**【0096】** 「人類共同構架」為代表在人類免疫球蛋白 VL 或 VH 構架序列之選擇中最常出現之胺基酸殘基的構架。通常, 人類免疫球蛋白 VL 或 VH 序列之選擇係來自可變域序列之亞群。通常, 序列亞群為如 Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), 第 1-3 卷中之亞群。在某些實施例中, 對於 VL, 該亞群為如 Kabat

等人，同上中之亞群  $\kappa$  I。在某些實施例中，對於 VH，該亞群為如 Kabat 等人，同上中之亞群 III。

**【0097】** 「人類化」抗體係指包含來自非人類 CDR 之胺基酸殘基及來自人類 FR 之胺基酸殘基的嵌合抗體。在某些實施例中，人類化抗體將包含至少一個(且典型地兩個)可變域的實質上全部，其中所有或實質上所有 CDR (例如 CDR)對應於非人類抗體之彼等 HVR，且所有或實質上所有 FR 對應於人類抗體之彼等 FR。人類化抗體視情況可包含衍生自人類抗體之抗體恆定區的至少一部分。抗體(例如非人類抗體)之「人類化形式」係指已經歷人類化之抗體。

**【0098】** 如本文所用，術語「高變區」或「CDR」係指抗體可變域中序列高度可變(本文中亦稱為「互補決定區」或「CDR」)及/或形成結構確定之環(「高變環」)及/或含有抗原接觸殘基(「抗原接點」)之區域中的每一者。除非另外指出，否則可變域中之 CDR 殘基及其他殘基(例如 FR 殘基)在本文中係根據 Kabat 等人，同上來編號。通常，抗體包含六個 CDR：三個在 VH 中(H1、H2、H3)，且三個在 VL 中(L1、L2、L3)。本文中之示例性 CDR 包括：

- (a) 存在於胺基酸殘基 26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)及 96-101 (H3)處之高變環(Chothia 及 Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))；
- (b) 存在於胺基酸殘基 24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2)及 95-102 (H3)處之 CDR (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))；

(c) 存在於胺基酸殘基 27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2)及 93-101 (H3)處之抗原接點(MacCallum 等人 J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))；及

(d) (a)、(b)及/或(c)之組合，包括 CDR 胺基酸殘基 46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3)及 94-102 (H3)。

**【0099】** 「免疫接合物」係指抗體接合至一或多個異源分子，包括但不限於細胞毒性劑。

**【0100】** 「經分離」之抗體為已與天然環境之組分分離的抗體。在某些實施例中，如藉由例如電泳(例如 SDS-PAGE、等電聚焦(IEF)、毛細管電泳)或層析(例如離子交換或逆相 HPLC)所測定，將抗體純化至大於 95%或 99%之純度。關於用於評估抗體純度之方法的綜述，參見例如 Flatman 等人, J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)。

**【0101】** 「經分離」之核酸係指已與天然環境之組分分離之核酸分子。經分離之核酸包括如下細胞中所含之核酸分子，該等細胞通常含有該核酸分子，但該核酸分子存在於染色體外或不同於其天然染色體位置之染色體位置。

**【0102】** 「編碼抗體(包括提及特異性抗體，例如抗 FGF21 抗體)之經分離之核酸」係指編碼抗體重鏈及輕鏈(或其片段)之一或多個核酸分子，包括單一載體或分開之載體中的此類核酸分子，及存在於宿主細胞中之一或多個位置的此類核酸分子。

【0103】 如本文所用，術語「單株抗體」係指獲自實質上均質之抗體群體(亦即構成群體之個別抗體為相同的及/或結合相同抗原決定基)的抗體，除了例如含有天然存在之突變或在單株抗體製劑之製備期間出現之可能的變異體抗體，此類變異體通常以微小量存在。與典型地包括針對不同決定位(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑相比之下，單株抗體製劑之各單株抗體係針對抗原上之單一決定位。因此，修飾語「單株」指示抗體之特徵為獲自實質上均質之抗體群體，且不應視為需要藉由任何特定方法來產生抗體。舉例而言，要根據目前揭示之主題使用之單株抗體可藉由多種技術來製備，包括但不限於雜交瘤法、重組 DNA 法、噬菌體展示法及利用含有全部或部分之人類免疫球蛋白基因座之基因轉殖動物的方法，此類方法及用於製備單株抗體之其他示例性方法描述於本文中。

【0104】 「裸抗體」係指未接合至異源部分(例如細胞毒性部分)或放射性標記之抗體。裸抗體可存在於醫藥調配物中。

【0105】 「天然抗體」係指具有不同結構之天然存在之免疫球蛋白分子。舉例而言，天然 IgG 抗體為約 150,000 道耳頓(dalton)之雜四聚醣蛋白，其由二硫鍵鍵結之兩個相同輕鏈及兩個相同重鏈組成。自 N 端至 C 端，各重鏈具有可變區(VH)，亦稱為可變重結構域或重鏈可變域，隨後為三個恆定域(CH1、CH2 及 CH3)。類似地，自 N 端至 C 端，各輕鏈具有可變區(VL)，亦稱為可變輕結構域或輕鏈可變域，隨後為恆定輕(CL)結構域。抗體之輕鏈可基於其恆定域之胺基酸序列分配至稱為  $\kappa$  及  $\lambda$  之兩種類型中之一者。

【0106】如本文所用，「經純化」之多肽(例如抗體)係指多肽之純度已增加，使得其以與其存在於其天然環境中及/或當最初在實驗室條件下合成及/或擴增時相比更純之形式存在。純度為相對項且不一定意謂絕對純度。

【0107】如本文所用，術語「包裝插頁」係指照例包括於商業包裝中且含有關於包裝組分之使用之資訊的說明書。

【0108】相對於參考多肽序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為在比對序列且在必要時引入間隙以實現最大序列一致性百分比之後，在候選序列中與參考多肽序列中之胺基酸殘基相同的胺基酸殘基之百分比，並且不將任何保守取代視為序列一致性之一部分。出於測定胺基酸序列一致性百分比之目的而進行比對可以此項技術內之各種方式來達成，例如使用公共可獲得之電腦軟體，諸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR)軟體。熟習此項技術者可確定用於比對序列之適當參數，包括在所比較之序列的整個長度上達成最大比對所需之任何算法。然而，出於本文之目的，使用序列比較電腦程式 ALIGN-2 來產生胺基酸序列一致性%值。ALIGN-2 序列比較電腦程式由 Genentech, Inc.創作，且源代碼已與用戶文檔一起提交給美國版權局(U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559)，其登記在美國版權登記號 TXU510087 下。ALIGN-2 程式為自 Genentech, Inc., South San Francisco, California 公共可獲得的，或可由源代碼編譯而來。ALIGN-2 程式應經編譯用於在 UNIX 作業系統，包括數位 UNIX V4.0D 上使用。所有序列比較參數係藉由 ALIGN-2 程式設定且不改變。

**【0109】** 在採用 ALIGN-2 進行胺基酸序列比較之情況中，給定胺基酸序列 A 對、與或相對於給定胺基酸序列 B 之胺基酸序列一致性%(其可替代地用片語表述為給定胺基酸序列 A 對、與或相對於給定胺基酸序列 B 具有或包含某一胺基酸序列一致性%)係如下計算：

$$100 \times \text{分數 } X/Y$$

其中 X 為在序列比對程式 ALIGN-2 之 A 與 B 之比對中由該程式評為一致匹配之胺基酸殘基的數目，且其中 Y 為 B 中之胺基酸殘基的總數目。應瞭解，在胺基酸序列 A 之長度與胺基酸序列 B 之長度不同的情況下，A 對 B 之胺基酸序列一致性%與 B 對 A 之胺基酸序列一致性%將不相等。除非另外特別陳述，否則本文中所有胺基酸序列一致性%值係如前一段落中所描述使用 ALIGN-2 電腦程式獲得。

**【0110】** 術語「可變區」或「可變域」係指抗體重鏈或輕鏈中參與抗體與抗原之結合的結構域。天然抗體之重鏈及輕鏈之可變域(分別為 VH 及 VL)通常具有類似結構，各結構域包含四個保守構架區(FR)及三個高變區(CDR)。(參見例如 Kindt 等人 Kuby Immunology, 第 6 版, W.H. Freeman and Co., 第 91 頁(2007)。) 單一 VH 或 VL 結構域可足以賦予抗原結合特異性。此外，結合特定抗原之抗體可使用來自結合該抗原之抗體的 VH 或 VL 結構域分別篩選互補 VL 或 VH 結構域之文庫而加以分離。參見例如 Portolano 等人, J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson 等人, Nature 352:624-628 (1991)。

**【0111】** 如本文中可互換使用之術語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及「宿主細胞培養物」係指已向其中引入外源性核酸之細胞，包括此類細胞之子代。

宿主細胞包括「轉型體」及「轉型細胞」，其包括原代轉型細胞及由其衍生之子代，不考慮代數。子代之核酸內容可不與親本細胞完全相同，而是可含有突變。本文中包括具有與在最初轉型之細胞中所篩選或選擇相同之功能或生物活性的突變體子代。

**【0112】** 如本文所用，術語「載體」係指能夠使與其連接之另一核酸增殖之核酸分子。該術語包括作為自我重複核酸結構之載體以及併入其已引入之宿主細胞的基因組中之載體。某些載體能夠引導與其可操作地連接之核酸的表現。此類載體在本文中稱為「表現載體」。

**【0113】** 如本文所用，術語「標記」或「可偵測標記」係指可連接至所要偵測或定量之物質(例如抗體)的任何化學基團或部分。標記為適合於物質之靈敏偵測或定量的可偵測標記。可偵測標記之非限制性實例包括但不限於冷光標記(例如螢光、磷光、化學冷光、生物冷光及電化學冷光標記)、放射性標記、酶、粒子、磁性物質、電活性物質及類似物。或者，可偵測標記可藉由參與特定結合反應指示其存在。此類標記之非限制性實例包括半抗原、抗體、生物素、鏈黴親和素、his-標籤、氨基三乙酸、麩胱甘肽 S-轉移酶、麩胱甘肽及類似物。

**【0114】** 如本文所用，術語「偵測手段」係指用於通過接著在分析中讀出之信號報導來偵測可偵測抗體之存在的部分或技術。典型地，偵測手段採用試劑，例如偵測劑，其擴增經固定之標記，諸如捕獲至微量滴定板上之標記，例如親和素、鏈黴親和素-HRP 或鏈黴親和素-β-D-半乳糖。

【0115】 本文中使用的術語「偵測」來包括目標分子(例如 FGF21 或其經加工之形式)之定性與定量量測兩者。在某些實施例中，偵測包括鑑定樣品中僅僅是存在目標分子以及確定目標分子是否以可偵測水準存在於樣品中。

【0116】 如本文中可互換使用之「個體(individual/subject)」為哺乳動物。哺乳動物包括但不限於馴養動物(例如牛、綿羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如人類及非人類靈長類動物，諸如猴)、兔及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)。在某些實施例中，個體(individual/subject)為人類。

【0117】 如本文所用，「樣品」係指較大量之材料中的一小部分。在某些實施例中，樣品包括但不限於培養物中之細胞、細胞上清液、細胞溶解產物、血清、血漿、生物流體(例如血液、血漿、血清、糞便、尿液、淋巴液、腹水、乳管灌洗液、唾液及腦脊髓液)及組織樣品。樣品之來源可為實體組織(例如來自新鮮、冷凍及/或保存之器官、組織樣品、活組織切片或吸出物)、血液或任何血液組成、體液(諸如尿液、淋巴液、腦脊髓液、羊水、腹膜液或間隙液)或來自個體之細胞，包括循環細胞。

## II. 免疫分析

【0118】 當前所揭示之主題提供偵測及定量 FGF21 蛋白之方法。在某些實施例中，本發明提供用於測定樣品中之總 FGF21 及/或活性 FGF21 蛋白之量的免疫分析。本發明進一步提供用於測定樣品中活性 FGF21 蛋白與總 FGF21 蛋白之比率的免疫分析方法。在某些實施例中，本發明之免疫分析方法使用本文所揭示之抗 FGF21 抗體。用於當前所揭示之方法中的抗 FGF21 抗體之非限制性實例提供於表 8-13 及 16-19 中。

【0119】 在某些實施例中，本發明提供用於偵測及定量人類 FGF21 蛋白之免疫分析方法。舉例而言，該等免疫分析方法可用於偵測及定量樣品中之 FGF21，例如總人類 FGF21 及/或活性人類 FGF21 蛋白。本發明之免疫分析方法可併有此項技術中已知之策略，包括但不限於夾心分析、酶聯免疫吸附分析 (ELISA) 分析、數位形式之 ELISA、電化學分析 (ECL) 及磁性免疫分析。在某些實施例中，免疫分析方法為單分子免疫分析，例如使用單分子陣列。舉例而言，但不限制，免疫分析方法可使用 Quanterix 儀器(例如 Simoa HD-1 Analyzer™) 來進行。

【0120】 在某些實施例中，本發明之方法包括使獲自個體之樣品與捕獲抗 FGF21 抗體(諸如本文所描述之彼等抗體)在允許捕獲抗 FGF21 抗體與樣品中之 FGF21 蛋白結合的條件下接觸。舉例而言，但不限制，可將樣品與結合於存在於 FGF21 上之抗原決定基之捕獲抗體一起孵育，以產生樣品-捕獲抗體組合物質。孵育樣品及捕獲抗體之條件可經選擇以使分析之靈敏度最大化及/或使解離最小化，並且確保存在於樣品中之 FGF21 蛋白結合於捕獲抗體。

【0121】 在某些實施例中，用於本文所揭示之免疫分析方法中之捕獲抗體可以約 0.1  $\mu\text{g/ml}$  至約 5.0  $\mu\text{g/ml}$  之濃度使用。舉例而言，但不限制，捕獲抗體可按以下濃度使用：約 0.1  $\mu\text{g/ml}$  至約 0.5  $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.1  $\mu\text{g/ml}$  至約 1.0  $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.1  $\mu\text{g/ml}$  至約 1.5  $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.1  $\mu\text{g/ml}$  至約 2.0  $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.1  $\mu\text{g/ml}$  至約 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.1  $\mu\text{g/ml}$  至約 3.0  $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.1  $\mu\text{g/ml}$  至約 3.5  $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.1  $\mu\text{g/ml}$  至約 4.0  $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.1  $\mu\text{g/ml}$  至約 4.5  $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.5  $\mu\text{g/ml}$  至約 5.0  $\mu\text{g/ml}$ 、約 1.0  $\mu\text{g/ml}$  至約 5.0  $\mu\text{g/ml}$ 、約 1.5  $\mu\text{g/ml}$  至約 5.0  $\mu\text{g/ml}$ 、約 2.0  $\mu\text{g/ml}$  至約 5.0

$\mu\text{g/ml}$ 、約  $2.5 \mu\text{g/ml}$  至約  $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $3.0 \mu\text{g/ml}$  至約  $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $3.5 \mu\text{g/ml}$  至約  $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $4.0 \mu\text{g/ml}$  至約  $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $4.5 \mu\text{g/ml}$  至約  $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $0.5 \mu\text{g/ml}$  至約  $2.0 \mu\text{g/ml}$  或約  $0.5 \mu\text{g/ml}$  至約  $1.0 \mu\text{g/ml}$ ，例如約  $0.5 \mu\text{g/ml}$ 。

**【0122】** 在某些實施例中，捕獲抗體可於塗佈緩衝液中稀釋。塗佈緩衝液之非限制性實例包括 PBS、碳酸鹽緩衝液、碳酸氫鹽緩衝劑或其組合。在某些實施例中，塗佈緩衝液為碳酸氫鈉。在某些實施例中，塗佈緩衝液為 PBS。在某些實施例中，塗佈緩衝液可以約  $10 \text{ mM}$  至約  $1 \text{ M}$  之濃度使用。舉例而言，但不限制，塗佈緩衝液可按以下濃度使用：約  $10 \text{ mM}$  至約  $100 \text{ mM}$ 、約  $10 \text{ mM}$  至約  $200 \text{ mM}$ 、約  $10 \text{ mM}$  至約  $300 \text{ mM}$ 、約  $10 \text{ mM}$  至約  $400 \text{ mM}$ 、約  $10 \text{ mM}$  至約  $500 \text{ mM}$ 、約  $10 \text{ mM}$  至約  $600 \text{ mM}$ 、約  $10 \text{ mM}$  至約  $700 \text{ mM}$ 、約  $10 \text{ mM}$  至約  $800 \text{ mM}$ 、約  $10 \text{ mM}$  至約  $900 \text{ mM}$ 、約  $100 \text{ mM}$  至約  $1 \text{ M}$ 、約  $200 \text{ mM}$  至約  $1 \text{ M}$ 、約  $300 \text{ mM}$  至約  $1 \text{ M}$ 、約  $400 \text{ mM}$  至約  $1 \text{ M}$ 、約  $500 \text{ mM}$  至約  $1 \text{ M}$ 、約  $600 \text{ mM}$  至約  $1 \text{ M}$ 、約  $700 \text{ mM}$  至約  $1 \text{ M}$ 、約  $800 \text{ mM}$  至約  $1 \text{ M}$  或約  $900 \text{ mM}$  至約  $1 \text{ M}$ 。

**【0123】** 如本文所用，捕獲抗體可固定於固相上。舉例而言，但不限制，固相可為適用於免疫計量分析之任何惰性支撐物或載體，包括呈例如表面、粒子、多孔基質、珠粒及類似形式之形式的支撐物。常用支撐物之非限制性實例包括小薄片、SEPHADEX®、凝膠、聚氯乙烯、塑膠珠粒及由聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯及類似物製造之分析板或試管，包括 96 孔微量滴定板，以及微粒材料，諸如濾紙、瓊脂糖、交聯右旋糖酐及其他多醣。在某些實施例中，用於固定之固相可為珠粒。舉例而言，但不限制，本文揭示之捕獲抗體係固定至順磁性珠

粒。在某些實施例中，經固定之捕獲抗體係塗佈於可用於一次分析若干樣品之微量滴定板上。

【0124】 在某些實施例中，偶合至捕獲抗體之順磁性珠粒可按以下濃度使用：每毫升約  $0.1 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $10.0 \times 10^7$  個珠粒，例如每毫升約  $0.1 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $0.5 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $0.1 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $1.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $0.1 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $2.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $0.1 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $3.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $0.1 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $4.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $0.1 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $5.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $0.1 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $6.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $0.1 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $7.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $0.1 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $8.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $0.1 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $9.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $0.5 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $10.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $1.0 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $10.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $2.0 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $10.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $3.0 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $10.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $4.0 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $10.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $5.0 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $10.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $6.0 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $10.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $7.0 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $10.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $8.0 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $10.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $9.0 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $10.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $0.5 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $1.0 \times 10^7$  個珠粒、每毫升約  $0.5 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $2.0 \times 10^7$  個珠粒或每毫升約  $0.5 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $3.0 \times 10^7$  個珠粒。在某些實施例中，順磁性珠粒可以每毫升約  $0.5 \times 10^7$  個珠粒至每毫升

約  $2.0 \times 10^7$  個珠粒之濃度使用。在某些實施例中，順磁性珠粒可以每毫升約  $1.0 \times 10^7$  個珠粒，例如每毫升約  $1.22 \times 10^7$  個珠粒之濃度使用，或以每毫升約  $0.5 \times 10^7$  個珠粒，例如每毫升約  $0.59 \times 10^7$  個珠粒之濃度使用。

**【0125】** 本文所揭示之免疫分析方法可進一步包括使樣品-捕獲抗體組合物質與偵測抗體接觸。在某些實施例中，偵測抗體結合於存在於 FGF21 上之抗原決定基。在某些實施例中，偵測抗體結合於存在於樣品-捕獲抗體組合物質上但在不存在 FGF21 之情況下不存在於捕獲抗體上之抗原決定基。在某些實施例中，隨後使用針對偵測抗體之偵測手段(例如一或多種偵測劑)量測或定量結合於樣品-捕獲抗體組合之偵測抗體，以測定由偵測抗體結合之 FGF21 蛋白(例如總 FGF21 或活性 FGF21 蛋白)之量。

**【0126】** 在某些實施例中，偵測抗體可以約  $0.1 \mu\text{g/ml}$  至約  $5.0 \mu\text{g/ml}$  之濃度使用。舉例而言，但不限制，偵測抗體可按以下濃度使用：約  $0.1 \mu\text{g/ml}$  至約  $0.5 \mu\text{g/ml}$ 、約  $0.1 \mu\text{g/ml}$  至約  $1.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $0.1 \mu\text{g/ml}$  至約  $1.5 \mu\text{g/ml}$ 、約  $0.1 \mu\text{g/ml}$  至約  $2.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $0.1 \mu\text{g/ml}$  至約  $2.5 \mu\text{g/ml}$ 、約  $0.1 \mu\text{g/ml}$  至約  $3.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $0.1 \mu\text{g/ml}$  至約  $3.5 \mu\text{g/ml}$ 、約  $0.1 \mu\text{g/ml}$  至約  $4.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $0.1 \mu\text{g/ml}$  至約  $4.5 \mu\text{g/ml}$ 、約  $0.5 \mu\text{g/ml}$  至約  $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $1.0 \mu\text{g/ml}$  至約  $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $1.5 \mu\text{g/ml}$  至約  $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $2.0 \mu\text{g/ml}$  至約  $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $2.5 \mu\text{g/ml}$  至約  $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $3.0 \mu\text{g/ml}$  至約  $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $3.5 \mu\text{g/ml}$  至約  $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $4.0 \mu\text{g/ml}$  至約  $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $4.5 \mu\text{g/ml}$  至約  $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $1.0 \mu\text{g/ml}$  至約  $3.0 \mu\text{g/ml}$ 、約  $0.5 \mu\text{g/ml}$  至約  $3.0 \mu\text{g/ml}$  或約  $0.5 \mu\text{g/ml}$  至約  $2.0 \mu\text{g/ml}$ 。在某些實施例中，用於偵測總 FGF21 蛋白之免疫分析可以約  $0.1 \mu\text{g/ml}$  至約  $1.0 \mu\text{g/ml}$ ，例如約  $0.4 \mu\text{g/ml}$  或約

0.8  $\mu\text{g/ml}$  之間的濃度使用偵測抗體。在某些實施例中，用於偵測活性 FGF21 蛋白之免疫分析可以約 1.0  $\mu\text{g/ml}$  至約 3.0  $\mu\text{g/ml}$ ，例如約 1.1  $\mu\text{g/ml}$  或約 2.1  $\mu\text{g/ml}$  之間的濃度使用偵測抗體。

**【0127】** 在某些實施例中，用於所揭示之方法中的抗 FGF21 抗體可經標記。標記包括但不限於直接偵測之標記或部分，諸如螢光、發色、電子緻密、化學冷光及放射性標記，以及例如通過酶反應或分子間相互作用間接偵測之部分，諸如酶或配位體。標記之非限制性實例包括放射性同位素  $^{32}\text{P}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$  及  $^{131}\text{I}$ ；螢光團，諸如稀土螯合物或螢光素及其衍生物；羅丹明及其衍生物；丹醯；傘形酮；螢光素酶，例如螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶(參見美國專利第 4,737,456 號)；螢光素；2,3-二氫酞嗪二酮；辣根過氧化酶(HRP)；鹼性磷酸酶； $\beta$ -半乳糖苷酶；葡糖澱粉酶；溶菌酶；醣氧化酶，例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶；雜環氧化酶，諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶，其與採用過氧化氫氧化染料前驅體之酶(諸如 HRP、乳過氧化物酶或微過氧化酶)偶合；生物素/親和素；自旋標記；噬菌體標記；穩定自由基；及類似物。在某些實施例中，偵測抗體經生物素標記，例如偵測抗體接合至生物素。

**【0128】** 在某些實施例中，用於生物素化偵測抗體之偵測劑為親和素、鏈黴親和素-HRP 或鏈黴親和素- $\beta$ -D-半乳哌喃糖(SBG)。在某些實施例中，偵測劑之讀出為螢光或比色的。舉例而言，但不限制，四甲基聯苯胺及過氧化氫可用作讀出。在某些實施例中，若偵測劑為鏈黴親和素-HRP，則藉由使用四甲基聯苯胺及過氧化氫讀出可為比色的。或者，在某些實施例中，試鹵靈  $\beta$ -D-半乳哌喃

糖苷可用作讀出。舉例而言，但不限制，若偵測劑為 SBG，則藉由使用試鹵靈  $\beta$ -D-半乳哌喃糖苷讀出可為螢光的。

【0129】 在某些實施例中，偵測劑(例如 SBG)可以約 50 至約 500 pM 之濃度使用。舉例而言，但不限制，偵測劑可按以下濃度使用：約 50 至約 100 pM、約 50 至約 150 pM、約 50 至約 200 pM、約 50 至約 250 pM、約 50 至約 300 pM、約 50 至約 350 pM、約 50 至約 400 pM、約 50 至約 450 pM、約 100 至約 500 pM、約 150 至約 500 pM、約 200 至約 500 pM、約 250 至約 500 pM、約 300 至約 500 pM、約 350 至約 500 pM、約 400 至約 500 pM、約 450 至約 500 pM、約 100 至約 400 pM 或約 200 至約 400 pM。在某些實施例中，偵測劑可以約 100 pM 至約 400 pM 之濃度使用，例如 SBG 可以約 110 pM、約 155 pM 或約 310 pM 之濃度使用。在某些實施例中，SBG 係以約 310 pM 之濃度使用。在某些實施例中，偵測劑(例如 HRP)可以約 1/10 至約 1/1000 之稀釋度使用。舉例而言，但不限制，偵測劑可按以下稀釋度使用：約 1/10 至約 1/100、約 1/10 至約 1/500、約 1/100 至約 1/1000 或約 1/500 至約 1/1000。在某些實施例中，偵測劑可以約 1/100 至約 1/1000 之稀釋度使用，例如 HRP 可以約 1/100 或約 1/500 之稀釋度使用。

【0130】 在某些實施例中，本發明之方法可包括用阻斷緩衝液阻斷捕獲抗體。在某些實施例中，阻斷緩衝液可包括 PBS、牛血清白蛋白(BSA)及/或抗微生物劑，例如 ProClin™ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)。在某些實施例中，該方法可包括多個洗滌步驟。在某些實施例中，用於洗滌之溶液通常為緩衝液(例如「洗滌緩衝液」)，諸如但不限於包括洗滌劑(例如 Tween 20)之 PBS 緩衝液。

舉例而言，但不限制，可在阻斷之後洗滌捕獲抗體及/或可例如藉由洗滌將樣品與捕獲抗體分離以移除未捕獲之材料。

**【0131】** 在某些實施例中，本發明之免疫分析方法可用於例如藉由偵測全長及經加工形式之 FGF21 來偵測樣品中之總 FGF21 蛋白的量。舉例而言，但不限制，用於偵測總 FGF21 蛋白之免疫分析方法可使用結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 (例如 SEQ ID NO: 1 之胺基酸殘基 5-172)內的抗原決定基之一或多種抗體。在某些實施例中，捕獲抗體為結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的抗體且偵測抗體為結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的抗體。在某些實施例中，捕獲抗體與偵測抗體為相同抗體，而在其他實施例中，捕獲抗體與偵測抗體為不同抗體，但兩者均結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基。在某些實施例中，捕獲抗體及偵測抗體結合於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之不同抗原決定基。舉例而言，但不限制，捕獲抗體及偵測抗體結合於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內不重疊之抗原決定基。在某些實施例中，捕獲抗體及偵測抗體結合於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內部分重疊之抗原決定基。

**【0132】** 在某些實施例中，用於測定樣品中之總 FGF21 蛋白之量的免疫分析可包括(a)使結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的捕獲抗體與樣品接觸，以產生樣品-捕獲抗體組合物質；(b)使樣品-捕獲抗體組合物質與結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的偵測抗體接觸；(c)偵測結合於樣品-捕獲抗體組合物質之偵測抗體；及(d)基於所結合之偵測抗體之水準計算存在於樣品中的總 FGF21 蛋白之量。

**【0133】** 在某些實施例中，本發明之免疫分析方法可用於例如藉由偵測保留 C 端片段之 FGF21 蛋白來偵測樣品中之活性 FGF21 蛋白的量。在某些實施例中，用於偵測總 FGF21 蛋白之免疫分析方法可使用結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 (例如 SEQ ID NO: 1 之胺基酸殘基 173-182)內之抗原決定基的一或多種抗體，及結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的一或多種抗體。舉例而言，但不限制，用於偵測活性 FGF21 蛋白之量的免疫分析方法可使用結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的捕獲抗體及結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 內之抗原決定基的偵測抗體。在某些實施例中，結合於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 之偵測抗體可為來自 Epitope Diagnostics, Inc., San Diego, CA、以目錄號 31002 出售之抗 FGF21 抗體。在某些實施例中，結合於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 之偵測抗體可為來自 Epitope Diagnostics, Inc., San Diego, CA、以目錄號 30661 出售之抗 FGF21 抗體。在某些實施例中，用於測定樣品中之活性 FGF21 蛋白之量的免疫分析方法可包括(a)使結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的捕獲抗體與樣品接觸，以產生樣品-捕獲抗體組合物質；(b)使樣品-捕獲抗體組合物質與結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 內之抗原決定基的偵測抗體接觸；(c)偵測結合於樣品-捕獲抗體組合物質之偵測抗體；及(d)基於所結合之偵測抗體之水準計算存在於樣品中的活性 FGF21 蛋白之量。

**【0134】** 本發明進一步提供用於測定樣品中活性 FGF21 蛋白與總 FGF21 蛋白之比率的免疫分析方法。舉例而言，但不限制，此類方法可涉及將用於偵測總 FGF21 蛋白之免疫分析與用於偵測活性 FGF21 蛋白之免疫分析組合。在某

些實施例中，用於測定樣品中活性 FGF21 蛋白與總 FGF21 蛋白之比率的免疫分析方法可包括(a) (i)使結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的第一捕獲抗體與樣品接觸，以產生第一樣品-捕獲抗體組合物質；(ii)使第一樣品-捕獲抗體組合物質與結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的第一偵測抗體接觸；(iii)偵測結合於樣品-捕獲抗體組合物質之第一偵測抗體；及(iv)基於所結合之第一偵測抗體之水準計算存在於樣品中的總 FGF21 蛋白之量；及(b) (i)使結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的第二捕獲抗體與樣品接觸，以產生第二樣品-捕獲抗體組合物質；(ii)使第二樣品-捕獲抗體組合物質與結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 內之抗原決定基的第二偵測抗體接觸；(iii)偵測結合於樣品-捕獲抗體組合物質之第二偵測抗體；及(iv)基於所結合之第二偵測抗體之水準計算存在於樣品中的活性 FGF21 蛋白之量。該方法可進一步包括將如藉由步驟(a)所測定之總 FGF21 蛋白的量與如藉由步驟(b)所測定之活性 FGF21 蛋白的量相比較，以確定樣品中活性 FGF21 蛋白與總 FGF21 蛋白之比率。在某些實施例中，第一捕獲抗體與第二捕獲抗體為相同抗體。或者，在某些實施例中，第一捕獲抗體與第二捕獲抗體為不同抗體，但兩者均結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基。在某些實施例中，第一捕獲抗體及第一偵測抗體結合於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之不同抗原決定基。舉例而言，但不限制，第一捕獲抗體及第一偵測抗體結合於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內不重疊之抗原決定基。在某些實施例中，第一捕獲抗體及第一偵測抗體結合於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內部分重疊之抗原決定基。

**【0135】** 在某些實施例中，本文所揭示之免疫分析方法具有約 2 pg/ml 至約 20 pg/ml 之偵測靈敏度(例如孔內靈敏度)。舉例而言，但不限制，本文所揭示之免疫分析具有以下靈敏度：約 2 pg/ml 至約 3 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 4 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 5 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 6 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 7 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 8 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 10 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 11 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 12 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 13 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 14 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 15 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 16 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 17 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 18 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 19 pg/ml、約 3 pg/ml 至約 15 pg/ml、約 3 pg/ml 至約 10 pg/ml 或約 3 pg/ml 至約 5 pg/ml。在某些實施例中，本文所揭示之免疫分析具有約 2 pg/ml 或更大、1 pg/ml 或更大或 0.5 pg/ml 或更大之靈敏度。在某些實施例中，本文所揭示之免疫分析具有約 0.2 pg/ml 至約 2.0 pg/ml (例如約 0.2 pg/ml 至約 0.5 pg/ml、約 0.2 pg/ml 至約 1.0 pg/ml 或約 0.2 pg/ml 至約 1.5 pg/ml)之偵測靈敏度(例如孔內靈敏度)。舉例而言，但不限制，本文所揭示之免疫分析(例如使用 Simoa HD-1 Analyzer™之單分子免疫分析)具有約 0.2 pg/ml 至約 0.5 pg/ml 之靈敏度(例如孔內靈敏度)。

**【0136】** 藉由本發明之免疫分析方法分析之樣品可為臨床樣品、培養物中之細胞、細胞上清液、細胞溶解產物、血清樣品、血漿樣品、其他生物流體(例如淋巴液)樣品或組織樣品。在某些實施例中，樣品之來源可為實體組織(例如來自新鮮、冷凍及/或保存之器官、組織樣品、血清、血漿、活組織切片或吸出物)或來自個體之細胞。在某些實施例中，樣品為血液樣品。在某些實施例中，樣品為血漿樣品。在某些實施例中，可自個體獲得樣品(例如血液或血漿樣品)且

經一或多種蛋白酶、酯酶、DDP-IV 及/或磷酸酶抑制劑處理。舉例而言，但不限制，樣品可經蛋白酶與磷酸酶抑制劑之混合物(例如 MS-SAFE，Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)處理。在某些實施例中，樣品經阻凝劑處理或收集於含有阻凝劑(例如 K<sub>2</sub>-EDTA)之管子中。在某些實施例中，可使用 P800 血液收集系統(BD Biosciences, San Jose, CA)收集樣品。

### III. 抗體

**【0137】** 本發明進一步提供結合於 FGF21 (例如人類 FGF21)之抗體。本發明之抗體適用於偵測及定量樣品中之 FGF21 蛋白含量。在某些實施例中，本發明之抗體可用於本文所揭示之用於偵測及定量 FGF21 蛋白之免疫分析方法中。舉例而言，但不限制，本發明之抗體可用於偵測樣品中之總 FGF21 蛋白及/或活性 FGF21 蛋白的含量。

**【0138】** 在某些實施例中，本發明之抗體可為人類化的。在某些實施例中，本發明之抗體包含受體人類構架，例如人類免疫球蛋白構架或人類共同構架。在某些實施例中，本發明之抗體可為單株抗體，包括嵌合、人類化或人類抗體。舉例而言，但不限制，本發明之抗體可為嵌合的。在某些實施例中，本發明之抗體可為抗體片段，例如 Fv、Fab、Fab'、scFv、雙功能抗體或 F(ab')<sub>2</sub> 片段。在某些實施例中，抗體為 IgG。在某些實施例中，抗體係選自 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4。在某些實施例中，抗體為全長抗體，例如完整 IgG1 抗體，或如本文所定義之其他抗體類別或同型。在某些實施例中，本文所揭示之抗 FGF21 抗體可經標記，例如接合至生物素。在某些實施例中，本發明之抗體可單獨或組合地併有如下文詳述之章節 1-7 中所描述的特徵中之任一者。

## A. 示例性抗 FGF21 抗體

【0139】本發明提供結合於 FGF21 蛋白之經分離之抗體。在某些實施例中，本發明之抗體可結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 (例如 SEQ ID NO: 1 之胺基酸殘基 5-172)內之抗原決定基。在某些實施例中，本發明之抗體可結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 (例如 SEQ ID NO: 1 之胺基酸殘基 173-182)內之抗原決定基。在某些實施例中，本發明之抗體不結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 1-4 (例如 SEQ ID NO: 1 之胺基酸殘基 1-4)內之抗原決定基。抗 FGF21 抗體之非限制性實例揭示於表 8-13 及 16-19 及圖 41A-B 中。

【0140】本發明提供抗 FGF21 抗體，其在某些實施例中包含選自以下之至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個 CDR：(a) CDR-H1，其包含 SEQ ID NO: 26-29 中之任一者之胺基酸序列及其保守取代；(b) CDR-H2，其包含 SEQ ID NO: 30-33 中之任一者之胺基酸序列及其保守取代；(c) CDR-H3，其包含 SEQ ID NO: 34-37 中之任一者之胺基酸序列及其保守取代；(d) CDR-L1，其包含 SEQ ID NO: 38-41 中之任一者之胺基酸序列及其保守取代；(e) CDR-L2，其包含 SEQ ID NO: 42-45 及其保守取代；及(f) CDR-L3，其包含 SEQ ID NO: 46-49 中之任一者之胺基酸序列及其保守取代。

【0141】本發明提供抗 FGF21 抗體，其在某些實施例中包含：(a) CDR-H1，其包含 SEQ ID NO: 26 之胺基酸序列及其保守取代；(b) CDR-H2，其包含 SEQ ID NO: 30 之胺基酸序列及其保守取代；(c) CDR-H3，其包含 SEQ ID NO: 34 之胺基酸序列及其保守取代；(d) CDR-L1，其包含 SEQ ID NO: 38 之胺基酸序列

及其保守取代；(e) CDR-L2，其包含 SEQ ID NO: 42 之胺基酸序列及其保守取代；及(f) CDR-L3，其包含 SEQ ID NO: 46 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0142】** 本發明提供抗 FGF21 抗體，其在某些實施例中包含：(a) CDR-H1，其包含 SEQ ID NO: 27 之胺基酸序列及其保守取代；(b) CDR-H2，其包含 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列及其保守取代；(c) CDR-H3，其包含 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列；(d) CDR-L1，其包含 SEQ ID NO: 39 之胺基酸序列及其保守取代；(e) CDR-L2，其包含 SEQ ID NO: 43 之胺基酸序列及其保守取代；及(f) CDR-L3，其包含 SEQ ID NO: 47 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0143】** 本發明提供抗 FGF21 抗體，其在某些實施例中包含：(a) CDR-H1，其包含 SEQ ID NO: 28 之胺基酸序列及其保守取代；(b) CDR-H2，其包含 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列及其保守取代；(c) CDR-H3，其包含 SEQ ID NO: 36 之胺基酸序列及其保守取代；(d) CDR-L1，其包含 SEQ ID NO: 40 之胺基酸序列及其保守取代；(e) CDR-L2，其包含 SEQ ID NO: 44 之胺基酸序列及其保守取代；及(f) CDR-L3，其包含 SEQ ID NO: 48 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0144】** 本發明提供抗 FGF21 抗體，其在某些實施例中包含：(a) CDR-H1，其包含 SEQ ID NO: 29 之胺基酸序列及其保守取代；(b) CDR-H2，其包含 SEQ ID NO: 33 之胺基酸序列及其保守取代；(c) CDR-H3，其包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列及其保守取代；(d) CDR-L1，其包含 SEQ ID NO: 41 之胺基酸序列及其保守取代；(e) CDR-L2，其包含 SEQ ID NO: 45 之胺基酸序列及其保守取代；及(f) CDR-L3，其包含 SEQ ID NO: 49 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0145】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 54-57 及 72-75 中之任一者之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的重鏈可變域(VH)序列。在某些實施例中，具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%一致性之 VH 序列相對於參考序列含有取代(例如保守取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗 FGF21 抗體保留結合於 FGF21 之能力。在某些實施例中，已取代、插入及/或缺失總共 1 至 10 個胺基酸。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在 CDR 外部之區域(亦即，FR 中)。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含含有 SEQ ID NO: 54-57 及 72-75 中之任一者之胺基酸序列的 VH 序列。

**【0146】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 50-53 及 68-71 中之任一者之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的輕鏈可變域(VL)序列。在某些實施例中，具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%一致性之 VL 序列相對於參考序列含有取代(例如保守取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗 FGF21 抗體保留結合於 FGF21 之能力。在某些實施例中，已取代、插入及/或缺失總共 1 至 10 個胺基酸。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在 CDR 外部之區域(亦即，FR 中)。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含含有 SEQ ID NO: 50-53 及 68-71 中之任一者之胺基酸序列的 VL 序列。

【0147】 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 54 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 VH 序列。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 50 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 VL 序列。在某些實施例中，VH 包含選自以下之一個、兩個或三個 CDR：(a) CDR-H1，其包含 SEQ ID NO: 26 之胺基酸序列，(b) CDR-H2，其包含 SEQ ID NO: 30 之胺基酸序列，及 (c) CDR-H3，其包含 SEQ ID NO: 34 之胺基酸序列。在某些實施例中，VL 包含選自以下之一個、兩個或三個 CDR：(a) CDR-L1，其包含 SEQ ID NO: 38 之胺基酸序列，(b) CDR-L2，其包含 SEQ ID NO: 42 之胺基酸序列，及(c) CDR-L3，其包含 SEQ ID NO: 46 之胺基酸序列。

【0148】 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 55 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 VH 序列。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 51 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 VL 序列。在某些實施例中，VH 包含選自以下之一個、兩個或三個 CDR：(a) CDR-H1，其包含 SEQ ID NO: 27 之胺基酸序列，(b) CDR-H2，其包含 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列，及 (c) CDR-H3，其包含 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列。在某些實施例中，VL 包含選自以下之一個、兩個或三個 CDR：(a) CDR-L1，其包含 SEQ ID NO: 39 之胺

基酸序列，(b) CDR-L2，其包含 SEQ ID NO: 43 之胺基酸序列，及(c) CDR-L3，其包含 SEQ ID NO: 47 之胺基酸序列。

**【0149】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 56 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 VH 序列。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 52 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 VL 序列。在某些實施例中，VH 包含選自以下之一個、兩個或三個 CDR：(a) CDR-H1，其包含 SEQ ID NO: 28 之胺基酸序列，(b) CDR-H2，其包含 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列，及(c) CDR-H3，其包含 SEQ ID NO: 36 之胺基酸序列。在某些實施例中，VL 包含選自以下之一個、兩個或三個 CDR：(a) CDR-L1，其包含 SEQ ID NO: 40 之胺基酸序列，(b) CDR-L2，其包含 SEQ ID NO: 44 之胺基酸序列，及(c) CDR-L3，其包含 SEQ ID NO: 48 之胺基酸序列。

**【0150】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 57 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 VH 序列。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 53 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 VL 序列。在某些實施例中，VH 包含選自以下之一個、兩個或三個 CDR：(a) CDR-H1，其包含 SEQ ID NO: 29 之胺基酸序列，(b) CDR-H2，其包含 SEQ ID NO: 33 之胺基酸序列，及(c) CDR-H3，其包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列。在某些實施例中，VL 包含

選自以下之一個、兩個或三個 CDR：(a) CDR-L1，其包含 SEQ ID NO: 41 之胺基酸序列，(b) CDR-L2，其包含 SEQ ID NO: 45 之胺基酸序列，及(c) CDR-L3，其包含 SEQ ID NO: 49 之胺基酸序列。

**【0151】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 75 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 VH 序列。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 71 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 VL 序列。在某些實施例中，VH 包含選自以下之一個、兩個或三個 CDR：(a) CDR-H1，其包含 SEQ ID NO: 26 之胺基酸序列，(b) CDR-H2，其包含 SEQ ID NO: 30 之胺基酸序列，及(c) CDR-H3，其包含 SEQ ID NO: 34 之胺基酸序列。在某些實施例中，VL 包含選自以下之一個、兩個或三個 CDR：(a) CDR-L1，其包含 SEQ ID NO: 38 之胺基酸序列，(b) CDR-L2，其包含 SEQ ID NO: 42 之胺基酸序列，及(c) CDR-L3，其包含 SEQ ID NO: 46 之胺基酸序列。

**【0152】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 74 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 VH 序列。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 70 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 VL 序列。在某些實施例中，VH 包含選自以下之一個、兩個或三個 CDR：(a) CDR-H1，其包含 SEQ ID NO: 27 之胺基酸序列，(b) CDR-H2，其包含 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列，及

(c) CDR-H3，其包含 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列。在某些實施例中，VL 包含選自以下之一個、兩個或三個 CDR：(a) CDR-L1，其包含 SEQ ID NO: 39 之胺基酸序列，(b) CDR-L2，其包含 SEQ ID NO: 43 之胺基酸序列，及(c) CDR-L3，其包含 SEQ ID NO: 47 之胺基酸序列。

**【0153】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 73 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 VH 序列。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 69 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 VL 序列。在某些實施例中，VH 包含選自以下之一個、兩個或三個 CDR：(a) CDR-H1，其包含 SEQ ID NO: 28 之胺基酸序列，(b) CDR-H2，其包含 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列，及(c) CDR-H3，其包含 SEQ ID NO: 36 之胺基酸序列。在某些實施例中，VL 包含選自以下之一個、兩個或三個 CDR：(a) CDR-L1，其包含 SEQ ID NO: 40 之胺基酸序列，(b) CDR-L2，其包含 SEQ ID NO: 44 之胺基酸序列，及(c) CDR-L3，其包含 SEQ ID NO: 48 之胺基酸序列。

**【0154】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 72 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 VH 序列。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 68 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 VL 序列。在某些實施例中，VH 包含選自以下之一個、兩個或三個 CDR：(a) CDR-H1，其包含 SEQ ID

NO: 29 之胺基酸序列，(b) CDR-H2，其包含 SEQ ID NO: 33 之胺基酸序列，及 (c) CDR-H3，其包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列。在某些實施例中，VL 包含選自以下之一個、兩個或三個 CDR：(a) CDR-L1，其包含 SEQ ID NO: 41 之胺基酸序列，(b) CDR-L2，其包含 SEQ ID NO: 45 之胺基酸序列，及(c) CDR-L3，其包含 SEQ ID NO: 49 之胺基酸序列。

**【0155】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 22-25 及 64-67 中之任一者之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的全長重鏈(HC)序列。在某些實施例中，具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%一致性之 HC 序列相對於參考序列含有取代(例如保守取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗 FGF21 抗體保留結合於 FGF21 之能力。在某些實施例中，已取代、插入及/或缺失總共 1 至 10 個胺基酸。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在 CDR 外部之區域(亦即，FR 中)。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含含有 SEQ ID NO: 22-25 及 64-67 中之任一者之胺基酸序列的 HC 序列。

**【0156】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 18-21 及 60-63 中之任一者之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的全長輕鏈(LC)序列。在某些實施例中，具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%一致性之 LC 序列相對於參考序列含有取代(例如保守取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗 FGF21 抗體保留結合於 FGF21 之能力。在某些實施

例中，已取代、插入及/或缺失總共 1 至 10 個胺基酸。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在 CDR 外部之區域(亦即，FR 中)。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含含有 SEQ ID NO: 18-21 及 60-63 中之任一者之胺基酸序列的 LC 序列。

**【0157】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 22 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 HC 序列。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 18 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 LC 序列。

**【0158】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 23 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 HC 序列。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 19 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 LC 序列。

**【0159】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 24 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 HC 序列。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 20 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 LC 序列。

**【0160】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 25 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或 100%序列一致性的 HC 序列。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 21 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 LC 序列。

**【0161】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 67 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 HC 序列。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 63 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 LC 序列。

**【0162】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 66 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 HC 序列。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 62 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 LC 序列。

**【0163】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 65 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 HC 序列。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 61 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 LC 序列。

**【0164】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體包含與 SEQ ID NO: 64 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 HC 序列。在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗

體包含與 SEQ ID NO: 60 之胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性的 LC 序列。

**【0165】** 在某些實施例中，提供一種抗 FGF21 抗體，其中該抗體包含如上文所提供之任一實施例中的 VH 及如上文所提供之任一實施例中的 VL。在某些實施例中，提供一種抗 FGF21 抗體，其中該抗體包含如上文所提供之任一實施例中的全長 HC 及如上文所提供之任一實施例中的全長 LC。

### 1. 抗體親和力

**【0166】** 在某些實施例中，本發明之抗 FGF21 抗體可具有 $\leq 1$  M、 $\leq 100$  mM、 $\leq 10$  mM、 $\leq 1$  mM、 $\leq 100$   $\mu$ M、 $\leq 10$   $\mu$ M、 $\leq 1$   $\mu$ M、 $\leq 100$  nM、 $\leq 10$  nM、 $\leq 1$  nM、 $\leq 0.1$  nM、 $\leq 0.01$  nM 或 $\leq 0.001$  nM 之解離常數( $K_d$ )。在某些實施例中，本發明之抗體可具有約  $10^{-3}$  或更小或  $10^{-8}$  M 或更小(例如  $10^{-8}$  M 至  $10^{-13}$  M，例如來自  $10^{-9}$  M 至  $10^{-13}$  M)之  $K_d$ 。在某些實施例中，本文所揭示之抗 FGF21 抗體可具有約  $10^{-10}$  M 至  $10^{-13}$  M 之  $K_d$ 。舉例而言，但不限制，本發明之捕獲抗體或偵測抗體以約  $10^{-10}$  M 至  $10^{-13}$  M 之  $K_d$  結合於 FGF21。

**【0167】** 在某些實施例中， $K_d$  可藉由經放射性標記之抗原結合分析(RIA)來量測。在某些實施例中，RIA 可用 Fab 型式之相關抗體及其抗原來進行。舉例而言，但不限制，Fab 對抗原之溶液結合親和力係如下量測：在存在滴定系列之非標記抗原的情況下用最小濃度之( $^{125}$ I)標記抗原平衡 Fab，接著用抗 Fab 抗體塗佈之板捕獲所結合之抗原(參見例如 Chen 等人, J. Mol. Biol. 293:865-881(1999))。為建立用於分析之條件，用含 5  $\mu$ g/ml 之捕獲抗 Fab 抗體(Cappel Labs)之 50 mM 碳酸鈉(pH 9.6)將 MICROTITER<sup>®</sup> 多孔板(Thermo Scientific)塗佈

隔夜，且隨後在室溫(約 23°C)下用含 2% (w/v)牛血清白蛋白之 PBS 阻斷二至五小時。在非吸附板(Nunc #269620)中，將 100 pM 或 26 pM [<sup>125</sup>I]-抗原與相關 Fab 之連續稀釋液混合(例如與 Presta 等人, *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)中之抗 VEGF 抗體 Fab-12 之評估一致)。接著將相關 Fab 孵育隔夜；然而，該孵育可持續更長時間(例如約 65 小時)以確保達到平衡。其後，將混合物轉移至捕獲板以在室溫下孵育(例如持續一個小時)。接著移除溶液且用含 0.1%聚山梨醇酯 20 (TWEEN-20<sup>®</sup>)之 PBS 將板洗滌八次。當板已乾燥時，每孔添加 150  $\mu$ l 之閃爍劑 (MICROSCINT-20<sup>™</sup> ; Packard)，且在 TOPCOUNT<sup>™</sup>  $\gamma$  計數儀(Packard)上對板計數十分鐘。選擇各 Fab 之給出小於或等於 20%之最大結合的濃度用於競爭性結合分析。

**【0168】** 在某些實施例中， $K_d$  可使用 BIACORE<sup>®</sup>表面電漿子共振分析來量測。舉例而言，但不限制，在 25°C 下使用經固定之抗原 CM5 晶片在約 10 個反應單位(RU)下進行使用 BIACORE<sup>®</sup>-2000、BIACORE<sup>®</sup>-3000、BIACORE X100 或 BIACORE T200 處理單元(Biacore, Inc., Piscataway, NJ)之分析。在某些實施例中，根據供應商之說明書用 N-乙基-N'-(3-二甲胺基丙基)-碳二醯亞胺鹽酸鹽 (EDC)及 N-羥基丁二醯亞胺(NHS)活化羧基甲基化右旋糖酐生物感測器晶片 (CM5, Biacore, Inc.)。將抗原用 10 mM 乙酸鈉(pH 4.8)稀釋至 5  $\mu$ g/ml (約 0.2  $\mu$ M)，然後以每分鐘 5  $\mu$ l 之流速注射以達成約 10 個反應單位(RU)之偶合蛋白質。在注射抗原之後，注射 1 M 乙醇胺以阻斷未反應之基團。對於動力學量測，在 25°C 下於含有 0.05%聚山梨醇酯 20 (TWEEN-20<sup>™</sup>)表面活性劑(PBST)之 PBS 中以約 25  $\mu$ l/min 之流速注射 Fab 之兩倍連續稀釋液(0.78 nM 至 500 nM)。締合速

率( $k_{\text{結合}}$ )及解離速率( $k_{\text{解離}}$ )係使用簡單一對一朗繆爾結合模型(Langmuir binding model) (BIAcore®評估軟體版本 3.2)藉由同時擬合締合及解離感測器圖來計算。平衡解離常數( $K_d$ )可以比率  $k_{\text{解離}}/k_{\text{結合}}$  形式來計算。參見例如 Chen 等人, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)。若藉由以上表面電漿子共振分析締合速率超過  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ，則締合速率可藉由使用螢光淬滅技術來測定，該螢光淬滅技術量測在如在光譜儀(諸如停-流裝備分光光度計(Aviv Instruments)或具有經攪拌比色皿之 8000-系列 SLM-AMINCO™ 分光光度計(ThermoSpectronic))中所量測存在增加濃度之抗原的情況下，在  $25^\circ\text{C}$  下於 PBS (pH 7.2)中之 20 nM 抗原抗體(Fab 形式)之螢光發射強度(激發= 295 nm；發射= 340 nm，16 nm 帶通)的增加或減小。

## 2. 抗體片段

**【0169】** 在某些實施例中，本發明之抗體為抗體片段。抗體片段包括但不限於 Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、Fv 及 scFv 片段及下文所描述之其他片段。關於某些抗體片段之綜述，參見 Hudson 等人 Nat. Med. 9:129-134 (2003)。關於 scFv 片段之綜述，參見例如 Pluckthün, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第 113 卷, Rosenberg 及 Moore 編, (Springer-Verlag, New York), 第 269-315 頁(1994)；亦參見 WO 93/16185；及美國專利第 5,571,894 號及第 5,587,458 號。關於包含挽救受體結合抗原決定基殘基且具有增加之活體內半衰期的 Fab 及 F(ab')<sub>2</sub> 片段之論述，參見美國專利第 5,869,046 號。

**【0170】** 在某些實施例中，本發明之抗體可為雙功能抗體。雙功能抗體為包含兩個抗原結合位點之抗體片段，其可為二價或雙特異性的。參見例如 EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson 等人, Nat. Med. 9:129-134 (2003)；及

Hollinger 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)。三功能抗體及四功能抗體為在本發明抗體之範疇內的其他抗體片段，其亦描述於 Hudson 等人, Nat. Med. 9:129-134 (2003)中。

【0171】 在某些實施例中，本發明之抗體可為單結構域抗體。單結構域抗體為包含抗體之重鏈可變域之全部或一部分或輕鏈可變域之全部或一部分的抗體片段。在某些實施例中，單結構域抗體為人類單結構域抗體 (Domantis, Inc., Waltham, MA；參見例如美國專利第 6,248,516 B1 號)。

【0172】 如本文所描述，抗體片段可藉由各種技術來製備，包括但不限於完整抗體之蛋白水解消化以及藉由重組宿主細胞(例如大腸桿菌(*E. coli*)或噬菌體)來製備。

### 3. 嵌合及人類化抗體

【0173】 在某些實施例中，本發明之抗體為嵌合抗體。某些嵌合抗體描述於此項技術中，例如美國專利第 4,816,567 號；及 Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984))中。在某些實施例中，本發明之嵌合抗體包含非人類可變區(例如衍生自小鼠、大鼠、倉鼠、兔或非人類靈長類動物，諸如猴之可變區)及人類恆定區。在另一實例中，嵌合抗體可為「類別轉換」抗體，其中類別或子類已相較於親本抗體有所變化。嵌合抗體包括其抗原結合片段。

【0174】 在某些實施例中，本發明之嵌合抗體可為人類化抗體。典型地，非人類抗體經人類化以降低對人類之免疫原性，同時保留親本非人類抗體之特異性及親和力。通常，人類化抗體包含一或多個可變域，其中 CDR (例如 CDR) (或其部分)衍生自非人類抗體，且 FR (或其部分)衍生自人類抗體序列。人類化

抗體視情況將亦包含人類恆定區之至少一部分。在某些實施例中，人類化抗體中之一些 FR 殘基經非人類抗體(例如衍生出 CDR 殘基之抗體)之對應殘基取代，例如以恢復或改良抗體特異性或親和力。

**【0175】** 人類化抗體及其製備方法綜述於例如 Almagro 及 Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)中，且進一步描述於例如以下各項中：Riechmann 等人, *Nature* 332:323-329 (1988)；Queen 等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989)；美國專利第 5, 821,337 號、第 7,527,791 號、第 6,982,321 號及第 7,087,409 號；Kashmiri 等人, *Methods* 36:25-34 (2005) (描述特異性決定區(SDR)移植)；Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (描述「表面重修」)；Dall'Acqua 等人, *Methods* 36:43-60 (2005) (描述「FR 改組」)；及 Osbourn 等人, *Methods* 36:61-68 (2005)及 Klimka 等人, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (描述 FR 改組之「導向選擇」方法)。

**【0176】** 可用於人類化之人類構架區包括但不限於：使用「最佳擬合」方法選擇之構架區(參見例如 Sims 等人 *J. Immunol.* 151:2296 (1993))；源自特定輕鏈或重鏈可變區子組之人類抗體之共同序列的構架區(參見例如 Carter 等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992)；及 Presta 等人 *J. Immunol.*, 151:2623 (1993))；人類成熟(體細胞突變)構架區或人類生殖系構架區(參見例如 Almagro 及 Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008))；及源自篩選 FR 文庫之構架區(參見例如 Baca 等人, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997)及 Rosok 等人, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996))。

#### 4. 人類抗體

【0177】 在某些實施例中，本發明之抗體可為人類抗體。人類抗體可使用此項技術中已知之各種技術來製備。人類抗體總體描述於 van Dijk 及 van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001)及 Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)中。

【0178】 人類抗體可藉由響應於抗原攻擊向已經修飾之基因轉殖動物投與免疫原以產生完整人類抗體或具有人類可變區之完整抗體來製備。此類動物典型地含有人類免疫球蛋白基因座之全部或一部分，其替代內源性免疫球蛋白基因座，或其存在於染色體外或整合隨機至動物染色體中。在此類基因轉殖小鼠中，內源性免疫球蛋白基因座通常已去活化。關於自基因轉殖動物獲得人類抗體之方法的綜述，參見 Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)。亦參見例如美國專利第 6,075,181 號及第 6,150,584 號，其描述 XENOMOUSE™ 技術；美國專利第 5,770,429 號，其描述 HUMAB® 技術；美國專利第 7,041,870 號，其描述 K-M MOUSE® 技術；及美國專利申請公開案第 US 2007/0061900 號，其描述 VELOCIMOUSE® 技術)。來自由此類動物產生之完整抗體之人類可變區可例如藉由與不同人類恆定區組合而經進一步修飾。

【0179】 人類抗體亦可藉由基於雜交瘤之方法來製備。已描述用於製備人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類異源骨髓瘤細胞株。(參見例如 Kozbor J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984)；Brodeur 等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第 51-63 頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；及 Boerner 等人, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)。)經由人類 B 細胞雜交瘤技術產生之人類抗體亦描述於 Li 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)中。

其他方法包括描述於例如美國專利第 7,189,826 號(描述自雜交瘤細胞株製備單株人類 IgM 抗體)及倪(Ni), 現代免疫學(Xiandai Mianyixue), 26(4):265-268 (2006) (描述人類-人類雜交瘤)中之彼等方法。人類雜交瘤技術(三體瘤技術)亦描述於 Vollmers 及 Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) 及 Vollmers 及 Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)中。

**【0180】** 人類抗體亦可藉由分離選自人類衍生之噬菌體展示文庫的 Fv 純系可變域序列來產生。此類可變域序列可接著與所需人類恆定域組合。用於自抗體文庫選擇人類抗體之技術描述於下文中。

## 5. 文庫衍生之抗體

**【0181】** 可藉由篩選組合文庫中具有所需活性之抗體來分離本發明之抗體。舉例而言，此項技術中已知多種方法用於產生噬菌體展示文庫及篩選此類文庫中具有所需結合特徵之抗體。此類方法綜述於例如 Hoogenboom 等人, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien 等人編, Human Press, Totowa, NJ, 2001)中且進一步描述於例如以下文獻中：McCafferty 等人, *Nature* 348:552-554；Clackson 等人, *Nature* 352: 624-628 (1991)；Marks 等人, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992)；Marks 及 Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo 編, Human Press, Totowa, NJ, 2003)；Sidhu 等人, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004)；Lee 等人, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004)；Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004)；及 Lee 等人, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004)。

【0182】 在某些噬菌體展示方法中，藉由聚合酶鏈反應(PCR)分開選殖 VH 及 VL 基因譜且隨機重組於噬菌體文庫中，如 Winter 等人, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)中所描述接著可篩選該等噬菌體文庫中之抗原結合噬菌體。噬菌體典型地以單鏈 Fv (scFv)片段或以 Fab 片段之形式展示抗體片段。來自經免疫來源之文庫為免疫原提供高親和力抗體，而不需要構築雜交瘤。或者，如 Griffiths 等人, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993)所描述，原初譜可經選殖(例如自人類)以在不進行任何免疫之情況下為廣泛範圍之非自體以及自體抗原提供抗體之單一來源。在某些實施例中，如 Hoogenboom 及 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)所描述，亦可藉由由幹細胞選殖未重排 V-基因區段，且使用含有隨機序列之 PCR 引物以編碼高度可變之 CDR3 區且實現活體外重排而合成製備原初文庫。描述人類抗體噬菌體文庫之專利公開案包括例如：美國專利第 5,750,373 號及美國專利公開案第 2005/0079574 號、第 2005/0119455 號、第 2005/0266000 號、第 2007/0117126 號、第 2007/0160598 號、第 2007/0237764 號、第 2007/0292936 號及第 2009/0002360 號。

【0183】 自人類抗體文庫分離之抗體或抗體片段被視為本文中之人類抗體或人類抗體片段。

## 6. 多特異性抗體

【0184】 在某些實施例中，本發明之抗體可為多特異性抗體，例如雙特異性抗體。多特異性抗體為對至少兩種不同抗原決定基具有結合特異性之單株抗體。在某些實施例中，結合特異性中之一者係針對存在於 FGF21 上之抗原決定基，

而另一者係針對任何其他抗原。雙特異性抗體可經製備呈全長抗體或抗體片段形式。

**【0185】** 用於製備多特異性抗體之技術包括但不限於具有不同特異性之兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之重組共表現(參見 Milstein 及 Cuello, *Nature* 305: 537 (1983))、WO 93/08829 及 Traunecker 等人, *EMBO J.* 10: 3655 (1991))及「杵臼」工程改造(參見例如美國專利第 5,731,168 號)。亦可如下製備多特異性抗體：藉由工程改造靜電轉向效應(engineering electrostatic steering effect)以製備抗體 Fc-異二聚分子(WO 2009/089004A1)；交聯兩種或更多種抗體或片段(參見例如美國專利第 4,676,980 號及 Brennan 等人, *Science*, 229: 81 (1985))；使用白胺酸拉鏈來製備雙特異性抗體(參見例如 Kostelny 等人, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992))；使用用於製備雙特異性抗體片段之「雙功能抗體」技術(參見例如 Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993))；及使用單鏈 Fv (sFv)二聚體(參見例如 Gruber 等人, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994))；及如例如 Tutt 等人 *J. Immunol.* 147: 60 (1991)中所描述製備三特異性抗體。

**【0186】** 本文中亦包括具有三個或更多個功能性抗原結合位點之經工程改造之抗體，包括「章魚抗體(Octopus antibody)」(參見例如 US 2006/0025576A1)。

## 7. 抗體變異體

**【0187】** 當前所揭示之主題進一步提供所揭示之抗體的胺基酸序列變異體。舉例而言，可能需要改良抗體之結合親和力及/或其他生物特性。抗體之胺基酸序列變異體可藉由將適當修飾引入編碼抗體之核苷酸序列中，或藉由肽合成來製備。此類修飾包括但不限於抗體之胺基酸序列內的殘基的缺失及/或插入及/

或取代。可進行缺失、插入及取代之任何組合以成為最終構築體，前提條件為最終抗體(亦即，經修飾)具有所需特徵，例如抗原結合。

#### a) 取代、插入及缺失變異體

**【0188】** 抗體變異體可具有一或多個胺基酸取代、插入及/或缺失。此類變異之位點相關包括但不限於 CDR 及 FR。保守取代之非限制性實例顯示於表 1 中之「較佳取代」標題下。更多實質性變化之非限制性實例提供於表 1 中之「示例性取代」標題下，且如下文關於胺基酸側鏈類別所進一步描述。可將胺基酸取代引入相關抗體中且針對所需活性(例如保留/改良之抗原結合、降低之免疫原性或改良之補體依賴性細胞毒性(CDC)或抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC))對產物進行篩選。

表 1

原始殘基	示例性取代	較佳取代
Ala (A)	Val ; Leu ; Ile	Val
Arg (R)	Lys ; Gln ; Asn	Lys
Asn (N)	Gln ; His ; Asp, Lys ; Arg	Gln
Asp (D)	Glu ; Asn	Glu
Cys (C)	Ser ; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn ; Glu	Asn
Glu (E)	Asp ; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg	Arg
Ile (I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; 正白胺酸	Leu
Leu (L)	正白胺酸 ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys (K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met (M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe (F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr

原始殘基	示例性取代	較佳取代
Thr (T)	Val ; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val (V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正白胺酸	Leu

**【0189】** 可根據常見側鏈特性對胺基酸進行分組：

- (1) 疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 鹼性：His、Lys、Arg；
- (5) 影響鏈取向之殘基：Gly、Pro；
- (6) 芳族：Trp、Tyr、Phe。

**【0190】** 在某些實施例中，非保守取代將需要將此等類別中之一者的成員換成另一類別。

**【0191】** 在某些實施例中，取代變異體之類型涉及取代親本抗體(例如人類化或人類抗體)之一或多個高變區殘基。通常，經選擇用於進一步研究之所得變異體將相對於親本抗體在某些生物特性方面具有改變(例如改良)(諸如但不限於增加之親和力、降低之免疫原性)且/或將實質上保留親本抗體之某些生物特性。取代變異體之非限制性實例為親和力成熟之抗體，其可例如使用基於噬菌體展示之親和力成熟技術(諸如本文所描述之彼等技術)適宜地產生。簡單來說，使一或多個 CDR 殘基發生突變，且使變異體抗體展示於噬菌體上，且針對特定生物活性(例如結合親和力)進行篩選。

【0192】 在某些實施例中，改變(例如取代)可在 CDR 中進行，例如以改良抗體親和力。此類改變可在 CDR 「熱點」(亦即，在體細胞成熟過程期間以高頻率經歷突變之密碼子編碼之殘基(參見例如 Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)))及/或接觸抗原之殘基中進行，並且對所得變異體 VH 或 VL 之結合親和力進行測試。藉由構築二級文庫及自其選擇來實現親和力成熟已描述於例如 Hoogenboom 等人, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien 等人編, Human Press, Totowa, NJ, (2001))中。在親和力成熟之某些實施例中，可藉由多種方法中之任一者(例如易錯 PCR、鏈改組或寡核苷酸定向誘變)將多樣性引入經選擇用於成熟之可變基因中。接著形成二級文庫。接著篩選該文庫以識別具有所需親和力之任何抗體變異體。引入多樣性之另一方法涉及 CDR 導向之方法，其中若干 CDR 殘基(例如一次 4-6 個殘基)經隨機化。可例如使用丙胺酸掃描誘變或模型化特定地識別參與抗原結合之 CDR 殘基。常常特定而言靶向 CDR-H3 及 CDR-L3。

【0193】 在某些實施例中，可在一或多個 CDR 內發生取代、插入及/或缺失，只要此類改變不實質上降低抗體結合抗原之能力即可。舉例而言，可在 CDR 中作出不實質上降低結合親和力之保守改變(例如如本文所提供之保守取代)。此類改變可例如在 CDR 中之抗原接觸殘基以外。在上文提供之變異體 VH 及 VL 序列之某些實施例中，各 CDR 未改變，或不含超過一個、兩個或三個胺基酸取代。

【0194】 適用於識別抗體中可經靶向以進行誘變之殘基或區的方法如由 Cunningham 及 Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085 所描述稱為「丙胺酸掃描誘

變」。在此方法中，識別殘基或目標殘基群(例如帶電荷殘基，諸如 arg、asp、his、lys 及 glu)且用中性或帶負電荷之胺基酸(例如丙胺酸或聚丙胺酸)置換以確定抗體與抗原之相互作用是否受到影響。可在對初始取代展示功能敏感性之胺基酸位置引入其他取代。替代地或另外，抗原-抗體複合物之晶體結構以鑑定抗體與抗原之間的接觸點。可靶向此類接觸殘基及相鄰殘基作為取代之候選者或將其清除。可篩選變異體以確定其是否含有所需特性。

**【0195】** 胺基酸序列插入包括長度在一個殘基至含有一百或更多個殘基之多肽範圍內的胺基末端及/或羧基末端融合，以及單個或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有 N 端甲硫胺醯基殘基之抗體。抗體分子之其他插入變異體包括抗體之 N 端或 C 端融合至酶(例如用於抗體導向之酶前藥療法(ADEPT))或多肽，此增加抗體之血清半衰期。

#### b) 糖基化變異體

**【0196】** 在某些實施例中，本發明之抗體可經改變以增加或降低抗體糖基化之程度。舉例而言，但不限制，抗體之糖基化位點的添加或缺失可適宜地藉由改變胺基酸序列使得形成或移除一或多個糖基化位點來實現。

**【0197】** 在本發明之抗體包含 Fc 區之情況下，可改變與其連接之碳水化合物(若存在)。由哺乳動物細胞產生之天然抗體典型地包含分枝雙觸角寡醣，其通常藉由 N-鍵聯附接至 Fc 區之 CH2 結構域之 Asn297。參見例如 Wright 等人 TIBTECH 15:26-32 (1997)。寡醣可包括各種碳水化合物，例如甘露糖、N-乙醯基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸，以及附接至雙觸角寡醣結構之「主幹」

中的 GlcNAc 之海藻糖。在某些實施例中，可對本發明之抗體中之寡醣進行修飾以形成具有某些改良之特性的抗體變異體。

【0198】 在某些實施例中，提供具有缺少附接(直接或間接)至 Fc 區之海藻糖的碳水化合物結構的抗體變異體。舉例而言，此類抗體中之海藻糖的量可為約 1%至約 80%、約 1%至約 65%、約 5%至約 65%或約 20%至約 40%及其間之值。

【0199】 在某些實施例中，海藻糖之量可如例如 WO 2008/077546 中所描述，藉由計算相對於如藉由 MALDI-TOF 質譜法所量測附接至 Asn 297 之所有糖結構(例如複合、雜合及高甘露糖結構)的總和，糖鏈內在 Asn297 處之海藻糖的平均量來確定。Asn297 係指位於 Fc 區中約位置 297 (Fc 區殘基之 Eu 編號)的天冬醯胺殘基；然而，歸因於抗體中之微小序列變異，Asn297 亦可定位於位置 297 上游或下游約±3 個胺基酸處，亦即，位置 294 與 300 之間。此類海藻糖基化變異體可具有改良之 ADCC 功能。參見例如美國專利公開案第 US 2003/0157108 號(Presta, L.)；第 US 2004/0093621 號(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。與「去海藻糖基化」或「海藻糖缺陷型」抗體變異體有關之出版物的實例包括：US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO2005/053742；WO2002/031140；Okazaki 等人 J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki 等人 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)。

【0200】 去海藻糖基化抗體可在缺乏蛋白質海藻糖基化之任何細胞株中製備。細胞株之非限制性實例包括缺乏蛋白質海藻糖基化之 Lec13 CHO 細胞(Ripka 等人 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)；美國專利申請案第 US 2003/0157108 A1 號, Presta, L；及 WO 2004/056312 A1, Adams 等人，尤其實例 11)及敲出細胞株，諸如  $\alpha$ -1,6-海藻糖基轉移酶基因 FUT8 敲出 CHO 細胞(參見例如 Yamane-Ohnuki 等人 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)；Kanda, Y.等人, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)；及 WO2003/085107)。

【0201】 進一步提供具有二等分寡醣之抗體變異體，例如其中附接至抗體 Fc 區之雙觸角寡醣由 GlcNAc 二等分。此類抗體變異體可具有降低之海藻糖基化及/或改良之 ADCC 功能。此類抗體變異體之非限制性實例描述於例如 WO 2003/011878 (Jean-Mairet 等人)；美國專利第 6,602,684 號(Umana 等人)；及 US 2005/0123546 (Umana 等人)中。亦提供在附接至 Fc 區之寡醣中具有至少一個半乳糖殘基之抗體變異體。此類抗體變異體可具有改良之 CDC 功能。此類抗體變異體描述於例如 WO 1997/30087 (Patel 等人)；WO 1998/58964 (Raju, S.)；及 WO 1999/22764 (Raju, S.)中。

### c) Fc 區變異體

【0202】 在某些實施例中，可將一或多個胺基酸修飾引入本文所提供之抗體的 Fc 區中，由此產生 Fc 區變異體。Fc 區變異體可包含在一或多個胺基酸位置包含胺基酸修飾(例如取代)之人類 Fc 區序列(例如人類 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 Fc 區)。

【0203】 在某些實施例中，本發明提供具有一些但非全部效應功能之抗體變異體。此類有限效應功能可使得抗體變異體成為如下應用之所需候選者，在該等應用中抗體活體內半衰期為重要的，但某些效應功能(諸如補體及 ADCC)為不必要的或有害的。可進行活體外及/或活體內細胞毒性分析以證實 CDC 及/或 ADCC 活性之降低/減損。舉例而言，可進行 Fc 受體(FcR)結合分析以確保抗體缺乏 FcγR 結合能力(因此可能缺乏 ADCC 活性)，但保留 FcRn 結合能力。用於介導 ADCC 之原代細胞 NK 細胞僅表現 FcγRIII，而單核細胞表現 FcγRI、FcγRII 及 FcγRIII。造血細胞上之 FcR 表現概括於 Ravetch 及 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)之第 464 頁的表 3 中。用於評估相關分子之 ADCC 活性的活體外分析之非限制性實例描述於美國專利第 5,500,362 號(參見例如 Hellstrom, I.等人 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986))及 Hellstrom, I 等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985)；5,821,337 (參見 Bruggemann, M.等人, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987))中。或者，可採用非放射性分析方法(參見例如用於流式細胞術之 ACTI™ 非放射性細胞毒性分析(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA；及 CYTOTOX 96®非放射性細胞毒性分析(Promega, Madison, WI)。適用於此類分析之效應細胞包括外周血單核細胞(PBMC)及自然殺傷(NK)細胞。替代地或另外，可在活體內，例如在動物模型(諸如揭示於 Clynes 等人 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998)中之動物模型)中評估相關分子之 ADCC 活性。亦可進行 C1q 結合分析以證實抗體不能結合 C1q 且因此缺乏 CDC 活性。參見例如 WO 2006/029879 及 WO 2005/100402 中之 C1q 及 C3c 結合性 ELISA。為評估補體活化，可進行 CDC 分

析(參見例如 Gazzano-Santoro 等人, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996) ; Cragg, M.S.等人, *Blood* 101:1045-1052 (2003) ; 及 Cragg, M.S.及 M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004))。亦可使用此項技術中已知之方法進行 FcRn 結合及活體內清除率/半衰期測定(參見例如 Petkova, S.B.等人, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006))。在某些實施例中, 例如如美國專利第 6,194,551 號、WO 99/51642 及 Idusogie 等人 *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)中所描述, 可在 Fc 區中作出改變, 從而產生改變(亦即, 改良或削弱)之 C1q 結合及/或補體依賴性細胞毒性 (CDC)。

**【0204】** 具有降低之效應功能的抗體包括具有 Fc 區殘基 238、265、269、270、297、327 及 329 中之一者或多者之取代的彼等抗體(美國專利第 6,737,056 號)。此類 Fc 突變體包括在胺基酸位置 265、269、270、297 及 327 中之兩者或更多者處具有取代之 Fc 突變體, 包括殘基 265 及 297 取代為丙胺酸的所謂「DANA」Fc 突變體(美國專利第 7,332,581 號)。

**【0205】** 描述了具有改良或削弱之 FcR 結合的某些抗體變異體。參見例如美國專利第 6,737,056 號 ; WO 2004/056312 及 Shields 等人, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)。

**【0206】** 在某些實施例中, 本發明之抗體變異體包含具有改良 ADCC 之一或多個胺基酸取代(例如在 Fc 區之位置 298、333 及/或 334 (殘基之 EU 編號)處之取代)的 Fc 區。

**【0207】** 在某些實施例中, 在本文所揭示之抗體(例如雙特異性抗體)之 Fc 區中作出之改變可產生具有增加之半衰期及改良之與負責將母體 IgG 轉移至胎兒

(Guyer 等人, J. Immunol. 117:587 (1976)及 Kim 等人, J. Immunol. 24:249 (1994)) 之新生兒 Fc 受體(FcRn)的結合的變異體抗體，其描述於 US2005/0014934A1 (Hinton 等人)中。彼等抗體包含其中具有改良 Fc 區與 FcRn 之結合的一或多個取代之 Fc 區。此類 Fc 變異體包括如下 Fc 變異體，其在以下 Fc 區殘基中之一或多處具有取代：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424 或 434，例如 Fc 區殘基 434 之取代(美國專利第 7,371,826 號)。

【0208】 關於 Fc 區變異體之其他實例亦參見 Duncan 及 Winter, Nature 322:738-40 (1988)；美國專利第 5,648,260 號；美國專利第 5,624,821 號；及 WO 94/29351。

#### d) 半胱胺酸工程改造之抗體變異體

【0209】 在某些實施例中，可能需要形成半胱胺酸工程改造之抗體，例如「硫基 MAb」，其中抗體之一或多個殘基經半胱胺酸殘基取代。在特定實施例中，取代之殘基存在於抗體之可及位點處。藉由用半胱胺酸取代彼等殘基，由此將反應性硫醇基安置在抗體之可及位點處，且其可用於使抗體接合至其他部分，諸如藥物部分或連接子-藥物部分，以形成如本文中進一步描述之免疫接合物。在某些實施例中，以下殘基中之任何一或多者可經半胱胺酸取代：輕鏈之 V205 (Kabat 編號)；重鏈之 A118 (EU 編號)；及重鏈 Fc 區之 S400 (EU 編號)。可如例如美國專利第 7,521,541 號中所描述產生半胱胺酸工程改造之抗體。

#### e) 抗體衍生物

**【0210】** 在某些實施例中，本發明之抗體可進一步經修飾以含有此項技術中已知且輕易可獲得之其他非蛋白質部分。適合用於抗體之衍生化的部分包括但不限於水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括但不限於聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇之共聚物、羧甲基纖維素、右旋糖酐、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、聚 1,3-二氧雜環戊烷、聚 1,3,6-三氧雜環己烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或隨機共聚物)及右旋糖酐或聚(n-乙基吡咯啉酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、聚環氧丙烷/環氧乙烷共聚物、聚氧乙烷化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛歸因於其在水中之穩定性可在製造中具有優勢。聚合物可具有任何分子量，且可為分枝的或不分枝的。附接至抗體之聚合物的數目可變化，且若附接超過一個聚合物，則其可為相同或不同分子。一般而言，用於衍生化之聚合物之數目及/或類型可基於包括但不限於以下之考慮因素來確定：所要改良之特定抗體特性或功能、抗體衍生物是否將在所定義條件下用於療法中等。

**【0211】** 在某些實施例中，提供抗體及非蛋白質部分之接合物，其可藉由暴露於輻射而經選擇性加熱。在一個實施例中，非蛋白質部分為碳奈米管(carbon nanotube) (Kam 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005))。在某些實施例中，輻射可具有任何波長，且包括但不限於不損害普通細胞但將非蛋白質部分加熱至使抗體-非蛋白質部分近端之細胞被殺死之溫度的波長。

## **B. 抗體製備方法**

【0212】 本文所揭示之抗體可使用任何此項技術中可獲得或已知之技術來製備。舉例而言，但不限制，可例如如美國專利第 4,816,567 號中所描述使用重組方法及組合物來產生抗體。以下實例中描述用於產生抗體之詳細程序。

【0213】 當前所揭示之主題進一步提供一種編碼本文所揭示之抗體的經分離之核酸。舉例而言，經分離之核酸可編碼包括抗體之 VL 的胺基酸序列及/或包含 VH 之胺基酸序列，例如抗體之輕鏈及/或重鏈。在某些實施例中，經分離之核酸可包括編碼具有 SEQ ID NO: 54 中所闡述之序列的重鏈可變區胺基酸序列之核苷酸序列，及/或編碼具有 SEQ ID NO: 50 中所闡述之序列的輕鏈可變區胺基酸序列之核苷酸序列。在某些實施例中，經分離之核酸可包括編碼具有 SEQ ID NO: 57 中所闡述之序列的重鏈可變區胺基酸序列之核苷酸序列，及/或編碼具有 SEQ ID NO: 53 中所闡述之序列的輕鏈可變區胺基酸序列之核苷酸序列。

【0214】 在某些實施例中，核酸可存在於一或多個載體(例如表現載體)中。如本文所用，術語「載體」係指能夠轉運與其連接之另一核酸的核酸分子。一種類型之載體為「質粒」，其係指其他 DNA 區段可連結至其中之環狀雙股 DNA 環。另一類型之載體為病毒載體，其中其他 DNA 區段可連結至病毒基因組中。某些載體能夠在其引入之宿主細胞中自主複製(例如具有細菌複製起點之細菌載體及附加型哺乳動物載體)。其他載體(例如非附加型哺乳動物載體)在引入宿主細胞中後整合至宿主細胞之基因組中，且由此與宿主基因組一起複製。此外，某些載體(表現載體)能夠引導與其可操作地連接之基因的表現。一般而言，用於重組 DNA 技術中之表現載體常常呈質粒(載體)形式。然而，所揭示之

主題旨在包括發揮同等功能之此類其他形式之表現載體，諸如病毒載體(例如複製缺陷型逆轉錄病毒、腺病毒及腺相關病毒)。

**【0215】** 在某些實施例中，可將編碼本發明之抗體的核酸及/或包括該核酸之一或多個載體引入宿主細胞中。在某些實施例中，將核酸引入細胞中可藉由此項技術中已知之任何方法來進行，包括但不限於轉染、電穿孔、微量注射、用含有核酸序列之病毒或噬菌體載體感染、細胞融合、染色體介導之基因轉移、微細胞介導之基因轉移、原生質球狀體融合等。在某些實施例中，宿主細胞可包括(例如已用以下各項轉型)：(1)包含編碼包含抗體之 VL 的胺基酸序列及包含抗體之 VH 的胺基酸序列之核酸的載體，或(2)第一載體，其包含編碼包含抗體之 VL 的胺基酸序列的核酸；及第二載體，其包含編碼包含抗體之 VH 的胺基酸序列的核酸。在某些實施例中，宿主細胞為真核細胞，例如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或淋巴樣細胞(例如 Y0、NS0、Sp20 細胞)。

**【0216】** 在某些實施例中，製備所揭示之抗 FGF21 抗體之方法可包括在適合抗體表現之條件下培養已引入編碼抗體之核酸的宿主細胞，及視情況自宿主細胞及/或宿主細胞培養基回收抗體。在某些實施例中，通過層析技術自宿主細胞回收抗體。

**【0217】** 對於本發明之抗體之重組製備，可分離例如如上文所描述編碼抗體之核酸，且插入一或多個載體中以便進一步在宿主細胞中選殖及/或表現。此類核酸可使用習知程序(例如藉由使用寡核苷酸探針，其能夠特異性結合於編碼抗體之重鏈及輕鏈的基因)輕易地分離及測序。

**【0218】** 適合用於抗體編碼載體之選殖或表現的宿主細胞包括本文所描述之原核或真核細胞。舉例而言，特定而言當不需要糖基化及 Fc 效應功能時，可在細菌中產生抗體。關於抗體片段及多肽在細菌中之表現，參見例如美國專利第 5,648,237 號、第 5,789,199 號及第 5,840,523 號。(參見例如 Charlton, *Methods in Molecular Biology*, 第 248 卷(B.K.C. Lo 編, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 第 245-254 頁，其描述抗體片段在大腸桿菌中之表現)。在表現之後，可於可溶性級分中自細菌細胞糊分離抗體且可進一步純化。

**【0219】** 除原核生物之外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物亦為適合於抗體編碼載體之選殖或表現宿主，包括糖基化路徑已「經人類化」從而使得以部分或完全人類糖基化模式產生抗體之真菌及酵母菌株。參見 Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004)及 Li 等人, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)。適合用於表現糖基化抗體之宿主細胞亦可衍生自多細胞有機體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已識別許多桿狀病毒株，其可與昆蟲細胞結合使用，特定而言用於轉染草地貪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)細胞。

**【0220】** 適合用於表現糖基化抗體之宿主細胞亦可衍生自多細胞有機體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已識別許多桿狀病毒株，其可與昆蟲細胞結合使用，特定而言用於轉染草地貪夜蛾細胞。

**【0221】** 在某些實施例中，可利用植物細胞培養物作為宿主細胞。參見例如美國專利第 5,959,177 號、第 6,040,498 號、第 6,420,548 號、第 7,125,978 號及

第 6,417,429 號(描述用於在基因轉殖植物中產生抗體之 PLANTIBODIES™ 技術)。

【0222】 在某些實施例中，亦可使用脊椎動物細胞作為宿主。舉例而言，但不限制，適合於在懸浮液中生長之哺乳動物細胞株可為適用的。適用之哺乳動物宿主細胞株之非限制性實例為由 SV40 轉型之猴腎 CV1 細胞株(COS-7)；人類胚胎腎細胞株(如例如 Graham 等人, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)中所描述之 293 或 293 細胞)；幼倉鼠腎細胞(BHK)；小鼠足細胞(如例如 Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)中所描述之 TM4 細胞)；猴腎細胞(CV1)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76)；人類子宮頸癌細胞(HELA)；犬腎細胞(MDCK；布法羅大鼠(buffalo rat)肝細胞(BRL 3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝細胞(Hep G2)；小鼠乳房腫瘤(MMT 060562)；如例如 Mather 等人, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)中所描述之 TRI 細胞；MRC 5 細胞；及 FS4 細胞。其他適用之哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括 DHFR<sup>-</sup> CHO 細胞(Urlaub 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))；及骨髓瘤細胞株，諸如 Y0、NS0 及 Sp2/0。關於適合用於產生抗體之某些哺乳動物宿主細胞株的綜述，參見例如 Yazaki 及 Wu, *Methods in Molecular Biology*, 第 248 卷(B.K.C. Lo 編, Humana Press, Totowa, NJ), 第 255-268 頁(2003)。

【0223】 在某些實施例中，用於製備雙特異性抗體及/或多特異性抗體之技術包括但不限於具有不同特異性之兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之重組共表現(參見 Milstein 及 Cuello, *Nature* 305: 537 (1983))、PCT 專利申請號 WO 93/08829 及 Traunecker 等人, *EMBO J.* 10: 3655 (1991))及「杵臼」工程改造(參見例如美國專

利第 5,731,168 號)。亦可如下製備雙特異性抗體：藉由工程改造靜電轉向效應以製備抗體 Fc-異二聚分子(WO 2009/089004A1)；交聯兩種或更多種抗體或片段(參見例如美國專利第 4,676,980 號及 Brennan 等人, *Science*, 229: 81 (1985))；使用白胺酸拉鏈來製備雙特異性抗體(參見例如 Kostelny 等人, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992))；使用用於製備雙特異性抗體片段之「雙功能抗體」技術(參見例如 Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993))；及使用單鏈 Fv (sFv)二聚體(參見例如 Gruber 等人, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994))；及如例如 Tutt 等人 *J. Immunol.* 147: 60 (1991)中所描述製備三特異性抗體。

**【0224】** 本發明之雙特異性及多特異性分子亦可使用化學技術(參見例如 Kranz (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5807)、 「多域(polydome)」技術(參見例如美國專利 4,474,893)或重組 DNA 技術來製備。當前所揭示之主題的雙特異性及多特異性分子亦可藉由使用此項技術中已知及如本文所描述之方法將組成結合特異性(例如第一抗原決定基及第二抗原決定基結合特異性)相接合來製備。舉例而言，但不限制，可分開地產生雙特異性及多特異性分子之各結合特異性且接著接合至彼此。當結合特異性為蛋白質或肽時，可使用多種偶合或交聯劑來進行共價接合。交聯劑之非限制性實例包括蛋白質 A、碳二醯亞胺、N-丁二醯亞胺基-S-乙醯基-硫代乙酸酯(SATA)、N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)及磺基丁二醯亞胺基 4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(磺基-SMCC) (參見例如 Karpovsky (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686；Liu (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648)。其他方法包括由 Paulus (*Behring Ins. Mitt.* (1985) 第 78 期, 118-132；Brennan (1985) *Science* 229:81-83), Glennie (1987) *J.*

Immunol. 139: 2367-2375)描述之彼等方法。當結合特異性為抗體(例如兩種人類化抗體)時，其可經由兩條重鏈之 C 端鉸鏈區之硫氫基鍵結而接合。在某些實施例中，鉸鏈區可經修飾以在接合之前含有奇數之硫氫基殘基，例如一個。

**【0225】** 在某些實施例中，雙特異性抗體之兩種結合特異性可在相同載體中編碼且在相同宿主細胞中表現及組裝。此方法在雙特異性及多特異性分子為 MAb x MAb、MAb x Fab、Fab x F(ab')<sub>2</sub> 或配位體 x Fab 融合蛋白之情況下特別適用。在某些實施例中，本發明之雙特異性抗體可為單鏈分子，諸如單鏈雙特異性抗體、包含一個單鏈抗體及結合決定位之單鏈雙特異性分子或包含兩個結合決定位之單鏈雙特異性分子。雙特異性及多特異性分子亦可為單鏈分子或可包含至少兩個單鏈分子。製備雙特異性分子及多特異性分子之方法描述於例如美國專利第 5,260,203 號；美國專利第 5,455,030 號；美國專利第 4,881,175 號；美國專利第 5,132,405 號；美國專利第 5,091,513 號；美國專利第 5,476,786 號；美國專利第 5,013,653 號；美國專利第 5,258,498 號；及美國專利第 5,482,858 號中。本文亦包括具有三個或更多個功能性抗原結合位點(例如抗原決定基結合位點)之經工程改造之抗體，包括「章魚抗體」(參見例如 US 2006/0025576A1)。

**【0226】** 在某些實施例中，可使用動物系統來產生本發明之抗體。一種用於製備雜交瘤之動物系統為鼠系統。小鼠中之雜交瘤製備為充分確立之程序。用於分離經免疫之脾細胞以用於融合之免疫方案及技術為此項技術中已知的。融合配偶體(例如鼠骨髓瘤細胞)及融合程序亦為已知的(參見例如 Harlow 及 Lane (1988), Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York)。

### C. 結合競爭分析

第 75 頁(發明說明書)

【0227】 可藉由此項技術中已知及本文所提供之各種分析對本文所提供之本發明的抗 FGF21 抗體之物理/化學特性及/或生物活性加以鑑定、篩選或表徵。

### 1. 結合分析及其他分析

【0228】 本發明之抗體的抗原結合活性可藉由諸如酶聯免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)或西方墨點分析(Western Blot Assay)之已知方法來測試。此等分析中之每一者通常藉由採用對相關複合物具特異性的經標記試劑(例如抗體)來偵測特別關注之蛋白質-抗體複合物之存在。舉例而言，FGF21-抗體複合物可使用例如識別且特異性結合於抗體-FGF21 複合物之酶聯抗體或抗體片段來偵測。或者，可使用多種其他免疫分析中之任一者來偵測複合物。舉例而言，抗體可經放射性標記且用於放射免疫分析(RIA)中(參見例如 Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, 1986 年 3 月，其以引用之方式併入本文中)。可藉由諸如使用蓋革計數器(Geiger counter)或閃爍計數器或藉由自動射線照相術之手段來偵測放射性同位素。

【0229】 在某些實施例中，競爭分析可用於鑑定與本發明之抗 FGF21 抗體(例如 mAb4 或 mAb15)競爭結合於 FGF21 之抗體。在某些實施例中，此類競爭抗體結合於 mAb4 或 mAb15 所結合之相同抗原決定基(例如線性或構象抗原決定基)。用於定位抗體結合之抗原決定基之詳細示例性方法提供於 Morris (1996) 「Epitope Mapping Protocols」, Methods in Molecular Biology 第 66 卷(Humana Press, Totowa, NJ)中。

【0230】 在競爭分析之一個非限制性實例中，可將經固定之 FGF21 在包含結合於 FGF21 (例如 mAb4 或 mAb15)之第一經標記抗體及針對與第一抗體競爭

第 76 頁(發明說明書)

結合於 FGF21 之能力進行測試的第二未標記抗體之溶液中孵育。第二抗體可存在於雜交瘤上清液中。作為對照，將經固定之 FGF21 在包含第一經標記抗體但不包含第二未標記抗體之溶液中孵育。在允許第一抗體結合於 FGF21 之條件下孵育之後，將過量未結合之抗體移除，且量測與經固定之 FGF21 相關之標記的量。若在測試樣品中與經固定之 FGF21 相關之標記的量相對於對照樣品實質上減少，則此表明第二抗體與第一抗體競爭結合於 FGF21。參見 Harlow 及 Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* 第 14 章(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

#### D. 免疫接合物

**【0231】** 當前所揭示之主題進一步提供包含接合至一或多種細胞毒性劑之抗體的免疫接合物，該一或多種細胞毒性劑為諸如化學治療劑或藥物、生長抑制劑、毒素(例如蛋白質毒素、細菌、真菌、植物或動物來源之酶活性毒素或其片段)或放射性同位素。舉例而言，所揭示之主題的抗體或抗原結合部分可在功能上連接(例如藉由化學偶合、基因融合、非共價締合或以其他方式)至一或多個其他結合分子，諸如另一抗體、抗體片段、肽或結合模擬物。

**【0232】** 在某些實施例中，免疫接合物為抗體-藥物接合物(ADC)，其中抗體接合至一或多種藥物，包括但不限於類美登素(maytansinoid) (參見美國專利第 5,208,020 號、第 5,416,064 號及歐洲專利 EP 0 425 235)；澳瑞他汀(auristatin)，諸如單甲基澳瑞他汀藥物部分 DE 及 DF (MMAE 及 MMAF) (參見美國專利第 5,635,483 號及第 5,780,588 號及第 7,498,298 號)；多拉司他汀(dolastatin)；加利車黴素(calicheamicin)或其衍生物(參見美國專利第 5,712,374 號、第 5,714,586

號、第 5,739,116 號、第 5,767,285 號、第 5,770,701 號、第 5,770,710 號、第 5,773,001 號及第 5,877,296 號；Hinman 等人, *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993)；及 Lode 等人, *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998))；蔥環類，諸如道諾黴素或阿黴素(參見 Kratz 等人, *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006)；Jeffrey 等人, *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006)；Torgov 等人, *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005)；Nagy 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000)；Dubowchik 等人, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002)；King 等人, *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002)；及美國專利第 6,630,579 號)；胺甲喋呤；長春地辛；紫杉烷，諸如多西他賽(docetaxel)、帕西他賽(paclitaxel)、拉洛他賽(larotaxel)、替司他賽(tesetaxel)及奧他賽(ortataxel)；單端孢黴烯(trichothecene)；及 CC1065。

**【0233】** 在某些實施例中，免疫接合物包含接合至包括但不限於以下之酶活性毒素或其片段之如本文所描述之抗體：白喉 A 鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素 A 鏈(來自綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素 A 鏈、相思豆毒素 A 鏈、葫蘆根毒素 A 鏈、 $\alpha$ -八疊球菌素、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陸(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII 及 PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制劑、麻風樹毒素、巴豆毒素、肥皂草(*Saponaaria officinalis*)抑制劑、白樹毒素(gelonin)、絲林黴素(mitogellin)、侷限麴菌素(restrictocin)、酚黴素、伊諾黴素(enomycin)及單端孢黴烯。

**【0234】** 在某些實施例中，免疫接合物包含接合至放射性原子以形成放射性接合物的如本文所描述之抗體。多種放射性同位素可用於製備放射性接合物。

非限制性實例包括  $\text{At}^{211}$ 、 $\text{I}^{131}$ 、 $\text{I}^{125}$ 、 $\text{Y}^{90}$ 、 $\text{Re}^{186}$ 、 $\text{Re}^{188}$ 、 $\text{Sm}^{153}$ 、 $\text{Bi}^{212}$ 、 $\text{P}^{32}$ 、 $\text{Pb}^{212}$  及  $\text{Lu}$  之放射性同位素。當放射性接合物用於偵測時，其可包括用於閃爍圖像研究之放射性原子，例如  $\text{tc99m}$  或  $\text{I123}$ ，或用於核磁共振(NMR)成像(亦稱為磁共振成像， $\text{mri}$ )之自旋標記，諸如再次碘-123、碘-131、銻-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、釷、錳或鐵。

**【0235】** 抗體與細胞毒性劑之接合物可使用諸如以下之多種雙官能蛋白質偶合劑來製備： $\text{N}$ -丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、丁二醯亞胺基-4-( $\text{N}$ -順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、亞胺酸酯之雙官能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯 2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如 Vitetta 等人, *Science* 238:1098 (1987) 中所描述來製備。碳-14-標記之 1-異硫氰酸苯甲基-3-甲基二伸乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)為用於使放射性核苷酸接合至抗體之示例性螯合劑。參見 WO94/11026。連接子可為有助於細胞中細胞毒性藥物之釋放的「可裂解連接子」。舉例而言，可使用酸不穩定性連接子、肽酶敏感性連接子、光不穩性連接子、二甲基連接子或含二硫化物之連接子(Chari 等人, *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); 美國專利第 5,208,020 號)。

**【0236】** 本文所揭示之免疫接合物明確涵蓋但不限於此類用包括但不限於以下之交聯劑試劑製備之接合物： $\text{BMPS}$ 、 $\text{EMCS}$ 、 $\text{GMBS}$ 、 $\text{HBVS}$ 、 $\text{LC-SMCC}$ 、

MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC 及磺基-SMPB 及 SVSB (丁二醯亞胺基-(4-乙基基磺)苯甲酸酯)，該等物質可商購獲得(例如來自 Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。

#### IV. 套組

**【0237】** 當前所揭示之主題進一步提供含有適用於進行本文所揭示之免疫分析的材料之套組。在某些實施例中，該套組包括含有本文所揭示之抗 FGF21 抗體之容器。適合之容器之非限制性實例包括瓶子、試管、小瓶及微量滴定板。容器可由諸如玻璃或塑膠之多種材料形成。在某些實施例中，該套組進一步包括包裝插頁，該包裝插頁提供關於在所揭示之免疫分析方法中使用抗 FGF21 抗體之說明書。

**【0238】** 在某些實施例中，該套組可包括含有一或多種抗 FGF21 抗體之一或多個容器。抗 FGF21 抗體之非限制性實例揭示於表 8-13 及 16-19 及圖 41A 及 B 中。舉例而言，但不限制，該套組可包括至少一個包括抗 FGF21 捕獲抗體之容器及至少一個包括抗 FGF21 偵測抗體之容器。

**【0239】** 在某些實施例中，用於偵測樣品中之總 FGF21 蛋白之套組包括第一容器，其含有結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的捕獲抗體；第二容器，其含有結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的偵測抗體；及第三容器，其含有偵測劑。

**【0240】** 在某些實施例中，用於偵測樣品中之活性 FGF21 蛋白之套組包括第一容器，其含有結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的

捕獲抗體；第二容器，其含有結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 內之抗原決定基的偵測抗體；及第三容器，其含有偵測劑。

【0241】 在某些實施例中，用於測定樣品中活性 FGF21 蛋白與總 FGF21 蛋白之比率的套組包括第一容器，其含有結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的第一捕獲抗體；第二容器，其含有結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的第一偵測抗體；第三容器，其含有結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的第二捕獲抗體；第四容器，其含有結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 內之抗原決定基的第二偵測抗體；及第五容器，其含有偵測劑。在某些實施例中，第一與第二捕獲抗體為相同抗體且可提供於單一容器中。或者，第一與第二捕獲抗體為不同抗體，且可提供於分開之容器中。

【0242】 在某些實施例中，捕獲抗體及/或偵測抗體可以約 0.1  $\mu\text{g/ml}$  至約 5.0  $\mu\text{g/ml}$  之濃度提供於本發明之套組中。在某些實施例中，偵測抗體可例如經生物素標記。

【0243】 在某些實施例中，提供於本發明之套組中之偵測劑可為親和素、鏈黴親和素-HRP 或鏈黴親和素- $\beta$ -D-半乳哌喃糖(SBG)。在某些實施例中，本發明之套組可進一步包括四甲基聯苯胺、過氧化氫及/或試鹵靈  $\beta$ -D-半乳哌喃糖苷。在某些實施例中，若套組包括鏈黴親和素-HRP，則套組可進一步包括四甲基聯苯胺及過氧化氫。在某些實施例中，若套組包括 SBG，則套組可進一步包括試鹵靈  $\beta$ -D-半乳哌喃糖苷。在某些實施例中，SBG 可以約 100 pM 至約 400 pM 之濃度提供於套組中。

【0244】 在某些實施例中，可提供附接至固體支撐物表面(諸如但不限於板或珠粒，例如順磁性珠粒)之捕獲抗體。替代地或另外，該套組可進一步包括可偶合至捕獲抗體之固體支撐物表面。在某些實施例中，固體支撐物可為順磁性珠粒且可以每毫升約  $0.1 \times 10^7$  個珠粒至每毫升約  $10.0 \times 10^7$  個珠粒之濃度提供。

【0245】 替代地或另外，該套組可包括由商業及使用者立場來看所需之其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑及過濾器。在某些實施例中，該套組可包括用於收集及/或加工血液樣品之材料。

## V. 示例性實施例

【0246】 A. 在某些非限制性實施例中，當前所揭示之主題提供一種用於測定樣品中之總 FGF21 蛋白的量之免疫分析方法，該免疫分析方法包括：

(a) 使結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的捕獲抗體與該樣品接觸，以產生樣品-捕獲抗體組合物質；

(b) 使該樣品-捕獲抗體組合物質與結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的偵測抗體接觸；

(c) 偵測結合於該樣品-捕獲抗體組合物質之該偵測抗體；及

(d) 基於所結合之該偵測抗體之水準計算存在於該樣品中的總 FGF21 蛋白之量。

【0247】 A1. 如 A 之前述免疫分析方法，其中該捕獲抗體及該偵測抗體結合於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之不同抗原決定基。

【0248】 B. 在某些非限制性實施例中，當前所揭示之主題提供一種用於測定樣品中之活性 FGF21 蛋白的量之免疫分析方法，該免疫分析方法包括：

- (a) 使結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的捕獲抗體與該樣品接觸，以產生樣品-捕獲抗體組合物質；
- (b) 使該樣品-捕獲抗體組合物質與結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 內之抗原決定基的偵測抗體接觸；
- (c) 偵測結合於該樣品-捕獲抗體組合物質之該偵測抗體；及
- (d) 基於所結合之該偵測抗體之水準計算存在於該樣品中的活性 FGF21 蛋白之量。

**【0249】** C. 在某些非限制性實施例中，當前所揭示之主題提供一種用於測定樣品中活性 FGF21 蛋白與總 FGF21 蛋白之比率的免疫分析方法，該免疫分析方法包括：

- (a) (i)使結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的第一捕獲抗體與該樣品接觸，以產生第一樣品-捕獲抗體組合物質；(ii)使該第一樣品-捕獲抗體組合物質與結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的第一偵測抗體接觸；(iii)偵測結合於該樣品-捕獲抗體組合物質之該第一偵測抗體；及(iv)基於所結合之該第一偵測抗體之水準計算存在於該樣品中的總 FGF21 蛋白之量；
- (b) (i)使結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的第二捕獲抗體與該樣品接觸，以產生第二樣品-捕獲抗體組合物質；(ii)使該第二樣品-捕獲抗體組合物質與結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 內之抗原決定基的第二偵測抗體接觸；(iii)偵測結合於該樣品-捕獲抗體組合物質之該第二偵測

抗體；及(iv)基於所結合之該第二偵測抗體之水準計算存在於該樣品中的活性 FGF21 蛋白之量；及

(c) 將如藉由步驟(a)所測定之總 FGF21 蛋白的量與如藉由步驟(b)所測定之活性 FGF21 蛋白的量相比較，以確定該樣品中活性 FGF21 蛋白與總 FGF21 蛋白之比率。

【0250】 C1. 如 C 之前述免疫分析方法，其中該第一捕獲抗體與該第二捕獲抗體為相同抗體。

【0251】 C2. 如 C 之前述免疫分析方法，其中該第一捕獲抗體及該第一偵測抗體結合於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之不同抗原決定基。

【0252】 C3. 如 A-C2 中任一項之前述免疫分析方法，其中該免疫分析為酶聯免疫吸附分析(ELISA)。

【0253】 C4. 如 A-C3 中任一項之前述免疫分析方法，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者固定至順磁性珠粒。

【0254】 C5. 如 A-C4 中任一項之前述免疫分析方法，其中該偵測抗體、該第一偵測抗體及該第二偵測抗體中之一或多者接合至生物素。

【0255】 C6. 如 A-C5 中任一項之前述免疫分析方法，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者以約  $10^{-10}$  M 至  $10^{-13}$  M 之  $K_d$  結合於 FGF21。

【0256】 C7. 如 A 及 C-C6 中任一項之前述免疫分析方法，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者以約  $10^{-10}$  M 至  $10^{-13}$  M 之  $K_d$  結合於 FGF21。

【0257】 C8. 如 A-C7 中任一項之前述免疫分析方法，其中該樣品為血液樣品。

【0258】 C9. 如 A-C7 中任一項之前述免疫分析方法，其中該樣品為血漿樣品。

【0259】 C10. 如 A-C9 中任一項之前述免疫分析方法，其中該方法以約 2 pg/ml 至約 20 pg/ml 之孔內靈敏度偵測該樣品中之總體或活性 FGF21 蛋白的量。

【0260】 C11. 如 A-C9 中任一項之前述免疫分析方法，其中該免疫分析方法係使用單分子偵測儀器進行。

【0261】 C12. 如 C11 之前述免疫分析方法，其中該單分子偵測儀器為 Quanterix Simoa HD-1 Analyzer™。

【0262】 C13. 如 C11 及 C12 之前述免疫分析方法，其中該方法以約 0.2 pg/ml 至約 0.5 pg/ml 之孔內靈敏度偵測該樣品中之總體或活性 FGF21 蛋白的量。

【0263】 C14. 如 A-C13 中任一項之前述免疫分析方法，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 26 及 27 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 30 及 31 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 34 及 35 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 38 及 39 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 42 及 43 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 46 及 47 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0264】 C15.** 如 A-C13 中任一項之前述免疫分析，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 54、55、74 及 75 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 50、51、70 及 71 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0265】 C16.** 如 A-C13 中任一項之前述免疫分析，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 22、23、66 及 67 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 18、19、62 及 63 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0266】 C17.** 如 A 及 C-C13 中任一項之前述免疫分析方法，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 28 及 29 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 32 及 33 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 36 及 37 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 40 及 41 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 44 及 45 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及
- (f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 48 及 49 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0267】** C18. 如 A 及 C-C13 中任一項之前述免疫分析，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 56、57、72 及 73 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 52、53、68 及 69 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0268】** C19. 如 A 及 C-C13 中任一項之前述免疫分析，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 24、25、64 及 65 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 20、21、60 及 61 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0269】 C20.** 如 C14 之前述免疫分析方法，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 26 之胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 30 之胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 34 之胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含 SEQ ID NO: 38 之胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 42 之胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 46 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0270】 C21.** 如 C20 之前述免疫分析，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 54 之胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 50 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0271】** C22. 如 C21 之前述免疫分析，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 22 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 18 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0272】** C23. 如 C17 之前述免疫分析方法，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈可變區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 29 之胺基酸序列及其保守取代；
- (b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 33 之胺基酸序列及其保守取代；
- (c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列及其保守取代；
- (d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含 SEQ ID NO: 41 之胺基酸序列及其保守取代；
- (e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 45 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 49 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0273】** C24. 如 C23 之前述免疫分析，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 57 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 53 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0274】** C25. 如 C24 之前述免疫分析，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 25 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 21 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0275】** C26. 如 A-C13 中任一項之前述免疫分析方法，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者與包含以下各項之抗體競爭性結合：

- (a) 重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 26 及 27 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 30 及 31 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 34 及 35 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 38 及 39 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 42 及 43 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及
- (f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 46 及 47 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0276】** C27. 如 A 及 C-C13 中任一項之前述免疫分析方法，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者與包含以下各項之抗體競爭性結合：

- (a) 重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 28 及 29 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 32 及 33 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 36 及 37 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 40 及 41 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 44 及 45 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及
- (f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 48 及 49 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0277】** D. 在某些非限制性實施例中，當前所揭示之主題提供一種用於偵測樣品中之總 FGF21 蛋白的套組，該套組包含：

- (a) 捕獲抗體，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基；
- (b) 偵測抗體，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基；
- 及
- (c) 偵測劑。

**【0278】** D1. 如 D 之前述套組，其中該捕獲抗體及該偵測抗體結合於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之不同抗原決定基。

**【0279】** E. 在某些非限制性實施例中，當前所揭示之主題提供一種用於偵測樣品中之活性 FGF21 蛋白的套組，該套組包含：

- (a) 捕獲抗體，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基；
  - (b) 偵測抗體，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 內之抗原決定基；
- 及
- (c) 偵測劑。

**【0280】** F. 在某些非限制性實施例中，當前所揭示之主題提供一種用於測定樣品中之活性 FGF21 蛋白與總 FGF21 蛋白之比率的套組，該套組包含：

- (a) (i) 第一捕獲抗體，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基及(ii) 第一偵測抗體，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基；
  - (b) (i) 第二捕獲抗體，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基及(ii) 第二偵測抗體，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 內之抗原決定基；及
- (c) 一或多種偵測劑。

**【0281】** F1. 如 F 之前述套組，其中該第一捕獲抗體與該第二捕獲抗體為相同抗體。

**【0282】** F2. 如 F 之前述套組，其中該第一捕獲抗體及該第一偵測抗體結合於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之不同抗原決定基。

**【0283】** F3. 如 D-F2 中任一項之前述套組，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者固定至順磁性珠粒。

【0284】 F4. 如 D-F3 中任一項之前述套組，其中該偵測抗體、該第一偵測抗體及該第二偵測抗體中之一或多者接合至生物素。

【0285】 F5. 如 D-F4 中任一項之前述套組，其中該偵測劑係選自由以下組成之群：鏈黴親和素-β-D-半乳哌喃糖接合物、鏈黴親和素-辣根過氧化酶接合物及其組合。

【0286】 F6. 如 F5 之前述套組，其進一步包含試鹵靈 β-D-半乳哌喃糖苷、四甲基聯苯胺、過氧化氫或其組合。

【0287】 F7. 如 D-F6 中任一項之前述套組，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者以約  $10^{-10}$  M 至  $10^{-13}$  M 之  $K_d$  結合於 FGF21。

【0288】 F8. 如 D 及 F-F7 中任一項之前述套組，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者以約  $10^{-10}$  M 至  $10^{-13}$  M 之  $K_d$  結合於 FGF21。

【0289】 F9. 如 D 及 F-F8 中任一項之前述套組，其中該偵測抗體或該第一偵測抗體具有約 0.1 μg/ml 至約 1 μg/ml 之濃度。

【0290】 F10. 如 E-F7 中任一項之前述套組，其中該偵測抗體或該第二偵測抗體中之一或多者具有約 1 μg/ml 至約 3 μg/ml 之濃度。

【0291】 F11. 如 F5 之前述套組，其中該鏈黴親和素-β-D-半乳哌喃糖接合物具有約 100 pM 至約 400 pM 之濃度。

【0292】 F12. 如 D-F11 中任一項之前述套組，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 26 及 27 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

- (b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 30 及 31 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 34 及 35 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 38 及 39 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 42 及 43 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及
- (f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 46 及 47 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0293】 F13.** 如 D-F11 中任一項之前述套組，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 54、55、74 及 75 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 50、51、70 及 71 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0294】 F14.** 如 D-F11 中任一項之前述套組，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 22、23、66 及 67 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 18、19、62 及 63 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0295】 F15.** 如 D 及 F-F11 中任一項之前述套組，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 28 及 29 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 32 及 33 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 36 及 37 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 40 及 41 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 44 及 45 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 48 及 49 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0296】 F16.** 如 D 及 F-F11 中任一項之前述套組，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 56、57、72 及 73 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 52、53、68 及 69 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0297】 F17.** 如 D 及 F-F11 中任一項之前述套組，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 24、25、64 及 65 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 20、21、60 及 61 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0298】 F18.** 如 F12 之前述套組，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 26 之胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 30 之胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 34 之胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含 SEQ ID NO: 38 之胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 42 之胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 46 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0299】 F19.** 如 F18 之前述套組，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 54 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 50 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0300】 F20.** 如 F19 之前述套組，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 22 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 18 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0301】 F21.** 如 F15 之前述套組，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈可變區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 29 之胺基酸序列及其保守取代；
- (b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 33 之胺基酸序列及其保守取代；
- (c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列及其保守取代；
- (d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含 SEQ ID NO: 41 之胺基酸序列及其保守取代；
- (e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 45 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 49 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0302】** F22. 如 F21 之前述套組，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 57 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 53 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0303】** F23. 如 F22 之前述套組，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 25 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 21 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0304】** F24. 如 D-F11 中任一項之前述套組，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者與包含以下各項之抗體競爭性結合：

- (a) 重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 26 及 27 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 30 及 31 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 34 及 35 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 38 及 39 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 42 及 43 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 46 及 47 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0305】** F25. 如 D 及 F-F11 中任一項之前述套組，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者與包含以下各項之抗體競爭性結合：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 28 及 29 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 32 及 33 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 36 及 37 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 40 及 41 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 44 及 45 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 48 及 49 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0306】** F26. 如 D-F25 中任一項之前述套組，其中該樣品為血液樣品。

**【0307】** F27. 如 D-F25 中任一項之前述套組，其中該樣品為血漿樣品。

**【0308】** F28. 如 D-F27 中任一項之前述套組，其中該套組以約 0.2 pg/ml 至約 0.5 pg/ml 之孔內靈敏度偵測該樣品中之總體或活性 FGF21 蛋白的量。

**【0309】 G.** 在某些非限制性實施例中，當前所揭示之主題提供一種經分離之抗 FGF21 抗體或其抗原結合部分，其包含：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 26-29 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 30-33 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 34-37 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 38-41 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 42-45 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 46-49 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【0310】 G1.** 如 G 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 26 之胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 30 之胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 34 之胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含 SEQ ID NO: 38 之胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 42 之胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 46 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0311】 G2.** 如 G 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 27 之胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含 SEQ ID NO: 39 之胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 43 之胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 47 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0312】 G3.** 如 G 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

- (a) 重鏈可變區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 28 之胺基酸序列及其保守取代；
- (b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列及其保守取代；
- (c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 36 之胺基酸序列及其保守取代；
- (d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含 SEQ ID NO: 40 之胺基酸序列及其保守取代；
- (e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 44 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 48 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0313】 G4.** 如 G 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

- (a) 重鏈可變區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 29 之胺基酸序列及其保守取代；
- (b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 33 之胺基酸序列及其保守取代；
- (c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列及其保守取代；
- (d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含 SEQ ID NO: 41 之胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 45 之胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 49 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0314】 G5.** 如 G1 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 54 之胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 50 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0315】 G6.** 如 G2 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 55 之胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 51 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0316】 G7.** 如 G3 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 56 之胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 52 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0317】 G8.** 如 G4 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 57 之胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 53 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0318】 G9.** 如 G1 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

- (a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 75 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 71 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0319】 G10.** 如 G2 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

- (a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 74 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 70 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0320】 G11.** 如 G3 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

- (a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 73 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 69 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0321】 G12.** 如 G4 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

- (a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 72 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 68 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0322】 G13.** 如 G5 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

- (a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 22 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 18 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0323】 G14.** 如 G6 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 23 之胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 19 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0324】 G15.** 如 G7 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 24 之胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 20 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0325】 G16.** 如 G8 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 25 之胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 21 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0326】 G17.** 如 G9 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 67 之胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 63 之胺基酸序列及其保守取代。

**【0327】 G18.** 如 G10 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 66 之胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 62 之胺基酸序列及其保守取代。

【0328】 G19. 如 G11 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 65 之胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 61 之胺基酸序列及其保守取代。

【0329】 G20. 如 G12 之前述經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 64 之胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 60 之胺基酸序列及其保守取代。

【0330】 H. 在某些非限制性實施例中，當前所揭示之主題提供一種經分離之核酸，其編碼如 G-G20 中任一項之抗體或其抗原結合部分。

【0331】 I. 在某些非限制性實施例中，當前所揭示之主題提供一種宿主細胞，其包含如 H 之核酸。

【0332】 J. 在某些非限制性實施例中，當前所揭示之主題提供一種產生抗體之方法，該方法包括培養如 I 之宿主細胞以產生該抗體。

【0333】 J1. 如 J 之前述方法，其進一步包括自該宿主細胞回收該抗體。

【0334】 K. 在某些非限制性實施例中，當前所揭示之主題提供一種組合物，其包含一或多種如 G-G20 中任一項之抗體或其抗原結合部分。

## 實例

【0335】 以下實例僅僅說明當前所揭示之主題且不應視為以任何方式加以限制。

### 實例 1：抗 FGF21 抗體產生

【0336】 藉由用重組人類 FGF21 對 SJL 及 Balb/c 小鼠進行免疫來產生單株抗體。藉由 ELISA 篩選 80 份雜交瘤上清液(圖 1)。基於與完整人類 FGF21 (PUR 98271)、完整食蟹猴 FGF21 (PUR 98270)及藉由由人類 FAP 消化完整人類 FGF21 產生之裂解的人類 FGF21 (PUR 102247)之結合選擇 20 份雜交瘤。

## 實例 2：抗 FGF21 抗體表徵

【0337】 藉由 ELISA 進一步表徵自所選擇之在實例 1 中所鑑定之 20 份雜交瘤獲得的 IgG。如下進行 ELISA：在 4°C 下將 96 孔 MaxiSorp 板(439454, Nalge Nunc International; Rochester, NY)用含 1 µg/mL 之抗 FGF21 mAb 或抗 FGF21 綿羊 pAb (目錄號 RD184108100, Biovendor, Asheville, NC)之塗佈緩衝液(50 mM 碳酸鈉, pH 9.6)塗佈隔夜。在次日, 在用含有 0.5% BSA 及 10 ppm ProClin 之 PBS (pH 7.4)阻斷且用洗滌緩衝液(PBS, 0.05% Tween 20, pH7.2)洗滌之後, 在室溫下將板與含 0.00000186-2000 pg/mL 之完整人類 FGF21 (全長未裂解之 FGF21; 目錄號 2539-FG, R&D Systems)或 FAP 裂解之人類 FGF21 的分析緩衝液(25 mM HEPES, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1%牛血清白蛋白 (BSA), 0.05% Tween 20)一起孵育 1-2 h。在用洗滌緩衝液洗滌之後, 在室溫下將板與 0.5 µg/ml 之二次抗體(R&D Systems, 生物素化山羊抗 FGF21 pAb BAF2539)一起孵育 1-2 h。在用洗滌緩衝液洗滌之後, 將板在於分析緩衝液中 1:1,000 稀釋之高敏感性鏈黴親和素-HRP (PIERCE 目錄號 21130)存在下進行孵育。在用洗滌緩衝液洗滌之後, 藉由添加受質 3,3',5,5'四甲基聯苯胺(TMBE 1000, Moss; Pasadena, MD)評估抗 FGF21 與重組 FGF21 之結合。繪製雙份孔之平均吸光度值隨抗體濃度而變之曲線且使用 Prism 6 (GraphPad Software, Inc.,

La Jolla, CA)將數據對三參數方程進行擬合以計算各抗體之半數最大有效濃度 (EC<sub>50</sub>)值(表 2)。

表 2. 各 FGF21 抗體之 EC<sub>50</sub> 值.

一次 Ab	二次 Ab	完整 FGF21 EC <sub>50</sub> (pg/ml)	裂解之 FGF21 EC <sub>50</sub> (pg/ml)	EC <sub>50</sub> 比率(裂解/ 完整)
mAb1	山羊抗 FGF21 pAb	126	228	1.8
mAb2	山羊抗 FGF21 pAb	2108	3187	1.5
mAb3	山羊抗 FGF21 pAb	292	450	1.5
mAb4	山羊抗 FGF21 pAb	90	170	1.9
mAb5	山羊抗 FGF21 pAb	5506	19331	3.5
mAb6	山羊抗 FGF21 pAb	1993	4813	2.4
mAb7	山羊抗 FGF21 pAb	8797	25403	2.9
mAb8	山羊抗 FGF21 pAb	503	777	1.5
mAb9	山羊抗 FGF21 pAb	855	1385	1.6
mAb10	山羊抗 FGF21 pAb	136	249	1.8
mAb11	山羊抗 FGF21 pAb	149	318	2.1
mAb12	山羊抗 FGF21 pAb	5633	30386	5.4
mAb13	山羊抗 FGF21 pAb	169	300	1.8
綿羊 pAb	山羊抗 FGF21 pAb	48	84	1.7

【0338】 基於完整與裂解之 FGF21 的差別偵測及絕對 EC<sub>50</sub> 值，將抗體 mAb5、mAb6、mAb7 及 mAb12 排除在進一步分析之外。藉由使用 EZ-Link™ NHS-PEG 固相生物素化套組(PIERCE 目錄號 21450)將抗體 mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb8、mAb9、mAb10、mAb11、mAb13、mAb15 及 mAb16 生物素化且使用完整 FGF21 以成對組合方式進行夾心 ELISA (表 3 及 4)。將經生物素化之山羊抗 FGF21 pAb BAF2539 (R&D Systems)用作陽性對照。

表 3. 夾心 ELISA 中抗 FGF21 mAb 之相容性.

	BIO -1	BIO -10	BIO- 11	BIO -4	BIO -9	BIO- 13	BIO -2	BIO -3	BIO -8	BAF2539
mAb1				XX	XX					XX
mAb10				XX	XX	X				XX
mAb11				XX	XX	X				XX
mAb4	XX	XX	XX							XX
mAb9	XX	XX	XX							XX
mAb13	X	X	X							XX
mAb8	XX	XX	XX	XX		X		X		XX

mAb2										XX
mAb3										XX
綿羊 pAb										XX

XX：強信號且 OD>1，X：強信號且 OD<1

表 4. 夾心 ELISA 中抗 FGF21 mAb 之相容性.

	BIO-4	BIO-11	BIO-15	BIO-16
mAb4		XX	XX	X
mAb8	-	-	-	
mAb9		XX	XX	X
mAb11	XX		XX	
mAb15	XX	X		
mAb16	-			

XX：強信號且 OD>1.5，X：強信號且 0.5<OD<1.5，-：當使用 653 pg/mL FGF21 時 OD<0.5。使用完整 FGF21 及 FAP 裂解之 FGF21 情況下的平均值來生成該表格。

【0339】 基於表 3 中提供之結果，將抗體 mAb2、3 及 13 排除在進一步分析之外。表 3 之結果將抗體 mAb1、4、8、9、10 及 11 置於三個抗原決定基倉 (epitope bin) 中(表 5)。

表 5. 抗原決定基建倉.

抗原決定基倉	mAb
1	1, 10, 11
2	4, 9
3	8

【0340】 接著在 ELISA 中使用完整人類 FGF21 (目錄號 2539-FG, R&D Systems) 以組合方式對抗體 mAb1、4、8、9、10 及 11 進行測試。繪製吸光度值隨抗體濃度而變之曲線且使用 Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) 將數據對三參數方程進行擬合以計算各抗體之半數最大有效濃度(EC<sub>50</sub>)值(表 6)。如表 6 中所示，當對於完整人類 FGF21 將抗體 mAb4 或 9 用作捕獲抗體且抗體 mAb10 或 11 用作偵測抗體時觀測到較佳效能。

表 6. 夾心 ELISA 中各種抗 FGF21 mAb 組合之 EC<sub>50</sub> 值.

捕獲 mAb	偵測 mAb	EC <sub>50</sub> (pg/ml)
4	10	108
4	11	133
9	11	156
9	10	161
11	4	161
10	4	172
8	10+4	182
10	9	191
4	1	193
11	9	195
8	11+4	198
8	1+4	202
1	4	222
8	4	228
8	10	237
9	1	249
8	11	303
8	1	308
1	9	323

【0341】 接著在 ELISA 中使用完整人類 FGF21 (目錄號 2539-FG, R&D systems)或 FAP 裂解之人類 FGF21 以組合方式對抗體 mAb4、8、9、10、11、15 及 16 進行測試。繪製吸光度值隨抗體濃度而變之曲線且使用 Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA)針對各抗體將數據對三參數方程進行擬合。當抗體 mAb4 或 9 用作捕獲抗體且抗體 mAb11 或 mAb15 用作偵測抗體時觀測到最一致之結果(圖 2 及表 7)。因此，將 mAb8 及 16 自進一步分析中移除。圖 2 表明抗體均等地結合於完整及 FAP 裂解之 FGF21 (cFGF21)，此對於偵測總 FGF21 (亦即，完整與 FAP 裂解兩者)之濃度為重要的。

表 7. 夾心 ELISA 中各種抗 FGF21 mAb 組合之 EC<sub>50</sub> 值.

捕獲 mAb	偵測 mAb	完整 FGF21 情況下之 EC <sub>50</sub> (pg/ml)	FAP 裂解之 FGF21 情況下之 EC <sub>50</sub> (pg/ml)
9	11	165.8	156.3
4	11	194.7	148
11	4	204.5	203.8
4	15	232.1	262.6

9	15	431.4	362.6
15	4	536.8	561.7
11	15	774.4	630.1
4	16	1246	7044
15	11	1388	1239
9	16	1451	6234
16	4	4893	15750
8	11	40272	106195
8	15	42549	78857
8	4	44411	121300000

【0342】 藉由 BIACORE<sup>®</sup>表面電漿子共振進一步分析抗體 mAb4、9、11 及 15 以確定  $K_d$ 。如圖 3 中所示，mAb4 具有  $3.689 \times 10^{10}$  之  $K_d$ ，mAb9 具有  $8.895 \times 10^{10}$  之  $K_d$ ，mAb11 具有  $2.704 \times 10^{10}$  之  $K_d$  且 mAb15 具有  $3.955 \times 10^{12}$  之  $K_d$ 。

### 實例 3：抗原決定基分析

【0343】 藉由使 FGF19、FGF21 或 FGF19-FGF21 嵌合蛋白以 FLAG 標記之蛋白質的形式在瞬時轉染之 HEK293 培養物上清液中表現且藉由 ELISA 測試抗體 mAb4、9、11 及 15 之結合來進行抗原決定基定位。對於 ELISA，在 4°C 下將 96 孔 MaxiSorp 板(439454，Nalge Nunc International; Rochester, NY)用 15  $\mu$ l 含有分泌之蛋白質的培養物上清液與 135  $\mu$ l 之 1 倍塗佈緩衝液(50 mM 碳酸鈉，pH 9.6)之混合物塗佈隔夜。使用結合於 FGF21 C 端之商業抗體 R5 及 R9 作為陽性對照。

人類 FGF19：

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQ  
 SAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHRSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEI  
 RPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPED  
 LRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ ID NO: 2)

人類 FGF21：

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLL  
 QLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNV  
 YQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDV  
 GSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 1)

人類 FGF21-19 嵌合體蛋白(FGF21 部分為斜體且 FGF19 部分加下劃線)：

HPIPDSSPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAH  
SLLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLOQYSEEDCAFEEEEIRPD  
GYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRG  
HLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ ID NO: 3)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRADGVVDCARGQSAHSLLE  
IKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLOQYSEEDCAFEEEEIRPDGYN  
VYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLE  
SDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ ID NO: 4)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGVVDCARGQSAHSLLE  
IKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLOQYSEEDCAFEEEEIRPDGYN  
VYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLE  
SDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ ID NO: 5)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSAHSLLEI  
KAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLOQYSEEDCAFEEEEIRPDGYNV  
YRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLES  
DMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ ID NO: 6)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLEI  
KAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLOQYSEEDCAFEEEEIRPDGYNV

YRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLES

DMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ ID NO: 7)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESELLQL

KALKPGVIQILGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVY

RSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESD

MFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ ID NO: 8)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESELLQL

KALKPGVIQILGVKTSRFLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYR

SEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDM

FSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ ID NO: 9)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESELLQL

KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEA

HGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLE

TDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ ID NO: 10)

RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESL

LQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQ

SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSS

DPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 11)

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIREDGTVGGAADQS

PESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGY

NVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPD

VGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 12)

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGTVGGAADQS  
 PESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLEDGY  
 NVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPD  
 VGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 13)

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQ  
 SPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLEDG  
 YNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPP  
 DVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 14)

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQ  
SAHSLLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLED  
 GYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQP  
 PDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 15)

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQ  
SAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELLE  
 DGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQ  
 PPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 16)

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQ  
SAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEI  
RPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPLPGLPPALPEPP  
 GILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 17)

【0344】 如圖 4 中所示，抗體 mAb4、9、11 及 15 結合於人類 FGF21 之核心  
 FGF 摺疊而不結合於 N 端或 C 端柔性區域。

#### 實例 4：FGF21 ELISA 分析

【0345】 與藉由使用 EZ-Link™ NHS-PEG 固相生物素化套組(PIERCE #21450)生物素化之 C 端特異性抗 FGF21 pAb (目錄號 30661, Epitope Diagnostics, San Diego, CA; 本文中亦稱為「C-ter pAb」))組合, 對在偵測完整 FGF21 時使用抗體 mAb4 及 11 作為捕獲抗體進行測試。用於測定總 FGF21 及活性 FGF21 含量之免疫分析的示意圖顯示於圖 5 中。

【0346】 如下進行 ELISA 分析: 在 4°C 下將 96 孔 MaxiSorp 板(目錄號 439454, Nalge Nunc International; Rochester, NY)用含 0.5 µg/mL 之抗 FGF21 mAb 之塗佈緩衝液(50 mM 碳酸鈉, pH 9.6)塗佈隔夜。在次日, 在用含有 0.5% BSA 及 10ppm Proclin 之 PBS (pH 7.4)阻斷且用洗滌緩衝液(PBS, 0.05% Tween 20, pH7.2)洗滌之後, 在室溫下將板與含 0.0004-32000 pg/mL 之完整人類 FGF21 (2539-FG, R&D systems)的分析緩衝液(25 mM HEPES, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1%牛血清白蛋白[BSA], 0.05% Tween-20)一起孵育 1-2 h。在用洗滌緩衝液洗滌之後, 在室溫下將板與含 0.5 µg/ml 之二次 Ab (生物素化之抗 FGF21 C 端 pAb 30661 或抗 FGF21 mAb11 或 15)之魔法緩衝液 (Magic buffer) (1x PBS pH 7.4, 0.5% BSA, 0.05% Tween 20, 0.2% BgG, 0.25% CHAPS, 5mM EDTA, 0.35M NaCl, 10PPM Proclin)一起孵育 1-2 h。在用洗滌緩衝液洗滌之後, 將板在於分析緩衝液中 1:1,000 稀釋之高靈敏度鏈黴親和素-HRP (PIERCE #21130)存在下進行孵育。在用洗滌緩衝液洗滌之後, 藉由添加受質 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMBE-1000, Moss; Pasadena, MD)來評估抗 FGF21 與重組 FGF21 之結合。更詳細之方案提供於圖 6 中。繪製雙份孔之平均吸光度

值隨抗體濃度而變之曲線且使用 Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) 將數據對三參數方程進行擬合(圖 7)。

【0347】 如圖 8 中所示，總 FGF21 ELISA 分析具有 5 pg/ml 之孔內靈敏度且活性 FGF21 ELISA 分析具有 28 pg/ml 之孔內靈敏度。活性 FGF21 ELISA 分析不偵測丟失最後 10 個 C 端胺基酸之裂解形式之 FGF21。

【0348】 進行其他實驗以確定血清對總 FGF21 ELISA 分析之影響。進行使用 mAb4 作為捕獲抗體且使用 mAb15 作為偵測抗體之 FGF21 ELISA 分析。如圖 9 中所示，對分析存在最小血清干擾。亦測試分析對人類 FGF21 之特異性。如圖 9 中所示，對總 FGF21 之分析偵測與對照小鼠相比在人類-FGF21 敲入小鼠中表現之人類 FGF21。圖 10 亦表明使用所揭示之抗體的分析對人類 FGF21 具特異性且不偵測小鼠 FGF21。

【0349】 基於此等資料，選擇 4 種抗體 mAb4、mAb9、mAb11 及 mAb15 進行 cDNA 選殖用於重組表現。此等抗體之胺基酸序列提供於表 8-13 及圖 41A 及 41B 中。在鼠 IgG2a 背景下重組 mAb 在 100 mL CHO 培養物中表現。

表 8. 鼠抗 FGF21 單株抗體之全長輕鏈(LC)序列.

抗體	全長輕鏈胺基酸序列
4	QIVLTQSPAIMSAPLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKVWIYRT TNLASGVPTRFSGSGSGTSSYSLTSSMEAEADAATYYCHQYHRSPPTWTFGGG TKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPYKIDINVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPI VKSFNRNEC (SEQ ID NO: 18)
9	DIQMTQSPASLSASVGETVIITCRASENIYSYLAHWYQQKQKSPQLLVYNIRT LAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYDSPWTFGGGKLEI KRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPYKIDINVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPI VKSFNRNEC (SEQ ID NO: 19)
11	QIVLTQSPALMSASPGERVTMTCSAGSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIYLT NLASGVPARFSGSGSGTSSYSLTSSMEAEADAATYYCQWSSNPRTFGGGTKL EIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPYKIDINVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPI VKSFNRNEC

	NRNEC (SEQ ID NO: 20)
15	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQIIVHNNGDYLEWYLQKPGQSPKLLI YKISNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGG GTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGS ERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPI VKSFNRNEC (SEQ ID NO: 21)

表 9. 鼠抗 FGF21 單株抗體之全長重鏈(HC)序列.

抗體	全長重鏈胺基酸序列
4	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATI STGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRSEDAMYYCARHDL VDWYFDVWGTGTTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVA HPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLSP IVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPI QHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMT KKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKL LRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO: 22)
9	EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYYMGWVKQSHGKSLEWIGDI NPNNGVTINNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLASEDTAVYYCTRGYG GALDYWGQGTSVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPE PVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPA SSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLSP IVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQ VTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRV EKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO: 23)
11	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTNYGISWVKQRTGQGLEWIGEI YPRSDNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCTRSDYG FFDYWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEP VTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPAS STKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLSP IVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQ VTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRV EKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO: 24)
15	QVQLIQSGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTGYAIHWVRQSPGKGLEWLGMIW KSGNTDYNAAFMSRLSITKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARNGYDY EFVYWGQGTTLTVSAAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEP VTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPAS STKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLSP IVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQ VTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRV EKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO: 25)

表 10. 鼠抗 FGF21 單株抗體之輕鏈可變區(VL)序列.

抗體	輕鏈可變區胺基酸序列
4	QIVLTQSPAIMSAPLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKVWIYRT TNLASGVPTRFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPPTWTFGGG

	TKLEIK (SEQ ID NO: 50)
9	DIQMTQSPASLSASVGETVIITCRASENIYSYLAWYQQKQGKSPQLLVYNIRTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYDSPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 51)
11	QIVLTQSPALMSASPGERVMTMTCSAGSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWLYLTSNLASGVPARFSGSGSGTSLTSSMEAEADAATYYCQQWSSNPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 52)
15	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQIIVHNNGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKISNRFSGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 53)

表 11. 鼠抗 FGF21 單株抗體之重鏈可變區(VH)序列.

抗體	重鏈可變區胺基酸序列
4	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATI STGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDAMYYCARHDLVDWYFDVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 54)
9	EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYYMGWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGVTTINNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLASEDTAVYYCTRGYGGALDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 55)
11	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTNYGISWVKQRTGQGLEWIGEIYPRSDNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCTRSDYGGFFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 56)
15	QVQLIQSGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTGAIHWVRQSPGKGLEWLGMIWKSGNTDYNAAFMSRLSITKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARNGYDYEFVYWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO: 57)

表 12. 鼠抗 FGF21 單株抗體之重鏈 CDR 序列.

抗體	CDR H1	CDR H2	CDR H3
4	SYGMS (SEQ ID NO: 26)	TISTGGGYTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 30)	HDLVDWYFDV (SEQ ID NO: 34)
9	DYYMG (SEQ ID NO: 27)	DINPNNGVTTINNQNFKG (SEQ ID NO: 31)	GYGGALDY (SEQ ID NO: 35)
11	NYGIS (SEQ ID NO: 28)	EIYPRSDNTYYNEKFKG (SEQ ID NO: 32)	SDYGGFFDY (SEQ ID NO: 36)
15	GYAIH (SEQ ID NO: 29)	MIWKSGNTDYNAAFMS (SEQ ID NO: 33)	NGYDYEFVY (SEQ ID NO: 37)

表 13. 鼠抗 FGF21 單株抗體之輕鏈 CDR 序列.

抗體	CDR L1	CDR L2	CDR L3
4	TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 38)	RTTNLAS (SEQ ID NO: 42)	HQYHRSPPTWT (SEQ ID NO: 46)
9	RASENIYSYLA (SEQ ID NO: 39)	NIRTLAE (SEQ ID NO: 43)	QHHYDSPWT (SEQ ID NO: 47)
11	SAGSSVSYMY (SEQ ID NO: 40)	LTSNLAS (SEQ ID NO: 44)	QQWSSNPRT (SEQ ID NO: 48)
15	RSSQIIVHNNGDTYLE (SEQ ID NO: 41)	KISNRFS (SEQ ID NO: 45)	FQGSHPVY (SEQ ID NO: 49)

### 實例 5：FGF21 ELISA 分析之優化

【0350】 將實例 4 中描述之 FGF21 ELISA 分析進一步優化以改良分析之靈敏度。

【0351】 將不同捕獲抗體相比較以確定哪種捕獲抗體產生更優良之偵測。對抗體 mAb4 與 mAb9 作為捕獲抗體進行測試。如圖 11 中所示，與 mAb9 相比使用 mAb4 作為捕獲抗體獲得較佳分析靈敏度。

【0352】 針對總 FGF21 分析及活性 FGF21 分析在固定偵測抗體濃度下對不同類型之塗佈緩衝液及不同濃度之塗佈抗體進行分析。在不同塗佈抗體濃度下分析碳酸氫鹽塗佈緩衝液及 PBS 塗佈緩衝液。如圖 12 中所示，對於總 FGF21 分析，碳酸氫鈉與 PBS 塗佈緩衝液甚至在不同塗佈抗體濃度下亦觀測到類似孔內靈敏度。舉例而言，塗佈含 2  $\mu\text{g/ml}$  mAb4 之 PBS 具有 2  $\text{pg/ml}$  之孔內靈敏度且塗佈 2  $\mu\text{g/ml}$  之 mAb4 具有 3  $\text{pg/ml}$  之孔內靈敏度。

【0353】 對於活性 FGF21 分析，碳酸氫鈉與 PBS 塗佈緩衝液觀測到類似孔內靈敏度(圖 13)。

【0354】 進行其他實驗以確定偵測抗體(mAb15)之濃度及辣根過氧化物(HRP)之濃度對總 FGF21 分析的靈敏度之影響。對於偵測抗體測試 0.2、1 及 2  $\mu\text{g/ml}$  之濃度且對於 HRP 測試 1/100 及 1/500 之稀釋度。如圖 14 中所示，較高濃度之偵測抗體及 HRP 未顯著改良分析之靈敏度。

#### 實例 6：使用 Quanterix Simoa 之 FGF21 偵測分析

【0355】 基於 ELISA 模式之優化，如實例 5 中所論述，將使用 Quanterix Simoa HD-1 Analyzer™之分析調整為使用 mAb4 作為捕獲抗體，且生物素化之

mAb15 (用於偵測總 FGF21)或生物素化之 C-ter pAb (用於偵測活性 FGF21)作為偵測抗體。分析之示意圖顯示於圖 15 中。

【0356】 提供了免疫分析之概述。Quanterix Simoa 免疫分析以使用 2-步分析方案用酶接合物(鏈黴親和素  $\beta$ -半乳糖苷酶(SBG))捕獲及標記總 FGF21 開始(圖 16)。在第一步中將用接合至 mAb4 之磁性珠粒捕獲之總 FGF21 與生物素化之偵測抗體(用於總 FGF21 之 mAb15-生物素或用於活性 FGF21 之 C-ter pAb-生物素)添加在一起，以形成捕獲之分析物夾心，接著添加 SBG 以便在第二步中進行偵測。在各步驟之間，洗滌珠粒。在各洗滌循環期間，儀器使用磁體使珠粒集結成糰粒，然後自動吸出上清液。在最後一個洗滌循環之後，將捕獲珠粒再懸浮於試鹵靈  $\beta$ -D-半乳哌喃糖苷(RGP)受質中。接著將珠粒轉移至 Simoa 圓盤之入口端為成像及分析物定量作準備。

【0357】 在捕獲及標記 FGF21 之後，將捕獲珠粒加載至含有 216,000 個 40- $\mu$ L 孔之陣列中，各孔已經尺寸調節以固持不超過每孔一個珠粒(4.25  $\mu$ m 寬，3.25  $\mu$ m 深)。通過入口通道推動珠粒懸浮液且置於陣列上。允許珠粒經由重力沈入孔中持續約 90 秒。將油等分試樣分配於陣列入口通道中且將陣列拉過來，將珠粒及 RGP 受質捕獲於微孔中並且自表面移除過量珠粒。若已捕獲且標記 FGF21 分子，則 SBG 將 RGP 受質水解為螢光產物試鹵靈。螢光產物在密封之微孔內積累，使得能夠偵測單分子。

【0358】 使用兩步 EDAC 偶合方案(Simoa Homebrew 2.0 多重珠粒塗佈方案 USER-213-11)製備多重捕獲珠粒。使珠粒與 0.5 mg/mL mAb4 及 0.25 mg/mL EDAC 偶合。在抗體一級胺基與珠粒上之羧基之間發生偶合反應。

【0359】 在 96 孔 Nunc™ 96 孔聚丙烯 MicroWell™板(V 形底，Thermo Scientific Nunc 249944, Rochester, NY)中進行 Quanterix Simoa 分析。對於標準曲線，將重組完整人類 FGF21 (iFGF21)及裂解之人類 FGF21 (cFGF21)在 Simoa 緩衝液(PBS pH 7.4，2% BSA (級分 B，不含蛋白酶)，0.1% Tween，5 mM EDTA) (0.200-500 pg/mL) (圖 17)或魔法緩衝液(BA010) (圖 19-25、28-32 及 33-37)中連續稀釋。為測定 FGF21 之未知濃度(例如於血漿或血清中)，將測試樣品在 Simoa 緩衝液或魔法緩衝液中以 1:5-1:20 加以稀釋。將分析板與所需之推薦試劑一起加載至 Simoa HD-1 Analyzer 中。在各孔中，對於各反應，使用 32  $\mu$ L 之接合至 mAb 4 之捕獲珠粒、32  $\mu$ L 之 1  $\mu$ g/mL 之偵測抗體(mAb15-生物素或 C-ter pAb-生物素)及 110  $\mu$ L 之 SBG。對於各孔，一式兩份進行分析。選擇製造商之預設 Homebrew 分析作為自動化程序之程式。關於分析方案之其他資訊提供於圖 18 中。

【0360】 如圖 19 中所示，總(T) FGF21 之基於 Quanterix Simoa 之分析(QSA)以 0.3 pg/ml 之孔內靈敏度(基於 2 倍空白孔平均 AEB)偵測完整(野生型(WT)) FGF21，且以 0.6 pg/ml 之孔內靈敏度偵測不具有最後 10 個 C 端胺基酸之裂解(CL)形式之 FGF21。活性(A) FGF21 QSA 以 1.8 pg/ml 之孔內靈敏度偵測完整 FGF21。與傳統 ELISA 相比在總 FGF21 與活性 FGF21 QSA 兩者中均觀測到分析靈敏度之顯著改良。圖 20 顯示總體及活性 FGF21 分析之標準曲線效能的代表圖。觀測到良好標準曲線效能。

### 實例 7：使用 Quanterix Simoa 之 FGF21 偵測分析的優化

【0361】 將實例 6 中描述之 FGF21 QSA 進一步優化以改良分析之靈敏度。

【0362】 分析了分析稀釋劑類型對分析靈敏度之影響。測試了兩種不同稀釋劑，BA010 稀釋劑(PBS，0.5% BSA，0.25% CHAPS，5mM EDTA，0.35M NaCl，0.05% Tween-20，0.05% Proclin 300，pH 7.4)及 IL-12 稀釋劑(PBS，1.5% BSA，0.15% Tween-20，0.05% Proclin 300，pH 7.4)。BA010 稀釋劑對於總體及活性 FGF21 分析兩者均表現良好，且產生較低之背景值及改良之靈敏度(圖 21)。

【0363】 亦分析了順磁性珠粒之濃度對分析靈敏度之影響。測試了兩種不同濃度，每毫升  $1.22 \times 10^7$  個珠粒之「高」珠粒濃度及每毫升  $0.59 \times 10^7$  個珠粒之「低」珠粒濃度。如圖 22 中所示，對於總 FGF21 分析在高珠粒濃度與低珠粒濃度之間觀測到類似分析靈敏度。然而，對於活性 FGF21 分析在低珠粒濃度下觀測到改良之靈敏度(圖 22)。特定而言，與在低珠粒濃度情況下觀測到 0.6 pg/ml 之孔內靈敏度相比，當使用高珠粒濃度時活性 FGF21 分析具有 1.2 pg/ml 之孔內靈敏度。亦分析了三種不同順磁性珠粒批次。如圖 23 中所示，在本發明批次及新批次之捕獲順磁性珠粒情況下觀測到類似結合曲線及分析靈敏度。優化之分析參數顯示於表 14 中。

表 14. 優化之分析參數.

試劑	濃度
分析稀釋劑(BA010)	1X
珠粒	每毫升 $0.59 \times 10^7$ 個珠粒
偵測抗體(總體，活性)	0.8 $\mu$ g/mL，2.2 $\mu$ g/mL
SBG	310pM

【0364】 針對總 FGF21 分析測試了不同偵測抗體。測試了抗體 mAb11、mAb15 及 C-ter pAb。在總 FGF21 分析中在各種偵測抗體情況下觀測到類似靈敏度(圖 24)。然而，mAb15 之曲線具有最低背景值。

【0365】 由圖 14、19 及 22 中所示之結果，確定對於總體及活性 FGF21 分析而言經優化之偵測抗體及 SBG 之濃度(表 15)。當偵測抗體及 SBG 之濃度增加時總 FGF21 與活性 FGF21 分析兩者之分析靈敏度均改良。在 0.8  $\mu\text{g/mL}$  之偵測抗體濃度及 310 pM 之 SBG 濃度情況下總 FGF21 分析之靈敏度得以改良，且在 2.2  $\mu\text{g/mL}$  之偵測抗體濃度及 310 pM 之 SBG 濃度情況下活性 FGF21 分析之靈敏度得以改良。

表 15. 偵測抗體濃度及 SBG 之優化.

總 FGF21 分析靈敏度(pg/ml)		
偵測抗體( $\mu\text{g/mL}$ )	SBG (pM)	
	310	155
0.8	<b>0.1</b>	0.4
0.4	0.7	0.3
活性 FGF21 分析靈敏度(pg/ml)		
偵測抗體( $\mu\text{g/mL}$ )	SBG (pM)	
	310	155
2.2	<b>0.5</b>	1.1
1.1	2.2	1.4

【0366】 對總 FGF21 分析進行進一步分析以確定是否觀測到鉤狀效應。當樣品中存在高量之分析物時典型地觀測到鉤狀效應且所觀測之值假性較低。如下進行分析：對於總體分析，藉由使用每毫升  $0.59 \times 10^7$  個珠粒之濃度的 mAb4 接合性順磁性珠粒進行捕獲且使用 0.8  $\mu\text{g/mL}$  之生物素化 mAb15 進行偵測；對於活性分析，使用每毫升  $0.59 \times 10^7$  個珠粒之濃度的 mAb4 接合性順磁性珠粒進行捕獲且使用 2.2  $\mu\text{g/mL}$  生物素化綿羊抗 FGF21 C-ter pAb 進行偵測。如圖 25 中所示，在總 FGF21 分析情況下未觀測到鉤狀效應。另外，總 FGF21 分析以類似靈敏度偵測完整人類 FGF21 及 FAP 裂解之人類 FGF21 (CL hFGF21) (圖 25)。

### 實例 8：使用 FGF21 QSA 分析血漿樣品

【0367】 使用總體及活性 FGF21 QSA 來分析自健康人類供體獲得且新製備之樣品。如實例 6 中所描述進行分析。如圖 26 中所示，分析能夠偵測健康供體血清樣品中之低含量活性 FGF21。再在高血壓或不使用任何藥物之供體中進行實驗且與使用蛋白酶抑制劑混合物 MS-SAFE 進行比較(圖 27)。再在 2 型糖尿病患者中進行實驗。如圖 28A-B 中所示，在 14 個樣品中，使用總 FGF21 分析在所有樣品(100%)中均偵測到 FGF21。對於活性 FGF21 分析，在 12/14 之樣品(86%)中偵測到 FGF21 蛋白(圖 28A-B)。自該等分析獲得之結果為可再現的(圖 29)。在總 FGF21 與活性 FGF21 分析兩者中再現性在 $\pm 30\%$ 差異內為可接受的。

【0368】 分析總體及活性 FGF21 分析之稀釋線性。對於總 FGF21 稀釋線性相較於最低所需稀釋度(MRD) (1:20 稀釋度)變化 $\pm 30\%$ 以內為可接受的，而在活性 FGF21 分析中則為在 1:40 稀釋度下(圖 30)。在初始 MRD 下觀測較高濃度之傾向。確定總體及活性 FGF21 分析之 LLOQ。對於總 FGF21 及活性 FGF21 分析，基於在最高稀釋係數下之平均計算濃度 $\pm 30\%$ 之內的可接受回收率，初步 LLOQ 經確定分別為 3.15 pg/ml 及 10.94 pg/ml (圖 31)。

【0369】 進一步分析該等分析之特異性。如圖 32 中所示，特異性係藉由在總 FGF21 及活性 FGF21 分析中在存在 10  $\mu\text{g/mL}$  之 mAb4 的情況下所有六種 2 型糖尿病血漿樣品之 AEB 值均抑制大於 90%來展現。

【0370】 將使用包括蛋白酶、酯酶及 DPP-IV 抑制劑之組合且包括抗凝劑  $\text{K}_2\text{-EDTA}$  之 P800 血液收集系統與單獨使用  $\text{K}_2\text{-EDTA}$  進行比較(圖 33)。在總 FGF21 及活性 FGF21 分析中觀測到在 P800 及  $\text{K}_2\text{EDTA}$  篩選血漿樣品之間在可接受之 $\pm 30\%$ 差異以內的類似結果(圖 34)。在總 FGF21 及活性 FGF21 分析中觀

測到 P800 與 K<sub>2</sub>-EDTA 篩選血漿樣品之間的良好相關性(圖 35-36)。分析了血漿樣品在儲存在 2-8°C 下之後的穩定性。如圖 37 中所示，在總 FGF21 及活性 FGF21 分析中觀測到在可接受之相較於 2-8°C 穩定性樣品回收率±30%以內的樣品穩定性。

**【0371】** 如圖 38 及 39 中所示，在藉由總體及活性 FGF21 分析所分析之 K<sub>2</sub>-EDTA 篩選血漿樣品中觀測到高於 100%之活性比率，表明由異嗜性抗體帶來干擾。特定而言，由 K<sub>2</sub>-EDTA 篩選血漿樣品 16 及 17 觀測到高於 100%之活性比率，但由單獨使用分析稀釋劑時之 GC29819 研究的樣品 9 及 10 未觀測到此類活性比率。活性比率高於 100%之樣品 16 及 17 含有人類抗小鼠抗體(HAMA)及人類抗綿羊抗體(HASA)，表明患者血漿樣品中 HAMA 及 HASA 之存在干擾總體及活性分析之準確性。如圖 38 及 39 中所示，HAMA 影響總體與活性分析兩者；而 HASA 僅影響活性分析。將 10 µg/ml 之小鼠 IgG 添加至總體分析之稀釋劑中及將 10 µg/ml 之綿羊 IgG 添加至活性分析之稀釋劑中分別有效移除 HAMA 及 HASA 干擾，且解決了所觀測到的高於 100%之活性比率(圖 38 及 39)。如圖 40 中所示，分析稀釋劑中存在 10 µg/ml 之抗小鼠 IgG 或抗綿羊 IgG 未分別影響總體及活性分析之標準曲線。

### 實例 9：嵌合抗 FGF21 抗體

**【0372】** 將抗體 mAb4、mAb9、mAb11 及 mAb15 接枝至具有 K149C 突變之人類 IgG1 構架上以產生小鼠/人類嵌合抗 FGF21 抗體，其具有小鼠 VH 及 VL 區及具有 K149C 突變之人類恆定區。嵌合抗體之胺基酸序列提供於下表 16-19 及圖 41A 及 41B 中。

表 16

<b>嵌合 Ab4 (FGF21.GN36.4.hIgG1 ; PRO418189)</b>
全長輕鏈胺基酸序列 QIVLTQSPA IMSAPLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKVWIYRTTNL ASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPPTWTFGGGKVEIK RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 63)
全長重鏈胺基酸序列 EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATISTG GGYTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRSEDAMYYCARHDLVDWYFD VWGTGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 67)
輕鏈可變區 QIVLTQSPA IMSAPLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKVWIYRTTNL ASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPPTWTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 71)
重鏈可變區 EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATISTG GGYTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRSEDAMYYCARHDLVDWYFD VWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 75)

表 17

<b>嵌合 Ab9 (FGF21.GN36.9.hIgG1 ; PRO418190)</b>
全長輕鏈胺基酸序列 DIQMTQSPASLSASVGETVIITCRASENIYSYLA WYQQKQKGKSPQLLVYNIRTLA EGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYDSPWTFGGGKVEIKRTV AAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 62)
全長重鏈胺基酸序列 EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYYMGWVKQSHGKSLEWIGDINP NNGVTINNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLASEDTAVYYCTRGYGGALD YWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 66)
輕鏈可變區 DIQMTQSPASLSASVGETVIITCRASENIYSYLA WYQQKQKGKSPQLLVYNIRTLA EGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYDSPWTFGGGKVEIK

(SEQ ID NO: 70)
重鏈可變區 EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYMGWVKQSHGKSLEWIGDINP NNGVTINNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLASEDTAVYYCTRGYGGALD YWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 74)

表 18

<b>嵌合 Ab11 (FGF21.GN36.11.hIgG1 ; PRO418191)</b>
全長輕鏈胺基酸序列 QIVLTQSPALMSASPGERVMTMTCASGSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIYLTSLNLA SGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPRTFGGGTKVEIKRTV AAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 61)
全長重鏈胺基酸序列 QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTNYGISWVKQRTGQGLEWIGEIYPR SDNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCTRSDYGFFDYW GQGTTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 65)
輕鏈可變區 ALMSASPGERVMTMTCASGSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIYLTSLNLAGVPARFS GSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 69)
重鏈可變區 QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTNYGISWVKQRTGQGLEWIGEIYPR SDNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCTRSDYGFFDYW GQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 73)

表 19

<b>嵌合 Ab15 (FGF21.GN36.15.hIgG1 ; PRO418192)</b>
全長輕鏈胺基酸序列 DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQIIVHNNGDYLEWYLQKPGQSPKLLIYKI SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGKVEI KRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 60)
全長重鏈胺基酸序列 QVQLIQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTGYAIHWVRQSPGKGLEWLGMIWKSG NTDYNAAFMSRLSITKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARNGYDYEFVYWG QGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE

SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH  
YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 64)

輕鏈可變區

DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQIIVHNNGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKI  
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKVEI  
K (SEQ ID NO: 68)

重鏈可變區

QVQLIQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTGYAIHWVRQSPGKGLEWLGMIWKSG  
NTDYNAAFMSRLSITKDNSK SQVFFKMNSLQADDTAIYYCARNGYDYEFVYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 72)

**【0373】** 除所描繪及主張之各個實施例外，所揭示之主題亦係有關具有本文所揭示及主張之特徵的其他組合之其他實施例。因而，本文所呈現之特定特徵可在所揭示主題之範疇內以其他方式彼此組合，使得所揭示之主題包括本文所揭示之特徵的任何適合之組合。已出於說明及描述之目的呈現對所揭示主題之特定實施例的前述描述。其不旨在為詳盡的或將所揭示之主題限制於彼等所揭示之實施例。

**【0374】** 對熟習此項技術者而言將顯而易見的是，可在不背離所揭示主題之精神或範疇之情況下在所揭示主題的組合物及方法中作出各種修改及變化。因此，所揭示之主題旨在包括在隨附申請專利範圍及其等效物範疇內之修改及變化。

**【0375】** 本文引用了各種出版物、專利以及專利申請案，該等文獻之內容以全文引用之方式併入本文中。

## 【序列表】

<110> 美商建南德克公司

<120> 偵測及定量 FGF21 之方法

<130> 00B206.0809

<150> 62/652,701

<151> 2018-04-04

<160> 77

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 181

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

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

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His  
20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser  
35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln  
50 55 60

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

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg  
85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His  
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

第1頁(序列表)

115

120

125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro  
 130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val  
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser  
 165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser  
 180

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 194

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 2

Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp  
 1 5 10 15

Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly  
 20 25 30

Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys  
 35 40 45

Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala  
 50 55 60

Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys  
 65 70 75 80

Met Gly Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu  
 85 90 95

Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr  
 100 105 110

第 2 頁(序列表)

Arg Ser Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln  
 115 120 125

Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu  
 130 135 140

Pro Met Leu Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His  
 145 150 155 160

Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp  
 165 170 175

Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe  
 180 185 190

Glu Lys

<210> 3

<211> 192

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro His Val His Tyr Gly Trp Gly Asp  
 1 5 10 15

Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser  
 20 25 30

Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg  
 35 40 45

Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg  
 50 55 60

Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly  
 65 70 75 80

Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys  
85 90 95

Ala Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser  
100 105 110

Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln  
115 120 125

Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met  
130 135 140

Leu Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu  
145 150 155 160

Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe  
165 170 175

Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys  
180 185 190

<210> 4

<211> 189

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 4

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

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His  
20 25 30

Leu Glu Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly Gln Ser  
35 40 45

Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val Ala  
 50 55 60

Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly  
 65 70 75 80

Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu  
 85 90 95

Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His  
 100 105 110

Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys  
 115 120 125

Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met  
 130 135 140

Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met  
 145 150 155 160

Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val  
 165 170 175

Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys  
 180 185

<210> 5  
 <211> 189  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 5  
 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val  
 1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

第 5 頁(序列表)

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

<210> 6  
 <211> 189  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

第 6 頁(序列表)

&lt;400&gt; 6

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

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His  
                   20                   25                   30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser  
                   35                   40                   45

Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val Ala  
                   50                   55                   60

Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly  
 65                   70                   75                   80

Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu  
                   85                   90                   95

Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His  
                   100                   105                   110

Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys  
                   115                   120                   125

Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met  
                   130                   135                   140

Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met  
 145                   150                   155                   160

Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val  
                   165                   170                   175

Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys  
                   180                   185

&lt;210&gt; 7

第 7 頁(序列表)

<211> 189  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 7

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

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His  
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser  
 35 40 45

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

Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly  
 65 70 75 80

Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu  
 85 90 95

Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His  
 100 105 110

Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys  
 115 120 125

Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met  
 130 135 140

Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met  
 145 150 155 160

Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val  
 165 170 175

第 8 頁(序列表)

Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys  
 180 185

<210> 8  
 <211> 189  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 8  
 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val  
 1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His  
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser  
 35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln  
 50 55 60

Ile Leu Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly  
 65 70 75 80

Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu  
 85 90 95

Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His  
 100 105 110

Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys  
 115 120 125

Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met  
 130 135 140

Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met  
 145 150 155 160

Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val  
 165 170 175

Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys  
 180 185

<210> 9

<211> 189

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 9

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

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His  
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser  
 35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln  
 50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly  
 65 70 75 80

Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu  
 85 90 95

Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His  
 100 105 110

Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys  
 115 120 125

Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met  
 130 135 140

Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met  
 145 150 155 160

Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val  
 165 170 175

Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys  
 180 185

<210> 10  
 <211> 187  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 10  
 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val  
 1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His  
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser  
 35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln  
 50 55 60

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

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85

90

95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His  
 100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro  
 115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Met Leu Pro Met Val Pro  
 130 135 140

Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser  
 145 150 155 160

Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly  
 165 170 175

Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys  
 180 185

<210> 11  
 <211> 183  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 11  
 Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly  
 1 5 10 15

Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu  
 20 25 30

Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp  
 35 40 45

Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val  
 50 55 60

Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro  
65 70 75 80

Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser  
85 90 95

Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu  
100 105 110

Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg  
115 120 125

Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu  
130 135 140

Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro  
145 150 155 160

Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly  
165 170 175

Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser  
180

<210> 12  
<211> 186  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 12  
Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp  
1 5 10 15

Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly  
20 25 30

Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly  
 35 40 45

Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys  
 50 55 60

Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys  
 65 70 75 80

Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu  
 85 90 95

Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr  
 100 105 110

Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser  
 115 120 125

Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu  
 130 135 140

Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro  
 145 150 155 160

Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro  
 165 170 175

Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser  
 180 185

<210> 13  
 <211> 186  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 13

Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp  
1 5 10 15

Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly  
20 25 30

Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Thr Val Gly Gly  
35 40 45

Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys  
50 55 60

Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys  
65 70 75 80

Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu  
85 90 95

Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr  
100 105 110

Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser  
115 120 125

Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu  
130 135 140

Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro  
145 150 155 160

Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro  
165 170 175

Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser  
180 185

<210> 14  
<211> 186  
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 14

Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp  
1                   5                   10                   15

Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly  
                  20                   25                   30

Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys  
          35                   40                   45

Ala Arg Gly Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys  
      50                   55                   60

Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys  
65                   70                   75                   80

Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu  
                  85                   90                   95

Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr  
          100                   105                   110

Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser  
          115                   120                   125

Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu  
      130                   135                   140

Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro  
145                   150                   155                   160

Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro  
                  165                   170                   175

Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser  
 180 185

<210> 15  
 <211> 186  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

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

Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly  
 20 25 30

Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys  
 35 40 45

Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys  
 50 55 60

Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys  
 65 70 75 80

Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu  
 85 90 95

Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr  
 100 105 110

Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser  
 115 120 125

Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu  
 130 135 140

Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro

第 17 頁(序列表)

145                    150                    155                    160  
 Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro  
                                     165                                      170                                      175  
  
 Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser  
                                     180                                      185  
  
 <210> 16  
 <211> 186  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」  
  
 <400> 16  
 Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp  
 1                                      5                                      10                                      15  
  
 Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly  
                                     20                                      25                                      30  
  
 Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys  
                                     35                                      40                                      45  
  
 Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala  
                                     50                                      55                                      60  
  
 Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys  
 65                                      70                                      75                                      80  
  
 Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu  
                                     85                                      90                                      95  
  
 Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr  
                                     100                                      105                                      110  
  
 Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser  
                                     115                                      120                                      125

第 18 頁(序列表)

Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu  
 130 135 140

Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro  
 145 150 155 160

Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro  
 165 170 175

Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser  
 180 185

<210> 17  
 <211> 188  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 17  
 Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp  
 1 5 10 15

Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly  
 20 25 30

Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys  
 35 40 45

Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala  
 50 55 60

Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys  
 65 70 75 80

Met Gly Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu  
 85 90 95

Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr  
 100 105 110

Arg Ser Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln  
 115 120 125

Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu  
 130 135 140

Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu  
 145 150 155 160

Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val  
 165 170 175

Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser  
 180 185

<210> 18

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 18

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu  
65 70 75 80

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

Pro Thr Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala  
100 105 110

Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu  
115 120 125

Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
130 135 140

Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn  
145 150 155 160

Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
165 170 175

Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His  
180 185 190

Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile  
195 200 205

Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
210 215

<210> 19  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 19  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
210

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

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 20  
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly  
1                   5                   10                   15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Gly Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                  20                   25                   30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
          35                   40                   45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
65                   70                   75                   80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Arg Thr  
                  85                   90                   95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro  
                  100                   105                   110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly  
          115                   120                   125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn  
      130                   135                   140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn

145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser  
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr  
180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe  
195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys  
210

<210> 21  
<211> 219  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 21  
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

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

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

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

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

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
 145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
 180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
 195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 210 215

<210> 22  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 22  
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg His Asp Leu Val Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr  
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu  
 130 135 140

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

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

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser  
 180 185 190

Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser  
 195 200 205

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

Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro  
 225 230 235 240

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

Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp  
 260 265 270

Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr  
 275 280 285

Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val  
 290 295 300

Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu  
 305 310 315 320

Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg  
 325 330 335

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

Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr  
 355 360 365

Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr  
 370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys  
 405 410 415

Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu  
 420 425 430

Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly

435

440

445

Lys

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 447

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 來源

&lt;223&gt; /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

&lt;400&gt; 23

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

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

Tyr Met Gly Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
          35                   40                   45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Ile Asn Asn Gln Asn Phe  
          50                   55                   60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65                   70                   75                   80

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

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

Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu  
          115                   120                   125

Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys  
          130                   135                   140

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

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

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp  
180 185 190

Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys  
210 215 220

Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
225 230 235 240

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

Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp  
260 265 270

Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln  
275 280 285

Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser  
290 295 300

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys  
305 310 315 320

Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile  
325 330 335

Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro

340

345

350

Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met  
 355 360 365

Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn  
 370 375 380

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

Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn  
 405 410 415

Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu  
 420 425 430

His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 24

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 24

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Asp Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

第 30 頁(序列表)

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala 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 Phe Cys  
85 90 95

Thr Arg Ser Asp Tyr Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu  
115 120 125

Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys  
130 135 140

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

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

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp  
180 185 190

Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys  
210 215 220

Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
225 230 235 240

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

Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp

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

<210> 25  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 25

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

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

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

Gly Met Ile Trp Lys Ser Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met  
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu  
115 120 125

Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys  
130 135 140

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

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

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp

	180		185		190														
Pro	Ser	Gln	Ser	Ile	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr				
		195					200					205							
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys				
	210					215					220								
Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val				
225					230					235					240				
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser				
				245					250					255					
Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp				
			260					265					270						
Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln				
		275					280					285							
Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser				
	290					295					300								
Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys				
305					310					315					320				
Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile				
				325					330					335					
Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro				
			340					345					350						
Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met				
		355					360					365							
Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn				
		370				375					380								

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

Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn  
 405 410 415

Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu  
 420 425 430

His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 26  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 26  
 Ser Tyr Gly Met Ser  
 1 5

<210> 27  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 27  
 Asp Tyr Tyr Met Gly  
 1 5

<210> 28  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 28

Asn Tyr Gly Ile Ser  
1                   5

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 29

Gly Tyr Ala Ile His  
1                   5

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 30

Thr Ile Ser Thr Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
1                   5                   10                   15

Gly

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 31

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Ile Asn Asn Gln Asn Phe Lys  
1                   5                   10                   15

Gly

<210> 32  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 32  
 Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Asp Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1                   5                   10                   15

Gly

<210> 33  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 33  
 Met Ile Trp Lys Ser Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met Ser  
 1                   5                   10                   15

<210> 34  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 34  
 His Asp Leu Val Asp Trp Tyr Phe Asp Val  
 1                   5                   10

<210> 35  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 35  
Gly Tyr Gly Gly Ala Leu Asp Tyr  
1 5

<210> 36  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 36  
Ser Asp Tyr Gly Phe Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 37  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 37  
Asn Gly Tyr Asp Tyr Glu Phe Val Tyr  
1 5

<210> 38  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

&lt;400&gt; 38

Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His  
 1                      5                      10

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 來源

&lt;223&gt; /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

&lt;400&gt; 39

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala  
 1                      5                      10

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 來源

&lt;223&gt; /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

&lt;400&gt; 40

Ser Ala Gly Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr  
 1                      5                      10

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 來源

&lt;223&gt; /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

&lt;400&gt; 41

Arg Ser Ser Gln Ile Ile Val His Asn Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu  
 1                      5                      10                      15

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 42

Arg Thr Thr Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 43

Asn Ile Arg Thr Leu Ala Glu

1 5

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 44

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 45

Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 46  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 46  
His Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr Trp Thr  
1                  5                  10

<210> 47  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 47  
Gln His His Tyr Asp Ser Pro Trp Thr  
1                  5

<210> 48  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 48  
Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Arg Thr  
1                  5

<210> 49  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成肽」

<400> 49

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 50

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 50

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser  
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu  
65 70 75 80

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

Pro Thr Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 51

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 51

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

Glu Thr Val Ile Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
                          20                           25                           30

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

Tyr Asn Ile Arg Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
          50                           55                           60

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

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Asp Ser Pro Trp  
                          85                           90                           95

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

<210> 52

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 52

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Gly Ser Ser Val Ser Tyr Met  
          20                           25                           30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

第 43 頁(序列表)

35

40

45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Arg Thr  
 85 90 95

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

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 來源

&lt;223&gt; /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

&lt;400&gt; 53

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

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

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95

第 44 頁(序列表)

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 54  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 54  
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg His Asp Leu Val Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 55  
 <211> 117  
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 55

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

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

Tyr Met Gly Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Ile Asn Asn Gln Asn Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 56

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 56

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Asp Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala 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 Phe Cys  
 85 90 95

Thr Arg Ser Asp Tyr Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 57  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 57  
 Gln Val Gln Leu Ile Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

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

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

Gly Met Ile Trp Lys Ser Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met  
 50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ala  
 115

<210> 58

<211> 171

<212> PRT

<213> 智人

<400> 58

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

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His  
 20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser  
 35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln  
 50 55 60

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

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg  
 85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His  
 100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro  
 115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro  
 130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val  
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro  
 165 170

<210> 59  
 <211> 177  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 59  
 Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg  
 20 25 30

Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu  
 35 40 45

Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val  
 50 55 60

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly  
 65 70 75 80

Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu  
 85 90 95

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu

第 49 頁(序列表)

100

105

110

His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly  
 115 120 125

Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu  
 130 135 140

Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp  
 145 150 155 160

Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala  
 165 170 175

Ser

<210> 60  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 60  
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

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

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

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

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

第 50 頁(序列表)

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
                     85                            90                            95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                     100                            105                            110

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 61  
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1                    5                            10                            15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Gly Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Arg Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
130 135 140

Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 62  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 62  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                   5                   10                   15

Glu Thr Val Ile Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
                   20                   25                   30

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

Tyr Asn Ile Arg Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
       50                   55                   60

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

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Asp Ser Pro Trp  
                   85                   90                   95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val 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 Cys 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> 63

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 63

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu  
 65 70 75 80

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

Pro Thr Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
 130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 145 150 155 160

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 64  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 64  
 Gln Val Gln Leu Ile Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

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

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 65  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 65  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala  
 1                    5                    10                    15

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

Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                    40                    45

Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Asp Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe  
                   50                    55                    60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala 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 Phe Cys  
                   85                    90                    95

Thr Arg Ser Asp Tyr Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
                   100                    105                    110

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 66  
<211> 447  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 66  
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

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

Tyr Met Gly Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Ile Asn Asn Gln Asn Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 67  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 67

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg His Asp Leu Val Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 68  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 68  
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

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

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 69  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 69  
 Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser  
 1                   5                   10                   15

Ala Gly Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg  
                   20                   25                   30

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

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

Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 65                   70                   75                   80

Gln Trp Ser Ser Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
                   85                   90                   95

Ile Lys

<210> 70  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 70  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                   5                   10                   15

Glu Thr Val Ile Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
 20 25 30

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

Tyr Asn Ile Arg Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Asp Ser Pro Trp  
 85 90 95

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

<210> 71  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 來源  
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 71  
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Pro Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser  
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu  
65 70 75 80

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

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

<210> 72

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 72

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

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

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

Gly Met Ile Trp Lys Ser Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met  
50 55 60

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

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

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

第 68 頁(序列表)

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 73  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> 來源  
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 73  
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala  
1 5 10 15

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

Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Asp Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala 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 Phe Cys  
85 90 95

Thr Arg Ser Asp Tyr Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 74  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 74

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

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

Tyr Met Gly Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Ile Asn Asn Gln Asn Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 75

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成多肽」

<400> 75

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg His Asp Leu Val Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 76  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 76  
 His Pro Ile Pro  
 1

<210> 77  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 77  
 Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser  
 1 5 10

**【發明申請專利範圍】**

**【第 1 項】** 一種用於測定樣品中之總 FGF21 蛋白之量的免疫分析方法，該方法包括：

- (a) 使結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的捕獲抗體與該樣品接觸，以產生樣品-捕獲抗體組合物質；
- (b) 使該樣品-捕獲抗體組合物質與結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的偵測抗體接觸；
- (c) 偵測結合於該樣品-捕獲抗體組合物質之該偵測抗體；及
- (d) 基於所結合之該偵測抗體之水準計算存在於該樣品中的總 FGF21 蛋白之量。

**【第 2 項】** 如申請專利範圍第 1 項之免疫分析方法，其中該捕獲抗體及該偵測抗體結合於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之不同抗原決定基。

**【第 3 項】** 一種用於測定樣品中之活性 FGF21 蛋白之量的免疫分析方法，該方法包括：

- (a) 使結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的捕獲抗體與該樣品接觸，以產生樣品-捕獲抗體組合物質；
- (b) 使該樣品-捕獲抗體組合物質與結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 內之抗原決定基的偵測抗體接觸；
- (c) 偵測結合於該樣品-捕獲抗體組合物質之該偵測抗體；及
- (d) 基於所結合之該偵測抗體之水準計算存在於該樣品中的活性 FGF21 蛋白之量。

【第 4 項】一種用於測定樣品中活性 FGF21 蛋白與總 FGF21 蛋白之比率的免疫分析方法，該方法包括：

(a) (i)使結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的第一捕獲抗體與該樣品接觸，以產生第一樣品-捕獲抗體組合物質；(ii)使該第一樣品-捕獲抗體組合物質與結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的第一偵測抗體接觸；(iii)偵測結合於該樣品-捕獲抗體組合物質之該第一偵測抗體；及(iv)基於所結合之該第一偵測抗體之水準計算存在於該樣品中的總 FGF21 蛋白之量；

(b) (i)使結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基的第二捕獲抗體與該樣品接觸，以產生第二樣品-捕獲抗體組合物質；(ii)使該第二樣品-捕獲抗體組合物質與結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 內之抗原決定基的第二偵測抗體接觸；(iii)偵測結合於該樣品-捕獲抗體組合物質之該第二偵測抗體；及(iv)基於所結合之該第二偵測抗體之水準計算存在於該樣品中的活性 FGF21 蛋白之量；及

(c) 將如藉由步驟(a)所測定之總 FGF21 蛋白的量與如藉由步驟(b)所測定之活性 FGF21 蛋白的量相比較，以確定該樣品中活性 FGF21 蛋白與總 FGF21 蛋白之比率。

【第 5 項】如申請專利範圍第 4 項之免疫分析方法，其中該第一捕獲抗體及該第一偵測抗體結合於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之不同抗原決定基。

- 【第 6 項】如申請專利範圍第 4 項之免疫分析方法，其中該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體為相同抗體。
- 【第 7 項】如申請專利範圍第 1 項至第 6 項中任一項之免疫分析方法，其中該免疫分析為酶聯免疫吸附分析(ELISA)。
- 【第 8 項】如申請專利範圍第 1 項至第 7 項中任一項之免疫分析方法，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者固定至順磁性珠粒。
- 【第 9 項】如申請專利範圍第 1 項至第 8 項中任一項之免疫分析方法，其中該偵測抗體、該第一偵測抗體及該第二偵測抗體中之一或多者接合至生物素。
- 【第 10 項】如申請專利範圍第 1 項至第 9 項中任一項之免疫分析方法，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者以約  $10^{-10}$  M 至  $10^{-13}$  M 之  $K_d$  結合於 FGF21。
- 【第 11 項】如申請專利範圍第 1 項及第 4 項至第 9 項中任一項之免疫分析方法，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者以約  $10^{-10}$  M 至  $10^{-13}$  M 之  $K_d$  結合於 FGF21。
- 【第 12 項】如申請專利範圍第 1 項至第 11 項中任一項之免疫分析方法，其中該樣品為血液樣品。
- 【第 13 項】如申請專利範圍第 1 項至第 11 項中任一項之免疫分析方法，其中該樣品為血漿樣品。

【第 14 項】 如申請專利範圍第 1 項至第 13 項中任一項之免疫分析方法，其中該方法以約 2 pg/ml 至約 20 pg/ml 之孔內靈敏度偵測該樣品中之總體或活性 FGF21 蛋白的量。

【第 15 項】 如申請專利範圍第 1 項至第 13 項中任一項之免疫分析方法，其中該免疫分析方法係使用單分子偵測儀器進行。

【第 16 項】 如申請專利範圍第 15 項之免疫分析方法，其中該單分子偵測儀器為 Quanterix Simoa HD-1 Analyzer™。

【第 17 項】 如申請專利範圍第 15 項或第 16 項之免疫分析方法，其中該方法以約 0.2 pg/ml 至約 0.5 pg/ml 之孔內靈敏度偵測該樣品中之總體或活性 FGF21 蛋白的量。

【第 18 項】 如申請專利範圍第 1 項至第 17 項中任一項之免疫分析方法，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 26 及 27 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 30 及 31 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 34 及 35 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 38 及 39 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 42 及 43 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 46 及 47 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【第 19 項】** 如申請專利範圍第 1 項至第 17 項中任一項之免疫分析，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 54、55、74 及 75 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 50、51、70 及 71 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【第 20 項】** 如申請專利範圍第 1 項至第 17 項中任一項之免疫分析，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 22、23、66 及 67 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 18、19、62 及 63 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【第 21 項】** 如申請專利範圍第 1 項及第 4 項至第 17 項中任一項之免疫分析方法，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 28 及 29 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 32 及 33 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 36 及 37 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 40 及 41 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 44 及 45 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 48 及 49 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【第 22 項】** 如申請專利範圍第 1 項及第 4 項至第 17 項中任一項之免疫分析，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 56、57、72 及 73 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 52、53、68 及 69 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【第 23 項】** 如申請專利範圍第 1 項及第 4 項至第 17 項中任一項之免疫分析，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 24、25、64 及 65 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 20、21、60 及 61 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【第 24 項】** 如申請專利範圍第 18 項之免疫分析方法，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 26 之胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 30 之胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 34 之胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含 SEQ ID NO: 38 之胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 42 之胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 46 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 25 項】** 如申請專利範圍第 24 項之免疫分析，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 54 之胺基酸序列及其保守取代；  
及

(b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 50 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 26 項】** 如申請專利範圍第 25 項之免疫分析，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 22 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 18 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 27 項】** 如申請專利範圍第 21 項之免疫分析方法，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈可變區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 29 之胺基酸序列及其保守取代；
- (b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 33 之胺基酸序列及其保守取代；
- (c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列及其保守取代；
- (d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含 SEQ ID NO: 41 之胺基酸序列及其保守取代；
- (e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 45 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 49 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 28 項】** 如申請專利範圍第 27 項之免疫分析，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 57 之胺基酸序列及其保守取代；

及

(b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 53 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 29 項】** 如申請專利範圍第 28 項之免疫分析，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 25 之胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 21 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 30 項】** 如申請專利範圍第 1 項至第 17 項中任一項之免疫分析方法，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者與包含以下各項之抗體競爭性結合：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 26 及 27 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 30 及 31 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 34 及 35 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 38 及 39 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 42 及 43 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 46 及 47 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【第 31 項】** 如申請專利範圍第 1 項及第 4 項至第 17 項中任一項之免疫分析方法，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者與包含以下各項之抗體競爭性結合：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 28 及 29 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 32 及 33 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 36 及 37 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 40 及 41 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 44 及 45 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 48 及 49 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【第 32 項】** 一種用於偵測樣品中之總 FGF21 蛋白的套組，其包含：

(a) 捕獲抗體或其抗原結合部分，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基；

(b) 偵測抗體或其抗原結合部分，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基；及

(c) 偵測劑。

【第 33 項】 如申請專利範圍第 32 項之套組，其中該捕獲抗體及該偵測抗體結合於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之不同抗原決定基。

【第 34 項】 一種用於偵測樣品中之活性 FGF21 蛋白的套組，其包含：

(a) 捕獲抗體或其抗原結合部分，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基；

(b) 偵測抗體或其抗原結合部分，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 內之抗原決定基；及

(c) 偵測劑。

【第 35 項】 一種用於測定樣品中活性 FGF21 蛋白與總 FGF21 蛋白之比率之套組，其包含：

(a) (i)第一捕獲抗體或其抗原結合部分，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基，及(ii)第一偵測抗體或其抗原結合部分，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基；

(b) (i)第二捕獲抗體或其抗原結合部分，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之抗原決定基，及(ii)第二偵測抗體或其抗原結合部分，其結合於存在於 FGF21 之胺基酸殘基 173-182 內之抗原決定基；及

(c) 一或多種偵測劑。

- 【第 36 項】 如申請專利範圍第 35 項之套組，其中該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體為相同抗體。
- 【第 37 項】 如申請專利範圍第 35 項之套組，其中該第一捕獲抗體及該第一偵測抗體結合於 FGF21 之胺基酸殘基 5-172 內之不同抗原決定基。
- 【第 38 項】 如申請專利範圍第 32 項至第 37 項中任一項之套組，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者固定至順磁性珠粒。
- 【第 39 項】 如申請專利範圍第 32 項至第 38 項中任一項之套組，其中該偵測抗體、該第一偵測抗體及該第二偵測抗體中之一或多者接合至生物素。
- 【第 40 項】 如申請專利範圍第 32 項至第 39 項中任一項之套組，其中該偵測劑係選自由以下組成之群：鏈黴親和素- $\beta$ -D-半乳糖胺糖接合物、鏈黴親和素-辣根過氧化酶接合物及其組合。
- 【第 41 項】 如申請專利範圍第 40 項之套組，其進一步包含試鹵靈  $\beta$ -D-半乳糖胺糖苷、四甲基聯苯胺、過氧化氫或其組合。
- 【第 42 項】 如申請專利範圍第 32 項至第 41 項中任一項之套組，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者以約  $10^{-10}$  M 至  $10^{-13}$  M 之  $K_d$  結合於 FGF21。
- 【第 43 項】 如申請專利範圍第 32 項及第 35 項至第 42 項中任一項之套組，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者以約  $10^{-10}$  M 至  $10^{-13}$  M 之  $K_d$  結合於 FGF21。

【第 44 項】 如申請專利範圍第 32 項及第 35 項至第 43 項中任一項之套組，其中該偵測抗體或該第一偵測抗體具有約 0.1  $\mu\text{g/ml}$  至約 1  $\mu\text{g/ml}$  之濃度。

【第 45 項】 如申請專利範圍第 33 項至第 42 項中任一項之套組，其中該偵測抗體或該第二偵測抗體中之一或多者具有約 1  $\mu\text{g/ml}$  至約 3  $\mu\text{g/ml}$  之濃度。

【第 46 項】 如申請專利範圍第 40 項之套組，其中該鏈黴親和素- $\beta$ -D-半乳糖接合物具有約 100 pM 至約 400 pM 之濃度。

【第 47 項】 如申請專利範圍第 32 項至第 46 項中任一項之套組，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 26 及 27 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 30 及 31 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 34 及 35 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 38 及 39 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 42 及 43 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 46 及 47 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【第 48 項】** 如申請專利範圍第 32 項至第 46 項中任一項之套組，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 54、55、74 及 75 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 50、51、70 及 71 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【第 49 項】** 如申請專利範圍第 32 項至第 46 項中任一項之套組，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 22、23、66 及 67 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 18、19、62 及 63 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【第 50 項】** 如申請專利範圍第 32 項及第 35 項至第 46 項中任一項之套組，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 28 及 29 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 32 及 33 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 36 及 37 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 40 及 41 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 44 及 45 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 48 及 49 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【第 51 項】** 如申請專利範圍第 32 項及第 35 項至第 46 項中任一項之套組，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 56、57、72 及 73 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈可變區，其包含選自由 SEQ ID NO: 52、53、68 及 69 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【第 52 項】** 如申請專利範圍第 32 項及第 35 項至第 46 項中任一項之套組，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 24、25、64 及 65 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含選自由 SEQ ID NO: 20、21、60 及 61 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【第 53 項】** 如申請專利範圍第 47 項之套組，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈可變區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 26 之胺基酸序列及其保守取代；
- (b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 30 之胺基酸序列及其保守取代；
- (c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 34 之胺基酸序列及其保守取代；
- (d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含 SEQ ID NO: 38 之胺基酸序列及其保守取代；
- (e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 42 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 46 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 54 項】** 如申請專利範圍第 53 項之套組，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 54 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 50 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 55 項】** 如申請專利範圍第 54 項之套組，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 22 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 18 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 56 項】** 如申請專利範圍第 50 項之套組，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 29 之胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 33 之胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含 SEQ ID NO: 41 之胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 45 之胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 49 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 57 項】** 如申請專利範圍第 56 項之套組，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

(a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 57 之胺基酸序列及其保守取代；  
及

(b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 53 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 58 項】** 如申請專利範圍第 57 項之套組，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者包含：

- (a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 25 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 21 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 59 項】** 如申請專利範圍第 32 項至第 46 項中任一項之套組，其中該捕獲抗體、該第一捕獲抗體及該第二捕獲抗體中之一或多者與包含以下各項之抗體競爭性結合：

- (a) 重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 26 及 27 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 30 及 31 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 34 及 35 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 38 及 39 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 42 及 43 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及
- (f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 46 及 47 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【第 60 項】** 如申請專利範圍第 32 項及第 35 項至第 46 項中任一項之套組，其中該偵測抗體及該第一偵測抗體中之一或多者與包含以下各項之抗體競爭性結合：

- (a) 重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 28 及 29 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 32 及 33 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 36 及 37 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 40 及 41 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 44 及 45 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及
- (f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 48 及 49 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【第 61 項】** 如申請專利範圍第 32 項至第 60 項中任一項之套組，其中該樣品為血液樣品。

**【第 62 項】** 如申請專利範圍第 32 項至第 60 項中任一項之套組，其中該樣品為血漿樣品。

**【第 63 項】** 如申請專利範圍第 32 項至第 62 項中任一項之套組，其中該套組以約 0.2 pg/ml 至約 0.5 pg/ml 之孔內靈敏度偵測該樣品中之總體或活性 FGF21 蛋白的量。

**【第 64 項】** 一種經分離之抗 FGF21 抗體或其抗原結合部分，其包含：

- (a) 重鏈可變區 CDR1，其包含選自由 SEQ ID NO: 26-29 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 30-33 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 34-37 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 38-41 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；
- (e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 42-45 組成之群的胺基酸序列及其保守取代；及
- (f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含選自由 SEQ ID NO: 46-49 組成之群的胺基酸序列及其保守取代。

**【第 65 項】** 如申請專利範圍第 64 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

- (a) 重鏈可變區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 26 之胺基酸序列及其保守取代；
- (b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 30 之胺基酸序列及其保守取代；
- (c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 34 之胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含 SEQ ID NO: 38 之胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 42 之胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 46 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 66 項】** 如申請專利範圍第 64 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 27 之胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含 SEQ ID NO: 39 之胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 43 之胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 47 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 67 項】** 如申請專利範圍第 64 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 28 之胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 36 之胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含 SEQ ID NO: 40 之胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 44 之胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 48 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 68 項】** 如申請專利範圍第 64 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈可變區 CDR1，其包含 SEQ ID NO: 29 之胺基酸序列及其保守取代；

(b) 重鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 33 之胺基酸序列及其保守取代；

(c) 重鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列及其保守取代；

(d) 輕鏈可變區 CDR1 結構域，其包含 SEQ ID NO: 41 之胺基酸序列及其保守取代；

(e) 輕鏈可變區 CDR2 結構域，其包含 SEQ ID NO: 45 之胺基酸序列及其保守取代；及

(f) 輕鏈可變區 CDR3 結構域，其包含 SEQ ID NO: 49 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 69 項】** 如申請專利範圍第 65 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 54 之胺基酸序列及其保守取代；  
及

(b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 50 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 70 項】** 如申請專利範圍第 66 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 55 之胺基酸序列及其保守取代；  
及

(b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 51 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 71 項】** 如申請專利範圍第 67 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 56 之胺基酸序列及其保守取代；

及

(b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 52 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 72 項】** 如申請專利範圍第 68 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原

結合部分包含：

(a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 57 之胺基酸序列及其保守取代；

及

(b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 53 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 73 項】** 如申請專利範圍第 65 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原

結合部分包含：

(a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 75 之胺基酸序列及其保守取代；

及

(b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 71 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 74 項】** 如申請專利範圍第 66 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原

結合部分包含：

(a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 74 之胺基酸序列及其保守取代；

及

(b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 70 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 75 項】** 如申請專利範圍第 67 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原

結合部分包含：

(a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 73 之胺基酸序列及其保守取代；

及

(b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 69 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 76 項】** 如申請專利範圍第 68 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 72 之胺基酸序列及其保守取代；

及

(b) 輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO: 68 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 77 項】** 如申請專利範圍第 69 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 22 之胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 18 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 78 項】** 如申請專利範圍第 70 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 23 之胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 19 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 79 項】** 如申請專利範圍第 71 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 24 之胺基酸序列及其保守取代；及

(b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 20 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 80 項】** 如申請專利範圍第 72 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

- (a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 25 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 21 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 81 項】** 如申請專利範圍第 73 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

- (a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 67 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 63 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 82 項】** 如申請專利範圍第 74 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

- (a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 66 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 62 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 83 項】** 如申請專利範圍第 75 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

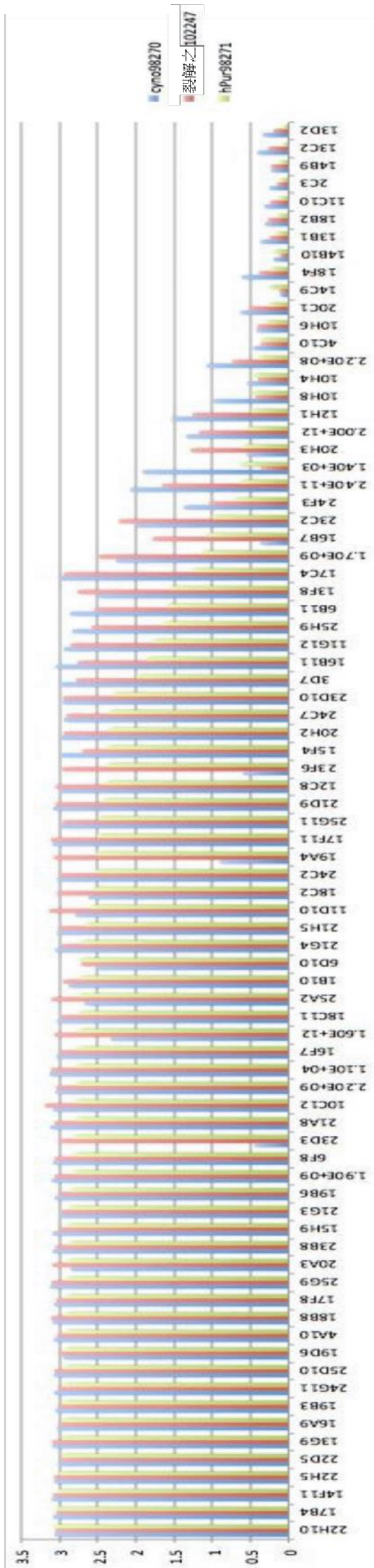
- (a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 65 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 61 之胺基酸序列及其保守取代。

**【第 84 項】** 如申請專利範圍第 76 項之經分離之抗體，其中該抗體或其抗原結合部分包含：

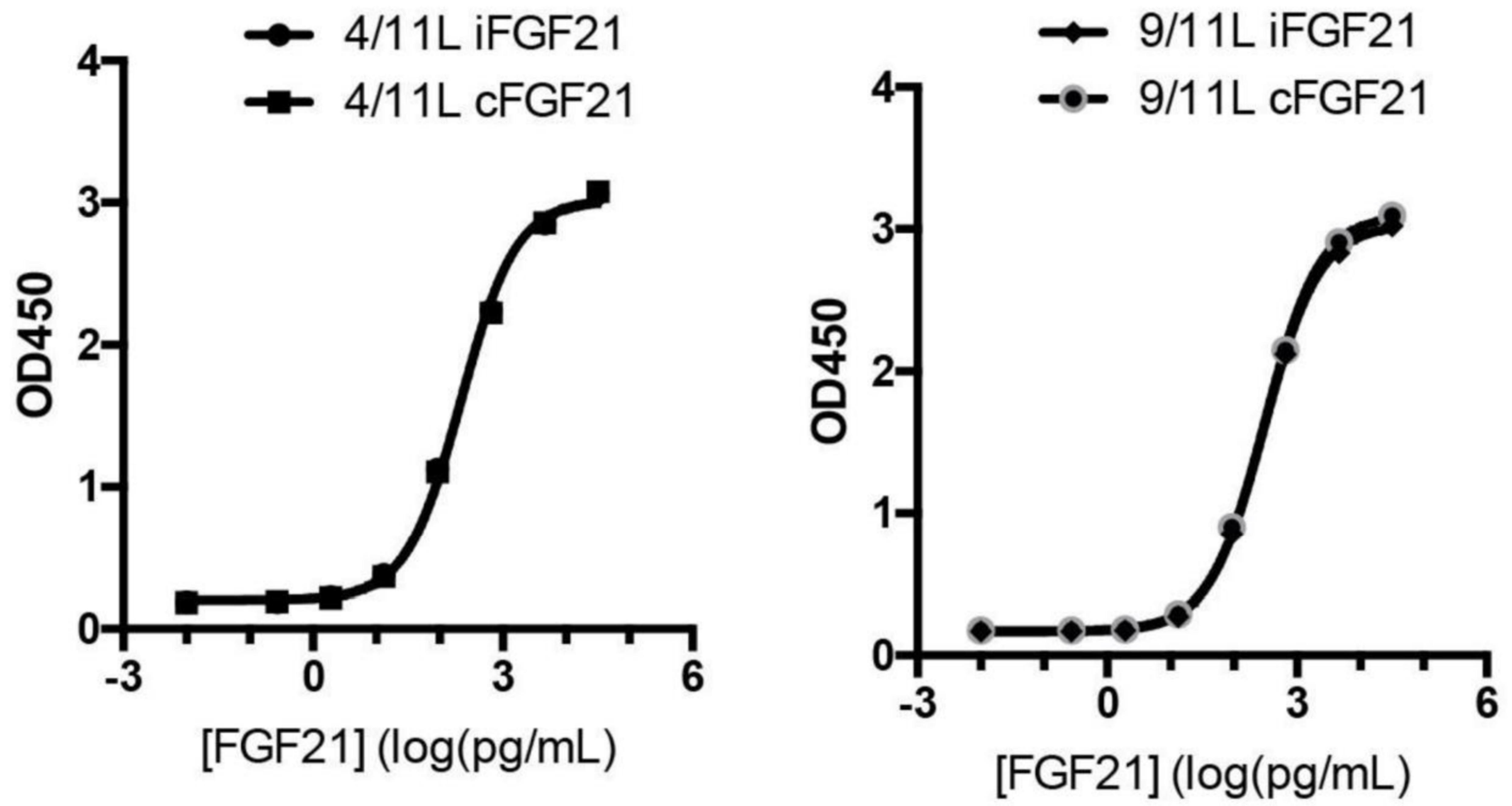
- (a) 重鏈，其包含 SEQ ID NO: 64 之胺基酸序列及其保守取代；及
- (b) 輕鏈，其包含 SEQ ID NO: 60 之胺基酸序列及其保守取代。

- 【第 85 項】 一種經分離之核酸，其編碼如申請專利範圍第 64 項至第 84 項中任一項之抗體或其抗原結合部分。
- 【第 86 項】 一種宿主細胞，其包含如申請專利範圍第 85 項之核酸。
- 【第 87 項】 一種產生抗體之方法，該方法包括培養如申請專利範圍第 86 項之宿主細胞以產生該抗體。
- 【第 88 項】 如申請專利範圍第 87 項之方法，其進一步包括自該宿主細胞回收該抗體。
- 【第 89 項】 一種組合物，其包含一或多種如申請專利範圍第 64 項至第 84 項中任一項之抗體或其抗原結合部分。

【發明圖式】



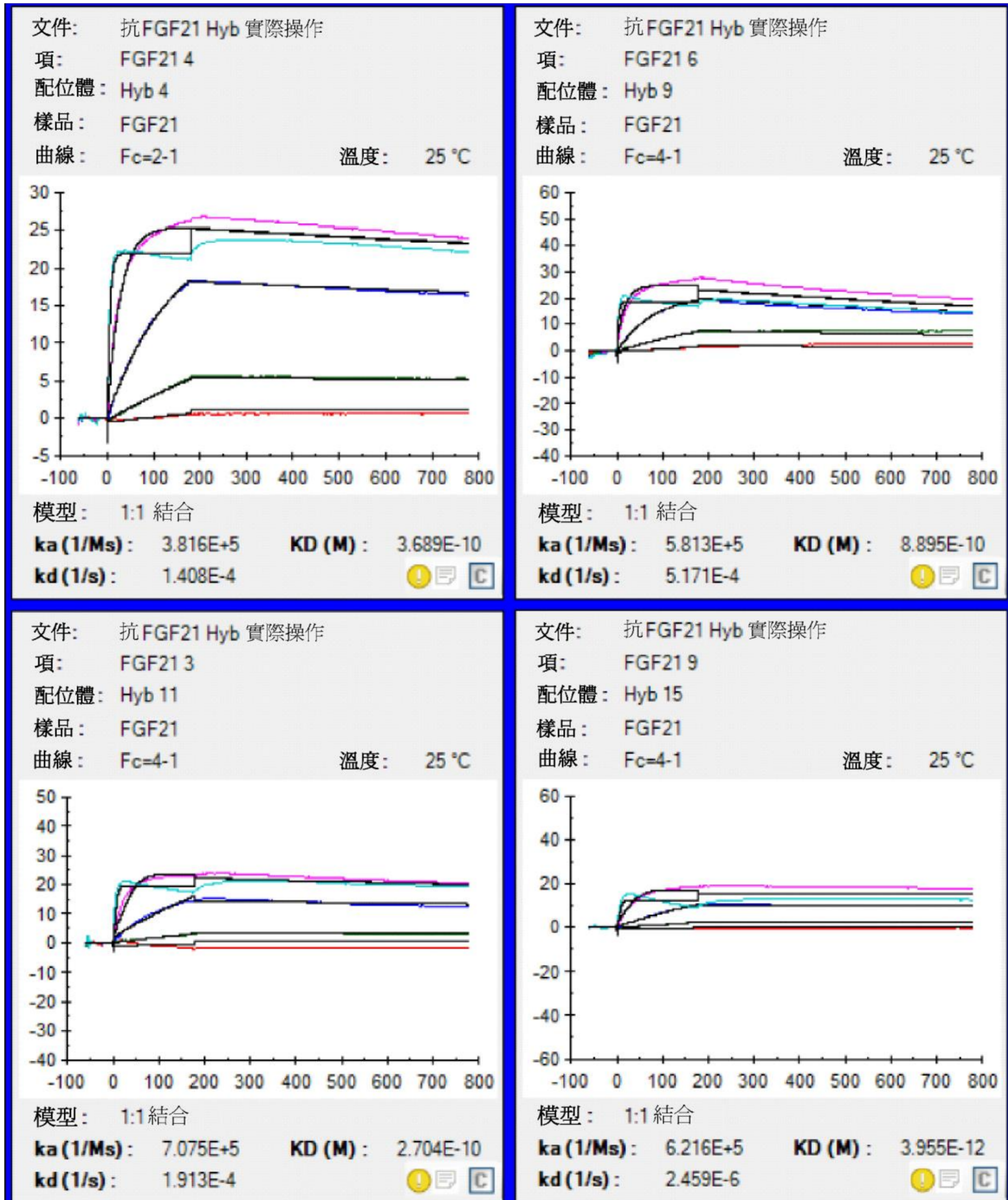
【圖 1】



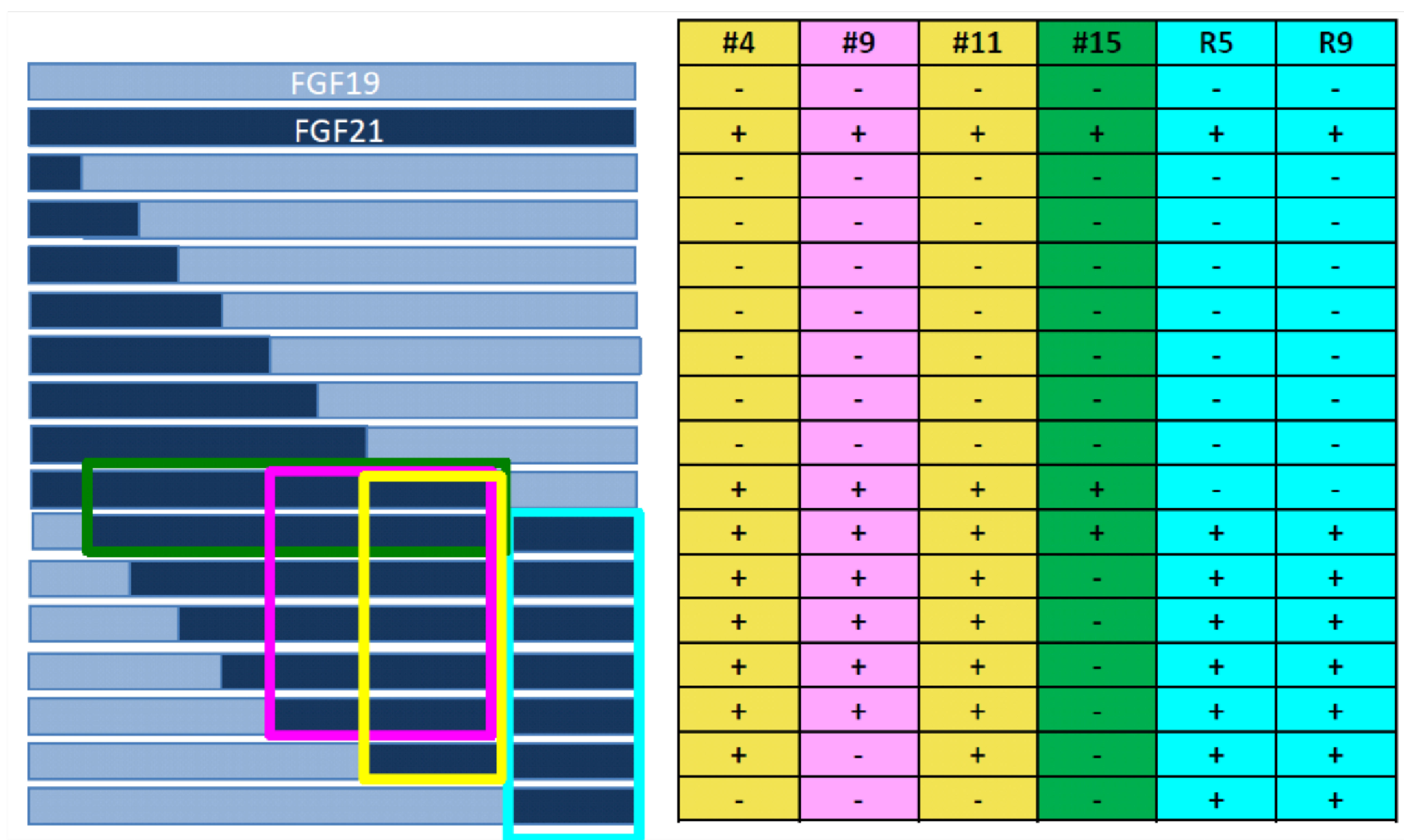
iFGF21: 完整 FGF21

cFGF21: 裂解之 FGF21

【圖 2】

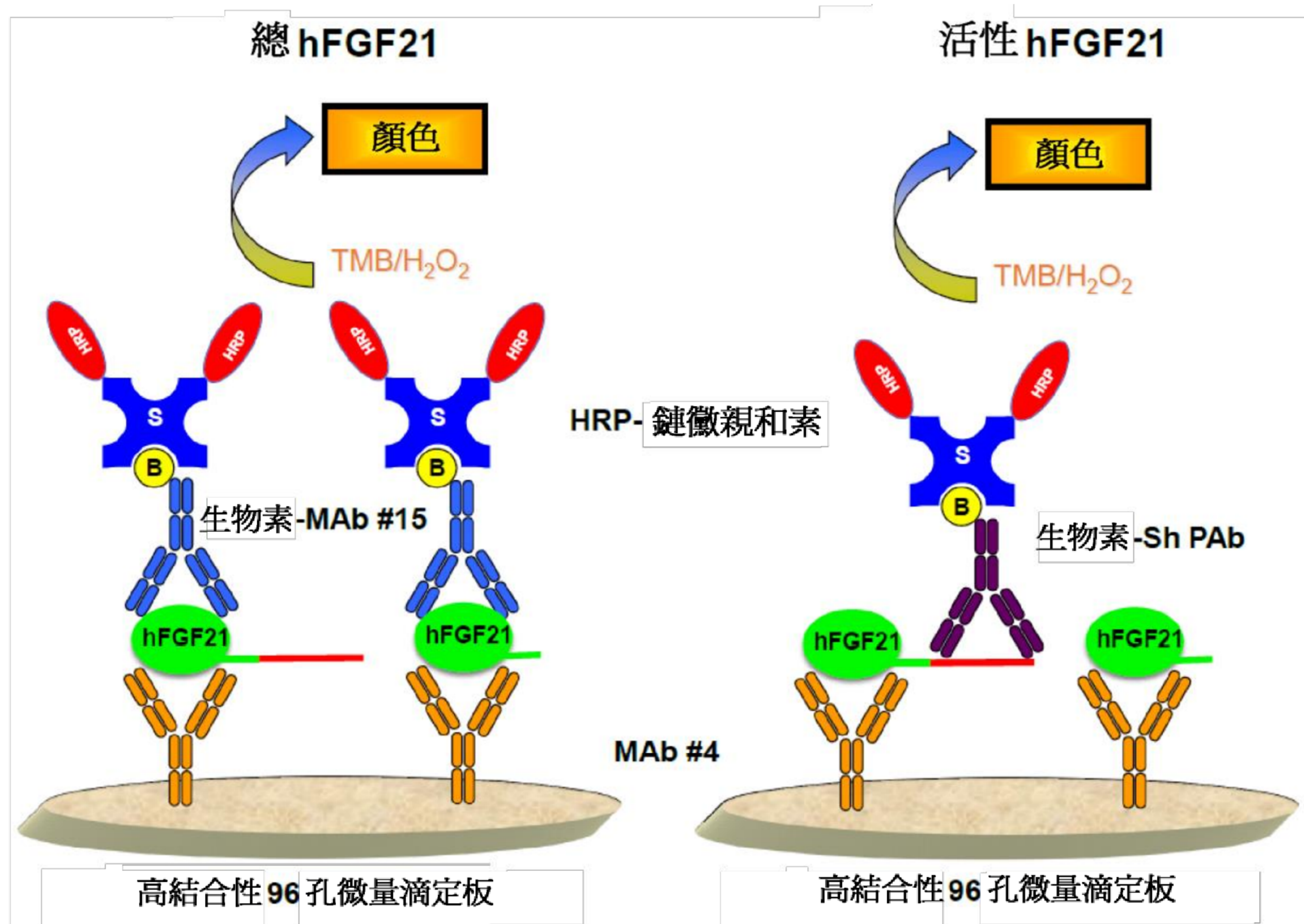


【圖 3】



+: 結合信號， -無結合信號

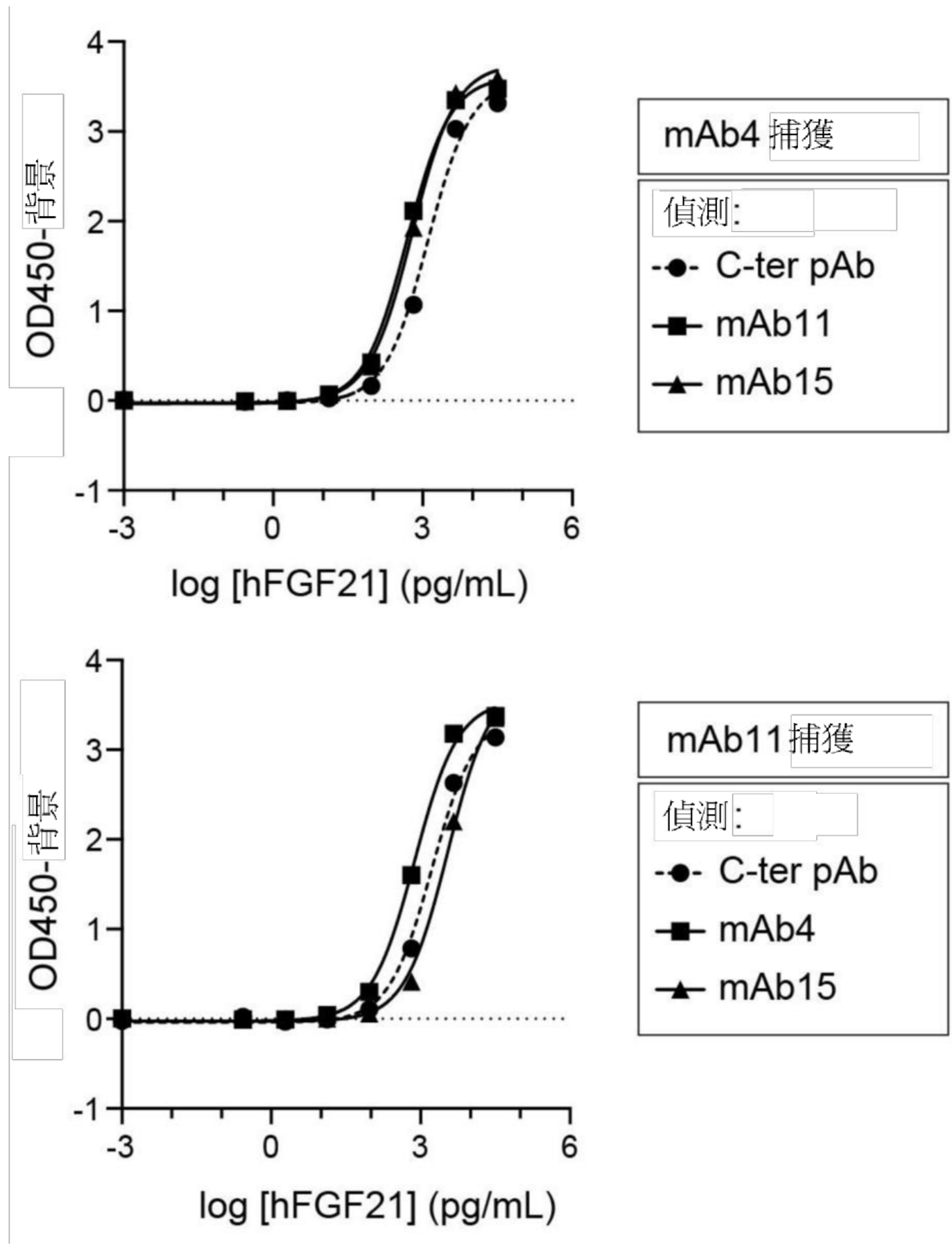
【圖 4】



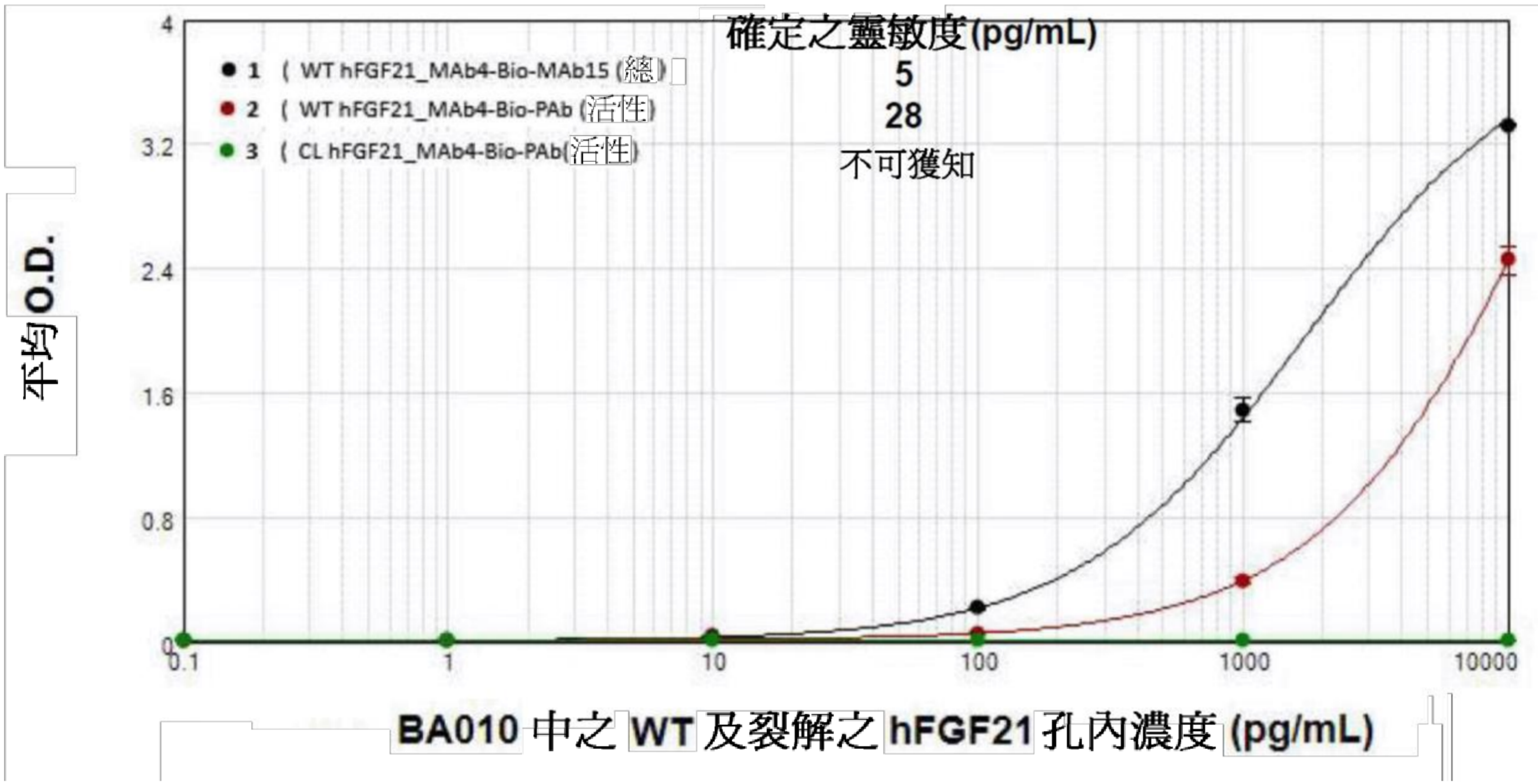
【圖 5】

1	將微量滴定板在 2-8°C 下用每孔 100 µL 之含 0.5 µg/mL 之山羊抗體的塗佈緩衝液塗佈隔夜。																					
2	將板用每個循環每孔 400 µL 之洗滌緩衝液洗滌三次。																					
3	向板中添加每孔 200 µL 之阻斷緩衝液且將板在室溫下在振盪下孵育 1 至 3 小時。																					
4	(注：若經塗佈之微量滴定板為冷凍的，則將板在室溫下在開啓鼓風機之通風櫥中孵育 1 至 3 小時) 如以下實例製備標準 (Std) 曲線： WT hFGF21 標準物來源濃度為 1590 µg/mL。 作為一個實例，如下表中所描述製備中間溶液 2：																					
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>儲備物</th> <th>濃度 (pg/mL)</th> <th>來源濃度 (pg/mL)</th> <th>稀釋倍數</th> <th>來源之體積 (µL)</th> <th>標準物稀釋劑之體積 (µL)</th> <th>總體積 (µL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>中間物 1</td> <td>10000000</td> <td>159000000</td> <td>159</td> <td>3.1</td> <td>496.9</td> <td>500</td> </tr> <tr> <td>中間物 2</td> <td>100000</td> <td>10000000</td> <td>100</td> <td>5.0</td> <td>495.0</td> <td>500</td> </tr> </tbody> </table>	儲備物	濃度 (pg/mL)	來源濃度 (pg/mL)	稀釋倍數	來源之體積 (µL)	標準物稀釋劑之體積 (µL)	總體積 (µL)	中間物 1	10000000	159000000	159	3.1	496.9	500	中間物 2	100000	10000000	100	5.0	495.0	500
儲備物	濃度 (pg/mL)	來源濃度 (pg/mL)	稀釋倍數	來源之體積 (µL)	標準物稀釋劑之體積 (µL)	總體積 (µL)																
中間物 1	10000000	159000000	159	3.1	496.9	500																
中間物 2	100000	10000000	100	5.0	495.0	500																
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>標準物濃度 (pg/mL)</th> <th>程序</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>標準物 1</td> <td>4000</td> </tr> <tr> <td>標準物 2</td> <td>1000</td> </tr> <tr> <td>標準物 3</td> <td>250</td> </tr> <tr> <td>標準物 4</td> <td>62.5</td> </tr> <tr> <td>標準物 5</td> <td>15.625</td> </tr> <tr> <td>標準物 6</td> <td>3.906</td> </tr> <tr> <td>標準物 7</td> <td>0.977</td> </tr> <tr> <td>標準物 8</td> <td>不可獲知</td> </tr> <tr> <td>陰性對照 (NC)</td> <td>0.000</td> </tr> </tbody> </table>	標準物濃度 (pg/mL)	程序	標準物 1	4000	標準物 2	1000	標準物 3	250	標準物 4	62.5	標準物 5	15.625	標準物 6	3.906	標準物 7	0.977	標準物 8	不可獲知	陰性對照 (NC)	0.000	
標準物濃度 (pg/mL)	程序																					
標準物 1	4000																					
標準物 2	1000																					
標準物 3	250																					
標準物 4	62.5																					
標準物 5	15.625																					
標準物 6	3.906																					
標準物 7	0.977																					
標準物 8	不可獲知																					
陰性對照 (NC)	0.000																					
5	於分析稀釋劑中以 X (TBD) 稀釋度稀釋對照 (QC) 及樣品																					
6	將板用每個循環每孔 400 µL 之洗滌緩衝液洗滌三次。																					
7	向板中添加經稀釋之標準物/對照/樣品，每孔 100 µL 一式兩份。																					
8	將板在室溫下在振盪下孵育 2 小時。																					
9	將經生物素化之偵測抗體在分析稀釋劑中稀釋至 0.5 µg/mL。																					
10	將板用每個循環每孔 400 µL 之洗滌緩衝液洗滌三次。																					
11	向板中添加每孔 100 µL 之經稀釋經生物素化之偵測抗體。																					
12	將板在室溫下在振盪下孵育 1 小時。																					
13	將 HRP 接合物儲備來源在 HRP 接合物稀釋劑中稀釋至 1:500 稀釋度 (TBD)。																					
14	將板用每個循環每孔 400 µL 之洗滌緩衝液洗滌三次。																					
15	向板中添加每孔 100 µL 之經稀釋之 HRP 接合物。																					
16	將板在室溫下在振盪下孵育 1 小時。																					
17	將板用每個循環每孔 400 µL 之洗滌緩衝液洗滌四次。																					
18	向板中添加每孔 100 µL 之 TMB 受質。																					
19	將板在室溫下在振盪下孵育約 15-20 分鐘。																					
20	向板中添加每孔 100 µL 之 1 M 磷酸。																					
21	使用 450 nm 讀取波長及 630 nm 或 650 nm 參考波長來讀取板。																					

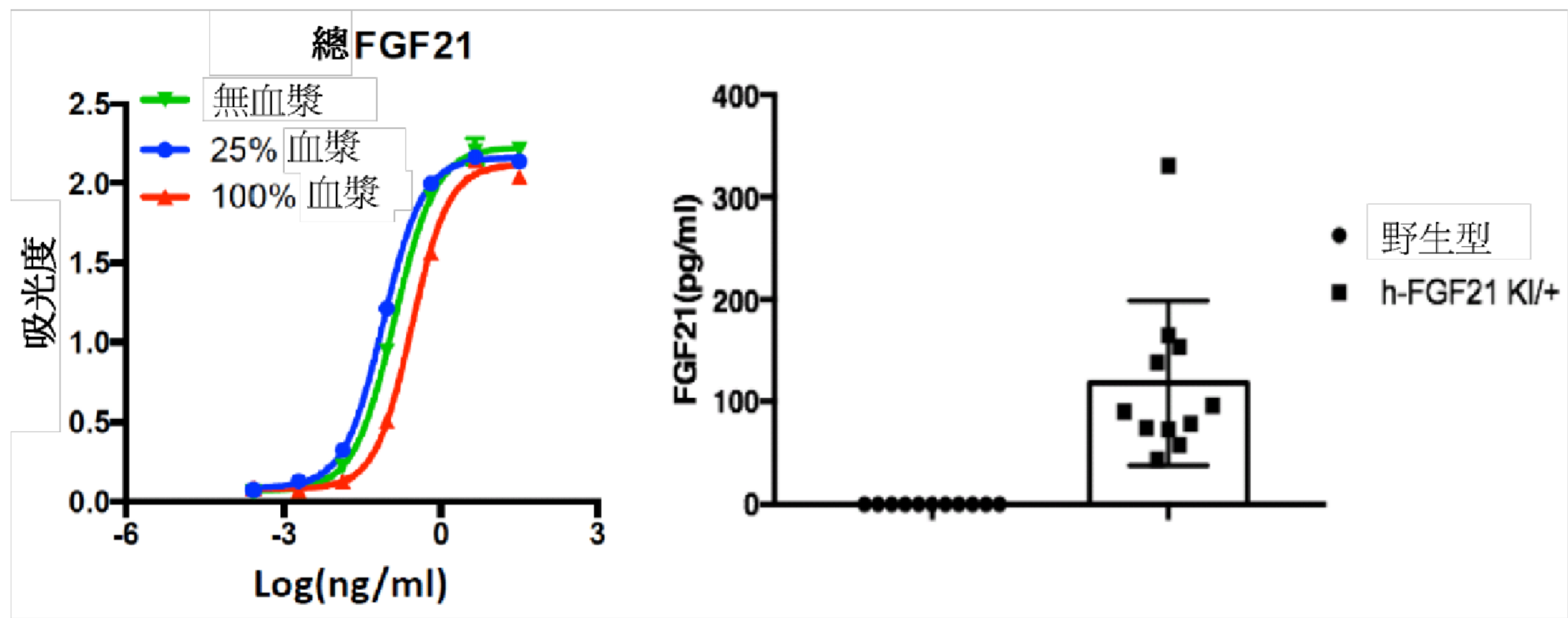
【圖 6】



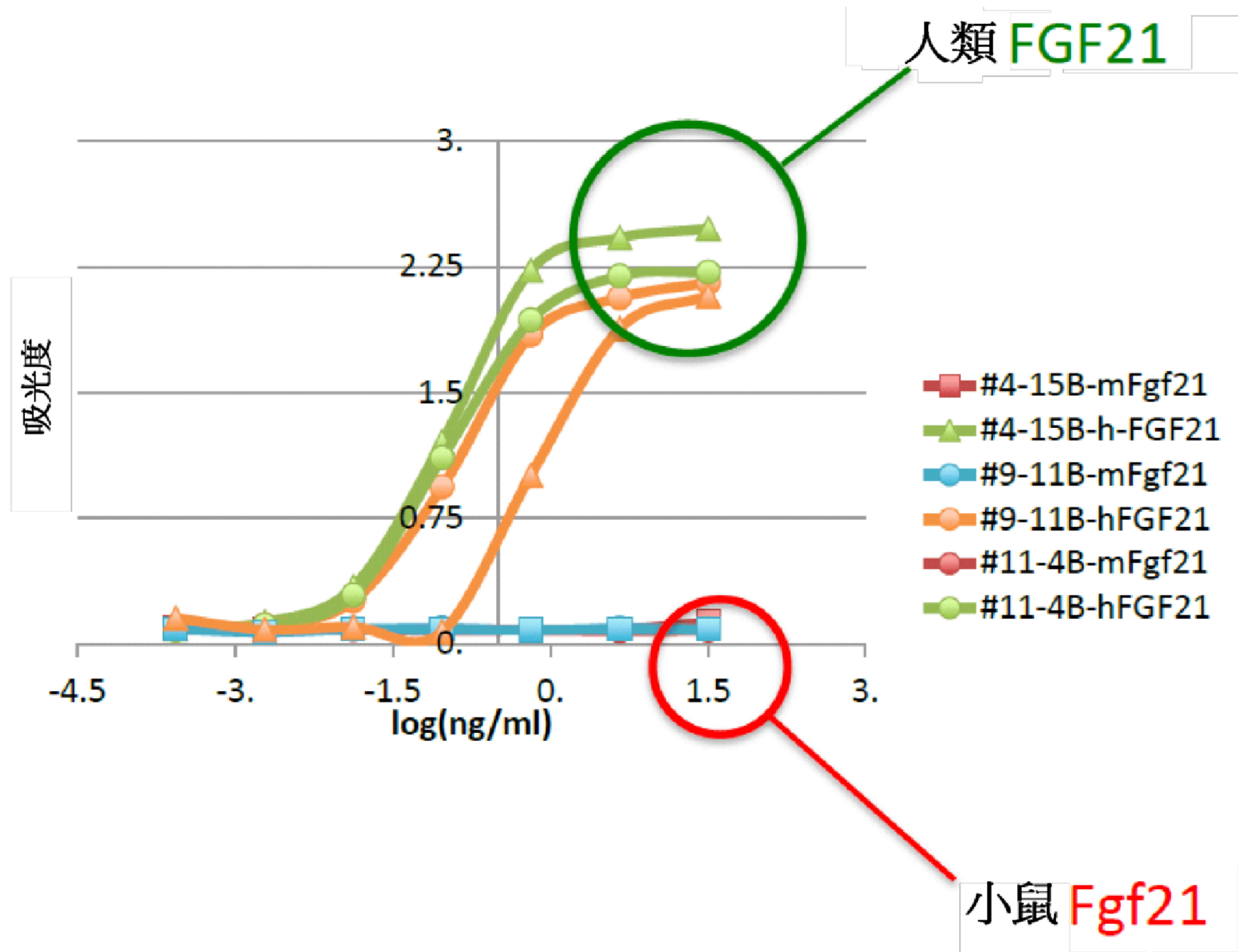
【圖 7】



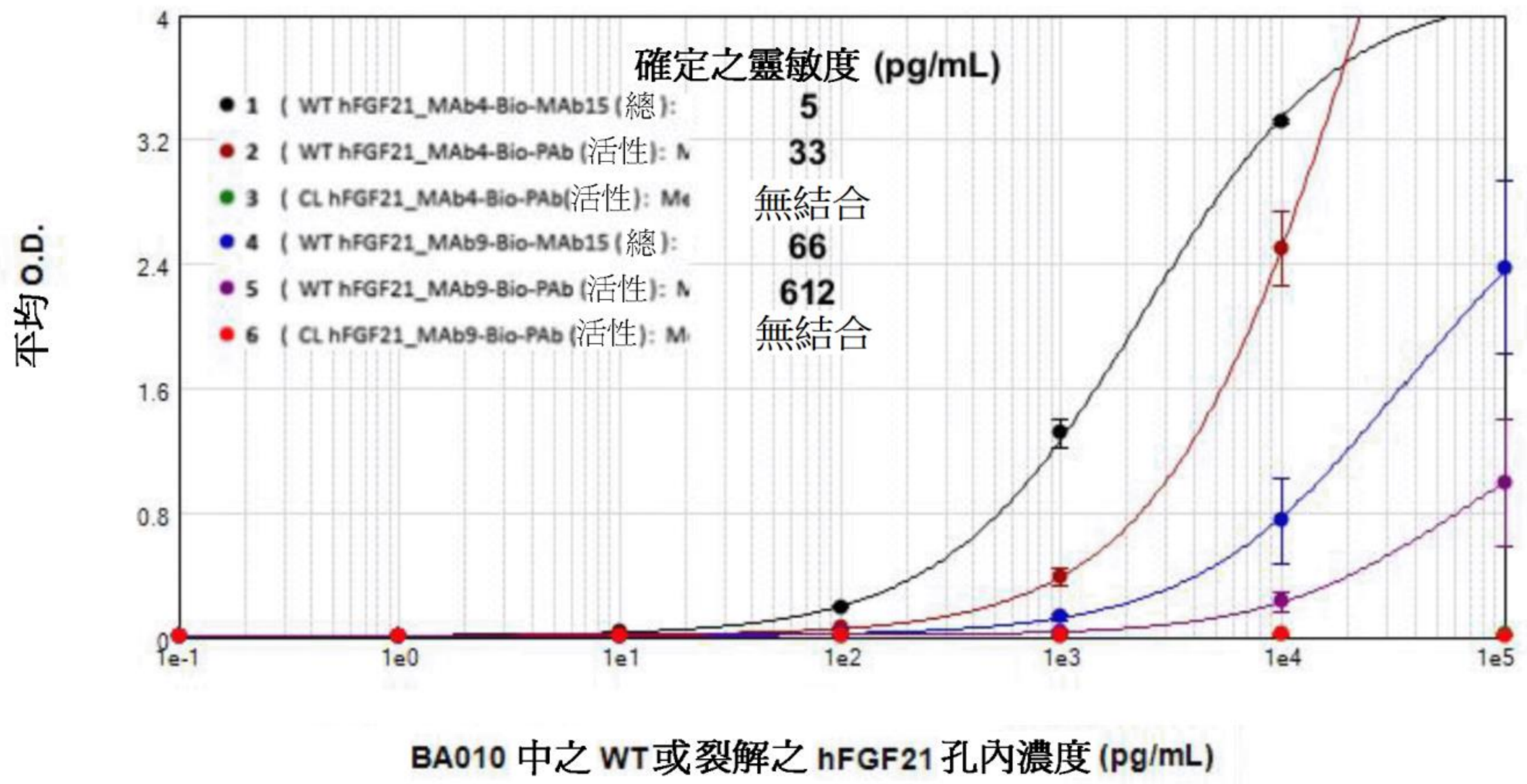
【圖 8】



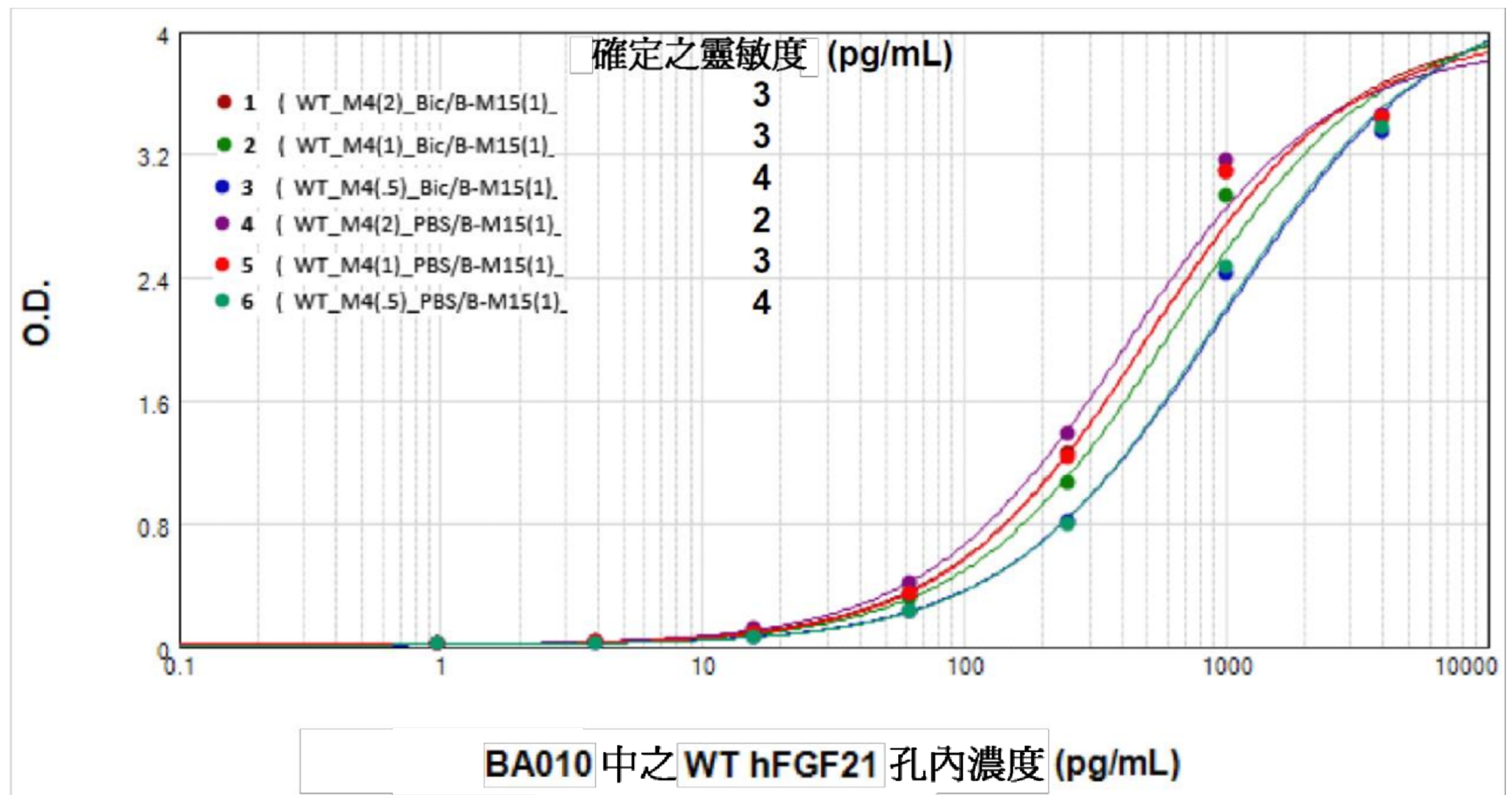
【圖 9】



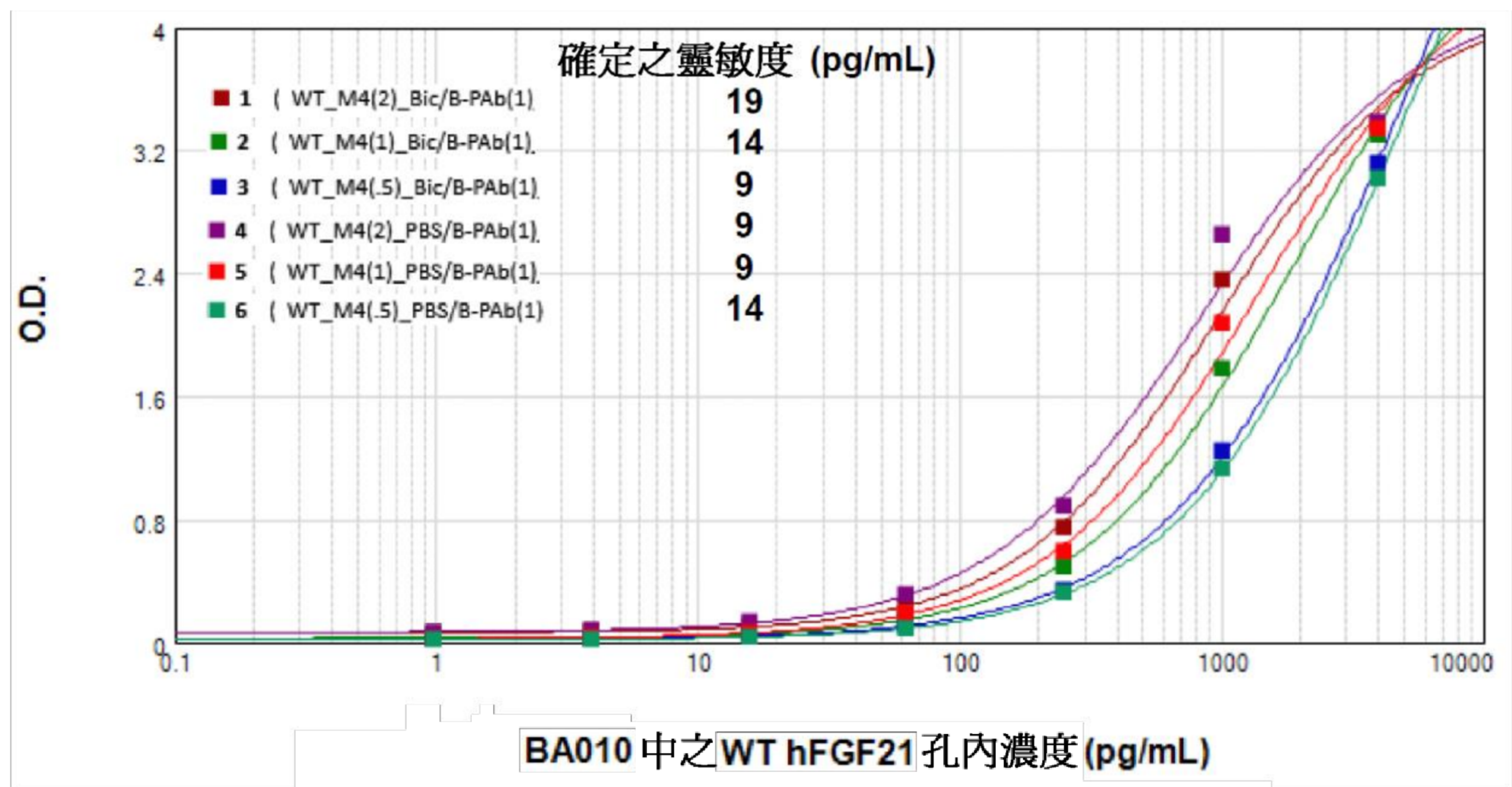
【圖 10】



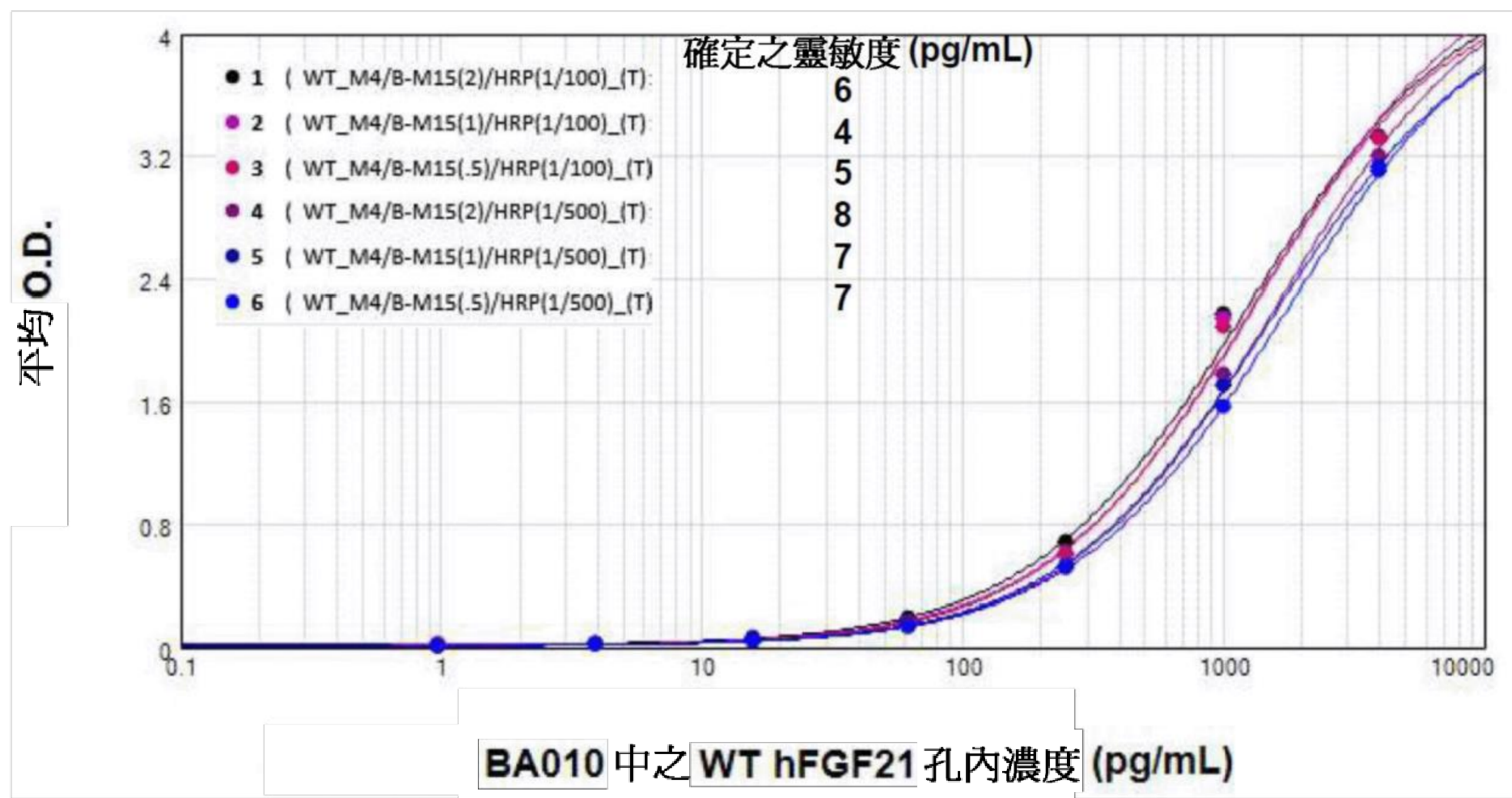
【圖 11】



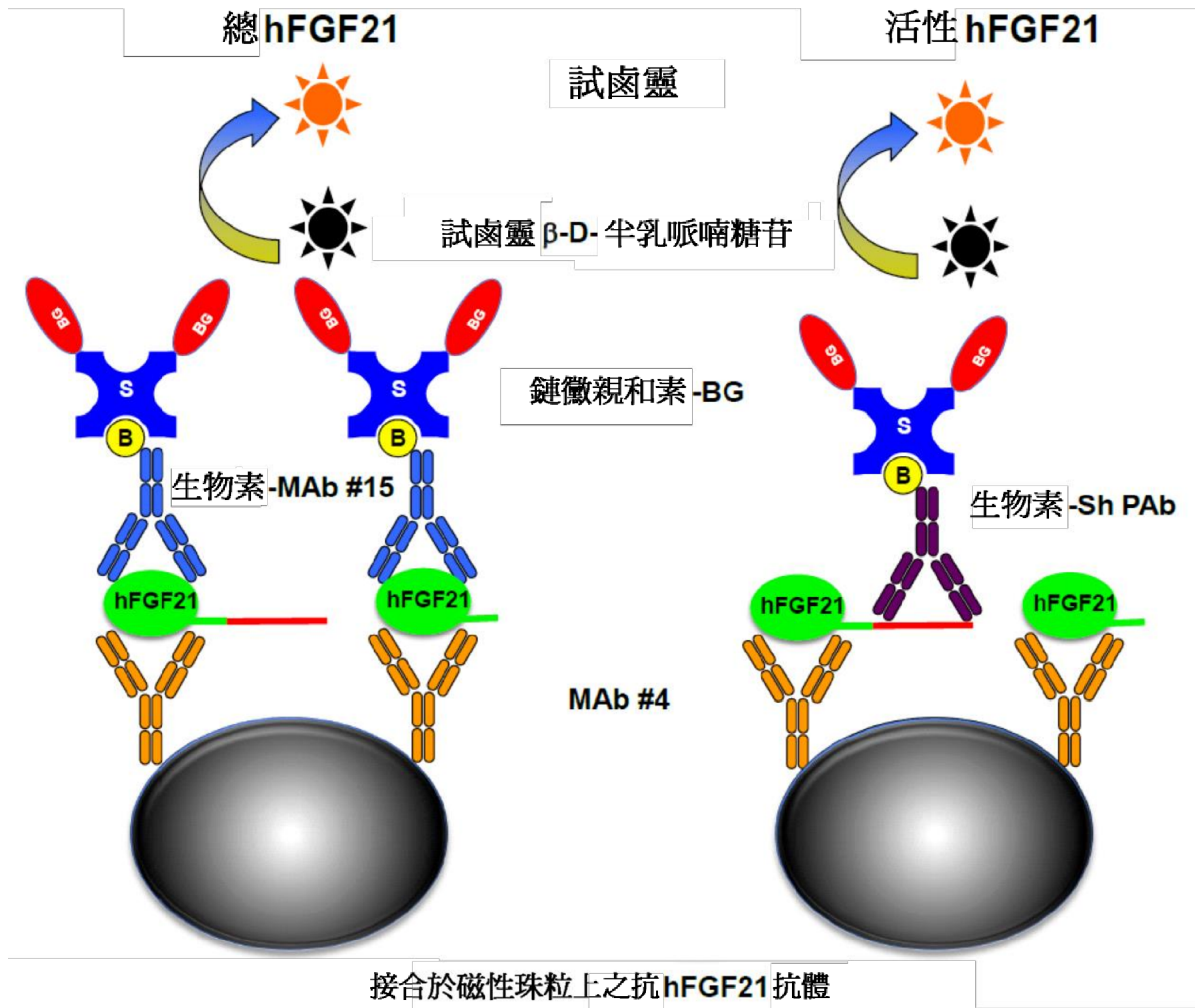
【圖 12】



【圖 13】



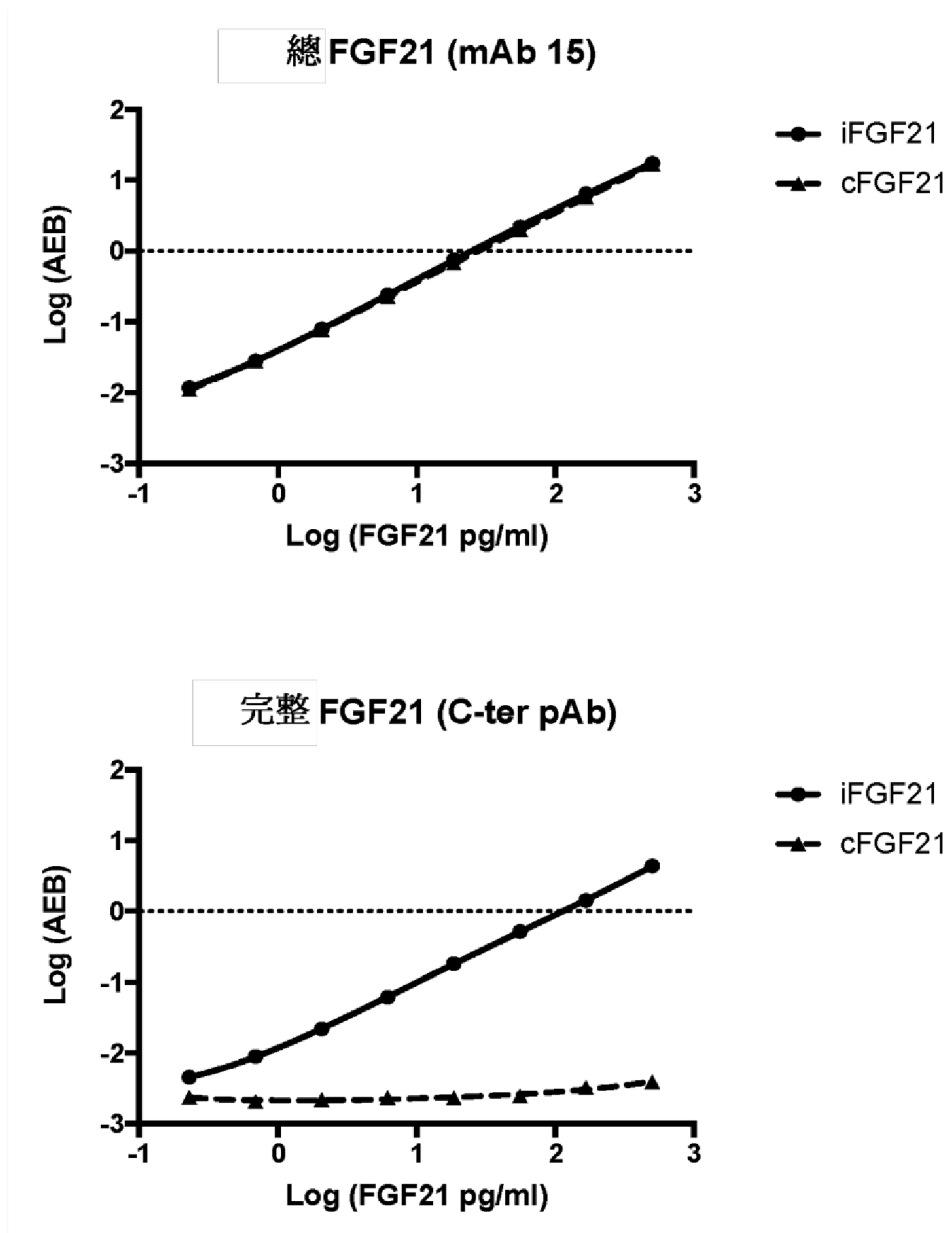
【圖 14】



【圖 15】

步驟	值	單位	最小	最大	註釋
^ 步驟 1 <input type="checkbox"/>					
珠粒	Homebrew 1 珠粒				
液體體積	25	μl	10	185	
樣品/校正物					
液體體積	100	μl	10	172	
偵測器	Homebrew 1 偵測				
液體體積	20	μl	10	185	
孵育時間	80	震盪 (45s) <input type="text"/>	1	1120	60:00 min
^ 步驟 2 <input type="checkbox"/>					
SBG	Homebrew 1 SBG				
液體體積	100	μl	10	185	
孵育時間	7	震盪 (45s) <input type="text"/>	1	1120	5:15 min
^ 量測					

【圖 16】



iFGF21: 完整 FGF21  
 cFGF21: 裂解之 FGF21

【圖 17】

1 於 15 mL 或 50 mL 聚丙烯離心管中製備抗 hFGF21 MAbs #4 塗佈之順磁性珠粒、生物素-接合物及 SBG 之工作溶液

2 將各工作溶液轉移至各別 Quantix 分析試劑瓶中。

3 如以下實例製備標準 (Std) 曲線：  
 WT hFGF21 標準物儲備物 I 濃度為 10 µg/mL。  
 作為一個實例，如下表中所描述製備中間溶液 2：

儲備物	濃度 (pg/mL)	來源濃度 (pg/mL)	稀釋倍數	來源之體積 (µL)	標準物稀釋劑之體積 (µL)	總體積 (µL)
中間物 1	100000	10000000	100	20.0	1980.0	2000
中間物 2	1000	100000	100	20.0	1980.0	2000

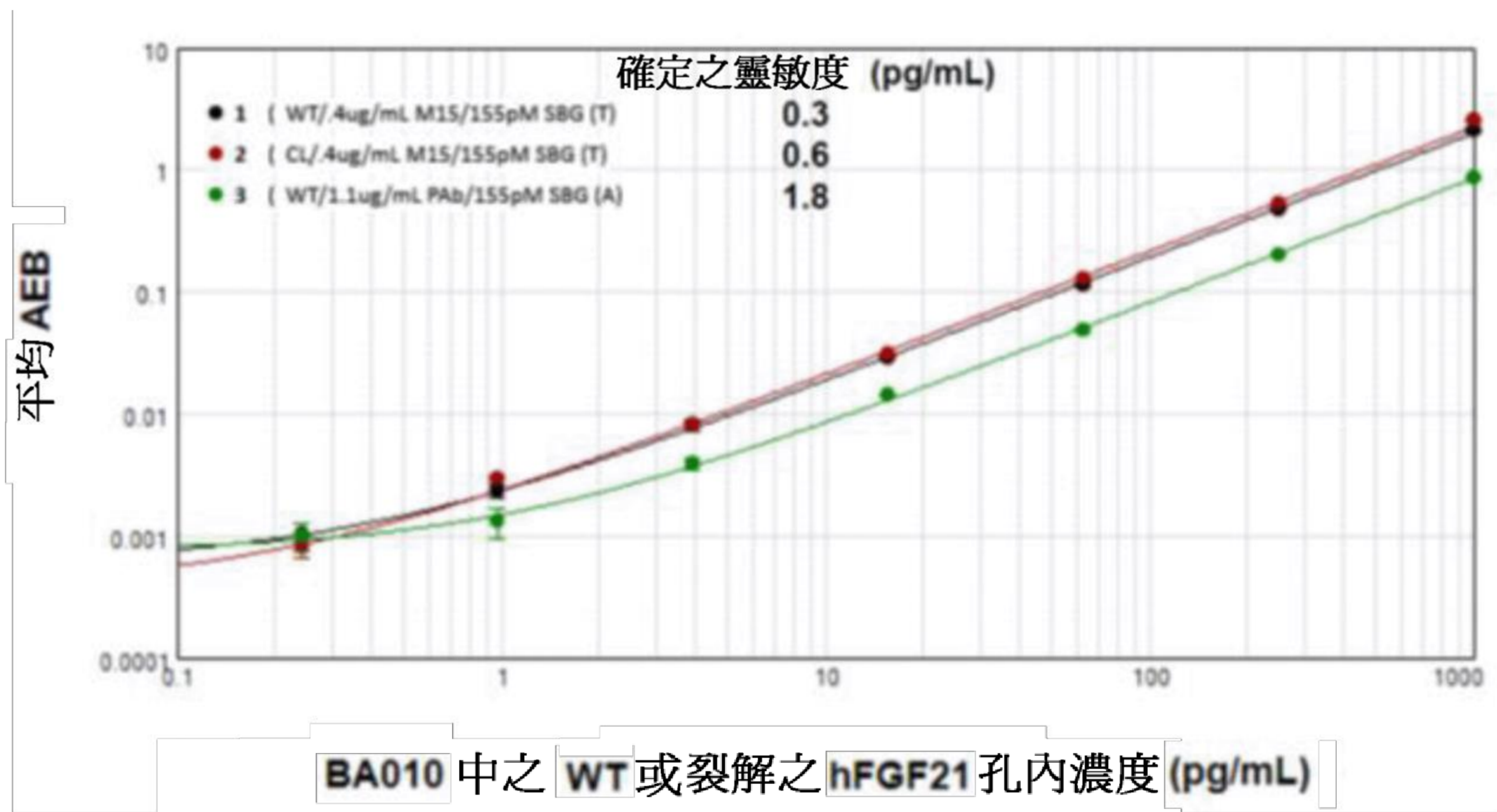
標準物濃度 (pg/mL)	程序
標準物 1	400 400 µL 之 1000 pg/mL 之中間物 2 + 600 µL 標準物稀釋劑
標準物 2	100 250 µL 標準物 1 + 750 µL 標準物稀釋劑
標準物 3	25 250 µL 標準物 2 + 750 µL 標準物稀釋劑
標準物 4	6.3 250 µL 標準物 3 + 750 µL 標準物稀釋劑
標準物 5	1.5625 250 µL 標準物 4 + 750 µL 標準物稀釋劑
標準物 6	0.391 250 µL 標準物 5 + 750 µL 標準物稀釋劑
標準物 7	0.098 250 µL 標準物 6 + 750 µL 標準物稀釋劑
標準物 8	0.024 250 µL 標準物 6 + 750 µL 標準物稀釋劑
陰性對照 (NC)	0.000 750 µL 標準物稀釋劑

4 使用純淨之高及低對照 (QC) 且於分析稀釋劑中以 1:20 最低所需稀釋度 (MRD) 及後續稀釋度對內源性對照 (EC) 或樣品進行稀釋。

5 向板中添加經稀釋之標準物/對照/樣品，每孔 300 µL 足夠，兩份。

6 設置全自動 Quantix Simoa HD-1 儀器且進行實驗。

【圖 18】



【圖 19】

總體分析	WT hFGF21濃度 (pg/mL)	平均AEB	標準偏差	CV%	S/N比率	平均結果	回收率%
		1000	2.1119	0.0924	4.4	4036	1055
	250	0.4766	0.0029	0.6	911	245	98
	62.50	0.1130	0.0028	2.5	216	59	95
	15.63	0.0289	0.0004	1.4	55	15	98
	3.91	0.0080	0.0008	9.7	15	4	105
	0.98	0.0024	0.0003	12	4	1.0	102
	0.24	0.0010	0.0003	26	2	0.2	97
	空白	0.0005	0.0001	11	1	範圍?	

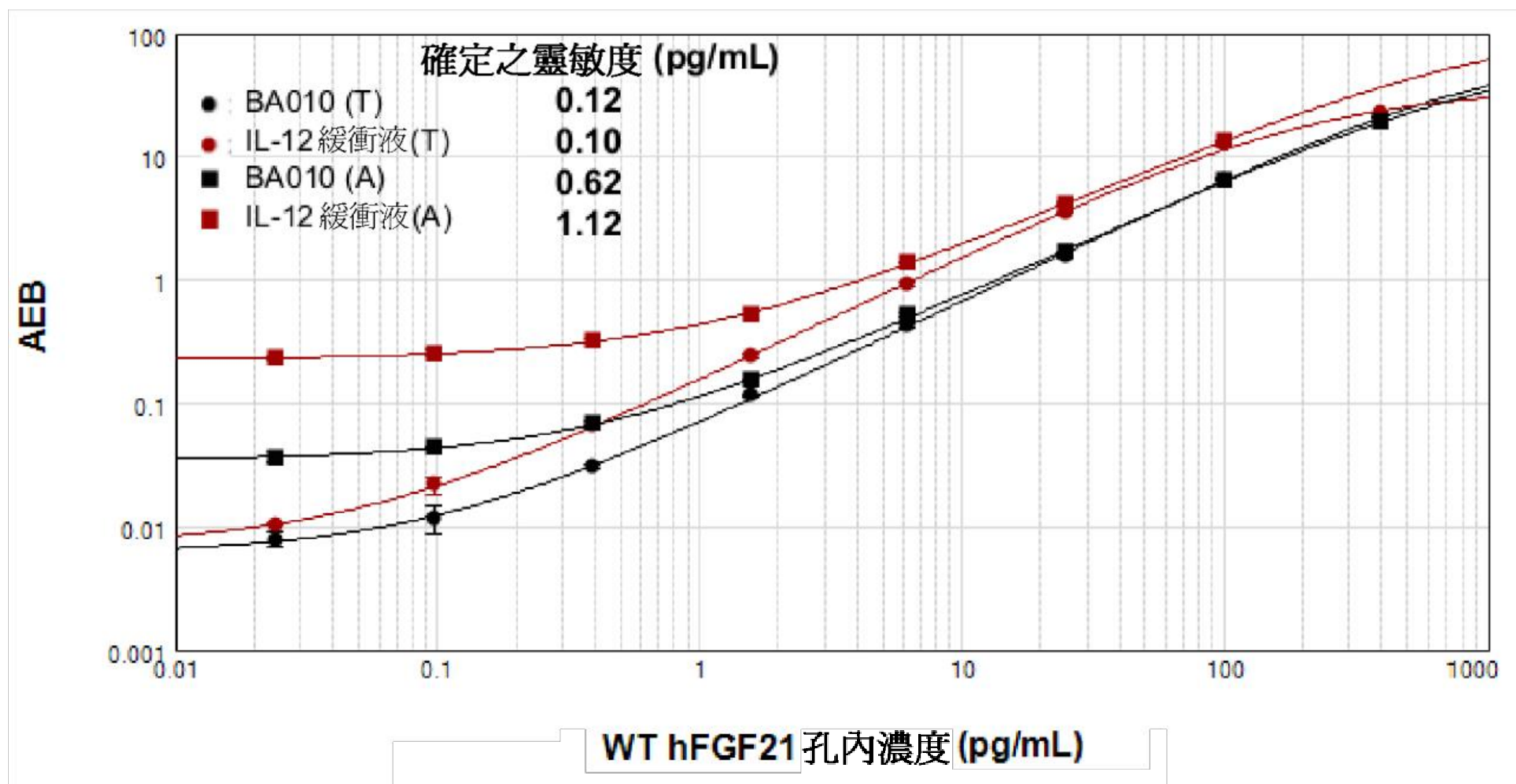
  

總體分析	CL hFGF21濃度 (pg/mL)	平均AEB	標準偏差	CV%	S/N比率	平均結果	回收率%
		1000	2.5205	0.0523	2.1	3183	1126
	250	0.5253	0.0014	0.3	663	240	96
	62.50	0.1266	0.0005	0.4	160	59	95
	15.63	0.0309	0.0007	2.2	39	15	93
	3.91	0.0082	0.0003	3.1	10	4	98
	0.98	0.0029	0.0001	3.5	4	1.3	129
	0.24	0.0008	0.0002	20	1	0.2	91
	空白	0.0008	0.0001	15	1	0.2	

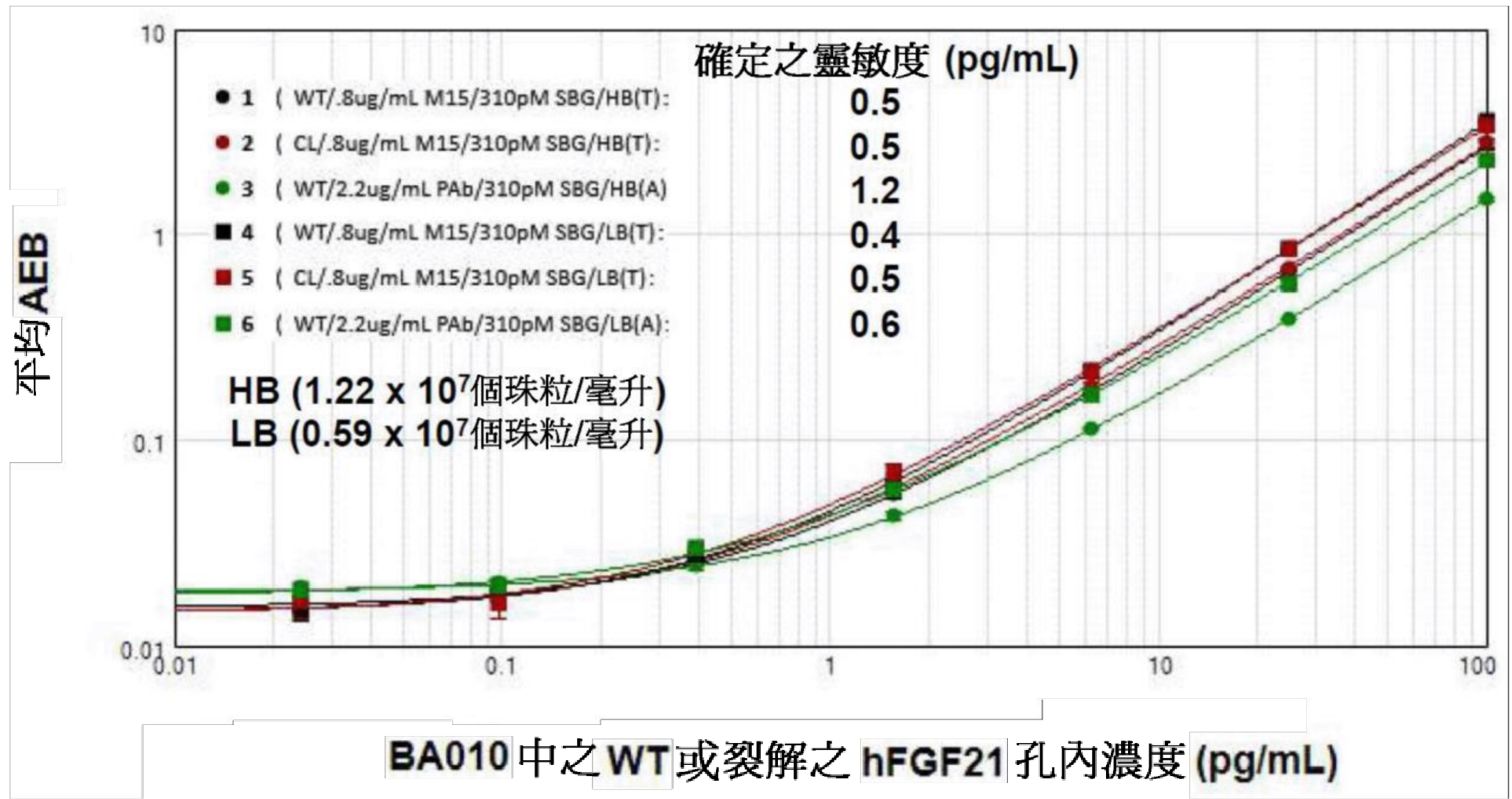
  

活性分析	WT hFGF21濃度 (pg/mL)	平均AEB	標準偏差	CV%	S/N比率	平均結果	回收率%
		1000	0.8592	0.0113	1.3	1085	1008
	250	0.2030	0.0011	0.5	256	244	98
	62.50	0.0492	0.0019	3.9	62	60	96
	15.63	0.0142	0.0003	2.4	18	17	110
	3.91	0.0039	0.0004	11	5	4	106
	0.98	0.0013	0.0004	28	2	0.8	78
	0.24	0.0010	0.0003	27	1	0.3	142
	空白	0.0010	0.0002	16	1	0.4	

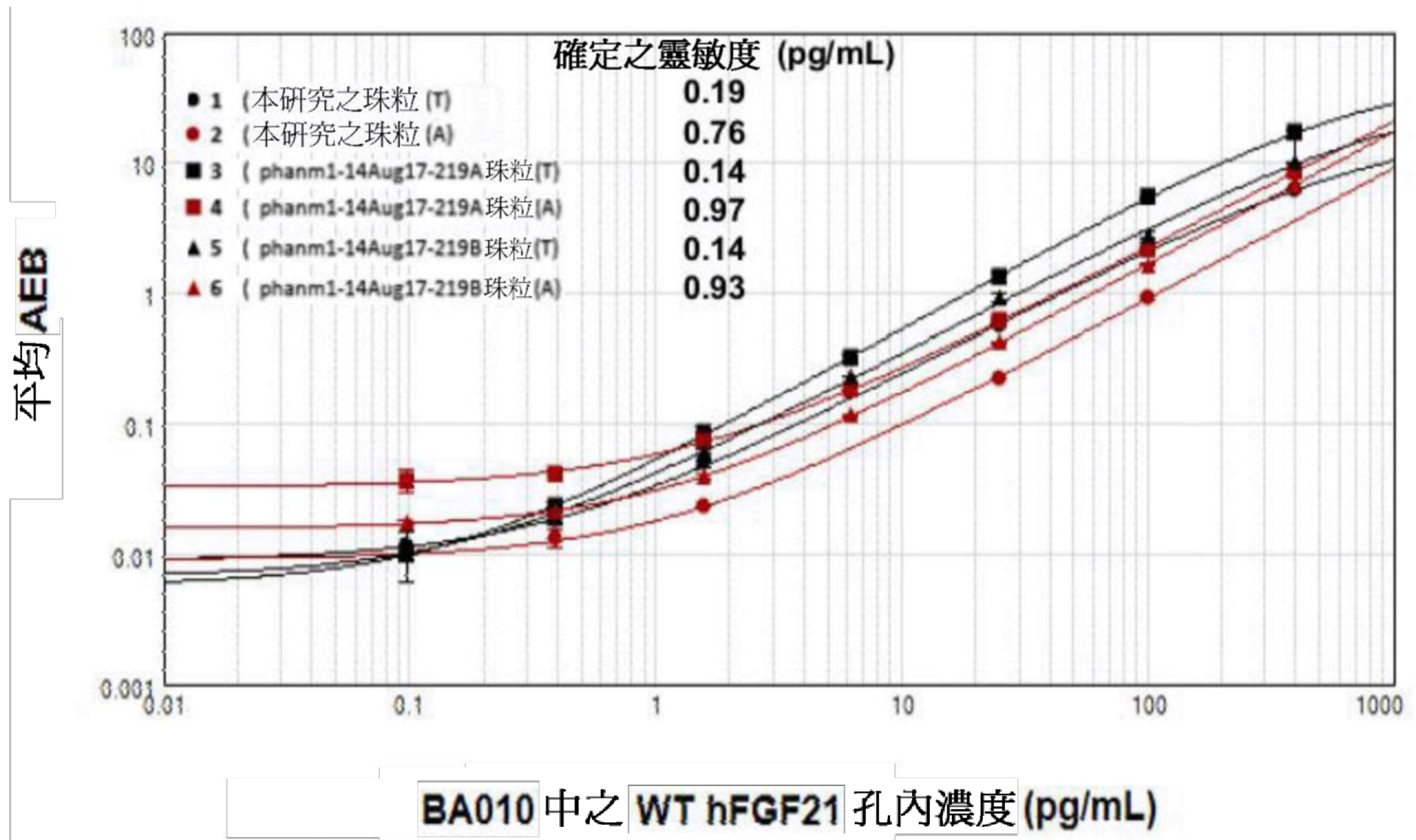
【圖 20】



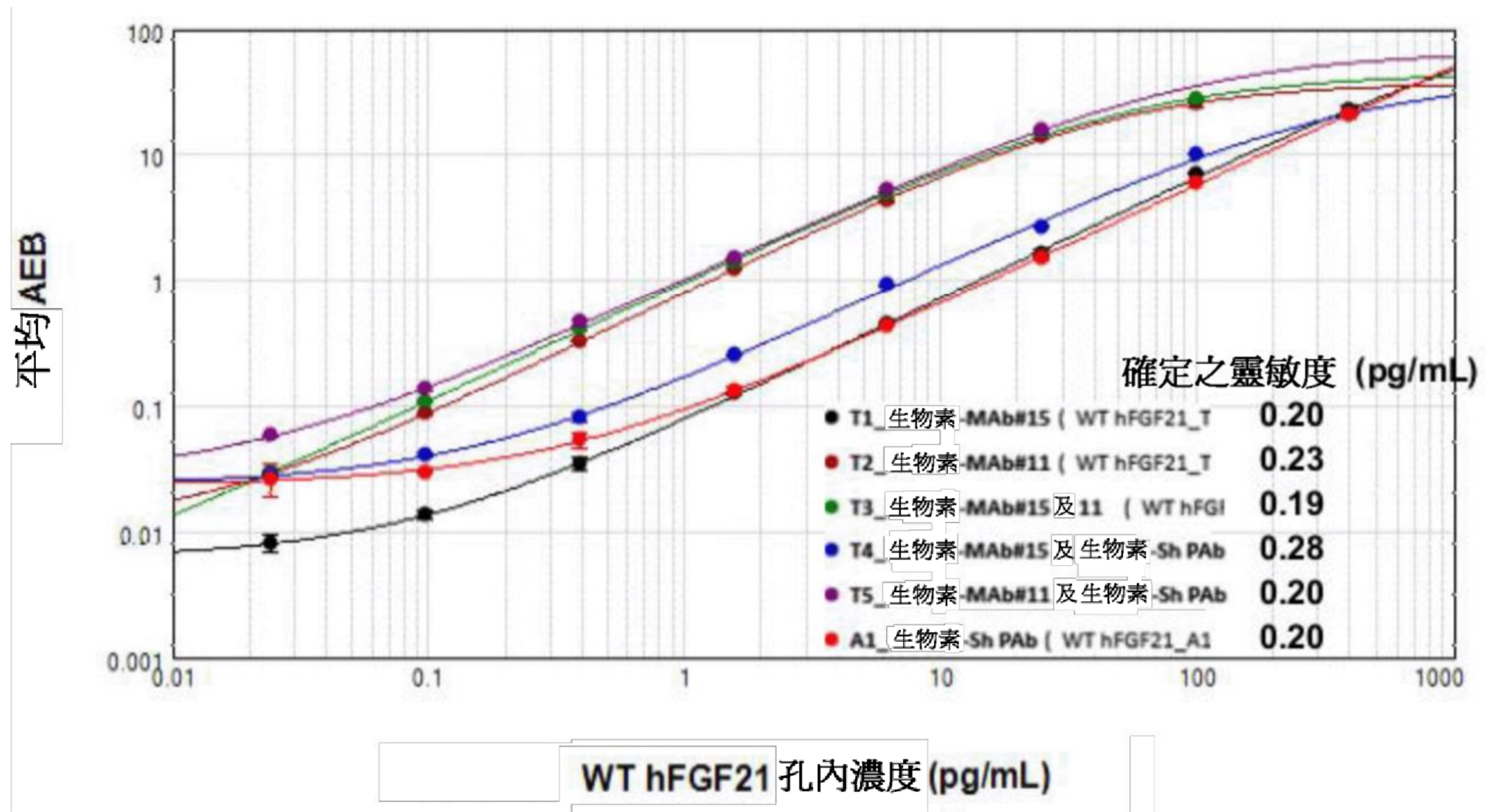
【圖 21】



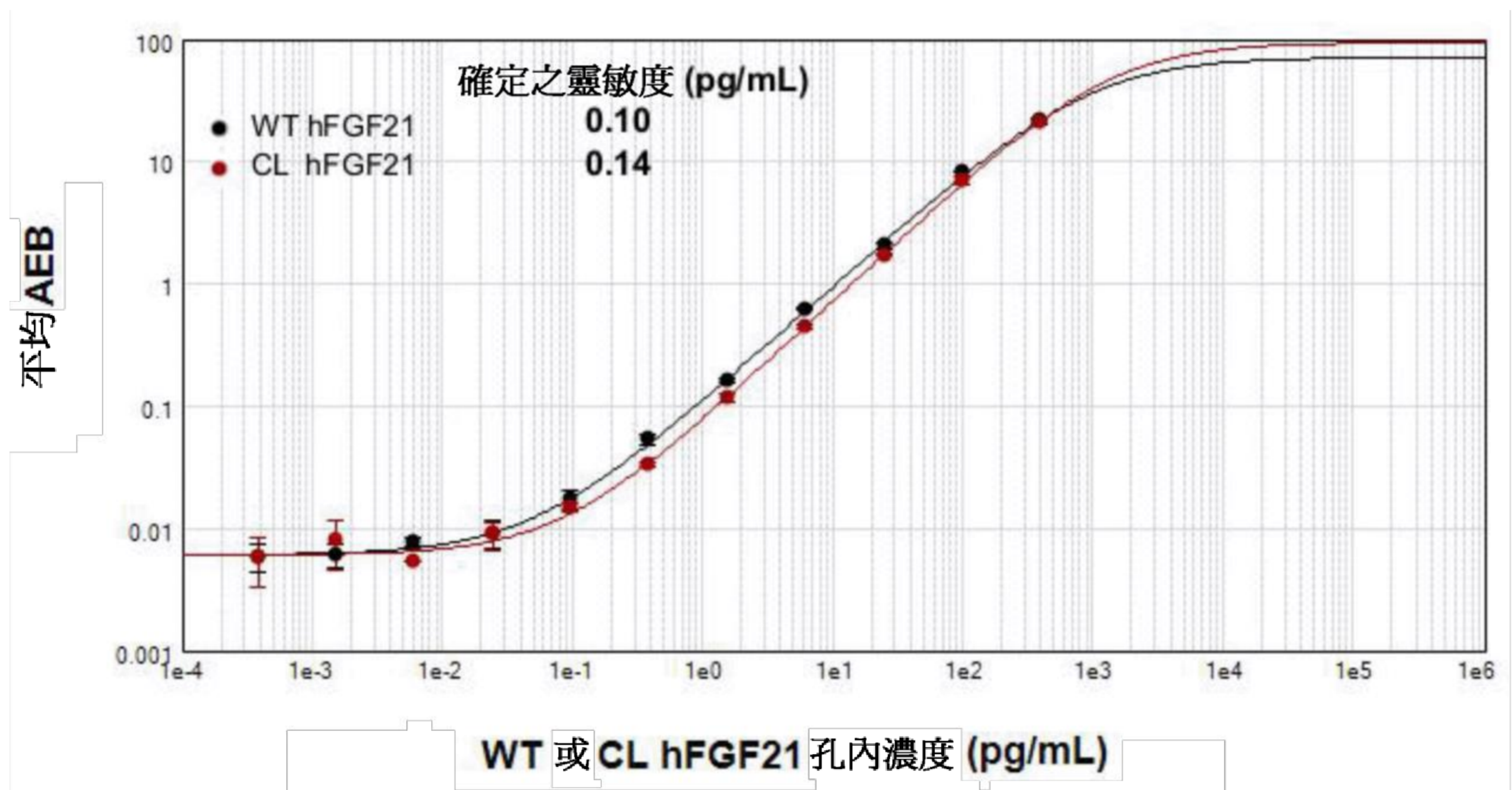
【圖 22】



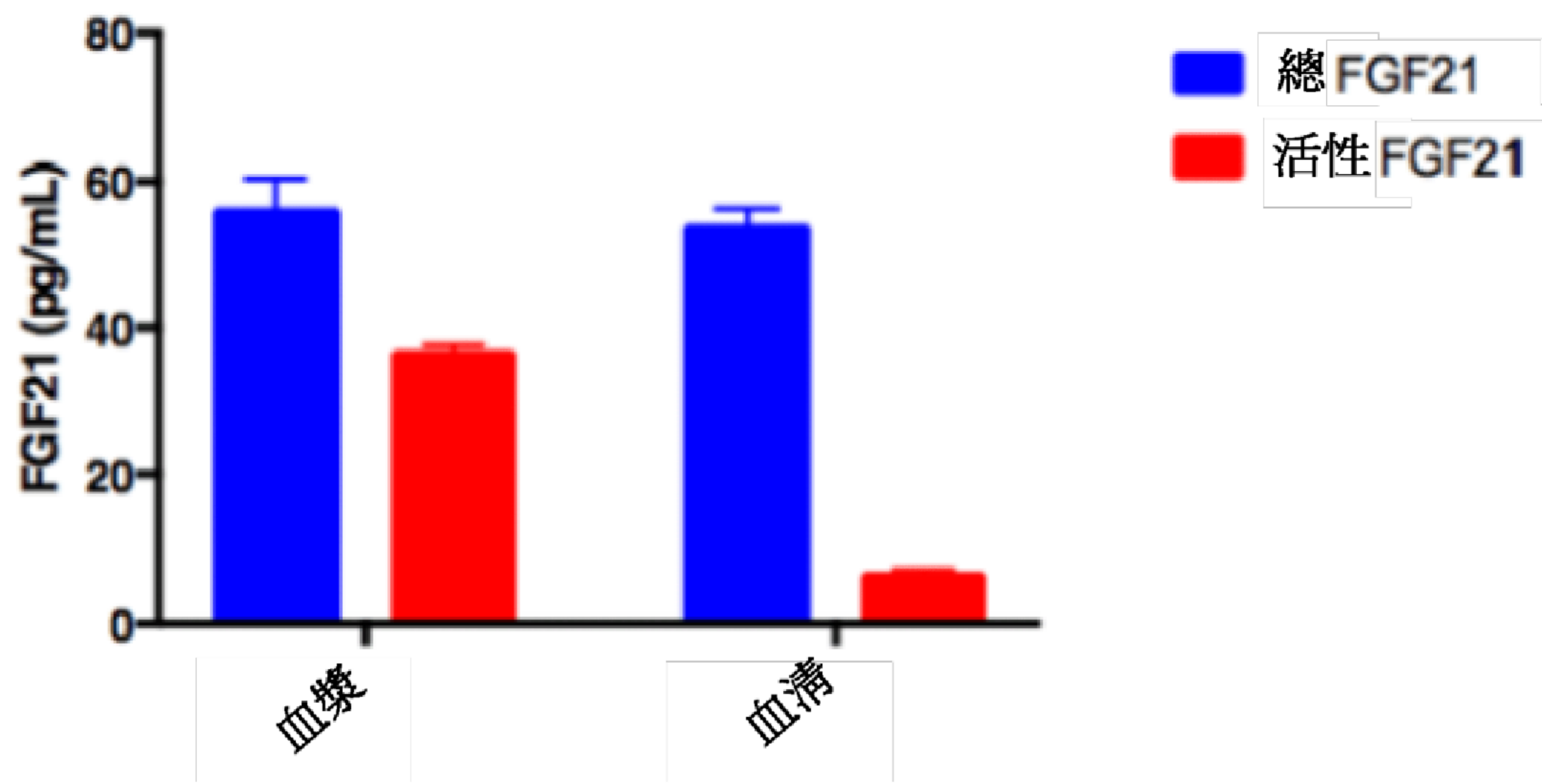
【圖 23】



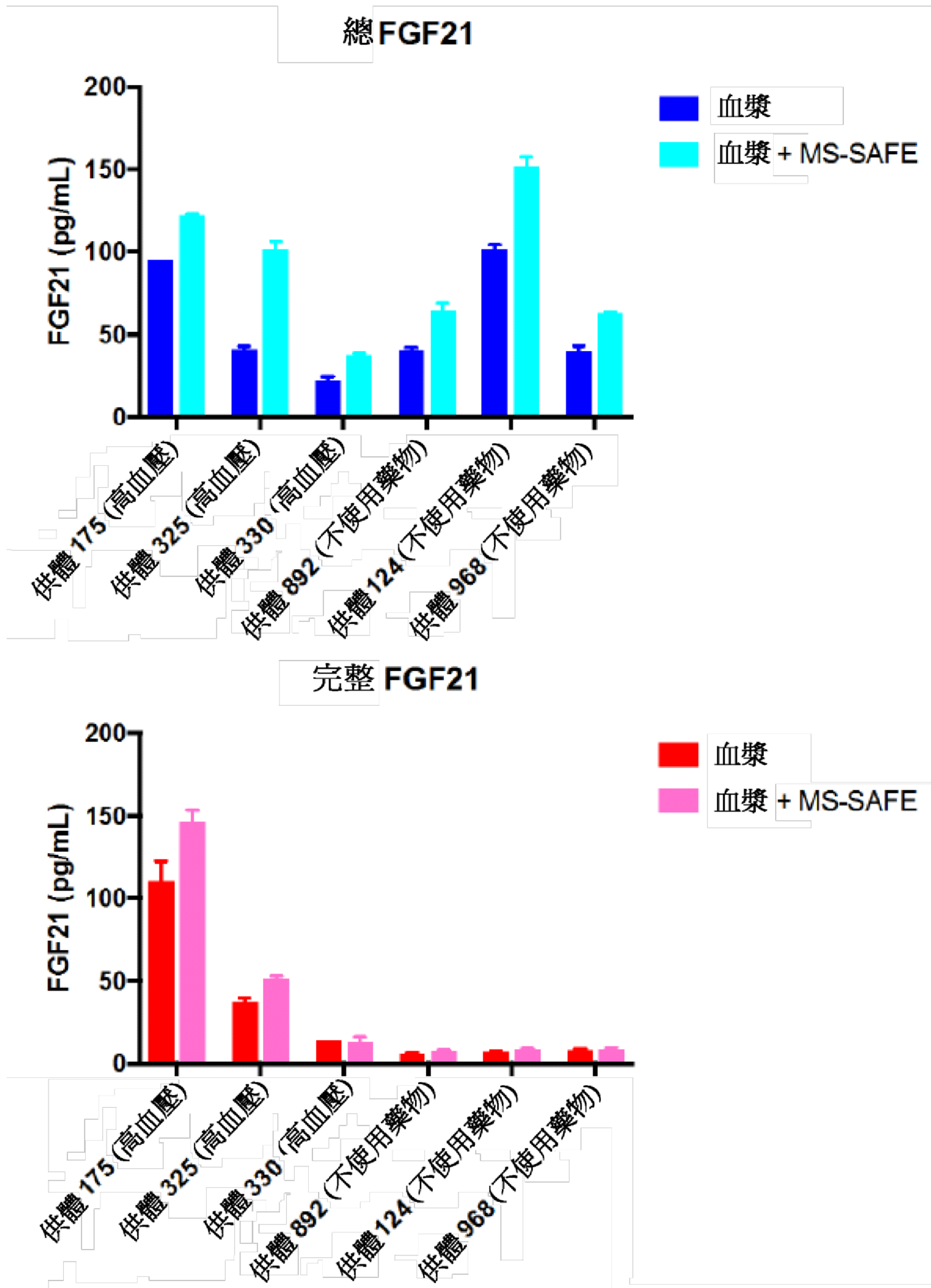
【圖 24】



【圖 25】



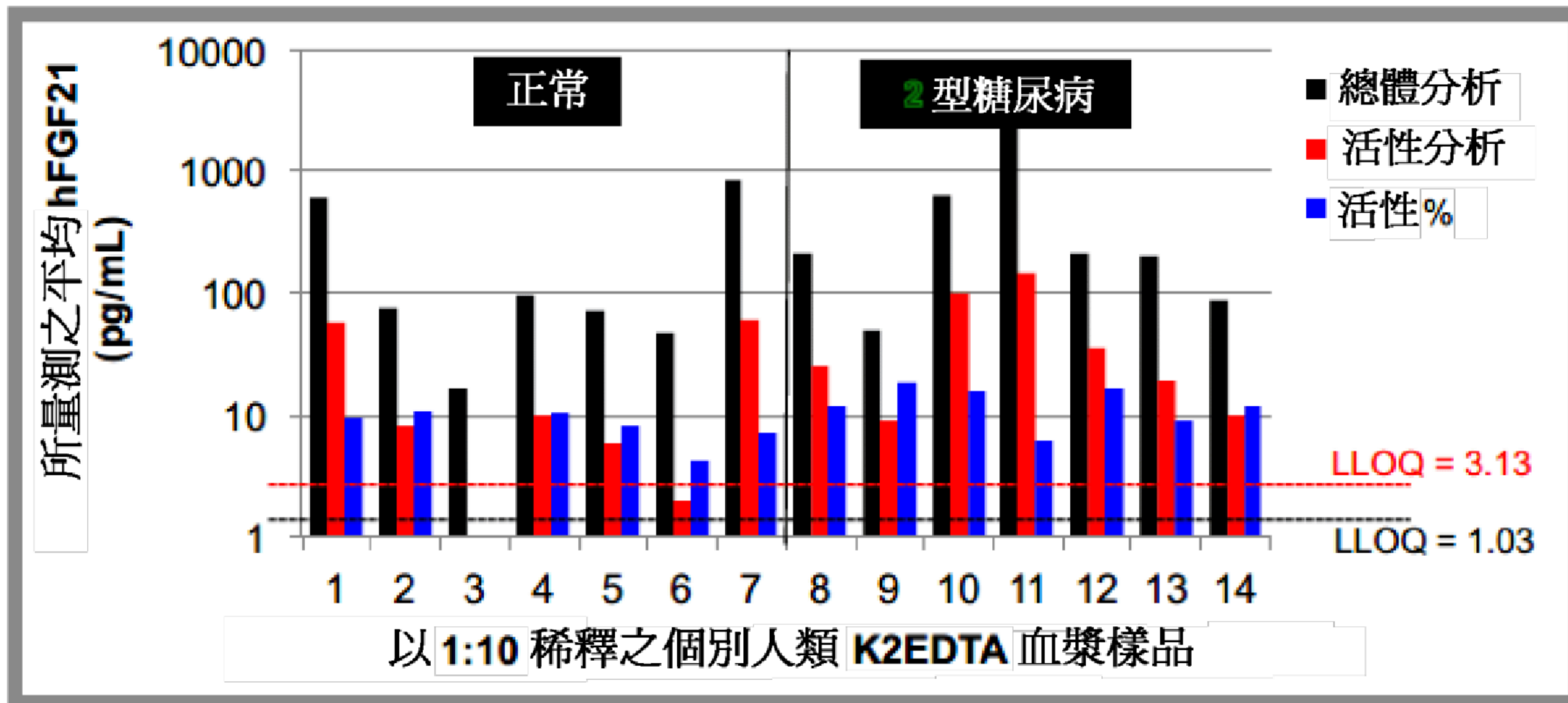
【圖 26】



【圖 27】

總體及活性 hFGF21 分析中之可偵測性(第1天)

	K <sub>2</sub> EDTA 血漿樣品	總體分析	活性分析	活性 %
正常	1	596	56	9
	2	75	8	11
	3	17	0	0
	4	96	10	10
	5	73	6	8
	6	47	2	4
	7	841	60	7
2型糖尿病	8	210	25	12
	9	49	9	18
	10	635	102	16
	11	2389	144	6
	12	216	36	17
	13	207	19	9
	14	85	10	12

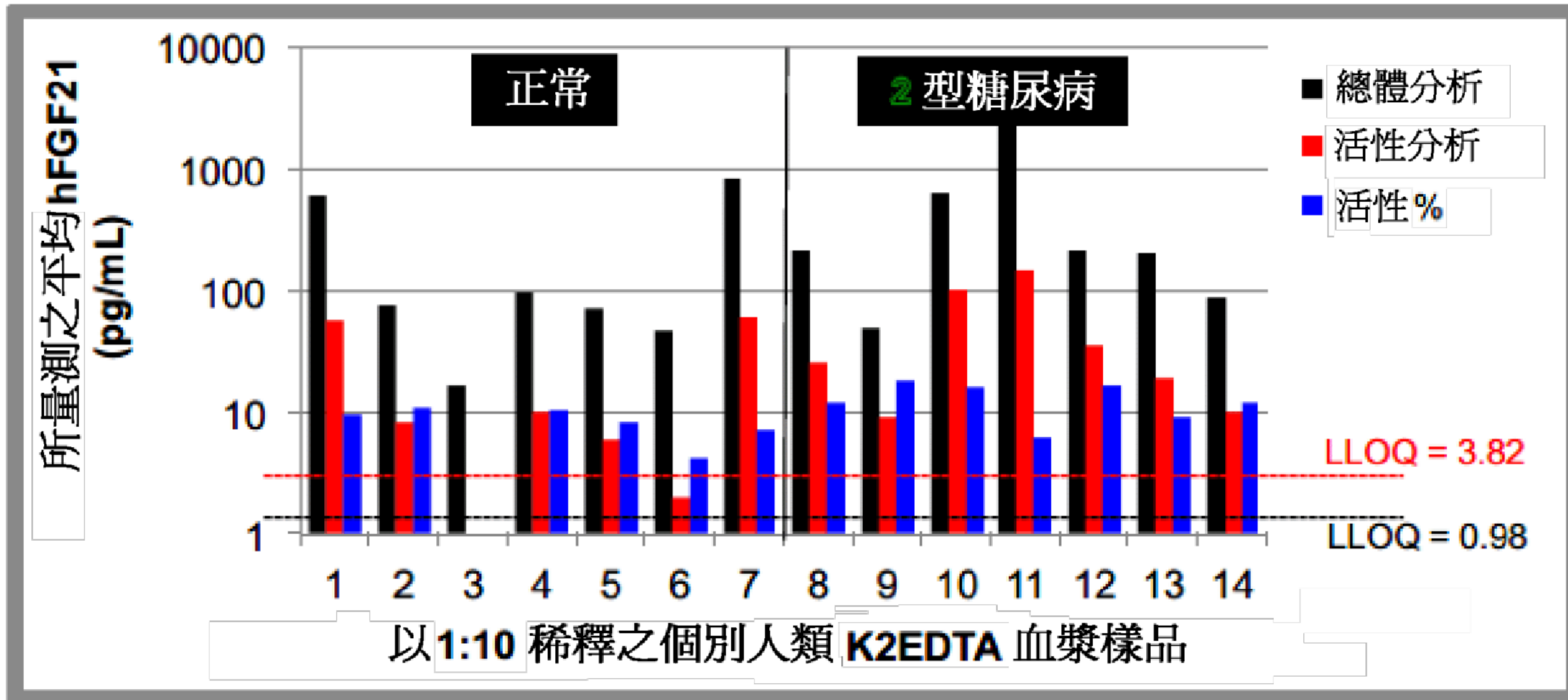


- 總體分析中之可偵測性為 **14/14 (100%)** 且活性分析中為 **12/14 (86%)**。

【圖 28A】

總體及活性 hFGF21 分析中之可偵測性(第2天)

	K <sub>2</sub> EDTA 血漿樣品	總體分析	活性分析	活性%
正常	1	596	56	9
	2	75	8	11
	3	17	0	0
	4	96	10	10
	5	73	6	8
	6	47	2	4
	7	841	60	7
2型糖尿病	8	210	25	12
	9	49	9	18
	10	635	102	16
	11	2389	144	6
	12	216	36	17
	13	207	19	9
	14	85	10	12



- 總體分析中之可偵測性為 14/14 (100%) 且活性分析中為 12/14 (86%)。

【圖 28B】

	K <sub>2</sub> EDTA 血漿樣品	總體分析 (pg/ml)			活性分析 (pg/ml)		
		第1天	第2天	差異%	第1天	第2天	差異%
正常	1	596	345	-42	56	51	-9
	2	75	82	9	8	10	25
	3	17	19	12	0	0	不可獲知
	4	96	93	-3	10	10	0
	5	73	75	3	6	6	0
	6	47	52	11	2	2	0
	7	841	787	-6	60	73	22
2型糖尿病	8	210	255	21	25	30	20
	9	49	57	16	9	11	22
	10	635	620	-2	102	124	22
	11	2389	2163	-9	144	171	19
	12	216	251	16	36	45	25
	13	207	202	-2	19	24	26
	14	85	89	5	10	13	30

【圖 29】

	K <sub>2</sub> EDTA 血漿樣品	稀釋度	總體分析			活性分析		
			hFGF21 (pg/mL)	相較於MRD 之回收率%	相較於MRD 之變化%	hFGF21 (pg/mL)	相較於MRD 之回收率%	相較於MRD 之變化%
2 型糖尿病	1	20	112	100	0	27	100	0
		40	110	98	-2	23	86	-14
		80	102	91	-9	16	58	-42
		160	96	86	-14	低於所需值	不可獲知	不可獲知
		320	98	88	-12	低於所需值	不可獲知	不可獲知
		640	108	97	-3	低於所需值	不可獲知	不可獲知
		1280	低於所需值	不可獲知	不可獲知	低於所需值	不可獲知	不可獲知
		2560	低於所需值	不可獲知	不可獲知	低於所需值	不可獲知	不可獲知
	2	20	185	100	0	37	100	0
		40	171	92	-8	34	92	-8
		80	163	88	-12	24	65	-35
		160	157	85	-15	23	63	-37
		320	158	85	-15	低於所需值	不可獲知	不可獲知
		640	171	92	-8	低於所需值	不可獲知	不可獲知
		1280	152	82	-18	低於所需值	不可獲知	不可獲知
		2560	低於所需值	不可獲知	不可獲知	低於所需值	不可獲知	不可獲知
	3	20	215	100	0	49	100	0
		40	194	90	-10	42	86	-14
		80	193	90	-10	35	70	-30
		160	186	86	-14	22	45	-55
		320	197	92	-8	低於所需值	不可獲知	不可獲知
		640	183	85	-15	低於所需值	不可獲知	不可獲知
		1280	217	101	1	低於所需值	不可獲知	不可獲知
		2560	低於所需值	不可獲知	不可獲知	低於所需值	不可獲知	不可獲知
	4	20	133	100	0	13	100	0
		40	143	108	8	13	96	-4
		80	132	100	0	低於所需值	不可獲知	不可獲知
		160	125	94	-6	低於所需值	不可獲知	不可獲知
320		106	80	-20	低於所需值	不可獲知	不可獲知	
640		111	84	-16	低於所需值	不可獲知	不可獲知	
1280		低於所需值	不可獲知	不可獲知	低於所需值	不可獲知	不可獲知	
2560		低於所需值	不可獲知	不可獲知	低於所需值	不可獲知	不可獲知	

【圖 30】

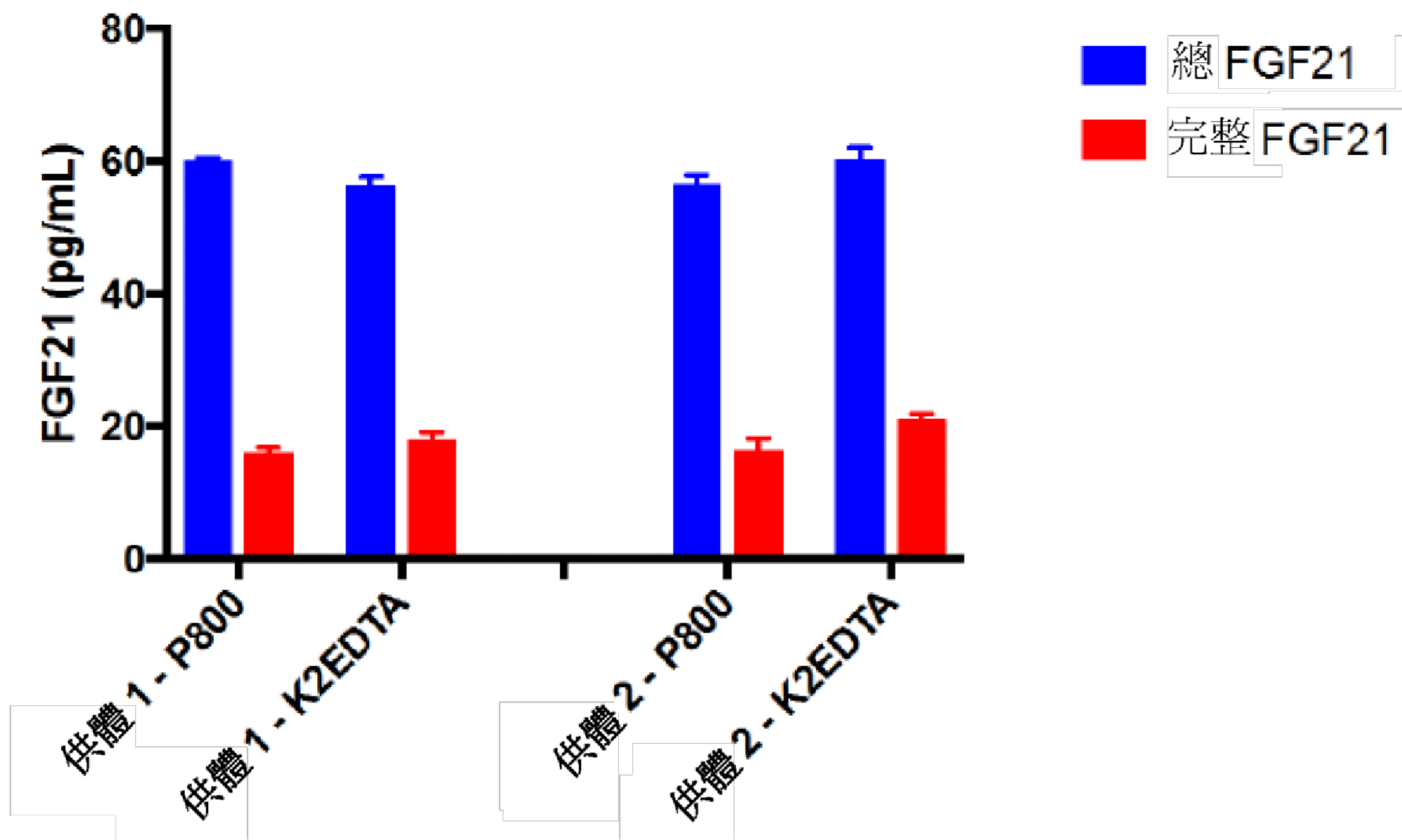
K <sub>2</sub> EDTA 血漿樣品	稀釋度	總體分析			活性分析			
		hFGF21 (pg/mL)	相較於MRD 之回收率%	LLOQ (pg/mL)	hFGF21 (pg/mL)	相較於 MRD 之回收率%	LLOQ (pg/mL)	
2 型糖尿病	1	20	112	100	27	100	0.583	
		40	110	98	23	86		
		80	102	91	16	58		
		160	96	86	低於所需值	不可獲知		
		320	98	88	低於所需值	不可獲知		
		640	108	97	0.169	低於所需值		不可獲知
		1280	低於所需值	不可獲知	低於所需值	不可獲知		
		2560	低於所需值	不可獲知	低於所需值	不可獲知		
	2	20	185	100	37	100	0.851	
		40	171	92	34	92		
		80	163	88	24	65		
		160	157	85	23	63		
		320	158	85	低於所需值	不可獲知		
		640	171	92	低於所需值	不可獲知		
		1280	152	89	0.119	低於所需值		不可獲知
		2560	低於所需值	不可獲知	低於所需值	不可獲知		
	3	20	215	100	49	100	0.432	
		40	194	90	42	86		
		80	193	90	35	70		
		160	186	86	22	45		
		320	197	92	低於所需值	不可獲知		
		640	183	85	低於所需值	不可獲知		
		1280	217	112	0.169	低於所需值		不可獲知
		2560	低於所需值	不可獲知	低於所需值	不可獲知		
	4	20	133	100	13	100	0.321	
		40	143	108	13	96		
		80	132	100	低於所需值	不可獲知		
		160	125	94	低於所需值	不可獲知		
320		106	80	低於所需值	不可獲知			
640		111	84	0.173	低於所需值	不可獲知		
1280		低於所需值	不可獲知	低於所需值	不可獲知			
2560		低於所需值	不可獲知	低於所需值	不可獲知			
		平均值	0.158		平均值	0.547		
		SD	0.026		SD	0.230		
		%CV	16.5		%CV	42.0		
針對1:20 稀釋度校正之最終 LLOQ:				3.15			10.94	

【圖 31】

2型糖尿病 K <sub>2</sub> EDTA 血漿樣品	稀釋度	總體分析					活性分析				
		單獨樣品		樣品 + 10 µg/mL MAb #4		抑制 % (AEB)	單獨樣品		樣品 + 10 µg/mL MAb #4		抑制 % (AEB)
		平均 AEB	hFGF21 (pg/mL)	平均 AEB	hFGF21 (pg/mL)		平均 AEB	hFGF21 (pg/mL)	平均 AEB	hFGF21 (pg/mL)	
1	20	1.90	565	0.051	9	97	0.32	71	0.020	低於所需值	94
2	20	4.02	1321	0.015	低於所需值	100	1.07	284	0.015	低於所需值	99
3	20	12.03	4730	0.034	5	100	1.44	394	0.023	低於所需值	98
4	20	1.84	546	0.022	3	99	0.47	110	0.022	低於所需值	95
5	20	1.52	439	0.011	低於所需值	99	0.29	62	0.020	低於所需值	93
6	20	0.82	220	0.004	低於所需值	99	0.17	31	0.016	低於所需值	91

【圖 32】

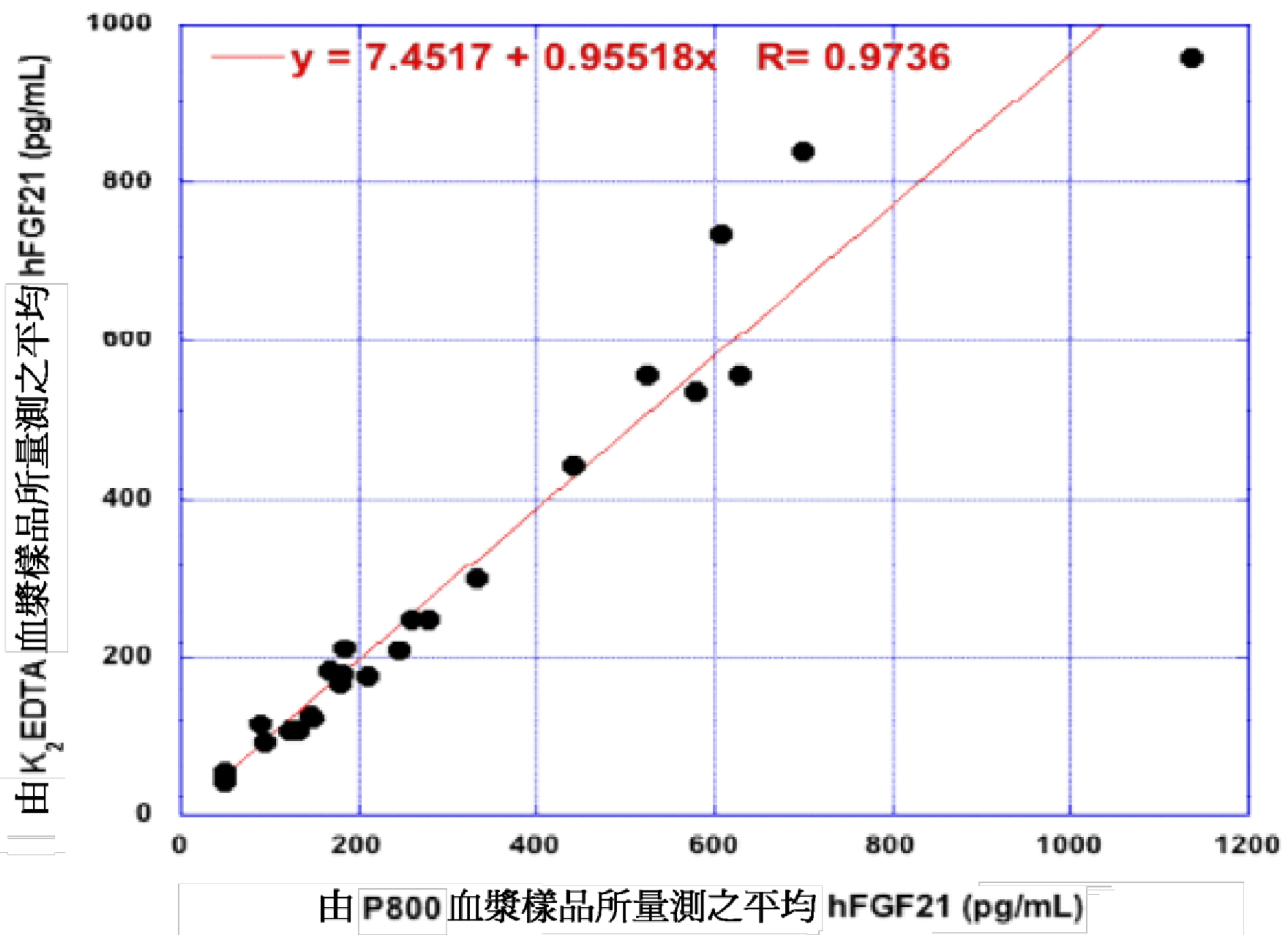
### P800 相較於 K2EDTA



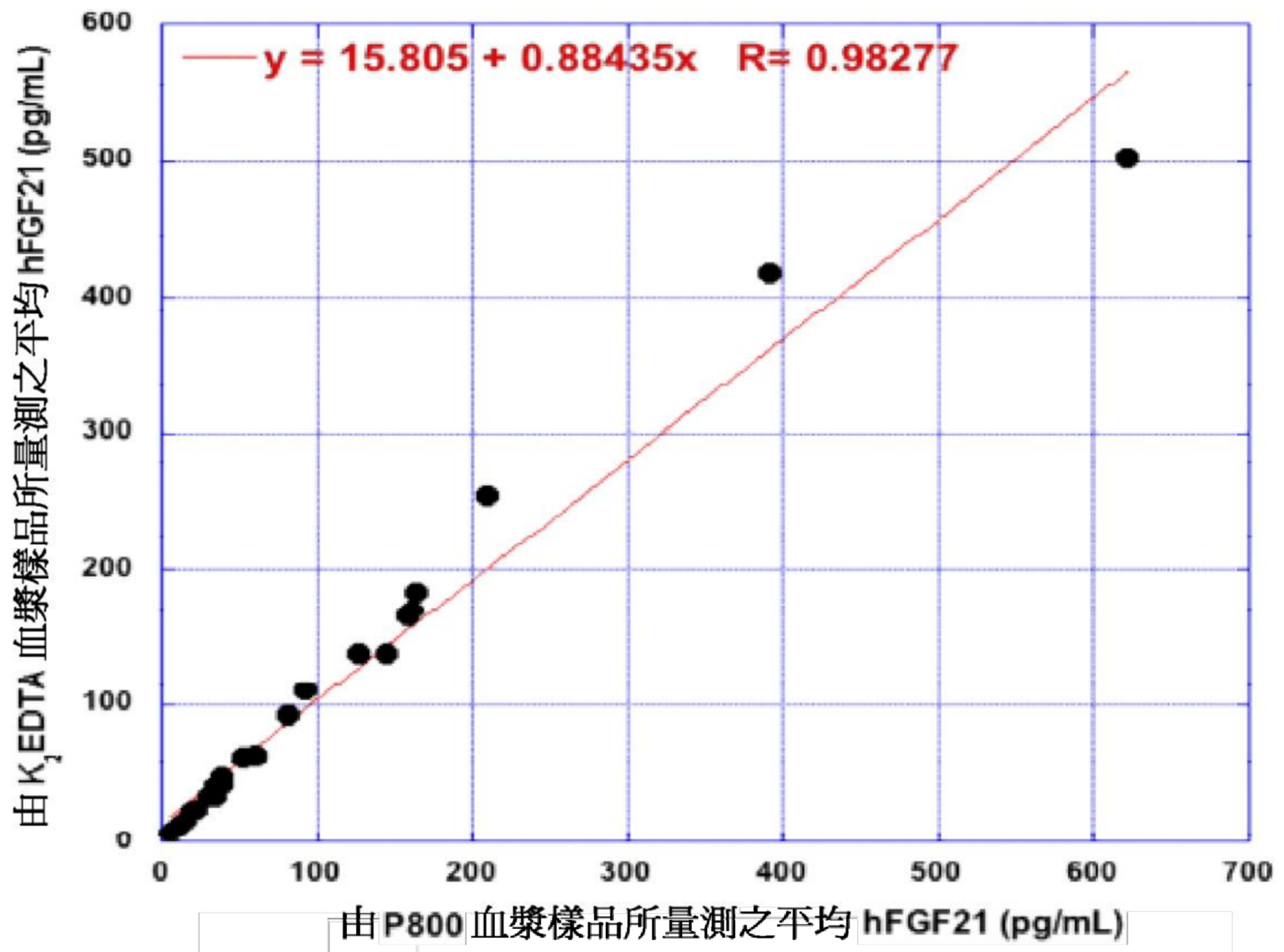
【圖 33】

血漿樣品	總體分析 (pg/ml)			活性分析 (pg/ml)			
	P800	K <sub>2</sub> EDTA	差異%	P800	K <sub>2</sub> EDTA	差異%	
GC23819 研究患者篩選樣品	1	91	117	29	11	12	4
	2	607	735	21	145	138	-5
	3	169	184	9	35	34	-4
	4	49	57	16	低於所需值	低於所需值	不可獲知
	5	低於所需值	99	不可獲知	低於所需值	13	不可獲知
	6	185	212	15	39	43	11
	7	699	840	20	158	166	5
	8	179	167	-7	39	49	27
	9	1137	959	-16	209	255	22
	10	628	557	-11	162	170	5
	11	334	298	-11	164	183	11
	12	122	108	-12	20	23	16
	13	147	128	-13	22	25	15
	14	181	179	-1.2	30	35	16
	15	279	248	-11	61	64	5
	16	132	109	-17	391	418	7
	17	259	249	-4	622	502	-19
	18	442	444	0.3	82	93	13
	19	579	536	-7	127	138	9
	20	148	125	-15	20	24	17
	21	49	47	-5	5	7	51
	22	247	209	-15	53	62	17
	23	211	177	-16	35	41	16
	24	524	557	6	93	110	18
	25	95	94	-2	15	16	8
平均值	312	297		110	109		
SD	263	257		143	127		
%CV	84	86		129	117		

【圖 34】



【圖 35】

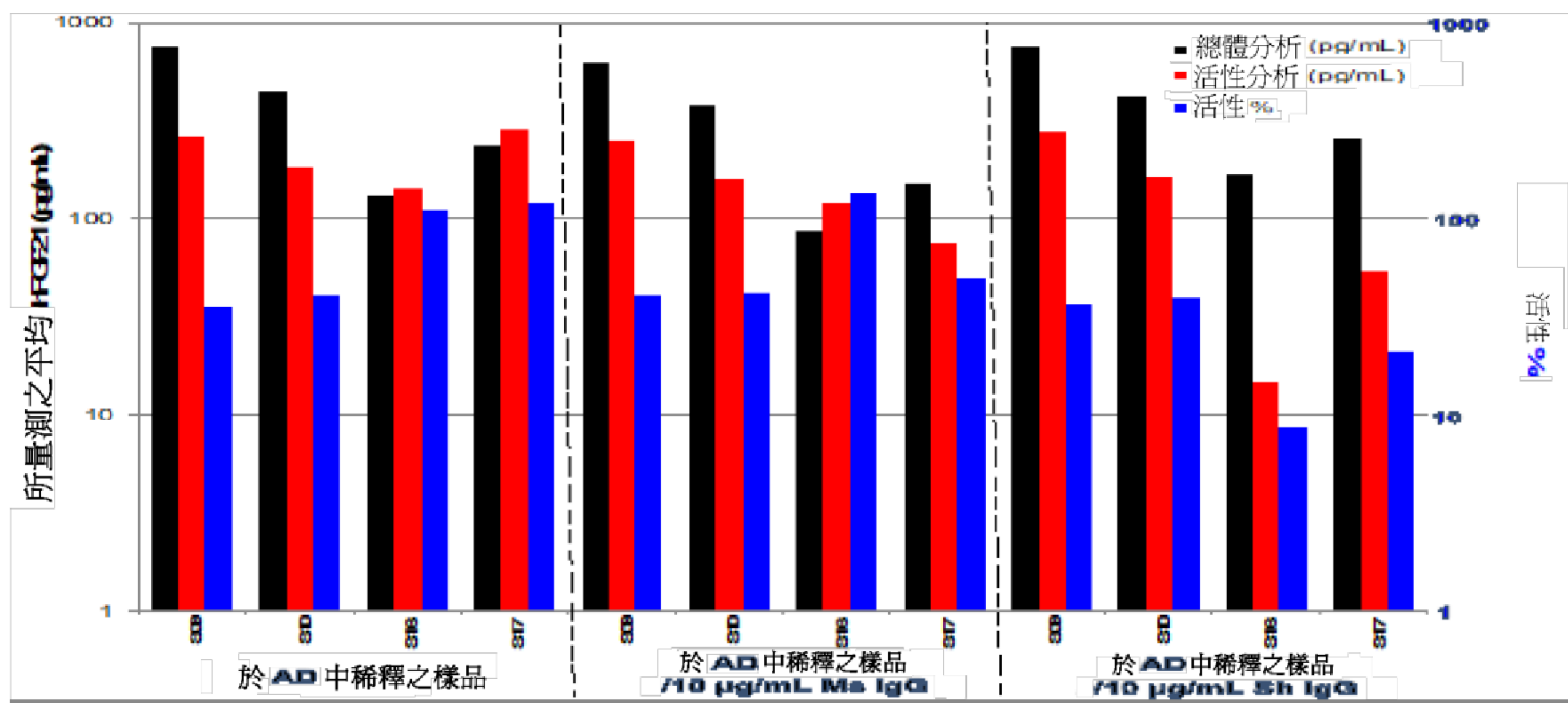


【圖 36】

	個體編號	P800血漿 穩定性樣品	總體分析	相較於 2-8°C 之回收率%	活性分析	相較於 2-8°C 之回收率%	活性%
GC29819 研究患者篩選樣品	含 1 ng/mL WT hFGF21 之 AD	2-8°C	1064	100	885	100	83
		1X F/T	1000	94	853	96	85
		2X F/T	1016	95	837	95	82
		3X F/T	1009	95	843	95	84
	20008	2-8°C	425	100	80	100	19
		1X F/T	418	98	96	120	23
		2X F/T	422	99	94	118	22
		3X F/T	427	101	97	122	23
	20027	2-8°C	135	100	29	100	22
		1X F/T	121	90	24	82	20
		2X F/T	118	87	24	82	20
		3X F/T	120	89	23	79	19
	20024	2-8°C	480	100	107	100	22
		1X F/T	452	94	103	96	23
		2X F/T	425	89	96	90	23
		3X F/T	451	94	102	95	23
	20029	2-8°C	122	100	28	100	23
		1X F/T	106	87	24	86	22
		2X F/T	113	92	23	83	20
		3X F/T	104	85	22	81	21
	20036	2-8°C	218	100	86	100	39
		1X F/T	199	91	66	77	33
		2X F/T	191	88	63	73	33
		3X F/T	193	88	66	77	34

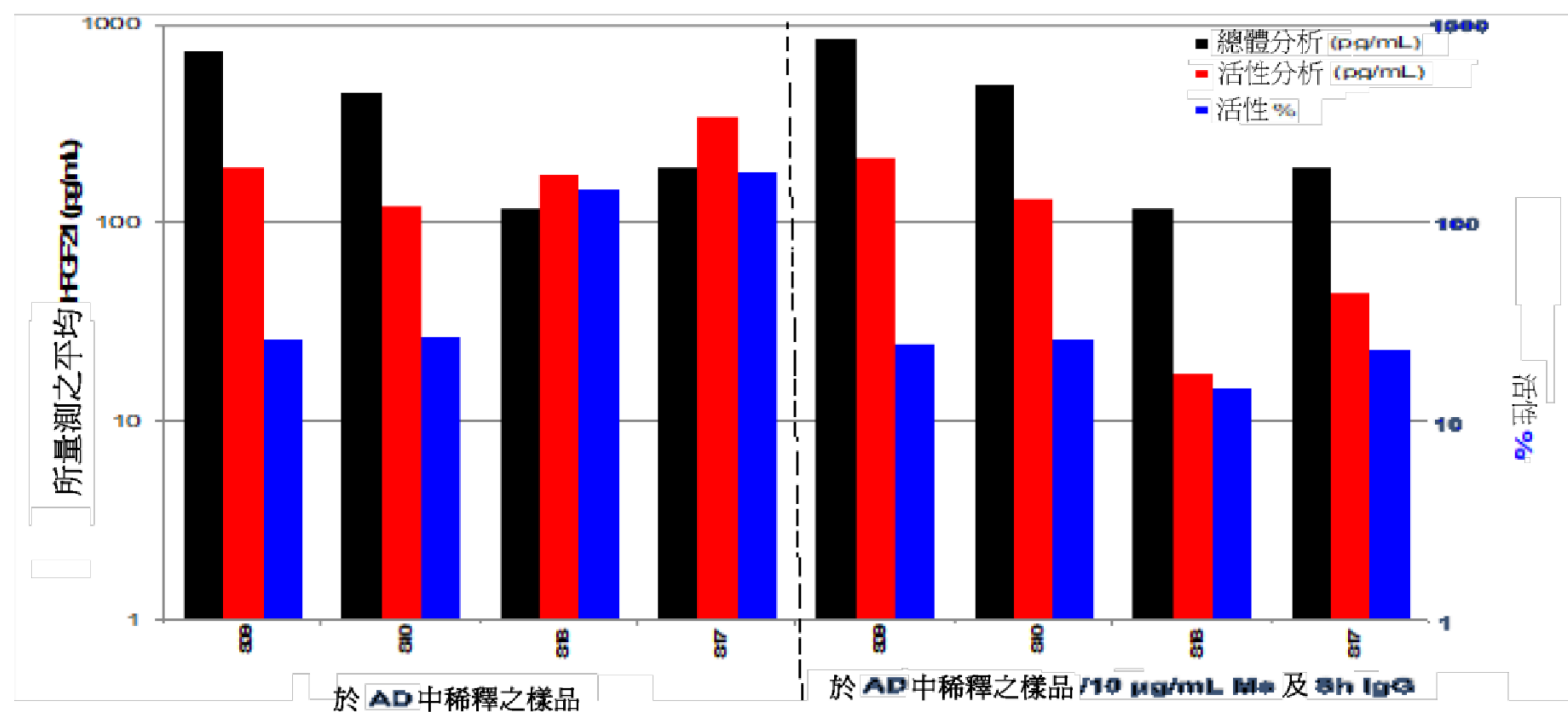
【圖 37】

樣品稀釋劑	GC29819 K <sub>2</sub> EDTA 樣品	總體分析 (pg/mL)	活性分析 (pg/mL)	活性%
分析稀釋劑	S09	764	268	35
	S10	446	182	41
	S16	130	145	112
	S17	238	290	122
分析稀釋劑/10 µg/mL MsIgG	S09	629	254	40
	S10	378	162	43
	S16	88	121	138
	S17	151	75	49
分析稀釋劑/10 µg/mL ShIgG	S09	755	277	37
	S10	420	167	40
	S16	170	15	9
	S17	254	54	21

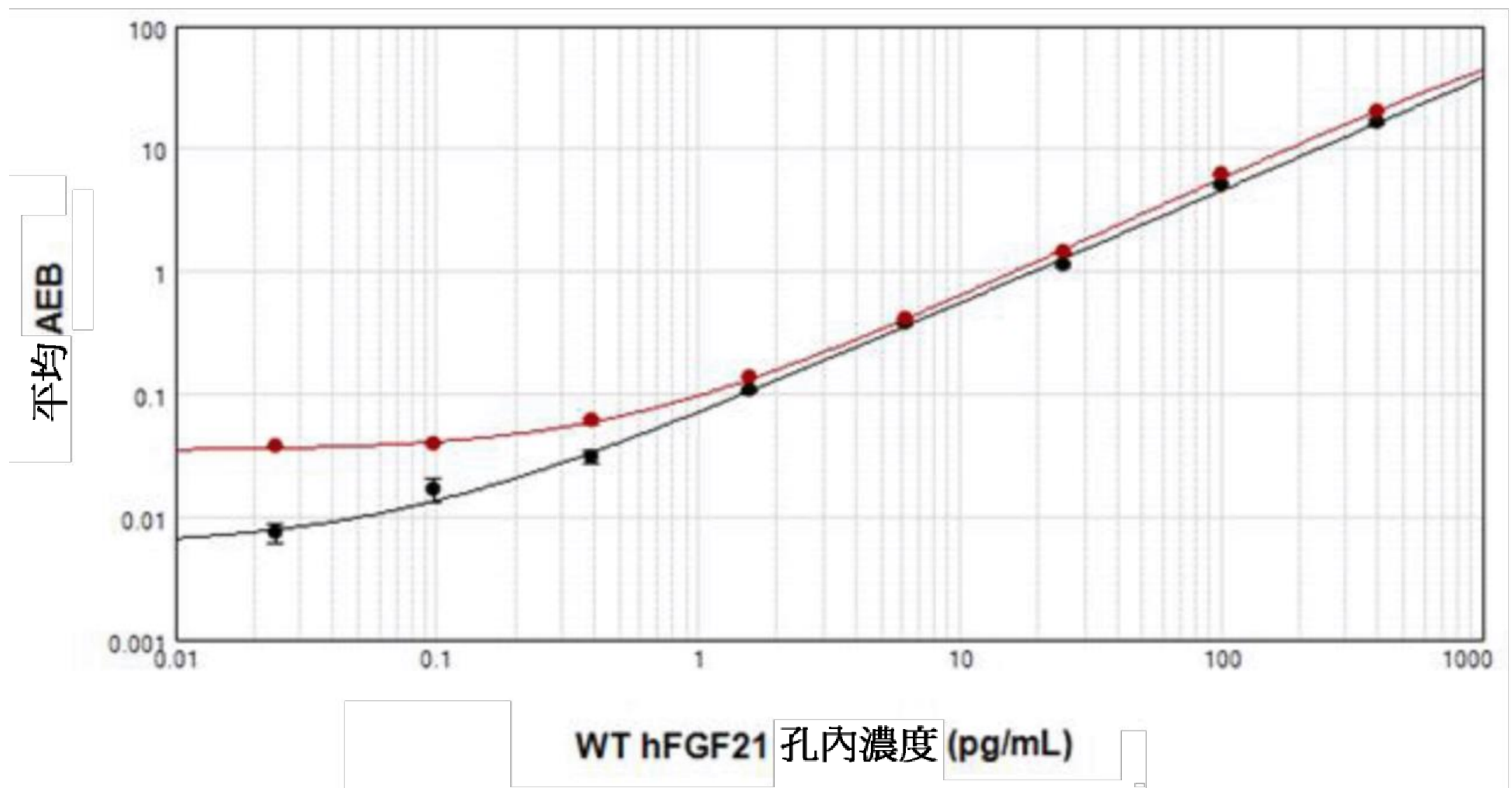


【圖 38】

樣品稀釋劑	GC29819 K <sub>2</sub> EDTA 樣品	總體分析 (pg/mL)	活性分析 (pg/mL)	活性%
分析稀釋劑	S09	738	190	26
	S10	461	122	27
	S16	118	173	146
	S17	191	347	182
分析稀釋劑/10 µg/mL Ms 及 Sh IgG	S09	848	209	25
	S10	501	131	26
	S16	119	18	15
	S17	190	44	23



【圖 39】



【圖 40】

根據 Kabat 定義之 CDR 序列加下劃線

輕鏈可變區

Kabat 編號	CDR L1 - 接點																																									
	CDR L1 - Chothia CDR L1 - Kabat																																									
FGF21.GN36.4.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
FGF21.GN36.9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
FGF21.GN36.11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
FGF21.GN36.15	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
FGF21.GN36.4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
FGF21.GN36.9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
FGF21.GN36.11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
FGF21.GN36.15	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37

Kabat 編號	CDR L2 - 接點																																									
	CDR L2 - Chothia CDR L2 - Kabat																																									
FGF21.GN36.4.	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
FGF21.GN36.9	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
FGF21.GN36.11	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
FGF21.GN36.15	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
FGF21.GN36.4	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
FGF21.GN36.9	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
FGF21.GN36.11	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
FGF21.GN36.15	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79

Kabat 編號	CDR L3 - 接點																													
	CDR L3 - Chothia CDR L3 - Kabat																													
FGF21.GN36.4.	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
FGF21.GN36.9	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
FGF21.GN36.11	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
FGF21.GN36.15	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
FGF21.GN36.4	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
FGF21.GN36.9	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
FGF21.GN36.11	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
FGF21.GN36.15	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107

【圖 41A】

重鏈可變區

Kabat 編號	CDR H1 - 接點																																									
	CDR H1 - Chothia					CDR H1 - Kabat																																				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
FGF21.GN36.4.	E	V	K	L	V	E	S	G	G	D	L	V	K	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	T	P	D
FGF21.GN36.9	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	I	P	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	M	G	W	V	K	Q	S	H	G	
FGF21.GN36.11	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	A	R	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	N	Y	G	I	S	W	V	K	Q	R	T	G
FGF21.GN36.15	Q	V	Q	L	I	Q	S	G	P	G	L	V	Q	P	S	Q	S	L	S	I	T	C	T	V	S	G	F	S	L	T	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	S	P	G
FGF21.GN36.4	E	V	K	L	V	E	S	G	G	D	L	V	K	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	T	P	D
FGF21.GN36.9	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	I	P	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	M	G	W	V	K	Q	S	H	G	
FGF21.GN36.11	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	A	R	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	N	Y	G	I	S	W	V	K	Q	R	T	G
FGF21.GN36.15	Q	V	Q	L	I	Q	S	G	P	G	L	V	Q	P	S	Q	S	L	S	I	T	C	T	V	S	G	F	S	L	T	G	Y	A	I	H	W	V	R	Q	S	P	G

Kabat 編號	CDR H2 - 接點																																									
	CDR H2 - Chothia					CDR H2 - Kabat																																				
43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a	
FGF21.GN36.4.	K	R	L	E	W	V	A	T	I	S	T	G	G	G	Y	T	Y	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	
FGF21.GN36.9	K	S	L	E	W	I	G	D	I	N	P	N	N	G	V	T	I	N	N	Q	N	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	E	L	R
FGF21.GN36.11	Q	G	L	E	W	I	G	E	I	Y	P	R	S	D	N	T	Y	Y	N	E	K	F	K	G	K	A	T	L	T	A	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	E	L	R
FGF21.GN36.15	K	G	L	E	W	L	G	M	I	W	.	K	S	G	N	T	D	Y	N	A	A	F	M	S	R	L	S	I	T	K	D	N	S	K	S	Q	V	F	F	K	M	N
FGF21.GN36.4	K	R	L	E	W	V	A	T	I	S	T	G	G	G	Y	T	Y	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	
FGF21.GN36.9	K	S	L	E	W	I	G	D	I	N	P	N	N	G	V	T	I	N	N	Q	N	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	E	L	R
FGF21.GN36.11	Q	G	L	E	W	I	G	E	I	Y	P	R	S	D	N	T	Y	Y	N	E	K	F	K	G	K	A	T	L	T	A	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	E	L	R
FGF21.GN36.15	K	G	L	E	W	L	G	M	I	W	.	K	S	G	N	T	D	Y	N	A	A	F	M	S	R	L	S	I	T	K	D	N	S	K	S	Q	V	F	F	K	M	N

Kabat 編號	CDR H3 - 接點																																		
	CDR H3 - Chothia					CDR H3 - Kabat																													
82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	
FGF21.GN36.4.	S	L	R	S	E	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R	H	D	L	V	D	W	Y	F	D	V	W	G	T	G	T	T	V	T	V	S	S
FGF21.GN36.9	S	L	A	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	G	Y	G	G	A	L	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S
FGF21.GN36.11	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	T	R	S	D	Y	G	F	F	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S
FGF21.GN36.15	S	L	Q	A	D	D	T	A	I	Y	Y	C	A	R	N	G	Y	D	Y	E	F	.	V	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
FGF21.GN36.4	S	L	R	S	E	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R	H	D	L	V	D	W	Y	F	D	V	W	G	T	G	T	T	V	T	V	S	S
FGF21.GN36.9	S	L	A	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	G	Y	G	G	A	L	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S
FGF21.GN36.11	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	T	R	S	D	Y	G	F	F	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S
FGF21.GN36.15	S	L	Q	A	D	D	T	A	I	Y	Y	C	A	R	N	G	Y	D	Y	E	F	.	V	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S

【圖 41B】